

江苏地区全血献血者铁代谢相关基因多态性与铁储备水平的相关性分析*

邵雷¹ 王金花¹ 林红¹

[摘要] 目的:探讨全血献血者铁代谢相关基因多态性与铁储备水平的相关性。方法:采用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测江苏地区合格献血者血清铁蛋白(SF)浓度,根据SF浓度将所有受检者按照SF<10 ng/mL铁缺乏、10<SF<30 ng/mL铁不足、30<SF<300 ng/mL铁正常、SF>300 ng/mL铁过载分为4组,并提取全血基因组DNA,用PCR方法扩增HFE、GDF15和TMPRSS6基因,利用基因测序对多态性位点进行分型,统计分析基因频率和基因型频率。结果:前期试验对46例SF浓度>300 ng/mL献血者进行基因测序发现HFE rs2071303表现出多态性,其中正常基因型T/T占10.9%(5例),C/T杂合突变占36.9%(17例),C/C纯合突变占52.2%(24例),基因频率及基因型频率均符合Hardy-weinberg平衡定律($P>0.05$);另检出5例H63D突变杂合子,占10.9%,其余全为正常基因型。在所有受检者中,TMPRSS6 17号外显子检出4个SNPs位点,TMPRSS6 18号外显子仅检出2个位点且各有1例杂合突变,各位点基因频率及基因型频率均符合Hardy-weinberg平衡定律($P>0.05$)。GDF15检出2个SNPs位点,基因频率及基因型频率均符合Hardy-weinberg平衡定律($P>0.05$);在GDF15基因上还分别检出4个位点上的4例杂合突变。以上所有位点在性别、SF浓度分布上均差异无统计学意义($P>0.05$)。结论:江苏地区全血献血者HFE、GDF15和TMPRSS6基因均具有多态性。H63D突变和rs2071303突变位点与铁过载有相关性值得继续研究,而GDF15和TMPRSS6的基因多态性如何影响献血者铁储备水平还需扩大样本量进一步探讨。

[关键词] 全血献血者;铁代谢相关基因;血清铁蛋白;基因频率;基因型频率

doi:10.13201/j.issn.1004-2806-b.2020.08.010

[中图分类号] R457.1 **[文献标志码]** A

Correlation between genetic polymorphism of iron metabolism-related gene and iron stores in Jiangsu

SHAO Lei WANG Jinhua LIN Hong

(Jiangsu Province Blood Center, Nanjing, 210042, China)

Corresponding author: LIN Hong, Email: linhong712003@sina.com

Abstract Objective: To explore the correlation between polymorphism of iron metabolism-related gene and iron stores in whole blood donors. **Method:** The serum ferritin concentration of whole blood donors in Jiangsu area were detected by ELISA method, all subjects were divided into four groups according to SF concentration: SF<10 ng/mL (Iron deficiency), 10<SF<30 ng/mL (depleted iron store), 30<SF<300 ng/mL (Iron normal), SF>300 ng/mL (Iron overload). The genomic DNA was extracted according to the concentration value. HFE, GDF15 and TMPRSS6 gene were amplified by PCR method, polymorphism sites were classified by gene sequencing, and gene frequencies and genotype frequencies were statistically analyzed. **Result:** Sequencing 46 blood donors with SF concentration greater than 300 ng/mL, the normal genotype T/T accounted for 10.9% (5 cases), C/T heterozygous mutation accounted for 36.9% (17 cases), and C/C homozygous mutation accounted for 52.2% (24 cases) in the 5' end of intron 2 of HFE gene (rs2071303). Gene frequency and genotype frequency were in line with Hardy-Weinberg equilibrium ($P>0.05$). In addition, 5 cases of H63D mutant heterozygotes were detected, accounting for 10.9%, and the rest were all normal genotypes. Among all the subjects, 4 SNPs sites were detected on exon 17 of TMPRSS6 gene and only 2 heterozygous mutations were detected at 2 sites on exon 18 of TMPRSS6 gene, 2 SNPs sites on GDF15 gene, and the gene frequency and genotype frequency were in line with Hardy-Weinberg equilibrium ($P>0.05$). Besides, 4 heterozygous mutations were detected at 4 sites on GDF15 gene. There was no statistical difference in gender and SF concentration distribution of the above sites ($P>0.05$). **Conclusion:** There are polymorphisms of HFE, GDF15 and TMPRSS6 genes in whole blood donors in Jiangsu area. The correlation between H63D and rs2071303 and iron overloading may be worthy of further study. However, how the genetic polymorphisms of GDF15 and TMPRSS6 affect the iron stores of blood donors needs to be further discussed by expanding the sample size.

Key words whole blood donors; iron metabolism-related gene; serum ferritin; gene frequency; genotype frequency

*基金项目:江苏省卫健委“六个一工程”项目(No: LGY2016045)

¹江苏省血液中心输血研究室(南京, 210042)

通信作者:林红, E-mail: linhong712003@sina.com

铁是许多生理功能必需的营养物质,也是许多代谢反应的基本辅因子,是血红蛋白携氧和电子传递链蛋白正常运转的重要保障。在细胞内,铁与铁转运蛋白结合,而不直接用于生理作用的铁会以铁蛋白的形式储存于细胞内;血液中少量铁蛋白与细胞内铁蛋白处于平衡状态,因此,血清铁蛋白水平在大多数情况下被认为是体内铁储备可靠的临床指标^[1]。对于献血者来说,随着铁的损失量超过吸收量,铁逐渐缺乏;当存储铁开始消耗时,缺铁性红细胞就会逐渐生成,最终导致缺铁性贫血的发生。通过对全血献血者血清铁蛋白水平的调查,评估铁储备状况,发现献血是引起铁缺乏的可能原因之一^[2]。随着人们对营养基因组学研究的日益深入,与铁代谢相关基因的多态性所带来的铁营养状况问题已逐渐被认知,而基因多态性与铁营养状况关系的发现,为解释某些群体营养现象甚至提早预测和评估人群和个人铁营养状况提供了可能^[3]。*HFE* 是第一个被确定的遗传性血色病(hereditary hemochromatosis,HH)相关基因,而具有 C282Y 和 H63D 突变者,不能上调铁调素(Hepcidin)降低铁的吸收,导致铁过载^[4];由 *TMPRSS6* 编码的 Matriptase-2 是一种丝氨酸蛋白酶,在 Hepcidin 表达和维持铁稳态中发挥重要作用^[5]。*HFE* 和 *TMPRSS6* 被认为可能通过影响铁的利用率来影响红细胞计数、血红蛋白等。研究发现,红细胞分泌生长分化因子 15(growth differentiation factor 15, *GDF15*)是转化生长因子(TGF)- β 超家族成员之一,在红细胞成熟过程中表达和分泌,有助于病理状态下 Hepcidin 的抑制,因此 *GDF15* 被认为是影响红细胞生成和 Hepcidin 调控铁代谢的重要蛋白^[6-7]。但 *GDF15* 与铁储备的关系尚不明确,针

对献血者 *GDF15* 基因多态性的研究也鲜有报道。在我国,遗传因素与铁代谢或者铁储备水平的关系研究很少,由于我国人群与其他民族人群遗传背景存在较大差异,铁代谢相关基因及其突变频率与其他民族之间也不同。基于以上,本研究对全血献血者 *HFE*、*GDF15* 和 *TMPRSS6* 的 SNPs 进行检测,探讨影响献血者铁储备水平的分子机制,从而给献血者恰当的献血频率的指导,并作为是否需要服用铁补剂的指标。

1 材料与方法

1.1 研究对象

2017-08—2018-04 对我中心 1 010 例合格献血者进行血清铁蛋白(serum ferritin,SF)检测,经知情同意后留取血清和白膜统一冻存于 -80℃ 冰箱备用。

1.2 SF 浓度检测

按照 Human FE Elisa Kit 产品说明书进行测定,用酶标仪 450 nm 波长读取吸光度 A 值,根据标准品绘制标准曲线,计算得出样品浓度,根据 SF 值将所有受检者按照 SF<10 ng/mL 铁缺乏、10<SF<30 ng/mL 铁不足、30<SF<300 ng/mL 铁正常、SF>300 ng/mL 铁过载分为 4 组。

1.3 全血基因组 DNA 提取

采用 Axygen DNA 提取试剂盒提取基因组 DNA,NanodropDNA 定量仪测定浓度和纯度,DNA 浓度为(50~100)ng/ μ L,纯度($A_{260/280}$)为 1.70~1.80。

1.4 PCR 扩增和测序分型

对 *HFE*、*GDF15* 和 *TMPRSS6* exon 17、exon 18 进行 PCR 扩增,引物序列见表 1。

表 1 PCR 引物序列

引物	序列(5'-3')	引物长度/bp	产物大小/bp
HFE F	GCA ACT CAC CCT TCA CAA AAT	21	1 012
HFE R	GAG AAA GTC CCT TCC CAG A	19	
GDF15 F	AGC TTT ACT AGG AGC GCC CCC A	22	480
GDF15 R	TGG CGT GAG TAT CCG GAC TGC A	22	
TMPRSS6 EXON17 F	AGA AGT AGG CTC CTG AGA TG	20	335
TMPRSS6 EXON17 R	AGG CTT CAG CAG GCT GAT GT	20	
TMPRSS6 EXON18 F	TTT AAG ACT GAA CGT GAC TCT GG	23	426
TMPRSS6 EXON18 R	GAG ACA AGA TGC CAC CTC CTG	21	

使用 20 μ L 扩增反应体系,包括 5 \times PCR Buffer 10 μ L,dNTP(2 mol/L)2 μ L,引物(10 mol/L)各 1 μ L,Taq DNA 聚合酶(5 U/ μ L)0.5 μ L,基因组 DNA(50~100)ng/ μ L 2 μ L,补 ddH₂O 至 20

μ L。用 ABI 9700 型 PCR 扩增仪,PCR 反应条件为:95℃ 预变性 5 min;95℃ 变性 30 s,58℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 1 min/30 s,35 个循环;72℃ 延伸 7 min,PCR 产物用 2%的琼脂糖进行电泳,使用全自

动数码凝胶图像分析系统(Tanon-2500,上海天能)观察特异性扩增产物并拍照记录。PCR 产物纯化后送上海华大基因测序,测序引物与扩增引物相同,测序结果用 Chromos 和 Mega6.0 软件进行比对。

1.5 统计学分析

使用 SPSS 19.0 统计软件计算 SNP 位点的等位基因和基因型频率,应用拟合优度 χ^2 检验对检测到的突变位点基因型进行 Hardy-Weinberg 平衡检验,应用 Kruskal-Wallis(KW)检验对多组数据进行非参数检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 SF 检测结果

1 010 例献血者血样样品 SF 检测结果如下:SF<10 ng/mL 铁缺乏组 67 例、10<SF<30 ng/mL 铁不足组 132 例、30<SF<300 ng/mL 铁正常 765 例、SF>300 ng/mL 铁过载组 46 例。本试验中献血者铁缺乏率为 6.63%。

2.2 测序结果

从 765 例铁正常组献血者中随机选取 110 例作为对照组,以及铁储备水平异常献血者 59 例,共计 169 例血液标本进行基因多态性分析

2.2.1 HFE 基因多态性测序结果 46 例 SF>300 ng/mL 的献血者 HFE 基因 2 号内含子 5' 端 5 号碱基 rs2071303 表现出多态性,其中正常基因型 T/T 5 例,C/T 杂合突变 17 例,C/C 纯合突变 24 例;另检出 5 例 rs1799945 C/G 杂合突变,其余全为正常基因型。见图 1。

2.2.2 TMPRSS6 基因 17、18 号外显子多态性测序结果 在 169 例受检者中, TMPRSS6 基因 17

号外显子检出 4 个 SNPs 位点:rs748638433、rs143875335、rs2235321、rs855791,18 号外显子仅检出 rs146358284 1 例杂合突变。见图 2。

2.2.3 GDF15 基因多态性测序结果 在 169 例受检者中,检出 rs17526126、rs141542836、rs1059369、rs376237203 各 135 例,检出 rs1059519 111 例,且都具有多态性,其中 rs1059519 和 rs1059369 的多态性较为丰富,其余位点仅检测到 1 例杂合突变。见图 3。

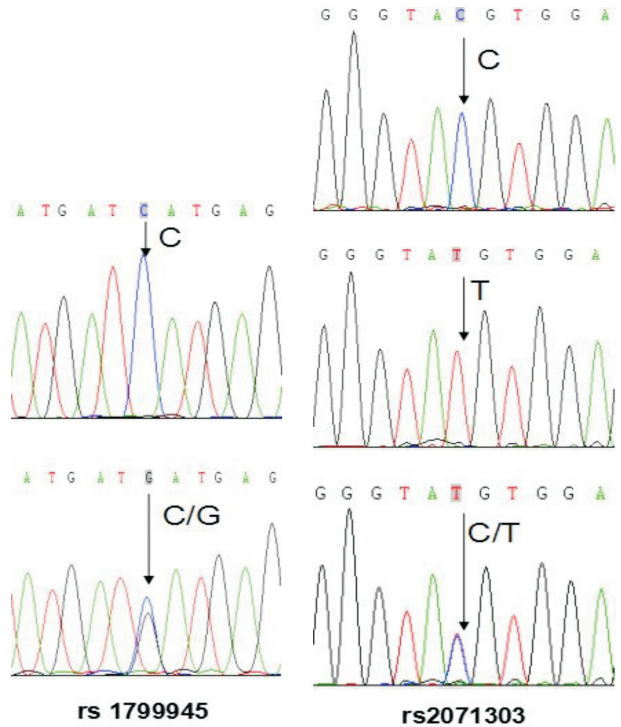


图 1 HFE 基因 rs2071303、rs1799945 位点测序峰图

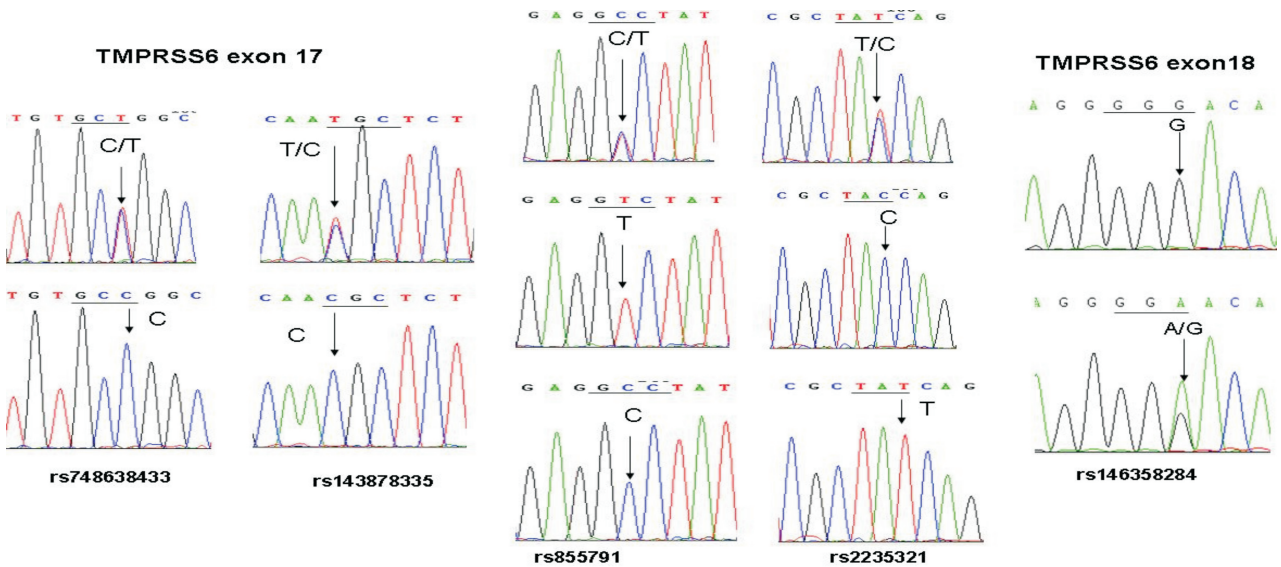


图 2 TMPRSS6 基因 exon 17、18 多态性测序峰图

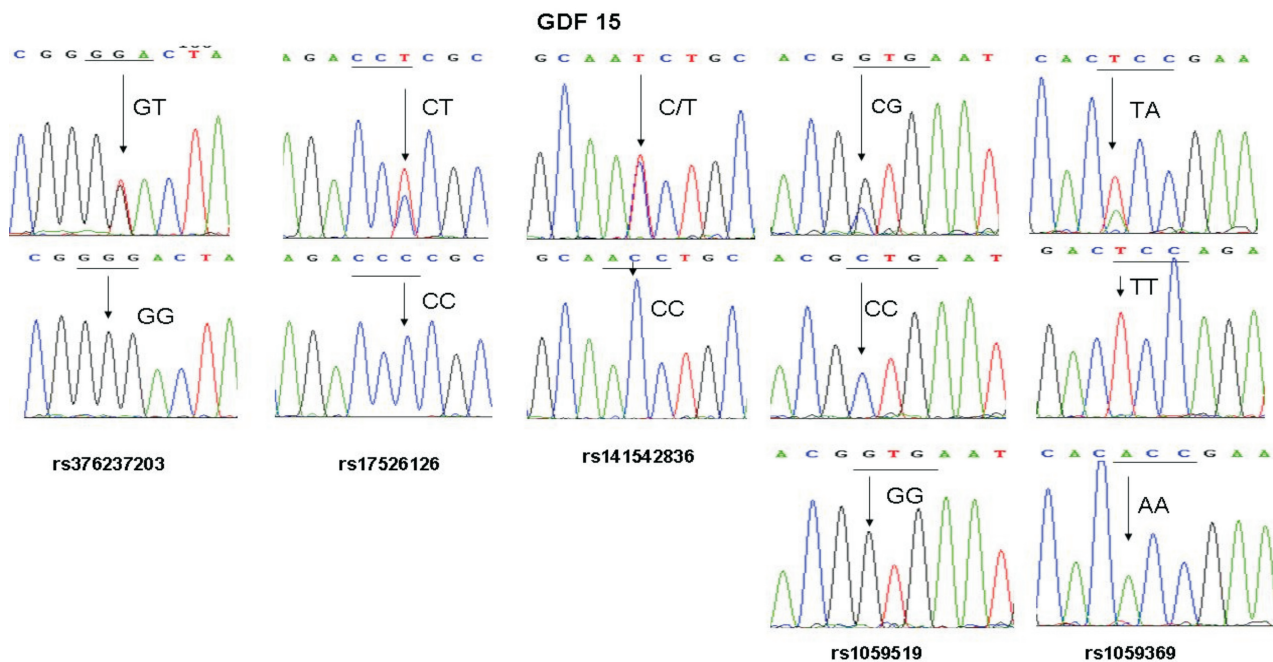


图 3 GDF15 基因多态性测序峰图

2.2.4 不同血清铁蛋白水平的人群,铁代谢相关基因多态性分布情况 经测序和序列比对,本次实验检测到的 *HFE*、*GDF15* 和 *TMPRSS6* 多态性位点见表 2,对相关多态性位点进行 Hardy-Weinberg 平衡(HWE)检验,结果显示除 *GDF15* rs1059369 ($P = 0.0002$) 外,其余所有基因型分布均符合

Hardy-Weinberg 平衡 ($P > 0.05$),说明本研究的人群遗传符合孟德尔遗传规律。

统计各组的分布情况进行组间差异检验,结果显示各位点在不同血清铁蛋白水平分组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 3。

表 2 HFE、TMPRSS、GDF15 多态性位点基因型分布

SNPs	基因型	H-W 平衡检验	SNPs	基因型	H-W 平衡检验
HFE rs2071303	TT	5	TMPRSS6 rs146358284	GG	150
	TC	24		GA	1
	CC	17		AA	0
HFE rs1799945	CC	41	GDF15 rs17526126	CC	134
	CG	5	CT	1	
	GG	0	TT	0	
TMPRSS6 rs2235321	TT	30	GDF15 rs141542836	CC	134
	TC	93	CT	1	
	CC	46	TT	0	
TMPRSS6 rs748638433	TT	0	GDF15 rs376237203	GG	134
	TC	1	GT	1	
	CC	23	TT	0	
TMPRSS6 rs143875335	TT	0	GDF15 rs1059369	TT	72
	TC	14	TA	40	
	CC	155	AA	23	
TMPRSS6 rs855791	TT	42	GDF15 rs1059519	CC	50
	TC	91	CG	52	
	CC	36	GG	9	
TMPRSS6 rs48259	TT	150			
	TC	1			
	CC	0			

表 3 HFE、TMPRSS6、GDF15 SNPs 在献血人群中的基因型分布和 H-W 平衡检测

基因(SNP)	基因型	铁缺乏 (SF<10 ng/mL)		铁不足 (10<SF<30 ng/mL)		铁正常 (30<SF<300 ng/mL)		铁过载 (SF>300 ng/mL)	
			P (HWE)		P (HWE)		P (HWE)		P (HWE)
HFE rs2071303	CC							17	0.417
	CT							24	
	TT							5	
HFE rs1799945	CC							41	0.697
	CG							5	
	GG							0	
TMPRSS6 rs2235321	CC	3	0.540	3	0.132	31	0.507	9	0.199
	CT	2		9		58		24	
	TT	1		1		21		7	
TMPRSS6 rs748638433	CC	4		4		15	0.897		
	CT	0		0		1			
	TT	0		0		0			
TMPRSS6 rs143875335	CC	6		12	0.885	101	0.655	36	0.739
	CT	0		1		9		4	
	TT	0		0		0		0	
TMPRSS6 rs855791	TT	2	0.414	2	0.391	31	0.805	7	0.113
	TC	2		8		56		25	
	CC	2		3		23		8	
GDF15 rs1059369	TT	2	0.659	5	0.875	46	0.001	19	0.007
	TA	4		5		23		8	
	AA	1		1		14		7	
GDF15 rs1059519	CC	2		4	0.427	28	0.394	16	0.437
	CG	1		2		33		16	
	GG	0		1		6		2	

3 讨论

献血者的铁缺乏现象,尤其是在女性和固定献血者中,近几年引起了极大的关注,世界多个国家发现固定献血者和育龄女性献血者的铁缺乏率偏高,建议延长献血间隔期和补充铁剂降低铁缺乏率,保护献血者健康。同时还发现,遗传因素如基因多态性位点与铁代谢具有相关性^[8]。本课题组对全血献血者 SF 水平进行调查,发现铁缺乏率处于较低水平,这主要是我国全血献血间隔期较长,有利于献血者恢复。本研究将铁缺乏率调查中铁过载和铁缺乏献血者作为研究对象,对其基因多态性进行了检测和分析,有些新发现。

3.1 HFE 基因与 HH

HFE 基因遗传多态性(C282Y 和 H63D)会影响 Hcpidin 的正常活性,而 Hcpidin 是铁的负调节因子,使得体内铁吸收过度增加,导致遗传性血色病。治疗性静脉放血是治疗此类疾病的主要方式,所以这些患者是理想的献血者^[9]。据报道,基因突变在不同种族间差别较大,对于 C282Y(rs1800562),突变的 A 等位基因纯合子在欧洲东南部高加索地区、美国和其他欧洲人群中分别占 1.8%、0.3%和 0.2%,而在亚洲人群中分布较低,仅在南亚地区检出 0.4%的杂合突变。本实验在

46 例铁过载全血献血者中未检出 C282Y 突变,与亚洲人群的分布规律相符。另一个主要的致病性突变位点是 H63D(rs1799945),组氨酸替换为天冬氨酸,导致铁稳态的破坏,引起铁的积累,特别是当它与 C282Y 多态性同时发生时。在高加索地区、美国、其他欧洲人群中,突变的 G 等位基因纯合子分别占 2.6%、2.6%、3.6%。在中国 105 例南部汉族人群中检测到 4 例(3.8%)杂合突变和 1 例(1.0%)纯合突变。在中国傣族人群和北京地区的汉族人群中均只检测到杂合突变(基因型 G/C),比例分别为 4.3%、5.8%^[4]。本研究共检测到 5 例(10.9%)杂合突变,无纯合突变,且与上述 3 个中国人群进行统计学分析差异无统计学意义(均 $P > 0.05$)。本实验还检测到 HFE 基因一个突变频率较高的多态性位点 rs2071303(C/C:17 例、C/T:24 例、T/T:5 例),通过与一项亚欧大陆中部人群的研究结果(C/C:6 例、C/T:24 例、T/T:20 例)比较后发现,差异有统计学意义($P = 0.0001$)。这个基因多态性是否与铁代谢异常具有相关性还需进一步探讨。

3.2 TMPRSS6 基因多态性与铁储备

近年来的研究显示, TMPRSS6 基因突变与缺铁性贫血相关。在 TMPRSS6 中发现的多个常见

的突变都与欧洲人群的血清铁浓度和血红蛋白浓度显著相关^[10-11]。*TMPRSS6* 基因的重要性还体现在其核苷酸多态性位点 (SNPs) (rs855791, rs820268) 与血清铁、血红蛋白等指标的降低有关, 与欧美人群一致的是, 在中国人群中 *TMPRSS6* 的 rs855791 多态性与缺铁性贫血有关。研究发现, *TMPRSS6* exon 17 的基因多态性比较丰富, 169 例受检者中检出 4 个 SNPs 位点, rs748638433、rs143875335、rs2235321、rs855791, exon 18 仅在 2 个位点上 (rs1037300825 和 rs146358284) 检出各 2 例杂合突变。将 169 例受检者按血清铁蛋白水平进行分组并对检测出的多态性位点进行组间差异分析, 均差异无统计学意义。携带 *TMPRSS6* rs855791 等位基因 C 的献血者, 尤其是女性献血者, 其体内 Hepcidin 水平偏低; 献血后不易出现铁缺乏^[3]。*TMPRSS6* 基因的 rs855791, 缬氨酸 (V) 突变为丙氨酸 (A) (A736V), 与 Hb 水平及 MCV 的改变密切相关, Langer 等^[12] 分析了多次献血者随机样品中的 *TMPRSS6* A736V 的改变情况, 发现约有 40% 为 A/A, 40% A/V, 20% V/V。对于女性来说, A/A 者的平均 SF 浓度高于 V/V 者 77%, A/V 者平均 SF 高出 54%。本研究, 一共在 55 例女性献血者中检测到 rs855791 多态性, 其中 A/A 11 例、A/V 29 例、V/V 15 例, 3 种基因型的平均 SF 分别为 75 ng/mL、75 ng/mL、62 ng/mL, A/A 者和 A/V 者平均 SF 均比 V/V 者高出 21%。

3.3 *GDF15* 基因多态性与铁储备

黄春妮等^[13] 研究了 *GDF15* 基因相关 SNP 位点与地中海贫血患者铁过载的关联性, 检测了 rs1059369、rs4808793、rs1058587 3 个位点, 发现位点 rs1059369 铁过载患者 A/A 及 A/T 基因型频率较正常组和无铁过载组显著增加, 地中海贫血铁过载的发病风险增加; rs4808793 位点对照组与无铁过载组及铁过载组的基因型分布差异有统计学意义, 携带 C/C 基因型的个体患铁过载的风险增加; 但 rs4808793 的多态性与地中海贫血铁过载相关性差异无统计学意义。本研究结果显示 *GDF15* rs1059519 和 rs1059369 的多态性较为丰富, 其余位点仅检测到 1 例杂合突变, 且这些位点在不同血清铁蛋白水平的献血者中的分布均差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。在 rs1059369 铁过载组中突变基因 A 的基因频率为 0.324, 正常组中 A 的基因频率为 0.307, 无统计学差异。

综上, 江苏地区全血献血者 *HFE*、*GDF15* 和 *TMPRSS6* 基因多态性与 SF 水平之间的关系的研究结果显示, *HFE*、*GDF15* 和 *TMPRSS6* 相关多态性位点与 SF 无统计学意义, 但 *TMPRSS6* rs855791 突变基因型的 SF 水平有升高的趋势, 提示与 hepcidin 的表达和铁代谢的相关性, 后续将扩

大样本量对 *TMPRSS6* 基因多态性与 SF 水平之间的关系及具体分子机制进一步证实和探讨。

参考文献

- [1] 赵晋英, 李艳伟. 铁代谢红细胞系调节因子与铁稳态 [J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2019, 35 (5): 19-25.
- [2] Hoque MM, Adnan SD, Karim S, et al. Evaluation of Iron Store by Serum Ferritin in Healthy Blood Donors of Bangladesh [J]. Mymensingh Medical J, 2016, 25: 485-491.
- [3] KISS JE. Laboratory and Genetic Assessment of Iron Deficiency in Blood Donors [J]. Clin Lab Med, 2015, 35: 73-91.
- [4] Katsarou MS, Papasavva M, Latsi R, et al. Hemochromatosis: Hereditary hemochromatosis and HFE gene [J]. Vitam Horm, 2019, 110: 201-222.
- [5] Bahadir B, Bavunoglu I, Hacıoglu Y, et al. The role of *TMPRSS6* gene variants in iron-related hematological parameters in Turkish patients with iron deficiency anemia [J]. Gene, 2018, 673: 201-205.
- [6] Lotfi R, Kroll C, Plonné D, et al. Hepcidin/Ferritin Quotient Helps to Predict Spontaneous Recovery from Iron Loss following Blood Donation [J]. Transfus Med Hemother, 2015, 42: 390-395.
- [7] Kim A, Nemeth E. New insights into iron regulation and erythropoiesis [J]. Curr Opin Hematol, 2015, 22: 199-205.
- [8] Gichohi-Wainaina WN, Melse-Boonstra A, Swinkels DW, et al. Common Variants and Haplotypes in the *TF*, *TNF- α* , and *TMPRSS6* Genes Are Associated with Iron Status in a Female Black South African Population [J]. J Nutr, 2015, 145: 945-953.
- [9] van Aerts RM, van Deursen CT, Koek GH. Proton Pump Inhibitors Reduce the Frequency of Phlebotomy in Patients with Hereditary Hemochromatosis [J]. Clin Gastroenterology Hepatol, 2016, 14: 147-152.
- [10] Sal E, Keskin EY, Yenicesu I, et al. Iron-refractory iron deficiency anemia (IRIDA) cases with 2 novel *TMPRSS6* mutations [J]. Pediatr Hematol Oncol, 2016, 33: 226-232.
- [11] Batar B, Bavunoglu I, Hacıoglu Y, et al. The role of *TMPRSS6* gene variants in iron-related hematological parameters in Turkish patients with iron deficiency anemia [J]. Gene, 2018, 673: 201-205.
- [12] Langer JC, Bialkowski W, Glynn S, et al. The *TMPRSS6* Ala736 Val Polymorphism Is Associated With Decreased Hemoglobin and Iron Status In Females Undergoing Repeated Phlebotomy [J]. Blood, 2013, 122: 787.
- [13] 黄春妮. 地中海贫血铁过载 *GDF-15* 基因多态性及血清糖蛋白糖基化修饰的研究和意义 [D]. 广西医科大学, 2017.

(收稿日期: 2020-01-21)