

· 现场调查 ·

系统性红斑狼疮发病的环境因素及其与几种趋化因子基因的交互作用

叶冬青 胡以松 李向培 黄芬 杨仕贵 郝加虎 尹婧 张国庆 刘慧慧

【摘要】 目的 探讨环境因素、日常生活方式、社会心理因素及其与 -2518MCP-1、CCR2-64I、SDF1-3'A 基因交互作用在系统性红斑狼疮(SLE)发病中的作用。方法 采用病例对照研究设计,用单因素和多因素非条件 logistic 模型分析影响 SLE 发病的因素,用非条件 logistic 模型分析基因-环境交互作用。结果 单因素 logistic 回归分析共发现 19 个因素与 SLE 发病有关,多因素 logistic 模型分析显示,有意义的变量共 5 个,其中饮用水为 SLE 的保护因素($OR = 0.099$),而多种药物过敏($OR = 8.174$)、阳光过敏($OR = 18.339$)、服用抗生素($OR = 5.626$)、口服避孕药($OR = 16.897$)为 SLE 发病的危险因素。非条件 logistic 模型分析发现在 SLE 发病中好食刺激性食物与 -2518MCP-1G/G 基因型存在交互作用($OR = 4.387$)。未发现 SLE 发病中存在环境与环境的交互作用。结论 多个环境危险因素与 SLE 的发病有关,而且 MCP-1 基因与好食刺激性食物间存在交互作用。

【关键词】 系统性红斑狼疮;环境因素;非条件 logistic 模型

Influences of environmental factors and interaction of several chemokines gene-environmental on systemic lupus erythematosus YE Dong-qing*, HU Yi-song, LI Xiang-pei, HUANG Fen, YANG Shi-gui, HAO Jia-hu, YIN Jing, ZHANG Guo-qing, LIU Hui-hui. *School of Public Health, Anhui Medical University, Hefei 230032, China

Corresponding author: YE Dong-qing, Email: cjdep@mail.hf.ah.cn

【Abstract】 Objective To explore the impact of environmental factors, daily lifestyle, psycho-social factors and the interactions between environmental factors and chemokines genes on systemic lupus erythematosus(SLE). **Methods** Case-control study was carried out and environmental factors for SLE were analyzed by univariate and multivariate unconditional logistic regression. Interactions between environmental factors and chemokines polymorphism contributing to systemic lupus erythematosus were also analyzed by logistic regression model. **Results** There were nineteen factors associated with SLE when univariate unconditional logistic regression was used. However, when multivariate unconditional logistic regression was used, only five factors showed having impacts on the disease, in which drinking well water ($OR = 0.099$) was protective factor for SLE, and multiple drug allergy ($OR = 8.174$), over-exposure to sunshine ($OR = 18.339$), taking antibiotics ($OR = 9.630$) and oral contraceptives were risk factors for SLE. When unconditional logistic regression model was used, results showed that there was interaction between eating irritable food and -2518MCP-1G/G genotype ($OR = 4.387$). No interaction between environmental factors was found that contributing to SLE in this study. **Conclusion** Many environmental factors were related to SLE, and there was an interaction between -2518MCP-1G/G genotype and eating irritable food.

【Key words】 Systemic lupus erythematosus; Environmental factors; Unconditional logistic regression model

系统性红斑狼疮(SLE)的病因和发病机理十分

基金项目:教育部科学技术研究重点项目资助(03056);国家自然科学基金资助(30371247);安徽省教育厅重点科研项目资助(2002kj175ZD);安徽省教育厅自然科学基金资助项目(2002kj166)

作者单位:230032 合肥,安徽医科大学流行病与卫生统计学系(叶冬青、胡以松、黄芬、杨仕贵、郝加虎、尹婧、张国庆、刘慧慧);安徽省立医院风湿科(李向培)

通讯作者:叶冬青,Email: cjdep@mail.hf.ah.cn

复杂,至今仍未完全弄清楚,多数学者认为 SLE 的发病是遗传、环境、行为生活方式及社会心理因素等多种因素综合作用所致,是一种多基因遗传病^[1,2]。有研究表明,-2518MCP-1、CCR2-64I、SDF1-3'A 基因多态性与许多自身免疫性疾病可能存在关联^[3,4]。本研究试图探讨环境因素及基因-环境交互作用对 SLE 发病的影响。

对象与方法

1. 研究对象: SLE 病例组共计 153 例, 为安徽省立医院风湿科 2002 年 3~9 月门诊和住院的 SLE 患者, 有基因型数据者 143 例, 女性 138 例、男性 5 例, 平均年龄 (32.98 ± 11.72) 岁。SLE 的诊断标准采用美国风湿病学会 1982 年制定的 SLE 诊断标准, 符合其中 4 条者可确诊。正常对照组共 161 名, 为安徽省合肥、巢湖、六安地区的城市和农村社区人群中无血缘关系的正常人, 有基因型数据者 157 名, 其中女性 150 名、男性 7 名, 平均年龄 (33.32 ± 7.25) 岁。两组间性别和年龄构成差异均无统计学意义 ($P=0.671, P=0.769$)。

2. 调查内容: 主要包括一般因素(年龄、性别、籍贯、职业、文化程度、经济状况等)、个人史(出生情况、婚姻状况、月经情况等)、生育史(怀孕、分娩、流产情况等)、环境暴露因素(紫外线照射、感染、药物)、饮食情况和社会心理因素(包括精神刺激和创伤等)。

3. 基因型检测:

(1) 主要试剂及仪器: 琼脂糖、丙烯酰胺、亚甲双丙烯酰胺等试剂购自 Sigma 公司, PCR 扩增试剂、限制性内切酶均为 MBI 公司, 其余为国产分析纯。体外 DNA 扩增采用 Biometra 公司的 T-GRADIENT PCR 扩增仪。

(2) 基因型检测: 试验所有引物均参照文献[5]设计, 由上海生工生物工程有限公司合成。基因组 DNA 的提取采用标准的酚-氯仿提取法。SDF1-3'A 和 -2518MCP-1 基因扩增反应体系及聚合酶链反应(PCR)条件参照文献[5]。PCR 产物经 2% 琼脂糖电泳后酶切, 以 PvuII 酶切 -2518MCP-1 基因扩增产物, MspI 酶切 SDF1-3'A 基因扩增产物, 酶切结果用 12% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后判定结果。酶切反应体系及等位基因型的判定参照文献[5]。

4. 质量控制: 调查方式为面访调查, 调查前首先统一培训调查员, 并规定调查表各项内容的标准和填写注意事项。在正式调查前, 在小范围内进行一次预调查, 完善调查表, 同时可进一步加强对调查员的培训。于调查当日对资料进行复核, 统一编号并作相应记录, 对不合格的调查表尽可能补查或予以剔除, 资料录入时采用逻辑输入方法。资料输入结束后, 对每个变量的分布作统计描述, 以发现异常值

并进行复查或将之剔除。PCR-RFLP 的结果按 5% 的比例进行复检, 复检与初检结果不一致时重复实验。

5. 变量的定义: 月经无规律: 月经周期 < 21 天、> 37 天或不规则其中一项者, 持续 6 个月以上; 自然流产: 无人为因素, 妊娠 < 28 周, 胎儿体重 < 1000 g; 口服避孕药: 连续服用避孕药半年以上者; 日晒: 每天日晒时间达到或超过 2 h 者; 接触有害物质: 工作场所或生活中接触苯、甲苯、氯乙烯、油漆、乳化剂、焊气、棉尘、重金属、染发剂及 X 线。

6. 变量赋值: 两分类变量: “有”赋值为 1, “无”赋值为 0; 无序多分类变量: 用哑变量赋值; 有序多分类变量: 由无、低至高分分别赋值为 0, 1, 2, ...; 数值变量按原始数据赋值。

7. 统计学分析: 资料用 Epi Info 6.04 录入, 由 Epi Info 6.04 和 SPSS 10.0 软件进行统计分析, χ^2 检验用于基因与 SLE 的关联性分析(当基因频率很低时用 Fisher's 精确概率法), OR 值的估计用 Woolf's 公式, 如计算出的 P 值 < 0.05, 则再用 Bonferroni 法(即将算得的 P 值乘以各亚组之间的比较次数)进行校正, 计算出校正 P 值 (P_c), 以 $P_c \leq 0.05$ 为差异有统计学意义的判断标准, 无需再校正。单因素分析根据不同的资料分别选用 χ^2 检验、 t 检验及单因素非条件 logistic 回归模型等方法, 多因素分析及基因-环境及环境-环境交互作用分析用非条件 logistic 模型。

结 果

1. 一般情况: 性别、年龄、民族、职业、文化程度在病例组和对照组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 仅月收入在两组间差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2. 两组间等位基因型频率分布: 表 1 可见, -2518MCP-1、CCR2-64I、SDF1-3'A 等位基因型频率在两组间的分布差异均无显著性。除 -2518MCP-1 等位基因型分布在病例组不符合 H-W 平衡外, 其余各组等位基因型分布均符合 H-W 平衡。而且, -2518MCP-1G/A 基因型对照组高于病例组 ($\chi^2 = 4.11, P = 0.04$), 但经校正后差异无统计学意义 ($P_c = 0.12$)。

3. 单因素 logistic 回归分析结果: 对影响 SLE 发病的因素进行单因素 logistic 回归分析结果表明(表 2), 共有 19 个因素与 SLE 的发病有关, 其中已

婚、经常喝茶、动、植物油各半、饮用水可能为影响 SLE 发病的保护因素。初婚年龄大、人工流产、口服避孕药、住宅附近有噪声、睡眠差、接触有害物质、食物过敏、药物过敏、阳光过敏、好食刺激性食物、发病前服用抗生素、服用抗寄生虫药物、抗胃肠病药物、消化道感染、链球菌感染可能为 SLE 发病的危险因素。其他因素与 SLE 的发病之间没有发现相关关系。

4. 多因素 logistic 回归分析:按 $\alpha = 0.05$ 的标准选取,最后进入 logistic 分析的变量有:已婚、初婚年龄、人工流产次数、口服避孕药、经常喝茶、动、植物

油各半、饮用水、住宅附近有噪声、睡眠较差、接触有害物质、食物过敏、药物过敏、阳光过敏、好食刺激性食物、服用抗生素、服用抗寄生虫药物、服用胃肠病药物、既往消化道感染、既往链球菌感染以及人均月收入共 20 个变量。最后经非条件 logistic 分析(逐步法,选入和剔除的标准均取 0.05),进入 logistic 模型的变量有 5 个(表 3)。其中饮用水为 SLE 的保护因素($OR = 0.099$),而药物过敏($OR = 8.174$)、阳光过敏($OR = 18.339$)、服用抗生素($OR = 5.626$)、口服避孕药($OR = 16.897$)为 SLE 发病的危险因素。

表1 -2518MCP-1、CCR2-64I、SDF1-3'A 等位基因型在两组间的分布

基因	组别	纯合野生型 (A/A)	杂合型 (A/G)	纯合突变型 (G/G)	H-W 平衡		基因型分布	
					χ^2 值	P 值	χ^2 值	P 值
-2518MCP-1	病例 (n=143)	68(0.48)	50(0.35)	25(0.17)	7.64	<0.01	4.20	0.12
	对照 (n=157)	63(0.40)	73(0.46)	21(0.14)	0.05	>0.75		
CCR2-64I	病例 (n=143)	81(0.56)	54(0.38)	8(0.06)	0.10	0.75	0.93	0.63
	对照 (n=157)	85(0.55)	66(0.42)	6(0.03)	2.65	>0.10		
SDF1-3'A	病例 (n=143)	78(0.54)	60(0.42)	5(0.04)	2.57	>0.10	0.33	0.84
	对照 (n=157)	93(0.59)	60(0.38)	4(0.03)	2.46	>0.10		

注:括号外数据为例数,括号内数据为百分率(%)

表2 SLE 影响因素的单因素非条件 logistic 回归分析

变量	β	s_{β}	Wald χ^2 值	P 值	OR 值(95% CI)
已婚	-1.524	0.356	18.292	0.000	0.218(0.108~0.438)
初婚年龄	0.147	0.055	7.256	0.007	1.159(1.041~1.290)
人工流产次数	0.301	0.137	4.846	0.028	1.351(1.034~1.766)
口服避孕药	2.221	1.066	4.342	0.037	9.219(1.141~74.495)
经常喝茶	-0.535	0.272	3.863	0.049	0.586(0.343~0.999)
动、植物油各半	-1.028	0.369	7.755	0.005	0.358(0.173~0.737)
食蔬菜情况	-0.237	0.152	2.431	0.119	0.789(0.586~1.063)
饮用水	-2.410	0.368	42.783	0.000	0.090(0.044~0.185)
住宅附近有噪声	0.652	0.293	4.964	0.026	1.920(1.082~3.408)
睡眠较差	1.136	0.383	8.783	0.003	3.115(1.469~6.604)
接触有害物质	1.272	0.530	5.756	0.016	3.568(1.262~10.085)
食物过敏	1.657	0.791	4.393	0.036	5.244(1.114~24.696)
药物过敏	1.953	0.409	22.838	0.000	7.051(3.165~15.710)
阳光过敏	2.462	1.052	5.475	0.019	11.731(1.491~92.276)
好食刺激性食物	0.695	0.238	8.508	0.004	2.005(1.256~3.198)
经常食用芹菜	0.351	0.234	2.249	0.134	1.421(0.898~2.249)
经常食用蘑菇	0.372	0.232	2.561	0.110	1.450(0.920~2.286)
服用抗生素	1.585	0.250	40.107	0.000	4.882(2.989~7.974)
服用抗寄生虫药物	1.310	0.253	26.783	0.000	3.706(2.257~6.087)
服用胃肠病药物	0.812	0.409	3.936	0.047	2.252(1.010~5.023)
服用抗结核药物	1.492	1.121	1.772	0.183	4.447(0.494~40.021)
既往消化道感染	0.561	0.246	5.195	0.023	1.752(1.082~2.839)
既往皮肤感染	0.487	0.255	3.649	0.056	1.627(0.987~2.680)
既往链球菌感染	0.822	0.242	11.546	0.001	2.275(1.416~3.656)
既往结核感染	1.500	1.121	1.789	0.181	4.480(0.498~40.313)

表3 SLE 影响因素的 logistic 分析结果

变量	β	s_{β}	Wald χ^2 值	P 值	OR 值(95% CI)
饮用水	-2.312	0.407	32.217	0.000	0.099(0.045~0.220)
药物过敏	2.101	0.471	19.937	0.000	8.174(3.250~20.558)
阳光过敏	2.909	1.171	6.175	0.013	18.339(1.849~181.921)
服用抗生素	1.727	0.312	30.637	0.000	5.626(3.052~10.371)
口服避孕药	2.827	1.193	5.617	0.018	16.897(1.631~175.073)
常数项	0.350	0.407	0.740	0.390	1.419

该 logistic 模型的整个方程的假设检验结果 = 136.367, $P < 0.001$, 故整个模型有统计学意义。回归诊断的结果理论值与期望值的一致率 = 76.5%, 模型的拟合优度较好。

5. 趋化因子基因-环境及环境-环境因素交互作用分析:

(1) 基因-环境交互作用项筛选: 考虑到样本量, 只对一阶交互作用进行探讨。选择的环境因素为单因素分析中 P 值 < 0.05 的变量, 限于篇幅表中只列出 P 值 < 0.2 的交互项, 其余 P 值 > 0.2 的交互项不再列出。从表 4 可见, 好食刺激性食物与 -2518MCP-1G/G 基因型存在交互作用。

(2) 环境-环境交互作用项筛选: 选择的环境因素为单因素分析中 P 值 < 0.5 的变量, 分别探讨他们之间可能的交互作用, 结果未发现任何交互作用。

(3) 包含一阶交互作用项的多因素 logistic 回归模型分析: 将表 2 中的 5 个环境因素(饮井水、药物过敏、阳光过敏、服用抗生素、口服避孕药)、1 个交互项(好食刺激性食物与 -2518MCP-1G/G)及这些交互项涉及到的等位基因型(-2518MCP-1G/G)和环境因素(好食刺激性食物)进行 logistic 模型拟合, 结果发现一阶交互作用项进入模型(表 5)。

该 logistic 模型的整个方程的假设检验结果 = 152.186, $P < 0.001$, 故整个模型有统计学意义。回归诊断结果的理论值与期望值的一致率 = 78.2%, 模型的拟合优度较好。

(4) 主效应模型与包含交互项模型比较: 为了解在主效应 logistic 模型加入交互项是否会明显改

善模型的拟合优度, 我们对主效应模型与包含交互项模型比较, 主效应模型的 $-2\log L = 276.091$, 包含交互项模型的 $-2\log L = 260.271$, 两个模型比较可计算检验统计量 $q = -2\ln(L1/L2) = 276.091 - 260.271 = 15.82$, q 服从与 χ^2 分布, 所以 $P < 0.01$, 两模型差异有极显著统计学意义, 包含交互项模型的一致率为 78.2%, 优于主效应模型(一致率 = 76.5%)。因此该交互项的增加对反应变量有显著影响, 并提高了模型的拟合优度。

讨 论

SLE 是一种累及多脏器的自身免疫性疾病。其发病率较高, 对女性危害严重, 但病因和发病机制至今不明。怀疑与 SLE 发病和促发有关的因素有: 感染、药物、化学毒物、过敏、某些食物、紫外线、损伤、免疫调节紊乱和激素失调以及遗传因素等。最近有研究发现 SLE 的发病率有不断增加的趋势, 其原因之一是诊断水平的提高, 而更可能的原因是环境危险因素的增加^[6,7]。因此, 进一步探索 SLE 的危险因素更加具有重要意义。

研究资料收集由经过专门培训的调查员采用面访调查的方法, 调查过程中严格进行质量控制, 尽力防止信息偏倚和混杂偏倚的发生, 并在资料分析过程中采用多因素 logistic 回归分析方法控制可能的混杂偏倚。

单因素 logistic 回归分析结果发现: 已婚、经常喝茶、动、植物油各半、饮井水可能为影响 SLE 发病的保护因素。初婚年龄大、人工流产、口服避孕药、

表4 趋化因子基因与环境因素交互作用的 logistic 模型分析结果

变 量	β	s_x	Wald χ^2 值	P 值	OR 值(95% CI)
-2518MCP-1G/G 与饮井水	-1.404	1.049	1.789	0.181	0.246(0.031~1.921)
-2518MCP-1G/A 与饮井水	-1.573	1.059	2.205	0.138	0.208(0.026~1.653)
-2518MCP-1G/G 与好食刺激性食物	1.479	0.725	4.156	0.041	4.387(1.059~18.176)

表5 包含交互项的 logistic 模型拟合结果

变 量	β	s_x	Wald χ^2 值	P 值	OR 值(95% CI)
饮井水	-2.527	0.434	33.876	0.000	0.080(0.034~0.187)
药物过敏	2.361	0.491	23.082	0.000	10.596(4.045~27.758)
阳光过敏	2.602	1.185	4.822	0.028	13.484(1.323~137.480)
服用抗生素	1.616	0.324	24.801	0.000	5.032(2.664~9.505)
口服避孕药	2.816	1.270	4.915	0.027	16.714(1.386~201.527)
好食刺激性食物	-0.330	0.747	0.196	0.658	0.719(0.166~3.105)
-2518MCP-1G/G 与好食刺激性食物	1.952	0.898	4.729	0.030	7.045(1.213~40.928)
-2518MCP-1G/G	-1.103	0.694	2.527	0.112	0.332(0.085~1.293)
常数项	1.006	0.735	1.873	0.171	2.734

住宅附近有噪声、睡眠差、接触有害物质、食物过敏、药物过敏、阳光过敏、好食刺激性食物、发病前服用抗生素、服用抗寄生虫药物、抗胃肠病药物、消化道感染、链球菌感染可能为 SLE 发病的危险因素。这些结果与国内外部分学者的观点不完全一致^[8-11]，可能与气候、地理位置、种族等有关，也可能与样本大小有关，今后将进一步扩大样本进行深入研究。

本次多因素研究结果发现口服避孕药与 SLE 存在关联，与其他研究不尽相同^[7,9,12]，推测其导致 SLE 发病的原因主要可能是由于口服避孕药中所含的雌激素成分所致，而雌激素被公认为在 SLE 的发病以及病后的复发过程中发挥重要作用^[11]。

本次研究中发现饮井水无论是单因素还是多因素分析均出现保护作用，其原因可能是因为分析的过程中变量赋值时将自来水作为对照，而自来水在用氯作为消毒剂时会产生很多的卤代物（如三氯甲烷、四氯化碳、三氯乙烯、四氯乙烯等），而有研究表明^[13,14]这些卤代物可能是会导致 SLE 的发病。

很多药物作为一个半抗原，可以启动体内的免疫应答反应。本次研究也表明药物过敏为 SLE 的危险因素，与国外的许多报道相一致^[9,12]。而且单因素及多因素分析时均发现发病前服用抗生素为 SLE 发病的危险因素，原因可能是与 SLE 患者的过敏体质有关。

紫外线能使表皮细胞核中 DNA 二聚化形成解聚的胸腺嘧啶二聚体引起 DNA 抗原性改变，导致体内自身抗体产生，紫外线也可使皮肤细胞受损，使血清中抗核因子进入细胞内，与细胞核发生作用，造成皮肤损害，这种情况类似于阳光曝晒，与本次研究发现阳光过敏为危险因素的结果相一致。

尽管多因素分析时没有发现好食刺激性食物与 SLE 的关联，也没有发现趋化因子单个基因对 SLE 的发病起作用，-2518MCP-1A/G 基因型对照组高于病例组，但经校正后差异无统计学意义，有待于扩大样本进一步探讨。但基因-环境交互作用研究发现好食刺激性食物与 -2518MCP-1G/G 基因型在 SLE 发病中存在交互作用，这再次提示尽管单独基因对 SLE 的发病没有作用，但基因与环境的协同作用可能对 SLE 的发病有重要影响。进一步研究可

采用扩大样本含量和进行实验性研究，有待于今后深入探讨。

参 考 文 献

- 1 Robertson CA, Vyse TJ. The genetics of systemic lupus erythematosus. *Exp Nephrol*, 2000, 8:194-202.
- 2 陆伟, 李向培, 施小明, 等. HLA-DM 基因遗传多态性对系统性红斑狼疮易感性的影响. *疾病控制杂志*, 2002, 6:104-107.
- 3 Nanki T, Hayashida K, El-Gabalawy HS, et al. Stromal cell-derived factor-1-CXC chemokine receptor 4 interactions play a central role in CD4⁺ T cell accumulation in rheumatoid arthritis synovium. *J Immunol*, 2000, 165:6590-6598.
- 4 Firestein GS, Yeo M, Zvaifler NJ. Apoptosis in rheumatoid arthritis synovium. *J Clin Invest*, 1995, 96:1631-1638.
- 5 Easterbrook PJ, Rostron T, Ives N, et al. Chemokine receptor polymorphisms and human immunodeficiency virus disease progression. *J Infect Dis*, 1999, 180:1096-1105.
- 6 Maddison PJ. Nature and nurture in systemic lupus erythematosus. *Adv Exp Med Biol*, 1999, 455:7-13.
- 7 Mayes MD. Epidemiologic studies of environmental agents and systemic autoimmune diseases. *Environ Health Perspect*, 1999, 107 suppl 5:s743-s748.
- 8 张卫华, 孟炜, 沈福民, 等. 系统性红斑狼疮病例对照研究. *中国公共卫生学报*, 1997, 16:129-131.
- 9 Bengtsson AA, Rylander L, Hagmar L, et al. Risk factors for developing systemic lupus erythematosus: a case-control study in southern Sweden. *Rheumatology(Oxford)*, 2002, 41:563-571.
- 10 Cooper GS, Dooley MA, Treadwell EL, et al. Hormonal, environmental, and infectious risk factors for developing systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*, 1998, 41:1714-1724.
- 11 Nagata C, Fujita S, Iwata H, et al. Systemic lupus erythematosus: a case-control epidemiologic study in Japan. *Int J Dermatol*, 1995, 34:333-337.
- 12 Strom BL, Reidenberg MM, West S, et al. Shingles, allergies, family medical history, oral contraceptives, and other potential risk factors for systemic lupus erythematosus. *Am J Epidemiol*, 1994, 140:632-642.
- 13 White KL, David DW, Butterworth LF, et al. Assessment of autoimmunity-inducing potential using the brown Norway rat challenge model. *Toxicol Lett*, 2000, 15:112-113, 443-451.
- 14 Khan MF, Kaphalia BS, Prabhakar BS, et al. Trichloroethene-induced autoimmune response in female MRL +/+ mice. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1995, 134:155-160.

(收稿日期:2003-12-04)

(本文编辑:尹廉)