

PROSTAT ADENOKARSİNOMLARDA p53 VARLIĞI İLE KLİNİK EVRE VE PROGNOZ İLİŞKİSİ

THE CORRELATION OF THE p53 EXPRESSION WITH CLINICAL STAGE AND PROGNOSIS IN PROSTATIC ADENOCARCINOMAS

*İNCİ, O., *KAYA, E., **ÖZYILMAZ, F., *HÜSEYİN, İ., *ALAGÖL, B.,
*BAKIRÇIVI, İ., *ŞEKER, V.

ÖZET :

Malign tümörlerin çoğunda p53 proteini immünohistokimyasal olarak gösterilmiştir. Bu protein 17. kromozomun kısa kolunda lokalize p53 geninin bir ürünüdür ve tümör baskılayıcı özelliğe sahiptir. p53 geni mutasyon ile inaktive olduğunda bu özelliğini yitirerek hücre transformasyonuna ve tümör gelişimine neden olmaktadır. p53 varlığının tümör diferansiyasyonu, evresi ve prognozu ile ilişkili olduğu bildirilmektedir. Bu çalışmada prostat adenokarsinomlu 44 olguda p53 proteinini immünohistokimyasal olarak çalıştık, hastaların klinik evre ve prognozuyla karşılaştırdık. Whitmore-Jewett evrelelendirmesine göre vakalarımızın 10'u (%23) evre A, 3'ü (%7) evre B, 5'i (%11) evre C ve 26'sı (%59) ise evre D'dir. p53 toplam olarak 9(%20.4) vakada pozitif. p53 pozitifliği evre A'da 2(%20), evre B'de 1(%33) ve evre D'de 6(%23) olguda görüldü. Takipleri 2 yılı dolduran 26 olgudan, bu süre içinde kaybedilen 7'sinde p53 pozitifliği 3 olguda (%43), yaşayan 19'unda ise 4 olguda (%21) bulundu. Grade ile p53 arasında bir koşutluk bulunmasına karşın, p53'ün klinik evre ile direkt bir koşutluk göstermediği ve prognozu olumsuz etkileyebileceği ancak bunun istatistiksel olarak anlamlı olmadığı kansındayız.

SUMMARY:

p53 protein has been detected immunohistochemically in most of malignant tumors. This protein is a product of p53 gene that is localized in the short arm of the 17th chromosome and has a tumor suppressor role. When the p53 gene is inactivated by a mutation it causes cellular transformation and carcinogenesis. p53 expression is correlated with tumor differentiation, stage and prognosis. In this study we researched p53 protein immunohistochemically in 44 cases with prostate adenocarcinoma and we compared the results with clinical stage and prognosis. According to Whitmore-Jewett Staging System 10 of our cases were stage A (%23), 3 were stage B (%7), 5 were stage C (%11) and 26 were stage D (%59). p53 staining was positive in 9 (%20.4) of all cases. According to Whitmore-Jewett Staging the results of p53 positivity were found as 2 (%20) in stage A, 1 (%33) in stage B and 6 (%23) in stage D. We followed 26 cases for two years. 7 of them died in two years. p53 positivity was found in 3 (%43) of dead cases and in 4 (%21) of 19 alive cases. Although there is a correlation between p53 and grade, it is not correlated directly with clinical stage and it may influence the prognosis negatively but it is not significant statistically.

Anahtar kelimeler: Prostat adenokarsinomu, p53, evre, prognoz.

Key words: Prostatic adenocarcinoma, p53, stage, prognosis.

GİRİŞ

p53 proteini hücre proliferasyonunu inhibe ettiğine inanılan nükleer bir fosfoproteindir. Normalde düşük düzeydedir ve

yarılanma ömrü kısadır. Ancak p53 genindeki nokta mutasyonlar daha uzun yarılanma ömrü olan stabil mutant protein oluşmasına neden olur. Bu da İmmünohistokimyasal (İHK) olarak

* Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalı - EDİRNE

** Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı - EDİRNE

saptanmaktadır (1,2). Tümör hücrelerinin nükleuslarında yüksek düzeyde biriken anormal p53 proteini sentezinden mutasyona uğramış p53 allelleri sorumludur (3,4,5).

p53 supresör genindeki anormallikler insan maligniteleri ile ilgili en yaygın genetik değişikliklerdir. Bu değişiklikler bir çok malign tümörde gözlenmektedir ve tümör gelişimi ile ilerlemesinde etkili olabileceği düşünülmektedir (6,7).

Gendeki mutasyon sonucu p53 proteini ekspresyonunda İHK ile saptanan anormal yüksek seviyeler birçok kanserde bulunur. Bu protein 17. kromozomun kısa kolunda lokalize olan ve tümör supresör özellikteki p53 geninin bir ürünüdür. Bu gen 5.-8. eksonlarında mutasyon olup inaktive olduğunda hücre transformasyonu ve tümör büyümesine neden olur (8). Ayrıca p53 ekspresyonu tümör evresi ve diferansiasyonu ile ilişkilidir (9). Malignitelerde sıklıkla mutasyona uğrayan p53 tümör supresör geni, bu mutasyon sonucu fonksiyonel olarak inaktive olup kanser patogenezi ve ilerlemesinde rol oynar (2,3,10,11).

Ürogenital tümörlerde evre, grade ve prognoz ile p53 ilişkisi birçok araştırmacı tarafından incelenmiştir. Bu çalışmada prostat adenokarsinomlu olgularda p53 varlığı ile klinik evre ve prognoz karşılaştırılarak prognostik parametre açısından incelendi.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmamıza 1985-1994 yılları arasında

Üroloji Anabilim Dalı'nda primer prostat adenokarsinomu tanısı alan 44 olgu dahil edildi. Patolojik tanı, formalin tespitli parafine gömülmüş materyallerin Hematoksilin-Eosin ile boyanıp mikroskopta bakılmasıyla kondu. Hastaların yaşları 50-85 arasındaydı (ortalama 69). Patolojik tetkik (p53 bakılması) için alınan materyallerin 23'ü iğne biyopsisi, 21'i prostatektomi materyaliydi. Patolojik inceleme için, prostatektomi yapılan olgularda alınan materyaller biyopsiye tercih edildi. Rektal tuşesi pozitif olan 32 olguda yapılan biyopsilerde 27 olguda pozitif sonuç alındı. Ancak bunlardan 4'ünde patolojik inceleme için prostatektomi (2 radikal, 2 üretral kalibrasyon amaçlı TURP) materyalleri tercih edildi. Rektal tuşesi negatif olup biyopsi yapılmayan 12 olguda ve biyopsi negatif 5 olguda (toplam 17) ise inceleme transvezikal prostatektomi materyallerinde yapıldı. 2 TURP ve 2 radikal prostatektomi ile beraber toplam 21 olguda prostatektomi materyali kullanılmış oldu.

Hastalar Whitmore-Jewett evrelemesine göre (12) evrelendirildi. Bunun için hastalar fizik baki, rektal tuşe, intravenöz pyelografi, bilgisayarlı tomografi, batin ultrasonu, kemik sintigrafisi, akciğer grafileri ve prostat iğne biyopsisi yapılanlarda biyopsi ile değerlendirildi. Laboratuvar tetkiki olarak Boehringer kiti ile Prostat Spesifik Antijen (PSA) (normal:0-4 ng/ml), Pointe kiti ile Prostatik Asit Fosfataz (PAP) (normal:0-3 u/L) ve ayrıca eritrosit çökme hızı bakıldı. Tümör diferansiasyonu Gleason skorlamasına (13) göre değerlendirildi. p53 pozitif olan olgular belirlendikten sonra klinik evre, grade ve prognoz ile ayrı ayrı karşılaştırıldı. Sonuçlar istatistiksel olarak Fisher'in "exact test" ine göre yorumlandı ve anlamlılık için p'nin 0.05'den küçük olması kriter alındı. Prognoz değerlendirilmesi yapılırken takipleri 2 yılı dolduran hastalar ele alındı. Kaybedilen hastalarla bu süre sonunda yaşayanlar arasında p53 pozitifliği karşılaştırıldı.

İHK olarak p53 proteini çalışırken parafin bloklardan alınan 5 mikronluk kesitlere Süper Sensitive Biotin-Streptavidin (SSB-SA) metodu ile p53 monoklonal mouse antikorun hazır formu (BioGenex/San Ramon, CA. Katalog no: AM240-5M) kullanıldı. Antijenik özelliği açığa çıkarmak için kesitler 100 derece sıcaklıktaki mikrodalga fırında sitrat buffer solüsyonunda benmari usulü 10 dakika tutuldu, oda ısısında soğutulduktan sonra protein blokajı için goat serum (BioGenex/San Ramon, CA. Katalog no: HK112-5K) ile 20 dakika inkübe edildi. Primer antikorda oda ısısında 120 dakika tutuldu. Kitteki hazır link (biotinylated goat anti-mouse Ig) ve label (alkalin fosfatase-conjugated streptavidin) solüsyonlarının herbiri ile 20'er dakika inkübe edildikten sonra kromojen tablet (Fast red) TBS ile sulandırılıp 60 dakika boyama yapıldı. Mayer hemotoksilen ile zıt boyama yapılarak gliserin jel ile kapatıldı. Ara yıkamalarda pH 7.6 PBS solüsyonu kullanıldı. Önceden pozitifliği tespit edilmiş olan meme karsinomuna ait doku, her uygulamada pozitif kontrol olarak alındı. Ayrıca her vakaya negatif kontrol kullanıldı. Değerlendirme yapılırken sadece nükear boyama pozitif kabul edildi, sitoplazmik boyanma dikkate alınmadı. Ayrıca boyanmanın yaygınlığına bakıldı. Boyanma %10 hücreden az ise fokal (+), %10-50 ise bölgesel (++) , %50 ve fazlası ise diffüz (+++) olarak kabul edildi.

Tablo 1. p53 pozitifliği ile klinik evre ilişkisi

Evre	Olgu sayısı	p53 (+)
A	10(%23)	2(%20)
B	3(%7)	1(%33)
C	5(%11)	0(%0)
D	26(%59)	6(%23)
	44(%100)	9(%20.4)

Tablo 2. p53 pozitifliği ile grade ilişkisi (14)

Grade	Olgu sayısı	p53 (+)
düşük + orta	18(%41)	1(%5.6)
yüksek	26(%59)	8(%30.8)
	44(%100)	9(%20.5)

Tablo 3. 2 yıllık sağkalımla p53 ilişkisi

	Olgu sayısı	p53 (+)	p53 (-)
2 yılda kaybedilen	7(%27)	3(%43)	4(%57)
2 yılı dolduran	19(%73)	4(%21)	15(%79)

Prostat adenokarsinomu tanısı ile çalışmamıza dahil ettiğimiz 44 olguda yaş ortalaması 69 (50-85) bulundu. En sık görülen semptomlar 34 olguda (%77) infravezikal obstrüksiyon bulguları, 10 olguda (%23) kemik metastazlarına bağlı bulgular ve 7 olguda (%16) hematüriydi. Rektal tuşede 32 olguda (%73) sertlik veya nodül saptandı. Laboratuvar tetkiki olarak PSA, bakılabilen sadece 14 olgunun tümünde normal değerler üzerindeydi. PAP bakılabilen 30 olgunun 21'inde (%70) yüksekti. 20 olguda (%45) anemi saptanırken, eritrosit çökme hızında artış 35 olguda (%80) vardı. 26 olguda (%59) kemik sintigrafisi ile metastaz saptandı. Primer prostat adenokarsinomuna ilaveten 3 olguda (%7) mesanede değişici epitel hücreli karsinom ve 1 olguda (%2) böbrekte renal adenokarsinom saptandı. Tedavide 16 olguya (%36) bilateral orkiektomi, 27 olguda (%61) medikal antiandrojenler ve 8 olguda (%18) LH-RH agonisti Triptorelin kullanıldı. İki olguya radikal prostatektomi yapıldı. Bazı olgularda biren fazla tedavi uygulandı.

Whitmore-Jewett evrelendirmesine göre 10 olgu (%23) evre A, 3 olgu (%7) evre B, 5 olgu (%11) evre C ve 26 olgu (%59) evre D'de yer almaktaydı. Gleason skoru ile olguların tümörün diferansiyasyonuna göre sınıflandırıldıklarında 3 olguda (%7) düşük, 15 olguda (%34) orta ve 26 olguda (%59) yüksek grade'li tümöre vardı. Evre ile grade dağılımını karşılaştırdığımızda düşük, orta ve yüksek grade'li tümör sayısı, evre A'da 1 (%10), 5 (%50) ve 4 (%40), evre B'de 0 (%0), 2 (%67) ve 1 (%33), evre C'de 1 (%20), 1 (%20) ve 3 (%60), evre D'de 1 (%4), 7 (%27) ve 18 (%69) bulundu. Klinik evre ilerledikçe yüksek Gleason skorlu olgu oranı artmaktaydı. Evre C ve D'de yüksek grade'li tümör oranı evre A ve B'den belirgin derecede fazlaydı.

p53 pozitifliği toplam 9 olguda (%20.4) saptandı. Bunların 4'ü (%49) fokal (+), 3'ü (%33) bölgesel (++) ve 2'si (%22) diffüz (+++) boyandı. p53 pozitif olguların evrelere dağılımı evre A'da 2 (%20), evre B'de 1 (%33) ve evre D'de 6 (%23) şeklindeydi. Evreler birbirleriyle

teker teker karşılaştırıldığında p53 pozitifliği açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi ($p>0.05$) ve p53'ün klinik evre ile direkt bir ilişki göstermediği düşünüldü. Evrelere göre p53 dağılımı Tablo 1'de görülmektedir.

p53 ile Gleason Skoru arasındaki ilişki başka bir çalışmamızda incelendi (14). Bu çalışmada p53 pozitifliği Gleason skoruna göre düşük grade'li tümörlerde 0, orta grade'lilerde 1 olguda (%6.6) ve yüksek grade'lilerde 8 olguda (%30.7) saptandı. Tümör diferansiyasyonu azaldıkça (grade arttıkça) p53 pozitiflik oranının arttığı görüldü. Olgu sayısının yetersiz olması nedeniyle düşük ve orta grade'li tümörler bir grup altında yüksek grade'lilerle karşılaştırıldığında p53 pozitifliği anlamlı derecede farklı ($p=0.04$) bulundu. Sonuçlar Tablo 2'de gösterildi (14).

TARTIŞMA

Mutasyona uğramış p53 geninin ürünü olan p53 proteini kanser gelişiminde ve progresyonunda rol oynayabilmektedir. p53 proteini İHK olarak saptanarak birçok prostat kanseri olgusunda p53 gen mutasyonu araştırılmıştır. Değişik oranlar bildirilmesine karşın, birçok yayında p53 gen mutasyonunun prostat kanserlerinde sık görülmediği bildirilmiştir (15, 16). Bir çalışmada ise prostat karsinomunda gen mutasyonu hiç saptanmamıştır (17). Çalışmalarda p53 proteininin nükleer akümüasyonu prostat kanserlerinde %6-20 arasında değişen oranlarda bulunmuştur (2,3,5,6,8,18,19). Bu çalışmaların aksine p53 mutasyonlarının prostat kanserinde yaygın (%42-60) olduğunu bulanlar da vardır (9,20).

Bizim çalışmamızda değişik derecelerde p53 pozitifliği toplam 44 olgunun 9'unda (%20.4) saptandı. Bunların 4'ü (%45) fokal (+)- 3'ü (%33) bölgesel (++) ve 2'si (%22) diffüz (+++) boyandı. Sonuçlarımız, p53'ün prostat kanserlerinde yaygın olmadığını bildiren yayınlarla uyumluydu.

Evre ile p53 pozitifliği arasında ilişki olup olmadığı netlik kazanmamıştır. Birçok yayında ileri evre tümörlerde p53 daha sık bulunmakla beraber (3,4,6,18,21), bunun anlamlı derecede farklı olmadığını bildirenler de vardır (18). Ayrıca p53 mutasyonu ile metastazlar arasında da ilişki olmadığı görülmüş (15). Bir çalışmada İHK pozitiflik ileri evrelerde %23, düşük evrelerde %4 bulunmuş ve mutasyona p53 allellerinin erken evrelerde nadir, ileri evrelerde %20-25 olduğu bildirilerek bu mutasyonun kanser progresyonunda rolü olabileceği düşünülmüştür (3). Bir başka çalışmada p53

akümüasyonu olan tüm tümörler evre D ve az diferansiye bulunmuş ve bu mutasyonun prostat kanserlerinde geç bir olay olabileceği bildirilmiştir (4,21).

p53 pozitifliği yüksek grade tümörlerde anlamlı derecede daha yaygındır (4,5,6). Gleason skoru ile ilişkilidir ve p53 pozitif tümörlerde skor daha yüksektir (2,8). Bunun yanında grade ile p53 pozitifliğinin ilişki göstermediği de bildirilmektedir (18,21).

Çalışmamızda Whitmore-Jewett'e göre evreler arasında p53 pozitifliğinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark göremedik. Gleason skoru ile karşılaştırdığımızda ise tümör grade'i arttıkça p53 pozitifliğinin de arttığını ve p53'ün az diferansiye tümörlerde daha fazla bulunduğunu gördük. Gleason skoru ile klinik evre arasında pozitif bir ilişki bulunmasına karşın, klinik evre ile p53 arasında anlamlı bir ilişki bulunmadığını saptadık.

p53 prognozu olumsuz etkilemektedir (1,5), ancak düşük düzey akümüasyonun prognostik anlamı yoktur (5). Bir çalışmada ortalama sağkalım p53 (+)'lerde 40ay, p53(-) lere 76 ay bulunmuş ve kötü prognozla birlikte olabileceği bildirilmiştir (8). p53'ün prognoz ile ilişkili olmadığı da bildirilmektedir (18). p53 protein akümüasyonu, lokal (erken evre) tümörlerde Gleason skoru ve prognozu etkilememektedir (22).

p53 ile sağkalımı karşılaştırdığımızda literatürle uyumlu olarak p53'ün prognozu olumsuz etkilediğini gördük. Kaybedilen olgular içinde p53 pozitif olanlar daha kısa sürede kaybedilmişti ve 22 yıllık sağkalım bakıldığında kaybedilenler içinde p53 pozitifliği yaşayanlardan daha fazlaydı. Ancak bu değerler istatistiksel olarak anlamlı derecede farklı değildi.

Sonuç olarak p53 ile klinik evre arasında bir ilişki bulunmamasına ve diğer organ kanserlerine göre prostat kanserinde p53 daha seyrek saptanmasına karşın, grade ile olan yakın ilişkisi ve az da olsa prognoz üzerindeki olumsuz etkisi nedeniyle, p53 bakılmasının hastaların takibinde ve hastalığın gidişi hakkında bilgi sahibi olmada yararlı olabileceği görüşündeyiz.

KAYNAKLAR

1. Fox, S.B., Persad, R.A., Royds, J., Kore, R.N., Silcocks, P.B., Collins, C.C.: p53 and c-myc expression in stage A1 prostatic adenocarcinoma: Useful prognostic determinants?. *J.Urol.*, 150: 490, 1993.
2. Kallakury, B.V.S., Figge, J., Ross, J.S., Fisher, H.A.G., Figge, H.L., Jennings, T.A.: Association of p53 immunoreactivity with high Gleason tumor grade in prostatic adenocarcinoma. *Hum. Pathol.*, 25:92, 1994.
3. Bookstein, R., MacGrogan, D., Hilsenbeck, S.G., Sharkey, F., Allred, D.C.: p53 is mutated in a subset of advanced-stage prostate cancers. *Cancer Res.*, 53(14): 3369, 1993.
4. Navone, N.M., Troncoso, P., Pisters, L.L., Goodrow, T.L., Palmer, J.L., Nichols, W.W., von-Eschenbach, A.C., Conti, C.J.: p53 protein accumulation and gene mutation in the progression of human prostate carcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.*, 85(20): 1657, 1993. (Abstr.)
5. Visakorpi, T., Kallioniemi, O.P., Heikkinen, A., Koivula, T., Isola, J.: Small subgroup of aggressive, highly proliferative prostatic carcinomas defined by p53 accumulation. *J.Natl. Cancer Inst.*, 84(11): 883, 1992. (Abstr.)
6. Aprikian, A.G., Sarkis, A.S., Fair, W.R., Zhang, Z., Fuks, Z., Cordon-Cordo, C.: Immunohistochemical determination of p53 protein nuclear accumulation in prostatic adenocarcinoma. *J. Urol.*, 151: 1276, 1994.
7. Effert, P.J., McCoy, R.H., Walther, P.J., Liu, E.T.: p53 gene alterations in human prostate carcinoma. *J.Urol.*, 150: 257, 1993.
8. Thomas, D.J., Robinson, M., King, P., Hasan, T., Charlton, R., Martin, J., Carr, T.W., Neal, D.E.: p53 expression and clinical outcome in prostate cancer. *Br. J. Urol.*, 72:778, 1993.
9. Valerdiz-Casasola, S., Menendez-Colunga, M.J., Martin-Castillo, J.: Expression of p53 in prostatic carcinoma. *Arch. Esp.Urol.*, 47(5):479, 1994. (Abstr.)
10. Effert, P.J., Neubauer, A., Walther, P.J., Liu, E.T.: Alterations of the p53 gene are associated with the progression of a human prostate carcinoma. *J. Urol.*, 147: 789, 1992.
11. Isaacs, W.B., Carter, B.S., Ewing, C.M.: Wild-type p53 suppresses growth of human prostate cancer cells containing mutant p53 alleles. *Cancer Res.*, 51: 4716, 1991.
12. Müftüoğlu, Y.Z.: Ürogenital sistem tümörleri. In: *Üroloji*. Edited by K. Anafarta. Ankara: Güneş Kitabevi Ltd. Şti., 1st edit., chap. 16, pp. 331-404, 1990.
13. Gleason, D.F.: Histologic grading of prostatic carcinoma. In: *Pathology of the Prostate*. D.G. Bostwick. Churchill Livingstone, chap. 6, pp. 83-93, 1990.
14. Özyılmaz, F., Şeker, V., Candan, L., Kutlu, K., Kaya, E., İnci, O.: Prostat adenokarsinomlarında p53 ekspresyonu ile Gleason skorlaması arasındaki ilişki. *Patoloji Bülteni*, 12(2): Baskıda, 1995.
15. Dinjens, W.N., Vander-Weiden, M.M., Schroeder, F.H., Bosman, F.T., Trapman, J.: Frequency and characterization of p53 mutations in primary and metastatic human prostate cancer. *Int. J. Cancer*, 56(5): 630, 1994. (Abstr.)
16. Uchida, T., Wada, C., Shitara, T., Egawa, S., Koshiba, K.: Infrequent involvement of p53 gene mutations in the tumorigenesis of Japanese prostate cancer. *Br. J. Cancer*, 68(4): 751-5, 1993. (Abstr.)
17. Castagnaro, M., Yandell, D.W., Dockhoro-Dworniczak, B., Wolfe, W.J., Poremba, C.: Androgen receptor gene mutations and p53 gene analysis in advanced prostate cancer. *Verh. Dtsch. Ges. Pathol.*, 77: 119, 1993. (Abstr.)
18. Mellon, K., Thompson, S., Charlton, R.G., Marsh, C., Robinson, M., Lane, D.P., Harris, A.L., Horne, C.H.W., Neal, D.E.: p53, c-erbB-2 and the epidermal growth factor receptor in the benign and malignant prostate. *J.Urol.*, 147: 496, 1992.
19. Soini, Y., Paakkö, P., Nuorva, K., Kamel, D., Lane, D.P., Vahakangas, K.: Comparative analysis of p53 protein immunoreactivity in prostatic, lung and breast carcinomas. *Virch. Arch. Pathol. Anat.*, 421: 223, 1992.
20. Chi, S.G., deVere-White, R.W., Meyers, F.J., Siders, D.B., Lee, F., Gumerlock, P.H.: p53 in prostate cancer: Frequent expressed transition mutations. *J.Natl. Cancer Inst.*, 84 (12): 926-33, 1994. (Abstr.)
21. Berner, A., Nesland, J.M., Waehre, H., Silde, J., Fossa, S.D.: Hormone resistant prostatic adenocarcinoma. An evaluation of prognostic factors in pre-and post-treatment specimens. *Br. J. Cancer*, 68(2): 380, 1993.

22. Vesalainen, S.L., Lipponen, P.K., Talja, M.T., Alhava, E.M., Syrjanen, K.J.: Proliferating cell nuclear antigen and p53 expression as prognostic factors in T1-2MO prostatic adenocarcinoma. *Int. J.Cancer* 58(2): 303, 1994. (Abstr.)