

## ОГРАНИЧЕННЫЙ ПРОТЕОЛИЗ И ЕГО ИНГИБИРОВАНИЕ В АСЦИТИЧЕСКОЙ ЖИДКОСТИ ПРИ РАКЕ ЯИЧНИКОВ И ТУБЕРКУЛЁЗЕ ПРИДАТКОВ МАТКИ

Франциянц Е.М., Моисеенко Т.И., Козлова Л.С., Исакова Ф.С.

*ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздрава России, г. Ростов-на-Дону, e-mail: super.gormon@yandex.ru*

В асцитической жидкости (АЖ) при раке яичников (РЯ, n=26- цистаденокарциномы, T<sub>3-4</sub>N<sub>0</sub>M<sub>0</sub>) и туберкулёзе придатков (ТП, n=11) обнаружена активность ферментов трипсинового типа,  $\alpha$ -2-макроглобулина ( $\alpha_2$ М) и  $\alpha$ -1-протеиназного ингибитора ( $\alpha_1$ ПИ) с резким нарушением протеиназо-ингибиторного баланса, сравнительно с кровью. При ТП только плазминоген и плазмин при значительной активации имели нормальный баланс, количество эндогенных ингибиторов было недостаточно. При РЯ высокое содержание  $\alpha_2$ М и  $\alpha_1$ ПИ в АЖ может быть следствием поступления белков с изменёнными свойствами из злокачественной опухоли, что препятствует контролю протеолиза. При РЯ истощение и дисбаланс ККС и ФС, даже в присутствии большого количества ингибиторов, исключают защитно-адаптивные функции ККС и ФС, превращая их в повреждающие факторы, способствующие распространению злокачественного процесса.

Ключевые слова: асцитическая жидкость, яичники, трипсиноподобные протеиназы, ингибиторы.

## LIMITED PROTEOLYSIS AND ITS INHIBITION IN ASCITIC FLUID IN OVARIAN CANCER AND TUBERCULOSIS OF THE UTERINE APPENDAGES

Frantsiyants E.M., Moiseenko T.I., Kozlova L.S., Isakova F.S.

*Rostov Research Institute of Oncology, Rostov-on-Don, e-mail: super.gormon@yandex.ru*

Activity of trypsin-like enzymes,  $\alpha_2$ -macroglobulin ( $\alpha_2$ M) and  $\alpha_1$ -proteinase inhibitor ( $\alpha_1$ PI) with a sharp proteinase-inhibitor imbalance were found in the ascitic fluid (AF) in ovarian cancer (OC, n=26 – cystadenocarcinoma, T<sub>3-4</sub>N<sub>0</sub>M<sub>0</sub>) and tuberculosis of the uterine appendages (TUA, n=11), in comparison with the blood. In TUA, only plasminogen and plasmin with significant activation had a normal balance, while quantity of endogenous inhibitors was insufficient. High content of  $\alpha_2$ M and  $\alpha_1$ PI in AF in OC could be the result of ingress of proteins with modified characteristics from the tumor which prevented control of proteolysis. In OC, depletion and imbalance of kallikrein-kinin system (KKS) and fibrinolytic system (FS), even with a greater quantity of inhibitors, excluded protective and adaptive functions of KKS and FS making them damaging factors contributing to the malignant process spread.

Keywords: ascitic fluid, ovaries, trypsin-like proteinases, inhibitors.

Неослабевающий интерес к особенностям метаболизма трипсиновых протеиназ, в частности компонентов калликреин-кининовой и фибринолитической систем (ККС и ФС), а также молекулярным механизмам взаимодействия между собой и с универсальными ингибиторами, объясняется их участием в регуляции многих физиологических функций организма [3,8,9]. Калликреин считается центральным регулятором многих систем ограниченного протеолиза, но регуляторный фермент может также стать причиной или участником патологических событий в организме [9,12]. Плазмин известен своей важной ролью в регуляции функций и плотности межклеточного матрикса, ангиогенезе, созревании половых клеток, санации полостей, тканей и жидкостей организма, развитии воспаления и злокачественных опухолей [3]. Универсальные ингибиторы  $\alpha$ -2-макроглобулин ( $\alpha_2$ М) и  $\alpha$ -1-протеиназный ингибитор ( $\alpha_1$ ПИ) регулируют активность протеолиза и являются молекулярной составляющей эндогенной защиты организма.

Асцитическая жидкость (АЖ) при различных заболеваниях яичников является ценной для изучения биологической средой поражённого организма, содержащей белка около 20-50 г/л [1,2].

Асцит может развиваться при любом воспалительном заболевании органов брюшной полости, но, вследствие быстротечности большинства таких патологий, выраженный и длительный асцит наблюдается только при туберкулезном перитоните [1]. В связи с этим для сравнения с АЖ, образующейся при асцитической форме рака яичников, нами использован подобный материал, полученный при операции по поводу туберкулёза придатков (ТП). Рак яичников (РЯ), в силу его тяжёлого течения и высокой смертности, является одной из наиболее агрессивных опухолей. У большинства больных РЯ заболевание в основном остаётся ограниченным брюшной полостью. ТП является типичным воспалительным заболеванием, для которого характерна экссудативная реакция [1]. Часто АЖ, образующаяся при раке яичников, по внешнему виду и составу не отличается от экссудатов другого происхождения [1,7]. В представляемом исследовании также не было выявлено явных различий между двумя видами исследуемого материала. Ограниченный протеолиз и его ингибирование в асцитической жидкости ранее не исследовались.

Цель исследования: изучение протеиназо-ингибиторного равновесия в АЖ больных раком яичников и туберкулёзом придатков для определения его роли в развитии заболеваний и точек приложения медикаментозной терапии.

#### **Материалы и методы исследования**

Во всех случаях получено письменное добровольное информированное согласие больных и этического комитета РНИОИ на использование операционного материала для научных исследований. Изучена АЖ больных злокачественными опухолями яичников без лечения (n=26, цистаденокарциномы, T<sub>3-4</sub>N<sub>0</sub>M<sub>0</sub>), результаты сравнивали с полученными в АЖ больных туберкулёзом придатков до лечения (ТП, n=11). Медиана возраста женщин составила 56,5±2,6 лет, все находились в различных периодах менопаузы. Внешних различий асцитической жидкости при указанных патологиях не отмечено: во всех случаях она была непрозрачной, в 29,3 % случаев имелся лёгкий осадок, составляющий около 20–22 % объёма. Розовый оттенок (геморрагическая составляющая) присутствовал примерно в 64–72 % случаев при каждом заболевании. В нативной АЖ исследовали трипсиноподобные протеиназы и ингибиторы с последующим пересчётом на 1 мг белка в 1 мл (по Лоури). Кинетику ферментов ККС определяли спектрофотометрически по скорости гидролиза этилового эфира N-α-бензоил-L-аргинина и гиппурил-L-лизина; плазминоген, плазмин, α<sub>2</sub>M и α<sub>1</sub>ПИ – методами ИФА на стандартных тест-наборах. Для сравнения использовали

плазму крови 32 практически здоровых доноров. Статистический анализ производили с помощью программы Statistica v.10 и t-критерия Стьюдента.

### Результаты и их обсуждение

Исследование АЖ при РЯ и ТП показало наличие активности трипсиноподобных протеиназ и универсальных ингибиторов. По общей активности трипсиновых протеиназ (ОАТ) в АЖ отличий практически не было, но активность калликреина (К) и плазмина (П), содержание их проферментов прекалликреина (ПК) и плазминогена (ПГ), активность кининазы 1 (карбоксипептидазы N, КПН), а также содержание ингибиторов  $\alpha_2$ М и  $\alpha_1$ ПИ достоверно различались (табл. 1).

Учитывая состав АЖ, мы сочли возможным сравнить полученные данные с плазмой крови (табл. 1,2), т.к. считается, что выпот происходит в основном из повреждённых воспалением сосудов [1,2,7]. В крови при злокачественных новообразованиях установлен дефицит прекалликреина [6], что может определять его низкое содержание и в АЖ (табл. 1). В ткани злокачественной опухоли количество ПК увеличивается, сравнительно с линией резекции [5], поэтому при тканевом выпоте в брюшную полость в АЖ неизбежно увеличилось бы и содержание прекалликреина.

**Таблица 1**

Компоненты кининовой системы, фибринолитической системы  
и универсальные ингибиторы в асцитической жидкости

Исследуемые показатели в пересчёте на 1 мг белка в 1 мл жидкости	Плазма крови здоровых доноров	Туберкулёз придатков (M±m)	Злокачественная опухоль одного яичника (M±m)
Общий белок по Лоури г/л	72,13±5,2	55,04±3,2 <sup>1</sup>	59,98±3,3 <sup>1</sup>
ОАТ ед/мг/мин	4,908±0,3	18,07±1,1 <sup>1</sup>	17,73±1,1 <sup>1</sup>
ПК ед/мг/мин	4,889±0,3	3,589±0,2 <sup>1</sup>	2,068±0,1 <sup>1,2</sup>
К ед/мг/мин	0,664±0,05	2,183±0,1 <sup>1</sup>	1,807±0,1 <sup>1,2</sup>
КПН мкМ/мг/мин	0,011±0,001	0,011±0,001	0,014±0,001 <sup>1,2</sup>
ПГ мкМ/мг	0,027±0,002	0,070±0,005 <sup>1</sup>	0,043±0,003 <sup>1,2</sup>
П мкМ/мг	0,012±0,001	0,032±0,002 <sup>1</sup>	0,073±0,005 <sup>1,2</sup>
$\alpha_2$ М мкМ/мг	0,059±0,004	0,042±0,002 <sup>1</sup>	0,060±0,004 <sup>1,2</sup>
$\alpha_1$ ПИ мкМ/мг	0,386±0,03	0,306±0,02 <sup>1</sup>	0,734±0,04 <sup>1,2</sup>

**Таблица 2**

Баланс протеиназ и ингибиторов в асцитической жидкости

Коэффициенты баланса	Плазма крови здоровых доноров (M±m)	Туберкулёз придатков (M±m)	Злокачественная опухоль одного яичника (M±m)
К/ОАТ	0,14±0,01	12,1±0,8 <sup>1</sup>	10,2±0,6 <sup>1,2</sup>

ПК/К	7,4±0,5	1,6±0,1 <sup>1</sup>	1,1±0,1 <sup>1,2</sup>
К/КПН	60,4±3,8	195±10,3 <sup>1</sup>	129±6,8 <sup>1,2</sup>
ПГ/П	2,3±0,2	2,2±0,1	0,6±0,1 <sup>1,2</sup>
К/α <sub>2</sub> M	11,3±0,8	52,1±2,9 <sup>1</sup>	30,4±1,6 <sup>1,2</sup>
П/α <sub>2</sub> M	0,2±0,01	1,3±0,1 <sup>1</sup>	0,9±0,1 <sup>1,2</sup>
ОАТ/α <sub>1</sub> ПИ	12,7±0,9	59,1±3,5 <sup>1</sup>	24,2±1,4 <sup>1,2</sup>

Примечание для табл. 1 и 2: <sup>1</sup> – достоверно, сравнительно с плазмой крови (p<0,01);

<sup>2</sup> – достоверно относительно данных незлокачественного заболевания (p<0,05).

При цистаденокарциноме яичника, на III–IV стадиях, асцит является доминирующим синдромом [1,2,7]. Как и при туберкулезном перитоните, жидкость в одних случаях оказывается экссудатом, в других – трансудатом. Учитывая высокое содержание белка в исследуемой АЖ при обоих заболеваниях (табл. 1), очевидно следует считать её экссудатом. Для хронических туберкулёзных перитонитов характерным считается преобладание лимфоцитов в асцитической жидкости [1]. В условиях раковой интоксикации, в асцитической жидкости содержатся циркулирующие иммунные комплексы и множество белков, в основном изменённой конформации, которые не могут эффективно выполнять свои функции [2]. Этим же автором установлено, что до проведения специализированного лечения у больных раком яичников в сыворотке крови и в асцитической жидкости выявляются значительные метаболические нарушения.

При анализе активности ККС в АЖ становится очевидным, что баланс её компонентов (табл. 2) и при туберкулёзе придатков, и при раке яичников далёк от физиологического. Понятно, что нет возможности изучить нормальный баланс ККС в асцитической жидкости, поскольку уже само её присутствие в брюшной полости означает патологическое состояние. Однако в обстоятельном обзоре А. Pavlopoulouetal. [9] подчёркивается, что во всех тканях и жидкостях организмов любого уровня организации активных калликреинов в несколько раз меньше, чем их проферментов, причём цифры соотношения неактивной и активной форм тем выше, чем выше эволюционная ступень развития живого организма. В трудах Г.А. Яровой и других исследователей ККС неоднократно упоминается о том, что активность свободного калликреина крови в норме стремится к минимальным цифрам вплоть до нуля, значительно повышаясь лишь при патологии, тогда как содержание прекалликреина менее подвержено колебаниям, поскольку он является одним из факторов свёртывания, обязательным метаболитом стабильности эндотелия и межклеточного матрикса. В тканях, особенно железистых, активность калликреина и содержание прекалликреина могут быть несколько выше, т.к. они необходимы для нормального метаболизма [8].

Баланс ПК/К в АЖ, близкий к единице при ТП и РЯ (табл. 2), свидетельствует о значительном «перерасходе» запаса прекалликреина, сравнительно с плазмой крови, вплоть до его истощения, в связи с чем система ПК-К лишена возможности выполнять свои регуляторные и адаптивно-защитные функции. Соотношение скорости образования и распада свободных кининов (К/КПН, табл. 2) достоверно различалось в АЖ при злокачественном и незлокачественном заболеваниях яичников, причём в последнем случае оно соответствовало данным плазмы крови. Это, по-видимому, связано с некоторыми различиями в содержании прекалликреина (табл. 1), полное истощение которого при РЯ могло сдерживать освобождение калликреина, даже при достаточном количестве активирующих факторов (белки, иммунные комплексы, раковые токсины, клетки крови и т.д.). При использовании одного субстрата в одинаковых условиях проведения реакции становится возможным оценить процентное содержание калликреина в общей активности трипсиновых протеиназ. Это соотношение приведено в таблице 2 (К/ОАТ), и оно при раке яичников было на 18,6 % ниже ( $p < 0,05$ ), чем при туберкулёзе придатков, и в последнем случае достоверность различий с нормой крови не установлена, несмотря на значительно увеличенную активность обоих показателей (табл. 1). Следовательно, при РЯ в асцитической жидкости в большей степени, чем при ТП, активирован весь спектр трипсиновых протеиназ, в связи с чем снижалась доля калликреина в практически одинаковой ОАТ (табл. 1). Тем не менее, патологическая активация ККС считается опасной для любых тканей и жидкостей организма, поскольку многие калликреины вовлечены в разные стадии развития рака и его прогрессии [9].

Касательно ФС, установлено, что в АЖ при ТП содержание плазминогена выше, чем плазмина в 2,2 раза, а при РЯ коэффициент баланса ПГ/П составил 0,6 в связи с высоким содержанием плазмина и резким снижением количества профермента (табл. 1,2).

При анализе изменений плазминогена и плазмина, очевидно, что их баланс при туберкулёзе придатков, несмотря на значительную активацию, близок к физиологическому. Такое же соотношение ПГ/П определяется, например, в крови доноров (табл. 2), в тканях интактных яичников и их доброкачественных опухолей [10]. В АЖ при раке яичников ПГ меньше, чем П в 1,7 раза (табл. 1), что говорит о патологическом дисбалансе предшественник/фермент (ПГ/П, табл. 2). Повышенная активность плазмина характерна для крови, тканей и биологических жидкостей при злокачественных новообразованиях [4,6,10]. Именно плазмин, кроме растворения фибрина, разжижает межклеточный матрикс, повреждает гистогематические барьеры и клеточные мембраны, является непосредственным активатором прекалликреина, трипсиногена, проэластазы и остальных

проферментов сериновых протеиназ, в том числе факторов роста, а также матриксных металлопротеиназ, коллагеназ и др.[3].

Ингибиторная активность в АЖ при РЯ по  $\alpha_2\text{M}$  и  $\alpha_1\text{ПИ}$  была достоверно выше, чем при ТП (табл. 1). Баланс  $\text{K}/\alpha_2\text{M}$  и  $\text{OAT}/\alpha_1\text{ПИ}$  при РЯ оказался достоверно низким, относительно ТП (табл. 2), что объяснимо с точки зрения высокой активности  $\alpha_2\text{M}$  и  $\alpha_1\text{ПИ}$  при РЯ и небольшого запаса прекалликреина. Несмотря на это, баланс  $\text{П}/\alpha_2\text{M}$  при РЯ в 1,5 раза выше, чем при ТП в связи с большим содержанием плазмина.

При выраженном воспалительном процессе, всегда сопровождающем туберкулёз, экссудация происходит вследствие резкого повышения проницаемости гистогематических барьеров, как следствие усиления процесса выпота (фильтрации) плазмы крови и микровезикулярного транспорта. При злокачественных новообразованиях воспалительный процесс начинается на поздних стадиях, при некрозе участков опухоли и повреждении прилегающих тканей, диссеминации процесса с вовлечением в процесс больших участков микрососудистой сети. Выход жидкости и растворённых белков во всех случаях осуществляется в местах соприкосновения эндотелиальных клеток. Фенестры увеличиваются при расширении сосудов, при сокращении контрактивных структур и округлении эндотелиальных клеток, что обусловлено прямым действием брадикинина [8]. Как уже упоминалось, количество последнего в обоих случаях исследования АЖ было повышенным, судя по высокой активности калликреина (табл. 1) – абсолютно специфичной кининогеназы [8]. Результатом экссудации является заполнение очага воспаления и интерстициальных пространств экссудатом. При сильном нарушении проницаемости, сопровождаемом разрушением стенки микрососуда, из плазмы выходят белки с высокой молекулярной массой ( $\alpha_2$ -глобулины, фибриноген) [1].

Таким образом, при ТП действие экзогенных этиологических факторов (микобактерии туберкулёза и их токсины), вызывая первичную альтерацию, приводит к длительному росту проницаемости микрососудов и воспалению с участием трипсиновых протеиназ и универсальных ингибиторов. В результате развивается некроз эндотелиальных клеток на уровне артериол небольшого диаметра, капилляров и венул, что ведет уже к стойкому повышению их проницаемости в очаге воспаления с выходом высокомолекулярных белков в интерстиций [1,7]. Сохранение нормального равновесия в системе ПГ-П АЖ, при высоком содержании компонентов, скорее подтверждает их активное участие в воспалительном процессе, чем свидетельствует о нормальном метаболизме. Биологический смысл экссудации состоит в отграничении очага через сдавление кровеносных и лимфатических микрососудов вследствие интерстициального отёка, а также в разведении факторов цитолиза в очаге воспаления для предотвращения

избыточной альтерации [7]. В этой связи возрастает необходимость санации интерстициальных пространств плазмином, протеиназой широкого спектра действия [3], при повышенной активности которого трудно провести грань между защитой и повреждением.

При РЯ истощение ККС и острый дисбаланс ФС, даже в присутствии большого количества ингибиторов, исключают защитно-адаптивные функции исследуемых систем в асцитической жидкости, обеспечивают участие их компонентов в патологическом процессе как повреждающих факторов, способствующих распространению злокачественного процесса [7-9,12]. Значительное содержание в АЖ  $\alpha_2$ М и  $\alpha_1$ ПИ при РЯ может быть следствием их поступления не только из крови и ткани яичника, но и из злокачественной опухоли, что меняет их свойства и препятствует контролю протеолиза [11].

### **Заключение**

Васцитической жидкости и при РЯ, и ТП обнаружены ферменты трипсинового типа и универсальные ингибиторы с резким нарушением протеиназо-ингибиторного баланса. Исключение составила активация системы ПГ-П, сохранившая нормальное соотношение «предшественник/фермент» при туберкулёзе придатков. Тем не менее в последнем случае недостаточное количество эндогенных ингибиторов не может остановить развивающееся воспаление.

При раке яичников в АЖ имеет место значительная активность систем ограниченного протеолиза и ингибиторов с качественным нарушением соотношения всех изученных показателей. Высокую активность плазмينا при истощении профермента можно считать специфичной не только для агрессивной неоплазмы [4,10], но и для экссудата в брюшную полость при диссеминации рака яичников. Способность злокачественной опухоли секретировать не только ферменты, но и ингибиторы известна [11] и подтверждается нашими результатами. Это свидетельствует о серьёзном искажении метаболических связей в ККС, ФС, обнаруженных в асцитической жидкости больных РЯ, а также их компонентов с системой универсальных ингибиторов и изменении статуса изученных систем с физиологического на патологический.

Наличие ферментов ограниченного протеолиза, установленное в АЖ при ТП и РЯ, в частности трипсиновых протеиназ, а также универсальных ингибиторов (и первые, и вторые – обязательные участники воспаления), вполне ожидаемо и требует как системной, так и локальной медикаментозной коррекции экзогенными ингибиторами протеиназ даже после удаления АЖ, поскольку продолжающийся выпот будет обеспечивать новые поступления белков, в том числе ферментов, следовательно, и распространение патологического процесса.

## Список литературы

1. Биохимический состав асцитической жидкости. (Электронный ресурс). URL:<http://www.medactiv.ru/ydiagn/diagn-090021.shtml> (дата публикации 22.05.12).
2. Меньшенина А.П. Внутривнутрибрюшинная химиотерапия на белковом концентрате асцитической жидкости в комплексном лечении больных асцитной формой рака яичников III–IV стадии заболевания: автореф. дис... канд. мед. наук. – Ростов-на-Дону, 2009. – 22 с.
3. Добровольский А.Б., Титаева Е.В. Система фибринолиза: регуляция активности и физиологические функции её основных компонентов. Обзор // Биохимия. – 2002. – Т. 67. – № 1. – С. 116-126.
4. Франциянц Е.М., Козлова Л.С., Горбунова Т.А. Плазмин, плазминоген и ингибиторы в ткани перифокальной зоны злокачественной опухоли мозга и ликворе // Thejournalmalignanttumors. – Ноябрь, 2012. – Т.2. – № 2. С. 159 (материалы XVI Российского онкологического конгресса).
5. Франциянц Е.М., Комарова Е.Ф., Черярина Н.Д. Состояние калликреин-кининовой системы ткани яичников при трансформации различного генеза. Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2014. – № 2 – С. 52-54.  
URL: [www.rae.ru/upfs/?section=content&op=show\\_article&article\\_id=5007](http://www.rae.ru/upfs/?section=content&op=show_article&article_id=5007) (дата обращения: 04.04.2014).
6. Франциянц Е.М., Максимова Н.А., Козель Ю.Ю., Ильченко М.Г., Козлова Л.С. Мониторинг плазминогена и плазмينا в плазме крови при лечении нефробластом у детей //Межд. журнал экспериментального образования. – 2014. – № 1. – С. 87-89.
7. Ходюкова А.Б., Батуревич Л.В. Лабораторное исследование выпотных жидкостей // Медицинские новости. – 2011. – № 10. – С. 17-19.
8. Яровая Г.А. Калликреин-кининовая система. Прошлое и настоящее. URL:<http://www.myshared.ru/slide/662762/> (опубликовано 11.12.2013).
9. Athanasia Pavlopoulou, Georgios Pampalakis, Ioannis Michalopoulos, Georgia Sotiropoulou. Evolutionary History of Tissue Kallikreins. Published: November 01, 2010. DOI: 10.1371/journal.pone.0013781. Affiliation: Department of Pharmacy, School of Health Sciences, University of Patras, Rion-Patras, Greece.
10. Frantsiyants Ye.M., Moiseyenko T.I., KomarovaYe.F., Kozlova L.S. Using certain indices of fibrinolytic system for forecasting the efficiency of neoajuvant chemotherapy in ovarian cancer. Journal of clinical oncology 2013 ASCO annual meeting Proceedings 49<sup>th</sup> Annual Meeting May 31-June, 4 2013 e 22022.



11. Katarina Wolf, Wu Yi I., Liu Yueying, Geiger Jörg, Tam Eric, Overall Christopher, Stack M. Sharon, Friedl Peter. Multi-step pericellular proteolysis controls the transition from individual to collective cancer cell invasion // Nature Cell Biol. – 2007. – V.9. – no.8, pp. 893-904.
12. Reis Fernando M., Silva-Filho Agnaldo L., Triginelli Sérgio A., Camargos Aroldo F. Biochemical markers of ovarian cancer: Diagnostic and prognostic value // Ital. J. Gynaecol. and Obstet. – 2004. – V.16. – no. 3-4, pp. 97-102.

**Рецензенты:**

Шихлярова А.И., д.м.н., профессор ФГБУ РНИОИ МЗ РФ, г. Ростов на Дону;

Непомнящая Е.М., д.м.н., профессор ФГБУ РНИОИ МЗ РФ, г. Ростов на Дону.