

М.А. Трещинская, д.м.н., Ю.И. Головченко, К.Н. Игрунова, Д.В. Ватлицов, Т.М. Рябиченко, О.А. Ключникова, А.Ю. Гончар, И.В. Курочкин, Национальная медицинская академия последипломного образования им. П.Л. Шупика, Киевская городская клиническая больница № 9



М.А. Трещинская

Патогенетически обоснованный подход к превентивной терапии цереброваскулярной патологии

Сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) являются доминирующей причиной инвалидности и смерти населения в большинстве стран мира, в том числе в Украине.

В последнее время все больше внимания уделяется целостности и функционированию эндотелия сосудов как основе кардиоваскулярного здоровья. Эндотелиальная функция находится под влиянием сосудистых факторов риска и отражает степень их повреждающего влияния. Нарушение физиологической функции сосудистого эндотелия является ранним признаком и независимым предиктором неблагоприятного прогноза при большинстве форм ССЗ.

Известные факторы риска ССЗ индуцируют развитие эндотелиальной дисфункции (ЭД), которая является предшественницей морфологических изменений при атеросклерозе (АС). Выявлено, что ЭД присутствует у пациентов с традиционными факторами риска АС: гиперхолестеринемией, артериальной гипертензией (АГ), сахарным диабетом (СД), а также у курильщиков (до того, как процесс проявил себя клинически).

Доступные данные свидетельствуют о том, что ЭД широко распространена, в частности, у пожилых людей развивается по мере старения даже при отсутствии других факторов риска или сосудистых заболеваний. С ЭД ассоциируется возраст-обусловленное снижение когнитивных функций (нарушение памяти) и физической активности (уменьшение активности в течение дня). Кроме того, ЭД принимает участие в патогенезе многих заболеваний, таких как АГ, инсульт, эректильная дисфункция и почечная недостаточность, которые также ассоциируются с процессом старения.

Нарушение функции эндотелия является прогностическим фактором ССЗ, а фармакологическая коррекция персистирующей ЭД может снизить риск или замедлить развитие сосудистых заболеваний. ЭД является предиктором необходимости более агрессивной или комбинированной медикаментозной терапии для уменьшения риска ССЗ. Наблюдение за эндотелиальной функцией в динамике в ответ на различные подходы в лечении может помочь титровать препараты и принимать решение о необходимости дополнительной терапии.

Эндотелий сосудов представляет собой слой клеток на базальной мембране, обладающих аутокринной, паракринной и эндокринной функциями. Эндотелий обуславливает деликатный баланс контррегулирующих путей, которые обеспечивают вазомоторные реакции, контролируют пролиферацию клеток, тромбообразование, воспаление и оксидативный стресс. Кроме того, эндотелиальные клетки вовлечены в процесс модулирования активности лейкоцитов и тромбоцитов, ингибируют адгезию лейкоцитов и диапезис, поддерживают непроницаемость сосудистого барьера для клеток крови и плазменных белков.

Оксид азота (NO), ранее известный как эндотелиальный фактор релаксации, вероятно, является наиболее важной субстанцией, продуцируемой сосудистым эндотелием для регуляции сосудистого тонуса. NO формируется в эндотелии в результате преобразования незаменимой аминокислоты L-аргинина в L-цитруллин при участии конституционального фермента эндотелиальной NO-синтазы (eNOS). Последняя локализуется в эндотелиальных клетках и отвечает за синтез базального уровня NO, быстрые изменения уровня NO в ответ на физические (напряжение сдвига) и химические стимулы (брадикардин). Только L-аргинин является субстратом eNOS для синтеза NO, но не только для NO-синтазы L-аргинин является субстратом. L-Аргинин используется для синтеза белков, мочевины, креатина, вазопрессина и агматина. Таким образом, активация метаболизма L-аргинина альтернативными путями может быть одним из механизмов недостаточного синтеза NO, а следовательно, и ЭД. Наиболее активным ферментом альтернативного пути метаболизма L-аргинина является аргиназа. L-Аргинин, не метаболизирующийся с помощью аргиназы до орнитина, используется одним из 4 ферментов: NOS (до образования NO), аргинил-tRNA-синтетазой (до образования аргинил-tRNA, предшественника в синтезе белков), аргининдекарбоксилазой (до агматина), аргинин-глицин амидинотрансферазой (до креатина).

Есть данные, что окисленные липопротеины низкой плотности (ЛПНП) повышают активность аргиназы, что приводит к снижению продукции NO в эндотелиальных клетках аорты человека.

Кроме того, активность NOS ингибируется аналогами L-аргинина, в которых замещен атом азота, например NG-monomethyl-L-arginine или NG-nitro-L-arginine. Интересно, что блокирующее влияние этих молекул на NOS может быть преодолено излишком L-аргинина, что указывает на наличие конкуренции за фермент между L-аргином и его аналогами. Снижение активности eNOS доказано и при повышении концентрации ЛПНП в плазме крови, что также можно преодолеть путем дополнительного введения L-аргинина. Эти данные указывают на то, что L-аргинин участвует в регуляции активности NOS в эндотелиальных клетках.

Путь L-аргинин-NO играет критическую роль в поддержании нормальной эндотелиальной функции, что отражается на оптимальном функционировании миокарда, АД, сбалансированности воспалительного ответа, апоптозе и защите от оксидативного повреждения. В ряде экспериментальных и клинических исследований показано, что введение субстрата для синтеза NO L-аргинина уменьшает проявления ЭД.

L-Аргинин может потенцировать синтез NO и снижать симптомы ЭД за счет восстановления активности eNOS. L-Аргинин препятствует окислению BH_4 — основного кофактора NOS. Кроме того, L-аргинин помогает преодолеть блокаду экспрессии eNOS, вызываемую эндогенными ингибиторами eNOS (асимметричным диметиларгинином — АДМА и L-NMMA), а также уменьшить активность аргиназы при АС. L-Аргинин восполняет увеличенный расход, обусловленный повышенной экспрессией iNOS в клетках иммунной системы и сосудов при АС.

Кроме того, L-аргинин повышает биоактивность NO посредством прямой антиоксидантной активности, in vivo применение L-аргинина снижает уровень NOS-опосредованного супероксида. L-Аргинин, поступающий в виде соли гидрохлорной кислоты, может влиять на внутриклеточный pH, что улучшает транспорт Ca и активацию eNOS, способствует неферментному превращению нитрита в NO. Имеются данные, что L-аргинин уменьшает концентрацию эндотелина-1, потенциального вазоконстриктора и важного модулятора ЭД (возможно, более значимого, чем NO) по мере старения.

L-Аргинин показал многообещающие результаты как средство профилактики ЭД при остром стрессе. К примеру, курение и употребление жирной пищи являются достоверными причинами ухудшения эндотелиальной функции. Оральный прием L-аргинина перед курением или употреблением жирной пищи предупреждает вредное воздействие этих факторов на эндотелиальную функцию.

По данным исследований, дозозависимая клиническая эффективность L-аргинина у людей заключается в том, что в небольших концентрациях в плазме 80-800 мкмоль/л препарат обладает селективным влиянием на эндотелиальную функцию (у пациентов с повышенным содержанием АДМА). В более высокой концентрации (в плазме 800-8000 мкмоль/л) L-аргинин оказывает прямое вазодилатирующее действие (вероятно, благодаря плеотропному эндокринному влиянию на синтез инсулина и гормона роста). В больших концентрациях (в плазме >8000 мкмоль/л) как L-аргинин, так и D-аргинин оказывают неспецифическое вазодилатирующее действие за счет осмотического эффекта, ацидоза и влияния на эндокринную систему.

Эффект L-аргинина на ЭД не является универсальным феноменом. Действие препарата зависит от изучаемого участка артерии, наличия или отсутствия ЭД, морфологических изменений, клинических проявлений ССЗ и достигаемой концентрации L-аргинина. Вероятно, такая стратегия могла бы быть наиболее эффективной на доклиническом этапе у пациентов с сосудистыми факторами риска (АГ, СД, курящих, особенно в сочетании с гиперхолестеринемией).

Регрессивный метаанализ результатов исследований показал, что гетерогенность влияния L-аргинина на ЭД (судя по показателю потокзависимой вазодилатации а. brachialis — ПЗВД) определяется базисным показателем ПЗВД, т.е. наличием дисфункции эндотелия. Анализ по подгруппам выявил, что эффект от приема L-аргинина был положительным в случаях, когда ПЗВД была ниже, и отрицательным, когда ПЗВД была выше базисной линии. Эти данные показывают, что вышеупомянутое вмешательство способно восстановить эндотелиальную функцию, но не могут ее увеличивать. Статистическая обработка результатов выявила обратную зависимость между ПЗВД и степенью эффективности L-аргинина.

Взаимосвязь между сосудистыми факторами риска, ЭД, АС и его осложнениями в виде ССЗ является основой для формирования стратегии терапии при поражении сосудов. Традиционное направление включает влияние на основные факторы риска, а именно: контроль АД, гликемии, коррекцию дислипидемии, отказ от курения, ограничение употребления алкоголя, снижение избыточной массы тела. В то же время перспективным является направление, основанное на восстановлении баланса между продукцией и катаболизмом NO — терапия L-аргином может оказывать дополнительную защиту сосудов от повреждающих факторов.

Практически всегда повреждение эндотелия сопровождается процессом перекисного окисления липидов, что усугубляет дефицит эндогенного NO за счет его ускоренной деградации активными формами кислорода. Кроме того, взаимодействие NO с супероксидом (и другими кислородными радикалами) приводит не только к утрате вазодилатирующего потенциала NO, но и к образованию высокотоксичного пероксинитрита (ONOO^\cdot). Известно, что при высоких концентрациях пероксинитрит индуцирует апоптоз, а также блокирует синтез простаглицина, усиливая при этом продукцию тромбосана и лейкотриенов. Другими словами, ЭД и активация процесса апоптоза могут являться ключевыми звеньями сосудистого повреждения.

Апоптоз играет важную роль в реализации механизмов адаптации организма к воздействию внешней среды. Это генетически регулируемый процесс, участвующий в дифференцировке, морфогенезе, а также поддержании клеточного гомеостаза. Недостаточная активность апоптоза может отразиться на процессах морфогенеза, элиминации клеток с генетическими поломками, становлении аутоагрессивности и проявляться в виде различных дефектов развития, формировании аутоиммунных процессов и злокачественных опухолей. В то же время не меньше заболеваний, основой которых является усиление апоптоза клеток организма. К таким патологиям относятся боковой амиотрофический склероз, болезнь Альцгеймера, спинальная мышечная атрофия и другие заболевания нервной системы.

Существует ряд других состояний, при которых в реализации основного поражения решающую роль играет апоптоз, например, инфаркт миокарда (апоптоз является преобладающей формой гибели миоцитов в ранний период развития состояния) инсульт, токсический (в частности, алкогольный) гепатит и т.д.

Таким образом, сбалансированная коррекция процессов апоптоза наряду с защитой сосудистого эндотелия может оказаться наиболее патогенетически обоснованным подходом на ранних этапах патологических процессов, чаще всего связанных с возрастом, наиболее ярким примером которых является хроническая сосудисто-мозговая недостаточность.

Поскольку сердечно-сосудистая (в частности, цереброваскулярная) патология значительно снижает с возрастом качество жизни людей, на наш взгляд, профилактика состояний, развивающихся на фоне ЭД, является одним из наиболее перспективных направлений современной медицины. Кроме того, нам показалось уместным изучить, какой эффект на процесс апоптоза оказывает препарат, благоприятно влияющий на эндотелиальную функцию (по данным литературы и наших исследований).

Таким образом, целью нашего исследования является клинико-экспериментальная оценка влияния препарата L-аргинина (Тивортина) на сосудодвигательную функцию эндотелия и процесс апоптоза у пациентов с цереброваскулярной патологией на ранних стадиях развития процесса.

Материал и методы

В исследование были включены 20 пациентов с начальными проявлениями недостаточности мозгового кровообращения (НПМК) и дисциркуляторной энцефалопатией 1-й стадии (ДЭП 1), согласно классификации Е.В. Шмидта,

Продолжение на стр. 32.

М.А. Трещинская, д.м.н., Ю.И. Головченко, К.Н. Игрунова, Д.В. Ватлизов, Т.М. Рябиченко, О.А. Ключникова, А.Ю. Гончар, И.В. Курочкин,
Национальная медицинская академия последипломного образования им. П.Л. Шупика, Киевская городская клиническая больница № 9

Патогенетически обоснованный подход к превентивной терапии цереброваскулярной патологии

Продолжение. Начало на стр. 31.

в возрасте от 40 до 63 лет (средний возраст 53,8±6,2 года). Среди обследованных пациентов были 11 женщин и 9 мужчин. АГ 1-й и 2-й стадии была диагностирована у 18 (90%) обследованных пациентов.

Диагноз «начальные проявления недостаточности кровоснабжения головного мозга» устанавливается при наличии у больного факторов риска сосудистого заболевания и не менее двух из следующих жалоб: головная боль, головокружение, шум в голове, нарушение памяти, снижение работоспособности, нарушения сна, которые отмечаются пациентом не менее 1 раза в неделю на протяжении 3 последних месяцев, при отсутствии в анамнезе черепно-мозговой травмы, признаков органического дефицита, преходящего нарушения мозгового кровообращения, инфекционных заболеваний головного мозга. В исследовании не включали лиц, перенесших нарушения мозгового кровообращения, инфаркт миокарда, а также тяжелые соматические заболевания. Всем пациентам проводилась ядерная магнитно-резонансная томография головного мозга с целью исключения значимого повреждения головного мозга и, таким образом, подтверждения диагноза НПНМК и ДЭП 1-й стадии.

Всем пациентам проводились общеклиническое и клинико-неврологическое обследования, на основании которых пациенты были рандомизированы для исследования; клинико-лабораторные обследования позволяли исключить тяжелую соматическую патологию и помогали выявить сосудистые факторы риска (гипергликемия, дислипидемия и т.д.). Клинико-инструментальные методы обследования помимо МРТ включали дуплексное сканирование экстра- и интракраниальных сосудов головного мозга, с помощью которого диагностировались гемодинамически значимые стенозы и деформации сосудов головы и шеи, а также выявлялись пациенты с атеросклеротическим поражением сосудов головы.

Функциональное состояние эндотелия оценивали по величине прироста диаметра, или ПЗВД, плечевой артерии с помощью теста реактивной гиперемии (D.S. Celermajer et al., 2002). Плечевую артерию визуализировали с помощью ультразвукового сканера SimensG-50 (Medical Inc., США, 2002) линейным датчиком с частотой 7 МГц. С помощью компрессионной манжетки блокировали кровоток в плечевой артерии на 5 мин, а затем вызывали быструю декомпрессию. В режиме двухмерного ультразвукового сканирования датчиком высокого разрешения определяли изменение диаметра плечевой артерии в ответ на увеличивающийся поток крови, что сопровождается повышением напряжения сдвига, активацией eNOS и выделением NO. Принято считать нормальной реакцией плечевой артерии в пробе с реактивной гиперемией ее дилатацию более чем на 10% от исходного диаметра. Сосудистая реакция рассматривается как патологическая в случаях, когда прирост диаметра составляет менее 10% от исходного уровня либо когда наблюдается вазоконстрикция.

У пациентов до и после курса лечения L-аргинином (4 г в сутки) был произведен забор крови с целью изучения уровня нитрита и эндотелина-1 как показателей сосудодвигательной активности эндотелия. Концентрация эндотелина-1 определялась методом иммуноферментного анализа с помощью реактива DRGEndotelin-1 ELISA (США). Уровень нитрита (NO₂) определяли флуориметрическим методом с помощью реактива Sigma-Aldrich (США).

Всем пациентам до проведения лечения производился забор крови натощак с целью исследования показателей апоптоза без изменений и на фоне добавления *in vitro* L-аргинина (препарат Тивортин производства компании «Юрия-Фарм») в расчетной дозе 4 и 8 г L-аргинина в сутки. Материалом для исследования служили мононуклеарные клетки (МНК) периферической крови, которые выделяли на градиенте плотности фикоколл-урографин (d=1,077) в асептических условиях. В дальнейшем выделенные МНК помещали в инкубационную среду RPMI-1640 (Sigma, США) с добавлением 10% ЭТС (Sigma, США). Суспензию клеток делили на 6 равных порций в пробирки для инкубации, после чего добавляли в помеченные пробирки препарат в расчетных концентрациях. Затем в определенные пробирки добавляли индуктор (в качестве индуктора апоптоза использовался глюкокортикоид дексаметазон) в апоптозиндуцирующей концентрации. Инкубацию проводили 18 ч при t=37°C. После инкубации клетки отмывали и изучали уровень апоптоза с использованием набора Annexin V-FITC Apoptosis detection Kit I (BD Bioscience Pharmingen, США) и изменение митохондриального мембранного потенциала с использованием родамина 123 и пропидия йодида (Sigma, США) в каждой пробе. Исследования проводили на проточном цитометре PAS (Partec, Германия).

В дальнейшем рассчитывался индекс индукции апоптоза (ИИА), который отражает не просто количество клеток, имеющих морфологические признаки апоптоза при микроскопическом исследовании ткани, такие как индекс апоптоза, а функциональный резерв клеток, т.е. степень

стойкости к повреждающим агентам — как экзо-, так и эндогенным. Этот показатель позволяет оценить исходное состояние клеток иммунной системы, приближая лабораторные данные к клинической оценке состояния организма. Важным моментом явилась оценка ИИА на фоне L-аргинина в дозе, аналогичной внутривенному введению Тивортина, — 4 и 8 г в сутки.

Все пациенты в ходе лечения, которое включало терапию, направленную на коррекцию факторов риска, прежде всего АГ и дислипидемии, при необходимости получали курс Тивортина в течение 10 дней в дозе 100 мл (4 г L-аргинина) внутривенно капельно.

Для статистического анализа данных применялась программа Statistica 6.0. Статистически значимая разница между показателями принималась при p<0,05.

Результаты и обсуждение

Все пациенты (n=20) до лечения предъявляли ряд жалоб: на головную боль (n=16; 80%), чаще всего тупую, без четкой локализации, не связанную с повышением артериального давления, возникающую при переутомлении, перемене погоды; головокружение (n=9; 45%), как правило, несистемного характера, усиливающееся при перемене положения тела; шум в голове диффузного характера (n=11; 55%), постоянный или преходящий; а также нарушение памяти (n=18; 90%), связанное прежде всего с повышенной лабильностью, трудностью фокусировки внимания, что приводило к снижению памяти на текущие события, нарушению механической памяти, логическая память оставалась интактной; нарушения сна (n=6; 30%) у обследованных пациентов чаще всего были связаны с повышенной лабильностью и встречались преимущественно у мужчин (n=4; 20%).

После курса лечения большинство пациентов (n=17; 85%) отметили повышение работоспособности, снизились интенсивность и частота жалоб. Встречаемость жалоб после курса L-аргинина изменилась следующим образом: головная боль наблюдалась у 12 (60%) больных; головокружение у 4 (20%) пациентов; шум в голове диффузного характера наблюдался у 17 (85%) обследованных; нарушение памяти, точнее рассеянность, была выявлена у 7 (35%) пациентов; нарушения сна — у 3 (15%) обследованных. Статистически значимое улучшение состояния наблюдалось у пациентов, испытывающих шум в голове и нарушение концентрации внимания. Следует отметить, что препарат переносился хорошо, побочные явления при внутривенном введении отмечены не были.

Таблица 1. Динамика жалоб после курса терапии

Жалоба	До лечения	После лечения
Головная боль	80% (n=16)	60% (n=12)
Головокружение	45% (n=9)	20% (n=4)
Шум в голове	85% (n=17)	55% (n=11)*
Нарушение концентрации внимания	90% (n=18)	35% (n=7)*
Нарушение сна	30% (n=6)	15% (n=3)

* p<0,05 — статистически значимое отличие по указанному показателю в динамике.

Данные оценки эндотелиальной функции представлены в таблице 2, в которой показано, что до лечения (оценка ПЗВД проводилась до и после курса лечения L-аргинином) ЭД наблюдалась у 18 (90%) пациентов, в то время как после терапии признаки ЭД выявлялись лишь у 3 (15%) больных.

Таблица 2. Показатели ПЗВД в динамике

Показатель	До лечения (n=20)	После лечения (n=20)
ПЗВД<10%	18 (90%)	3 (15%)*
Исходный диаметр плечевой артерии, мм	4,02±0,31	4,15±0,26
Диаметр на 1-й секунде, мм	4,46±0,38	4,76±0,27
Диаметр на 60-й секунде, мм	4,83±0,35	5,21±0,37*
ПЗВД на 1-й секунде, %	9,79±7,25	11,94±3,98
ПЗВД на 60-й секунде, %	10,15±7,80	20,10±9,64*
Время восстановления, мин	4,69±0,62	4,10±0,97*

* p<0,05 статистически значимое отличие по указанному в шапке колонки показателю между образцами.

В таблице 3 представлены биохимические показатели сосудодвигательной функции эндотелия в динамике. Выявлено, что у пациентов с НПНМК и ДЭП 1-й стадии уровень нитритов и эндотелина-1 значительно выше, чем у относительно здоровых добровольцев (n=7).

Таблица 3. Динамика показателей концентраций нитрита и эндотелина-1 у пациентов с начальными стадиями цереброваскулярной недостаточности в ходе лечения

Показатель	До лечения	После лечения	p	У здоровых пациентов
Нитриты, мкмоль/л	1,899±0,789	1,365±0,417	0,0109	1,178±0,235
Эндотелин-1, нг/мл	0,986±0,53	0,3147±0,138	0,0001	0,240±0,12

Ключевым моментом исследования было выявление положительного влияния Тивортина на функциональный резерв МНК, причем в дозе 4 г/сут, но не 8 г/сут, что только подтверждает гипотезу о дозозависимости эффекта и, в данном случае, регулирующем влиянии доз, приближающихся к суточной потребности в частично незаменимой аминокислоте (табл. 4).

Таблица 4. Показатели апоптоза лимфоцитов периферической крови пациентов с НПНМК (*in vitro*)

	Спонтанный апоптоз, % от общего количества клеток	Индукцированный апоптоз, % от общего количества клеток	ИИА, у.е.
Без препарата	19,44±8,2	23,53±7,7	0,838±0,2
Тивортин 4 г/сут	17,29±5,74	23,64±7,2	0,736±0,1*
Тивортин 8 г/сут	16,97±6,13	21,50±7,3	0,801±0,03

* Статистически значимое отличие по указанному в шапке колонки показателю между образцами.

Обсуждение

В ходе исследования наблюдалась положительная динамика в состоянии пациентов с начальными стадиями цереброваскулярной недостаточности, что отражалось в уменьшении встречаемости основных жалоб. Статистически значимо снизилось количество жалоб, которые характеризуют функциональное состояние центральной нервной системы (субъективное ощущение шума в голове, нарушение концентрации внимания и рассеянность).

На фоне лечения была отмечена нормализация показателя распространенной эндотелиальной функции ПЗВД, после курса L-аргинином количество больных с признаками ЭД уменьшилось с 18 до 3.

Было выявлено, что терапия L-аргинином оказывает благоприятное влияние на уровень эндотелина-1, который в результате стал приближаться к таковому у здоровых пациентов. Кроме того, наблюдалось снижение уровня нитрита, который опосредованно отражает метаболизм NO и должен находиться в балансе с уровнем эндотелина-1. Таким образом, препарат оказывает регулирующее влияние на ключевые биологически активные вещества, участвующие в регуляции сосудистого тонуса, в том числе мозговые сосуды.

Изучение функционального резерва клеток иммунной системы выявило статистически значимые отличия ИИА при использовании Тивортина в дозе, аналогичной суточной дозе L-аргинина, — 4 г в сутки. Кроме того, было показано отсутствие статистически значимых различий в значениях спонтанного и индуцированного апоптоза, но снижение уровня указанных показателей свидетельствует о дозозависимом эффекте и необходимости индивидуально подбирать дозу препарата, так как во время исследования в 2 (10%) случаях увеличение функционального резерва происходило только после применения дозы, аналогичной суточной дозе L-аргинина, — 8 г в сутки. Таким образом, результаты исследования ИИА позволяют говорить о потенциально протекторных свойствах Тивортина относительно внешних проапоптогенных воздействий в определенной дозе. При этом абсолютные показатели спонтанного и индуцированного апоптоза диагностической значимости не имели, что указывает на регулирующую, сбалансированную направленность действия препарата. Следует отметить, что увеличение дозы вдвое в большинстве случаев не только не оказывает дополнительного положительного влияния, но и приводит к нарушениям регуляции клеточной смерти, что обуславливает необходимость индивидуального подхода к каждому случаю.

Таким образом, применение Тивортина в комплексе превентивного лечения у пациентов с сосудистыми факторами риска и признаками ЭД позволяет говорить о его патогенетической направленности действия на патологический процесс.

Список литературы находится в редакции.