

Irena Wojsyk-Banaszak, Anna Bręborowicz

Klinika Pneumonologii, Alergologii Dziecięcej i Immunologii Klinicznej Uniwersytetu Medycznego
im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu
Kierownik: prof. dr hab. n. med. A. Bręborowicz

Zastosowanie kliniczne badań czynnościowych układu oddechowego u dzieci w wieku przedszkolnym

Clinical application of pulmonary function tests in preschool children

Praca finansowana z działalności statutowej kliniki nr 502-01-01105122-04348 oraz badań własnych nr 501-01-01105122-07884 i 501-01-01105122-04348

Abstract

Pulmonary function tests are routinely used in the assessment of respiratory system in older children and adults. They have not made their way into wide clinical practice in preschool children and infants, mainly due to poor cooperation in this age group. This review discusses the use of various pulmonary function tests in preschool children in clinical setting. Issues relevant for clinical practice comprising but not limited to expressing results, within-occasion repeatability and between occasion reproducibility of various tests as well as choosing reference data are described. This paper also examines the most frequent respiratory disorders in preschool children and potential impact of pulmonary function tests results on clinical management in these patients.

Key words: preschool children, pulmonary function tests, reference values, diagnostic tool

Pneumonol. Alergol. Pol. 2010; 78, 2: 133–137

Streszczenie

Badania czynnościowe stanowią złoty standard oceny układu oddechowego u dzieci w wieku szkolnym i starszych oraz osób dorosłych. Nie znalazły one jednak dotychczas szerszego zastosowania w praktyce klinicznej u dzieci w wieku przedszkolnym i młodszych, co wynika głównie z trudności z zaangażowaniem i współpracą w tym wieku. W niniejszej pracy przedstawiono zastosowanie badań czynnościowych układu oddechowego u małych dzieci. Poruszono — istotne dla klinicysty — kwestie dotyczące prawidłowego przedstawiania wyników badania, powtarzalności pomiarów czy wyboru wartości referencyjnych. Omówiono najczęściej występujące u dzieci w wieku przedszkolnym zaburzenia układu oddechowego oraz możliwości zastosowania badań czynnościowych układu oddechowego u cierpiących na nie pacjentów, a także ich potencjalny wpływ na postępowanie kliniczne czy decyzje terapeutyczne.

Słowa kluczowe: dzieci przedszkolne, badania czynnościowe układu oddechowego, wartości referencyjne, narzędzia diagnostyczne

Pneumonol. Alergol. Pol. 2010; 78, 2: 133–137

Badania czynnościowe układu oddechowego stanowią niezwykle ważny element oceny pacjentów z chorobami układu oddechowego. Dostarczają one obiektywnych kryteriów diagnostycznych, uła-

twiając wczesne rozpoznanie choroby, monitorowanie jej przebiegu i skuteczności stosowanego leczenia. Ich wynik może mieć wpływ na podejmowanie decyzji terapeutycznych oraz wartość pro-

Adres do korespondencji: dr n. med. Irena Wojsyk-Banaszak, Klinika Pneumonologii, Alergologii Dziecięcej i Immunologii Klinicznej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, ul. Szpitalna 27/33, 60–572 Poznań, tel.: (61) 849 13 13, faks: (61) 848 01 11, e-mail: iwojsyk@ump.edu.pl

Praca wpłynęła do Redakcji: 25.02.2009 r.
Copyright © 2010 Via Medica
ISSN 0867–7077

agnostyczną dla przebiegu choroby płuc. Od wielu lat stanowią złoty standard rozpoznawania i monitorowania astmy oskrzelowej i innych przewlekłych chorób układu oddechowego u pacjentów powyżej 6. roku życia, jednak u młodszych dzieci nie są — jak dotąd — powszechnie stosowane. Opublikowanie w 2007 roku wspólnych wytycznych europejskich i amerykańskich towarzystw chorób płuc *American Thoracic Society* (ATS), i *European Respiratory Society* (ERS) pozwoliło usystematyzować wiedzę teoretyczną na temat dostępnych metod badania funkcji układu oddechowego u małych dzieci [1], ale nie wpłynęło w sposób istotny na upowszechnienie ich zastosowania w praktyce klinicznej.

Przyczyn niedostatecznego wykorzystania badań czynnościowych u małych dzieci jest wiele. Jedną z nich stanowią trudności z zaangażowaniem i współpracą w tym wieku. Używany do badań sprzęt jest wysokospecjalistyczny, a przez to kosztowny, a ponadto nie zawsze powszechnie dostępny. Część badań klinicznych przeprowadzano z zastosowaniem aparatury modyfikowanej przez badaczy na potrzeby konkretnego badania. Zaangażowany personel, poza perfekcyjnym opanowaniem techniki badania, powinien umieć współpracować z dziećmi.

Idealne badanie czynnościowe układu oddechowego u dzieci przedszkolnych powinno spełniać następujące kryteria: (1) możliwość wykonania w każdym wieku i w konsekwencji zastosowania w badaniach długoterminowo oceniających czynność płuc, (2) łatwość przeprowadzenia, (3) bezpieczeństwo, (4) powtarzalność, (5) czułość wystarczająca dla odróżnienia dzieci chorych od zdrowych oraz wykrycia zmian związanych ze wzrastaniem, (6) możliwość zaakceptowania przez dzieci i ich rodziców [1].

Niezwykle ważnym zagadnieniem dla klinicysty jest wybór wartości referencyjnych, uzyskanych przez porównywalnych pod względem wzrostu i masy ciała rówieśników. Zależy od nich interpretacja wyników, co w konsekwencji może mieć wpływ na decyzje terapeutyczne [2]. Dla dzieci w wieku przedszkolnym opublikowano wartości referencyjne pomiarów czynności układu oddechowego metodą spirometrii [3–5], okluzji [6, 7], oscylacji wymuszonych [8, 9] i oscylometrii impulsowej [10–12], pletyzmografii [9], metody rozcieńczania gazu [13]. Wartości referencyjne uzyskane dla dzieci starszych nie powinny być ekstrapolowane dla pacjentów sześciolletnich i młodszych [1]. Na ogół parametry czynnościowe mają rozkład normalny i za prawidłowe przyjmuje się te mieszczące się w przedziale $\pm 1,96$ odchylenia standardowego (SD, *standard deviation*). Jednak tak przy-

jęty zakres normy jest często szeroki i, z tego względu, wyniki pomiarów części chorych mogą się zawierać w zakresie obserwowanym dla zdrowej populacji [14]. Jeżeli to możliwe wyniki powinny być przedstawione jako *Z-scores*. *Z-score* jest wskaźnikiem oznaczającym, o ile SD otrzymany wynik różni się od wyznaczonej wartości średniej danego parametru dla danej populacji. Ponadto zobiektywizowany wskaźnik *Z-score* może służyć do oceny występujących zmian czynności układu oddechowego i nie ulega on zmianom pod wpływem czynników modyfikujących, jak: wzrastanie, zmiana masy ciała, zastosowanie zmienionych metod pomiaru [1].

W ocenie wartości referencyjnych należy uwzględnić metodę badania i sprzęt, na którym wykonywano pomiary, a także reprezentatywność poszczególnych grup wiekowych, w tym małych dzieci [14]. Ponadto sprzęt i oprogramowanie, stosowane do badań dzieci w wieku przedszkolnym, powinny być specjalnie przystosowane do małych pacjentów.

Lekarz wybierający rodzaj badania i oceniający jego wynik powinien wiedzieć, jakie rezultaty osiągają najczęściej pacjenci z danym schorzeniem, oraz znać prawdopodobieństwo otrzymania wyniku fałszywie dodatniego.

Metoda optymalna dla rozpoznania oraz monitorowania przebiegu choroby powinna się cechować powtarzalnością wyników, zarówno w czasie danego badania, jak i podczas kolejnych badań, u dzieci zdrowych i chorych. Powtarzalność pomiaru jest zwykle przedstawiana jako współczynnik zmienności (CV%, *coefficient of variation*), który jest obliczany jako uśrednione odchylenie standardowe (tj. $100 \times \text{SD}/\text{średnia}$) [14]. Na brak powtarzalności pomiarów mogą mieć wpływ liczne czynniki techniczne, w tym zależne od pacjenta, jak: zmiana sposobu oddychania z „przez usta” na „przez nos” (zapobiega temu klips na nosie lub maska z wbudowanym ustnikiem), zmiany toru oddychania, czynność mięśni oddechowych, ruchy języka i wielkość głośni [15]. Powtarzalność pomiaru należy uwzględnić, oceniając skuteczność stosowanych interwencji terapeutycznych, a zatem czy zmiany obserwowane po zastosowanym leczeniu, na przykład lekach rozszerzających oskrzela, wynikają faktycznie z ich działania czy też z fizjologicznej zmienności czynnościowej układu oddechowego. Podobnie w ocenie progresji choroby czy skuteczności stosowanego leczenia należy brać pod uwagę zmienność pomiarów uzyskiwanych w kolejnych dniach [16].

Celem niniejszego artykułu jest przedstawienie możliwości zastosowania badań oceniających stan czynnościowy układu oddechowego w praktyce klinicznej.

Zastosowanie kliniczne

Najczęściej występującymi zaburzeniami układu oddechowego u dzieci w wieku przedszkolnym są te o charakterze obturacyjnym, dotyczące jednej trzeciej małych dzieci [17]. W tym okresie życia znacznie większy niż w późniejszym wieku udział w całkowitym oporze dróg oddechowych ma opór obwodowych dróg oddechowych [15]. Pacjenci z obturacją stanowią heterogenną grupę, różne są bowiem przyczyny obturacji oraz czas nawracania objawów. Mimo że 80% opisywanych dzieci „klinicznie wyrasta” z obturacji, u większości z nich stwierdza się utrzymywanie nieprawidłowych parametrów mechaniki oddychania [17, 18]. W długoterminowych badaniach populacyjnych stwierdzono ponadto, że incydenty obturacji we wczesnym dzieciństwie stanowią istotny czynnik ryzyka rozwoju astmy oskrzelowej w drugiej dekadzie życia, nawet u osób, u których objawy ustąpiły na wiele lat [19]. Częstość występowania astmy u młodych dorosłych z nawracającą obturacją w okresie wczesnodziecięcym w wywiadzie jest pięciokrotnie wyższa niż w grupie ich rówieśników [20].

Astmę u małych dzieci rozpoznaje się na podstawie objawów klinicznych, danych z wywiadu i odpowiedzi na leczenie. Nieliczne są — jak dotąd — próby powiązania kryteriów klinicznych z obiektywnymi parametrami czynnościowymi układu oddechowego u małych dzieci [21, 22].

Badacze niemieccy w latach 90. ubiegłego wieku wykazali w badaniu spirometrycznym, przeprowadzonym w grupie 4–6-letnich zdrowych dzieci, statystycznie istotnie gorszą FEV_1 u badanych narażonych na zanieczyszczenie powietrza [23].

Podobnie nieliczne są — jak dotąd — badania dokumentujące korelację między fenotypem obturacji i jej ewolucją we wczesnym dzieciństwie a własnościami mechanicznymi układu oddechowego. Stwierdzono, że upośledzenie czynności płuc, mierzone metodą pletyzmografii, u dzieci z obturacją w wieku 3 lat jest istotnym czynnikiem ryzyka utrzymywania się epizodów świszczącego oddechu w późniejszym okresie życia [22]. Badacze amerykańscy wykazali u 4-letnich dzieci chorych na astmę oskrzelową statystycznie istotną różnicę wyników próby rozkurczowej, ocenianej metodą oscylometrii impulsowej (ale nie spirometrii), w porównaniu z dziećmi zdrowymi. Różnicy takiej nie zaobserwowano w wynikach badania spirometrycznego przed podaniem leków rozkurczowych [21].

Podjęto też próbę oceny czynności układu oddechowego u dzieci z różnymi fenotypami ob-

turacji metodą okluzji. Co prawda wartości R_{int} były wyższe u dzieci z utrzymującą się obturacją (*persistent wheeze*), ale z uwagi na szeroki zakres mierzonych u nich wartości i „nakładanie się” wyników dzieci z różnymi fenotypami świszczącego oddechu, nie udało się określić ryzyka wystąpienia astmy oskrzelowej wyłącznie na podstawie wyniku tego badania [24].

Aktualnie uważa się, że u dzieci z astmą do zaburzenia czynności płuc dochodzi głównie w pierwszych 6 latach życia [25], a dodatkowo nieznacznie ulega ona pogorszeniu w ciągu kolejnych 4 lat [26]. Równocześnie poddaje się w wątpliwość wpływ leczenia przeciwzapalnego [27] i rozszerzającego oskrzela [28] na naturalny przebieg choroby u małych dzieci z przemijającą obturacją. Zatem jak najwcześniejsze rozpoznanie astmy pozwoliłoby zoptymalizować postępowanie terapeutyczne i uniknąć zarówno opóźnionego, jak i niedostatecznie intensywnego leczenia, a w konsekwencji trwałego uszkodzenia płuc, z drugiej strony czasem niepotrzebnego stosowania leków przeciwzapalnych i narażania pacjentów na ich działania uboczne.

Badania czynnościowe stanowią potencjalnie istotne narzędzie oceny klinicznej małych dzieci z mukowiscydozą. Pięćdziesiąt procent niemowląt w momencie rozpoznania choroby prezentuje objawy ze strony układu oddechowego oraz zaburzenia czynnościowe o charakterze obturacji [29]. Wskaźnik FEV_1 , którego wartość w późniejszym okresie najlepiej koreluje z ryzykiem zgonu [29] u dzieci z mukowiscydozą, jest znacznie obniżony w porównaniu ze zdrowymi rówieśnikami [30]. Średnia wartość FEV_1 obniża się z 90% wartości przewidywanej w wieku 6–12 lat do 59% wartości przewidywanej w wieku 18 lat [31]. Mimo że wiedza dotycząca przebiegu zmian oskrzelowo-płucnych u niemowląt z mukowiscydozą jest coraz bogatsza, niewiele wiadomo na temat czynności układu oddechowego tych chorych w wieku przedszkolnym. Wczesne rozpoznanie zaburzeń czynności układu oddechowego i ich ocena ilościowa mogą pozwolić na odpowiednio wczesne rozpoczęcie agresywnego leczenia, zanim dojdzie do nieodwracalnych zmian w płucach. Ponieważ zmiany w przebiegu mukowiscydozy początkowo dotyczą obwodowych części płuc, w tej chorobie zastosowanie mogą znaleźć metody diagnozowania nieprawidłowości zachodzących w miąższu płuc, takie jak metoda oscylacji wymuszonych czy rozcieńczeń gazu [1].

Również coraz liczniejsza grupa przedwcześnie urodzonych noworodków z małą i bardzo małą urodzeniową masą ciała oraz z powikłaniami okre-

su okołoporodowego, pod postacią przewlekłej choroby płuc, może odnieść korzyści z badań czynnościowych układu oddechowego. Przewlekła choroba płuc charakteryzuje się zaburzeniami wentylacji, zarówno o charakterze obturacyjnym, jak i restrykcyjnym. Z kolei zaburzenia rozwoju dróg oddechowych, naczyń oraz miąższu płucnego mogą prowadzić do upośledzenia podatności płuc, zaburzenia drożności obwodowych dróg oddechowych oraz nadreaktywności oskrzeli. Wyniki badań oceniających długofalowo rozwój dzieci z przewlekłą chorobą płuc pokazują, że u części z nich utrzymują się nieprawidłowości układu oddechowego pod postacią incydentów obturacji, nadreaktywności oskrzeli czy obniżonej pojemności życiowej w wieku zarówno szkolnym [32–34], jak i dorosłym [35, 36]. Okres przedszkolny u tych pacjentów jest, z przyczyn technicznych, stosunkowo najgorzej poznany. Wiadomo jednak, że w wieku 3–5 lat u dzieci, które przebyły przewlekłą chorobę płuc, są obniżone wskaźniki reaktancji oraz wyższa jest częstotliwość rezonansu w badaniu metodą oscylacji wymuszonych w porównaniu z grupą kontrolną [37]. Zaburzenia te, świadczące o zmniejszonej podatności płuc, występują nawet u dzieci bez objawów klinicznych. Większa część niemowląt z przewlekłą chorobą płuc jest przez wiele lat leczona wziewnymi lekami przeciwzapalnymi i rozszerzającymi oskrzela [38]. Wyodrębnienie tych dzieci, u których występują zaburzenia czynnościowe układu oddechowego, zwłaszcza w okresie bezobjawowym, oraz dzieci z nadreaktywnością oskrzeli, szczególnie częściowo odwracalną, mogłoby mieć istotne implikacje dla postępowania terapeutycznego.

Podziękowania

Autorzy pracy składają podziękowania Profesorowi Grzegorzowi Lisowi za przejrzenie manuskryptu oraz wskazówki merytoryczne, a także Profesorowi Waldemarowi Tomalakowi, którego cenne uwagi były pomocne dla powstania tego artykułu.

Piśmiennictwo

1. An official American Thoracic Society/European Respiratory Society statement: Pulmonary function testing in preschool children. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2007; 175: 1304–1345.
2. Tomalak W. Wykonywanie badań spirometrycznych u dzieci. *Pneumonol. Alergol. Pol.* 2006; 74: 39–40.
3. Nystad W., Samuelsen J.O., Nafstad P., Edvardsen E., Stensrud T., Jakkola J.J. Feasibility of measuring lung function in preschool children. *Thorax* 2002; 57: 1021–1027.
4. Zapletal A., Chalupova J. Forced expiratory parameters in healthy preschool children (3–6 years of age). *Pediatr. Pulmonol.* 2003; 35: 200–207.
5. Vilozni D., Barak A., Efrati O. i wsp. The role of computer games in measuring spirometry in healthy and “asthmatic” preschool children. *Chest* 2005; 128: 1146–1155.
6. Lombardi E., Sly P.D., Concutelli G. i wsp. Reference values of interrupter respiratory resistance in healthy preschool white children. *Thorax* 2001; 56: 691–695.
7. Merkus P.J., Arets H.G., Joosten T. i wsp. Measurements of interrupter resistance: reference values for children 3–13 yrs of age. *Eur. Respir. J.* 2002; 20: 907–911.
8. Mazurek H., Willim G., Marchal F., Haluszka J., Tomalak W. Input respiratory impedance measured by head generator in preschool children. *Pediatr. Pulmonol.* 2000; 30: 47–55.
9. Klug B., Bisgaard H. Specific airways resistance, interrupter resistance and respiratory impedance in healthy children aged 2–7 years. *Pediatr. Pulmonol.* 1998; 25: 322–331.
10. Frei J., Jutla J., Kramer G. i wsp. Impulse Oscillometry. Reference values in children 100 to 150 cm in height and 3 to 10 years of age. *Chest* 2005; 128: 1266–1273.
11. Dencker M., Malmberg L.P., Valind S. i wsp. Reference values for respiratory system impedance by using impulse oscillometry in children aged 2–11 years. *Clin. Physiol. Funct. Imaging* 2006; 26: 247–250.
12. Nowowiejska B., Tomalak W., Radliński J., Siergiejko G., Latawiec W., Kaczmarek M. Transient reference values for impulse oscillometry for children aged 3–18 years. *Pediatr. Pulmonol.* 2008; 00: 1–6.
13. Aurora P., Bush A., Gustafsson P.M. i wsp. Multiple-breath wash-out as a marker of lung disease in preschool children with cystic fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2005; 171: 249–256.
14. Stocks J. Clinical implications of pulmonary function testing in preschool children. *Pediatr. Resp. Rev.* 2006; 7S: S26–29.
15. Arets H.G.M., van der Ent C.K. Measurements of airway mechanics in spontaneously breathing young children. *Pediatr. Respir. Rev.* 2004; 5: 77–84.
16. Frey U. Clinical implications of infant lung function testing: does it contribute to clinical decision making? *Pediatr. Respir. Rev.* 2001; 2: 126–130.
17. Taussig L.M., Wright A.L., Holberg C.J. i wsp. Tucson children's respiratory study: 1980 to present. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2003; 111: 661–675.
18. Piippo-Savolainen E., Korppi M. Wheezy babies — wheezy adults? Review on long-term outcome until adulthood after early childhood wheezing. *Acta Paediatr.* 2008; 97: 5–11.
19. Goskor E., Amark M., Alm B. i wsp. Asthma symptoms in early childhood — what happens then? *Acta Paediatr.* 2006; 95: 471–478.
20. Huurre T.M., Aro H.M., Jaakkola J.J. Incidence and prevalence of asthma and allergic rhinitis: a cohort study of Finnish adolescents. *J. Asthma* 2004; 41: 311–317.
21. Marotta A., Klinnert M.D., Price M.P. i wsp. Impulse oscillometry provides an effective measure of lung dysfunction in 4-year-old children at risk for persistent asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2003; 112: 317–322.
22. Lowe L.A., Simpson A., Woodcock A., Morris J., Murray C.S., Custovic A. Wheeze phenotypes and lung function in preschool children. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2005; 171: 231–237.
23. Fritz G.J., Herbarth O. Pulmonary function and urban air pollution in preschool children. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 2001; 203: 235–244.
24. Brussee J.E., Smith H.A., Koopman L.P. i wsp. Interrupter resistance and wheezing phenotypes at 4 years of age. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2004; 169: 209–213.
25. Martinez F.D., Wright A.L., Taussig L.M. i wsp. Asthma and wheezing in the first six years of life. *N. Engl. J. Med.* 1995; 332: 133–138.
26. The Childhood Asthma Management Program Research Group. Longterm effects of budesonide or nedocromil in children with asthma. *N. Engl. J. Med.* 2000; 343: 1054–1063.
27. Wong J.Y., Moon S., Beardmore C. i wsp. No objective benefit from steroids inhaled via a spacer in infants recovering from bronchiolitis. *Eur. Respir. J.* 2000; 15: 388–394.
28. Goldstein A.B., Castile R.G., Davis S.D. i wsp. Bronchodilator responsiveness in normal infants and young children. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2001; 164: 447–454.
29. Marostica P.J., Weist A.D., Eigen H. i wsp. Spirometry in 3- to 6-year old children with cystic fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2002; 166: 67–71.
30. Morgan W.J., Butler S.M., Johnson C.A. i wsp. Epidemiologic study of cystic fibrosis: design and implementation of a prospective, multicenter, observational study of patients with cystic fibrosis in the US and Canada. *Pediatr. Pulmonol.* 1999; 28: 231–241.
31. Konstan M.W., Butler S.M., Schidlow D.V., Morgan W.J., Julius J.R., Johnson C.A. Patterns of medical practice in cystic fibrosis.

- I. Evaluation and monitoring of health status of patients. Investigators and Coordinators of the Epidemiologic Study of cystic fibrosis. *Pediatr. Pulmonol.* 1999; 28: 242–247.
32. Malmberg L.P., Mieskonen S., Pelkonen A., Kari A., Sovijarvi A.R., Turpeinen M. Lung function measured by the oscillometric method in prematurely born children with chronic lung disease. *Eur. Respir. J.* 2000; 16: 598–603.
33. Filippone M., Sartor M., Zacchello F., Baraldi E. Flow limitation in infants with bronchopulmonary dysplasia and respiratory function at school age. *Lancet* 2003; 361: 753–754.
34. Narang I., Baraldi E., Silverman M., Bush A. Airway function measurements and the long-term follow-up of survivors of pre-term birth with and without chronic lung disease. *Pediatr. Pulmonol.* 2006; 41: 497–508.
35. Vrijlandt E.J., Gerritsen J., Boezezn H.M., Grevink R.G., Duiverman E.J. Lung function and exercise capacity in young adults born prematurely. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2006; 173: 890–896.
36. Doyle L.W., Faber B., Callanan C., Freezer N., Ford G.W., Davis N.M. Bronchopulmonary dysplasia in Very Low Birth Weight subjects and lung function in late adolescence. *Pediatrics* 2006; 118: 108–113.
37. Vrijlandt E.J., Boezezn H.M., Gerritsen J., Stremmelaar E.F., Duiverman E.J. Respiratory health in prematurely born pre-school children with and without bronchopulmonary dysplasia. *J. Pediatr.* 2007; 150: 256–261.
38. Allen J., Zwerdling R., Ehrenkranz R. i wsp. Statement on the care of the child with chronic lung disease of infancy and childhood. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2003; 168: 356–396.