

Poruchy vrodenej imunity – nové patogenetické aspekty atopickej dermatitídy



Doc. MUDr. Dušan Buchvald, PhD.

Detská dermatovenerologická klinika LFUK a DFNSP, Bratislava

Neustále sa zvyšujúce množstvo poznatkov ukazuje, že v patogenéze atopickej dermatitídy dôležitú úlohu zohrávajú viaceré poruchy systému vrodenej imunity, ktoré spoločne ovplyvňujú vývoj choroby a závažnosť jej priebehu.

Geneticky podmienená porucha epidermálnej bariéry, modifikácie receptorov rozpoznávajúcich molekulové vzory a deficiencia antimikróbných peptidov umožňujú prienik alergénov a patogénnych mikroorganizmov do kože, kde prichádzajú do kontaktu s imunokompetentnými bunkami. Poruchy vrodenej imunity jednak napomáhajú vývoju včasnej precitlivenosti voči atopickým alergénom, a jednak vysvetľujú vnímavosť pacientov s atopickou dermatitídou na patogénne mikroorganizmy ako *Staphylococcus aureus* a vírus herpes simplex.

Úvod

Hlavnou úlohou imunitného systému je ochrana integrity organizmu, ktorú zabezpečuje prostredníctvom rozpoznania a eliminácie cudzorodých (nevlastných) látok prenikajúcich do organizmu z vonkajšieho prostredia alebo vznikajúcich v jeho vnútri. Využíva pri tom dve línie obrany, ktoré navzájom úzko spolupracujú a ich mechanizmy sa často prelínajú – vrodenu imunitu a získanú imunitu. Hlavným rozdielom medzi nimi je fenomén imunologickej pamäte (t.j. schopnosť učiť sa a zvyšovať efektívnosť odpovede pri nových stretnutiach s cudzorodou látkou), ktorá je výhradnou vlastnosťou získanej imunity. V minulosti bola vrodená imunita charakterizovaná aj ako nešpecifická, t.j. neschopná rozlišovať medzi cudzorodými látkami a reagujúca vždy rovnakou stereotypnou odpoveďou bez ohľadu na charakter spúšťajúceho faktora. Dnes už vieme, že tomu tak nie je a že aj vrodená imunita disponuje receptormi schopnými rozlišovať skupinové charakteristiky cudzorodých látok, zodpovedajúco nasmerovať svoju odpoveď a zároveň aktivovať zodpovedajúci mechanizmus získanej imunity. Na druhej strane, takto aktivovaná získaná imunitná odpoveď potom na princípe negatívnej spätnej väzby utlmuje reakciu vrodenej imunity, aby zabránila neprimeranému poškodeniu tkaniva nahromadenými zápalovými bunkami vrodenej imunity.

Vrodená imunita je vyvinutá už pri narodení a je schopná okamžite reagovať na prienik cudzorodých látok do organizmu. Zabezpečovaná je viacerými líniami obrany a množstvom rôznych mechanizmov, tak na rozhraní organizmu a vonkajšieho prostredia (koža, vonkajšie sliznice), ako aj vo vnútornom prostredí organizmu (humorálne a celulárne faktory). Koža predstavuje významnú zložku systému prirodzenej imunity – tvorí fyzikálno-chemickú bariéru, disponuje rôznymi typmi

receptorov prirodzenej imunity (napr. receptormi podobnými Toll receptoru drozofily – Toll-like receptors TLR), produkuje rôzne peptidy s antimikróbnym účinkom (antimikróbne peptidy AMP), obsahuje viacero typov rezidentných alebo infiltrujúcich buniek aktívnych v reakciách vrodenej imunitnej odpovede (makrofágy, žírne bunky, prirodzene zabíjačské NK bunky, polymorfonukleárne leukocyty).

Poruchy v systéme vrodenej imunity kože umožňujú prienik rôznych látok z vonkajšieho prostredia do organizmu a uľahčujú tak napríklad patogenetické uplatnenie rôznych mikroorganizmov alebo vývoj precitlivenosti a hypersenzitívnych reakcií na rôzne kontaktné alebo vzdušné alergény.

Mechanizmy vrodenej imunity kože

Dôležitou fyziologickou funkciou kože z hľadiska jej pôsobenia ako súčasti systému prirodzenej imunity je zabezpečenie bariéry medzi vnútro organizmu a vonkajším prostredím. Táto bariéra je lokalizovaná na úrovni rohovej vrstvy epidermy a zabezpečujú ju korneocyty a lipidové lamely medzibunkových priestorov stratum corneum. Dokonale zrohovatené korneocyty a medzibunkové priestory vyplnené lipidovými lamelami pozostávajúcimi predovšetkým z ceramidov, cholesterolu a voľných mastných kyselín za fyziologických podmienok znemožňujú prienik molekúl s relatívnou molekulovou hmotnosťou vyššou ako 500 do hlbších vrstiev kože a ďalej do vnútra organizmu¹. Fyziologická obnova tejto bariéry prebieha jednak procesmi proliferácie a diferenciácie keratinocytov a jednak deskvamáciou povrchových buniek stratum corneum, v ktorej dôležitú úlohu zohráva koordinovaná aktivita proteolytických enzýmov rohovej vrstvy a ich inhibítorov. Druhou líniou epidermálnej bariéry sú zonulae occludentes, štruktúry uzatvárajúce tkanivovým mokom vyplnené medzibunkové priestory na úrovni stratum granulosum, brániac tak voľnému prieniku látok z vonkajšieho prostredia cez intercelulárne priestory do hlbších vrstiev kože².

Na membránach keratinocytov sú prítomné viaceré typy receptorov vrodenej imunity. Spoločne sa označujú ako receptory rozpoznávajúce molekulové vzory patogénnych mikroorganizmov (pattern-recognition receptors, PRRs). Jednotlivé typy týchto receptorov sú schopné rozpoznať fylogeneticky zakonzervované molekulové vzory vlastné veľkým skupinám mikroorganizmov (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs), napr. lipopolysacharid gramnegatívnych baktérií, zymosan kvasiniek alebo dvojvláknovú RNA niektorých vírusov. Aktivácia týchto receptorov po naviazaní zodpovedajúceho molekulového vzoru má za následok spustenie skupinovo špecifickej vrodenej imunitnej odpovede – produkciu cytokínov, chemokínov, adhézných molekúl a antimikróbných peptidov, akumuláciu a aktiváciu efektorových



buniek vrodenej imunity, napr. NK buniek alebo polymorfonukleárných leukocytov. Medzi receptory prítomné na bunkách kože patria napríklad Toll-like receptory TLR alebo receptory NOD (obsahujúce nukleotidy viažúcu oligomerizačnú doménu, nucleotide-binding oligomerization domain). Významným obranným mechanizmom kože v rámci vrodenej imunity sú antimikróbne peptidy. Pozitívny náboj molekúl väčšiny z nich zabezpečuje ich schopnosť penetrovať cez negatívne nabité bunkové steny mikroorganizmov a majú tak priamu mikrobicídnu aktivitu. Okrem tejto funkcie sa AMP podieľajú aj na aktivácii ďalších mechanizmov imunitnej odpovede – stimulácii produkcie prozápalových cytokínov a chemokínov. Niektoré antimikróbne peptidy sú bunkami kože produkované konštitučne, stimulom pre produkciu iných je aktivácia receptorov vrodenej imunity, napr. TLR. Keratinocyty sú schopné syntézy a sekrécie viac ako desiatich rôznych AMP, ich hlavnými skupinami sú defenzíny a kathericidíny.

Atopická dermatitída

Atopická dermatitída je zápalová dermatóza s komplexnou etiopatogenezou, v ktorej sa kombinuje genetická predispozícia, porušená epidermálna bariérová funkcia a imunitná dysregulácia. Vývoj fenotypu choroby je podmienený interakciou medzi genetickou predispozíciou na jednej strane a vonkajším prostredím na strane druhej. Interakcia génov a prostredia teda rozhoduje, či sa u geneticky predisponovaného jedinca vyvinie klinicky manifestná atopická dermatitída alebo zostane latentným atopikom.

Dedičnosť atopickej dermatitídy má polygénový charakter, na výslednom efekte dedičnej predispozície sa podieľajú produkty viacerých génov. Ako významne asociované s fenotypom atopickej dermatitídy sa ukazujú predovšetkým gény kódujúce niektoré zložky imunitného systému s účasťou na mechanizme včasnej precitlivenosti (vysokoafinitný receptor pre IgE, interleukín IL-13, receptor pre interleukín IL-4R) a gény kódujúce proteíny dôležité pre integritu epidermálnej bariéry³. Polymorfizmus týchto génov spôsobuje, že niektoré alely kódujú produkty so zmenenou štruktúrou alebo funkciou, čo sa môže prejaviť ako predispozičný faktor vývoja atopickej dermatitídy (napr. zmena signálnej funkcie receptora alebo ovplyvnenie bariérovej funkcie epidermy).

O úlohe atopie pri vývoji atopickej dermatitídy máme k dispozícii množstvo dôkazov, v ostatných rokoch sa však pomocou využitia metód molekulovej biológie a genetiky potvrdilo, že primárnym procesom v patogenéze tejto choroby je geneticky podmienená insuficiencia epidermálnej bariéry⁴. Uľahčený prienik látok z vonkajšieho prostredia do kože má potom u geneticky predisponovaných jedincov za následok senzibilizáciu voči alergénom sprostredkovanú protilátkami triedy IgE⁵.

Výsledky štúdií z ostatných rokov rozšírili naše poznatky o etiopatogenezе atopickej dermatitídy o nový pohľad na význam porúch vrodenej imunity. Popri zníženej funkcii epidermálnej bariéry sa na patogenéze choroby alebo jej komplikácií môžu podieľať aj zmeny v ďalších mechanizmoch – poruchy expresie alebo funkcie receptorov rozpoznávajúcich molekulové vzory (PRR) a poruchy expresie antimikróbných peptidov (AMP).

Porucha epidermálnej bariéry pri atopickej dermatitíde

Jedným z charakteristických klinických znakov atopickej dermatitídy je suchosť kože a to nielen v ložiskách dermatitídy, ale aj v nezapálenej koži. Podmienená je porušenou bariérovou funkciou epidermy, ktorú za fyziologických podmienok zabezpečujú korneocyty a lipidové lamely medzibunkových priestorov stratum corneum. Zvýšená transepidermálna strata vody, únik zložiek prirodzeného hydratačného faktora a následná znížená väzobná kapacita epidermy pre vodu vedú potom k typickej xeróze kože. V procese diferenciácie keratinocytov dôležitú úlohu zohráva proteín filagrín, ktorý agreguje keratinové filamentá keratinocytov do hrubých zväzkov, čo predstavuje kľúčový dej pri tvorbe zrohovateného obalu korneocytov. Nulové mutácie v gène pre filagrín, ktoré sa významne asocioujú s atopickou dermatitídou, vedú k deficiencii filagrínových peptidov vo vonkajších vrstvách epidermy a následne k nedokonalému zrohovateniu keratinocytov a poruche bariérovej funkcie^{6,7}. Nedostatok filagrínu v rohovej vrstve epidermy sa prejaví aj zníženým obsahom komponentov prirodzeného hydratačného faktora v koži, pretože väčšinu hydrofilných aminokyselín tohto faktora tvoria produkty enzymatickej degradácie filagrínu⁸.

Epidermálnu bariéru za fyziologických podmienok pomáhajú zabezpečovať aj zonulae occludentes uzatvárajúce medzibunkové priestory na úrovni stratum granulosum. Len pred tromi rokmi skupina amerických a nemeckých autorov publikovala prioritné výsledky svojej štúdie expresie a funkcie kladínu-1, jedného z dôležitých proteínov zonulae occludentes, v koži pacientov s atopickou dermatitídou. Ukázali, že niektoré varianty v rámci polymorfizmu génu pre kladín-1 sú významne asociované s atopickou dermatitídou a že tento proteín je významne slabšie exprimovaný v nepostihnutej atopickej koži v porovnaní s kožou neatopických jedincov⁹. Rozšírili tak naše poznatky o geneticky podmienenej poruche bariérovej funkcie epidermy pri atopickej dermatitíde, ktorá nie je obmedzená len na rohovú vrstvu epidermy, ale týka sa aj stratum granulosum.

K poruche bariérovej funkcie môže prispievať aj predčasné štiepenie korneodezmozómov. Geneticky podmienená zvýšená aktivita chymotryptického enzýmu stratum corneum (stratum corneum chymotryptický enzým, SCCE) a znížená aktivita inhibitora tohto enzýmu (lymfopitelový inhibitor serínových proteáz Kazalovho typu 5, LEKTI) majú za následok predčasnú proteolýzu korneodezmozómov a nadmernú deskvamáciu korneocytov, vedúce k ďalšiemu oslabovaniu epidermálnej bariéry¹⁰.

Svoju úlohu pri vzniku poruchy epidermálnej bariéry zohráva aj znížený obsah lipidov, predovšetkým ceramidov a viacnenasýtených mastných kyselín, v rohovej vrstve epidermy pacientov s atopickou dermatitídou. Ceramidy tu plnia štruktúrnú funkciu ako zložka lipidových lamiel stratum corneum a podieľajú sa aj na regulácii procesov diferenciácie keratinocytov. Príčinou ich deficiencie je pravdepodobne jednak porucha metabolizmu sfingomyelínu v atopickej koži a jednak porucha mechanizmu tvorby lipidových lamiel stratum corneum. Ceramidy sú v koži tvorené najmä zo sfingomyelínu. U atopikov je však aktivita enzýmu sfingomyelínázy, ktorý túto reakciu katalyzuje,



lyzuje, znížená¹¹. Navyše, epidermálna sfingomyelín-deacyláza abnormálnym spôsobom degraduje sfingomyelín v atopickej koži – namiesto ceramidov je produktom tejto degradácie sfingozylfosforylcholín, látka, ktorá má výraznú prozápalovú aktivitu¹². Porušený intracelulárny mechanizmus tvorby základných stavebných jednotiek lipidových lamiel stratum corneum v keratinocytoch má za následok odbúravanie týchto štruktúr v bunkách a ich absenciu v extracelulárnej lipidovej bariére rohovej vrstvy¹³. Všetkými týmito mechanizmami oslabená bariérová funkcia epidermy znamená potom jednak poruchu vodného hospodárstva s následnou suchosťou a jednak uľahčenie prieniku mikroorganizmov, iritantov a alergénov. Následná imunitná odpoveď na alergény má u atopikov v akútnej fáze charakter hypersenzitívnej reakcie sprostredkovanvej Th2 lymfocytmi, v chronickej fáze sa aktivuje aj Th1 odpoveď.

Porucha expresie alebo funkcie receptorov vrodenej imunity pri atopickej dermatitíde

Hlavnou funkciou receptorov podobných Toll (TLR) po naviazaní skupinovo špecifického molekulového vzoru patogénneho mikroorganizmu je indukcia zápalu ako vrodenej imunitnej odpovede a zároveň indukcia dozrievania dendritických buniek. Tieto potom v ďalšom stupni reakcie podmieňujú nasmerovanie získanej imunitnej odpovede tak, aby čo najefektívnejšie eliminovala útočiaci mikroorganizmus. Väčšina ligandov TLR receptorov podporuje vývoj v smere Th1 alebo Th17 imunitnej odpovede, ktoré sa uplatňujú v protibaktériovej a protivírusovej imunitě.

Receptory TLR2 prítomné na cytoplazmatickej membráne keratinocytov rozpoznávajú viacero molekulových vzorov, vrátane peptidoglykanu a kyseliny lipoteichoovej grampozitívnych mikroorganizmov, napr. *Staphylococcus aureus*. Výsledky štúdií z ostatných rokov ukázali poruchu funkcie TLR2 receptorov na keratinocytoch pacientov s atopickou dermatitídou. Ich počty na membránach buniek atopických a neatopických osôb sa síce nelíšili, ale stimulácia receptorov atopických pacientov viedla k signifikantne slabšej zápalovej odpovedi (produkcií prozápalových cytokínov) ako v prípade neatopických osôb^{14,15}. Je vysoko pravdepodobné, že táto znížená schopnosť obrannej zápalovej odpovede u atopikov prispieva k neschopnosti eradikovať zlaté stafylokoky kolonizujúce ich kožu. Príčina nedostatočnej funkcie TLR2 receptorov nie je známa, ale môžu pri nej zohrávať úlohu genetické faktory. Niektoré polymorfné varianty tohto receptora sa asocioujú so zvýšenou náchylnosťou na stafylokokové infekcie a mutácia TLR2 génu, vedúca k nefunkčnosti receptora, sa vyskytla až u 11,5 % pacientov s atopickou dermatitídou a klinicky sa asociovala s ťažším priebehom choroby¹⁶. Na vnútrobunkových membránach endozómov keratinocytov sú prítomné receptory vrodenej imunity zo skupiny NOD receptorov. Stimulácia NOD2 jeho ligandom z baktériovej steny indukovala v epidermálnych bunkách produkciu antimikróbneho peptidu HBD-2¹⁷. Rovnako ako v prípade TLR receptorov, oslabená signalizačná funkcia NOD receptorov môže prispievať k zvýšenej náchylnosti pacientov s atopickou dermatitídou na kolonizáciu a infekcie baktériami *Staphylococcus aureus*. Niektoré polymorfizmy génov pre NOD receptory sa asociovali s fenotypom atopickej dermatitídy¹⁴ a podporujú tak názor o ďalšej geneticky podmienenej poruche v systéme vrodenej imunity pri atopickej dermatitíde.

Poruchy antimikróbnych peptidov pri atopickej dermatitíde

Spomedzi antimikróbnych peptidov produkovaných stimulovanými keratinocyty majú z hľadiska patogenézy atopickej dermatitídy význam predovšetkým poruchy syntézy beta-defenzínov HBD-2 a HBD-3 a katehelicidínu LL37. Všetky tri majú protistafylokovú aktivitu a katehelicidín aj protivírusovú aktivitu proti vírusom herpes simplex HSV-1 a HSV-2¹⁸. V epiderme zapálenej kože pacientov s atopickou dermatitídou je síce prítomné zvýšené množstvo všetkých troch antimikróbnych peptidov pri porovnaní so zdravou neatopickou kožou, ale signifikantne nižšie je pri porovnaní so zapálenou kožou psoriatických pacientov¹⁹. Predpokladá sa, že za zníženú schopnosť produkcie antimikróbnych peptidov pri atopickej dermatitíde je zodpovedná znížená aktivita TLR a NOD receptorov, ktoré slabo stimulujú syntézu AMP napriek prítomnosti patogénnych baktérií alebo vírusov na atopickej koži²⁰. Prispieť k nej môže aj inhibičný vplyv Th2 cytokínov, zvýšene produkovaných pri atopickej dermatitíde, na epidermálnu expresiu antimikróbnych peptidov²¹. Naopak, Th17 cytokíny zohrávajúce dôležitú úlohu v patogenéze psoriázy výrazne stimulujú syntézu AMP²². Relatívne nízke hladiny AMP v atopickej koži prispievajú k uľahčeniu kolonizácie zlatými stafylokokmi a zvyšujú riziko sekundárnej baktériovej infekcie ložísk atopickej dermatitídy a vývoja eczema herpeticum¹⁸.





Literatúra:

1. Bos JD, Meinardi MM. The 500 Dalton rule for the skin penetration of chemical compounds and drugs. *Exp Dermatol* 2000; 9(3): 165-169.
2. Niessen CM. Tight junctions/adherens junctions: basic structure and function. *J Invest Dermatol* 2007; 127(11): 2525-2532.
3. Bieber T. Atopic dermatitis. *N Engl J Med* 2008; 358(14): 1483-1494.
4. Hanifin JM. Evolving concepts of pathogenesis in atopic dermatitis and other eczemas. *J Invest Dermatol* 2009; 129(2): 320-322.
5. Elias PM, Hatano Y, Williams ML. Basis for the barrier abnormality in atopic dermatitis: Outside-inside-outside pathogenic mechanisms. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 121(6): 1337-1343.
6. McGrath JA, Uitto J. The filaggrin story: novel insights into skin-barrier function and disease. *Trends Mol Med* 2008; 14(1): 20-27.
7. Palmer CN, Irvine AD, Terron-Kwiatkowski A, Zhao Y, Liao H, Lee SP, Goudie DR, Sandilands A, Campbell LE, Smith FJ, O'Regan GM, Watson RM, Cecil JE, Bale SJ, Compton JG, DiGiovanna JJ, Fleckman P, Lewis-Jones S, Arseculeratne G, Sergeant A, Munro CS, El HB, McElreavey K, Halkjaer LB, Bisgaard H, Mukhopadhyay S, McLean WH. Common loss-of-function variants of the epidermal barrier protein filaggrin are a major predisposing factor for atopic dermatitis. *Nat Genet* 2006; 38(4): 441-446.
8. O'Regan GM, Sandilands A, McLean WH, Irvine AD. Filaggrin in atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 122(4): 689-693.
9. De Benedetto A, Rafaels NM, McGirt LY, Ivanov AI, Georas SN, Chedle C, Berger AE, Zhang K, Vidyasagar S, Yoshida T, Boguniewicz M, Hata T, Schneider LC, Hanifin JM, Gallo RL, Novak N, Weidinger S, Beaty TH, Leung DY, Barnes KC, Beck LA. Tight junction defects in patients with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 2011; 127(3): 773-786.
10. Cork MJ, Robinson DA, Vasilopoulos Y, Ferguson A, Moustafa M, MacGowan A, Duff GW, Ward SJ, Tazi-Ahnini R. New perspectives on epidermal barrier dysfunction in atopic dermatitis: gene-environment interactions. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 118(1): 3-21.
11. Jensen JM, Folster-Holst R, Baranowsky A, Schunck M, Winoto-Morbach S, Neumann C, Schutze S, Proksch E. Impaired sphingomyelinase activity and epidermal differentiation in atopic dermatitis. *J Invest Dermatol* 2004; 122(6): 1423-1431.
12. Hara J, Higuchi K, Okamoto R, Kawashima M, Imokawa G. High-expression of sphingomyelin deacylase is an important determinant of ceramide deficiency leading to barrier disruption in atopic dermatitis. *J Invest Dermatol* 2000; 115(3): 406-413.
13. Fartasch M, Bassukas ID, Diepgen TL. Disturbed extruding mechanism of lamellar bodies in dry non-eczematous skin of atopics. *Br J Dermatol* 1992; 127(3): 221-227.
14. De Benedetto A, Agnihotri R, McGirt LY, Bankova LG, Beck LA. Atopic dermatitis: a disease caused by innate immune defects? *J Invest Dermatol* 2009; 129(1): 14-30.
15. McGirt LY, Beck LA. Innate immune defects in atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 118(1): 202-208.
16. Ahmad-Nejad P, Mrabet-Dahbi S, Breuer K, Klotz M, Werfel T, Herz U, Heeg K, Neumaier M, Renz H. The toll-like receptor 2 R753Q polymorphism defines a subgroup of patients with atopic dermatitis having severe phenotype. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 113(3): 565-567.
17. Voss E, Wehkamp J, Wehkamp K, Stange EF, Schroder JM, Harder J. NOD2/CARD15 mediates induction of the antimicrobial peptide human beta-defensin-2. *J Biol Chem* 2006; 281(4): 2005-2011.
18. Howell MD, Wollenberg A, Gallo RL, Flaig M, Streib JE, Wong C, Pavicic T, Boguniewicz M, Leung DY. Cathelicidin deficiency predisposes to eczema herpeticum. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 117(4): 836-841.
19. Nomura I, Goleva E, Howell MD, Hamid QA, Ong PY, Hall CF, Darst MA, Gao B, Boguniewicz M, Travers JB, Leung DY. Cytokine milieu of atopic dermatitis, as compared to psoriasis, skin prevents induction of innate immune response genes. *J Immunol* 2003; 171(6): 3262-3269.
20. Kuo IH, Yoshida T, de BA, Beck LA. The cutaneous innate immune response in patients with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 2013; 131(2): 266-278.
21. Howell MD, Boguniewicz M, Pastore S, Novak N, Bieber T, Girolomoni G, Leung DY. Mechanism of HBD-3 deficiency in atopic dermatitis. *Clin Immunol* 2006; 121(3): 332-338.
22. Liang SC, Tan XY, Luxenberg DP, Karim R, Dunussi-Joannopoulos K, Collins M, Fouser LA. Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. *J Exp Med* 2006; 203(10): 2271-2279.