

DOI: 10.31146/1682-8658-ecg-159-11-38-43

УДК 616.37–089

Генетические полиморфизмы как предрасполагающие факторы хронического панкреатита

Тарасенко С. В., Натальский А. А., Богомолов А. Ю., Баконина И. В., Кадыкова О. А., Андрианова К. В.

ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России, 390026, Рязань, Россия

Genetic polymorphisms as predisposing factors of chronic pancreatitis

S. V. Tarasenko, A. A. Natalskiy, A. Yu. Bogomolov, I. V. Bakonina, O. A. Kadykova, K. V. Andrianova

Ryazan State Medical University, 390026, Ryazan, Russia

Для цитирования: Тарасенко С. В., Натальский А. А., Богомолов А. Ю., Баконина И. В., Кадыкова О. А., Андрианова К. В. Генетические полиморфизмы как предрасполагающие факторы хронического панкреатита. Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. 2018;159(11): 38–43.

DOI: 10.31146/1682-8658-ecg-159-11-38-43

For citation: Tarasenko S. V., Natalskiy A. A., Bogomolov A. Yu., Bakonina I. V., Kadykova O. A., Andrianova K. V. Genetic polymorphisms as predisposing factors of chronic pancreatitis. *Experimental and Clinical Gastroenterology*. 2018;159(11): 38–43. (In Russ.) DOI: 10.31146/1682-8658-ecg-159-11-38-43

✉ *Corresponding author:*

Натальский Александр Анатольевич
Aleksander A. Natalskii
lorey1983@mail.ru

Тарасенко Сергей Васильевич, д.м.н., профессор, зав. каф. госпитальной хирургии

Натальский Александр Анатольевич, д.м.н., доцент каф. госпитальной хирургии

Богомолов Алексей Юрьевич, ассистент каф. госпитальной хирургии

Баконина Ирина Владимировна, ассистент каф. госпитальной хирургии

Кадыкова Оксана Александровна, очный аспирант каф. госпитальной хирургии

Андрианова Кристина Викторовна, студент 6 курса, 24 группы лечебного факультета

Sergey V. Tarasenko, MD, Professor, Head of the Department of Hospital Surgery, ORCID: 0000-0002-0032-6831

Aleksander A. Natalskii, MD, Associate Professor of Department of Hospital Surgery, ORCID: 0000-0003-1590-9818

Aleksey Yu. Bogomolov, Intramural post-graduate student of Department of Hospital Surgery

Irina V. Bakonina, Assistant of Department of Hospital Surgery

Oksana A. Kadykova, post-graduate student of Department of Hospital Surgery

Kristina V. Andrianova, 6th year student of medical faculty Ryazan

Резюме

Цель. Целью работы явилось изучение полиморфизма ряда генов и их роль как предрасполагающих факторов развития хронического панкреатита.

Методы. Проведено исследование генетических полиморфизмов у 35 пациентов с хроническим панкреатитом. В опытной группе 8 женщин и 27 мужчин, средний возраст которых оставил 43,2±5,3 лет. Контрольную группу составили гипотетические исследуемые по общепризнанным данным для европеоидной расы. Было получено информированное согласие на участие в исследовании. Всем больным проводились стандартные общеклинические, биохимические анализы, так же анализу подвергали геномную ДНК человека, выделенную из лейкоцитов крови.

Результаты. Было обнаружено, что в опытной группе частота полиморфизма генов была выше, чем в контрольной группе. Нормальная гомозигота в опытной группе в генотипе отсутствовала среди всех генов: MMP1 (–1607delG); 9MMP9 (A-8202G); TIMP-1 (C536T); IL10 (G-1082A); OPG TNFRSF11B- (мутация G1181C); P450 (3A4 CYP3A4 1A/1B); P-450 (CYP1A1); LPL (мутация Ser447Ter), GSTP1 (мутация Ile105Val). Среди гетерозиготных генов преобладали полиморфизмы TIMP-1 (C536T), IL10(G-1082A), LPL (мутация Ser447Ter), P450 (CYP1A1), IL10 (G-1082A). Наибольшее число патологических гомозигот было выявлено MMP1, 9MMP9, P450 (3A4 CYP3A4 1A/1B), OPG.

Выводы. Исследование генетического полиморфизма человеческого генома показало, что имеет место высокий риск развития хронического панкреатита у пациентов с указанными полиморфизмами (MMP1, 9MMP9, P450 (3A4 CYP3A4 1A/1B), OPG). Получены достоверные различия частоты встречаемости мутаций генов в группах сравнения. Указанные полиморфизмы являются одними из факторов, предрасполагающих к развитию хронического панкреатита. Определение полиморфизма генов может использоваться в хирургической практике, включая комплексную диагностику и прогнозирование характера течения хронического панкреатита — развитие кистозной формы хронического панкреатита.

Ключевые слова: хронический панкреатит, полиморфизм генов

Summary

The aim of the work was the study of the polymorphism of a number of genes and their role as predisposing factors in the development of chronic pancreatitis.

Materials and methods: A study of genetic polymorphisms in 35 patients with chronic pancreatitis was carried out. Patients were divided into groups. In the experimental group, 8 women and 27 men, whose mean age was 43.2 ± 5.3 years. The control group was made up of hypothetical studies according to generally accepted data for the Caucasoid race. Informed consent to participate in the study was obtained. All patients underwent standard general clinical, biochemical analyzes, as well as human genomic DNA isolated from blood leukocytes was subjected to analysis.

Results: It was found that in the experimental group the frequency of gene polymorphism was higher than in the control group. Normal homozygote in the experimental group in the genotype was absent among all genes: MMP1 (-1607delG); 9MMP9 (A-8202G); TIMP-1 (C536T); IL10 (G-1082A); OPG TNFRSF11B- (mutation G1181C); P450 (3A4 CYP3A4 1A / 1B); P-450 (CYP1A1); LPL (Ser447Ter mutation), GSTP1 (mutation Ile105Val). Among heterozygous genes polymorphisms TIMP-1 (C536T), IL10 (G-1082A), LPL (mutation Ser447Ter), P450 (CYP1A1), IL10 (G-1082A) prevailed. The greatest number of pathological homozygotes was detected by MMP1, 9MMP9, P450 (3A4 CYP3A4 1A / 1B), OPG.

Conclusions: A study of the genetic polymorphism of the human genome showed that there is a high risk of developing chronic pancreatitis in patients with these polymorphisms (MMP1, 9MMP9, P450 (3A4 CYP3A4 1A / 1B), OPG). Significant differences in the frequency of occurrence of gene mutations in comparison groups were obtained. These polymorphisms are one of the factors predisposing to the development of chronic pancreatitis. The determination of gene polymorphism can be used in surgical practice, including complex diagnosis and predicting the nature of the course of chronic pancreatitis-the development of a cystic form of chronic pancreatitis.

Keywords: chronic pancreatitis, gene polymorphism

За последние десятилетия эпидемиологические, клинические и патологоанатомические исследования свидетельствуют о росте и «омоложении» заболеваемости хронического панкреатита в 2 раза [1,2]. Это связано как с увеличением частоты случаев заболеваний желчевыводящих путей и большого сосочка двенадцатиперстной кишки, являющиеся фоновыми для хронического панкреатита, так и с улучшением способов диагностики непосредственно самого заболевания. Ряд авторов отмечает популяризацию и увеличение употребления алкоголя в молодежной среде отдельных стран [3]. Нельзя исключить и воздействия неблагоприятных факторов внешней среды, которые влияя на геном клетки, определяющий синтез ферментов и структурных белков, ослабляют различные защитные механизмы. Исследования полиморфизма генов в настоящее время активно

проводятся в различных направлениях медицины, в том числе в хирургической гастроэнтерологии: диагностике хронического панкреатита. В патогенезе хронического панкреатита у большинства больных лежит повреждение ткани железы продуцируемыми ею пищеварительными ферментами. Выделяют следующие патогенетические факторы: затруднение оттока секрета железы в двенадцатиперстную кишку и гипертония, ненормально высокие объем и ферментативная активность сока поджелудочной железы, рефлюкс в протоковую систему поджелудочной железы содержимого двенадцатиперстной кишки и желчи [1].

Цель исследования: изучить частоту встречаемости ряда полиморфизмов генов для оценки прогноза развития хронического панкреатита у пациентов.

Материалы и методы исследования

В исследовании генетических полиморфизмов приняли участие 35 больных с верифицированным диагнозом хронический панкреатит, находившихся на стационарном лечении в Центре хирургии печени, поджелудочной железы и желчевыводящих путей г. Рязани. Опытную группу представили 27 мужчин и 8 женщин в возрасте от 18 до 75 лет, средний возраст составил $44,5 \pm 8,7$ лет. Все пациенты, участвовавшие в исследовании, дали на это письменное информированное добровольное согласие. Исследование выполнено в соответствии с требованиями Хельсинской декларации Всемирной медицинской ассоциации в редакции 2013 г.

Контрольную группу составили гипотетические исследуемые, данные которых общепризнаны

для европеоидной расы [5,6,7]. Для оценки работы использовались: архивные данные; общие клинические, биохимические анализы; анализ геномной ДНК человека, выделенной из лейкоцитов крови. Верификацию диагноза хронического панкреатита проводили с использованием общепринятых методов инструментальной диагностики: ультразвукового исследования (УЗИ), фиброгастродуоденоскопии (ФГДС), прямых методов рентгеноконтрастного исследования желчевыводящих путей и протоковой системы поджелудочной железы, компьютерной томографии (КТ) и магнитнорезонансной томографии (МРТ).

В рамках исследования проведен анализ полиморфизмов геномной ДНК человека, выделенной

из лейкоцитов крови, для генов матриксной металлопротеиназы-1 MMP1 (-1607delG), матриксной металлопротеиназы-9 MMP9 (мутация A-8202G), мутация тканевого ингибитора металлопротеиназы-1 TIMP-1 (C536T), мутация гена интерлейкина-10 IL10 (G-1082A), цитохрома P450 (3A4 CYP3A4 1A/1B), цитохрома P450 (CYP1A1), мутация рецептора 11B фактора некроза опухоли OPG TNFRSF11B (G1181C), мутация в гене липопротеиназы LPL (Ser447Ter), мутация гена р-глутатион S-трансферазы -1 GSTP1 (Ile105Val) с помощью реагента «ДНК-экспресс-кровь» при помощи системы «SNP-экспресс-РВ» ООО НТП «Литех» (г. Москва). С образцом выделенной ДНК параллельно проводили две реакции амплификации – с двумя парами аллель-специфичных праймеров. Результаты анализа позволяли дать три типа заключений: нормальная гомозигота, гетерозигота, мутантная гомозигота.

Результаты и их обсуждение

Распределение генотипов в исследуемых группах было следующим: нормальные гомозиготы гена MMP1 (AA) в опытной группе отсутствовали, в контрольной же, напротив, выявлены в 67,1% случаев; гетерозиготы (AG) встречались соответственно у 42,8% (15) и 46,5% пациентов; патологические гомозиготы (GG) в опытной группе выявлены у 57,2% (20 больных), в контрольной группе – у 13,6% (табл. 1). Полиморфизмы гена 9MMP9 в опытной группе был представлен только патологическими гомозиготами у 19 больных (54,3%) и гетерозиготами 16 – пациентов (45,7%), в контрольной группе преобладали нормальные гомозиготы AA и составили 61,2%, гетерозиготы AG – 34,7%, патологические гомозиготы GG – 4,1% (табл. 1). Нормальный генотип AA TIMP1 в опытной группе отсутствовал, напротив же, в контрольной обнаружен у 49,1%; гетерозигота (AG) встречалась у 97,3% (34) и 28% пациентов соответственно; генотип GG у опытной группы присутствовал у 2,9% (1) больных, у контрольной группы – 22,9% (табл. 1). Изучение полиморфизма IL10 в опытной группе выявило отсутствие гомозигот AA, в контрольной группе гомозиготы были 44,5%; генотип AG в опытной группе – у 60% (21 больной) и 55,5% в контрольной; патологические гомозиготы GG в опытной группе составили 40% (14 пациентов), а в контрольной группе отсутствовали (табл. 2). Полиморфизм гена цитохрома P450 3A4 в опытной группе был представлен только патологическими гомозиготами BB, в контрольной группе гетерозиготы AB определены у 56%, а патологические гомозиготы в 44% случаев (табл. 2). Гомозиготный вариант OPG TNF (GG) в опытной группе не обнаружен, в контрольной составил 75,1%; гетерозигота (GC) встречалась у 42,9% (15) и 15,4% пациентов соответственно; мутированный генотип (CC) в экспериментальной группе выявлен у 57,1% (20), в контрольной группы – 22,9%. Изучение полиморфизма LPL (SS) в опытной группе выявило полное отсутствие гомозигот, в контрольной группе гомозиготы были у 64,7%; гетерозигота (ST) в опытной группе определена у 73,4% (26) и 35,3% в контрольной; гомозиготный

Статистическую обработку выполняли при помощи пакета Microsoft Excel 7.0. Для оценки ассоциации изучаемых полиморфных вариантов генов с риском развития осложненных форм ХП рассчитывали отношение шансов OR (Odds Ratio). $OR = (a \times d) / (b \times c)$, где a – частота аллеля (генотипа) в выборке больных, b – частота аллеля (генотипа) в контрольной выборке, сумма частот остальных аллелей (генотипов) в выборке больных, d – сумма частот остальных аллелей (генотипов) в контрольной выборке. OR = 1 рассматривали как отсутствие ассоциации; OR > 1 – как положительную ассоциацию («повышенный риск развития патологии»), OR < 1 – как отрицательную ассоциацию аллеля или генотипа с заболеванием («пониженный риск развития патологии»). Применялся F-критерий Фишера, критерий, достоверными считались значение $P < 0,05$.

вариант TT мутированного гена LPL в опытной группе обнаружен у 25,7% (9), в контрольной группе генотип TT отсутствовал (табл. 1, 2). Гомозиготы гена P450 CYP 1A1 (AA) в опытной группе не найдены, в контрольной группе представлены у 97,8%; мутированный ген цитохрома в опытной группе был представлен только гетерозиготами AA1–100% (35) и у 46,5% пациентов контрольной группы; патологические гомозиготы A1A1 не выявлены в обеих группах (табл. 1, 2). В группе сравнения гомозиготы GSTP1 (IleIle) присутствовали у 86,7% человек; мутация гена GSTP1 опытной группы была представлена преимущественно гетерозиготами IleVal – 65,7% (23) и патологическими гомозиготами ValVal – 34,3% (12). В контрольной группе генотипы IleVal и ValVal встречались у 12,4% и 0,9% человек соответственно. Следует отметить, что максимальные значения отношения шансов OR получены для мутаций гена MMP9 и MMP1 равные 14,25 и 8,5 соответственно.

Следует отметить, что у больных хроническим панкреатитом наблюдалось полное отсутствие гомозиготных генов (полностью здоровых).

Больные опытной группы были разбиты на подгруппы по морфологическому признаку в соответствии с классификацией Ивашкина, 1990 г. (табл. 3).

Наиболее значимым с точки зрения хирурга является кистозная форма ХП [8], так как именно данная форма приводит к развитию осложненных клинических форм хронического панкреатита: развитию синдрома механической желтухи, портальной гипертензии, дуоденостаза. В связи с чем, нами был проведен сравнительный анализ распределения изучаемых полиморфизмов генов у пациентов с кистозной формой ХП и с некистозными формами (табл. 4).

Наибольшее значение отношения шансов в опытной группе превышает единицу более чем в 14 раз, что свидетельствует о том, что носительство гетерозиготы и мутантной гомозиготы в изучаемых генах является фактором риска развития хронического панкреатита.

Гены	Нормальные гомозиготы		Гетерозиготы		Патологические гомозиготы		OR
	Опытная	Контрольная	Опытная	Контрольная	Опытная	Контрольная	
MMP1	-	67,1%	42,8%	23,3%	57,2%	9,6%	8,5
9MMP9	-	61,2%	45,7%	34,7%	54,3%	4,1%	14,250
TIMP1	-	49,1%	97,3%	28%	2,9%	22,9%	0,037
IL10	-	44,5%	60%	55,5%	40%	-	-
P450 3A4	-	-	-	56%	100%	44%	-
OPG TNF	-	75,1%	42,9%	15,4%	57,1%	9,5%	2,222
LPL	-	64,7%	74,3%	35,3%	25,7%	-	-
P450 CYP1A1	-	97,8%	100%	2,2%	-	-	-
GSTP1	-	86,7%	65,7%	12,4%	34,3%	0,9%	2,087

Таблица 1.
Распределение полиморфизмов исследуемых генов в группах сравнения

Table 1.
The distribution of polymorphisms of the studied genes in the comparison groups

Название гена	Количество больных, n (%)		
	Нормальные гомозиготы	Гетерозиготы	Патологические гомозиготы
MMP1	-	15 (42,8%)	20 (57,2%)
9MMP9	-	16 (45,7%)	19 (54,3%)
TIMP1	-	34 (97,3%)	1 (2,9%)
IL10	-	21 (60%)	14 (40%)
P450 3A4	-	-	35 (100%)
OPG TNF	-	15 (42,9%)	20 (57,1%)
LPL	-	26 (74,3%)	9 (25,7%)
P450 CYP1A1	-	35 (100%)	-
GSTP1	-	23 (65,7%)	12 (34,3%)

Таблица 2.
Распределение генотипов в опытной группе

Table 2.
The distribution of genotypes in the experimental group

Морфологическая форма	Число пациентов (n)
Интерстициально-отечный	7
Паренхиматозный	4
Индуративный	5
Псевдотуморозный	3
Кистозный	16
Всего	35

Таблица 3.
Классификация хронического панкреатита

Table 3.
Classification of chronic pancreatitis

Аллели	Кистозная форма (n=16) N (%)	Некистозная форма (n=19) N (%)	F-Критерий, P	Критерий, P	OR, P
Полиморфизм <i>MMP1</i> (-1607delG)					
Гетерозигота	2 (12,5%)	13 (68,4%)	0,00163	11,09	OR = 0,066
Патологическая гомозигота	14 (87,5%)	6 (31,6%)	P < 0,05	P < 0,001	(0,011 до 0,378) CI 95%
Полиморфизм <i>9MMP9</i> (A-8202G)					
Гетерозигота	1 (6,3%)	15 (78,9%)	0,00002	18,49	OR = 0,018
Патологическая гомозигота	15 (93,7%)	4 (21,1%)	P < 0,05	P < 0,001	(0,002 до 0,178) CI 95%
Полиморфизм <i>TIMP-1</i> (C536T)					
Гетерозигота	15 (93,6%)	19 (100%)	0,45714	1,222	-
Патологическая гомозигота	1 (6,4%)	0 (0%)	P > 0,05	P = 0,269	-
Полиморфизм <i>IL10</i> (G-1082A)					
Гетерозигота	9 (56,3%)	12 (63,2%)	0,73911	0,175	OR = 0,75
Патологическая гомозигота	7 (43,7%)	7 (36,8%)	P > 0,05	P = 0,678	(0,193 до 2,917) CI 95%
Полиморфизм <i>P450</i> (3A4 CYP3A4 1A/1B)					
Гетерозигота	0 (100%)	0 (0%)	1,0	-	-
Патологическая гомозигота	16 (100%)	19 (100%)	P > 0,05	-	-

Таблица 4.
Сравнение частоты встречаемости полиморфизмов у пациентов с кистозной и некистозной формой ХП.

Table 4.
Comparison of the frequency of occurrence of polymorphisms in patients with cystic and non-cystic chronic pancreatitis

Таблица 4.
продолжение

Аллели	Кистозная форма (n=16) N (%)	Некистозная форма (n=19) N (%)	F-Критерий, P	Критерий, P	OR, P
Полиморфизм <i>P450 (CYP1A1)</i>					
Гетерозигота	16 (100%)	19 (100%)	1,0	-	-
Патологическая гомозигота	0 (0%)	0 (0%)	P > 0,05	-	-
Полиморфизм <i>OPG TNFRSF11B (G1181C)</i>					
Гетерозигота	6 (37,5%)	9 (47,4%)	0,73378	0,345	OR = 0.667 (0,172 до 2,584) CI 95%
Патологическая гомозигота	10 (62,5%)	10 (52,6%)	P > 0,05	P=0,557	
Полиморфизм <i>LPL (Ser447Ter)</i>					
Гетерозигота	12 (75,0%)	14 (73,7%)	1,0	0,007	OR = 0.778 (0,233 до 4,920) CI 95%
Патологическая гомозигота	4 (25,0)	5 (26,3%)	P > 0,05	P=0,934	
Полиморфизм <i>GSTP1 (Ile105Val)</i>					
Гетерозигота	11 (68,8%)	12 (63,2%)	1,0	0,121	OR = 1,283 (0,313 до 5,253) CI 95%
Патологическая гомозигота	5 (31,2%)	7 (36,8%)	P > 0,05	P=0,729	

Выводы

- Исследование генетического полиморфизма человеческого генома показали, что имеет место положительное предсказательное значение и прямая корреляция между полиморфизмом генов и развитием хронического панкреатита.
- Среди всех клинических форм хронического панкреатита кистозная является наиболее генетически обусловленной.
- Полиморфизмы генов металлопротеиназы-1 и металлопротеиназы-9 достоверно чаще встречаются у лиц, страдающих хроническим панкреатитом и в частности являются генетическими факторами риска развития кистозной формы хронического панкреатита.

Работа выполнена в рамках гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых МД-2376.2017.

Литература | References

- Васильев Ю. В.* Этиопатогенетические и клинические аспекты хронического алкогольного панкреатита. *Гепатология.* – 2006. – № 3. – С. 19–24.
Vasiliev Yu. V. Etiopathogenetic and clinical aspects of chronic alcoholic pancreatitis. *Hepatology.* – 2006. – №3. – P.19-24.
- Тарасенко С. В., Песков О. Д., Милов Д. И., Артамонов С. В.* Клинические формы деструктивного панкреатита. *Российский медико-биологический вестник имени академика И. П. Павлова.* – 2001. – № 3–4. – С. 40–42.
Tarasenko S. V., Peskov O. D., Mirov D. I., Artamonov S. V. Clinical forms of destructive pancreatitis. *Russian Medical and Biological Bulletin named after academician I.P. Pavlova.* – 2001. – № 3–4. – p. 40–42.
- Калинин А. В.* Хронический панкреатит: распространенность, этиология, патогенез, классификация и клиническая характеристика этиологических форм. *Клинические перспективы гастроэнтерологической гепатологии.* – 2006. – № 6. – С. 5–15.
Kalinin A. V. Chronic pancreatitis: prevalence, etiology, pathogenesis, classification and clinical characteristics of etiological forms. *Clinical perspectives of gastroenterological hepatology.* – 2006. – №6. – p. 5–15.
- Григорьева И. Н.* Острый и хронический панкреатит. Новосибирск, 2010.
Grigorieva I. N. Acute and chronic pancreatitis. Novosibirsk, 2010.
- Dorr S, Lechtenbohmer N, Rau R et al.* Association of a specific haplotype across the genes MMP1 and MMP3 with radiographic joint destruction in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther.* – 2004. – V.6. – P.199–207
- Tanindi A., Sahinarslan A, Elbeg S, Cemri M.* Relationship Between MMP-1, MMP-9, TIMP1, IL-6 and Risk Factors, Clinical Presentation, Extent and Severity of Atherosclerotic Coronary Artery Disease. *Open Cardiovasc Med J.* – 2011. – V.5. – P. 110–116.
- Коненков В. И., Шевченко А. В., Прокофьев В. Ф., Королев М. А., Климонтов В. В., Чердынцева Н. В., Покушалов Е. А., Караськов А. М.* Цитокиновые генные сети в персонализированном прогнозе состояния здоровья человека и формирования групп высокого риска развития заболеваний для проведения профилактических мероприятий. *Профилактическая медицина.* – 2013. – Т. 16(4). – с. 19–26.

Konenkov VI, Shevchenko AV, Prokof'ev VF, Korolev MA, et al. Cytokine gene networks in the personalized prediction of the human health status and in the formation of high disease risk factors for implementation of preventive measures. *Profilakticheskaya meditsina.* 2013;16(4):19–26

8. *Тарасенко С. В., Карюхин И. В., Рахмаев Т. С., Зайцев О. В.* Пункционно-дренирующие вмешательства под контролем уз-аппарата в лечении паци-

ентов с кистозными поражениями поджелудочной железы. // *Наука молодых – Eruditio juvenium,* – 2013. – № 1. – С. 20–25.

Tarasenko S. V., Karyukhin I. V., Rakhmaev T. S., Zaitsev O. V. Percutaneous ultrasound-guided puncture-draining interventions in treatment of patients with pancreatic cysts. *Nauka molodykh (Eruditio Juvenium).* 2013, No.1, pp.20–25.