



Helicobacter Pylori Eradikasyonu ile ADMA, SDMA ve L-NMMA Serum Düzeylerinin Değişimi

Changes in Serum Levels of ADMA, SDMA and L-NMMA with *Helicobacter Pylori* Eradication

Süleyman Baldane¹, Hüseyin Korkmaz², Süleyman Hilmi İpekçi¹, Mehmet Sözen³, Sedat Abuşoğlu⁴, Tarık Akar⁵, Ali Ünlü⁴, Levent Kebapçılar¹

¹Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Endokrinoloji Bilim Dalı, Konya, Türkiye

²Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Gastroenteroloji Bilim Dalı, Konya, Türkiye

³Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Konya, Türkiye

⁴Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Konya, Türkiye

⁵Bülent Ecevit Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı Gastroenteroloji Bilim Dalı, Zonguldak, Türkiye

Cite this article as: Baldane S, Korkmaz H, İpekçi SH, Sözen M, Abuşoğlu S, Akar T, et al. Changes in Serum Levels of ADMA, SDMA and L-NMMA with *Helicobacter Pylori* Eradication. JAREM 2017; 7: 132-4.

ÖZ

Amaç: Artmış asimetrik dimetil arjinin (ADMA) düzeyleri başta kardiyovasküler sistem olmak üzere birçok sistemde nitrik oksit (NO) düzeylerini azaltarak olumsuz etkilere neden olur. *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) enfeksiyonunun ADMA düzeylerinde artışa neden olduğu bilinmektedir. Bu çalışmanın amacı *H. pylori* ile enfekte bireylerde eradikasyon tedavisinin ADMA ve diğer metilarginin metabolizma ürünlerinin serum düzeylerine etkisini değerlendirmek olarak belirlendi.

Yöntemler: ¹⁴C üre nefes testi ve gaita antijen testlerinin her ikisinde pozitiflik tespit edilen hastalar *H. pylori* ile enfekte kabul edildi. Hastalara 14 günlük eradikasyon tedavisi (günde 2 kez 40 mg pantoprazol, günde iki kez 1000 mg amoksisilin ve günde iki kez 500 mg klaritromisin) verildi. Eradikasyon tedavisi öncesinde ve eradikasyon sağlanan hastalarda tedaviden 3 ay sonra ADMA, simetrik dimetil arjinin (SDMA) ve N-monometil-L-arjinin (L-NMMA) serum düzeylerinin ölçümü için kan örnekleri alındı.

Bulgular: Çalışmaya dahil edilen 45 hastadan 23'ü kadın ve 22'si erkek idi. Hastaların ortalama yaşı 32,4±8 idi. Hastaların serum ADMA, SDMA ve L-NMMA düzeylerinde eradikasyon tedavisi sonrasında, tedavi öncesine göre anlamlı düzeylerde azalma olduğu görüldü.

Sonuç: Bu çalışmada *H. pylori* eradikasyonu ile plazma ADMA, SDMA ve L-NMMA düzeylerinde anlamlı azalma olduğu gösterildi. *H. pylori* eradikasyonuna bağlı azalan serum ADMA, SDMA ve L-NMMA düzeylerinin, başta kardiyovasküler sistem olmak üzere bütün sistemlerde oluşturabileceği yararlı etkilerin değerlendirilmesi için geniş çaplı, uzun süreli çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar kelimeler: *Helicobacter pylori*, asimetrik dimetil arjinin, simetrik dimetil arjinin, N-monometil-L-arjinin

ABSTRACT

Objective: Increased asymmetric dimethylarginine (ADMA) levels are associated with reduced nitric oxide (NO) levels in many systems, particularly the cardiovascular system, and cause adverse effects. The objective of this study is to evaluate the effect of eradication therapy in patients infected with *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) on the serum level of ADMA and other metabolic products of methylarginine.

Methods: Patients who were found positive both in urea breath tests and stool antigen tests were considered to have *H. pylori* infection. These patients received eradication therapy for 14 days (twice daily pantoprazole 40 mg, twice daily amoxicillin 1000 mg, and twice daily clarithromycin 500 mg). Blood samples were taken to measure serum ADMA, symmetric dimethylarginine (SDMA), and N-monomethyl-L-arginine (L-NMMA) levels before eradication therapy and 3 months after the therapy for patients for whom eradication was achieved.

Results: A total of 23 of the 45 patients included in the study were female, whereas 22 were male. The mean age of the patients was 32.4±8 years. Significant reductions in the serum ADMA, SDMA, and L-NMMA levels of the patients were observed post-eradication therapy versus pre-eradication therapy.

Conclusion: This study demonstrated significant reductions in serum ADMA, SDMA, and L-NMMA levels with *H. pylori* eradication. Further extensive long-term studies are needed to evaluate the positive effects that reduced serum ADMA, SDMA, and L-NMMA levels after *H. pylori* eradication can have on all systems, particularly the cardiovascular system.

Keywords: *Helicobacter pylori*, asymmetric dimethylarginine, symmetric dimethylarginine, N-monomethyl-L-arginine

GİRİŞ

Nitrik oksit (NO), başlıca kardiyovasküler ve gastrointestinal sistem olmak üzere tüm sistemlerde güçlü vazodilatör etkiye sahip gaz yapıda bir moleküldür (1). NO gastrik mukozal kan akımında artış, asit salgısında inhibisyon ve fundus dilatasyonu gibi etkileri ile gastrik mukozal bütünlüğün sürdürülmesine önemli katkı sağlar ve mukoza koruyucu faktör olarak işlev görür (2-4). NO, L-arjinin aminoasidinden oksijen molekülünde yer aldığı, NO

sentetaz (NOS) enzimi ile katalizlenen, bir reaksiyon ile sentezlenir (5). Asimetrik dimetil arjinin (ADMA), L-arjinine oldukça benzer yapıdadır ve NOS enziminin yarışmalı inhibitörüdür. Artmış ADMA düzeyleri başta kardiyovasküler sistem olmak üzere birçok sistemde NO düzeyini azaltarak olumsuz etkilere neden olur (6).

Helicobacter pylori (*H. pylori*) gastrointestinal sistem mukozası içerisinde lokalize olarak yaşam boyu süren bir inflamasyon kaynağı oluşturur. Klinik ve deneysel çalışmalar ile *H. pylori* enfeksiyo-

nunun ADMA düzeylerinde artışa neden olduğu gösterilmiştir (6). Literatürde endotel disfonksiyonu gelişiminde ADMA'nın önemi-ne dair birçok çalışma mevcut olmasına rağmen *H. pylori* enfeksiyonu ile ADMA düzeyleri arasındaki ilişkiyi değerlendiren çok az sayıda çalışma mevcuttur (7-9). Bu çalışmanın amacı *H. pylori* ile enfekte bireylerde eradikasyon tedavisinin ADMA, simetrik dime-til arjinin (SDMA) ve N-monometil-L-arjinin (L-NMMA)'nın serum düzeylerine etkisini değerlendirmek olarak belirlendi.

YÖNTEMLER

Üniversitemizin Gastroenteroloji Bilim Dalı polikliniğine dispeptik yakınmalar ile başvuran 18-45 yaş aralığında 45 hasta çalışmaya dahil edildi. *H. pylori* için daha önce eradikasyon tedavisi ve son bir ay içinde antiülser ilaç tedavisi kullanan hastalar, hipertansiyon, diabetes mellitus, serebrovasküler hastalık ve iskemik kalp hastalığı olan hastalar, malignitesi olan hastalar, hepatik veya renal yetmezlikli hastalar, inflamatuvar veya enfeksiyöz hastalığı olan hastalar, gastrik cerrahi öyküsü olan hastalar ve gebe veya emziren hastalar çalışmadan dışlandı.

Çalışma, Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu'nun 2013/287 sayılı izni ile gerçekleştirildi ve çalışmaya dahil edilen tüm bireylerden aydınlatılmış onam formu alındı.

Helicobacter pylori enfeksiyonu tanısı ve eradikasyon kontrolü için ¹⁴C üre nefes testi ve gaita antijen testleri kullanıldı. Çalışmanın başında *H. pylori* enfeksiyonu tanısı için ve 14 günlük eradikasyon tedavisinin bitiminden itibaren 3 ay sonra eradikasyon kontrolü için olmak üzere iki kez ¹⁴C üre nefes testi ve gaita antijen testi yapıldı. Çalışmanın başında her iki test için pozitif sonuç alınan hastalar enfekte kabul edilerek çalışmaya dahil edildi. Eradikasyon tedavisi sonrası 3. ayda her iki testi negatif sonuçlanan hastalarda eradikasyon sağlandığı kabul edildi. Çalışmaya dahil edilen 45 hastadan 29 hastada eradikasyon sağlandığı görüldü. Eradikasyon öncesi 45 hastanın ve eradikasyon sağlanan 29 hastanın serum ADMA, SDMA, L-NMMA düzeyleri karşılaştırıldı.

Çalışmaya dahil edilen tüm hastalara eradikasyon rejimi olarak 14 gün süre ile günde 2 kez 40 mg pantoprazol, günde iki kez 1000 mg amoksisilin ve günde iki kez 500 mg klaritromisin tedavisi peroral yoldan verildi.

Asimetrik dimetil arjinin, SDMA ve L-NMMA serum düzeyleri çalışmanın başında ve eradikasyon tedavisinin 3. ayında çalışıldı. Kan örnekleri bir gecelik açlık sonrası alındı ve serum halinde -80°C ısıda saklandı. Serum ADMA, SDMA, L-NMMA düzeylerinin analizi yüksek performanslı sıvı kromatografisi (Shimadzu LC-20AD; Shimadzu, Kyoto, Japan) ile eşlenmiş API 3200 LC-MS/MS system kütle spektrometre (Applied biosystem/MDS SCIEX; CA, ABD) cihazında Luna C18 (Phenomenex; CA, ABD) kolon ile modifiye metot kullanılarak yapıldı (10).

İstatistiksel Analiz

Verilerin istatistiksel analizinde SPSS versiyon 20.0 (IBM Statistical Package for the Social Sciences, version 20.0 IBM Corp.; Armonk, NY, ABD) programı kullanıldı. Parametrik verilerde iki grup ortalama karşılaştırması eşleştirilmiş Student's t testi ile yapıldı. Parametrik verilerin ortalama ± standart sapma değerleri uygun olarak gösterildi. p değeri < 0,05 ise anlamlı olarak kabul edildi.

BULGULAR

Çalışmaya dahil edilen 45 hastadan 23'ü kadın ve 22'si erkek idi. Hastaların ortalama yaşı 32,4±8 idi. Eradikasyon öncesi enfekte 45 hastanın ve eradikasyon sağlanan 29 hastanın ADMA, SDMA ve L-NMMA serum düzeyleri karşılaştırıldığında, eradikasyon tedavisi ile serum düzeylerinde anlamlı azalma olduğu görüldü (Tablo 1).

TARTIŞMA

Nitrik oksid, sentezi doğrudan NOS ekspresyonu ve aktivitesi tarafından kontrol edilen, başta kardiyovasküler sistem olmak üzere tüm sistemlerde vazodilatatör etkiye sahip, ikincil haberci olarak da kabul edilen, gaz yapıda bir moleküldür. Vazodilatasyon vücuttaki önemli inflamatuvar sinyallerden birisidir ve geniş ölçüde NO bağımlı süreçler ile sağlanır (11).

Metilarjininler, proteinlerde bulunan arjinin rezidülerinin metilasyonu sonucu oluşurlar (12). Protein-arjinin metilasyonu, proteinlerin içindeki arjininin guanido azotuna 1 veya 2 metil grubunu aktaran bir post-translasyonel modifikasyondur. İnsanlarda bu işlem Protein Arjinin Metil Transferaz (PRMT) enzimleri tarafından gerçekleştirilir (13). Tip 1 PRMT aktivitesi sonucu oluşan ürün ADMA ve L-NMMA molekülleridir. Bu moleküllerin NOS'ı inhibe edebilme özelliği vardır. Tip 2 PRMT ise SDMA oluşumunda rol oynar. SDMA'nın NOS'ı inhibe etme özelliği yoktur (14). Ancak renal yetmezlikte SDMA, ADMA'ya göre dolaşımda çok daha yüksek seviyelerde bulunur (15).

Asimetrik dimetil arjinin'i önemli kılan nokta NOS aktivitesini inhibe ederek NO sentezinde önemli ölçüde azalma yapmasıdır. Son dönemde artan kanıtlar ADMA birikiminin birçok sistemde NO sentezini ve biyoyararlanımını azaltarak zararlı etkiler ve organ disfonksiyonuna neden olduğunu düşündürmektedir (16). ADMA tarafından indüklenen endotel hasarı; hipertansiyon, ateroskleroz, koroner arter hastalığı, diabetes mellitus, pulmoner hipertansiyon ve renal yetmezlik gibi birçok hastalığın gelişiminde rol alabilir (16-19). ADMA, NO düzeyinde azalmanın yanı sıra doğrudan oksidatif stres ve hücre ölümünü de indükleyebilir (20, 21).

Helicobacter pylori'nin ADMA düzeylerini artırdığı deneysel ve klinik çalışmalarla gösterilmiştir. Ratlarda *H. pylori*'nin proteolizisi ile elde edilen özütün in vitro eklenmesi ile duodonal perfüzyonda dört kat, duodonal dokuda beş kat düzeyinde ADMA artışının olduğu gösterilmiştir (22). Wang ve ark. (23) tarafından yapılan çalışmada ise *H. pylori* ile inkübe edilen gastrik mukozal epitelyal hücre kültüründe artmış ADMA ve TNF-α düzeyleri görülmüş ve dışardan ADMA uygulaması ile TNF-α düzeylerinde artış olduğu gösterilmiştir. Klinik çalışmalar da ise *H. pylori* ile enfekte kişilerde mide antrum dokusunda artmış mukozal NOS ekspresyonu ve artmış ADMA içeriği olduğu gösterilmiştir (24). Diğer bir klinik çalışmada asemptomatik *H. pylori* enfeksiyonu olan kişilerde sağlıklı kişilere göre artmış plazma ADMA düzeylerinin olduğu bildirilmiştir (9). Bir diğer klinik çalışmada ise *H. pylori* ile enfekte hastaların mide öz suyunda artmış ADMA düzeyleri tespit edilmiş ancak bu çalışma da *H. pylori* pozitif ve negatif hastalarda plazma ADMA seviyeleri arasında anlamlı fark tespit edilmemiştir (8).

Table 1. Eradikasyon öncesi ve sonrasında ADMA, SDMA ve L-NMMA serum düzeylerinin karşılaştırılması

Parametre	Eradikasyon öncesi (n=45)	Eradikasyon sonrası (n=29)	p
ADMA (µmol/l)	0,56±0,09	0,43±0,11	< 0,001
SDMA (µmol/l)	0,70±0,19	0,39±0,11	< 0,001
L-NMMA (µmol/l)	0,10±0,02	0,009±0,02	< 0,001

ADMA: asimetrik dimetil arjinin; SDMA: simetrik dimetil arjinin; L-NMMA: N-monometil-L-arjinin

Helicobacter pylori eradikasyonu ile ADMA düzeylerini değerlendiren tek çalışma, Aydemir ve ark. (7) tarafından yapılmıştır. Bu çalışmada H. pylori eradikasyonu sağlanan hastalarda serum ADMA düzeylerinde anlamlı azalma olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmada ADMA dışındaki metil arjinin metabolizma ürünleri değerlendirilmemiştir.

Bizim çalışmamızda Aydemir ve ark. (7) çalışmasına benzer şekilde H. pylori eradikasyonu ile ADMA düzeylerinde anlamlı azalma izlendi. Ayrıca bizim çalışmamızda ilk kez diğer metilarjinin metabolizma ürünlerinde de (SDMA ve L-NMMA) eradikasyon tedavisi ile anlamlı azalma olduğu gösterildi.

Küçük hasta grubunda yapılması, hastaların uzun süreli takibinin olmaması, eradikasyonun sağlanmadığı hastalarda metil arjinin metabolizma ürünlerinin düzeylerinin bakılmamış olması çalışmamızdaki önemli kısıtlılıklar olarak görülmektedir.

SONUÇ

Sonuç olarak, H. pylori eradikasyonuna bağlı azalan serum ADMA, SDMA ve L-NMMA düzeylerinin, birçok sistemde yararlı etkiler oluşturabileceği düşünülebilir. Bu olası yararlı etkilerin geniş çaplı, uzun süreli çalışmalarla değerlendirilmesinin uygun olacağını düşünmekteyiz.

Ethics Committee Approval: Ethics committee approval was received for this study from the ethics committee of Selçuk University School of Medicine.

Informed Consent: Written informed consent was obtained from patients who participated in this study.

Peer-review: Externally peer-reviewed.

Author Contributions: Concept - S.B., S.H.İ.; Design - S.B., S.H.İ.; Supervision - S.B., H.K.; Resources - S.B., H.K., M.S., S.A.; Materials - S.A., A.Ü., M.S.; Data Collection and/or Processing - S.A., A.Ü., M.S., H.K.; Analysis and/or Interpretation - S.B., S.H.İ., L.K., T.A.; Literature Search - M.S., S.B.; Writing Manuscript - S.B., S.H.İ., T.A., A.Ü., L.K.; Critical Review - A.Ü., L.K., T.A.

Conflict of Interest: No conflict of interest was declared by the authors.

Financial Disclosure: The authors declared that this study has received no financial support.

Etik Komite Onayı: Bu çalışma için etik komite onayı Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi'nden alınmıştır.

Hasta Onamı: Yazılı hasta onamı bu çalışmaya katılan hastalardan alınmıştır.

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Yazar Katkıları: Fikir - S.B., S.H.İ.; Tasarım - S.B., S.H.İ.; Denetleme - S.B., H.K.; Kaynaklar - S.B., H.K., M.S., S.A.; Malzemeler - S.A., A.Ü., M.S.; Veri Toplanması ve/veya İşlemesi - S.A., A.Ü., M.S., H.K.; Analiz ve/veya Yorum - S.B., S.H.İ., L.K., T.A.; Literatür Taraması - M.S., S.B.; Yazıyı Yazan - S.B., S.H.İ., T.A., A.Ü., L.K.; Eleştirel İnceleme - A.Ü., L.K., T.A.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

Finansal Destek: Yazarlar bu çalışma için finansal destek almadıklarını beyan etmişlerdir.

KAYNAKLAR

- Selçuk MT, Selçuk H, Temizhan A, Maden O, Ulupinar H, Baysal E, et al. The effect of plasma asymmetric dimethylarginine (ADMA) level and L-arginine/ADMA ratio on the development of coronary collaterals. *Türk Kardiyol Dern Ars* 2008; 36: 150-5.
- Brown JF, Hanson PJ, Whittle BJ. Nitric oxide donors increase mucus gel thickness in rat stomach. *Eur J Pharmacol* 1992; 223: 103-4. [CrossRef]
- Masuda E, Kawano S, Nagano K, Tsuji S, Takei Y, Tsujii M, et al. Endogenous nitric oxide modulates ethanol-induced gastric mucosal injury in rats. *Gastroenterology* 1995; 108: 58-64. [CrossRef]
- Urgancı N, Usta M. Yenidoğandan Ergenliği: Gastroözofageal Reflü. *JAREM* 2016; 6: 67-73. [CrossRef]
- Bełtowski J, Kedra A. Asymmetric dimethylarginine (ADMA) as a target for pharmacotherapy. *Pharmacol Rep* 2006; 58: 159-78.
- Zhang Z, Zou YY, Li FJ, Hu CP. Asymmetric dimethylarginine: a novel biomarker of gastric mucosal injury? *World J Gastroenterol* 2011; 17: 2178-80. [CrossRef]
- Aydemir S, Eren H, Tekin IO, Harmandar FA, Demircan N, Cabuk M. Helicobacter pylori eradication lowers serum asymmetric dimethylarginine levels. *Mediators Inflamm* 2010; 2010: 685903. [CrossRef]
- Zhang Z, Zou YY, Zhou Y, Zhou H, Li YJ. The aggravatory effect of nicotine on Helicobacter pylori-induced gastric mucosa injury: role of asymmetric dimethylarginine. *Journal of Clinical Gastroenterology* 2009; 43: 261-6. [CrossRef]
- Marra M, Bonfigli AR, Bonazzi P, Galeazzi R, Sirolla C, Testa I, et al. Asymptomatic Helicobacter pylori infection increases asymmetric dimethylarginine levels in healthy subjects. *Helicobacter* 2005; 10: 609-14. [CrossRef]
- Di Gangi IM, Chianetti L, Gucciardi A, Moret V, Naturale M, Giordano G. Simultaneous quantitative determination of N(G),N(G)-dimethyl-L-arginine or asymmetric dimethylarginine and related pathway's metabolites in biological fluids by ultrahigh-performance liquid chromatography/electrospray ionization-tandem mass spectrometry. *Anal Chim Acta* 2010; 677: 140-8. [CrossRef]
- Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987; 327: 524-6. [CrossRef]
- Fiedler L. The DDAH/ADMA pathway is a critical regulator of NO signaling in vascular homeostasis. *Cell Adh Migr* 2008; 2: 149-50. [CrossRef]
- Mcbride AE, Silver PA. State of the arg: protein methylation at arginine comes of age. *Cell* 2001; 106: 5-8. [CrossRef]
- Bełtowski J, Kedra A. Asymmetric dimethylarginine (ADMA) as a target for pharmacotherapy. *Pharmacol Rep* 2006; 58: 159-78.
- Fliser D. Asymmetric dimethylarginine (ADMA): the silent transition from an "uraemic toxin" to a global cardiovascular risk molecule. *Eur J Clin Invest* 2005; 35: 71-9. [CrossRef]
- Böger RH, Bode-Böger SM, Szuba A, Tsao PS, Chan JR, Tangphao O, et al. Asymmetric dimethylarginine (ADMA): a novel risk factor for endothelial dysfunction: its role in hypercholesterolemia. *Circulation* 1998; 98: 1842-7. [CrossRef]
- Hayden MR, Tyagi SC. Is type 2 diabetes mellitus a vascular disease (atherosclerosis) with hyperglycemia a late manifestation? The role of NOS, NO, and redox stress. *Cardiovasc Diabetol* 2003; 12: 2. [CrossRef]
- Kielstein JT, Imprim B, Simmel S, Bode-Böger SM, Tsikas D, Frölich JC, et al. Cardiovascular effects of systemic nitric oxide synthase inhibition with asymmetrical dimethylarginine in humans. *Circulation* 2004; 109: 172-7. [CrossRef]
- Böger RH. The emerging role of ADMA as a novel cardiovascular risk factor. *Cardiovasc Res* 2003; 59: 824-33. [CrossRef]
- Wells SM, Holian A. Asymmetric dimethylarginine induces oxidative and nitrosative stress in murine lung epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2007; 36: 520-8. [CrossRef]
- Yuan Q, Jiang DJ, Chen QQ, Wang S, Xin HY, Deng HW, et al. Role of asymmetric dimethylarginine in homocysteine induced apoptosis of vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 356: 880-5. [CrossRef]
- Fändriks L, von Bothmer C, Johansson B, Holm M, Bölin I, Pettersson A. Water extract of Helicobacter pylori inhibits duodenal mucosal alkaline secretion in anesthetized rats. *Gastroenterology* 1997; 113: 1570-5. [CrossRef]
- Wang L, Zhou Y, Peng J, Zhang Z, Jiang DJ, Li YJ. Role of endogenous nitric oxide synthase inhibitor in gastric mucosal injury. *Can J Physiol Pharmacol* 2008; 86: 97-104. [CrossRef]
- von Bothmer C, Edebo A, Lönnroth H, Olbe L, Pettersson A, Fändriks L. Helicobacter pylori infection inhibits antral mucosal nitric oxide production in humans. *Scand J Gastroenterol* 2002; 37: 404-8. [CrossRef]