● مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی بابل، سال چهارم، شمارهٔ ۳ (پی‌درپی۱۵)، صفحه ۱۲ الی ۱۶، تابستان ۱۳۸۱

خالص سازی ایمونوگلوبولینهای سرم انسان با روش کروماتوگرافی تیوفیلیک (T-gel)

دکتر مهدی پورامیر[۱*]، صغری اسدالهی دباغ [۲]، بتول پاک نژاد[۲]

۱- استادیار گروه بیوشیمی دانشگاه علوم پزشکی بابل ۲- دانشجوی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی بابل

سابقه و هدف: آنتی‌بادیهای انسانی که با هزینه زیاد تهیه می‌شود در تشخیص، پیشگیری و درمان بیماریها کاربرد دارد. هدف از این تحقیق، طراحی و راه‌اندازی روشی مؤثر و کم‌هزینه برای تخلیص ایمونوگلوبولین‌های سرم انسان می‌باشد.

مواد و روشها: ایمونوگلوبولین‌های سرم انسان با سولفات آمونیوم (۵۰٪ اشباع) رسوب داده شد و به دنبال آن خالص‌سازی با کروماتوگرافی تیوفیلیک انجام شد. خلوص آنتی بادیها با روش الکتروفورز استات سلولز ارزیابی شد. غلظت آنتی‌بادیها (IgG، IgM و IgA) در سرم و Pool فراکسیونهای محصول با روش ایمونودیفوزیون شعاعی یکطرفه (SRID) اندازه‌گیری شد و درصد بازیافت محاسبه گردید.

یافته‌ها: آنالیز محصولات در الکتروفورز استات سلولز نشانگر وجود فقط یک باند در ناحیه گاما بود. بازیافت ایمونوگلوبولین G، ۷۵٪ بود، در حالیکه میزان بازیافت IgM بطور بارزی کمتر (حدود ۱۷٪) محاسبه شد.

نتیجه‌گیری: ایمونوگلوبولین‌های خالص به همراه بافر با غلظت نمکی کم و PH حدود PH خنثی جدا گردید، پس نیازی به پردازش محصول نمی‌باشد، کروماتوگرافی تیوفیلیک موجب سهولت تخلیص ایمونوگلوبولینها در یک مرحله بعد از رسوبدهی با سولفات آمونیوم می‌شود. ایمونوگلوبولینهای خالص شده در این تحقیق برای روشهای ایمونوشیمیایی مناسب است.

واژه‌های کلیدی: *خالص سازی، ایمونوگلوبولین، سرم انسان، ژل تیوفیلیک.*

مقدمه

ایمونوگلوبولین‌ها براساس تفاوت در ساختمان نواحی ثابت (C) زنجیره سنگین به کلاسها و زیر کلاسهای مختلفی دسته‌بندی می‌شوند. کلاسهای مولکولهای آنتی بادی عبارتند از IgA، IgD، IgE، IgG، IgM. در انسانها IgG و IgA به زیر کلاسهای IgG1، IgG2، IgG3 ، IgG4، IgA1 و IgA2 دسته‌بندی می‌شوند (۲و۱). روشهای خالص‌سازی ایمونوگلوبولین G عبارتست‌از رسوبدهی گزینشی با سولفات آمونیوم یا سولفات سدیم (۴و۳)، کروماتوگرافی مبادله یونی، کروماتوگرافی مبادله یونی FPLC/HPLC(۵)، پروتئینهای L,G (۸-۶) کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون (۶و۳)، کروماتوگرافی گرایشی روی ستونهای لیگاند ـ آنتی‌ژن(۹) و کروماتوگرافی تیوفیلیک (T-gel) (۱۲-۱۰). رسوبدهی با پلی‌اتیلن گلیکول (PEG) (۳) و کروماتوگرافی ژل‌فیلتراسیون(۱۳) در خالص‌سازی IgM کاربرد دارد. برای خالص سازی IgA از رسوبدهی با سولفات آمونیوم بهمراه کروماتوگرافی مبادله یونی و کروماتوگرافی

▣ هزینه انجام این پژوهش در قالب طرح تحقیقاتی شماره ۱۳۸۰۶ از اعتبارات معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی بابل تأمین شده است.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1381.4.3.2.2]

روی Jacalin ثابت استفاده می‌شود(۱۵و۱۴). کروماتوگرافی گرایشی برای تخلیص IgE و IgD پیشنهاد شده است (۱۷و۱۶). برای تائید تخلیص ایمونوگلوبولین‌ها از انواع روشهای ایمونوشیمیایی نظیر ایمونودیفوزیون شعاعی یکطرفه (SRID)، ایمونودیفوزیون دو طرفه (DID)، ایمونوالکتروفورز، Western blott و نیز از انواع روشهای الکتروفوز نظیر الکتروفورز استات سلولز و SDS-PAGE[1] استفاده می‌شود(۱۹و۱۸).

فرآورده‌های ایمونوگلوبولین سرم انسان در انواع روشهای ایمونوشیمیایی جهت تستهای کیفی و کمی کاربرد دارد. فرآورده‌های ایمونوگلوبولین برای اولین بار در دهه ۱۹۵۰ میلادی جهت درمان استفاده شد که ابتدا فقط برای تزریق داخل عضلانی (im) طراحی شده بود و به دلیل درد ناشی از تزریق، جذب erratic و واکنشهای آنافیلاکسی کاربرد محدودی داشت. ایمونوگلوبولین جهت تزریق درون وریدی (IVIG) در سال ۱۹۸۰ در آمریکا مجاز شناخته شد.

اخیراً اندیکاسیونهای مشخص جهت تجویز IVIG توسط FDA تأیید شده است که اختلاف ضعف ایمنی اولیه، لوکمی لمفوسیتی مزمن، پورپورای ترومبوسیتوپنی ایدیوپاتیک و بیماری کاواساکی را شامل می شود. IVIG مصارف درمانی دیگری نیز دارد که تعدادی از آنها در مراحل اولیه آزمایش و تأیید قرار دارد(۲۱و۲۰).

ایمونوگلوبولین برای کاربرد درون وریدی از سرم انسانی (pool سرم) که حاصل خونگیری از حداقل۱۰۰۰ نفر اهداء کننده خون است، خالص می‌گردد. خون این افراد از نظر وجود ویروسهای HIV، HBV،HCV آزمایش می‌شود. محصول باید دارای حداقل۹۰ ٪ IgG سالم و دارای زیر کلاسهای IgG در غلظت فیزیولوژیک و نیز دارای کمپلمان خوب‌وتوانایی اپسونیزاسیون مناسب باشد. بعلاوه آلودگیهایی نظیر آنزیم‌های وازواکتیو، مجتمع‌های پروتئینی، IgA، اندوتوکسین‌ها و عوامل عفونی باید در طی روند تولید حذف شوند(۲۳و۲۲).

این تحقیق بمنظور طراحی و راه‌اندازی روشی ساده و با راندمان زیاد برای تخلیص ایمونوگلوبولینهای سرم انسان در شرایط آزمایشگاه با تجهیزات و هزینه کم و در حداقل زمان ممکن، انجام شده است.

1.Sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel elrctrophoresis

مواد و روشها

ژل استات سلولز، پودر تریس، سفاروز CL-4B ، دی وینیل سولفون (DVS)، ۲- مرکاپتواتانول (2ME)، محلول رنگی پانسو S، محلولهای رنگبر و شفاف ساز، سرم استاندارد از شرکتهای سیگما، مرک و بیوژن.

پلیت‌هایSRID برای اندازه‌گیری غلظت IgG، IgM و IgA (بیوژن)، خطاکش مخصوصSRID (بیوژن)، سانتریفوژ (Clements-2000)، الکتروفورز الفور برای ژل استات سلولز، ستونهای کروماتوگرافی، اسپکتروفتومتر U-Vis (cecil)، همزن مغناطیسی، همزن چرخشی (Shaker) ، PH متر (Suntex) ،

رسوبدهی گزینشی با سولفات آمونیوم

۱/۸ گرم سولفات آمونیوم به ml ۴ سرم انسانی تهیه شده از یک فرد ظاهراً سالم افزوده شد (محلول ۵۰٪ اشباع) ظرف حاوی سرم را در حمام یخ قرار داده و با همزدن متوالی، نمک به سرم اضافه شد تا حدی که کف تولید نشده و پروتئینها بتدریج رسوب کنند. مخلوط حاصله به مدت ۲۰ دقیقه در rpm ۳۵۰۰ سانتریفوژ شد و رسوب در بافر TBS (PH=۷/۳) حل گردید.

کروماتوگرافی تیوفیلیک (T-gel)

کروماتوگرافی تیوفیلیک بر اساس روش Scoble ، Scops (۱۲و۱۱) و با کمی تغییرات انجام شد:ml ۱/۷ از ژل سفاروز CL-4B را در ml ۱/۷ از محلول کربنات سدیم (PH۱۲ ،۰/۵ M) سوسپانسیه کرده و بعد از افزودن µl ۱۶۰ دی وینیل سولفون به مدت ۶ ساعت در دمای آزمایشگاه با همزن (shaker) همزده شد. ژل فعال شده را باکربنات سدیم (PH۱۱ ،۰/۵ M) شستشو داده و حجم سوسپانسیون با کربنات سدیم (PH۱۱) به ml ۳/۴ رسید. در مرحله بعد با افزودن µl ۶۰ ۲- مرکاپتو اتانول به مدت یکساعت در دمای آزمایشگاه همزده شد. ژل آماده شده را در ستون با ابعاد cm ۰/۵۵× ۵ ریخته و حجم نهایی ژل حدود ml ۱/۶ شد. ژل با بافر TBS دارای سولفات سدیم (M ۰/۵) به تعادل رسید و جذب نوری محلول خروجی در طول موج nm ۲۸۰ خوانده شد، عبور بافر تا $A_{۲۸۰}$=۰ ادامه یافت.

محلول بدست آمده در پایان مرحله رسوبدهی با سولفات آمونیوم از ستون عبور داده شد و در مراحل بعدی به ترتیب TBS

[DOR: 20.1001.1.15614107.1381.4.3.2.2]

دارای سولفات سدیم (۰/۵ M) و TBS بدون سولفات سدیم از ستون عبور داده شد و جذب محلول خروجی در طول موج۲۸۰ nm خوانده شد.

الکتروفورز استات سلولز

الکتروفورز استات سلولز در PH=۸/۶ به مدت ۴۰ دقیقه و با ولتاژ ثابت۲۴۰V با سیستم الفور انجام شد و برای رنگ‌آمیزی پروتئینها از پانسو S استفاده گردید. بعد از رنگ‌آمیزی، رنگبری و شفاف‌سازی انجام شد.

ایمونودیفوزیون شعاعی یکطرفه (SRID)

از پلیت‌های SRID (بیوژن) جهت اندازه‌گیری غلظت IgG، IgM ، IgA سرم و pool پیک دوم بعد از کروماتوگرافی T-gel استفاده شد. در پلیت‌های IgG ، تمامی نمونه‌ها و استانداردها رقیق شده (۱/۱۰) و سپس ۲µl از هر محلول در حفره مربوطه ریخته شد. حجم نمونه‌ها و استانداردها در مورد IgM و IgA به ترتیب ۵µl و ۲µl (رقیق نشده) بود. درب پلیت را بسته و بعد از پنج دقیقه پلیت را به صورت وارونه بر روی یک سطح تراز در دمای حدود ۲۴-۲۰ درجه قرار داده به مدت ۷۲ ساعت انکوبه گردید.

رسم منحنی استاندارد و تعیین غلظت ایمونوگلوبولین‌های سرم و محصول کروماتوگرافی

قطر حلقه‌های رسوبی مربوط به استانداردها و نمونه‌ها با خطکش مخصوص SRID با دقت اندازه‌گیری ۰/۱ میلی‌متر تعیین شد. مجذور قطر حلقه‌های رسوبی استانداردها در برابر غلظت آنها رسم شده و با استفاده از آن غلظت ایمونوگلوبولین‌های موجود در نمونه‌ها محاسبه گردید.

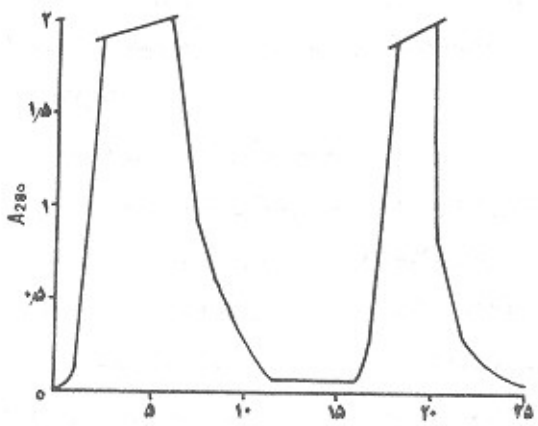
محاسبه درصد بازیافت ایمونوگلوبولین‌ها

با در نظر گرفتن غلظت IgG، IgM و IgA در سرم و Pool مربوط به پیک دوم خروجی از ستون T-gel (مخلوط فراکسیونهای جمع شده در پیک دوم) درصد بازیافت محاسبه شد.

یافته‌ها

کروماتوگرام مربوط به کروماتوگرافی T-gel

کروماتوگرام مربوط به فراکسیونهای خروجی از ستون T-gel در شکل ۱ نشانداده شده است. اولین پیک مربوط به فراکسیونهای پروتئین خارج شده به همراه بافر TBS دارای سولفات سدیم ۰/۵M می‌باشد و پیک دوم دارای پروتئینهایی است که جذب ستون T-gel شده و بعد از شستشو با بافر TBS فاقد سولفات سدیم (غلظت نمکی کمتر) از ستون خارج شده است.



شکل۱. کروماتوگرافی مربوط به فراکسیونهای خروجی از ستون کروماتوگرافی **T-gel**: جذب نوری در طول موج **۲۸۰ nm** خوانده شد و هر فراکسیون **۱/۵ml** حجم دارد. پیک اول دارای پروتئینهایی است که در مرحله اول با غلظت نمکی زیاد از ستون خارج شده ولی پیک دوم دارای ایمونوگلوبولینهای سرم انسان است که با غلظت نمکی کم از ستون جدا شده و جمع آوری گردید.

الکتروفورز استات سلولز

الکتروفورز پروتئینهای سرم انسان و پروتئینهای موجود در Pool در فراکسیونهای پیک دوم (شکل ۲) نشانگر یک باند پروتئینی در ناحیه گاما الکتروفورزی، بعد از انجام کروماتوگرافی می‌باشد.

ایمونودیفوزیون شعاعی یکطرفه (SRID) و تعیین غلظت ایمونوگلوبولینهای سرم

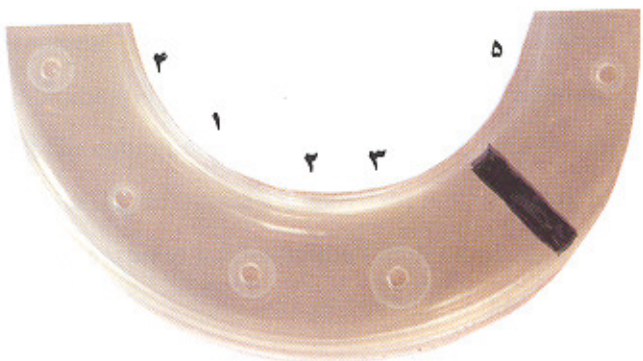
در شکل ۳ نتیجه SRID مربوط به IgG نشانداده شده است. با توجه به نمودارهای استاندارد مذکور، غلظت IgG سرم، ۲۰۰۰ mg/dl و غلظت IgG pool ۱۰۰۰ mg/dl محاسبه شد. با در نظر گرفتن حجم سرم (۴ ml) و حجم فراکسیونهای جمع شده در pool (۶ml) مقدار IgG در سرم ۸۰mg و در pool، ۶۰mg تعیین شد.غلظت IgA در سرم ۱۳۰ mg/dl محاسبه شد ولی شعاع رسوبی مربوط به IgA pool مشاهده نشد. غلظت IgM در سرم ۲۶۵ mg/dl و در pool ، با تقریب حدود ۳۰ mg/dl محاسبه

[DOR: 20.1001.1.15614107.1381.4.3.2.2]

شد. مقدار IgM سرم ۱۰/۶ mg و مقدار IgM موجود در pool، حدود ۱/۸ mg تعیین شد.



شکل۲. الکتروفورز استات سلولز پروتئینهای سرم انسان و پروتئینهای موجود در pool فراکسیونهای پیک دوم ، پروتئینها با پانسو S رنگ آمیزی شده‌اند. الکتروفورز در PH=۸/۶ به مدت ٤٠ دقیقه و در ولتاژ ثابت ۲٤۰V انجام شد.



شکل۳. ایمونودیفوزیون شعاعی یکطرفه IgG(SRID) نمونه‌های استاندارد (۱و۲و۳)، سرم انسان (٤) و فراکسیونهای Pool مربوط به پیک دوم بعد از T-gel (٥)

محاسبه درصد بازیافت ایمونوگلوبولین‌ها

با در نظر گرفتن مقدار اولیه IgG و IgM موجود در سرم و Pool درصد بازیافت در کروماتوگرافی T-gel جهت IgG سرم انسان حدود ۷۵٪ و IgM حدود ۱۷٪ محاسبه گردید. بعد از کروماتوگرافی T-gel و با توجه به نتایج SRID ایمونوگلوبولین A در محصول نهایی مشاهده نشد.

بحث

خالص‌سازی ایمونوگلوبولینهای سرم انسان با تجهیزات و هزینه زیاد در آزمایشگاههای پیشرفته جهت تهیه فرآورده‌های دارویی و آزمایشگاهی انجام می‌شود. در این تحقیق روش رسوبدهی گزینشی و درپی آن کروماتوگرافی تیوفیلیک (T-gel) جهت خالص‌سازی ایمونوگلوبولین‌های سرم انسانی در آزمایشگاه با تجهیزات و هزینه کم طراحی و راه اندازی شد. روش رسوبدهی با سولفات آمونیوم روشی ارزان و با تجهیزات کم است ولی محصول نهایی دارای ناخالصی‌های زیادی است و جهت جدا کردن نمکها باید از دیالیز استفاده نمود (۴و۳). روش رسوبدهی با سولفات آمونیوم (یا سدیم) و به دنبال آن کروماتوگرافی مبادله یونی منجر به محصولی با خلوص نسبتاً زیاد می‌شود و معمولاً غیر از IgG، سایر ایمونوگلوبولین‌ها حذف می‌شود، روشی ساده و ارزان است ولی چند مرحله‌ای بوده و نیاز به دیالیز در بین مراحل مختلف از معایب این روش می‌باشد. همچنین مقداری از زیرکلاسهای IgG حذف شده و محصول نهایی کاهش می‌یابد (۶و۵و۳).

روش کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون برای تخلیص IgM مناسبتر بوده، کاربرد کمی در تخلیص IgG دارد و برای خالص سازی بیشتر نیاز به مراحل اضافی است(۶و۳). کروماتوگرافی با ستون پروتئین A یا G منجر به تولید IgG با خلوص زیاد می‌شود و پس از دیالیز، کروماتوگرافی در یک مرحله انجام می‌گردد ولی هزینه زیادی لازم است و برای جدا کردن آنتی بادیهای متصل شده به ستون (در روش عمومی) از PH اسیدی یا قلیایی نسبتاً قوی استفاده می‌شود که ممکن است فعالیت آنتی بادیها را کاهش دهد. همچنین در روش کروماتوگرافی با پروتئین A همه زیر کلاسهای IgG انسانی به ستون متصل نمی‌شوند(۸و۷و۳). روشهای HPLC و FPLC که بسیار مؤثر و محصول آن آنتی‌بادیهای با خلوص زیاد است هزینه و تجهیزات زیادی نیاز دارد (۵).در مقایسه با روشهای فوق‌الذکر، روش کروماتوگرافی T-gel که در این تحقیق راه اندازی شد مزایای زیر را دارد: مواد اولیه ارزان، تجهیزات کم، خلوص نسبتاً زیاد (وجود تنها یک باند در ناحیه گامای الکتروفورزی)، درصد بازیافت نسبتاً خوب IgG (۷۵٪)، بازیافت کم IgM (۱۷٪) و عدم حضور IgA در محصول نهایی. همچنین روش T-gel نیازی به

[DOR: 20.1001.1.15614107.1381.4.3.2.2]

مراحل اضافی دیالیز نداشته و محصول نهایی در PH خنثی در فراکسیونهای مجزا جداسازی و تخلیص گردید. Porath وجود باند ۲ α ماکروگلوبولین و ترانسفرین (باندβ) را گزارش نمود(۱۰) که در این مطالعه این باندها مشاهده نشد.

همچنین در روش porath از ژل آگاروز ۶٪ استفاده شد و زمان فعالسازی T-gel طولانی بود (۳۸ ساعت) ولی در این تحقیق از سفاروز CL-4B استفاده شد و ستون T-gel در زمانی کوتاه (۸ ساعت) فعال شد. در روش Scoble ، Scops (۱۲و۱۱) حداکثر ظرفیت اتصالی ستون به IgG، ۲۶/۳ mg/ml گزارش گردید که در مطالعه حاضر ظرفیت اتصالی ستون به IgG ، ۳۷/۵ mg/ml محاسبه شد که در مقایسه با روش مذکور ظرفیت اتصالی بیشتری دارد. ایمونوگلوبولین‌های خالص شده با روش T-gel در این تحقیق را می‌توان در سنجشهای ایمونوشیمیایی بکار برد ولی جهت استفاده از این محصول در پیشگیری و درمان بیماریها باید تستهایی برای HIV ، HBV ، HCV انجام داد و نیز روشهایی برای حذف عوامل پاتوژن و مزاحم طراحی شود.

تقدیر و تشکر

از شورای محترم پژوهشی و کارکنان حوزه پژوهشی دانشگاه، اعضاء محترم هیأت علمی و کارکنان گروه بیوشیمی، بیوفیزیک دانشگاه و نیز از خانم فاطمه بنار که در این تحقیق ما را یاری نموده‌اند سپاسگزاریم.

****

References

1. Abbas AL, Lichtman AH, Pober JS. Cellular and molecular immunology, 4th ed. W.B Saunders Co 2000; pp: 41-62.

2. Austyn JM, Wood KJ. Principles of cellular and molecular immunology. Oxford University Press 1994; pp: 329-82.

3. Walker JM. The protein protocols handbook. Human Press USA 1996; pp: 721-47.

4. Ferencik M. Handbook of immunochemistry. Chapman Hall Co 1993; pp: 191-223.

5. Johnstone A, Thorpe R. Immunochemistry in practice, 3rd ed, Black Well Science 1996; pp: 34-100.

6. Kerr MA, Loomes LM, Thorpe SJ. Purification and fragmentation of immunoglobulin. In: Immunochemistry labfax (Kerr MA, Thorpe R eds). Bios Scientific Oxford UK 1994; pp: 83-114.

7. Biorck L, Kronval G. Purification and some properties of streptococcal protein G, a novel IgG- binding reagent. J Immunol 1984; 132(2): 969-74.

8. Lammler C, Sting R. Isolation of immunoglobulin G by affinity chromatography using an IgG FC receptor protein from streptococcus disgalactiae coupled to a solid phase. J Immunol Methods 1989; 124(1): 131-5.

9. Voet D, Voet JG, Pratt CW. Fudamentals of biochemistry. John Wiley and sons, Inc 1999; pp: 99-107.

10. Porath J, Maisano F, Belew M. Thiophilic adsorption-a new method for protein fractionation. FEBS Lett 1985; 185(2): 306-10.

11. Scoble JA, Scopes RK. Ligand structure of the divinylsulfone based T-gel. J Chromatogr A 1997; 787: 47-54.

12. Scoble JA, Scopes RK. Assay for determining the number of reaction groups on gels used in affinity chromatography and its application to the optimisation of the epichlorohydrin and divinylsulfone activation reactions. J Chromatogr A 1996; 752: 67-76.

13. Garvey JS, Gremer NE, Sussdrorf DH. Methods in immunology, 3rd ed. WA Benjamin Inc 1977; pp: 215-70.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1381.4.3.2.2]

14. Loomes LM, Stewart WW, Mazengera RL, Senior BW, Kerr MA. Purification and characterization of human immunoglobulin IgA 1 and IgA 2 isotypes from serum. J Immunl Methods 1991; 141(2): 209-18.

15. Klevin JL, Dawson JR. Quantitation of secretory protein levels by radioimmunoassay. Methods in enzymology 1981; 73: 625-6.

16. Sutton BJ, Could HJ. The human IgE network. Nature 1993; 366: 421-8.

17. Carayannopoulous L, Capra JD. Fundamental Immunology, 3rd ed, Raven Press Ltd 1993; pp: 283-314.

18. Hansen P, Scoble JA, Hanson B, Hoogenraad NJ. Isolation and purification of immunoglobulins from chicken eggs using thiophilic interaction chromatography. J Immunol Methods 1998; 215: 1-7.

19. Belew M, Juntti N, Larsson A, Porath J. A one- step purification method for monoclonal antibodies based on salt promoted adsorption chromatography on a thiophilic adsorbent. J Immunol Methods 1987; 102: 173-82.

20. Clark AL. Clinical uses of intravenous immunoglobulin in pregnancy. Clin Obstet Gynecol 1999; 42(2): 368-80.

21. Dalakas MC. Intravenous immunoglobulin (IVIG) therapy in neurologic diseases. Ann Intern Med 1997; 126(9): 721-30.

22. ASHP commission on therapeutics. ASHP therapeutic guidelines for intravenous immunoglobulin. Clin Pharm 1992; 11: 117-36.

23. Steele R, Burks W, Williams L. Intravenous immunoglobulin, New clinical application. Ann Allergy 1988; 60: 89-95.

*آدرس نویسنده مسئول: دانشگاه علوم پزشکی بابل، بخش بیوشیمی و بیوفیزیک تلفن: ٤-۲۲۲۹۵۹۱-۰۱۱۱.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1381.4.3.2.2]