

Perbandingan kadar asam folat pada kehamilan dengan preeklampsia dan kehamilan normal

A.A.N. JAYAKUSUMA*
M.K. KARKATA*
K. DARMAYASA*
K. GUNUNG**

*Subbagian Fetomaternal
Bagian/SMF Obstetri Ginekologi
**IKK-IKP

Fakultas Kedokteran Universitas Udayana/
RS Sanglah
Denpasar

Tujuan: Membandingkan konsentrasi asam folat pada kehamilan dengan preeklampsia dan kehamilan normal dan hubungannya dengan peningkatan konsentrasi homosistein dan tekanan darah.

Bahan dan cara kerja: Penelitian kasus-kontrol mengikutsertakan 30 pasien preeklampsia sebagai kasus dan 30 pasien dengan kehamilan normal sebagai kontrol. *Imx Folate Reagent Pack* dari Abbott Laboratories digunakan untuk mengukur konsentrasi asam folat plasma, sedang konsentrasi homosistein diukur dengan *Fluorescent Polarization Immunology Assay*. Analisis dilakukan dengan tes Kai-kuadrat atau *Fisher's Exact, T test* dan korelasi Pearson.

Hasil: Rerata konsentrasi asam folat plasma pada pasien preeklampsia (12,32 ng/mL) lebih rendah dibanding dengan yang didapat pada kehamilan normal (14,22 ng/mL), namun secara statistik tidak berbeda bermakna ($p=0,275$). Didapatkan perbedaan bermakna ($p=0,027$) antara rerata konsentrasi homosistein pasien preeklampsia (9,71 $\mu\text{mol/L}$) dan pasien dengan kehamilan normal (6,13 $\mu\text{mol/L}$). Tidak terbukti korelasi negatif konsentrasi asam folat plasma ($r=-0,3$; $p=0,123$) dan homosistein ($r=-0,1$; $p=0,551$) antara pasien preeklampsia dengan kehamilan normal. Namun didapatkan korelasi negatif yang bermakna dari konsentrasi asam folat plasma dengan tekanan sistolik ($r=-0,4$; $p=0,030$) dan tekanan diastolik ($r=-0,4$; $p=0,030$) pada pasien preeklampsia.

Kesimpulan: Berdasarkan penelitian ini tidak didapatkan perbedaan bermakna antara konsentrasi asam folat plasma pasien preeklampsia dengan kehamilan normal. Didapatkan hubungan bermakna antara asam folat plasma dengan tekanan sistolik dan diastolik pada pasien preeklampsia.

[Maj Obstet Ginekol Indones 2007; 31-2: 61-5]

Kata kunci: preeklampsia, asam folat, homosistein, tekanan darah sistolik/diastolik

Subject: To compare the plasma folic acid concentration in preeclamptic versus normal pregnancy patients and its correlation with increase of homocystein concentration, systolic and diastolic blood pressure.

Materials and method: Case control study, conducted to 30 preeclamptic patients as the case group and 30 normal pregnancy patients as the control group. *Imx Folate Reagent Pack* from Abbott Laboratories was used to examine plasma folic acid concentration and *Fluorescent Polarization Immunology Assay* was used for homocystein concentration. The data were analyzed by using *Chi-square test* or *Fisher's Exact, T test* and *Pearson correlation test*.

Result: No significant differences ($p=0,275$) in mean of plasma folic acid concentration of preeclamptic patients (12.32 ng/mL) and normal pregnancy (14.22 ng/mL). A significant difference ($p=0,027$) in the mean of homocystein concentration of preeclamptic patients (9.71 $\mu\text{mol/L}$) and normal pregnancy patients (6.13 $\mu\text{mol/L}$) was found. No significant negative correlation of plasma folic acid concentration ($r=-0,3$; $p=0,123$) and homocystein concentration ($r=-0,1$; $p=0,551$). But there were a significant negative correlation between plasma folic acid concentration with systolic ($r=-0,4$; $p=0,030$) and diastolic blood pressure ($r=-0,4$; $p=0,030$) of preeclamptic patients.

Conclusion: This study showed there was no significant difference in plasma folic acid concentration of preeclamptic patients and normal pregnancy. There were a significant negative correlation between plasma folic acid concentration with systolic and diastolic blood pressure in preeclamptic patients.

[Indones J Obstet Gynecol 2007; 31-2: 61-5]

Keywords: preeclampsia, folic acid, homocystein, systolic/diastolic blood pressure

PENDAHULUAN

Meskipun penyebab terjadinya preeklampsia sampai sekarang belum jelas, namun beberapa teori telah diakui dapat menjelaskan patogenesis pre-

eklampsia. Teori-teori tersebut adalah, teori genetik, teori imunologi, teori iskemik plasenta, teori radikal bebas dan kerusakan endotel, dan teori diet.¹⁻⁴ Disfungsi endotel telah terbukti merupakan titik sentral manifestasi klinik preeklampsia, di mana

hiperhomosisteinemia merupakan salah satu penyebab keadaan tersebut. Homosistein, adalah asam amino yang mengandung gugus S, berasal dari metabolisme metionin yang memerlukan asam folat.

Defisiensi asam folat ternyata terbukti menyebabkan tingginya kadar homosistein, di mana dinyatakan bahwa hampir duapertiga kasus hiperhomosisteinemia disebabkan oleh defisiensi asam folat, penyebab lainnya adalah defisiensi vitamin B₁₂ dan B₆. Dalam jalur pertama, metabolisme homosistein asam folat berfungsi sebagai donor metil (*N-Methyl-tetrahydrofolate*), yang berperan dalam reaksi remetilasi homosistein menjadi metionin, di mana metionin terbentuk dengan menambahkan gugus metil pada reaksi yang dikatalisis oleh enzim *methionine synthase*. Vitamin B₁₂ berfungsi sebagai koenzim pada reaksi ini. Jalur kedua dalam menjaga keseimbangan homosistein ini adalah jalur transsulfurasi, di mana jalur ini terpakai bila tubuh membutuhkan sistein atau terjadi kelebihan homosistein dalam tubuh. Pada jalur ini homosistein akan dikondensasi oleh *serine* membentuk *cystathionin* dengan katalisator vitamin B₆. *Cystathionin* ini selanjutnya dihidrolisis menjadi sistein yang selanjutnya membentuk *gluthation*, yang telah dikenal sebagai anti oksidan endogen. Gangguan kedua jalur tersebut, terutama defisiensi asam folat akan menyebabkan terjadinya keadaan hiperhomosisteinemia yang menjadi penyebab disfungsi endotel.^{3,5} Dekker seperti yang dikutip oleh Michael Leeda (1998) mendapatkan dari 79 wanita dengan riwayat preeklampsia berat ternyata sebanyak 17,7% mengalami hiperhomosisteinemia.⁶

Berdasarkan latar belakang itulah penelitian ini dilakukan untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan kadar asam folat pada wanita hamil preeklampsia dan wanita hamil normal. Dengan mengetahui perbedaan kadar asam folat pada kedua kondisi tersebut diharapkan memberikan sumbangan informasi untuk menjelaskan patogenesis preeklampsia.

RANCANGAN PENELITIAN

Penelitian ini merupakan penelitian kasus-kontrol dengan memakai dua kelompok, dengan kriteria inklusi adalah kehamilan tunggal, hidup, umur kehamilan aterm, umur ibu kurang dari 35 tahun dan bersedia mengikuti penelitian ini. Sedangkan kriteria eksklusi adalah ibu hamil dengan diabetes melitus, hipertensi kronik, obese (IMT >29), riwayat keguguran, riwayat preeklampsia dalam keluarga.

Kelompok I terdiri dari ibu hamil aterm dengan preeklampsia sebanyak 30 kasus, dan kelompok II adalah kelompok ibu hamil aterm normal sebanyak 30 kasus.

BAHAN PENELITIAN

Bahan penelitian berupa contoh darah vena dari kedua kelompok penelitian tersebut sebanyak 10 ml. Batasan preeklampsia disesuaikan dengan klasifikasi menurut *National High Blood Pressure Education Program, Working Group Report on High Blood Pressure in Pregnancy 2000*. Waktu pengambilan contoh darah 12 jam puasa *post partus*. Penelitian ini dilakukan mulai tanggal 3 Juni 2003 sampai 12 Februari 2004. Sebelum pengambilan contoh darah, dilakukan persetujuan tindakan medik dan persetujuan untuk mengikuti penelitian.

CARA KERJA

Kelompok I adalah ibu hamil aterm dengan preeklampsia sebagai kasus yang dirawat di IRD Kebidanan RS Sanglah Denpasar, yang sudah memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi. Kelompok II sebagai kontrol diambil dari ibu dengan kehamilan normal. Darah vena diambil sebanyak 10 ml untuk pemeriksaan asam folat dan homosistein. Contoh darah diberi label identitas sesuai dengan nomor urut sampel. Selanjutnya pemeriksaan laboratorium dilakukan bekerjasama dengan Laboratorium Prodia Cabang Denpasar di Denpasar. Prosedur pemeriksaan asam folat menggunakan *metode Ion capture reactions cells* dan pemeriksaan homosistein menggunakan *metode Fluorescence Polarization Immunology Assay (FPIA)*. Pengolahan data dilakukan dengan komputer menggunakan program SPSS versi 10.0, dan uji statistik yang digunakan adalah uji *Chi-square* atau *Fisher's Exact, T test*, dan *Correlation*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Karakteristik Penderita

Agar kedua kelompok penelitian, yaitu kelompok preeklampsia (30 kasus) dan kelompok hamil normal (30 kasus) dapat diperbandingkan, maka dilakukan komparasi karakteristik dari kedua kelompok itu yaitu, umur ibu, paritas dan umur kehamilan dan kadar hemoglobin.

Tabel 1. Sebaran karakteristik pada kelompok preeklampsia dan kehamilan normal

Karakteristik	Preeklampsia (30)	Kehamilan normal (30)	p
Umur:			
< 19 tahun	1	6	0,103**
> 19 tahun	29	24	
Paritas:			
Nulipara	24	23	0,754*
Multipara	6	7	
Umur Kehamilan (mg)	38,2 (±1,34)	38,7 (±1,16)	0,155***
Kadar Hb (mg/dl)	11,7 (±1,48)	11,8 (±1,03)	0,672***

Keterangan: *Chi-square Test; **Fisher's Exact Test; ***T Test.

Pada Tabel 1 tampak bahwa karakteristik penderita ditinjau dari segi umur ibu, paritas, umur kehamilan dan kadar hemoglobin secara statistik tidak menunjukkan perbedaan yang bermakna ($p > 0,05$) sehingga kedua kelompok tersebut dapat dianggap komparabel.

Tabel 2. Perbandingan rerata kadar asam folat dan kadar homosistein antara kelompok preeklampsia dan kehamilan normal

	Preeklampsia (30)	Kehamilan normal (30)	p
Kadar asam folat (ng/ml)	12,32 (±9,090)	14,22 (±2,388)	0,275*
Kadar homosistein (µmol/l)	9,71 (±8,264)	6,13 (±1,770)	0,027*

Keterangan: *T Test.

Dalam Tabel 2 tampak bahwa pada kelompok preeklampsia didapatkan kadar asam folat yang lebih rendah dibandingkan dengan kelompok kehamilan normal, namun perbedaan tersebut secara statistik tidak bermakna ($p = 0,275$). Sedangkan kadar homosistein plasma pada wanita hamil dengan preeklampsia lebih tinggi secara bermakna ($p = 0,027$) dibandingkan dengan kadar homosistein wanita hamil normal.

Tabel 3. Korelasi antara kadar asam folat dan homosistein pada kehamilan dengan preeklampsia dan kehamilan normal

	Preeklampsia (30)	Kehamilan normal (30)
Asam folat - homosistein	$r = -0,3$ ($p = 0,123$)	$r = -0,1$ ($p = 0,551$)

Pada kelompok ibu hamil dengan preeklampsia dijumpai hubungan negatif yang lemah ($r = -0,3$) dan tidak bermakna ($p = 0,123$) antara kadar asam folat dan homosistein plasma. Hasil yang sama juga dijumpai pada kelompok ibu dengan kehamilan normal, yaitu hubungan negatif yang lemah ($r = -0,1$) dan tidak bermakna ($p = 0,551$) antara kadar asam folat dengan homosistein plasma (Tabel 3).

Rerata tekanan darah sistolik dan diastolik dapat dilihat dalam Tabel 4. Ternyata rerata tekanan darah sistolik berbeda bermakna ($p = 0,001$) pada kelompok pasien preeklampsia ($155 \pm 11,4$ mmHg) dibandingkan dengan pasien hamil normal ($118 \pm 6,3$ mmHg). Demikian pula halnya dengan tekanan darah diastolik ($p = 0,001$), masing-masing pada pasien preeklampsia dan hamil normal adalah: $102 \pm 9,0$ mmHg dan $76 \pm 5,6$ mmHg.

Tabel 4. Perbandingan rerata tekanan darah sistolik dan diastolik antara kelompok preeklampsia dan kehamilan normal

	Preeklampsia (30)	Kehamilan normal (30)	p
Tekanan darah sistolik (mmHg)	155 (±11,4)	118 (±6,3)	0,001
Tekanan darah diastolik (mmHg)	102 (±9,0)	76 (±5,6)	0,001

Tabel 5. Korelasi kadar asam folat dengan tekanan darah sistolik dan diastolik

Korelasi kadar asam folat dengan:	Kelompok				Gabungan
	Preeklampsia		Kehamilan normal		
	r	p	r	p	
Sistolik	-0,4	0,030	0,03	0,888	-0,3 ($p = 0,035$)
Diastolik	-0,4	0,038	0,1	0,598	-0,3 ($p = 0,036$)

Keterangan: r = koefisien korelasi Pearson

Tabel 5 memperlihatkan bahwa terdapat korelasi negatif yang bermakna antara kadar asam folat dengan tingginya tekanan darah sistolik dan diastolik apabila pasien preeklampsia dan hamil normal digabungkan, koefisien korelasi (r) keduanya adalah $-0,3$ ($p = 0,035$) dan ($0,036$). Artinya bahwa semakin rendah kadar asam folat atau homosistein maka tekanan darah sistolik dan diastolik semakin tinggi. Ternyata yang memberikan hasil yang bermakna adalah kelompok ibu hamil dengan preeklampsia, $r = -0,4$ ($p = 0,030$) baik untuk tekanan darah sistolik maupun diastolik. Sebaliknya pada ibu dengan kehamilan normal asam folat hampir tidak ada pengaruhnya terhadap tekanan darah baik sistolik maupun diastolik, masing-masing $r = 0,03$ ($p = 0,888$) dan $r = 0,1$ ($p = 0,598$).

Tabel 6. Korelasi kadar homosistein dengan tekanan darah sistolik dan diastolik

Korelasi kadar homosistein dengan:	Kelompok				Gabungan
	Preeklampsia		Kehamilan normal		
	r	p	r	p	
Sistolik	0,2	0,305	-0,3	0,885	0,3 ($p = 0,010$)
Diastolik	0,3	0,185	0,1	0,577	0,4 ($p = 0,005$)

Keterangan: r = koefisien korelasi Pearson

Tabel 6 menunjukkan adanya korelasi positif yang bermakna antara baik tekanan darah sistolik maupun diastolik dan kadar homosistein pada gabungan pasien preeklampsia dan hamil normal, dengan koefisien korelasi berturut-turut: $r=0,3$ ($p=0,010$) dan $r=0,4$ ($p=0,005$). Artinya bahwa semakin tinggi kadar homosistein maka tekanan darah sistolik dan diastolik semakin tinggi. Akan tetapi bila dilihat hubungan antara kadar homosistein dengan tekanan darah sistolik dan diastolik pada kelompok pasien preeklampsia tidak tampak adanya hubungan yang bermakna (masing-masing $r=0,2$ ($p=0,305$) dan $r=0,3$ ($p=0,185$) maupun pada ibu dengan kehamilan normal dengan koefisien korelasi masing-masing $r=-0,3$ ($p=0,885$) dan $r=0,1$ ($p=0,557$).

PEMBAHASAN

Menurunnya kadar asam folat plasma mempunyai arti penting dalam patogenesis preeklampsia, karena asam folat berperan dalam metabolisme homosistein. Asam folat bertindak sebagai donor metil dalam reaksi remetilasi pada metabolisme homosistein, apabila terjadi kekurangan asam folat maka tidak terjadi perubahan homosistein menjadi metionin yang mengakibatkan terjadinya keadaan hiperhomosisteinemia. Homosistein merupakan asam amino yang mengandung sulfur. McCully adalah orang pertama yang membuktikan adanya hubungan antara hiperhomosistein dengan terjadinya aterosklerosis, dan sejak saat itu banyak penelitian telah membuktikan hubungan tersebut.⁵ Bukti-bukti eksperimental menunjukkan adanya disfungsi endotel pada keadaan hiperhomosisteinemia, walaupun mekanisme yang pasti belum diketahui, tetapi diduga bahwa kelebihan homosistein tersebut menyebabkan terjadinya proses otooksidasi yang menghasilkan gugus oksigen reaktif yaitu superoksida dan hidrogen peroksida, di mana keadaan ini menyebabkan terjadinya kerusakan endotel. Pada penelitian ini kadar asam folat pada kehamilan dengan preeklampsia lebih rendah (12,32 ng/ml) dibandingkan dengan kadar asam folat pada kehamilan normal (14,20 ng/ml) walaupun perbedaan tersebut secara statistik tidak bermakna. Sama halnya dengan penelitian yang dilakukan oleh Defina dan kawan-kawan, yang mendapatkan kadar asam folat wanita hamil preeklampsia berat yang lebih rendah (10,63 ng/ml) dibandingkan dengan kadar asam folat wanita hamil normal (11,37 ng/ml) dan perbedaan tersebut juga tidak bermakna ($p>0,05$).^{7,8} Sanchez dan kawan-kawan mengukur kadar asam folat, vitamin B₁₂ dan homosistein pada 125 wanita

hamil dengan preeklampsia trimester III dan membandingkannya dengan 179 kehamilan normal, ternyata didapatkan hasil kadar asam folat pada preeklampsia berada di bawah kuartil terendah dengan rasio odds 1,6; rendahnya kadar vitamin B₁₂ tidak mempunyai hubungan dengan preeklampsia.¹¹ Hal tersebut membuktikan bahwa asam folat berperan dalam patogenesis preeklampsia, keadaan ini bisa dilihat dari meningkatnya kadar homosistein pada penelitian ini di mana terdapat perbedaan yang bermakna ($p<0,05$) antara kadar homosistein pada preeklampsia yang lebih tinggi (9,71 mmol/l) dibandingkan dengan kadar homosistein pada kehamilan normal (6,13 mmol/l). Bila dilihat korelasi antara kadar asam folat dan kadar homosistein, maka terdapat korelasi negatif antara kadar asam folat dan kadar homosistein, yang berarti bahwa bila kadar asam folat rendah maka kadar homosistein akan tinggi, perbedaan tersebut pada penelitian ini tidak bermakna, karena sebagaimana diketahui tinggi rendahnya kadar homosistein tidak saja tergantung dari asam folat tetapi ada juga peran substansi lainnya seperti vitamin B₁₂, vitamin B₆ dan sistein.^{3,5,7} Amanda dan kawan-kawan mendapatkan kadar homosistein pada 56 penderita preeklampsia sebesar 9,8 mmol/l yang lebih tinggi dibandingkan dengan 112 wanita hamil normal yaitu sebesar 8,4 umol/l.³ Vollset dan kawan-kawan mendapatkan kadar homosistein pada preeklampsia 32% lebih tinggi dibandingkan dengan wanita hamil normal.⁷ Kaitan antara asam folat dan homosistein telah dibuktikan pula oleh Patrick dan kawan-kawan yang membandingkan kadar homosistein dan asam folat pada wanita preeklampsia dari ras kulit hitam dan kulit putih, dan diperoleh bahwa pada wanita kulit hitam dengan preeklampsia kadar homosisteinnya lebih tinggi (8,7 mmol/l) dibandingkan dengan kadar homosistein wanita kulit putih dengan kehamilan normal (7,6 mmol/l), dan kadar asam folat pada wanita kulit hitam yang preeklampsia lebih rendah (14,1 ng/ml) dibandingkan dengan kadar asam folat wanita kulit putih dengan kehamilan normal (18,5 ng/ml), juga didapatkan hubungan yang terbalik antara kadar asam folat dengan homosistein ($r=-0,23$, $p=0,01$).⁹

Disfungsi endotel telah diakui sebagai titik sentral munculnya gejala dan tanda klinik preeklampsia, yaitu hipertensi, edema dan proteinuria. Peningkatan radikal bebas dapat menerangkan sebagian dari kerusakan tersebut di mana homosistein yang berlebihan dapat menyebabkan meningkatnya radikal bebas. *Nitric oxide* (NO) merupakan salah satu petanda penting pada kerusakan endotel, di mana kadarnya menurun pada preeklampsia.^{3,4,5,6}

Ahmet dan kawan-kawan membuktikan hubungan antara peningkatan homosistein dan penurunan kadar NO, dengan membandingkan hasil pemeriksaan homosistein dan NO dari 19 wanita preeklampsia dan 15 wanita hamil normal pada umur kehamilan 33-35 minggu. Didapatkan hasil bahwa pada wanita preeklampsia ternyata kadar NO-nya lebih rendah secara bermakna ($p < 0,001$) dan kadar homosistein-nya lebih tinggi secara bermakna ($p < 0,001$) dibandingkan dengan wanita hamil normal.¹⁰

Pada penelitian ini juga didapatkan korelasi negatif yang bermakna ($p < 0,05$) antara kadar asam folat dengan tingginya tekanan darah. Hal ini ada hubungannya dengan semakin tingginya kadar homosistein, yang merupakan penyebab kerusakan endotel, di mana pada keadaan itu akan terjadi penurunan NO yang merupakan vasodilator yang kuat.

KESIMPULAN

Kadar asam folat pada preeklampsia lebih rendah secara tidak bermakna dibandingkan dengan kadar asam folat pada kehamilan normal, keadaan ini disertai dengan tingginya kadar homosistein secara bermakna pada penderita preeklampsia dibandingkan dengan kehamilan normal. Rendahnya kadar asam folat pada preeklampsia ini mempunyai korelasi negatif yang bermakna terhadap tingginya tekanan darah.

RUJUKAN

1. Angsar D. Hipertensi Dalam Kehamilan. Edisi II, Kuliah Mahasiswa Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga. Surabaya: Lab/SMF Obstetri Ginekologi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga; 2003

2. Cunningham FG, Gant NF, Leveno KJ, Gilstrap III LC, Hauth JC, Wenstrom KD. Hypertensive disorders in pregnancy. In: Williams Obstetrics. 21st ed. New York: McGraw Hill; 2001: 567-618
3. Amanda C, Molloy AM, Scott JM, Daly SF. Elevated plasma Homosistein in early pregnancy: A risk factor for development of severe preeclampsia. Am J Obstet Gynecol 2001; 185(4): 781-5
4. Dekker GA, Sibai BM. Etiology and pathogenesis of preeclampsia: current concepts. Am J Obstet Gynecol 1998; 179: 1359-75
5. Franklin HE. Homocysteine and atherotrombosis. The New England Journals of Medicine 1998; 338(15): 1042-50
6. Leeda M, Riyazi N, Vries JIP, Jakobs C, Geijn HP, Dekker GA. Effects of folic acid and vitamin B₆ supplementations on women with hyperHomocysteinemia and history of preeclampsia or fetal growth restriction. Am J Obstet Gynecol 1998; 179(1): 135-9
7. Vollset SE. Plasma total Homocysteine, pregnancy complications, and adverse pregnancy outcomes: the Hordaland Homocysteine study. Am J Clin Nutr 2000; 71(4): 962-8
8. Defina, Symasuri AK, Pangemanan WT, Syarif Husin. Perbandingan kadar asam folat pada wanita hamil penderita preeklampsia berat dengan wanita hamil normal di RSMH Palembang. Buku Program Pertemuan Ilmiah Tahunan Feto-Maternal. Jakarta: Februari 2004; 114
9. Patrick TE, Powers RW, Daftary AR, Ness RB, Roberts JM. Homocysteine and folic acid are inversely related in Black Women with preeclampsia. Hypertension April, 2004
10. Ahmet V, Yasemin Y, Ece O, Kemal K, Sami U, Kayhan G. Endothelial dysfunction in preeclampsia. Increased homocysteine and decreased nitric oxide levels. Gynecologic and Obstetric Investigation 2003; 56: 221-4
11. Sanchez SE, Zhang C, Rene Malinow M, Ware-Jauregui S, Larrbure G, Williams MD. Plasma folate, vitamin B₁₂, homocysteine concentrations in preeclampsia and normotensive Peruvian women. Am J Epidemiol 2001; 153(5): 474-80