

A humán papillomavírus (HPV) fertőzések kimenetelét meghatározó virális és gazdaszervezeti tényezők, társfertőzések szerepe

Virális tényezők

Nyomonkövetéses non-intervenciós klinikai epidemiológiai tanulmányban [1] 455 beteg és 10644 beteghónap adatait feldolgozva, a súlyos fokú CIN kockázatát P3-as citológiai atípiára 16,2-szeresre (CI_{95} : 3,9-66,6), a Hybrid Capture teszttel meghatározott magas kockázatú HPV fertőzés pedig 76,8-szorosra (CI_{95} : 23,7-249,5) növelte. A tipizálással meghatározott genotípusokat a feltételezett onkogén kockázat alapján csoportosítottuk: 1.: HPV16/18, 2.: HPV45/52/56, 3.: HPV31/33/35/51/58, 4.: Hybrid Capture tesztben keresztreagáló típusok. Az első csoport standardizált relatív kockázata 119,1-szeres (CI_{95} : 36,2-390,9), a másodiké 44,4-szeres (CI_{95} : 9,8-201,0), a harmadiké 39,7-szeres (CI_{95} : 10,9-144,8), a negyediké 21,4-szeres (CI_{95} : 2,2-209,2) volt. A negyedik csoport onkológiai kockázata is szignifikáns, de alacsonyabb, mint az igazoltan magas kockázatú típusoké. Az utóbbi eredményünk összhangban volt a cervix carcinoma és a HPV genotípusok kapcsolatát vizsgáló legszélesebb körű, multicentrikus, populációs alapú eset-kontroll tanulmánnyal [2]. A kereszthibridizáló HPV genotípusokat (pl. HPV26, HPV53, HPV66) jelenleg potenciálisan onkogén csoportba sorolják.

A fenti tanulmányban a követés végpontját jelentő CIN szövettani diagnózisig eltelt idő 1 hónaptól 51 hónapig terjedt. Mivel a betegkövetés kiindulópontja az első regisztrált cervikális atípiára volt, az esetek egy részének háttérében már ekkor a manifeszt rákmegelőző elváltozás (súlyos fokú CIN) volt jelen, amelyet a nőgyógyászati kép alapján rövid időn belül *lege artis* eltávolítottak. Ismert azonban, hogy a citológiával vagy kolposzkópiával kimutatott cervikális atípiára az esetek nagyobb részében olyan korai folyamatot jelez, amely nem tekinthető egyértelműen rákmegelőző elváltozásnak, de egy részük a közeljövőben súlyos fokú CIN lézióvá progresszióval. Az újabb HPV genotípus [3] tanulmányunkban a vizsgálati csoport ezen heterogenitásának lehetséges torzító hatását becsültük meg az alábbi módon: 234 beteg kiindulási citológiai eredményét tudtuk utólag megfeleltetni a Bethesda beosztásnak abból a 403 betegből, akinek a követés kezdetén citológiai atípiája volt. A citológiai atípiára megítélésében jelenleg a Bethesda osztályozás tükrözi legjobban a folyamat pillanatnyi állapotát. A HSIL csoport ($n=49$) relatív kockázata ($RR=19,0$; CI_{95} : 8,03-45,1), lényegesen magasabb volt mint az ASCUS ($n=185$) csoporté ($RR=4,19$; CI_{95} : 1,88-9,34). Az 1 évet meghaladó nyomonkövetés után szövettani vizsgálatra kerülő súlyos fokú CIN biopsziák 86%-ában (31/36) a kiindulási citológia eredménye az onkológiai megítélés szempontjából átmeneti zónának számító ASCUS (atypical squamous cell of unknown significance) volt. Ezekben az esetekben a nyomonkövetési adatok (citológia és kolposzkópia) a későbbiekben bekövetkező progresszióra utaltak. A 30 hónapon túli esetekben viszont már nem lehetett a folyamatosságot kimutatni a kiindulási cervikális atípiára és a késői rákmegelőző elváltozás között. Ezért a második HPV genotípus tanulmányban a betegadatok nyomonkövetését három időszakra (1-12 hónap, 13-30 hónap, 30 hónapon túl) osztottuk és mindhárom szakaszban külön-külön meghatároztuk a kiindulási HPV státusz onkogén kockázatát. Minden egyes időszakban azon betegek adatait értékeltük, akiknél a vizsgált időszak kezdetéig nem történt terápiás beavatkozás és vizsgált időszak teljes tartamára nézve egyértelműen meg lehetett állapítani a súlyos fokú CIN meglétét vagy hiányát. Így az első vizsgálati időszakban meghatározott betegségkockázati értékek elsősorban a kiinduláskor fennálló rákmegelőző elváltozásokét tükrözik, míg a második vizsgálati időszak jól megfelelt a kohorsz vizsgálatok azon feltételének, hogy kiinduláskor a résztvevőknek mentesnek kell lenni a vizsgálat végpontjaként meghatározott megbetegedéstől, jelen esetben a súlyos fokú CIN-től.

Megemelt vizsgálati szám (638 beteg) mellett a korábbi genotípus tanulmányban meghatározott betegségkockázati értékek alapján három HPV genotípus csoportot vizsgáltunk célzottan: 1.: HPV16/18, 2.: egyéb magas onkogén kockázatú HPV genotípusok (korábbi tanulmányban a 2. és 3. csoportba sorolt HPV genotípusok) 3.: potenciálisan onkogén HPV genotípusok (korábbi tanulmány keresztregáló típusai). Sem az első, sem a második genotípus csoport betegségkockázatban nem találtunk lényeges különbséget az első és a második követési időszak között (1. táblázat), ami arra utal, hogy HPV genotípusok onkogén kockázatának becslését lényegesen nem befolyásolja, hogy a manifeszt rákmegelőző állapot kialakulását követően vagy még előtte történik a HPV kimutatás. A potenciálisan onkogén HPV típusok valamelyikét hordozó súlyos fokú CIN csak az első követési időszakban fordult elő, Cox regressziós modellből számított standardizált relatív kockázatuk mind erre az időszakra RR=37,3 (CI₉₅: 5,09-272), mind a teljes követési időre RR=14,8 (CI₉₅: 2,8-78,3) szignifikánsan emelkedett értéket mutatott. A követés 30. hónapja után viszont a kiindulási HPV státusz és a rákmegelőző elváltozások kialakulása között lényegesen gyengébb volt a statisztikai kapcsolat és a folyamatosságot sem lehetett kimutatni. Valószínű, hogy a kiindulási cervikális atípiá regenerálódott, majd a követés alatt később új progresszív folyamat alakult ki, ugyanis a cervikális atípiának elsősorban életviteli kockázati tényezői vannak (STD infekciók, dohányzás, szülések száma) azaz a spontán gyógyulás után változatlan életvitel mellett kialakulhat egy újabb kórfolyamat.

Az első genotípus tanulmányban[1] a HPV 16/18 csoport CIN kockázata kb. 3-szor (2,98 ill. 2,74) magasabb volt, mint a másik két magas kockázatú genotípus csoporté. Mivel a HPV16/18 csoportban a fertőzéseket túlnyomó részben a 16. genotípus képviselte, a második tanulmányban[3] - ahol ez az arány 91% volt - a 16. és az egyéb onkogén genotípusok (a HPV18 kivételével) relatív kockázata közötti különbséget határoztuk meg. Ez az érték, mind az első [3,29× (CI₉₅: 1,8-6,0)], mind a második vizsgálati időszakban [3,19× (CI₉₅: 1,4-7,24)] igen jól megközelítette a matematikai modellezéssel kiszámolt 3,2-szeres értéket, ami az eredményünk konzisztens voltát erősíti. Az említett matematikai modellezéssel azt kívánták kiszámítani, hogy milyen onkogenitásbeli különbségekkel lehet magyarázni a 16. és a többi magas kockázatú genotípus prevalencia adatait a cervikális karcinogenezis különböző stádiumaiban[4].

1. táblázat. Súlyos fokú CIN kialakulásának életkorra, citológiai eredményre standardizált relatív kockázata (95% fiducia intervalummal) a követés időtartama és a HPV genotípusok szerint

követés (hónap)	HPV16/18	egyéb magas kock. HPV
<12	161,4 (38,5 – 677)	47,9 (10,9 – 210)
13-30	196,7 (25,4– 1525)	69,7 (8,7 – 557)
> 30	29,2 (5,02 – 170)	0 –

A kiindulási HPV státuszt 19 esetben többszörös HPV fertőzés jellemezte, amelynek standardizált onkológiai kockázata (RR=49,5; CI₉₅: 12,2-201,7) nem volt nagyobb, mint amikor egyetlen magas kockázatú HPV genotípus okozott fertőzést (RR=85,6; CI₉₅: 26,2-279,3)[1]. A virális kópiaszámra jellemző hibridizációs szignál erősségét a minta DNS tartalmára standardizáltuk és megállapítottuk, hogy a Hybrid Capture HPV teszt detektálási küszöbértéke fölött a vírusterhelés mértékéből prognosztikai következtetéseket nem lehet

levonni. A vírusterhelés egyébként független volt a többi vizsgált kockázati tényezőtől, így a HPV típustól is[1].

A betegek egy csoportjánál a műtét utáni nyomon követést is végeztünk[5], mivel a CIN sikeres eradikációját követően az etiológiai faktor HPV is általában eltűnik, azaz a HPV kimutatás diagnosztikus segítséget adhat a beteg műtét utáni nyomonkövetésében. A lézió műtéti eltávolítása után az onkogén HPV eltűnt a cervixről 43 (70%) esetben. Ezekben a betegekben sem CIN, sem perzisztáló citológiai atípiá nem fejlődött ki a követés során (medián: 29 hónap). Az eredményekből arra következtettünk, hogy a műtét utáni negatív HPV teszt a recidíva kialakulása ellen szól. A HPV teszt negatív prediktív értéke (NPV) a vizsgálati csoportban 100% (CI₉₅: 91.8-100%) volt, ami arra utal, hogy a diagnosztikus HPV tesztnek a beteg műtét utáni gondozásában, mint szűrő módszernek van szerepe. Viszonylag magas volt műtét után a HPV pozitív aránya (18 beteg, 30%), akik közül 10-nél lehetett összehasonlítni a műtét előtti és utáni HPV genotípust. Nyolc esetben a műtéttel tényleg eltűnt a cervikális léziót okozó HPV genotípus, de – valószínűleg a beteg vagy partnere változatlan életvitele miatt – újabb HPV fertőzés alakult ki.

Gazdaszervezeti tényezők

Mivel a szakirodalom alapján sem a rákmegelőző elváltozások, sem az invazív carcinomás esetek életkor szerinti megoszlása nem volt összhangban a magas onkogén kockázatú HPV típusok korszpecifikus prevalenciájával, arra a következtetésre jutottunk, hogy az életkort mint lehetséges kofaktort kell vizsgálnunk a további tanulmányokban, mégpedig a korszpecifikus prevalencia alapján kategórikusan elkülönülő 2 korcsoport, a 35 év alattiak és felettek betegségkockázatának összehasonlításával. Az első genotípus tanulmányban[1] a súlyos fokú CIN HPV- és citológiai státuszra standardizált relatív kockázatát a 35 év feletti életkor 1,99-szeresre (CI₉₅: 1,26-3,16) növelte a 35 év alattihoz képest. A második genotípus tanulmányban[3] szintén hasonló szignifikáns különbséget kaptunk (RR=1,56; CI₉₅: 1,07-2,27), ami azonban eltűnt (0,75; CI₉₅: 0,39-1,43), ha a kiviselt terhességek számát is bevontuk a standardizálásba. Ugyanakkor, 0 és 3 kiviselt terhesség között terhességenként átlagosan 1,62-szeresre nőtt a betegségkockázata, ami azt jelzi, hogy az idősebb betegek fokozott kockázata nem az életkorukból származott, hanem abból, hogy náluk magasabb volt a kiviselt terhességek száma.

Az L1 antigénre adott interferon(IFN)-gamma ELISPOT rendszer detektálási küszöbe 10 reszponder /10⁵ limfocita volt. A humán papillomavírus (HPV)16-specifikus IFN-gamma termelés valóban szoros kapcsolatban volt a HPV16 expozícióval (6/8 eset ill. 1/12 kontroll reagált, p=0.004). Az alacsony kockázatú HPV6 és HPV11 típusokra adott válaszok gyakorisága nem különbözött szignifikánsan a HPV16 expozíciós és a kontroll csoportban. A különböző típusok közül csak a HPV16- és a HPV6-specifikus IFN-gamma termelés nagysága korrelált egymással (r=0,83, p<0,001).

Az E6 antigénre mind az IFN-gamma, mind interleukin(IL)-4 ELISPOT vizsgálatokat végeztünk. A vizsgált HPV16 expozíciós csoportban 11%-os gyakorisággal váltott ki IFN-gamma termelést az E6 antigén, de csak alacsony reszponder frekvencia mellett (<20 / 10⁵ limfocita). Az E6 antigénnel szemben kialakuló IL-4 válaszkészség a detektálási küszöb alatt maradt. Az E7 antigénre specifikus immunitást poolozott átfedő oligopeptidekkel vizsgáltuk HPV16 expozíciós csoportban. IFN-gamma termelést 45%-ban, míg IL-4 termelést 35%-ban lehetett kimutatni. Tendenciaszerűen a reszponder frekvenciák a detektálási küszöb közelében voltak és ugyanazon donorokban lehetett kimutatni az IL-4-t, mint az IFN-gammát.[6]

Társfertőzések

A nyál útján is ürülő TT-vírus (TTV) koinfekció szerepét a HPV mediált karcinogenezisben gégetumorokon vizsgáltuk [7]. Olyan laphámsejtes gégerákban szenvedő betegekben, akikben metasztázis és/vagy műtét utáni relapsus alakult ki (átlagos követési idő: 400 nap), szignifikánsan gyakoribb (8/11) volt a primer tumorban a HPV és az 1. genocsoportba tartozó TTV koinfekciója ($p < 0,001$) mint azon betegekben (0/14), akikben a követési idő alatt nem lehetett megfigyelni metasztázist vagy relapszust. Az azonban még nem ismert, hogy a TTV koinfekció fokozza a HPV patogén hatását vagy ellenkezőleg a gyorsabb progressziójú elváltozáshoz nagyobb a TT vírus vagy a TTV fertőzött sejtek affinitása. Igazoltuk, hogy az 1. genocsoportú TTV valóban képes perzisztens módon fertőzni [8].

Chlamydia trachomatis fertőzés az onkogén HPV típusal rendelkező atípiás citológiájú minták elenyésző százalékában volt kimutatható, azaz a *C. trachomatis* fertőzések valószínűleg nem játszanak szerepet a méhnyaki hámsejtek neoplasiás folyamatainak progressziójában.[9, 10]

A humán papillomavírusok (HPV) génexpressziójának hatása a többrétegű hámok citokinhálózatára

A cervikális karcinogenezis invazív stádiumában vizsgáltuk a HPV16 mRNS-ek expresszióját. Az utóbbi csoportot alkotó 34 invazív cervix carcinomás biopsziából 19 hordozott HPV16 genotípust. Ezekben valamint HPV16 pozitív és Caski sejtvonalakban vizsgáltuk a HPV16 genom transzkripcióját az E7 régióban és az E2 C-terminális kódoló régiójában (. A HPV16 genomról átírt, érett mRNS-ek policisztronálisak. Az E7 szekvencia kimutatása az mRNS-ben ezért egyben a tőle proximálisan elhelyezkedő E6 expressziójára is utal (az E6 és E7 együttesen felelős a malignus fenotípus fenntartásáért). Az E2 C-terminális kódoló szakasz viszont deléció szenvedhet a vírusgenom kromoszómába integrálódása során. A Caski sejtvonalban és a vizsgált biopsziák közül háromban lehetett kimutatni az E2 C-terminális expressziót is, azaz a biopsziák 84%-ában az E2 nem fejeződött ki, a 3447-3655 nukleotidszekvenciára specifikus RT-PCR negatív volt. Mind a 16-os mind az egyéb HPV genotípust hordozó biopsziákban RT-PCR módszerrel kerestük az interleukin (IL)-6, IL-8, IL-10, TGF-beta1, TGF-beta2 expresszióját. IL-8 mRNS-t csak 2 esetben, TGF-beta2 expressziót 14 esetben, míg az IL-6, IL-10 és TGF-beta1 expresszióját egy-egy ill. kettő-kettő eset kivételével minden biopsziában kimutattuk. További cervix carcinoma eredetű sejtvonalakban (Siha, Hela, C33A) vizsgáltuk az IL-6, IL-10 és TGF-beta1 expressziót. Az autokrin növekedési faktor IL-6 és a környező sejteket gátló TGF-beta1 mindhárom sejtvonalban kifejeződött, míg az IL-10 egyikben sem. IL-10 expresszió csak a biopsziákban volt kimutatható, a vizsgált sejtvonalakban nem, ami az irodalmi adatokkal összhangban arra utal, hogy a cervix uteriben az IL-10 terelés nem a keratinocitáknak, hanem az infiltráló leukocitáknak köszönhető.

Az IL-10 expressziót befolyásolja a promoterben a -1082. nukleotid polimorfizmusa [11]. Saját klinikai epidemiológiai vizsgálataink [12] szerint a HPV fertőzés talaján kialakuló cervikális atípiában az IL-10 promóter nt-1082 nukleotid által meghatározott genotípusok eloszlása nem különbözött a kontroll csoporttól ($p=0,70$) és nem befolyásolta a CIN kockázatot sem (AA: ref, AG: RR=1,11 [CI₉₅: 0,59-2,08], GG: RR=0,62 [CI₉₅: 0,25-1,50]). Ugyanakkor a HPV-negatív citológiai atípiára kisebb volt a hajlama a non-AA genotípusoknak, amelyeket magasabb IL-10 termelő képesség jellemez (esélyhányadosok AA: ref. AG=0,56 [CI₉₅: 0,31-1,02], GG=0,27 [CI₉₅: 0,11-0,63]). Adataink alapján az IL-10

promóter nt-1082 polimorfizmusa nem befolyásolja a cervikális carcinogenezist, de befolyásolhatja a HPV-től független hámdiszpláziák kialakulását. Az IL-10 promóterben a proximális CpG dinukleotid egyöntetűen hipermetilált az általunk vizsgált 12 keratinocita eredetű sejtvonalban, és nem metilált az IL-10-t termelő limfoid sejtekben.[13]

A TGF-beta2 átíródását a HPV16 E7 közvetlenül is gátolja. Tudományos együttműködés keretében megállapítottuk, hogy az E7 Rb-dependens módon fejt ki hatását a TGF-beta2 promóter régiójában[14]. A cervix carcinoma sejtekre általában jellemző TGF-beta1 expressziót mRNS szinten vizsgáltuk. HeLa sejtekben kb. kétszeres mennyiségben lehetett kimutatni a transzkriptumot C33A sejtekhez képest, míg HaCat sejtvonalon nem tudtunk kimutatni TGF-beta1 mRNS-t. A HeLa és a C33A sejtvonalakat választottuk HPV16 E2 transzfekcióra, mivel ezekben a sejtekben nincs endogén HPV16 E2. A TGF-beta1 expressziót azonban nem befolyásolta a HPV16 E2.

Új eredmények

- A magas onkogén kockázatú HPV csoporton belül a 16. genotípus onkológiai kockázata mintegy háromszorosán meghaladja az egyéb genotípusokét. Az epidemiológiai módszerekkel meghatározott különbség igen jól közelítette mások elméleti számításait. Kutatásaink hozzájárulnak az egyenlőre még potenciálisan onkogénnek tekintett HPV genotípusok daganatkeltő szerepének igazolásához
- Egyidejűleg több HPV genotípussal történő fertőzés onkológiai kockázata nem nagyobb, mint ha csak egy magas kockázatú HPV genotípus mutatható ki.
- Az életkor és a szülészeti kórelőzmény kofaktor szerepének ismeretében a nullipar nők HPV fertőzéseiben az életkortól függetlenül jobban vállalható az alapos konzervatív nyomonkövetéses ellenőrzés, mint a multipar nőkben. Ez összhangban van a nullipar nők reprodukciós esélyeinek megőrzését célzó irányelvekkel.
- A molekuláris Koch-posztulátumok reverzibilitási feltételének megfelelően diagnosztikusan is felhasználható szoros összefüggést mutattunk ki a sikeres terápia és a magas kockázatú HPV eradikációja között.
- A TT vírus képes perzisztáló fertőzést kialakítani és a HPV-hez kapcsolódó megbetegedésekben is okozhat társfertőzést
- HPV fertőzésre szisztémás immunválasz csak részlegesen alakul ki.
- A kofaktorként vizsgált IL-10 promóter nt-1082 polimorfizmusa nem befolyásolja a cervikális carcinogenezist, de befolyásolhatja a HPV-től független hámdiszpláziák kialakulását.

1. Szoke, K., T. Sapy, Z. Krasznai, Z. Hernadi, G. Szladek, G. Veress, J. Dillner, L. Gergely, and **J. Kónya**. 2003. Moderate variation of the oncogenic potential among high-risk human papillomavirus types in gynecologic patients with cervical abnormalities. *Journal of Medical Virology* 71:585-592.
2. Munoz, N., F. X. Bosch, S. de Sanjose, R. Herrero, X. Castellsague, K. V. Shah, P. J. Snijders, and C. J. Meijer. 2003. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N. Engl. J. Med.* 348:518-527.

3. Hernadi,Z., L.Gazdag, K.Szoke, T.Sapy, Z.T.Krasznai, and **J.Kónya**. 2005. Duration of HPV-associated risk for high-grade cervical intraepithelial neoplasia. *European Journal of Obstetrics Gynecology and Reproductive Biology* in press.
4. Barnabas, R. Assessing the Effect of HPV 16 Transmission and HPV 16 Progression Rates on the Potential Impact of HPV Vaccines. 5-1-2005. 22nd International Papillomavirus Conference. 5-1-2005.
5. Hernadi,Z., K.Szoke, T.Sapy, Z.T.Krasznai, G.Soos, G.Veress, L.Gergely, and **J.Kónya**. 2005. Role of human papillomavirus (HPV) testing in the follow-up of patients after treatment for cervical precancerous lesions. *European Journal of Obstetrics Gynecology and Reproductive Biology* 118:229-234.
6. **Kónya J**, Szalmás A,: Humorális és celluláris immunitás rekombináns humán papillomavírus antigének ellen, Magyar Mikrobiológiai Társaság 2004. évi Nagygyűlése, 2004
7. Szladek,G., A.Juhasz, G.Kardos, K.Szoke, T.Major, I.Sziklai, I.Tar, I.Marton, **J.Kónya**, L.Gergely, and K.Szarka. 2005. High co-prevalence of genogroup 1 TT virus and human papillomavirus is associated with poor clinical outcome of laryngeal carcinoma. *Journal of Clinical Pathology* 58:402-405.
8. Szladek,G., A.Juhasz, L.Asztalos, K.Szoke, M.Murvai, K.Szarka, G.Veress, L.Gergely, and **J.Kónya**. 2003. Persisting TT virus (TTV) genogroup 1 variants in renal transplant recipients. *Archives of Virology* 148:841-851.
9. **Kónya J**, Szőke K, Fehér E, Szalmás A.: Prevalence of Chlamydia trachomatis and oncogenic human papillomavirus types in cytologic atypia of the uterine cervix, 5th Meeting of the European Society for Chlamydia Research 2004 September 1-4, Budapest, Hungary, 2004
10. **Kónya J**: A genomika jelentősége az STD kórokozók kimutatásában., *Klinikai és Kísérletes Laboratóriumi Medicina* 31(1): 9, 2004, 2004
11. Stanczuk,G.A., E.N.Sibanda, C.Perrey, M.Chirara, V.Pravica, I.V.Hutchinson, and S.A.Tswana. 2001. Cancer of the uterine cervix may be significantly associated with a gene polymorphism coding for increased IL-10 production. *Int.J Cancer* 94:792-794.
12. Szoke,K., A.Szalmás, G.Szladek, G.Veress, L.Gergely, F.D.Toth, and **J.Kónya**. 2004. IL-10 promoter nt-1082A/G polymorphism and human papillomavirus infection in cytologic abnormalities of the uterine cervix. *Journal of Interferon and Cytokine Research* 24:245-251.
13. Szalmás A, Bánáti F, Koroknai A, Salamon D, Veress G, Minárovits J, Gergely L, **Kónya J**.: Interleukin-10 promóter metiláció és humán papillomavírus infekció humán keratinocita sejtvonalakban., Magyar Mikrobiológiai Társaság 2004. évi Nagygyűlése, 2004
14. Murvai M, Borbely AA, **Kónya J**, Gergely L, Veress G. Effect of human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncogenes on the activity of the transforming growth factor-beta2 (TGF-beta2) promoter. *Arch Virol.* 2004 Dec;149(12):2379-92. PMID: 15290353