

Wyniki badań cytogenetycznych u płodów z poszerzeniem przezierności karkowej

Results of cytogenetic examinations in fetuses with increased nuchal translucency

Kornacki Jakub¹, Ziółkowska Katarzyna², Goździewicz Tomasz¹, Skrzypczak Jana¹

¹ Klinika Rozrodczości, Katedra Ginekologii, Położnictwa i Onkologii Ginekologicznej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu, Polska

² Pracownia Cytogenetyczna Ginekologiczno-Położniczego Szpitala Klinicznego Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu, Polska

Streszczenie

Cel pracy: Ocena wyników badań cytogenetycznych u płodów z poszerzeniem przezierności karkowej (NT) oraz określenie zależności między grubością NT i obecnością współistniejących nieprawidłowości w badaniu ultrasonograficznym płodu a wynikiem kariotypu.

Materiał i metody: Analizą objęto 121 płodów z ciąż pojedynczych, u których stwierdzono poszerzenie NT. U wszystkich płodów dokonano oceny kariotypu w następstwie wykonanej amniopunkcji. Wyniki badań cytogenetycznych u płodu analizowano dla całej badanej grupy oraz oddzielnie w odniesieniu do poszczególnych wartości NT: 1) poszerzenie NT, ale nie przekraczające 3,5mm, 2) od 3,5 do 4,4mm, 3) 4,5 do 5,4mm, 4) 5,5-6,4mm, oraz 5) $\geq 6,5$ mm.

Wyniki: Nieprawidłowy wynik kariotypu uzyskano u 41 spośród 121 badanych płodów, czyli u 33,9%. Najczęściej stwierdzaną aberracją chromosomową była trisomia 21. Odsetek aberracji chromosomowych u płodów w całej badanej grupie wzrastał wraz ze stopniem poszerzenia NT i wyniósł 15,9% u płodów z poszerzeniem NT nieprzekraczającym 3,5mm i 54,5% u płodów z wartością NT $\geq 6,5$ mm. Nieprawidłowy kariotyp stwierdzono u 54,5% płodów, u których wykazano inne, poza poszerzeniem NT, nieprawidłowości anatomiczne w badaniu ultrasonograficznym.

Wnioski:

1. Około 65% płodów z poszerzeniem przezierności karkowej ma prawidłowy kariotyp.
2. Odsetek nieprawidłowych wyników kariotypu u płodów wzrasta wraz z wartością NT.
3. Ocena ultrasonograficzna płodu wykonywana pomiędzy 11 a 13+6 tygodniem ciąży i ukierunkowana na wykrywanie chorób genetycznych płodu powinna obejmować, poza badaniem markerów ultrasonograficznych trisomii w I trymestrze ciąży, wstępną ocenę anatomii płodu, w tym narządów wewnętrznych.

Słowa kluczowe: **płód / ultrasonografia / przezierność karkowa / kariotyp / amniopunkcja /**

Adres do korespondencji:

Jakub Kornacki
Klinika Rozrodczości Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu
Polska, 60-535 Poznań, ul. Polna 33
tel./fax: 61 841 93 27
e-mail: kuba.kornacki@wp.pl

Otrzymano: 17.11.2011
Zaakceptowano do druku: 22.02.2012

Abstract

Objectives: The analysis of karyotypes in fetuses with increased nuchal translucency (NT) and the assessment of correlations between NT thickness, presence of other fetal anomalies and the result of karyotype.

Material and methods: The study was conducted among 121 singleton fetuses with increased NT thickness. In all fetuses the karyotype was assessed following amniocentesis.

The results of karyotypes were analyzed in the whole studied group, as well as in specific subgroups of patients according to NT value: 1) increased NT, but not exceeding 3,5mm, 2) 3,5-4,4mm, 3) 4,5-5,4mm, 4) 5,5-6,4mm, and 5) $\geq 6,5$ mm.

Results: Abnormal results of the karyotype were found in 41 out of 121 fetuses (33,9%). The most common aberration was trisomy 21. A percentage of abnormal fetal karyotypes increased with the degree of NT thickening and was 15,9% in fetuses with increased NT which did not exceed 3,5 mm and 54,5% in fetuses with NT $\geq 6,5$ mm. The abnormal karyotype was diagnosed in 54,5% of fetuses with increased NT and other abnormalities found in ultrasound.

Conclusions:

1. Around 65% of the fetuses with an increased NT have normal karyotype.
2. A percentage of abnormal karyotypes in fetuses increases with the degree of NT thickening.
3. An ultrasound finding of an increased NT and other abnormalities in a fetus is associated with higher risk of chromosomal aberrations in comparison to cases when there is only an increased nuchal translucency.

Key words: fetus/ ultrasound/ nuchal translucency/ karyotype/ amniocentesis /

Wstęp

Wprowadzenie pod koniec lat dziewięćdziesiątych XX wieku oceny pomiaru grubości przezierności karkowej (NT) u płodu pomiędzy 11 a 13+6 tygodniem ciąży stało się przełomem w nieinwazyjnej diagnostyce prenatalnej trisomii [1].

Aktualnie, poszerzenie NT jest najsilniejszym, pojedynczym markerem sonograficznym trisomii 21 u płodu, w 1. tryestrze ciąży.

Wykorzystanie tej metody skринningu pozwala ostatecznie na identyfikację ponad 75% płodów z trisomią 21 i innymi zaburzeniami chromosomalnymi przy 5% odsetku wyników fałszywie dodatnich [1].

Mając świadomość dużej przydatności pomiaru grubości NT w identyfikacji aberracji chromosomowych u płodu nie można jednocześnie zapominać o fakcie, że około 70% płodów z poszerzeniem przezierności karkowej ma prawidłowy kariotyp i w większości przypadków rozwija się prawidłowo po urodzeniu [2]. Ma to szczególne znaczenie w odniesieniu do sposobu informowania przyszłych matek i rodziców o dalszym rokowaniu w przypadku stwierdzenia poszerzenia NT u płodu.

Cel pracy

Celem pracy była ocena wyników badań cytogenetycznych u płodów, u których stwierdzono poszerzenie przezierności karkowej oraz określenie zależności między grubością NT i obecnością współistniejących nieprawidłowości w badaniu ultrasonograficznym płodu a wynikiem badania kariotypu.

Materiał i metody

Analizą objęto 121 ciężarnych i płody z ciąży pojedynczych, hospitalizowane w latach 2003-2010 w Ginekologiczno-Położniczym Szpitalu Klinicznym Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu. U wszystkich badanych ciężarnych wykonano amniopunkcję genetyczną ze względu na poszerzenie przezierności karkowej współistniejące lub niewspółistniejące z innymi nieprawidłowościami anatomicznymi u płodu.

Oceny grubości przezierności karkowej dokonywano każdorazowo przy długości ciemieniowo-siedzeniowej (CRL) płodu pomiędzy 45 a 84mm, zgodnie z zasadami *Fetal Medicine Foundation* (FMF) [3]. Poszerzeniem przezierności karkowej określano każdy wynik pomiaru NT powyżej 95 centyla dla określonej wartości CRL, w oparciu o rozkład grubości NT przyjęty przez FMF [4].

Wyniki badań cytogenetycznych u płodu analizowano dla całej badanej grupy oraz oddzielnie w odniesieniu do poszczególnych wartości NT:

- 1) poszerzenie NT, ale nieprzekraczające 3,5mm,
- 2) od 3,5 do 4,4mm,
- 3) 4,5 do 5,4mm,
- 4) 5,5-6,4mm oraz
- 5) $\geq 6,5$ mm (ekstremalne poszerzenie przezierności karkowej).

W ocenie ostatecznej wyników brano też pod uwagę czy wskazaniem do amniopunkcji było jedynie poszerzenie NT czy też inne nieprawidłowości anatomiczne stwierdzone w badaniu ultrasonograficznym.

Amniopunkcje genetyczne wykonywano każdorazowo po 15 tygodniu ciąży w Pracowni Diagnostyki i Leczenia Wad Płodu Ginekologiczno-Położniczego Szpitala Klinicznego Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu.

Badania cytogenetyczne przeprowadzano w Pracowni Cytogenetycznej Ginekologiczno-Położniczego Szpitala Klinicznego Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu przy wykorzystaniu hodowli *in situ* osadu amniocytów na odpowiednim podłożu.

Do oceny zależności między wartością NT a ryzykiem wystąpienia aberracji chromosomowej wykorzystano test χ^2 dla trendu. Z kolei dla określenia znamienności różnicy w częstości występowania zaburzeń chromosomowych w grupie płodów z poszerzeniem NT oraz u płodów z poszerzeniem NT i innymi nieprawidłowościami anatomicznymi posłużono się testem χ^2 .

Wyniki badań cytogenetycznych u płodów z poszerzeniem przezierności karkowej.

Tabela I. Liczba i typ aberracji chromosomowych u płodów z poszerzeniem przezierności karkowej.

Aberracja chromosomowa	Liczba
Trisomia 21	19
Trisomia 18	8
Monosomia 45X	4
Trisomia 13	3
Triploidia	3
Mozaikowość 45X	1
Podwójna trisomia (48,XXY,+18)	1
Tetrasomia X (48XXXX)	1
46,XX, der (18) (pochodna chromosomu pary 18)	1
Razem	41

Wyniki

U wszystkich 121 badanych ciężarnych uzyskano odpowiednią hodowlę amniocytów pozwalającą na przeprowadzenie dalszych badań cytogenetycznych, w wyniku których uzyskano wyniki kariotypu u 121 płodów.

Średni wiek pacjentek, u których wykonano amniopunkcję z powodu poszerzenia NT lub z powodu poszerzenia NT oraz stwierdzenia innych nieprawidłowości w badaniu ultrasonograficznym płodu wyniósł 30,1 lat (17-46).

Średnia wartość NT w badanej grupie wynosiła 4,6mm (2-15).

Nieprawidłowy wynik kariotypu uzyskano u 41 spośród 121 badanych płodów, czyli u 33,9%. Najczęściej stwierdzaną aberracją chromosomową była trisomia 21, którą wykryto u 19 płodów z poszerzeniem NT, czyli u 15,7% wszystkich badanych. W dalszej kolejności najczęściej rozpoznawanymi aberracjami były kolejno: trisomia 18 (8 płodów – 6,6%), monosomia 45X (4 płody – 3,3%), trisomia 13 (3 płody – 2,5%) oraz triploidia (3 płody – 2,5%). Wszystkie typy zdiagnozowanych zaburzeń chromosomowych przedstawiano w tabeli I.

Odsetek aberracji chromosomowych u płodów w całej badanej grupie wzrastał wraz ze stopniem poszerzenia NT. Najwyższy odsetek nieprawidłowości chromosomowych (54,5%) stwierdzono w grupie płodów z ekstremalnym poszerzeniem NT. Trisomia 21 stanowiła 41,7% z nich, trisomia 18 – 25%, monosomia 45X – 16,7%, a triploidia i trisomia 13 pary – 8,3%. Z kolei, u płodów z najmniejszego stopnia poszerzeniem NT (95 centyl – 3,4mm), gdzie odsetek aberracji chromosomowych był najniższy (15,9%), stwierdzono dwie niezwykle rzadkie aberracje tzn. podwójną trisomię (48,XXY,+18) oraz tetrasomię X (48XXXX).

Wyniki badań cytogenetycznych w zależności od stopnia poszerzenia przezierności karkowej przedstawiono w tabeli II.

U 22 spośród 121 płodów stwierdzono w badaniu ultrasonograficznym inne, poza poszerzeniem NT, nieprawidłowości anatomiczne w badaniu ultrasonograficznym, w tym między innymi: brak kości nosowej, jelita hiperechogenne, wadę serca, holoprosencefalię i obrzęk uogólniony.

Z kolei u 12 z tych 22 płodów, czyli u 54,5%, stwierdzono nieprawidłowy kariotyp, w tym u 5 trisomię 21, u 2 triploidię, u 2 trisomię 18 pary, u 1 trisomię 13 pary chromosomów, u 1 monosomię 45X oraz u 1 podwójną trisomię - 48XXY +18. (Tabela III).

W grupie płodów z trisomią 21, najczęściej stwierdzanymi nieprawidłowościami anatomicznymi, poza poszerzeniem NT, były:

- 1) brak kości nosowej i
- 2) wspólny kanał przedstonkowo-komorowy (AVC).

U 4 z 7 płodów, u których stwierdzano zarówno poszerzenie NT jak i brak kości nosowej w I trymestrze ciąży wynik badania cytogenetycznego był nieprawidłowy (57,1%); w 3 przypadkach był to zespół Downa.

Z kolei u obydwu płodów, u których rozpoznano zarówno poszerzenie NT, jak i AVC, stwierdzono trisomię 21 pary chromosomów.

Całkowity odsetek aberracji chromosomowych u płodów z poszerzeniem NT i innymi nieprawidłowościami stwierdzanymi w badaniu ultrasonograficznym był wyższy od częstości zaburzeń chromosomowych u płodów, u których stwierdzono jedynie poszerzenie NT (54,5% vs 33,9%), aczkolwiek różnica ta nie osiągnęła istotności statystycznej ($p=0,09$).

Dyskusja

Poinformowanie pacjentki o fakcie stwierdzenia poszerzenia NT u płodu wiąże się nieodłącznie z przeprowadzeniem trudnej rozmowy z ciężarną na temat dalszego sposobu postępowania oraz rokowania. W dobie powszechnego wykonywania tego badania, niezwykle ważne jest by rozmowa ta była rzetelna, opierała się na dostępnych wynikach badań naukowych i co bardzo istotne by pozwalała uświadomić pacjentce o niemałym szansie urodzenia zdrowego dziecka mimo stwierdzonej nieprawidłowości.

W badaniach własnych wykazano, że ponad 66% płodów, u których stwierdzono poszerzenie NT miało prawidłowy kariotyp. Odsetek ten jest zbliżony do wyników innych doniesień, w tym Snijdersa i wsp. [1] oraz Bilardo i wsp. [2]. W drugim [2], z wyżej przytoczonych badań, które przeprowadzono na 451 płodach z poszerzeniem NT, prawidłowy wynik badania cytogenetycznego uzyskano u 67% pacjentów.

W grupie płodów z aberracjami chromosomowymi uzyskany rozkład częstości występowania specyficznych zaburzeń jest zgodny z wynikami wcześniejszych badań [1, 4]. Stwierdzono w nich między innymi, że około 50% płodów z poszerzeniem NT i nieprawidłowym kariotypem stanowią trisomie 21 pary, około 20-25% trisomie 18 pary, a trisomia 13 pary, monosomia 45X i triploidia po około 10%.

W odniesieniu do rokowania co do dalszych losów płodu z poszerzeniem NT niezwykle ważny jest stopień poszerzenia przezierności karkowej. W badaniach własnych potwierdzono wcześniej opisywany fakt [1, 2] wzrostu ryzyka wystąpienia aberracji chromosomowej u płodu wraz ze wzrostem wartości NT. Znajomość tej korelacji jest bardzo istotna dla wszystkich lekarzy odbywających rozmowę z pacjentką czy przyszłymi rodzicami w sytuacji stwierdzenia poszerzenia NT u płodu.

Największe ryzyko aberracji chromosomowej występuje u płodów z ekstremalnym poszerzeniem przezierności karkowej.

Tabela II. Wyniki badań cytogenetycznych u płodów w zależności od stopnia poszerzenia przezierności karkowej.

NT (mm)	Liczba	Prawidłowy kariotyp (%)	Nieprawidłowy kariotyp (%) (poszczególne aberracje chromosomowe)
95 centyl – 3,4 mm	44	84,1	15,9 Trisomia 21 - 28,5% Trisomia 18 - 14,3% Triploidia - 14,3% Tetrasomia X - 14,3% Podwójna trisomia (48,XXY,+18) - 14,3% Mozaikowość 45X - 14,3%
3,5-4,4 mm	34	64,7	35,3 Trisomia 21 - 50% Trisomia 18 - 33,3% Trisomia 13 - 8,3% Triploidia - 8,3%
4,5-5,4 mm	11	54,6	45,4 Trisomia 21 - 40% Trisomia 13 - 20% 45X – 20% 46 XX (der 18) - 20%
5,5-6,4 mm	10	50,0	50,0 Trisomia 21 - 80% Trisomia 18 - 20%
≥ 6,5mm	22	45,5	54,5 Trisomia 21 - 41,7% Trisomia 18 - 25% 45X - 16,7% Trisomia 13 - 8,3% Triploidia - 8,3%
Razem	121	66,1	33,9

Tabela III. Charakterystyka płodów z nieprawidłowym wynikiem kariotypu, u których stwierdzono poszerzenie NT i inne nieprawidłowości anatomiczne.

Płód	Wynik kariotypu	Wynik badania ultrasonograficznego	
		NT (mm)	Inne nieprawidłowości anatomiczne
1	trisomia 21	6,5	brak kości nosowej
2	trisomia 21	6,0	brak kości nosowej
3	trisomia 21	4,0	wada serca (AVC)
4	trisomia 21	4,3	wada serca (AVC)
5	trisomia 21	4,0	brak kości nosowej, jelita hiperechogenne
6	trisomia 18	6,0	brak kości nosowej
7	trisomia 18	4,0	przepuklina sznura pępowinowego
8	triploidia 69XXX	7,0	IUGR, mikrognatia, jelita hiperechogenne
9	triploidia 69XXY	3,9	obrzęk uogólniony
10	trisomia 13	4,0	holoprosencefalia
11	monosomia 45X	7,0	nieprawidłowy przyczep płodowy pępowiny
12	podwójna trisomia 48XXY +18	3,2	przepuklina oponowo-rdzeniowa

IUGR – wewnątrzmaciczne ograniczenie wzrastania płodu
AVC – wspólny kanał przedsionkowo-komorowy

Wyniki badań cytogenetycznych u płodów z poszerzeniem przezierności karkowej.

W badaniach własnych nieprawidłowy wynik badania cytogenetycznego stwierdzono u prawie 55% płodów z wartością NT $\geq 6,5$ mm; najczęściej, podobnie jak i w całej badanej grupie, była to trisomia 21. Uzyskany odsetek nieprawidłowości w tej grupie jest bardzo zbliżony do rezultatu badań Bilardo i wsp. [2] oraz nieco niższy od wyniku zaobserwowanego przez Scotta i wsp. [5]. Ci drudzy stwierdzili aberracje chromosomowe aż u 74,2% płodów z wartością NT $\geq 6,5$ mm.

Ciekawostką jest fakt, że w badaniach Scotta i wsp. [5] najczęstszym zaburzeniem chromosomowym w tej grupie płodów była nie trisomia 21, ale trisomia 18 pary, która stanowiła ponad 37,1% płodów z ekstremalnym poszerzeniem NT. Prawie jednakowe wyniki uzyskane w tym zakresie w naszej pracy oraz w badaniach Bilardo i wsp. [2], przeprowadzonych w Holandii, oraz nieco odmienne rezultaty badania Scotta i wsp. [5] dotyczące populacji australijskiej mogą wskazywać na wpływ czynników etnicznych i geograficznych na wyniki korelacji między wartością NT a typem aberracji chromosomowych u płodu.

Istotnym dla ginekologów-położników, a pocieszającym dla przyszłych rodziców może być niewątpliwie fakt, że stwierdzenie poszerzenia przezierności karkowej u płodu w więcej niż połowie przypadków wiąże się z urodzeniem zdrowego dziecka [2]. Dane te są jeszcze bardziej pozytywne gdy stwierdzamy niewielkiego stopnia poszerzenie NT tzn. od wartości odpowiadającej 95 centylowi dla danego tygodnia ciąży do wartości 3,4mm. Z drugiej strony należy mieć świadomość, i uwzględnić to każdorazowo w czasie rozmowy z przyszłymi rodzicami, że prawidłowy wynik badania cytogenetycznego u płodu z poszerzeniem NT nie oznacza, że płód jest zdrowy. Kolejnym etapem diagnostyki jest w takiej sytuacji szczegółowa ocena anatomii płodu, ze zwróceniem szczególnej uwagi na serce, którego wady są najczęstszymi izolowanymi anomaliami u płodu z poszerzeniem przezierności karkowej i prawidłowym kariotypem [2, 6].

Jak wykazała Bilardo i wsp. [2], przy prawidłowym wyniku dokładnej oceny ultrasonograficznej płodu z poszerzeniem NT i prawidłowym kariotypem, przeprowadzonej około 20 tygodnia ciąży, ryzyko urodzenia zdrowego dziecka wynosi aż około 98%. Tak dobre rokowanie w tej grupie płodów dotyczy także tych, u których wartość NT była ekstremalnie duża. W tej samej pracy [2] rozwój wszystkich pięciorga dzieci z wartością NT $\geq 6,5$ mm, ale prawidłowym kariotypem i prawidłową anatomią płodu stwierdzoną w badaniu ultrasonograficznym, był prawidłowy.

Nie było zaskoczeniem stwierdzenie w badaniach własnych wyższego odsetka aberracji chromosomowych u płodów, u których obserwowano zarówno poszerzenie przezierności karkowej, jak i inne nieprawidłowości anatomiczne, niż w tych przypadkach gdzie wykazano jedynie poszerzenie NT. Dziwić może jedynie brak znamiennej statystycznie różnicy. Wynika to, według naszej opinii, ze stosunkowo małej liczebności grup, zwłaszcza tej obejmującej płody z poszerzeniem NT i innymi nieprawidłowościami anatomicznymi stwierdzanymi w badaniu ultrasonograficznym (22 płody).

Brak kości nosowej i wspólny kanał przedślonkowo-komorowy były, poza poszerzeniem NT, najczęstszymi anomaliami u płodów współistniejącymi z aberracjami chromosomowymi. Stanowi to potwierdzenie rezultatów wcześniejszych doniesień, które wskazywały na wzrost ryzyka trisomii u płodu, zwłaszcza zespołu Downa w przypadku stwierdzenia innych wad, zwłaszcza

braku kości nosowej, w badaniu ultrasonograficznym płodu między 11 a 13+6 tygodniem ciąży [7].

Z kolei, powszechnie wiadomo, że wspólny kanał przedślonkowo-komorowy jest najczęstszą wadą serca rozpoznawaną prenatalnie u płodu z zespołem Downa [8].

Wnioski

1. Około 65% płodów z poszerzeniem przezierności karkowej ma prawidłowy kariotyp.
2. Odsetek nieprawidłowych wyników badania cytogenetycznego u płodów wzrasta wraz z wartością przezierności karkowej i jest najwyższy u płodów z ekstremalnym poszerzeniem NT.
3. Ocena ultrasonograficzna płodu wykonywana pomiędzy 11 a 13+6 tygodniem ciąży i ukierunkowana na wykrywanie chorób genetycznych płodu powinna obejmować, poza badaniem markerów ultrasonograficznych trisomii w I trymestrze ciąży, wstępną ocenę anatomii płodu, w tym narządów wewnętrznych.

Piśmiennictwo

1. Snijders R, Noble P, Serbie N, [et al.]. UK multicentre project on assessment of risk of trisomy 21 by maternal age and fetal nuchal-translucency thickness at 10-14 weeks of gestation. Fetal Medicine Foundation First Trimester Screening Group. *Lancet*. 1998, 351, 343-346.
2. Bilardo C, Mueller M, Pajkrt E, [et al.]. Increased nuchal translucency thickness and normal karyotype: time for parental reassurance. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2007, 30, 11-18.
3. Nicolaidis K, Węgrzyn P. Diagnostyka zaburzeń chromosomowych w 1. trymestrze ciąży. W: Badanie ultrasonograficzne między 11 - 13+6 tygodniem ciąży. Red. Nicolaidis K, Węgrzyn P. Londyn: Fetal Medicine Foundation. 2004, 9-50.
4. Yoshida S, Miura K, Yamasaki K, [et al.]. Does increased nuchal translucency indicate a fetal abnormality? A retrospective study to clarify the clinical significance of nuchal translucency in Japan. *J Hum Genet*. 2008, 53, 688-693.
5. Scott F, Evans J, Mc Lennan A. Perinatal outcome in fetuses with extremely large nuchal translucency measurement. *Aust N Z J Obstet Gynaecol*. 2009, 49, 254-257.
6. Souka A, von Kaisenberg C, Hyett J, [et al.]. Increased nuchal translucency with normal karyotype. *Am J Obstet Gynecol*. 2005, 192, 1005-1021.
7. Nicolaidis K. Nuchal translucency and other first-trimester sonographic markers of chromosomal abnormalities. *Am J Obstet Gynecol*. 2004, 191, 45-67.
8. Mogra R, Zidere V, Allan L. Prenatally detectable congenital heart defects in fetuses with Down syndrome. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2011, 38, 320-324.