

Encefalopatia z odkładaniem żelaza w mózgu (NBIA, choroba Hallervordena-Spatza)

Dr n. med. Tomasz Kmieć

Klinika Neurologii i Epileptologii, Instytut „Pomnik – Centrum Zdrowia Dziecka”
Warszawa Międzyzlesie, Aleja Dzieci Polskich 20
t.kmiec@czd.pl, tel. 022-815 74 05

Encefalopatia z odkładaniem żelaza w mózgu spowodowana zwyrodnieniem ośrodkowego układu nerwowego (NBIA-1 *neurodegeneration with brain iron accumulation*, dawniej choroba Hallervordena-Spatza) jest rzadkim zespołem wieku dziecięcego, uwarunkowanym genetycznie. Jest jednak najczęstszą i najcięższą chorobą układu pozapiramidowego występującą u dzieci i młodzieży.

Klinicznie charakteryzuje się powoli postępującymi objawami pozapiramidowymi w postaci dystonii, obniżeniem funkcji poznawczych, zaburzeniami chodu, mowy i połykania, zwyrodnieniem siatkówki oraz obecnością akantocytów we krwi obwodowej. Postępujący przebieg choroby w zależności od postaci może być bardzo powolny – kilkunastoletni lub bardzo szybki – dwu-czteroletni. Dotychczas u dzieci wyróżniono dwie postaci choroby: postać wczesnodziecięcą występującą przed 10 r.ż. i postać późnodziecięcą z pierwszymi objawami po 10 r.ż.

Kliniczne rozpoznanie jest możliwe u dzieci z objawami pozapiramidowymi po uzyskaniu obrazów mózgu w wykonanym badaniu rezonansu magnetycznego, który uwidoczniła obecność złogów żelaza w gałce błędej i istocie czarnej. Dostępne w chwili obecnej jest także badanie molekularne mogące potwierdzić mutację genetyczną (PANK2) u pacjentów z postacią wczesnodziecięcą.

Do chwili obecnej nie znaleziono leczenia przyczynowego choroby; pozostaje kompleksowa terapia objawowa, rehabilitacja i pielęgnacja pacjenta.

Wstęp

Choroba została opisana po raz pierwszy w 1922 r. przez Hallervordena i Spatza u 5 siostr, jako postępująca zwyrodnieniowa choroba układu nerwowego o nieznanym etiologii. Dziedziczy się w sposób autosomalny recesywny. W 50% przypadków występuje rodzinie. Do 1989 r. opisano ponad 60 przypadków tej choroby na świecie. Natomiast w naszym kraju od roku 1980 r. rozpoznano ponad 50 przypadków tej choroby. W 1999 r. udało się zidentyfikować locus genu na chromosomie 20p12.3-p13, a następnie w 2001 r. produkt genu i mutację dla kinazy pantotenowej PANK2.

Do 2001 r. określano chorobę jako zespół Hallervordena-Spatza, z uwagi jednak na aktywne uczestnictwo obu lekarzy w programie zagłady chorych psychicznie i upośledzonych pacjentów w czasie II Wojny Światowej, zaproponowano zmianę nazwy na NBIA (zwyrodnienie układu nerwowego odkładaniem się żelaza w mózgu), która

jest stosowana coraz częściej. W związku z odkryciem genu choroby w części przypadków, Zhou i wsp. proponują nową nazwę: neurozwyrodnienie związane z kinazą pantotenianu (PANK- *pantothenate kinase associated neurodegeneration*). Do chwili obecnej nie znaleziono genu ani mutacji dla postaci późnodziecięcej.

Choroba charakteryzuje się podstępnie pojawiającymi się objawami ze strony układu pozapiramidowego, obniżeniem funkcji intelektualnych, zwyrodnieniem barwnikowym siatkówki i obecnością akantocytów we krwi obwodowej.

Ponieważ nie znaleziono dotąd biochemicznych mechanizmów patologicznych, rozpoznanie wstępne oparte jest na obrazie klinicznym oraz na badaniu neuroobrazowym rezonansu magnetycznego, które uwidoczniła symetryczne złogi żelaza w gałce błędej i istocie czarnej.

W postaci wczesnodziecięcej z mutacją PANK2 w badaniu MR głowy występuje typowy objaw „tygrysięgo oka”, a w postaci późnodziecięcej obustronne zmiany hipointensywne w obrębie gałki błędej.

Zmiany neuropatologiczne polegają na akumulacji pigmentu zawierającego żelazo i lipofuscynę z neuromelaniną w gałce błędej i w istocie czarnej oraz na rozsiałym zwyrodnieniu i rozdęciu aksonów (tzw. twory sferoidalne).

Obraz kliniczny

Encefalopatia postępująca z odkładaniem się żelaza w mózgu (NBIA) charakteryzuje się podstępnie, powoli postępującymi objawami pozapiramidowymi, stopniowym obniżeniem funkcji intelektualnych u dzieci w wieku 3-12 lat. Choroba pojawia się w ponad 50% przypadków przed 10 r.ż., a w 80% przed 15 r.ż. Początkowo występują zaburzenia w poruszaniu się i wykonywaniu ruchów dowolnych. Zasadnicze objawy to dystoniczne ustawienie stóp i rąk, ruchy choreo-ateletyczne i zmienne napięcie mięśniowe z przewagą sztywności. U dzieci występują objawy dystonii ogniskowej, a u młodzieży zespół hiperkinetyczno-akinetyczny w obrębie kończyn dolnych i tułowia. We wczesnym okresie pojawia się dyzartria i jest objawem stałym i narastającym. Skurcze dystoniczne mogą obejmować mięśnie głowy, języka i ust, prowadząc do znacznych zaburzeń artykulacji, żucia i łykania. Ponadto w badaniu stwierdza się objawy piramidowe, niedowład spastyczny kończyn dolnych, objawy mózdkowe oraz zaburzenia widzenia spowodowane zwyrodnieniem barwnikowym siatkówki z zanikiem nerwów wzrokowych. Nie obserwuje

się napadów padaczkowych. U większości pacjentów można stwierdzić obecność akantocytów, czyli nieprawidłowych krwinek czerwonych we krwi obwodowej.

W przebiegu choroby występuje stopniowe obniżenie funkcji poznawczych, któremu towarzyszą zaburzenia zachowania i osobowości, szczególnie w postaci późnej powoli postępującej. Są to zaburzenia zachowania i zmiana przedchorobowej osobowości jak drażliwość, impulsywność, agresywność, rozhamowanie z nadpobudliwością seksualną lub inercja przejawiająca się apatią, brakiem samodzielnych zainteresowań i inicjatywy, tępy afekt z obniżeniem reakcji emocjonalnych. Obserwuje się zaburzenia funkcji poznawczych jak uwagi, pamięci, spostrzegania, spowolnienie myślenia. W sferze mowy obserwuje się słabą płynność słowną.

W zaawansowanym stadium choroby dominuje uogólniona dystonia z rzekomymi przykurczami mięśniowymi, często „scyzorykowate” ułożenie kończyn dolnych, globalne otępienie, mutyzm akinetyczny, nietrzymanie moczu i stolca, znaczne wychudzenie. Bezpośrednią przyczyną zgonu jest zapalenie płuc i niewydolność oddechowa pogłębiona uszkodzeniem ośrodka oddechowego.

Obraz i przebieg kliniczny jest bardzo zróżnicowany co do wieku zachorowania, długości przeżycia, przebiegu klinicznego i różnorodności występowania typowych objawów klinicznych. Prawdopodobnie jest to uzależnione o rodzaju mutacji i zmiennej ilości produkowanego białka aktywnego w procesach przemiany żelaza w strukturach pozapiramidowych mózgu.

Do chwili obecnej nie jest znany gen ani mutacja u dzieci z późną postacią tej choroby.

Podział kliniczny

W zależności od wieku zachorowania, przebiegu klinicznego i obecności mutacji PANK2 wyodrębnia się następujące postaci kliniczne:

I. Postać wczesnodziecięcą, zwaną dziecięcą (pełne objawy choroby występują przed ukończeniem 10 r.ż., obecna jest mutacja PANK2)

a) o wczesnym zachorowaniu i szybkim przebiegu
Pierwsze objawy występują na przełomie pierwszego i drugiego roku życia.

Dominuje wybitna sztywność mięśniowa, uogólniona dystonia z torsyjnym ustawieniem stóp i rąk oraz pseudoprzykurcze mięśniowe i wybitne, krańcowe wygięcie tułowia ku tyłowi co znacznie utrudnia odżywianie i oddychanie. U większości dzieci stwierdza się zwyrodnienie barwnikowe siatkówki oraz akantocyty we krwi obwodowej.

Przebieg choroby jest bardzo szybki, okres przeżycia od jednego do kilku lat.

b) o powolnym przebiegu

Zachorowanie występuje około piątego roku życia, ale może być wcześniejsze.

Obraz kliniczny jest bardzo zróżnicowany, ale dominuje dystonia, a zwyrodnienie barwnikowe siatkówki oraz upośledzenie funkcji intelektualnych są mniej widoczne.

Wielu pacjentów może się uczyć przez dłuższy czas, pomimo postępujących objawów ruchowych i zaburzeń artykulacji.

W obu postaciach rozpoznanie wstępne oparte jest na badaniu rezonansu magnetycznego, które uwidoczni w sekwencjach T-2 zależnych przy rozdzielczości 1, 5 Tesli, obecność skumulowanego żelaza w obrębie gałki bladej w postaci objawu tzw. „tygrysięgo oka”.

II. Postać późnodziecięcą zwaną młodzieńczą (rozwinęty obraz choroby między 10 a 20 r.ż.)

Rozpoczyna się w drugiej dekadzie życia. Pierwszym objawem choroby są zaburzenia chodu i częste upadki. W badaniu neurologicznym stwierdza się objawy piramidowe, wygórowane odruchy ścięgniste, objaw Babińskiego, klonus stopy i rzepki, przykurcz w stawie skokowym, a klinicznie niedowład spastyczny kończyn dolnych. Objawy pozapiramidowe pod postacią dystonii, ruchów choreo-ateotycznych; zaburzenia artykulacji pojawiają się stopniowo później. Dominują znacznego stopnia zaburzenia zachowania z nasilającą się agresją opisane powyżej, a w połączeniu z obniżeniem funkcji intelektualnych uzupełniają pełny obraz kliniczny.

Nietypowy obraz kliniczny powoduje opóźnienie ustalenia rozpoznania, gdyż wiele chorób neurometabolicznych w tym wieku przebiega podobnie. Zwykle przebieg choroby jest bardzo powolny, o wiele wolniejszy niż w postaciach wczesnodziecięcych.

Decydujące o ustaleniu rozpoznania jest badanie rezonansu magnetycznego, które uwidoczni charakterystyczne hipointensywne zmiany w sekwencji T2 w gałce bladej i w istocie czarnej, związane z odkładaniem się tam żelaza.

III. Postać wieku dorosłego (rozpoczyna się po 20 r.ż.)

Występuje znacznie rzadziej i charakteryzuje się różnorodnością pozapiramidowych objawów ruchowych jak atetozą, płasawicą i mioklonie. Nadal objawem osiowym jest dystonia. Pojawia się otępienie. Opisywano przypadki z pierwszymi objawami w 50 r.ż. ze sztywnością pozapiramidową i otępieniem.

IV. Postać o przedłużonym przebiegu klinicznym

Są to przypadki, w których pierwsze objawy pojawiają się pod koniec pierwszej lub w drugiej dekadzie życia, a przebieg kliniczny jest bardzo wolny i wyjątkowo długi, tak że okres przeżycia wynosi kilkadziesiąt lat.

Diagnostyka różnicowa

O chorobie należy zawsze myśleć, gdy stwierdza się w badaniu neurologicznym objawy pozapiramidowe pod postacią sztywności mięśniowej, dystonii ogniskowej połowicznej i uogólnionej, zaburzeń mowy, połykania, pogorszenia widzenia, obniżenia funkcji intelektualnych, zaburzeń zachowania, obecności zwyrodnienia barwnikowego siatkówki i akantocytów we krwi obwodowej. Wykonanie dostępnego powszechnie badania MR rezonansu magnetycznego o rozdzielczości 1, 5 Tesli, pozwoli na potwierdzenie rozpoznania, jeśli uwidoczni charakterystyczne dla tej choroby zmiany hipointensywne lub objaw „tygrysięgo oka” w gałce bladej. W żadnej innej chorobie układu nerwowego powyższe zmiany nie występują. Pozytywny wynik w tym badaniu pozwoli na uniknięcie serii kolejnych specjalistycznych badań biochemicznych u chorego pacjenta, które nie wykazują zwykle żadnych odchyłań. Wstępne potwierdzenie

badaniem MR mózgu rozpoznania NBIA, pozwala na zlecenie wykonania specjalistycznych badań molekularnych DNA w poszukiwaniu mutacji PANK2 i ostateczne potwierdzenie rozpoznania tej strasznej choroby.

Inne choroby układu pozapiramidowego u dzieci jak dystonia uogólniona DYT1, DYT 5, DYT11, choroba Huntingtona, choroba Wilsona, choroba Segawy, choroba Niemann-Picka typ C, sialidoza występują znacznie rzadziej. Należy pamiętać o innych chorobach jak układowy toczeń rumieniowaty, zespół polekowy lub zatrucie tlenkiem węgla.

Nie stwierdza się swoistych odchyłań biochemicznych w badaniach laboratoryjnych i w płynie mózgowo-rdzeniowym. Poziomy żelaza, ferrytyny, hemoglobiny we krwi są prawidłowe. U większości chorych stwierdza się we krwi obwodowej akantocyty, czyli nieprawidłowe krwinki czerwone. Nieprawidłowe są badania potencjałów wywołanych wzrokowych i badania elektroretinograficzne a większości chorych stwierdza się oftalmoskopowo zwyrodnienie barwnikowe siatkówki. Uważany za oddzielny zespół HARP (hipoprebetalipoproteinemia, akantocytoza, zwyrodnienie barwnikowe siatkówki, zwyrodnienie gałki błędej) okazał się na podstawie wykonanych badań molekularnych zespołem NBIA-PKAN, gdyż wykryto u tych chorych obecność mutacji PANK2.

Badanie rezonansu magnetycznego

Badaniem z wyboru jest rezonans magnetyczny MR głowy, o mocy 1,5 T, który uwidoczni symetrycznie w obrębie gałek błądych obszar ewidentnego obniżenia sygnału w sekwencji T2 zależnej, w którego centrum lub w części przednio-przyśrodkowej znajduje się małe hiperintensywne pole przypominające wyglądem „żrenicę tygrysięgo oka”. Ponadto wyraźne obniżenie sygnału stwierdza się obustronnie w okolicy istoty czarnej tworzącej siatkowatego.

Okazało się, że u wszystkich dzieci z obecnością mutacji PANK2 i postacią wczesnodziecięcą, klasyczną o ciężkim przebiegu w obrazach MR uwidoczniła się zmiana w gałce błędej o typie „tygrysięgo oka”. Natomiast w kilkunastu przypadkach, gdzie nie znaleziono mutacji PANK2, a klinicznie rozpoznano postać powoli postępującą późnodziecięcą, w obrazach MR głowy stwierdzono obecność tylko zmian hipointensywnych w obrębie całej gałki błędej i w istocie czarnej pnia mózgu. Uważa się, że obszar hipointensywny w obu gałkach błądych spowodowany jest znacznym nagromadzeniem złogów żelaza, natomiast środkowe hiperintensywne pole może być spowodowane glejową, obrzękiem i ubytkiem neuronalnym ze zgąbczeniem podłoża i jest charakterystyczny dla omawianej choroby.

Badania genetyczne

Encefalopatia z odkładaniem się żelaza w mózgu (NBIA) związana z kinazą pantotenową spowodowana jest obecnością mutacji PANK2 w genie kodującym kinazę pantotenową 2 na chromosomie 20p12.3-p13. Jest ona kluczowym enzymem w biosyntezie koenzymu A, który jest niezbędny w metabolizmie energetycznym, syntezie kwasu tłuszczowego i jego degradacji, w metabolizmie neuroprekaźników i glutacjonu. Od kilku lat dostępne badania molekularne pozwala na znalezienie tej mutacji genu i potwierdzenie obecności choroby u badanego pacjenta. Badanie molekularne polega na zsekwencjonowaniu całego genu PANK2 metodą PCR i przeprowadzeniu amplifikacji

wszystkich 7 eksonów w sposób sensowy jak i antysensowy. Na podstawie uzyskanych dotąd wyników badań molekularnych u chorych z mutacją PANK2 stwierdzono mutacje powodujące skrócenie dojrzewania produkowanego białka (zmiana ramki odczytu, mutacja nonsensowna, mutacja zmiany sekwencji donorów i akceptorów) oraz na mutacje zmiany sensu określane jako te, które powodują zamianę aminokwasów.

W Klinice Neurologii IP Centrum Zdrowia Dziecka od 1985 r. stwierdzono objawy kliniczne NBIA u 50 dzieci, które wystąpiły w wieku od 2 do 13 lat. Dzięki współpracy i uprzejmości Instytutu Genetyki Człowieka w Monachium od 2005 r. wykonano badania molekularne w celu znalezienia mutacji PANK2 u 30 pacjentów (15 dziewczynek, 15 chłopców) z objawami klinicznym i zmianami strukturalnymi w gałce błędej w badaniu rezonansu magnetycznego.

U 20 z nich potwierdzono obecność mutacji PANK2 i objaw „tygrysięgo oka” w MR mózgu i rozpoznano wczesną klasyczną, ciężką postać choroby, z wystąpieniem objawów przed 10 r.ż. z obecnym zwyrodnieniem barwnikowym siatkówki i akantocytozą. W badaniach molekularnych u 20 pacjentów znaleziono 10 mutacji heterozygotycznych i 10 homozygotycznych. Najczęściej występowała mutacja c.573delC/p.S. 191RfsX13 wyjątkowo tylko w polskiej populacji badanych pacjentów.

U pozostałych 10 dzieci nie znaleziono mutacji PANK2 ani też objawu „tygrysięgo oka” w MR mózgu (obecny był jednak obszar hipointensywny w obu gałkach błądych), zachorowanie wystąpiło po 10 r.ż., a pierwszymi dominującymi objawami były zaburzenie chodu, i dysmetria oraz nadpobudliwość emocjonalna i zaburzenia zachowania, a przebieg choroby jest nadal łagodny i powolny.

Leczenie

Do chwili obecnej nie znaleziono swoistego leczenia encefalopatii postępującej z odkładaniem się żelaza w mózgu – NBIA. Próby stosowania związków chelatujących żelazo nie przyniosły pozytywnych rezultatów. Leczenie jest ukierunkowane na zmniejszenie poszczególnych objawów choroby. Jest ono także nieskuteczne i nie wpływa hamująco na przebieg naturalny choroby. Najtrudniejszym objawem do leczenia jest dystonia uogólniona. Próby podawania leków dopaminoergicznych – lewodopy, leków agonistów – bromokryptyny niekiedy nasilały tylko objawy ruchowe. Jeśli to leczenie okazuje się nieskuteczne, zaleca się podawanie tryhexyfenidylu (parkopan). Niestety poprawa i zmniejszenie sztywności bywa przejściowa. Próby leczenia miejscowego toksyną botulinową, także okazały się zupełnie nieefektywne. Stosowany doustnie i w pompie baklofen także, mimo podwyższanych i wysokich dawek terapeutycznych, tylko nieznacznie wpływa na zmniejszenie napięcia mięśniowego i torsyjne ruchy dystoniczne. Okresowo niewielką poprawę można zauważyć po podaniu hemineuryny lub chloropromazyny. Działanie diazepam i klonazepam łagodzi niepokój, hiperkinezy, ułatwia zasypianie. Wskazane jest podawanie doustne kwasu pantotenowego w dawce 1-3 g dziennie, ale nie ma dowodów, że wpływa to na zahamowanie rozwoju choroby.

W późniejszym stadium choroby konieczne jest odżywianie przez zgłębnik dożołądkowy lub przez założoną gastrostomię. Niezbędne jest odsysanie dróg oddechowych.

U pacjentów z tą chorobą nie obserwowano napadów padaczkowych.

Leczenie neurochirurgiczne uszkodzające lub stymulujące jądra podkorowe nie przynosi spodziewanych efektów i dalej są prowadzone obserwacje i zbierane doświadczenia na temat tego rodzaju leczenia.

Zawodzą wszystkie inne sposoby leczenia jak używanie syntetyzatora głosu w narastającej dyzartrii czy od początku stosowane ćwiczenia logopedyczne.

W celu poprawy aktywności ruchowej i samodzielności chorych zaleca się włączenie wielostronnej rehabilitacji, obejmującą różnorodną kinezyterapię, jak ćwiczenia zwiększające zakres ruchu, metodę proprioceptywnego torowania, ćwiczenia statycznej i dynamicznej równowagi, terapię antyzachłystową, trening pęcherza moczowego. Wielokierunkowe, połączone leczenie może przynieść wymierną poprawę sprawności chorego dziecka.

Po kilku latach trwania postępującej choroby wszyscy pacjenci wymagają specjalistycznej pielęgnacji i nadzoru lekarskiego w domu, a niekiedy na oddziale intensywnej opieki medycznej.

Piśmiennictwo

1. Bertrand E. Zwrodnienie ośrodkowego układu nerwowego z odkładaniem się żelaza w mózgu, typu pierwszego (dawniej choroba Hallervordena-Spatza). Część I – obraz kliniczny i leczenie, *Neurol Neurochir Pol*, 2002,36,5,947-958.
2. Bertrand E. Zwrodnienie ośrodkowego układu nerwowego z odkładaniem się żelaza w mózgu, typu pierwszego. Część II – obraz histopatologiczny, nowe aspekty genetyczne oraz patogeneza. *Neurol Neurochir Pol*, 2002,36,6,1163-1171
3. Hartig B.M., Hortnagel K., Garavaglia B., Zori G., Kmieć T. i wsp. Genotypic and phenotypic spectrum of PANK2 mutations in patients with neurodegeneration with brain iron accumulation, *Ann Neurol*, 2006,59:248-256.
4. Hayflick S.J. Unraveling the Hallervorden-Spatz syndrome: pantothenate kinase-associated neurodegeneration is the same. *Curr Opin Pediatr* 2003,15:572-577.
5. Hayflick S.J., Westaway S.K., Levinson B. i wsp. Genetic, clinical, and radiographic delineation of Hallervorden-Spatz syndrome. *N Engl J Med* 2003;348:33-40.
6. Hortnagel K., Prokisch H., Meitinger T.: An isoform of hPANK2, deficient in pantothenate kinase-associated neurodegeneration, localizes to mitochondria. *Hum Mol Gene*, 2003,12,321-327.
7. Kmieć T. Choroby układu pozapiramidowego, w: *Neurologia Dziecięca*, pod red. Michałowicza i Józwiaka, wyd. Urban&Partner, Wrocław, 2000.
8. Kmieć T. Choroba Hallervordena-Spatza, w: *Postępy w diagnostyce i leczeniu chorób układu nerwowego u dzieci*, pod red. Józwiaka S., wyd. Bifolium, Lublin, 2003, tom 4, 132-135.
9. Kmieć T., Jurkiewicz E., Józwiak S., Pakuła-Kościesza I., Ebhart M., Prokisch H., Usefulness of brain MRI in diagnosis of NBIA in PKAN and non-PKAN patients. *Neuropediatrics*, 2006,37,suppl.1,130.
10. Kmieć T., Józwiak S., Pakuła-Kościesza I., Jurkiewicz E. i wsp. Aspekty kliniczne i diagnostyczne choroby Hallervordena-Spatza u 12 dzieci. *Ped Pol*, 2000,LXXV,11,873-881.
11. Kmieć T., Jurkiewicz E., Juszko J., Hartig M., Hortnagel K., Józwiak S., Pakuła-Kościesza I. Charakterystyka genetyczna, kliniczna i radiograficzna encefalopatii postępującej z odkładaniem się żelaza w mózgu (NBIA) (dawniej zespołu Hallervordena-Spatza), *Neurol Dziec*, 2007,16, supl.zjazd.36-37.
12. Kotzbauer P.T., Truax A.C., Trojanowski JQ, Lee V.M. Altered neuronal mitochondrial coenzyme A synthesis in neurodegeneration with brain iron accumulation caused by abnormal processing, stability, and catalytic activity of mutant pantothenate kinase 2., *J Neurosci* 2005;25:689-698.
13. Swaiman K.F. Hallervorden-Spatz syndrome. *Ped Neurol*, 2001,25,2, 102-108.
14. Taylor T.D., Litt M., Kramer P., i wsp. Homozygosity mapping of Hallervorden-Spatz syndrome to chromosome 20p12.3-p13, 1996, *Nat Genet*, 1996,14,479-481.
15. Zhou B., Westaway S.K., Levinson B. i wsp. A novel pantothenate kinase gene (PANK2) is defective in Hallervorden-Spatz syndrome. *Nat Genet*, 2001:28:345-349.