

Hepatit C Virüsü Genotip Dağılımı ve 5' UTR Nükleotid Değişiklikleri

Genotype Distribution and 5' UTR Nucleotide Changes in Hepatitis C Virus

Tekin Karslıgil¹, Eda Savaş¹, M. Cemil Savaş²

¹Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tibbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Gaziantep, Turkey

²Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi, Gastroenteroloji Bilim Dalı, Gaziantep, Turkey

ÖZET

Amaç: HCV, tek zincirli 9500 nükleotid uzunluğunda bir RNA virusudur. Genomun 3' ve 5' uclarında oldukça korunmuş ve farklı HCV tipleri arasında %92 oranında homoloji gösteren iki adet translasyona uğramayan bölge (untranslated region=UTR) bulunmaktadır. 5'UTR bölgesi genotip saptanmasında kullanılmaktadır. Çalışmada genotip ve bu bölgedeki nükleik asid değişiklikleri araştırılmıştır.

Gereç ve Yöntemler: HCV tanısı almış 51 hastanın serumunda HCV RNA ekstraksiyonu ve pürifikasyonu yapılmıştır. Genomun 5'uncundaki 341 nükleotid uzunluğundaki UTR bölgesinin sekans analizi yapılmış ve HCV genotipleri saptanmıştır. On-line BLAST programı kullanılarak elde edilen dizilerdeki nükleotid değişiklikleri araştırılmıştır.

Bulgular: Ellibir hastanın 45'inde (%88.2) genotip 1 (tüm genotiplerin %78.4'ü 1b, %9.8'i 1a) saptanmıştır. Dizilerin 41'inde (%80.4) nükleik asit değişiklikleri belirlenmiştir. Bu değişiklikler genellikle 84. kodonda inserisyon, 43. ve 46. kodonlarda delesyon, 15., 17. ve 18. kodonlarda transverzisyon, 62. kodonda ise transisyon şeklinde görülmektedir. Nükleik asit değişiklikleri ile viral yük arasında anlamlı bir ilişki bulunmamıştır.

Sonuç: 5'UTR bölgesi korunmuş bölge olmasına rağmen bu bölgede mutasyonlar görülebilmektedir ve bu mutasyonlar genotipi, viral yük ve tedavi cevabını etkileyebilir. Bu nedenle geniş serilerde ileri araştırmalara gereksinim vardır.

Anahtar Sözcükler: HCV, Genotip, 5'UTR nükleotid değişiklikleri

Geliş tarihi: 30.03.2010

Kabul tarihi: 21.07.2010

ABSTRACT

Objective: HCV is a single-stranded RNA virus which has 9500 nucleotide. On the 3' and 5' ends of the genome, there are two untranslated regions (UTR) which are highly protected and which have 92% homology among various HCV types. 5' UTR is used for the genotype detection. In this study, genotype and nucleic acid changes in this region were analyzed.

Material and Methods: In 51 patients diagnosed with HCV, HCV-RNA was isolated and purified from serum samples. The 341 nucleotide-long UTR region at the 5'end of the genome was sequenced and genotypes were detected. Nucleotide changes were analyzed with on-line BLAST program.

Results: In 45 (88.2%) of 51 patients, genotype-1 (78.4% of all genotypes were 1b, 9.8% were 1a) was detected. In 41 (80.4%) of the 51 sequences, nucleic acid changes were detected. These changes generally occurred as an insertion in codon 84 ; deletion in codon 43 and codon 46; transversion in codon 15, 17 and 18, and transition in codon 62. No significant relationship was found between viral load and nucleic acid changes.

Conclusion: Although the 5'UTR region is a protected region, mutation can be observed, and the mutations may affect the genotype, viral load and treatment response. Therefore, further investigation is required in a large series.

Key Words: HCV, Genotyping, 5' UTR nucleotide changes

Received: 30.03.2010

Accepted: 21.07.2010

Giriş

Hepatit C Virüs (HCV) enfeksiyonu, kronik hepatit, karaçığer sirozu ve karaciğer kanserine yol açabilen önemli bir sağlık sorunudur. Dünyada 130-170 milyon kişinin hepatit C virüsü (HCV) ile infekte olduğu ve prevalansın yaklaşık %2.2-3 arasında olduğu tahmin edilmektedir (1). Ülkemiz dünya haritasında prevalansı %1-1.9 arasında olan ülkeler içinde yer almaktadır (2).

Hepatit C Virüsü, Hepacivirüsler genusunda Flaviviridae ailesinde yaklaşık 40-50 nm çapında, dışta lipid zarf taşıyan bir virüstür (3, 4). HCV'nin genomu tek zincirli pozitif sens bir RNA moleküldür. Yaklaşık 9500 baz uzunluğundadır ve tek bir protein kodlayıcı bölge, open reading frame (ORF) içerir. ORF ge-

nomen büyük bir kısmını kapsamaktadır ve yaklaşık 3010 aminoasit uzunluğunda bir poliproteini kodlar. HCV genomunun her iki ucunda (5' ve 3') ise ürüne dönüşmeyen (untranslated region, 5'UTR, 3'UTR) bölgeler bulunmaktadır (3, 5).

Hepatit C viruslarında görülen yüksek mutasyon potansiyeli sayesinde fenotip kısa sürede değişebilir. Bunun biyolojik etkileri, konak savunmasından kaçan mutasyonların oluşması, hücre tropizmine ve virulansta değişiklik ve antiviral ajanlara direnç şeklinde olabilir. Virus-konak ilişkilerinde etkili olabilecek genotipler ve mutasyonlar hakkında daha detaylı bilgilerin elde edilebilmesi için ileri moleküler ve klinik çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır (3).

HCV genomunun 5' UTR bölgesi HCV şüsları arasında çok yüksek düzeyde homoloji gösteren ve nispeten korunmuş

bir bölge olup hala kullanılan rutin tanı kitlerinin çoğunda hedef bölge olarak kabul edilmektedir. 5' UTR bölgesi, viral genomun ökaryotik ribozomun 40S alt ünitesine bağlanarak translasyonunu sağlayan bir bölgedir. HCV genomunun 5' UTR bölgesinde bu bağlanmayı sağlayan kısım "internal ribosomal entry site (IRES)" olarak adlandırılmaktır ve başlangıçtaki 29 nükleotid hariç, 5' UTR'nın tamamı bu işlevde yer almaktadır. Buna karşılık ilk 23 nükleotidin, translasyonu baskılacak rolü olduğu sanılmakta ve bu bölgenden gelecekte antivirallere uygun bir hedef oluşturabileceğinden düşünülmektedir (6).

Genotip ve mutasyonlar kronik hepatit C'li hastaların klinik gidişini etkilemeye ve interferon tedavisine cevabı etkileyen en önemli parametreleri oluşturmaktadırlar. 5' UTR bölgesindeki sınırlı mutasyonların da genotip üzerine ve virüsün ribozoma bağlanması, dolayısıyla viral yük etkisi bulunabilir. Çalışmada HCV kaynaklı kronik hepatitli hastalarda genotip dağılımının saptanması ve 5' UTR bölgesinde olabilecek nükleotid değişikliklerinin araştırılması planlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

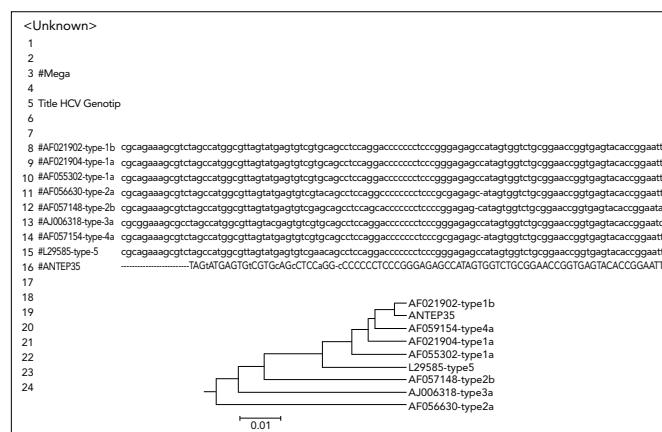
Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Gastroenteroloji bölümünde başvurarak anti HCV ve HCV PCRlarının pozitif olması nedeniyle HCV enfeksiyonu tanısı almış yaş ortalaması 50.0 ± 8.6 olan 26'sı kadın 25'i erkek olmak üzere toplam 51 hasta çalışmaya alındı. Hastaların HCV genotipleri belirlenerek 5' UTR bölgesi nükleotid değişiklikleri araştırıldı.

Her hastadan 10 ml periferal venöz kan örneği alınarak serumları ayrıldı ve çalışılınca kadar -20°C 'de saklandı. Örneklerdeki RNA'lar, HCV RNA Ekstraksiyon kiti (Invisorb® INSTANT Spin DNA/RNA Virus Mini Kit, INVITEC, Germany) kullanılarak ve üretici firmanın önerileri doğrultusunda elde edildi. Her RNA örneği, istenilen dizinin amplifikasyonunu sağlayacak primer seti ile (Invisorb Spin PCRapid, Invitac, Germany) çoğaltıldı. ABI 310 Genetik Analizör (Applera Corp. US) kullanılarak HCV genotipleri saptandı. Genotiplendirme ve sekans çalışması için önce Invisorb Spin PCRapid Kiti kullanılarak HCV genotipleri saptandı. Genotiplendirme ve sekans çalışması için önce Invisorb Spin PCRapid Kiti kullanılarak (Invitac, Germany) PCR ürünü pürifiye edildi. The Big Dye Terminatör v3.1 Cycle Sequencing Kit ile PCR hazırlandı. Cycle Sequencing aşamasında Forward (P14) ve Reverse(P12) primerleri kullanıldı. NaAc ile tekrar pürifikasyonu takiben ABI 310 cihazında sonuçlar elde edildi. Genotiplendirme, bilgisayarında MEGA programı kullanılarak yapıldı ve 250-300 bazlık dizilerin mevcut dizilerle karşılaştırılması sonucu genotipler belirlendi (Şekil 1). Nükleotid analizi, elde edilen dizilerin HCV sequence database internet sitesindeki HCV BLAST SEARCH programı kullanılarak yapıldı (Şekil 2). Nükleik asit değişiklikleri üçlü kodonlar halinde araştırıldı ve İnsersyon, delesyon, transisyon, transversiyon şeklinde değerlendirildi. (http://hcv.lanl.gov/content/hcv-db/BASIC_BLAST/basic_blast.html)

Istatistiksel değerlendirmelerde SPSS 11.0 programı ile Student t testi uygulandı. $p < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Bulgular

Genotipleme yapılan 51 hastanın 45'inde (%88.2) genotip 1 saptandı (Tablo 1). BLAST programına yüklenen dizilerde



Şekil 1. Mega programında 35. hastanın genotiplemesi

Z84257 HCV I PATIENT 1-1989-2 | seid 14590 | 1b | GB | 1989 | Hepatitis C virus 5' noncoding region (patient 1, 1989, clone 2). length = 251

Score = 315 bits (198), Expect = $5e^{-86}$
Identities = 204/214 (95%)
Strand : Plus / Plus

Query: 9	gtntnctganagctcngacccccctccgggagagccatagtggctcgccgAACCGG
Sbjct: 38	gtgtcgtcgcgcctccaggacccccctccgggagagccatagtggctcgccgAACCGG
Query: 69	ttagtacaccggattgcaggacgcgggtcccttctggattaacccgctcaatgcc
Sbjct: 98	ttagtacaccggattgcaggacgcgggtcccttctggattaacccgctcaatgcc
Query: 129	tggagttggcgtgccccgcgactgtccggactgttgggtcgccgaaaggc
Sbjct: 158	tggagttggcgtgccccgcgactgtccggactgttgggtcgccgaaaggc
Query: 189	cttgtgtactgcctgatagggtgctcgagatg
Sbjct: 218	cttgtgtactgcctgatagggtgctcgagatg

Şekil 2. Blast Programında nükleotid analiz sonucu

Tablo 1. HCV infeksiyonlu hastalarda genotip dağılımı

Genotip	Hasta (n=51)	%
1a	5	9.8
1b	40	78.4
2a	4	7.8
3a	1	2
4c	1	2

41 olguda (%80.4) nükleik asit değişiklikleri saptandı. Dizilerin 20'sinde insersyon, 16'sında delesyon, 14'ünde transversiyon, 17'sinde transisyon tipi nükleik asid değişikliği saptandı. Nükleik asit değişiklikleri genellikle 84. kodonda insersyon, 43. ve 46. kodonlarda delesyon, 15., 17. ve 18. kodonlarda transversiyon, 62. kodonda ise transisyon şeklinde saptandı (Tablo 2). Nükleik asit değişikliği saptanınlarla saptanmayanlar arasında viral yük araştırıldığından anlamlı bir ilişki görülmeli ($p > 0.05$) (Tablo 3).

Tartışma

HCV genotip dağılımı dünya üzerinde coğrafik bölgelere göre farklılık göstermektedir. Bazı HCV genotipleri tüm dünyada yaygın olarak bulunurken bazı tipler belirli bölgelerde daha sık görülmektedir. Kuzey ve Güney Amerika, Avrupa ve

Tablo 2. HCV Genomlarında saptanan Nükleik asit değişikliklerinin bölgelere ve hastalara göre dağılımı

Hasta	İnsersiyon	Delesyon	Transversiyon	Transisyon
1	81. kodon			62. kodon
2			15., 17., 18. kodon	18. kodon
3	84. kodon			47., 62. kodon
4		8. kodon	7. kodon	
5	84. kodon			62. kodon
6	84. kodon			62. kodon
7	84. kodon			62. kodon
8	66. kodon		10. kodon	
9	Mutasyon yok			
10		26., 32., 48. kodon		
11	Mutasyon yok			
12	52. kodon	17. kodon		
13	25. kodon		4. kodon	
14	84. kodon			62. kodon
15	Mutasyon yok			
16		8. kodon	7. kodon	
17			15., 17., 18. kodon	18. kodon
18			15., 17., 18. kodon	
19		43,109. kodon		
20		46. kodon		
21		46. kodon		
22		43,109. kodon		
23		43,109. kodon		
24		43,109. kodon		
25	92.-93. kodon			
26		43,109. kodon		
27	19. kodon		18. kodon	
28	84. kodon			62. kodon
29	84. kodon			62. kodon
30		43,109. kodon		
31	84. kodon			62. kodon
32	84. kodon			62. kodon
33	84.kodon			62. kodon
34		46. kodon	15. kodon	
35		28. kodon		
36		28. kodon		
37	Mutasyon yok			
38			15., 17., 18. kodon	
39	84. kodon			62. kodon
40		46. kodon		
41	19. kodon		18. kodon	
42	Mutasyon yok			
43	Mutasyon yok			
44			373-375. kodon	366. kodon
45			53.-58. kodon	54.-55. kodon
46	81. kodon			62. kodon
47	54. 62. ve 66. kodon		50. kodon	
48	Mutasyon yok			
49	Mutasyon yok			
50	Mutasyon yok			
51	Mutasyon yok			

Tablo 3. Nükleik asit değişikliği ile viral yük arasındaki ilişki

Nükleik Asit değişikliği	Nükleik Asit değişikliği saptananlarda viral yük	Nükleik Asit değişikliği saptanmayanlarda viral yük	p değeri
İnsersiyon	532 625.0 ± 405479.2	768 913.0 ± 102119.2	0.387
Delesyon	722 400.0 ± 1071132.6	654 586.2 ± 745827.4	0.826
Transversiyon	1 077 909.0 ± 1402811.7	512 500.0 ± 371774.6	0.053
Transisyon	614 666 ± 707791	414 777 ± 1009665	0.737

Japonya'da HCV enfeksiyonunun %90'dan fazlası 1a, 1b, 2a, 2b, 2c, 3a subtipleri ile oluşmaktadır (7, 8). Amerika Birleşik Devletlerinde 1a ve 1b eşit olmak üzere genotip 1, %70'lik bir kısmı oluşturur. Japonya'da genotip 1b HCV enfeksiyonlarının %70'den fazmasını oluşturmaktadır (9). Türkiye'de yapılan HCV genotip çalışmalarında HCV infeksiyonlarının yaklaşık %90'ı genotip 1 olarak bulunmuştur, bunların da büyük çoğunluğu tip 1b olup, tip 2, 3 ve 4 HCV infeksiyonlarına da daha az sıklıkla rastlanmaktadır (10-15).

HCV genomunda çeşitli mutasyonlar görülmekte ve buna bağlı türümüler (Quasispecies) ortaya çıkmaktadır. Bunlar arasında NS5A bölgesinin değişik kısımlarındaki viral mutasyonların interferon tedavisine yanıtını etkilediğini iddia eden çeşitli çalışmalar bulunmaktadır (16).

Çalışmamızda 5'UTR (UTR: Untranslated Region) bölgesi mutasyonları araştırılmıştır. Bu bölge genomun başlangıcında bulunan 341 nükleotidlik bir bölge olup oldukça korunmuş bir bölgedir. Bu nedenle tanı amaçlı moleküler testler ve genotipleme genellikle bu bölgede ve farklı metodlarla (Sequencing, RFLP, İnno LiPA) yapılmaktadır. Bu bölgenin farklı HCV tiplerinde %92 homoloji gösterdiği belirtilmektedir. 5'UTR bölgesinde görülebilecek nokta mutasyonlarının %10'un üzerindeki olguda yanlış genotiplemeye neden olacağı belirtilmektedir (5). Bu nedenle çalışmada saptanan mutasyonlar genotipi değiştirebilir ve tedavi yanıtını etkileyebilir. 5'UTR bölgesi Internal Ribosomal Entry Site (IRES) adı verilen ve replikasyonun başlangıcında görev alan translasyonu başlatan bir bölge içerir (17). Yeni tedavi alternatifleri geliştirme çalışmalarında 5' UTR bölgesi ve IRES kısmını inhibe eden RNA molekülleri geliştirilmiş ve bu bölgenin inhibisyonunun potent antiviral etkisi gösterilmiştir (18). Laporte ve ark. (19) bir hastadaki farklı 5' UTR ve IRES bölgesi mutasyonlarının ve oluşan türümülerinin *in vitro* ve *in vivo* hücre kültürlerinde HCV RNA translasyon fonksiyonunu etkilediğini göstermişlerdir. Mısır'da yapılan bir çalışmada 5' UTR bölgesinin mutasyonlarının tedaviye etkisi araştırılmış, özellikle transisyon tipi mutasyonların tedavi cevabı olan hastalarda daha az olduğu saptanmıştır. Bu çalışmada 160. kodondaki G'den A'ya oluşan transisyonla ileri araştırmalar için dikkat çekilmiştir (20). Çalışmamızda 160. kodonda transisyon tipi mutasyon saptanmamıştır. Bununla birlikte 13 hastada 62. kodonda transisyon tipi mutasyon görülmektedir. Yine 11 hastada 84. kodonda insersiyon, 6 hastada 43. kodonda delesyon saptanmıştır. Ancak, bu değişikliklerin tedavi yanıtını nasıl et-

kileceği araştırılmamıştır. 5' UTR ve IRES bölgesinin mutasyonlarının tedavi yanıtını etkilemesi konusunda literatürde çelişkili sonuçlar mevcuttur. Bazı çalışmalarla 5'UTR bölgesinin mutasyonlarının tedavi cevabını olumlu etkilediği belirtilirken (20, 21), bazlarında ise bu bölgede görülen mutasyonlarla tedavi arasında bir ilişki saptanmamıştır (22, 23).

Çalışmamızda Avrupa kaynaklı ve ülkemizden yapılan çalışmalarla uyumlu olarak baskın genotip olarak genotip 1b bulunmuştur. Görülen mutasyonların viral yüke etkisi saptanmamıştır ($p > 0.05$). 5'UTR bölgesinin korunmuş bölge olmasına rağmen mutasyon görülebilen bir bölge olması ve bu bölge mutasyonlarının genotipi etkileyebileceğinin düşünüldüğünde tip tayininde, genomda farklı bölgelerin de bu bölgeyle birlikte araştırılması uygun olacaktır. Ayrıca bu bölge nokta mutasyonlarının translasyonda nasıl etkili olduğunu, viral yük ve tedavi cevabının geniş serilerle ileri araştırmala ihtiyacı vardır.

Çıkar Çatışması

Yazarlar herhangi bir çıkar çatışması bildirmemiştir.

Kaynaklar

1. Lavanchy D. The global burden of hepatitis C. Liver Int 2009;29:74-81. [\[CrossRef\]](#)
2. Hüseyin Şener Barut, Özgür Günal. Dünyada ve Ülkemizde Hepatitis C Epidemiyolojisi. Klinik Dergisi 2009;22:38-43.
3. Shuhart MC, Gretch DR. Hepatitis C and G Viruses, Patrick Murray edt. Manuel of Clinical Microbiology 2003;2:1480-94.
4. Davis GL. Hepatitis C virus genotypes and quasispecies. Am J Med 1999;107:21-6. [\[CrossRef\]](#)
5. Pawlotsky JM. Virology of hepatitis B and C viruses and antiviral targets. J Hepatol 2006;44:10-3. [\[CrossRef\]](#)
6. Glenn JS. Molecular virology of the hepatitis C virus: implication for novel therapies. Infect Dis Clin North Am 2006;20:81-98. [\[CrossRef\]](#)
7. Bartenschlager R. The hepatitis C virus replicon system: from basic research to clinical application. J Hepatol 2005;43:210-6. [\[CrossRef\]](#)
8. Ogata N, Alter HJ, Miller RH, Purcell RH. Nucleotide sequence and mutation rate of the H strain of hepatitis C virus. Proc Natl Acad Sci USA 1991;88:3392-6. [\[CrossRef\]](#)
9. Domíati-Saad R, Scheuermann RH. Nucleic acid testing for viral burden and viral genotyping. Clin Chim Acta 2006;363:197-205. [\[CrossRef\]](#)
10. Smith DB, Simmonds P. Review: Molecular epidemiology of hepatitis C virus. J Gastroenterol Hepatol 1997;12:522-7. [\[CrossRef\]](#)
11. Altindis M, Yilmaz S, Dikengil T, Acemoglu H, Hosoglu S. Sero-prevalence and genotyping of hepatitis B, hepatitis C and HIV among healthy population and Turkish soldiers in Northern Cyprus. World J Gastroenterol 2006;12:6792-6.
12. Selcuk H, Kanbay M, Korkmaz M, Gur G, Akcay A, Arslan H, et al. Distribution of HCV Genotypes in Patients with End-Stage Renal Disease According to Type of Dialysis Treatment. Dig Dis Sci 2006;51:1420-5. [\[CrossRef\]](#)
13. Abacioglu YH, Davidson F, Tuncer S, Yap PL, Ustacelebi S, Yulug N, et al. The distribution of hepatitis C virus genotypes in Turkish patients. J Viral Hepat 1995;2:297-301. [\[CrossRef\]](#)
14. Bozdayı G, Rota S, Verdi H, Derici U, Sindel S, Bali M, et al. The presence of hepatitis C virus (HCV) infection in hemodialysis patients and determination of HCV genotype distribution. Mikrobiyol Bul 2002;36:291-300.

15. Yildiz E, Oztan A, Sar F, Pinarbasi E, Cetin-Atalay R, Akkiz H, et al. Molecular characterization of a full genome Turkish hepatitis C virus 1b isolate (HCV-TR1): a predominant viral form in Turkey. *Virus Genes* 2002;25:169-77. [\[CrossRef\]](#)
16. Hofmann WP, Zeuzem S, Sarrasin C. Hepatitis C virus-related resistance mechanisms to interferon alpha-based antiviral therapy. *J Clin Virol* 2005;32:86-91. [\[CrossRef\]](#)
17. Jubin R. Hepatitis C IRES: translating translation into a therapeutic target. *Curr Opin Mol Ther* 2001;3:278-87.
18. Kanda T, Steele R, Ray R, Ray RB. Small interfering RNA targeted to hepatitis C virus 5' nontranslated region exerts potent antiviral effect. *J Virol* 2007;81:669-76.
19. Laporte J, Malet I, Andrieu T, Thibault V, Toulme JJ, Wychowski C, et al. Comparative analysis of translation efficiencies of hepatitis C virus 5' untranslated regions among intraindividual quasi-species present in chronic infection: opposite behaviors depending on cell type. *J Virol* 2000;74:10827-33. [\[CrossRef\]](#)
20. Zekri AR, El-Din HM, Bahnassy AA, Khaled MM, Omar A, Fouad I, et al. Genetic distance and heterogeneity between quasispecies is a critical predictor to IFN response in Egyptian patients with HCV genotype-4. *Virol J* 2007;4:1-12. [\[CrossRef\]](#)
21. Suzuki K, Shinzawa H, Kuboki M, Ishibashi M, Yoshii E, Saito T, et al. Secondary structure of the hepatitis C virus 5' untranslated region and efficacy of interferon therapy for chronic hepatitis C. *Liver* 1998;18:331-6. [\[CrossRef\]](#)
22. Thelu MA, Drouet E, Hilleret MN, Zarski JP. Lack of clinical significance of variability in the internal ribosome entry site of hepatitis C virus. *J Med Virol* 2004;72:396-405. [\[CrossRef\]](#)
23. Soler M, Pellerin M, Malnou CE, Dhumeaux D, Kean KM, Pawlotsky JM. Quasispecies heterogeneity and constraints on the evolution of the 5' noncoding region of hepatitis C virus (HCV): relationship with HCV resistance to interferon-alpha therapy. *Virology* 2002;298:160-73. [\[CrossRef\]](#)