

Psödohipoaldosteronizm Tip 1 Tanılı Bir Olgu ve Moleküler Genetik Etiyolojinin Araştırılması

A Case with Pseudohypoaldosteronism Type 1 and Investigation of Molecular Genetic Etiology

Semih BOLU¹, Mustafa DOĞAN^{2*}, Recep ERÖZ³, Hüseyin YÜCE³,
Asuman MERMERCİ⁴, Recep ÖZMERDİVENLİ⁵

¹Adıyaman Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Adıyaman; ²Malatya Eğitim Araştırma Hastanesi, Malatya

³Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik AD, Düzce; ⁴Boyabat Devlet Hastanesi, Sinop

⁵Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji AD, Aydın

ÖZ

Pseudohypoaldosteronizm hiponatremi, hiperkalemi ve metabolik asidoz ile kendini gösteren ve renal tübül hücrelerinde aldosterona periferik yanıtızsızlık sonucu oluşan bir tuz kaybı tablosudur. Periferik direnç mineralokortikoid reseptörü veya epitelyal sodyum kanalındaki mutasyon sonucu primer olabileceği gibi, enfeksiyon, üropati ve ilaçlara bağlı reseptör direncine bağlı olarak sekonder de gelişebilir. Tip 1 PHA hem otozomal dominant (sporadik-renal form) hem de otozomal resesif (sistemik form) olarak kalıtım göstermektedir. Sistemik psödohipoaldosteronizm tip 1 otozomal resesif kalıtılır ve en ağır formudur. Epitelyal sodyum kanalındaki (EnaC) üç subunitten: Alfa subunit (SCNN1A;12p13), Beta subunit (SCNN1B;16p12.2-p12.1), Gamma subunitlerin (SCNN1G;16p12) birinde fonksiyon kaybı yapan mutasyon sonucu meydana gelmektedir. Ailevi özellikteki primer psödohipoaldosteronizm tip1 olgusu nadir görülmesi ve diğer tuz kaybı ile giden hastalıklarla karışabilmesi nedeni ile literatüre katkı amaçlı sunulmuştur.

Anahtar kelimeler: Psödohipoaldosteronizm tip 1; tuz kaybı; yenidoğan.

ABSTRACT

Pseudohypoaldosteronism is a salt-wasting pattern that manifests with hyponatremia, hyperkalemia, and metabolic acidosis, and is the result of aldosterone peripheral nonresponse in renal tubule cells. Peripheral resistance development may occur as a result of mutations in the mineralocorticoid receptor or epithelial sodium channel; it can also develop as a secondary to infection, uropathy and receptor resistance due to drug use. Type 1 PHA is inherited as both autosomal dominant (sporadic-renal form) and autosomal recessive (systemic form). Systemic pseudohypoaldosteronism type 1 is autosomal recessive and the most severe form. Loss of function in one of the three subunits of the epithelial sodium channel (EnaC) is responsible for the disease (the alpha subunit (SCNN1A; 12p13), the beta subunit (SCNN1B; 16p12.2-p12.1), and the Gamma subunit (SCNN1G; 16p12). We present a patient who was diagnosed the primary pseudohypoaldosteronism type 1 for contribution to the literature, which is a rare disease and can be confused with other diseases caused by salt loss.

Keywords: Pseudohypoaldosteronism type 1; salt-wasting; newborn.

GİRİŞ

Tuz kaybı tablosu, vücudun sodyum tutma özelliğini kaybederek böbreklerden ya da diğer ekzokrin bezlerden sodyum kaybetmesi sonucu görülen hiponatremi, hipernatriüri ve dehidratasyon tablosudur. Yenidoğan döneminde tuz kaybına neden olan hastalıkların başında konjenital adrenal hiperplazi (KAH) gelir. Hastalar genelde yenidoğan döneminde cinsiyet farklılaşma bozuklukları ya da hayatı tehdit eden tuz kaybı tablolarıyla hastaneye başvururlar (1). Diğer tuz kaybı sebepleri arasında Konjenital Adrenal Hipoplazi, Konjenital Hipopitüitarizm, Bartter sendromu, İzole Aldosteron Eksikliği ve Pseudohipoaldosteronizm gibi daha nadir görülen hastalıklar yer almaktadır. Tuz kaybı tablosu, kilo alamamadan hipotansif şoka neden olacak kadar ağır klinik tablolara neden olabilir. Psödohipoaldosteronizm, aldosterona periferik direnç sonucu gelişen tuz kaybettiren bir hastalıktır. Mineralokortikoid reseptörü veya epitelyal sodyum kanalındaki mutasyon sonucu primer olabileceği gibi enfeksiyon, üropati ve ilaçlara bağlı sekonder olarak da gelişebilir (2). Psödohipoaldosteronizmin karakteristik bulguları hiponatremi, hiperkalemi, metabolik asidoz, yüksek aldosteron ve renin düzeyidir (3,4). Yenidoğan döneminde ağır hiponatremi ve dehidratasyon ile başvuran 4 günlük kız bebek, oldukça nadir rastlanan psödohipoaldosteronizm tip 1 tanısı alması nedeniyle sunuldu.

Sorumlu Yazar / Corresponding Author: Mustafa DOĞAN, mustafadogan81@yahoo.com

Geliş Tarihi / Received: 09.05.2018 Kabul Tarihi / Accepted: 05.06.2018

OLGU SUNUMU

Aralarında birinci derece kuzen akrabalığı olan ebeveynlerden, 29 yaşındaki annenin sorunsuz geçen dördüncü gebeliğinden üçüncü canlı doğum olarak sezaryen yolla 41 haftalık 3450 gram olarak doğduğu öğrenilen 9 günlük kız bebek, emmeme, halsizlik ve solunum düzensizliği nedeni ile kabul edildi. Bebeğin doğum sonrası ağlamadığı, asfiksi tanısı ile 4 gün yenidoğan yoğun bakım ünitesinde takip edildiği, solunum desteği gördüğü ve taburculuğu sonrası şikayetlerinin başlaması ile tekrar başvuruda yapılan tetkiklerinde hiponatremi (Na:105 mEq/L) ve hiperpotasemisinin (K:9,1 mEq/L) saptandığı bilgisi alındı.

Bebeğin muayenesinde, genel durum kötü, cilt turgoru azalmış, solunum sayısı 66/dk, nabız 124/dk, tansiyon 96/64 mmHg (normal sınırlarda), vücut ağırlığı 3070 gr (50-75 p) (%11 tartı kaybı), boy 51 cm (75-90 p), baş çevresi 35,5 cm (25-50 p) idi. Deri kuru, tüm vücutta yaygın deskuamasyon, boyun ve gövdenin üst taraflarında da miliyalari mevcut. Genital sistem muayenesi normal, meme areolasi ve vücutta pigmentasyon artışı yoktu. Diğer sistem muayeneleri doğal saptandı. Laboratuvar tetkiklerinde serum sodyumu (Na) 112 mEq/L (hiponatremi), serum potasyumu (K) 9,1 mEq/L (hiperpotasemi) ve kan şekeri 108 mg/dl, üre: 55,9 mg/dl, kreatinin: 0,37 mg/dl idi. Kan gazında venöz pH 7,26, HCO₃: 12,1 mmol/L, BE: -17,2 (metabolik asidoz) saptandı. Tam kan sayımı, C-reaktif protein ve tam idrar analizi değerleri normal sınırlardaydı. Spot idrarda sodyum düzeyi yüksek (66 mEq/L), potasyum değeri düşük (2,27 mg/dl (25-125)) saptandı. Hastamızın hiperkalemi sırasında >7 olması gereken transtubuler K gradienti hipoadosteronizm ile uyumlu olarak 0,5 bulundu. Hipovolemi ve hiponatremi esnasında olgunun kan örnekleri alındıktan sonra serum fizyolojik sıvı yüklemesi ve 4 cc/kg %3 NaCl intravenöz puşe tedavisi ile beraber toplam sıvı desteği (200 cc/kg/gün) olarak başlandı. Tuz kaybı nedeni ile günde 2 gram fludrokortizon ve 1,5 gram/gün oral tuz tedavisine başlandı. Hiperpotasemi tedavisi için intravenöz insülin-glikoz sıvısı, bikarbonat ve oral olarak kalsiyum polistiren sulfonat (antipotasyum granül) 1 gr/kg dozunda tedaviye eklendi. Bebeğin yapılan hormonal değerlendirmesinde ACTH: 12,2 pg/ml (0-46) ile normal sınırlarda, kortizol düzeyleri ise ilk geldiğinde stres anında 63,44 ug/dl, kontrolü 3,76 ug/dl ve 17-OH progesteron 3,36 ng/dl olup klinik ve laboratuvar bulguları ile birlikte konjenital adrenal hiperplazi dışlandı. Sürenal tuz kaybı tedavisinde verilen fludrokortizon tedavisine rağmen serum sodyum değeri yükselmeyen hastanın plazma renin aktivitesi 105,56 ng/mL/h (2,4-37), aldosteron 4610 pg/mL (50-1746,7) bulundu. İdrar sodyum atılımında artışla beraber plazma renin aktivitesi ve aldosteron düzeylerinin yüksek, ek olarak kan basıncı değerlerinin normal olması nedeniyle olguda primer psödohipoaldosteronizm tanısı konuldu. Sekonder PHA'yı dışlamak için yapılan tam idrar tahlili ve üriner sistem ultrasonografisi normal bulundu. İdrar kültüründe üreme saptanmadı. Hastanın aldığı fludrokortizon tedavisi kesilerek mamasına katılan sofraya tuzu artırıldı ve antipotasyum granül tedavisine devam edildi. Hastanın tuz kaybına bağlı elektrolit dengesizliği, beslenmeye tuz eklenmesi ve antipotasyum granül ile kontrol altına alındı. Alınan kontrol Na: 137 meq/l, K: 5,1 meq/l saptandı. Olgu yatışının 29. gününde 4280 gram (gelişine göre 1210 gram kilo alımı) olarak, oral tuz desteği (9 gram/gün) ve antipotasyum tedavisi (10 gram/gün) ile ayaktan Çocuk Endokrinoloji ve Yenidoğan poliklinik kontrolüne gelmek üzere taburcu edildi. Hastanın bir alt solunum yolu enfeksiyonu sonrasında hiperpotasemi ve sıvı kaybı sonucu exitus olduğu öğrenildi. Klinik ve laboratuvar bulgularıyla sistemik tip psödohipoaldosteronizm tip 1 olduğu düşünülen hastadan SCNN1A, SCNN1B ve SCNN1G genleri yeni nesil dizi analizi yöntemiyle dizilendi. Çalışma ile ilgili hastanın ebeveynlerinden bilgilendirilmiş onam alındı. Genetik analiz sonucunda SCNN1A geni 12. ekzonda bir missense (yanlış anlamlı) aminoasit mutasyonu (p.Thr663Ala), (c.1987A>G) heterozigot olarak, 1. ekzonda p.Pro33Pro sinonim aminoasit mutasyonu heterozigot

olarak ve genin 6. intron bölgesinde IVS6+54 C>T değişikliğini homozigot olarak taşıdığı saptanmıştır.

TARTIŞMA

Yenidoğan döneminde tuz kaybı sendromları beslenme bozukluğu, tartı alamama, kusma ve halsizlik gibi spesifik olmayan yakınmalardan şok tablosuna kadar giden ağır farklı klinik bulgular ile karşımıza çıkabilmektedir (5). Yenidoğan döneminde tuz kaybı bulguları saptanan olgularda öncelikle KAH düşünülmelidir. Olgular sıklıkla cinsiyet farklılaşma bozuklukları ve tuz kaybı tablosu ile başvururlar. Plazma sodyum düzeyi ölçümü ile birlikte idrar sodyum düzeyi ölçümü tuz kaybının nedenini araştırmada faydalıdır. İdrarla tuz kaybı olan olgularda en hassas sodyum dengesi göstergesi plazma renin aktivitesidir ve sodyum replasmanına rağmen yüksek değerlerde saptanır (6). Yenidoğan döneminde tuz kaybı ile başvuran olgularda KAH öncelikle düşünülmelidir. Tuz kaybettiren KAH türleri 21 hidroksilaz, 3-βhidroksi steroid dehidrogenaz, 20-22-desmolaz ve geçici olarak 11-β hidroksilaz ve 17-hidroksilaz eksiklikleridir (1). Olgular sıklıkla yenidoğan döneminde cinsiyet farklılaşma bozuklukları ve tuz kaybı tablolarıyla başvururlar. Bebeklerdeki cinsiyet farklılaşma sorunu çarpıcıdır ama tuz kaybı krizi hayatı tehdit eden ciddi ve acil bir tablodur. Tuz kaybettiren KAH türlerinden en sık (%90-95) görülen tip 21-Hidroksilaz eksikliğidir.

KAH olgularında tuz kaybı tablosu en erken hayatın ilk haftası içinde gelişebilirse de genellikle 2-3 haftada belirti verir. Bebeklerde kusma, dalgınlık, hipotansiyon, hipoglisemi ve düzeltilemeyen dehidratasyon görülür. Fizik muayenede erkeklerde makrogenitalya, kızlarda ise şüpheli genitalya saptanır. Her iki cinsiyette de genital bölge ve meme areolasında hiperpigmentasyon dikkati çeker (1). Yenidoğan döneminde tuz kaybı sendromu saptanan bebeklerde öncelikle konjenital adrenal hiperplazi düşünülerek tedavi hızla hiperpotasemi başta olmak üzere sıvı elektrolit dengesini düzeltmeye yönelik olmalıdır. Hastaların klinik ve laboratuvar bulguları yakın takip edilmeli ve tedavi başarısına göre altta yatan diğer nadir sebepler de göz önünde bulundurulmalıdır. Hiponatremi, hiperpotasemi ve metabolik asidozu olan hastalarda uygun sıvı-elektrolit ve steroid replasmanına rağmen klinik ve laboratuvar yanıt alınmıyorsa aldosteron direnci düşünülmeli ve plazma renin, aldosteron düzeyleri incelenmelidir. Plazma renin aktivitesi ve aldosteron düzeylerinin yüksekliği, hipotansiyon ve hipogliseminin olmaması, ebeveynlerin akraba olması, klinik bulgular (tartı alamama, kusma, huzursuzluk), nedeniyle hasta tip 1 psödohipoaldosteronizm (PHA1) tanısı aldı.

Periferik hedef dokuların aldosterona cevapsızlığı olarak bilinen psödohipoaldosteronizm bir tuz kaybı sendromudur. Laboratuvar özellikleri hiponatremi, hiperkalemi, metabolik asidoz, yüksek plazma aldosteron ve renin düzeylerine rağmen oluşan yüksek üriner sodyum ve düşük potasyum atılımı ile karakterizedir. Hastalık, mineralokortikoid reseptörleri veya amilorid bağımlı epitelyal sodyum kanallarındaki mutasyonlar sonucunda primer olarak ya da enfeksiyonlar, üropati ve ilaçlara sekonder olarak oluşabilir. Tip 1 PHA hem otozomal dominant (sporadik-renal form) hem de otozomal resesif (sistemik form) olarak kalıtım göstermektedir. Otozomal dominant (Renal tip) 1 PHA formunda aldosterona renal direnç mineralokortikoid reseptör genindeki (NR3C2) mutasyon nedeniyle oluşur (7). Vakalarda renal tuz kaybı, hiperpotasemi, tartı alamama, artmış renin-aldosteron düzeyi ve metabolik asidoz ile seyredir (8). Sistemik form olan otozomal resesif PHA'da ise aldosterona direnç, amilorid bağımlı epitelyal sodyum kanallarındaki mutasyon sonucu oluşur ve böbrek tübülleri, solunum sistemi, ter bezleri, kolon ve tükrük bezlerinden sodyum kaybı görülür. Sistemik psödohipoaldosteronizm tip 1 otozomal resesif kalıtlı ve en ağır formdur. Epitelyal sodyum kanalındaki (EnaC) üç subunitten: Alfa subunit (SCNN1A;12p13), Beta subunit (SCNN1B;16p12.2-p12.1), Gamma subunitlerin (SCNN1G;16p12) birinde fonksiyon kaybı yapan mutasyon

sonucu meydana gelmektedir (7,9). Hastamızda tespit edilen c.1987A>G değişikliği insiliko analiz verileri, toplam alel frekansları birlikte değerlendirildiğinde polimorfizm olarak değerlendirilmiştir. Ekzon 1'deki sinonim (c.99C>T), (p.Pro33Pro) varyantı için insiliko verilerine göre önemli bir "splicing" motif değişikliği beklenmemektedir. 6. intron bölgesindeki IVS6+54 C>T değişikliğini Mutation Taster insiliko analiz değerlendirme programı polimorfizm olarak değerlendirilmiş ancak "splicing" mekanizmasının etkilenebileceği, protein yapıda değişiklik meydana getirebileceği şeklinde belirtmektedir. Human Splicing Finder programı ise splicing mekanizmasında bir değişiklik öngörmemektedir. SCNN1B ve SCNN1G genlerinde yapılan analizler neticesinde kodlayan bölgeleri ve ekzon/intron birleşim bölgelerinde patojenik bir varyant saptanmadı.

SCNN1A geninde bugüne kadar 46 tane mutasyon tanımlanmıştır. Bu mutasyonların çoğu missense mutasyon olmakla birlikte gende delesyon ve splicing mekanizmasını bozan mutasyonlar da tanımlanmış ve psödohipoaldosteronizm tip 1 kliniği ile ilişkilendirilmiştir. Hastanın birinci derece yakınlarını içeren segregasyon analizleri planlandı. Literatürde bazı Psödohipoaldosteronizm tip 1 olduğu düşünülen özellikle de sporadik olarak ortaya çıkmış bazı vakalarda epitelyal sodyum kanalları (ENaC) veya mineralokortikoid reseptörlerinde mutasyon saptanamamıştır (10,11). Vakamızda segregasyon analiz verileri ile birlikte genetik etiyojolojiyi ortaya koymak adına daha detaylı analizler planlandı.

Sistemik mineralokortikoid direnci nedeni ile yüksek doz tuz desteği ile kompanse edilebilen tuz kaybı ve bazen ölümcül hiperkalemi meydana gelir (12,13). Ağır dehidratasyon, tekrarlayan alt solunum yolu enfeksiyonları ve kardiyak arrest gibi farklı klinik bulgularla kendini gösterebilir (14). Ek olarak milia rubra ve tekrarlayan deri enfeksiyonları da tanımlanmıştır. Tuz kaybı krizi sırasında standart mineralokortikoid replasmanına cevap yoktur. Bu durumda yüksek miktarlarda (50 mEq/kg/güne kadar çıkabilen) sodyum replasmanı yapılmalıdır. Hiperpotasemi hayatı tehdit edecek kardiyak sorunlara yol açtığından diyaliz yapılması gerekir. Hastamızda diyalize gerek olmadığı fakat yüksek serum potasyum değerleri nedeni ile antipotasyum granül 4gr/kg/gün dozuna kadar arttırıldı. Oral verilen antipotasyum granül yalnız 4 gr/kg/gün gibi yüksek dozlarda batın distansiyonuna yol açtı. Serum potasyum değerlerine göre azaltılan dozlarda antipotasyum tedavisi ile bu şikayetler de geriledi. Olgular dehidratasyondan, sistemik ve üriner sistem enfeksiyonlarından korunmalıdır. Erken semptom görülmesi, yüksek aldosteron düzeyi ve günlük 30 mmol/kg'ı aşan tuz alımı kuvvetle sistemik psödohipoaldosteronizm tip 1'i düşündürür (1). Hastamızda da 50 mmol/kg/gün dozunu aşan oral tuz desteği gerekti. Spontan remisyon görülmemekle birlikte halen küratif bir tedavi yoktur. Tuz desteği de bazen yetersiz kalabilir (2). Bu hastalarda araya giren enfeksiyon gibi durumlar tuz kaybı krizini başlatabilir.

Sonuç olarak, hayatın ilk haftalarında görülen ve hayatı tehdit eden tuz kaybı sendromlarının ayırıcı tanısı güç olsa da kesin tanıya gidilmesi önemlidir. Tuz kaybı tablosu hızla düzeltilirken eşlik eden bulgular ve öykü iyi değerlendirilmelidir. Yenidoğanlarda en sık ve en önemli sebep KAH iken, diğer nedenleri de düşünüp ayırıcı tanı için gerekli tetkiklerin hızla yapılması hayat kurtarıcı olacaktır. Planlanan KAH tedavisine yeterli yanıt alınmaması durumunda psödohipoaldosteronizm ayırıcı tanıda değerlendirilmelidir. Yeni nesil dizi analizi teknolojisi ile birçok hastalığın moleküler temelinin anlaşılmasında büyük ilerlemeler kaydedilmeye başlanmıştır. Moleküler genetik tanının ortaya konması ailelere doğru bir genetik danışmanlık verilebilmesi için önem arz etmekte; bu sayede risk altında olan aile bireyleri hızlıca taranabilmektedir (15). Moleküler genetik araştırmalar aldosteron sentezinde veya rezistansındaki defektlerinin patojenitesinin aydınlatılmasına ve genotip-fenotip ilişkilendirme çalışmalarına yardımcı olabilir.

KAYNAKLAR

1. Kurtoğlu S, Hatipoğlu N, Büyükayhan D. Neonatal tuz kaybı tablosu. Türkiye Klinikleri J Pediatr Sci. 2008;4(2):90-105.
2. Belot A, Ranchin B, Fichtner C, Pujo L, Rossier BC, Liutkus A et al. Pseudohypoaldosteronisms, report on a 10-patient series. Nephrol Dial Transplant. 2008;23(5):1636-41.
3. Güran T, Değirmenci S, Bulut İK, Say A, Riepe FG, Güran Ö. Critical points in the management of pseudohypoaldosteronism type 1. J Clin Res Pediatr Endocrinol. 2011;3(2):98-100.
4. Amin N, Alvi NS, Barth JH, Field HP, Finlay E, Tyerman K, et al. Pseudohypoaldosteronism type 1: clinical features and management in infancy. Endocrinol Diabetes Metab Case Rep. 2013;2013:130010.
5. Akın MA, Çoban D, Kurtoğlu S, Akın L, Akçakuş M. Yenidoğanda iki tuz kaybı olgusu: primer ve sekonder psödohipoaldosteronizm. Erciyes Tıp Dergisi. 2010;32(3):207-12.
6. Gündüz Z, Kurtoğlu S, Düşünsel R, Kendirci M, Melikoğlu A. Psödohipoaldosteronizm: idrarla tuz kaybına yol açan önemli durum. Ulusal Endokrinoloji Dergisi. 1995;5(4):409-16.
7. Silva N, Costa M, Silva A, Sá C, Martins S, Antunes A, et al. A case of systemic pseudohypoaldosteronism with a novel mutation in the SCNN1A gene. Endocrinol Nutr. 2013;60(1):33-6.
8. Viemann M, Peter M, López-Siguero JP, Simic-Schleicher G, Sippell WG. Evidence for genetic heterogeneity of pseudohypoaldosteronism type 1: identification of a novel mutation in the human mineralocorticoid receptor in one sporadic case and no mutations in two autosomal dominant kindreds. J Clin Endocrinol Metab. 2001;86(5):2056-9.
9. Furgeson SB, Linas S. Mechanisms of type I and type II pseudohypoaldosteronism. J Am Soc Nephrol. 2010;21(11):1842-5.
10. Sartorato P, Lapeyraque AL, Armanini D, Kuhnle U, Khaldi Y, Salomon R, et al. Different inactivating mutations of the mineralocorticoid receptor in fourteen families affected by type I pseudohypoaldosteronism. J Clin Endocrinol Metab. 2003;88(6):2508-17.
11. Turan I, Kotan LD, Tastan M, Gurbuz F, Topaloglu AK, Yuksel B. Molecular genetic studies in a case series of isolated hypoaldosteronism due to biosynthesis defects or aldosterone resistance. Clin Endocrinol (Oxf). 2018;88(6):799-805.
12. Schweiger B, Moriarty MW, Cadnapaphornchai MA. Case report: severe neonatal hyperkalemia due to pseudohypoaldosteronism type 1. Curr Opin Pediatr. 2009;21(2):269-71.
13. Manipriya R, Umamaheswari B, Prakash A, Binu N. Rare cause of hyperkalemia in the newborn period: report of two cases of pseudohypoaldosteronism type 1. Indian J Nephrol. 2018;28(1):69-72.
14. Saravanapandian N, Paul S, Matthai J. Pseudohypoaldosteronism type 1: a rare cause of severe dyselectrolytemia and cardiovascular collapse in neonates. J Clin Neonatol. 2012;1(4):224-6.
15. Dogan M, Eröz R, Yüce H, Özmerdivenli R. The known about next-generation sequencing (NGS) (review of the literature). Duzce Med J. 2017;19(1):27-30.