

Association of G103T Polymorphism of Coagulation Factor XIII with Recurrent Pregnancy Loss in Northwest of Iran

Bonyadi M*¹, Nazm AS², Taghavi S³, Ajamian F²

1. Center of Excellence for Biodiversity, Faculty of Natural Sciences, University of Tabriz, Tabriz, Iran

2. Department of Biology, Faculty of Science, University of Guilan, Rasht, Iran

3. Department of Obstetrics and Gynecology, Alzahra Hospital, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

* *Corresponding Author.* Tel/Fax: +984133357622 E-mail: jabbarpour@tabrizu.ac.ir

Received: Jul 11, 2015 Accepted: Dec 21, 2015

ABSTRACT

Background & objectives: Recurrent miscarriage (RM) occurs in 1–3% of couples attempting to bear children. Thrombophilia is one of the suspected causes of recurrent miscarriage. The factor XIII makes the clot stable at the end of coagulation cascade. The polymorphism G103T of factor XIII gene is the most common polymorphism that affects F XIII activity. We aimed to study the possible association of *FXIII* gene polymorphism (V34L) with recurrent miscarriage among patients in Northwest of Iran.

Methods: The study groups consisted of 70 patients with two or more consecutive miscarriages. The control group included 50 women with at least two successful deliveries and no history of pregnancy loss. DNA from both groups analyzed for carrying mutation of *FXIII* by PCR-RFLP. The χ^2 test used for statistical analyze.

Results: Two patients (%2.85) in the case group were homozygote (TT) for 34 Leu mutation whereas no homozygote (TT) was found in control group ($p>0.05$). 19 patients (%27.1) in the case group and 13 women (%26) in the control group were found to be heterozygote for G103T polymorphism ($p>0.05$). No significant difference was observed between patients with RPL and healthy women for G103T mutation.

Conclusion: No statistically difference was observed between case and control group.

Keywords: Recurrent Miscarriage; Thrombophilia; F XIII.

بررسی همراهی پلی مورفیسم G103T ژن FXIII با سقط مکرر در شمالغرب ایران

مرتضی جبارپور بنیادی^{۱*}، صبا احمدپور نظم^۲، سیمین تقوی^۳، فرزنام عجمیان^۲

۱. قطب علمی تنوع زیستی، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران ۲. گروه علوم زیستی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان، رشت، ایران ۳. گروه زنان و زایمان، بیمارستان الزهرا، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
* نویسنده مسئول. تلفکس: ۰۴۱۳۳۳۵۷۶۲۲ - پست الکترونیک: jabbarpour@tabrizu.ac.ir

چکیده

زمینه و هدف: سقط مکرر جنین در ۱ الی ۳ درصد خانم‌هایی که قصد دارند صاحب فرزند شوند، رخ می‌دهد. ترومبوفیلی از علل مستعدکننده سقط مکرر است. فاکتور XIII در انتهای آبشار انعقادی وجود دارد که سبب پایداری لخته می‌شود. شایع‌ترین پلی مورفیسم ژن FXIII، G103T بوده که باعث تغییر فعالیت فاکتور XIII می‌شود.

روش کار: ۷۰ بیمار با سابقه حداقل ۲ بار سقط و ۵۰ خانم بدون سابقه سقط و حداقل ۱ تولد زنده به عنوان گروه کنترل از شمالغرب کشور مورد بررسی قرار گرفته‌اند. استخراج DNA به روش نمک اشباع از لوکوسیت‌ها صورت گرفت. برای بررسی پلی مورفیسم مورد نظر از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز و همچنین تکنیک PCR-RFLP استفاده شد. بعد از تکثیر ناحیه مورد نظر، از آنزیم محدودالتر DdeI جهت تمایز دو آلل G و T استفاده گردید. به منظور تجزیه و تحلیل آماری از برنامه کای مربع استفاده شد.

یافته‌ها: از گروه بیمار ۲ نفر (۲/۸۵٪) دارای ژنوتیپ هموزیگوت (TT) بودند، در صورتی که در گروه کنترل ژنوتیپ هموزیگوت (TT) مشاهده نشد ($p > 0.05$). همچنین ۱۹ نفر (۲۷/۱٪) از گروه بیمار و ۱۳ نفر (۲۶٪) از گروه کنترل دارای ژنوتیپ هترو (GT) بودند ($p > 0.05$). بین این دو گروه تفاوت معنی داری از نظر آماری برای پلی مورفیسم G103T مشاهده نگردید.

نتیجه‌گیری: پلی مورفیسم ژن FXIII احتمالاً از طریق اختلال در سیستم انعقادی سبب سقط جنین می‌شود. بررسی جهش G103T در بیماران مبتلا به سقط مکرر در جمعیت‌های دیگر توصیه می‌شود.

واژه‌های کلیدی: سقط مکرر، ترومبوفیلی، فاکتور XIII

دریافت: ۹۴/۴/۲۰ پذیرش: ۹۴/۹/۳۰

مقدمه

سقط مکرر به معنی از دست دادن ۳ بارداری متوالی یا بیشتر، قبل از هفته بیستم حاملگی است. حداقل ۵۰ درصد از موارد سقط‌های مکرر بطور قابل توجهی ناشناخته هستند و منشأ آنها غیرقابل توضیح است. شواهد جدید نشان‌دهنده این است که سقط مکرر علاوه بر فاکتورهای بالینی، محیطی، شیوه زندگی که جزء عوامل خطر محسوب می‌شوند، دارای استعدادهای ژنتیکی نیز می‌باشد. بررسی مشاهدات

اولیه نشان داده که شیوع سقط مکرر در خویشاوندان درجه یک در مقایسه با سایر جمعیت ۷-۲ برابر بیشتر است. مطالعات ثبت شده جمعیت نشان داده که فراوانی کل سقط جنین در میان خواهران مبتلا به سقط مکرر با منشأ ناشناخته، حدود ۲ برابر نسبت به جمعیت عمومی است. بررسی ارتباط ژنوم گسترده خواهران دارای سقط مکرر بصورت ایدئوپاتیک، مشارکت فاکتورهای ژنتیکی ناهمگون در سقط را تایید می‌کند. با توجه به چندعاملی بودن سقط مکرر،

تشخیص بالینی آن در افراد مختلف، متفاوت است. امروزه بررسی‌های متفاوتی برای تشخیص بالینی عوامل مختلفی که خطر سقط را افزایش می‌دهند صورت می‌گیرد، از جمله این عوامل می‌توان به ناهنجاری‌های کروموزومی بصورت بالانس در والدین، ترومبوفیلی مادر، آناتومی رحم، غدد درون‌ریز و اختلالات سیستم ایمنی اشاره نمود (۱).

ترومبوفیلی بیماری است که در آن افزایش استعداد ایجاد لخته در سیستم انعقادی وجود دارد. در دوران بارداری به دلیل تغییرات فیزیولوژیکی حاملگی و همچنین تأثیرات ترومبوفیلی اکتسابی یا ارثی، خطر ترومبوفیلی وریدی افزایش می‌یابد (۲). نقص در ژن‌های فاکتور انعقادی از علل رایج ترومبوفیلی ژنتیکی است. یکی از ژن‌های فاکتور انعقادی، فاکتور ۱۳ است که در شکل‌گیری فبرین نقش دارد. از عملکردهای دیگر این فاکتور می‌توان به تأثیر مثبت آن در طول دوره بارداری اشاره کرد (۳،۴). در زمان حاملگی، طی لانه‌گزینی و اتصال سیتوتروفوبلاست به دیواره اندومتر رحم، فاکتور XIII به عنوان پروتئین چسبنده عمل می‌کند که نقص آن سبب جدا شدن جفت از رحم می‌شود (۵). طی انعقاد خون فاکتور ۱۳ با تأثیر ترومبین فعال می‌شود. ترومبین با برش پیوند بین آرژنین ۳۷ و گلیسین ۳۸ در حضور کلسیم، FXIII را فعال می‌کند، بدین ترتیب زنجیره A از B جدا شده و بصورت دایمر A_2 آزاد می‌شود که همان شکل فعال آنزیم است. بنابراین این آنزیم با ایجاد پیوند پپتیدی مابین دو اسید آمینه گلوتامین و لیزین زنجیره گاما فبرین باعث بوجود آمدن اتصالات عرضی در فبرین می‌شود که سبب استحکام آن می‌شود و بدین ترتیب فبرین نسبت به سیستم فبرینولیز مقاومت نشان می‌دهد. واریانت‌های ژنی FXIII روی ساختار فبرین اثر می‌گذارند و در ترومبوز نقش مهمی دارند (۳،۶). فاکتور ۱۳ در جریان خون بصورت هتروترامر دیده می‌شود. شامل دو زیر واحد

کاتالیتیکی (A_2) و دو زیر واحد حامل (B_2) است. بدلیل نقش آنزیمی زیر واحد A، اکثر پلی‌مورفیسم‌ها در این زیر واحد بررسی شده‌اند. شایع‌ترین پلی‌مورفیسم موجود در ژن FXIII تبدیل G به T در اگزون ۲ ژن کدکننده FXIII است که منجر به جایگزینی اسید آمینه والین توسط لوسین می‌شود. واریانت FXIII G103T در غلظت پلازما FXIII تغییر ایجاد نمی‌کند، اما ممکن است تغییر اسید آمینه سبب تغییر فعالیت FXIII شود (۶). محصول واریانت FXIII G103T ساختار فبرینی با الیاف نازک و منافذ کوچک است. در این صورت تجمع الیاف فبرین مختل می‌شود و سبب خون لختگی‌ها در مویرگ‌ها و پرزهای جفتی می‌شود که جزء یافته‌های مورفولوژیکی شایع در سقط‌های مکرر هستند و نشان‌دهنده اختلال در هموستاز طی حمل این پلی‌مورفیسم است (۷). با توجه به اهمیت این فاکتور در مسیر انعقاد خون و عدم بررسی ارتباط پلی-مورفیسم FXIII G103T با سقط جنین در جمعیت شمالغرب کشور، مطالعه حاضر با هدف بررسی همراهی پلی‌مورفیسم FXIII G103T و سقط مکرر با استفاده از تکنیک PCR-RFLP در دو گروه شاهد و کنترل فراهم گردید.

روش کار

در این مطالعه ۷۰ خانم با سابقه حداقل دو سقط مکرر خودبخودی قبل از هفته ۲۴ و با میانگین سنی $32/33 \pm 4/7$ سال که فاقد مشکلات آناتومیکی رحمی، ناهنجاری‌های سیتوژنتیکی، مشکلات هورمونی و ایمونولوژیک بودند، توسط متخصصین زنان و زایمان به مرکز ژنتیک معرفی شدند و همچنین ۵۰ خانم دارای حداقل دو فرزند و بدون سابقه سقط به عنوان گروه شاهد انتخاب شدند. گروه بیمار و کنترل هر دو از زنان منطقه شمالغرب کشور مورد مطالعه قرار گرفتند. به منظور نمونه‌گیری و اجرای طرح، تمامی افراد مورد مطالعه فرم رضایت‌نامه را آگاهانه امضا

۲/۵ میکرولیتر بافر (10X)، ۰/۵ میکرولیتر dNTP ۱۰ میلی مولار، ۰/۹۵ منیزیم ۵۰ میلی مولار، ۰/۱۸ از آنزیم Taq DNA polymerase (10X) و ۳ میکرولیتر از DNA می باشد که با آب مقطر تقطیر کرده و به حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر رسانیده شد. برنامه PCR در ۳۵ چرخه به انجام رسید (دمای واسرشت اولیه ۹۴ به مدت ۵ دقیقه و ثانویه به مدت ۳۰ ثانیه، دمای اتصال پرایمر ۵۸ به مدت ۳۰ ثانیه و دمای تولید سازی ۷۲ به مدت ۳۰ ثانیه و همچنین دمای تولید سازی نهایی به مدت ۵ دقیقه انجام شد). جهت انجام واکنش RFLP، تمام مواد لازم از جمله آب مقطر دوبار یونیزه به حجم ۲/۵ میکرولیتر، بافر اختصاصی آنزیم به حجم ۲/۵ میکرولیتر DdeI و ۰/۳ میکرولیتر آنزیم DdeI را به درون میکروتیوب حاوی محصول PCR اضافه کرده و میکروتیوب ها را به مدت ۲۴ ساعت در بن ماری با دمای ۳۷ درجه قرار می دهند. پس از این مدت محصول تجزیه را در ژل پلی آکرلامید ۱۰٪ الکتروفورز کرده و با اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی می کنند (شکل ۱).

CATGCCTTTTCTGTTGTCTTC

CATGCCTTTTCTGTTGTCTTCTTTTTTTTTTTTTTCTGAAGGACCTTGTAAGTCAAAAATGTCAGA
AACTCCAGGACCGCCTTTGGAGGCAGAAGAGCAGTTCCACCCAATAACTCTAATGCAGCGGAA
GATGACCTGCCACAGTGGAGCTTCAGGGCITGGTGCCCCGGGGCGTCAACCTGCAAGGTA
ATCACGGGGCCCCGCAGTTGGACGTTCCAT

شکل ۱. توالی ژن فاکتور XIIIa در ناحیه پلی مورفیسم، توالی آندرلاین نشانگر توالی پرایمر جلوبرنده و معکوس می باشد.

شکل ۲. جایگاه برش آنزیم DdeI

بدین ترتیب محصول PCR که به اندازه ۱۹۲bp طول دارد توسط این آنزیم به دو قطعه ۱۶۱bp و ۳۱bp تجزیه می شود و قابل ذکر است که قطعه ۳۱ جفت بازی به دلیل هم سایز بودن با قطعه پرایمرها قابل تفکیک از هم نمی باشند. در افراد واجد ژنوتیپ TT دو قطعه ۱۶۱bp و ۳۱bp ایجاد می شود. در صورتی که با وجود آلل G، تنها قطعه ۱۹۲bp ایجاد می شود.

کردند. حجم نمونه بر اساس تعداد نمونه هایی که در دسترس بودند، انتخاب شد.

بررسی ژنتیک

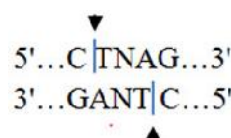
برای بررسی پلی مورفیسم از افراد هر دو گروه به مقدار ۴cc خون در لوله های حاوی EDTA دریافت شد، سپس DNA طبق روش هضم نمکی از لکوسیت های خون استخراج شد. واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR) با استفاده از پرایمرهای اگزون ۲ زنجیره A ژن مورد نظر انجام شده (شکل ۱) و محصول PCR با استفاده از ژل آگارز ۱/۵٪ الکتروفورز کرده و پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید زیر نور UV بررسی شد. مواد مورد استفاده در هر واکنش شامل ۱ میکرولیتر از هر پرایمر جلوبرنده

F:5 CATGCCTTTTCTGTTGTCTTC3

و معکوس

R:5 TACCTTGCAGGTTGACGCCCGGGGCACTA3

برای ایجاد جایگاه برش توسط آنزیم محدود کننده از پرایمر موتاژنز از مقاله جدی و همکاران استفاده شد (۷). از آنزیم محدود کننده DdeI برای مشاهده موتاسیون پلی مورفیسم مورد نظر در ژن FXIIIa استفاده گردید، که در صورت وجود آلل T جایگاه لازم برای عملکرد آنزیم ایجاد می شود (شکل ۲).



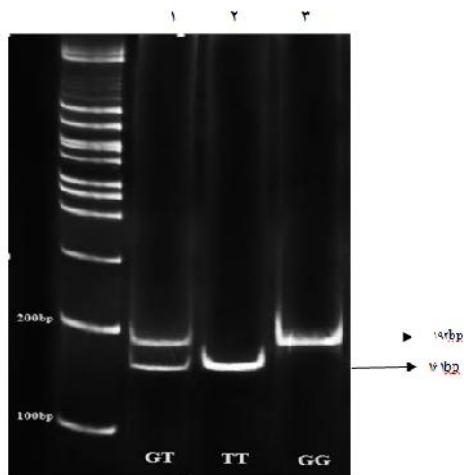
تحلیل آماری

بر اساس نتایج بدست آمده، افراد از نظر پلی مورفیسم G103T ژن FXIIIا به سه گروه GG,GT,TT تقسیم شدند. تفاوت های ژنوتیپی و آلی با استفاده از برنامه 2way contingency آنالیز شد. p -value کمتر از ۰/۰۵ درصد معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته ها

با استفاده از الکتروفورز محصولات RFLP روی ژل آکریل آمید (شکل ۳) نتایج بدست آمده با برنامه 2way contingency مورد بررسی قرار گرفتند. ۱۹ نفر (۲۷/۱٪) از گروه بیمار و ۱۳ نفر (۲۶٪) از گروه کنترل دارای ژنوتیپ هتروزیگوت (GT) بودند. در گروه بیمار ۲ نفر (۲/۸۵٪) دارای ژنوتیپ هموزیگوت (TT) مشاهده شد، در صورتی که ژنوتیپ هموزیگوت TT در گروه شاهد مشاهده نگردید، اما هیچ گونه تفاوت معنی داری بین توزیع پلی مورفیسم G103T در دو گروه بیمار و شاهد مشاهده نگردید.

(جدول ۱). از نظر فراوانی آلی، دو آلل G و T در بین دو گروه کنترل و بیمار، تفاوت معنی داری وجود نداشت (جدول ۲).



شکل ۳: تصویر هضم آنزیمی در افراد با ژنوتیپ های مختلف. ستون ۱ که بعد از ستون مارکر نشانگر قرار گرفته متعلق به یک فرد هتروزیگوت برای GT، ستون ۲ یک فرد هموزیگوت TT و ستون ۳ متعلق به یک فرد با ژنوتیپ GG می باشد.

جدول ۱. فراوانی ژنوتیپ

ژنوتیپ	گروه بیمار (۷۰)		گروه کنترل (۵۰)		p -value	X^2
	درصد	تعداد	درصد	تعداد		
GG	۷۰/۰۵	۴۹	۷۴	۳۷	۰/۵۳۳۷	۰/۳۸۷۱
GT	۲۷/۱	۱۹	۲۶	۱۳	۰/۸۶	۰/۳۱۰
TT	۲/۸۵	۲	۰	۰	۰/۰۸۹	۲/۸۹۱

جدول ۲. فراوانی آلل ها

آلل ها	گروه بیمار		گروه کنترل		p -value	X^2
	درصد	تعداد	درصد	تعداد		
G	۸۳/۶	۱۱۷	۸۷	۸۷	۰/۴۹۷۱	۰/۴۶۰۹
T	۱۶/۴	۲۳	۱۳	۱۳	۰/۴۹۷۱	۰/۴۶۰۹

بحث

پلی مورفیسم G103T FXIIIا در ترومبوفیلی نقش مهمی بر عهده داشته و رخداد این پلی مورفیسم در فاکتور XIII سبب افزایش فعالیت آنزیم

ترنس گلوتامیناز می شود، بدین ترتیب سبب مقاومت شبکه فیبرین نسبت به سیستم فیبرینولیز می شود. به دلیل اهمیت فاکتور XIII در مسیر انعقادی، مطالعات متعددی در رابطه با بررسی پلی مورفیسم G103T و

پلی مورفیسم را در بین زنان مبتلا به سقط مکرر مشاهده کردند (۱۱). اگر این آزمایش در جمعیت‌های مختلف تکرار گردد، ممکن است نتایج متفاوتی بدست آید و این اختلافات ممکن است ناشی از تفاوت‌های نژادی و زمینه ژنتیکی جمعیت و همچنین موقعیت جغرافیایی مورد مطالعه باشد. همچنین می‌توان نقش سایر ژن‌های ترومبوفیلی را همراه با عوامل محیطی در نظر گرفت. بنابراین بدلیل اهمیت فاکتورهای انعقادی بررسی این پلی مورفیسم در افراد مبتلا به سقط مکرر در جمعیت شمالغرب کشور خصوصاً آذربایجان شرقی مطالعه گردید. از محدودیت‌های این طرح می‌توان به تعداد نمونه و نیز در دسترس نبودن نمونه از جمعیت‌های دیگر اشاره کرد.

نتیجه‌گیری

باتوجه به نتایج بدست آمده، ارتباط معنی‌داری بین پلی مورفیسم FXIII G103T و سقط مکرر در جمعیت شمالغرب کشور خصوصاً آذربایجان شرقی مشاهده نگردید.

تشکر و قدردانی

این مقاله نتیجه پایان‌نامه کارشناسی ارشد می‌باشد. نویسندگان این مقاله از تمام کسانی که در انجام این پروژه همکاری و حمایت نمودند، کمال تشکر و قدردانی را دارند.

سقط جنین در جمعیت‌های متفاوت صورت گرفته است. در مطالعه حاضر با وجود اینکه تعداد ژنوتیپ GT و TT در گروه بیمار بیش از گروه کنترل بود، ولی از نظر آماری تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. مطالعات دیگر در جمعیت‌های مختلف نتایج مشابهی با نتایج مطالعه حاضر نشان داده است. در مطالعه‌ای که در جمعیت تهران توسط محمود جدی و همکاران صورت گرفت، شیوع پلی مورفیسم G103T ژن FXIII در افراد بیمار بیش از گروه شاهد گزارش شد ولی تفاوت مشاهده شده از نظر آماری معنی‌دار نبود ($p=0/158$) (۶). در مطالعه دیگری توسط باقری و همکاران بر روی این پلی مورفیسم بین گروه بیمار و کنترل از جمعیت ارومیه تفاوت مشاهده شده از نظر آماری معنی‌دار نبود ($p=0/32$) (۳). در مطالعه ترابی و همکاران نیز هیچگونه ارتباطی بین پلی مورفیسم FXIII G103T و سقط مکرر در جمعیت تهران مشاهده نشد ($p>0/05$) (۸). برخلاف یافته‌های مطالعه حاضر، ینی‌سسو^۱ و همکاران در بررسی جمعیت ترکیه نتایج متفاوتی گزارش کردند و بین این پلی مورفیسم و سقط مکرر ارتباط معنی‌داری پیدا کردند ($p<0/05$) (۹). گودمن^۲ و همکاران طی مطالعات خود در جمعیت شیکاگو بین دو گروه مطالعه شده، ارتباط معنی‌داری مشاهده کردند ($p<0/0001$) (۱۰). همچنین کولام^۳ و همکاران با مطالعه جمعیت شیکاگو افزایش قابل توجهی از این

¹ Yenicesu

² Goodman

³ Coulam

References

- 1- Rull K, Nagirnaja L, Laan M. Genetics of recurrent miscarriage: challenges, current knowledge, future directions. *Frontiers Genet.* 2012 Mar;19(3):34.
- 2- Battinelli B, Marshall A, Connors J. The Role of Thrombophilia in Pregnancy, *Hindawi.* 2013 Dec;2013:1- 9.
- 3- Bagheri M, Abdi Rad I, Omrani M, Nanbaksh F. The Val34Ieu genetic variation in the A Subunit of Coagulation Factor XIII in recurrent spontaneous Abortion. *Syst Biol Reprod Med.* 2011 Oct; 57(5): 261-264.
- 4- Pasquier E, Martin L, Kohler H, Schroeder V. Factor XIII plasma levels in women with unexplained recurrent pregnancy loss. *J Thromb Haemost.* 2012 Apr; 10(4): 723-5.

- 5- Padmanabhan L, Mhaskar R, Mhaskar A, Ross C. Factor XIII deficiency: a rare cause of repeated abortion. *Singapore Med J*. 2004 Apr; 45(4): 186-7.
- 6- Naderi M, Drogaleh A, Tabibian Sh, Alizadeh Sh, Eshghi P, Solaimani GH. Current understanding in diagnosis and management of factor XIII deficiency. *Iran J Ped Hematol oncol*. 2013 Oct;3(4):164-72.
- 7- Jeddi-Tehrani M, Torabi R, Mohammadzadeh A, Arefi S, Keramatipour M, Zeraati H, et al. Investigating Association of Three Polymorphisms of coagulation Factor XIII and Recurrent Pregnancy Loss. *Am J Reprod Immunol*. 2010 Sep; 64(3): 212–217.
- 8- Torabi R, Zarei S, Zeraati H, Zarnani A, Akhondi M, Hadavi R, et al. Combination of Thrombophilic Gene Polymorphisms as a Cause of Increased the Risk of Recurrent Pregnancy Loss. *J Reprod Infertil*. 2012 Apr; 13(2): 89-94.
- 9- Yenicesu GI, Cetin M, Ozdemir O, Cetin A, Ozen F, Yenicesu C, et al. A prospective case-control study analyzes 12 thrombophilic gene mutations in Turkish couples with recurrent pregnancy loss. *Am J Reprod Immunol*. 2010 Feb; 63(2):126–136.
- 10- Goodman CS, Coulam C, Jeyendran R, Acosta V, Roussev R. Which Thrombophilic Gene mutation are Risk Factors for Recurrent Pregnancy loss. *Am J Reprod Immunol*. 2006 Oct; 56(4): 230-236.
- 11- Coulam CB, Jeyendran RS, Fishel LA, Roussev R. Multiple thrombophilic gene mutations rather than specific gene mutations are risk factors for recurrent miscarriage. *Am J Reprod Immunol*. 2006 May; 55(5):360–368.