

Habituel Abortus Olan Gebelerde Homosistein Folik Asid ve Vit B12 Seviyelerinin Değerlendirilmesi

Evaluation of Homocystein, Folic Acid and Vit B12 Levels in Patients with Recurrent Pregnancy Losses

Gürkan ÇIKIM¹, Abdullah TOK²

¹ Adıyaman Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya ABD, Adıyaman, Türkiye

² Sütçü İmam Üniversitesi, Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum ABD, Kahramanmaraş, Türkiye

Özet

Giriş: Tekrarlayan gebelik kaybı iki veya daha fazla başarısız klinik gebelik veya intrauterin olması gerekmeyen ardışık üç gebelik kaybı olarak tanımlanır. Tekrarlayan gebelik kayıplarında homosistein düzeylerinin arttığını ya da değişmediğini gösteren çalışmalar mevcuttur. Bu çalışmada, tekrarlayan gebelik kayıplarında serbest radikal benzeri etki gösteren homosistein ve homosistein'in atılımında önemli fonksiyonlara sahip olan B12 ve folik asit düzeylerinde değişim olup olmadığı amaçlandı.

Gereç ve Yöntemler: Bu retrospektif çalışmaya, Ocak ve Aralık 2020 tarihleri arasında 2. basamak bir hastaneye başvuran, tekrarlayan gebelik kaybı tanısı konulmuş ve 1. Trimesterde gebeliği olan 30 hasta (Grup I) ve 1. trimesterde bulunan herhangi bir şikayeti olmayan 30 sağlıklı gebe (Grup II) dahil edilmiştir. Gruplar; plazma homosistein, serum folik asit ve vitamin B12 düzeyleri açısından karşılaştırıldı.

Bulgular: Homosistein düzeyleri ($\mu\text{mol/L}$), Grup I: 17.6 ± 9.5 , Grup II: 11.8 ± 4.6 , Vitamin B12 düzeyleri (ng/L): Grup I: 233.4 ± 69.5 , Grup II: 262.4 ± 76.7 , folik asit düzeyleri ($\mu\text{g/L}$): Grup I: 7.7 ± 3.3 , Grup II: 11.3 ± 3.7 olarak saptandı. Homosistein düzeylerinde; tekrarlayan gebelik kaybı olan grupta (Grup I) istatistiksel olarak anlamlı yükseklik saptandı ($p < 0.05$). Folik asit düzeylerinde; tekrarlayan gebelik kaybı olan grupta (Grup I) istatistiksel olarak anlamlı düşüklük bulundu ($p < 0.05$). Vitamin B12 düzeyi ve ortalama yaş açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi ($p > 0.05$).

Sonuç: Tekrarlayan gebelik kaybı olan hastalarda, homosistein, folik asit düzeylerinin etiolojide rol oynayabileceğini düşünmekteyiz.

Anahtar Kelimeler: Tekrarlayan gebelik kaybı, Homosistein, Folik asid

Abstract

Objective: Recurrent pregnancy loss is defined as two or more unsuccessful clinical pregnancies or three consecutive pregnancies that are not necessarily intrauterine. There are studies showing that homocysteine levels increase or do not change in recurrent pregnancy losses. In this study, it was aimed to investigate whether there was a change in B12 and folic acid levels, which have important functions in the excretion of free radical-like homocysteine and homocysteine in recurrent pregnancy losses.

Material and Methods: In this retrospective study, 30 patients (Group I, diagnosed with recurrent pregnancy loss and were pregnant in the 1st trimester (Group I) and 30 healthy pregnant women in the 1st trimester without any complaints (Group II) who applied to a 2nd level hospital between January and December 2020 were included. Groups were compared in terms of plasma homocysteine, serum folic acid and vitamin B12 levels.

Results: Homocysteine levels ($\mu\text{mol/L}$), Group I: 17.6 ± 9.5 , Group II: 11.8 ± 4.6 , Vitamin B12 levels (ng/L): Group I: 233.4 ± 69.5 , Group II: 262.4 ± 76.7 , folic acid levels ($\mu\text{g/L}$): Group I: 7.7 ± 3.3 , Group II: 11.3 ± 3.7 . At homocysteine levels; a statistically significant increase was found in the group with recurrent pregnancy loss (Group I) ($p < 0.05$). At folic acid levels; a statistically significant decrease was found in the group with recurrent pregnancy loss (Group I) ($p < 0.05$). There was no statistically significant difference between the groups regarding vitamin B12 level and mean age ($p > 0.05$ for both).

Conclusion: We think that homocysteine and folic acid levels may play a role in the etiology in patients with recurrent pregnancy loss.

Keywords: Recurrent pregnancy loss, Homocysteine, Folic acid

Yazışma Adresi: Gürkan ÇIKIM, Adıyaman Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Biyokimya ABD, Adıyaman, Türkiye

Telefon: +90 533 663 55 44, Mail: drgurkanc@hotmail.com

ORCID No (Sırasıyla): 0000-0002-7572-3962, 0000-0003-0998-5531

Geliş Tarihi: 12.03.2021

Kabul Tarihi: 11.08.2021

DOI: 10.17517/ksutfd.895874

GİRİŞ

Tekrarlayan gebelik kaybı ultrasonografi veya histopatolojik inceleme ile belgelenen iki veya daha fazla başarısız klinik gebelik veya intrauterin olması gerekmeyen ardışık üç gebelik kaybı olarak tanımlanır. Tekrarlayan gebelik kaybı her yıl 500.000'den fazla kadını etkilemekte ve 20. gebelik haftası öncesinde ardı ardına iki veya daha fazla gebelik kaybı olarak bilinmektedir (1). Onikinci gebelik haftasına kadar olan düşüklükler erken, 12.-20. gebelik haftaları arasında olanlar ise geç düşüklükler olarak tanımlanmakta ve sıklığı, tüm gebelikler göz önüne alındığında %1 civarında görülmektedir (2). Nedeni tam olarak bilinmemekle birlikte, koagülasyon sistem bozuklukları, genetik faktörler, uterin anomaliler, immünolojik nedenler, yetersiz hormon seviyeleri, enfeksiyonlar, çevresel faktörler suçlanmaktadır (3). Homosistein, metiyoninden oluşan esansiyel bir aminoasit olup, B6 vitamini varlığında transsülfürasyonla sistationa ya da B12 varlığında remetilyasyonla metiyonine dönüşmektedir (4). Yapılan çalışmalarda, hiperhomosisteinemi'nin kardiyovasküler, serebral, vasküler, renal bozukluklar gibi pek çok hastalıkta rol oynadığı gösterilmiştir (5,6). Tekrarlayan gebelik kayıplarında homosistein düzeylerinin arttığını ya da değişmediğini gösteren çalışmalar mevcuttur (7,8).

Vitamin B12 DNA sentezinde rol alan, sinir dokusu gelişimi ve fonksiyonları için önemli olan vitamindir (9). Vitamin B12 eksikliği ülkelere göre değişmekle birlikte % 2 ile % 40 oranında görülmektedir (10,11). B12 vitamini hayvansal gıdalarla alınmakta, bitkilerde sebzelede bulunmamakta ve terminal ileumdan intrinsik faktör aracılığı ile emilmektedir (12). Vitamin B12 eksikliği nedenleri arasında, özellikle pernisiyöz anemi olmak üzere otoimmün nedenler, genetik bozukluklar, sıkı vejeteryan diyetle beslenme, gastrointestinal cerrahi, parazitler, Crohn hastalığı, metformin, proton pompa inhibitörleri gibi ilaçların kullanımı sayılmaktadır (13,14). B12 eksikliğinde homosistein düzeylerinin arttığı gösterilmiştir (15,16). Folik asit tek karbon transferinde rol oynayan, suda çözünen, pürin, pirimidin sentezinde görev alan, normal doku büyümesi ve replikasyonda işlevi olan vitamindir (17). Yapılan çalışmalarda, folik asit eksikliğinin ensefalosel, spina bifida gibi nöral tüp defektleri ve homosistein artışına neden olduğu saptanmıştır (18,19). Bu çalışmada, tekrarlayan düşük tanısı koyulmuş gebelerde, serbest radikal benzeri etki gösteren homosistein metabolizmasında önemli fonksiyonlara sahip olan vitamin B12 ve folik asit düzeylerinin araştırılması sağlıklı gebelerle karşılaştırılması amaçlandı.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Retrospektif olarak dizayn edilmiş olan çalışmamıza; Ocak ve Aralık 2020 tarihleri arasında, 1.trimestrde tekrarlayan gebelik kaybı nedeniyle Obstetri polikliniğine başvuran, herhangi bir tedavi almayan, sigara kullanmayan, kronik hastalığı olmayan, 22-34 yaş grubunda olan 30 hasta (Grup I) ve 1. trimesterde bulunan herhangi bir şikayeti olmayan 30 sağlıklı gebe (Grup II) olmak üzere toplam 60 gebe kadın dahil edildi. Çalışmada plazma homosistein, serum folik

asit ve vitamin B12 düzeyleri değerlendirildi. Homosistein, vitamin B12 ve folik asit düzeylerinin analizinde, Cobas e 602 otoanalizör cihazı (Roche Diagnostics, F.Hoffmann-La Roche Ltd., Kaiseraugst, Switzerland) ve electrochemiluminescence immunoassay yöntemi kullanıldı. Çalışmamızda habituel abortus tanısı koymada 2 defa birinci trimester gebelik kaybı tekrarlayan gebelik kaybı olarak kabul edilmiştir. Uterin anomali veya genetik nedenli abortuslar, enfeksiyon sebepli abortuslar çalışmamıza alınmamış ve çalışmamızda dışlanma kriteri olarak kabul edilmiştir. Çalışmamızın etik kurulu Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Tıp Fakültesi, girişimsel olmayan klinik etik kurulundan 19-01-2021 v3 67 no ile alındı. Bu çalışma Helsinki Deklerasyonu prensiplerine uygun olarak yapılmıştır.

İstatistiksel Analiz

Veriler, Windows için SPSS 20.0 programı (SPSS, Inc., Chicago, IL, ABD) kullanılarak analiz edildi. Sürekli ve sürekli verilerin normal dağılımı Kolmogorov ve Smirnov varyansların homojenliği ise Levene testi ile analiz edildi. Tanımlayıcı değişkenler ortalama \pm standart sapma (SD) olarak ifade edildi. Gruplar arası parametrelerin karşılaştırılmasında normal dağılım gösterenlerde student-t test, göstermeyenlerde Mann-Whitney U testi kullanıldı. Power analizi yapılarak her iki gruba 30 hasta kabulü yapılmıştır.

SONUÇLAR

Homosistein düzeyleri ($\mu\text{mol/L}$), Grup I: 17.6 ± 9.5 , Grup II: 11.8 ± 4.6 , Vitamin B12 düzeyleri (ng/L): Grup I: 233.4 ± 69.5 , Grup II: 262.4 ± 76.7 , folik asit düzeyleri ($\mu\text{g/L}$): Grup I: 7.7 ± 3.3 , Grup II: 11.3 ± 3.7 olarak saptandı. Homosistein düzeylerinde; tekrarlayan gebelik kaybı olan grupta (Grup I) istatistiksel olarak anlamlı yükseklik saptandı ($p < 0.05$). Folik asit düzeylerinde; tekrarlayan gebelik kaybı olan grupta (Grup I) istatistiksel olarak anlamlı düşüklük bulundu ($p < 0.05$). Vitamin B12 düzeylerinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi ($p = 0.186$). Yaşlar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı ($p = 0.210$).

TARTIŞMA

Tekrarlayan gebelik kayıpları sıklığı ilgili değişik çalışmalarda farklı sonuçlar alınmış, bir ve iki kez gebelik kaybı olarak düşünüldüğünde % 1-5, üç kez ve daha fazla gebelik kaybı olarak düşünüldüğünde % 0.5-1 oranında görüldüğü tespit edilmiştir (20,21). Yaşanan gebelik kayıpları, bir sonraki kayıp riskini artırmaktadır (22). Gebelik kaybı oranlarının çok yüksek olması, nedenlerinin önemini daha da artırmıştır. Uterusta anatomik bozukluklar, parenteral karyotip olumsuzlukları, antifosfolipid antikorlar, endokrin, immün, trombofilik bozukluklar, anne yaşı, obezite bunlardan bazılarıdır (23). Bu nedenlerden biriside homosistein düzeylerinin artışı olarak gösterilmektedir (7). Homosistein metiyoninden oluşan, transsülfürasyonla B6 vitamini varlığında sistationin beta sentaz enzimi ile önce sistationine sonrasında sisteyne ya da remetilyasyonla B12 vitamini ve metilen tetrahidrofo-

Tablo 1. Çalışma gruplarının demografik ve biyokimyasal sonuçları

	Grup I (n= 30)	Grup II (n= 30)	P değeri
Homosistein($\mu\text{mol/L}$)	17,6 \pm 9,5	11,8 \pm 4,6	0,042*
Folik asit ($\mu\text{g/L}$)	7,7 \pm 3,3	11,3 \pm 3,7	0,001*
Vitamin B12 (ng/L)	233,4 \pm 69,5	262,4 \pm 76,7	0,186
Yaş (yıl)	28,3 \pm 3,8	26,9 \pm 3,3	0,210

*p<0.05: istatistiksel olarak anlamlı

lat redüktaz (MTHFR) enzimi ile oluşturulan folik asitin bir formu olan N5 metil tetrahidrofolik asit varlığında metiyonin sentaz enzimi varlığında tekrar metiyonine dönüşerek metabolize olan bir aminoasittir (24,25). Homosisteinin bir kısmı homosistein disülfid yada homosistein tiolaktana dönüşmekte bu dönüşüm sırasında süperoksit, hidrojen peroksit gibi serbest radikaller oluşmakta, bu serbest radikaller homosisteinle birlikte endotele zarar vermektedir (26). Böylece endotel özelliğini yitirmekte, antikoagulan özelliğini kaybetmekte, koagulasyona eğilimi artmaktadır. Diğer yandan homosisteinin etkisi ile endotelden salgılanan endotel gelişimini ve düzenlenmesini sağlayan en güçlü vazodilatör moleküllerden birisi olan nitrik oksit salınımı engellenmektedir. Homosistein ayrıca, faktör V, X, XII etkilerini hızlandırıp, protein C aktivasyonunu engelleyerek, plazminojen aktivatörlerinin salınımını artırarak hiperkoagulopati oluşturmaktadır (27). Yapılan bir çalışmada, homosistein düzeylerinin artışının ateroskleroz ve tromboembolik olaylarda bağımsız bir risk faktörü olduğu saptanmıştır (28). Başka bir çalışmada ise homosistein düzeyleri yüksek olan gebelerin, düşük materyalinin incelenmesinde, koryonik vasküler sisteminin yeterince gelişmediği ve defekt olduğu bulunmuştur (29). Tekrarlayan gebelik kayıplarında homosistein düzeylerinin yüksek olduğu ya da değişmediği gösterilmiştir (7,8).

Çalışmamızda homosistein düzeyleri tekrarlayan gebelik kaybı olan grupta yüksek olarak bulundu. Folik asit düzeyinin düşük olmasının homosistein seviyelerinin yüksek olmasına neden olabileceği düşünüldü. Vitamin B12 ve folik asit homosisteinin metiyonine dönüşümünde gerekli olan vitaminlerdir. Vitamin B12 ve folik asit eksikliğinde homosistein düzeylerinin yükseldiği gösterilmiştir (30). Yapılan çalışmalarda tekrarlayan gebelik kayıplarında B12 ve folik asit eksikliği olduğu ve homosistein düzeyleri ile negatif korelasyon gösterdiği tespit edilmiştir (31-33). Çalışmamızda, folik asit düzeylerinin, tekrarlayan gebelik kaybı olan grupta düşük olduğu, vitamin B12 düzeylerinin ise değişmediği saptandı. Bu durumun Vitamin B12'nin depolanması nedeniyle olduğunu düşündük.

Sonuç olarak, gebelerde ve tekrarlayan gebelik kaybı olan hastalarda, hastaneye ilk başvurularında homosistein, vitamin B12, folik asit düzeylerinin düzenli takip edilmesi, ayrıca diyet ile yeterince hayvansal gıda alımının tavsiye edilmesi, suda çözünen, fazlası idrarla atılan depolanamayan folik asit

içeren preparatların düzenli şekilde gebelere verilmesinin faydalı olacağını düşünüyoruz.

KAYNAKLAR

1. American College of Obstetricians and Gynecologists. Management of recurrent early pregnancy loss. ACOG Practice Bulletin 2001;24:1-8.
2. Cho HY, Park HS, Ko EJ, Ryu CS, Kim JO, Kim YR, Ahn EH, Lee WS, Kim NK. Association of Complement Factor D and H Polymorphisms with Recurrent Pregnancy Loss. *Int J Mol Sci.* 2019;21(1):17. doi: 10.3390/ijms21010017. PMID: 31861421; PMCID: PMC6981708.
3. Aghajanzadeh F, Esmaeilzadeh S, Basirat Z, Mahouti T, Heidari FN, Golsorkhtabaramiri M. Using autologous intrauterine platelet-rich plasma to improve the reproductive outcomes of women with recurrent implantation failure. *JBRA Assist Reprod.* 2020;24(1):30-33. doi: 10.5935/1518-0557.20190055. PMID: 31689042; PMCID: PMC6993157.
4. Majumder A, Singh M, George AK, Tyagi SC. Restoration of skeletal muscle homeostasis by hydrogen sulfide during hyperhomocysteinemia-mediated oxidative/ER stress condition 1. *Can J Physiol Pharmacol.* 2019 Jun;97(6):441-456. doi: 10.1139/cjpp-2018-0501. Epub 2018 Nov 13. PMID: 30422673; PMCID: PMC6719301.
5. Ganguly P, Alam SF. Role of homocysteine in the development of cardiovascular disease *Nutr J.* 2015;14:6.
6. Perna AF, Ingrosso D. Homocysteine and chronic kidney disease: an ongoing narrative. *J Nephrol.* 2019;32(5):673-675.
7. Gaiday AN, Tussupkaliyev AB, Bermagambetova SK, Zhmagulova SS, Sarsembayeva LK, Dossimbetova MB, et al. Effect of homocysteine on pregnancy: a systematic review. *Chem Biol Interact* 2018;293:70-6.
8. Foka ZJ, Lambropoulos AF. Factor V leiden and prothrombin G20210A mutations, but not methylenetetrahydrofolate reductase C677T, are associated with recurrent miscarriages. *Hum Reprod* 2000;15:458-62.
9. Romine MF, Rodionov DA, Maezato Y, Anderson LN, Nandhikonda P, Rodionova IA, et al. Elucidation of roles for vitamin B12 in regulation of folate, ubiquinone, and methionine metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2017;114 (7).
10. Kalem P, Benli AR, Koroglu M, Benli NC, Koyuncu M, Cesur O, et al. The effect of ferritin, vitamin B12 and

- folic acid on pregnancy outcomes. *Int J Clin Exp Med*. 2016;9(11):22413-7.
11. Garcia-Casal M, Osorio C, Landaeta M, Leets I, Matus P, Fazzino F, et al. High prevalence of folic acid and vitamin B12 deficiencies infants, children, adolescents and pregnant women in Venezuela. *European Journal of Clinical Nutrition* 2005;59(9):1064-70.
 12. Majumder A, Singh M, George AK, Tyagi SC. Restoration of skeletal muscle homeostasis by hydrogen sulfide during hyperhomocysteinemia-mediated oxidative/ER stress condition 1. *Can J Physiol Pharmacol*. 2019;97(6):441-456. doi: 10.1139/cjpp-2018-0501. Epub 2018 Nov 13. PMID: 30422673; PMCID: PMC6719301.
 13. Lam JR, Schneider JL, Zhao W, Corley DA. Proton pump inhibitor and histamine receptor antagonist use and vitamin B12 deficiency. *JAMA* 2013;310(22):2435-2442.
 14. Curro M, Gugliandolo A, Gangemi C, Risitano R, Ientile R, Caccamo D. Toxic effects of mildly elevated homocysteine concentrations in neuronal-like cells. *Neurochem Res*. 2014;39:1485-95.
 15. Ganguly P, Alam SF. Role of homocysteine in the development of cardiovascular disease. *Nutr J* 2015;14(6) <https://doi.org/10.1186/1475-2891-14-6>
 16. Yu M, Li W, Luo S, Zhang Y, Liu H, Gao Y, Wang X, Wilson J, Huang G. Folic acid stimulation of neural stem cell proliferation is associated with altered methylation profile of PI3K/Akt/CREB. *J. Nutr. Biochem* 2014;25:496-502.
 17. Lo A, Polsek D, Sidhu S. Estimating the burden of neural tube defects in low- and middle in come countries. *J Glob Health* 2014;4(1):010402.
 18. Stirzaker C, Song, J.Z, Ng W, Du Q, Armstrong, N.J, Locke W.J Statham A.L, French H, Pidsley R. et al. Methyl-CpG-binding protein MBD2 plays a key role in maintenance and spread of DNA methylation at CpG islands and shores in cancer. *Oncogen* 2016.
 19. Jakubowski H. Homocysteine Modification in Protein Structure/Function and Human Disease. *Physiol Rev* 2019;99: 555-604
 20. Rai R, Regan L. Recurrent miscarriage. *The Lancet* 2006;368(9535):601-11.
 21. Silver RM, Branch DW, Goldenberg R, Iams JD, Klebanoff MA. Nomenclature for pregnancy outcomes: time for a change. *Obstet Gynecol* 2011;118(6):1402-8.
 22. Gibbins KJ, Porter TF. The Importance of an Evidence-based Workup for Recurrent Pregnancy Loss. *Clin Obstet Gynecol*. 2016;59(3):456-463. doi:10.1097/GRF.0000000000000219
 23. Boots C, Stephenson MD. Does obesity increase the risk of miscarriage in spontaneous conception: a systematic review. *Semin Reprod Med* 2011;29(6):507-13.
 24. Jakubowski H. Homocysteine editing, thioester chemistry, coenzyme A, and the origin of coded peptide synthesis. *Life (Basel)* 2017;7:6.
 25. McCully KS. Homocysteine, Thioretinaco Ozonide, and Oxidative Phosphorylation in Cancer and Aging: A Proposed Clinical Trial Protocol. *Methods Mol Biol* 2019;1866:285-310. doi: 10.1007/978-1-4939-8796-2_23. PMID: 30725425.
 26. Mcdowell IFW, Long D. Homosisteine and endothelial dysfunction: A link with cardiovascular disease. *J Nutr* 2000;130:3695-725.
 27. Dinç N, Yücel SB, Taneli F, Sayın MV. The effect of the MTHFR C677T mutation on athletic performance and the homocysteine level of soccer players and sedentary individuals. *J Hum Kinet* 2016;51:61-69. Published 2016 Jul 2. doi:10.1515/hukin-2015-0171
 28. Chambers J, Skooner J. Homosisteine: A novel risk factor for coronary heart disease in UK Indian Asians *Heart* 2001;86:121-2.
 29. Nelen WL, Bulten J, Steegers EA, Blom HJ, Hanselaar AG, Eskes TK. Maternal homocysteine and chorionic vascularization in recurrent early pregnancy loss. *Hum Reprod* 2000;15:954-60.
 30. Serapinas D, Boreikaite E, Bartkeviciute A, Bandzeviciene R, Silkunas M, Bartkeviciene D. The importance of folate, vitamins B6 and B12 for the lowering of homocysteine concentrations for patients with recurrent pregnancy loss and MTHFR mutations. *Reprod Toxicol*. 2017;72:159-163. doi: 10.1016/j.reprotox.2017.07.001. Epub 2017 Jul 6. PMID: 28689805.
 31. Sikora J, Magnucki J, Zietek J, Kobielska L, Partyka R, Kococinska D, et al. Homocysteine, folic acid and vitamin B12 concentration in patients with recurrent miscarriages. *Neuro Endocrinol Lett* 2007;28:507-12.
 32. Wouters MG, Boers GH, Blom HJ, Trijbels FJ, Thomas CM, Borm GF, et al. Hyperhomocysteinemia: a risk factor in women with unexplained recurrent early pregnancy loss. *Fertil Steril* 1993;60:820-5.
 33. Pushpakumar S, Kundu S, Sen U. Endothelial dysfunction: the link between homocysteine and hydrogen sulfide. *Curr Med Chem* 2014;21(32):3662-72. doi: 10.2174/0929867321666140706142335. PMID: 25005183; PMCID: PMC5539954.