

# Talasemi Majorlu Çocuklarda Plazma/Lökosit Askorbik Asit Düzeyleri İle Demir Birikimi Arasındaki İlişki (\*)

Erdal ATAÖZDEN (\*\*), Hale ARAL (\*\*\*), Arif KUT (\*\*), Selma ÇEKİRDEK (\*\*\*\*), Çetin TİMUR (\*\*\*\*\*), İncihan OCAKOĞLU (\*\*\*)

## ÖZET

*Transfüzyon tedavisi beraberinde önemli komplikasyonlara yol açan demir birikimi ile, plazma ve lökosit askorbik asit düzeyleri arasındaki ilişkiyi ve talasemi tedavisinde askorbik asitin yerini araştırdık. 25 takipli hasta (13 kız, 12 erkek) ve 21 sağlıklı çocuk (10 kız, 11 erkek) çalışmaya alındı. Plazma ve lökosit askorbik asit düzeyleri dinitrofenil hidrazin metodu; serum ferritin düzeyleri ELİSA metodu ile ölçüldü. Lökosit askorbik asit düzeyleri normal olan 14 hastanın ferritin değerlerinin ortalaması  $1211.94 \pm 179.92$  ng/ml iken, lökosit askorbik asit düzeyi normalin altında olan 11 hastanın ferritin değerlerinin ortalaması  $1338.22 \pm 229.65$  ng/ml idi ( $p > 0.05$ ). Plazma ve lökosit askorbik asit düzeylerinin azalmasıyla birlikte serum ferritin düzeylerinde yükselme gözlemlendi, ancak bu istatistiksel olarak anlamlı değildi.*

**Anahtar kelimeler:** Askorbik asit, talasemi major, ferritin, DFO

## SUMMARY

### Relationship Between Ascorbic Acid Levels of Plasma/Leucocyte Ascorbic Acid Levels and Iron Loading in Children with Thalassemia Major

*We investigated the relationship between iron loading, which causes important complications during transfusion therapy, and plasma and leucocyte ascorbic acid levels. 25 followed patients (13 female, 12 male) and 21 healthy children (10 female, 11 male) were studied. Plasma and leucocyte ascorbic acid levels were measured using the method of dinitrophenyl hydrazine and; serum ferritin levels were measured using the ELISA method. While for 14 patients, whose leucocyte ascorbic acid levels were within normal range, had serum ferritin mean levels of  $1211.94 \pm 179.92$  ng/ml; for 11 patients, whose leucocyte ascorbic acid levels were lower than the normal range, had serum ferritin mean levels of  $1338.22 \pm 229.65$  ng/ml ( $p > 0.05$ ). Decreasing the plasma and leucocyte ascorbic acid levels, serum ferritin levels were found to increase, but it was not important statistically.*

**Key words:** Ascorbic acid, thalassemia major, ferritin, DFO

Otozomal resessif geçiş gösteren hastalıklar arasında en sık görülen hastalık grubunu oluşturan Talasemi sendromlarının, ülkemizdeki taşıyıcılık sıklığı bölgeler arasında büyük farklılıklar göstermekte olup <sup>(1)</sup>, % 0.6 ile % 10.8 arasında değişmektedir <sup>(2,3)</sup>.

Hastalığın klinik seyri uygun transfüzyon ve demir şelasyon tedavisi alıp almamasına bağlıdır. Uygun tedavi almayan hastalarda yaşam süresi 5 yaş civarında olmasına karşın, uygun tedavi alanlar daha uzun yaşayabilmektedir <sup>(4)</sup>, ancak ileri yaşlara ulaşan hasta sayısı ile

birlikte komplikasyonların görülme sıklığı da artmıştır. Talasemi majorlu hastalarda transfüzyon tedavisinin en önemli komplikasyonu demir birikimidir. Demir birikimini ve organlarda demir toksisitesine bağlı hasarları önlemek veya geciktirmek için şelasyon tedavisi şarttır <sup>(5-9)</sup>. Bu amaçla günümüzde kullanılan Desferrok-samin (DFO) ile negatif demir dengesi oluşturulur, serum ferritin seviyesi düşürülür, transferrin saturasyonu azaltılır, oluşan hepatik hasar geriye döndürülürken talasemi majorda en sık ölüm nedeni olan kardiyak komplikasyonlar geciktirilerek yaşam süresi uzatılmış

Serbest Radikaller ve Antioksidanlar Araştırma Derneği tarafından 19-22 Mayıs 1999 tarihleri arasında Eskişehir'de düzenlenen 2. Ulusal Kongresi'nde poster olarak sunulmuştur.\*; SSK Göztepe Eğitim Hastanesi Çocuk Kliniği Asist. Dr.\*\*; Biyokimya Kliniği Uz. Dr\*\*\*; Biyokimya Klinik Şefi\*\*\*\*; Çocuk Kliniği Hematoloji Ünitesi Uz. Dr.\*\*\*\*\*

olur (10-12).

Demir emiliminde; gıdanın içeriği, demir depolarının o anki durumu, eritropoezin hızı ve kişinin hemoglobinin düzeyi etkindir. Askorbik asit demir absorpsiyonunu artırmaksızın ekskresyonunu artırır. Demirin artı ikiden artı üç değerliğe değişiminde ve demirin hücre içine girişinde etkilidir. Askorbik asit demir depolarını mobilize edip düşük moleküler ağırlıklı şelatabl demir havuzunda artış sağlar ve DFO ile üriner demir atılımını artırır. Askorbik asit DFO infüzyonundan bağımsız olarak verilirse düşük moleküler ağırlıklı demir dokulara direkt olarak toksik etkili olabilir. Gıdalarla birlikte verilirse gastrointestinal demir emilimini artırır. DFO infüzyonuna başlanıldığında, infüzyonla eşzamanlı olarak 100 mg C vitamini ağızdan verilmelidir. DFO dozu arttıkça C vitamini dozunu 200 mg'a çıkarmak gerekir (12-14).

Askorbik asidin en önemli kimyasal özelliği kuvvetli redüktör olmasıdır; enediol grubu (C-2,C-3), hidrojen transfer sistemi olarak görev yapar (15). Askorbik asit orak hücre anemisinde eritrositleri hemolizden korurken (16); G-6-PD eksikliğinde (17) ve paroksizmal nokturnal hemoglobinüride eritrositlerde hemolizi artırır (18). Plazma askorbik asit düzeyi yakın zamandaki askorbik asit alımını gösterirken, periferik kandaki lökosit askorbik asit düzeyleri doku rezervlerini gösterir. Eritrosit askorbik asit düzeyi, lökosit askorbik asit düzeyi ile kıyaslandığında oldukça düşüktür (19).

Transfüzyon tedavisinde kullanılan konsantre eritrosit süspanسیونları 1 mg/ml demir içermekte ve böylece her transfüzyonda organizmaya ortalama 180 mg demir verilmektedir (7). Önemli komplikasyonlara yol açan demir birikimi ile, plazma ve lökosit askorbik asit düzeyleri arasındaki ilişkiyi ve talasemi tedavisinde askorbik asitin yerini ortaya koymayı amaçladık.

## MATERYAL ve METOD

SSK Göztepe Eğitim Hastanesi Çocuk Kliniği Hemato-loji Ünitesi'nce  $\beta$ -Talasemi major tanısı ile izlenen, yaşları 2 3/12 ile 17 1/12 arasında değişen, 13'ü kız 12'si erkek olan transfüzyona bağımlı 25 çocuk hasta grubunu oluştururken; kontrol grubu yaşları 4 1/12 ile 12 6/12 arasında olan, 21 (10 kız, 11 erkek) sağlıklı çocuktan oluştu. Hastalarımızın tanı alma yaşları 0.25 ile 8 yıl arasında değişmekte idi.

Olguların hemoglobin ve lökosit sayımları Coulter T-660 ile

yapıldı. Serum ferritin düzeyleri ELISA metodu kullanılarak, Bio-Clin, Inc. (ABD) ile belirlendi. 300  $\mu$ l heparin içeren 10 mililitrelik enjektöre kan alınarak, oda ısısında 30 dakika bekletilip altta eritrositler, üzerinde lökositleri ihtiva eden sıvı (buffy coat), en üstte plazma olarak çökmesi sağlandıktan sonra; lökositlerin bulunduğu sıvı alınarak mevcut lökositlerin sayımı yapıldı. Askorbik asit düzeyleri saptanacak olan bu lökositlerin sayımı Türk solüsyonu (Glasiyal asetik asit, 3 ml; % 1 Jansiyen viole, 3 ml; distile su, 300 ml) kullanılarak Thoma lamı ile sağlandı.

Lökositler, Janke & Kunkel, IKA Labortechnik Ultra-Turbax T 25 kullanılarak, dakikada 13500 devir hızla, 6 dakika süreyle homojenize edildi. Plazma ve lökositler % 5 TCA ile karıştırılıp 15 dakika (2500 g) santrifüj edilerek deproteinizasyonları sağlandı. Daha sonra askorbik asit düzeyleri ölçüldü. Plazma ve askorbik asit konsantrasyonu dinitrofenil hidrazin metodu ile spektrofotometrik olarak 520 nm dalga boyunda ölçüldü (20, 21).

İstatistikler, SPSS for Windows (Release 5.0.1) proramı ile Student t testi kullanılarak değerlendirildi.

## BULGULAR

Hastalarımızın ortalama tanı alma yaşları  $2.40 \pm 1.64$  yıl idi. Hastalarımız; ortalama olarak  $7.28 \pm 3.78$  yıldır,  $3.20 \pm 0.41$  hafta sıklığında,  $135.04 \pm 72.73$  ünite kan almışlardı.

Hastalardan askorbik asit alanların ortalama Hb değerleri  $8.48 \pm 1.24$  g/dl, almayanların  $8.30 \pm 1.06$  g/dl olup aralarında anlamlı bir fark yoktu ( $p > 0.05$ ) (Tablo 1). Askorbik asit alan hasta grubuna ait ( $n=14$ ) ortalama plazma askorbik asit düzeyi ( $0.91 \pm 0.34$  mg/dl) ile; askorbik asit almayan hasta grubuna ait ( $n=11$ ), plazma askorbik asit düzeyi ( $0.29 \pm 0.16$  mg/dl) arasında ileri derecede anlamlı bir fark istatistiksel vardı ( $p < 0.01$ ). Çalışma grubunda askorbik asit alan 14 hastanın 5'inde (% 36) plazma askorbik asit düzeyi normalin altındaydı.

Askorbik asit alan 14 hastanın 2'sinde (% 14), askorbik asit almayan 11 hastanın 9'unda (% 82); toplam 11 hastada (9+2) lökosit askorbik asit düzeyi normalden (normal değer: 20-40  $\mu$ g /108 lökosit) düşük bulundu. Tüm olgularda askorbik asit alanların ortalama lökosit askorbik asit değerleri  $26.87 \pm 6.04$   $\mu$ g/108 lökosit iken, bu değer askorbik asit almayanlarda  $15.18 \pm 5.93$   $\mu$ g/108 lökosit bulundu ( $p < 0.01$ ).

Hasta grubu içinde askorbik asit alanlarda ortalama se-

**Tablo 1. Kontrol ve hasta grubuna ait yaş, kan hemoglobin, plazma askorbik asit, lökosit askorbik asit, serum ferritin ortalama değerlerinin karşılaştırılması ve askorbik asit alan ve almayanlara ait kan hemoglobin, plazma askorbik asit, lökosit askorbik asit, serum ferritin ortalama değerleri.**

	Hasta (n=25)	Kontrol (n=21)	p değerleri
Yaş (yıl)	12.49±0.95	9.42±2.12	(p>0.05)
Kan Hemoglobin (gr/dl)	12.49±0.95	8.40±1.15	(p<0.01)
Plz. askorbik a. (mg/dl)	AA alan: 8.48±1.24 (n=24)	0.89±0.22	(p=0.017)
	AA almayan: 8.30±1.06 (n=11)		
Lök. askorbik a. (µg/10 <sup>8</sup> lök.)	0.64±0.42	31.60±11.89	(p<0.01)
	AA alan: 0.91±0.34 (n=14)		
Serum Ferritin (ng/ml)	AA almayan: 0.29±0.16 (n=11)	27.62±10.43	(p<0.01)
	21.73±8.34		
	AA alan: 26.87±6.04 (tüm olgularda)		
	AA almayan: 15.18±9.53 (tüm olgularda)		
	1267.50±208.81		
	AA alan: 1205.62±179.55 (n=14)		
	AA almayan: 1346.27±214.83 (n=11)		

rum ferritin değeri 1205.62±179.55 ng/ml iken, askorbik asit almayanlarda 1346.27±214.83 ng/ml bulundu; aralarında istatistik anlamlılık yoktu (p>0.05).

Lökosit askorbik asit düzeyleri normal olan 14 hastanın ferritin değerlerinin ortalaması 1211.94±179.92 ng/ml iken, lökosit askorbik asit düzeyi normalin altında olan 11 hastanın ferritin değerlerinin ortalaması 1338.22 ±229.65 ng/ml olarak bulundu, ancak istatistiksel anlamlılık yoktu (p>0.05).

## TARTIŞMA

Askorbik asit metabolizması ve hemoglobin oluşumu arasında belirgin bir ilişki olduğu gösterilmiştir. Cox ve ark., sağlıklı çocuklarda yaptıkları bir çalışmada, askorbik asit düzeylerindeki artmanın Hb düzeylerini de arttıracakını göstermişlerdir (22). Choremis ve ark., bir test dozunda askorbik asit verdikten sonra, talasemili çocukların plazma askorbik asit düzeylerinde kontrol grubuna göre hızlı bir artışı takiben hızlı bir düşüş saptamışlar ve buna, kan yapan dokuların aktivitesinin fazla olmasına bağlı olarak artmış kullanımanın yolaçtığı ileri sürmüşlerdir (21). Hunt ve ark., demir eksikliği olan kadınlarda yaptıkları bir çalışmada, askorbik asit verilmesiyle birlikte Hb değerlerinde yükselme olduğunu göstermişlerdir (23). Buna karşılık, deneysel skorbut oluşturulan erişkinlerde yapılan bir çalışmada askorbik asitin kan oluşumu için gerekli olmadığı sonucuna varılmıştır (21). Bizim çalışmamızda, hastalardan askorbik asit alanlarla almayanların ortalama Hb değerleri arasında anlamlı bir fark yoktu (p>0.05).

Çocuklarda askorbik asit seviyeleri ile demir düzeyi

arasında ters bir ilişki varlığı gösterilmiştir. Demir eksikliği anemisinde, askorbik asit katabolizmasındaki azalma bunu açıklayabilmektedir(24). Talasemi majorlu çocuklarda yapılan bir çalışmada, ilk uygulamadan 2.,3.,4. saatler sonrasında 50 mg/kg dozunda per-oral (PO) askorbik asit verildikten sonra plazma askorbik asit düzeylerine bakıldığında gözlenen; her iki grupta da en yüksek düzeye 3. saatten sonra erişmiştir. Ancak hastalardaki düzeyi, kontrol grubuna göre istatistik olarak anlamlılık gösterecek şekilde yüksek bulunmuştur (p<0.01). Buradan hareketle, talasemi majorlu hastalardaki düşük plazma askorbik asit seviyesinin muhtemel nedenleri olarak; askorbik asitin bu hastalarda plazmadan dokulara daha hızlı taşınması, böbrek atılımının daha hızlı olması veya askorbik asit katabolizmasının hızlanmış olması gibi olası nedenler ileri sürülmüştür (21).

Çalışma grubumuzun plazma askorbik asit düzeyi ortalamasının (0.64±0.42 mg/dl) nispeten normal sınırlara (0.8-1.4 mg/dl) yakın saptanması; daha önce Tayland'da yapılan bir çalışmada (25) gösterildiği gibi askorbik asit açısından zengin besinlerin ülkemizde bol miktarda bulunması ve tüketilmesinin yanısıra Açkurt ve ark.'nın gösterdiği gibi, ülkemizdeki 7-17 yaş grubundaki okul çocuklarının % 82.5'inin plazma askorbik asit düzeyinin normal sınırlarda bulunması, ayrıca çalışma grubumuzdaki 14 hastanın 250 mg/gün dozunda PO askorbik asit alıyor olması ile açıklanabilir. Wapnick ve ark.'nın en az 23 litre kan tansüzyonu almış olan 14 hastada yapmış olduğu çalışmaya göre, askorbik asit deposu olarak görev yapan lökositlerdeki düzeyini kontrole göre düşük bulup, 250 mg x 3/gün dozunda askorbik

asit başladıktan bir hafta sonra hastaların lökosit askorbik asit düzeylerinde yükselme saptamışlar. Askorbik asit verilmesi kesildikten iki ay sonra, lökosit askorbik asit düzeylerinin eski düşük değerlerine gerilediğini gözlemlemişlerdir (26). Bizim çalışmamızda da, PO askorbik asit alımı ile lökosit askorbik asit düzeyi arasındaki ilişki belirledik. Askorbik asit non-hem demir emilimini artıran maddelerin en güçlüsüdür (27). A.B.D. ve İngiltere’de aşırı demir yüklenmesi olan hastalarda bile diyetle askorbik asit alındığı için klinik “skorbüt” gelişmemektedir (28).

Conte ve ark., talasemik hastalara PO 1 g askorbik asit verdikten sonra idrarla demir atılımının arttığını saptamışlardır. Ancak, askorbik asit verilen ve verilmeyen gruplar arasındaki fark istatistiki olarak anlamlı bulunmamıştır (29). Talasemik hastalara DFO ile birlikte PO askorbik asit verilmesiyle oluşan idrardaki demir atılımının, sadece DFO verilmesiyle oluşandan daha fazla olduğunu, Conte (29) dahil, bir çok araştırmacı göstermiştir (30-33). Hussain ve ark., bu artışın % 96 gibi bir oranda gerçekleştiğini göstermiştir (31). Buna karşılık, Hathirat ve ark. DFO alan talasemik hastalara 300 mg/gün askorbik asiti bir ay verip bir ay vermeme şeklinde, 4 ile 10 ay süre ile izlemişler ve bu hastalarda askorbik asit aldığı ve almadığı dönemlerdeki idrarla demir atılımı arasındaki farkı istatistiki olarak anlamlı bulmamışlardır (33).

Kan transfüzyonuna bağlı demir yüklenmesi olan hastalarda askorbik asit düzeyleri düşüktür. Askorbik asit depoları azaldığında DFO’nun indüklediği demir atılımı bozulur. Ancak, askorbik asit suplementasyonu ile atılım beklenen değerlere döner. Yoğun şelasyon tedavisi ile aşırı demir depolanması azaltılabildiğinde lökosit askorbik asit düzeyi de normale döner ve normal diyetle beslenen hastalarda DFO’in indüklediği maksimum demir atılımı artık askorbik asit suplementasyonuna bağlı değildir. Oral askorbik asit verilmesinin idrar demir atılımını artırması yönündeki etkiyi Conte ve ark. ferritinden salınan demirin ferröz hale redukte olması ile açıklarken (29), Pippard da makrofajlardan demirin hepatositlere mobilize olması ve böylece serum demir konsantrasyonunun artması veya demir turnover’ındaki değişikliklere bağlamıştır (31).

β Talasemi majorlu hastalarda, sadece şelasyon tedavisi uygulanmasıyla karşılaştırıldığında, şelasyon tedavisi ile birlikte oral askorbik asit alımının, serum ferritin

düzeyini, daha çok düşürmekle birlikte yine de normal düzeylere indirmekte yetersiz kaldığı, hastalar için önemli bir sorun olan demir birikiminin önlenmesi amacıyla bu yöndeki çalışmaların devam etmesi gerektiği sonucuna varılmıştır.

## KAYNAKLAR

1. Ulukutlu L, Can B, Başak AN, et al: Hematolojide arayışlar, 1. baskı, İstanbul Üniversitesi Basımevi, İstanbul, 161-6, 1994.
2. Nişli G: Beta talasemi (ayın kitabı), 1. baskı, Ege Üni. Tıp Fak. Yayını 75:1-54, 1995.
3. Aksoy M: The history of beta thalassemia in Turkey. The Turkish J Of Pediatrics 33:195-97, 1991.
4. Willough by Michael LN: Pediatrik hematoloji, 1. baskı, Çeviri Prof. Dr. Lania Ulukutlu, İstanbul, 206-230, 1982.
5. Pionelli S, Loew T: Management of thalassemia major (Cooley’s Anemia). Hemat Onco Clin N Ame 5 (3) June, 1991.
6. Cohen AR, Martin M, Schwartz E: Current treatment of Cooley’s anemia. Ann N Acad Sci 612:286-92, 1990.
7. Fosburg MT, Nathan DG: Treatment of Cooley’s anemia. Blood 76(3):435-44, 1990.
8. Chonen A: Treatment of transfusional iron overload. Ame J Ped Hem Onco 12(1):48, 1990.
9. Cohen AR, Mizamin J, Schwartz E: Rapid removal of excessive iron with daily, high-dose intravenous chelation therapy. J Pediatr 115-55, 1989.
10. Donagh K M, Nienhuis AW: Hematology of Infancy and Childhood. 1. baskı, Philadelphia WB Saunders Company, 783-881, 1993.
11. Gümrük F, Altay Ç: Talasemiler. Katkı Pediatri Dergisi 16(3):307-27, 1995.
12. Agaoglu L: Pediatri 2, 5. baskı, Nobel tıp kitabevi, İstanbul, 1098-100, 1990.
13. Hoffbrand AV, Wonke B: Results of long-term subcutaneous desferrioxamine therapy. Clin Haemat 2(2):195-256, 1989.
14. Hersko C: Biological models for studying iron chelation drugs. Clin Haemat 2(2):195-256, 1989.
15. Levine M: New concepts in the biology and biochemistry of ascorbic acid. N Eng J of Med 314(14):892-902, 1986.
16. Rice-Evans C, Omorphos SC, Baysal E: Sickle cell membranes and oxidative damage. Biochem J 237:265-69, 1986.
17. Mehta JB, Singhal SM, Mehta BC: Ascorbic acid-induced haemolysis in G-6-PD deficiency. Lancet 336(13):944, 1990.
18. Iwamoto N, Kawaguchi T, Horikawa K, et al: Haemolysis induced by ascorbic acid in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. Lancet 343(5):357, 1994.
19. Moser U, Bendich A: Handbook of vitamins. 2. baskı, Newyork and Basel, 195-232, 1994.
20. Çekirdek S: Plazma ve lökosit askorbik asit konsantrasyonlarının tayini ile mide kanserlerinde askorbik asit metabolizmasının araştırılması (Doçentlik tezi). Atatürk Üniversitesi-Erzurum, 17-21, 1978.
21. Liakakos D, Matsaniotis N, Karpouzias J, Morphis L, Agathopoulos A: Ascorbic acid malabsorption in thalassaemia. Clin Chim Acta 26:197-202, 1969.
22. Loh HS, Wilson CW: Iron and vitamin C. Lancet (2):768-9, 1971.
23. Hunt J, Mullen LM, Lykken GI, et al: Ascorbic acid: effect on ongoing iron absorption and status in iron-depleted young women. Am J Clin Nutr 51:649-55, 1990.
24. Bingöl A, Altay Ç, Say B, Dönmez Ş: Plasma, erythrocyte, and leukocyte ascorbic acid concentrations in children with iron deficiency anemia. The Journal of Pediatrics 51(6):902-4, 1975.
25. Newill A, Habibzadeh N, Schorah CJ: Plasma levels of vitamin C components in normal and diabetic subjects. Ann Clin Biochem 21:488-90, 1984.
26. Wapnick AA, Lynch SR, Krawitz P, et al: Effects of iron overload on ascorbic acid metabolism. Br Med J 21:704-7, 1968.
27. Bothwell TH, Baynes RD, MacFarlane BJ, et al: Nutritional iron requirements and food iron absorption. Jour of Inter Med 226:357-65, 1989.
28. Cohen A, Cohen IJ, Schwartz E: Scurvy and altered iron stores in thalassemia major. New Eng J of Med 304(15):158-60, 1981.
29. Conte D, Brunelli L, Ferrario L, et al: Effect of ascorbic acid on desferrioxamine-induced urinary iron excretion in idiopathic hemochromatosis. Acta haemat 72:117-20, 1984.
30. Hussain MAM, Flynn DM, Green N, et al: Effect of dose, time, and ascorbate on iron excretion after subcutaneous desferrioxamine. Lancet 7:977-79, 1977.
31. Pippard M: Iron overload and iron chelation therapy in thalassemia and sickle cell haemoglobinopathies. Acta haemat 78:206-11, 1987.
32. Cohen A, Schwartz E: Iron chelation therapy with desferrioxamine in Cooley anemia. J of Ped 92(4):643-47, 1978.
33. Hathirat P, Isarangkura P, Areekul S, et al: Oral ascorbic acid and excretion in thalassemic children treated with desferrioxamine-methansulfonate (Desferral). Birth Defects 23(5B):129-33, 1988.