DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

METÁN BELÉLEGZÉS HATÁSA AZ AKUT MESENTERIALIS ISCHAEMIA ÉS A KORAI REPERFÚZIÓ OKOZTA BÉLSZAKASZ-FÜGGŐ FUNKCIONÁLIS, STRUKTURÁLIS ÉS MOLEKULÁRIS VÁLTOZÁSOKRA PATKÁNY BÉLCSATORNÁBAN

POLES MARIETTA ZITA

Témavezetők:

PROF. DR. FEKETE ÉVA
professzor emerita

DR. BÓDI NIKOLETT
egyetemi adjunktus

DR. KASZAKI JÓZSEF
egyetemi docens

BIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA
SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM
TERMÉSZETTUDOMÁNYI ÉS INFORMATIKAI KAR
ÉLETTANI, SZERVEZETTANI ÉS IDEGTUDOMÁNYI TANSZÉK

SZEGED
2015

RÖVIDÍTÉSEK MAGYARÁZATA

AMS	arteria mesenterica superior
HuC/HuD	humán neuronális fehérje
I/R	ischaemia/reperfúzió
MPO	mieloperoxidáz
nNOS	neuronális nitrogén-monoxid szintáz (neuronal nitric oxide synthase)
NO	nitrogén-monoxid
NOS	nitrogén-monoxid szintáz (nitric oxide synthase)
ROS	reaktív oxigén származék (reactive oxygen species)
XOR	xantin oxidoreduktáz

BEVEZETÉS

Az *arteria mesenterica superior* (AMS) a vékonybél teljes hosszának és a vastagbél proximális szakaszának vérellátásáért felelős verőér. Elzáródása vagy véráramlásának tartós csökkenése a bélfal oxigénhiányos állapotát, az akut mesenterialis ischaemia kialakulását okozza. Az ellátó erek nagyfokú kollateralizációja és az ezzel járó kompenzációs mechanizmusok miatt a bélfal a hosszabb idejű hipoperfúziót is jól tolerálja. Az akut mesenterialis ischaemia ezért hosszú ideig tünetmentes vagy más betegségre is jellemző, nem specifikus tünetegyüttest mutat. Ezért a bélcsatorna ischaemiás károsodása csak későn, a bélfal visszafordíthatatlan károsodása után ismerhető fel egyértelműen. Ezzel magyarázható az, hogy a mesenterialis ischaemiával diagnosztizált esetek mortalitási rátája napjainkban is igen magas, 60-80% körül van.

A nem letális mesenterialis ischaemiát túlélt betegeknél számos esetben különböző súlyosságú, nehezen kezelhető motoros működési zavarokkal járó klinikai tüneteket írtak le. A bélcsatorna motoros működésének jelentős megváltozása az ischaemia és a reperfúzió alatt egyértelműen a motoros működéseket szabályozó neuronok érintettségére utalnak.

Az emlős bélcsatorna egyes funkcióinak irányítását, a szekréció, az abszorpció és a motilitás összehangolását a bélidegrendszer végzi. A motoros működések szabályozásában fontos szerepet játszanak a nitrogén monoxidot (NO) neurotranszmitterként használó nitrerg neuronok. A NO keletkezését fiziológiás körülmények között a nitrogén monoxid szintáz (NOS) katalizálja. A NOS oxigénfüggő enzim, így működése hipoxia hatására az oxigénhiány mértékétől függően zavart szenved. Ugyanakkor a NO szintjének jelentős emelkedése a reperfúzió korai fázisában, majd a nitrerg neuronok szelektív pusztulása a reperfúzió késői fázisában jól ismert. Ezek a megfigyelések azt mutatják, hogy a myentericus nitrerg neuronok érzékenyen reagálnak környezetük oxigenizáltsági állapotának változásaira. Arról azonban, hogy az ischaemiás inzultus során, illetve a reperfúzió korai fázisában változnak-e a nitrerg neuronok kvantitatív sajátságai, nem állnak rendelkezésünkre irodalmi adatok.

Molekuláris szinten az ischaemia reduktív stresszként jellemezhető. A reperfúzió során a szövetekbe áramló oxigén nagy mennyiségű reaktív oxigénszármazékok (reactive oxygen species, ROS) képződését okozza, s ezáltal paradox módon a szövetek ischaemiás károsodását tovább súlyosbítja. A ROS által kiváltott lipidperoxidáció arachidonsav és az arachidonsav származékainak felszabadulásához vezet, melyek elősegítik a fehérvérsejtek aktiválódását és vándorlását a sérült szövetekbe. Az aktivált leukociták azután további, nagy

mennyiségű ROS-ot szabadítanak fel, s így fokozzák az oxidatív stresszt. A sejtek oxidatív stressz ellen alkalmazott egyik fő védekező mechanizmusa a NO szintézis szabályozása. A NO megnöveli a gyulladt szövetek véráramlását, szabályozza a bélhámsejteket védő nyálka termelését, csökkenti a leukociták mesenterialis endotheliumhoz történő kitapadását és véd a másodlagos fertőzésektől. A NO ROS-kal történő reakciója antioxidáns szerepére utal. A reperfúzió korai fázisában azonban a ROS fokozott keletkezése korlátozza a NO felhalmozódását, s így megakadályozza a NO kedvező, védő hatásainak érvényesülését. Ráadásul a ROS-okkal elreagált NO a reperfúziós károsodások másik jelentős folyamatához, a nitrozatív stressz kialakulásához vezet. Az oxidatív és nitrozatív stresszmarkerek endogén szintje jelentősen befolyásolja az egyes bélszakaszok érzékenységét a szöveti mikrokörnyezet megváltozott oxigenáltsági szintjére.

A metán belélegzés gyulladáscsökkentő szerepét kutatócsoportunk ischaemia/reperfúziós (I/R) állatmodelleken korábban már bizonyította. A reperfúziós fázis korai szakaszában alkalmazott metán belélegeztetés csökkentette a mikrokeringési zavarokat, a nyálkahártya károsodás mértékét és a vékonybél oxidatív és nitrozatív stresszmarkereinek szintjét. Arról azonban, hogy a metán belélegzése befolyásolja-e az ischaemiás inzultus során és a reperfúzió korai fázisában kialakuló bélműködési zavarokat, valamint a bélfal strukturális és molekuláris változásait, nem állnak rendelkezésünkre irodalmi adatok.

CÉLKITŰZÉSEK

Az I/R-s károsodások a reperfúzió késői időszakában jól ismertek. Arról azonban, hogy a már súlyos funkcionális zavarokat is okozó szövettani elváltozásokat megelőzően az ischaemia alatt, illetve a reperfúzió korai szakaszában milyen strukturális, funkcionális vagy molekuláris változások történnek a bélfalban, szinte semmit sem tudunk. Munkánk során ezért a következő kérdésekre kerestük a választ:

Vannak-e bélszakasz-specifikus különbségek az akut ischaemia, illetve az ischaemiát követő rövid reperfúziós fázisban:

- a bélfalizomzat kontrakcióinak frekvencia- és amplitúdó értékeiben?
- a teljes myentericus neuronpopuláció, illetve a myentericus nitrerg neuronok kvantitatív sajátságaiban?
- a szöveti oxidatív és nitrozatív stresszmarkerek szintjében?

Ha vannak ilyen különbségek, akkor

- az ischaemiás fázis végén és a reperfúziós fázis elején alkalmazott metán belélegzés befolyásolja-e ezeknek a kialakulását?

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Ahhoz, hogy az ischaemia és a reperfúzió ideje alatt bekövetkező változásokat külön, egymástól függetlenül is vizsgálhassuk, kísérleti állatainkat random módon négy rövid (álműtött, ischaemiás, metánkezelt álműtött és metánkezelt ischaemiás) és négy hosszú (álműtött, I/R-s, metánkezelt álműtött és metánkezelt I/R-s) vizsgálati idejű csoportra osztottuk. Az ischaemiát az AMS elszorításával váltottuk ki. Az ischaemia minden esetben 50 percig tartott, melyet a hosszú vizsgálati idejű csoportban 120 perces reperfúziós fázis követett. A metánkezelt állatok az ischaemiás fázis utolsó 10 percében, illetve a reperfúzió első 5 percében 2,2 térfogatszázalék metánnal dúsított normoxiás levegőkeveréket lélegeztek be.

A bélcsatorna motoros aktivitásában bekövetkező változások vizsgálatára a bélfal külső izomrétegéből a bélfal simaizom kontrakcióit kísérő mioelektromos jeleket vezettünk el, melyeket a vékony- és vastagbélre jellemző frekvenciatartományokra szűrtünk. A regisztrátumok gyors Fourier-transzformációjával meghatároztuk a simaizom kontrakciók domináns frekvencia értékeit és a hozzá tartozó amplitúdó értékeket.

A myentericus összneuronszám megállapításához HuC/HuD pán-neuronális marker ellen-, míg a myentericus nitrerg neuronok kvantitatív változásainak vizsgálatára neuronális NOS (nNOS) ellen készített specifikus antitestek felhasználásával immunhisztokémiai festéseket végeztünk. A megfestett bélnyúzat preparátumokról digitális felvételeket készítettünk, majd megszámoltuk az egy látótérre eső immunpozitív sejtek számát. A nitrerg neuronok arányát az összneuronszámhoz viszonyítva adtuk meg.

A vizsgált bélszakaszok oxidatív stressz szintjének változásait a szöveti xantin oxidoreduktáz (XOR) és a szöveti mieloperoxidáz (MPO) aktivitásának mérésével jellemeztük. A NO szint változásait a szöveti nitrit/nitrát szint meghatározásával, míg nitrozatív stressz szintjének változásait a szöveti nitrotirozin szint mérésével jellemeztük.

EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉS

Kimutattuk, hogy ischaemia hatására a vékony- és a vastagbél falában a simaizom kontrakciókat kísérő elektromos jelek frekvencia értékei csökkentek, míg az amplitúdó érékei emelkedtek. Bár a hipoperfúzió hatására bekövetkező mioelektromos változások tendenciája a vékony- és vastagbélben megegyezett, azok időben elkülönültek. Amíg a vékonybélben az elektromos jelek változása már az ischaemia első 25 percében kimutatható volt, a vastagbélben ezek csak az ischaemia második 25 percében jelentek meg, ami a colon hipoxiával szembeni nagyobb toleranciáját jelzi.

A reperfúzió kezdetén a bélfalból elvezetett mioelektromos jelek frekvencia értékei az alapaktivitás szintjére tértek vissza, az amplitúdó értékek azonban a vékonybélben az alapaktivitásnál szignifikánsan alacsonyabb értéket mutattak. Ez jelzi, hogy a biokémiai markerekkel kimutatható fokozott oxidatív és nitrozatív stressz már a korai reperfúzió során is befolyásolja az izomkontrakciókat kísérő elektromos jelek egy részét, s így a korai hipoperfúzió okozta változások funkcionális szempontból csak részben reverzibilisek.

A terápiás célú metán belélegeztetés időpontját az ischaemiás fázis utolsó 10 és a reperfúziós periódus első 5 percében, korábbi eredményeink alapján határoztuk meg. Úgy gondoltuk, hogy terápiás szempontból az az időintervallum lehet a leghatékonyabb, amikor éppen elkezdődik az egyes stresszmarkerek akkumulációja. Bár a metán belélegzés a simaizom kontrakciókat kísérő elektromos jelek domináns frekvencia értékeit a vékony- és a vastagbélben is csökkentette, az amplitúdók értékeit egyik vizsgált bélszakaszban sem befolyásolta. Miután az elektromos jelek változásai már az ischaemia korai fázisában jelentkeztek úgy gondoljuk, hogy a hipoperfúziónak a bélfunkciókat is érintő, azonnali hatásának a kivédéséhez egy, az ischaemiás inzultussal egy időben alkalmazott metánkezelés lenne alkalmas. Ennek igazolására, s egyben a metán hatásmechanizmusának a pontosabb megértésére további vizsgálatok szükségesek.

Immunhisztokémiai vizsgálataink eredményei alapján megállapítottuk, hogy az összneuronszám sem az ischaemia sem a reperfúzió korai fázisában nem változott a vizsgált bélszakaszokban. A nNOS-t expresszáló neuronok aránya azonban hipoperfúzió során mind a duodénumban, mind az ileumban lecsökkent.

Az ischaemia során alkalmazott metán belégzést követően ez a lecsökkent nitrerg neuron arány a duodénumban stabilizálódott, míg az ileumban a nitrerg neuronok denzitása a metán kezelés után a kontrollhoz közeli értékre tért vissza. Reperfúzió során a duodenumban

továbbra is megmaradt a lecsökkent denzitás érték, az ileumban azonban a nitrerg neuronok aránya nagyobb volt a kontroll minták értékeinél. Amikor a reoxigenizációhoz metán belélegzés is kapcsolódott, a nitrerg neuronok aránya mindkét bélszakaszon a kontrollhoz közeli értékekre tért vissza. Ez arra utal, hogy a metán belégzés mindkét bélszakaszban elősegítette a nitrerg neuronok alkalmazkodását a mikrokörnyezetük megváltozott oxigén szintjéhez. Az eredeti nitrerg neurondenzitás helyreállításához azonban a két bélszakaszban lévő nitrerg neuronok két különböző adaptációs stratégiát követtek, így az összneuronszámhoz viszonyított arányuk a duodenumban növekedett, míg az ileumban csökkent. A vastagbélben az ischaemiás inzultus során a nitrerg neuronok denzitása megnőtt, de ez mind az ischaemiás periódusban alkalmazott metánkezelés, mind a reoxigenizáció során az eredeti értékre tért vissza. Ezek az eredmények tovább erősítik azt a feltételezésünket, hogy a colon a vékonybéli szakaszoknál jobban tolerálja a vérátfolyás különbözőségeit.
Eredményeinket irodalmi adatokkal összevetve feltételezzük, hogy a nitrerg neuronok a reperfúzió késői fázisában korábban már megfigyelt szelektív pusztulását egy korai, adaptív fázis előzi meg, így a nitrerg neuronok az oxigén elvonásra, s az azt követő reoxigenizációra két fázisban reagálnak. Az első fázisban, az ischaemia és a reperfúzió korai fázisa alatt, azok reverzibilis, adaptív változásokon mennek keresztül. Az elhúzódó reperfúziós fázis során a nitrerg neuronok átlépnek egy második reaktív fázisba, amikor már visszafordíthatatlan strukturális és metabolikus változások történnek bennük, s végül jelentős számban elpusztulnak.

Kimutattuk, hogy az oxidatív és nitrozatív stresszmarkerek fiziológiás szintjében jelentős bélszakasz-specifikus különbségek vannak. Különösen nagy eltérést találtunk a XOR aktivitásban. A duodenális mintákban az ileumban mért értékek ötszörösét, míg a colon értékeinek húszszorosát detektáltuk. A szöveti XOR aktivitás ischaemia hatására egyik vizsgált bélszakaszban sem változott jelentős mértékben. A szöveti MPO aktivitás azonban a duodenumban szignifikánsan fokozódott, s az enzim emelkedett aktivitása a metán belélegzés ellenére sem tért vissza a kontrollhoz közeli értékekre. Az MPO szint irreverzibilis megemelkedése a duodénumban jelzi, hogy ez a vékonybélszakasz az ileumnál érzékenyebben reagál a környezet megváltozott oxigenáltsági szintjére. Feltételezzük, hogy ebben meghatározó szerepe van az ileuménál ötször magasabb duodenális endogén XOR szintnek. A reperfúzió során mind a XOR, mind az MPO aktivitása mindhárom vizsgált bélszakaszban szignifikánsan fokozódott, majd, amikor a reoxigenizációhoz metán belégzés is kapcsolódott, mindkét enzim szintje mindhárom vizsgált bélszakaszon a kontroll szintjére csökkent. Ezek az eredmények a metán védő hatásának azt a hipotézisét támasztják alá, mely

szerint a metán a sejtek membránjaiban átmenetileg felhalmozódva képes megváltoztatni a membránkötött fehérjék, így a XOR enzimaktivitását is.

A szöveti nitrit/nitrát szint hipoperfúzió során csak az ileumban emelkedett szignifikánsan, s a korai reperfúzió során is mindhárom vizsgált bélszakaszban a kontroll mintákéhoz hasonló értékeket kaptunk. Ez alapján feltételezzük, hogy a mi kísérleti körülményeink között a NO még megfelelő, fiziológiáshoz közeli mennyiségben van jelen, de mindenképp elegendő mennyiségben ahhoz, hogy a nitrerg neuronok „adaptációs ablaka" nyitva maradjon, s így képesek legyenek alkalmazkodni az ischaemia és a reoxigenizáció okozta megváltozott környezeti feltételekhez. Ugyanakkor az ileum megemelkedett nitrit/nitrát szintje magyarázatot adhat a nitrerg neuronoknak a duodénumban és az ileumban megfigyelt eltérő adaptációs dinamikájának megértéséhez.

A szöveti nitrotirozin szint ischaemia során csak a duodenumban nőtt jelentős mértékben. Ez tovább erősíti azt a feltételezésünket, hogy a duodenum a többi vizsgált bélszakasznál érzékenyebben reagál a megváltozott mikrokeringési viszonyokra. Ugyanakkor a megemelkedett nitrotirozin szint magyarázat lehet arra a megfigyelésünkre is, hogy a duodénum nNOS-t expresszáló neuronjai lassabban alkalmazkodnak az AMS elszorítását követő oxigén hiányhoz. A korai reperfúzió során mindhárom vizsgált bélszakaszban szignifikánsan megemelkedett a szöveti nitrotirozin szint, jelezve, hogy ebben a fázisban már a NO szövetkárosító hatása kerül előtérbe. A reperfúziós fázisban alkalmazott metánbelégzés mindhárom vizsgált bélszakaszban az álműtött állatokból származó mintákban mért értékekhez közeli értékeket mutatta. Ez alátámasztja azt a hipotézisünket, hogy a metánbelégzés közömbösíti a NO reduktív származékait s így csökkenti a nitrozatív stressz mértékét.

KÖVETKEZTETÉSEK

Eredményeink választ adtak a célkitűzéseinkben feltett kérdésekre. Igazoltuk, hogy az akut oxigénhiány a bélcsatorna teljes hosszában megváltoztatja a simaizom kontrakciókat kísérő mioelektromos jelek frekvencia- és amplitúdó értékeit. A hipoxia okozta funkcionális változások azonban csak részben bizonyultak reverzibilisnek.

Kimutattuk, hogy a nitrerg myentericus neuronok kvantitatív sajátságai az ischaemiás és reperfúziós inzultus során bélszakasz-specifikusan változnak. Feltételezzük, hogy a nitrerg neuronok reperfúzió késői fázisában megfigyelt szelektív pusztulását egy korai, adaptív fázis előzi meg, amikor a nitrerg neuronok környezetük megváltozott oxigenizáltsági állapotához adaptívan alkalmazkodnak.

Igazoltuk, hogy az általunk vizsgált biokémiai markerek fiziológiás szintje bélszakasz-specifikus eltéréseket mutat. Az itt talált jelentős eltérések magyarázatul szolgálnak az IR során megfigyelt funkcionális, strukturális és molekuláris válaszok bélszakasz-specifitására.

Igazoltuk, hogy az ischaemiás és reperfúziós inzultusok során alkalmazott metán belélegzés kontroll szintre csökkenti a reperfúzió során megemelkedett oxidatív és nitrozatív stresszmarkerek szintjét. Úgy gondoljuk, hogy metán belélegeztetés után ennek következményeként áll helyre az ischaemia során megváltozott mioelektromos aktivitás, és tér vissza a nitrerg myentericus neuronok összneuronszámhoz viszonyított eredeti aránya.

TUDOMÁNYOS KÖZLEMÉNYEK LISTÁJA

MTMT azonosító: 10026448

Összesített impakt faktor: 10,561

Folyóiratban megjelent, s az értekezéshez felhasznált teljes közlemények:

M. Z. Poles, N. Bódi, P. Talapka, M. Bagyánszki, M. Boros, É. Fekete, J. Kaszaki (2015) Methane inhalation enhances adaptive responses of nitrergic neurons to ischemia and reoxygenation in gut region-dependent way in rats. (előkészületben)

N. Bódi, Zs. Jancsó, P. Talapka, A. Pál, **M. Z. Poles**, M. Bagyánszki, E. Hermesz, É. Fekete (2014) Gut region-specific rearrangement of the cellular and subcellular compartments of nitric oxide synthaes isoforms after chronic ethanol consumption in rats. Histol Histopathol. 29(12):1547-1555. **IF: 2,096**

*Z. Máté, ***M. Z. Poles**, G. Szabó, M. Bagyánszki, P. Talapka, É. Fekete, N. Bódi (2013) Spatiotemporal expression pattern of DsRedT3/CCK gene construct during postnatal development of myenteric plexus in transgenic mice. Cell and Tissue Research 352(2): 199-206. **IF: 3,333**
*- megosztott első szerzők

Folyóiratban megjelent, az értekezéshez nem kapcsolódó teljes közlemények:

P. Talapka, L. I. Nagy, A. Pál, **M. Z. Poles**, A. Berkó, M. Bagyánszki, L. G. Puskás, É. Fekete, N. Bódi (2014) Alleviated mucosal and neuronal damage in a rat model of Crohn's disease. World J Gastroenterol. 20(44):16690-16697. **IF: 2,369**

N. Bódi, P. Talapka, **M. Poles**, E. Hermesz, Zs. Jancsó, Z. Katarova, F. Izbéki, T. Wittmann, É. Fekete, M. Bagyánszki (2012) Gut region-specific diabetic damage to the capillary endothelium adjacent to the myenteric plexus. Microcirculation 19(4):316-326. **IF: 2.763**

Az értekezés alapjául szolgáló, folyóiratban megjelent előadás kivonatok:

M. Z. Poles, N. Bódi, P. Talapka, G. Varga, A. Pál, M. Bagyánszki, R. Gáspár, J. Kaszaki, É. Fekete, M. Boros (2014) Effects of methane inhalation on the nitrergic myenteric neurons and intestinal myoelectrical activity during mesenteric ischemia-reperfusion in rats. Joint Meeting of the Federation of European Physiological Societies (FEPS) and the Hungarian Physiological Society, Budapest, Magyarország, 2014. augusztus 27-30.; Acta Physiologica (ISSN: 1748-1708) 211: (S697) p. 11.

M. Z. Poles, A. Mészáros, N. Bódi, M. Bagyánszki, G. Varga, É. Fekete, J. Kaszaki, M. Boros (2014) Effect of methane on gastrointestinal motility in ischemia-reperfusion. 49th Congress of the European Society for Surgical Research, Budapest, Magyarország, 2014. május 21-24.; Magyar Sebészet 67(3): 235-236.

Az értekezés alapjául szolgáló, konferencia összefoglaló kötetekben megjelent előadás kivonatok:

N. Bódi, P. Talapka, G. Varga, T. Tőkés, M.Z. Poles, A. Pál, M. Bagyánszki, J. Kaszaki, É. Fekete, M. Boros (2013) Inhaled Methane is Preventing an Increase in Nitrergic Myenteric Neuron Density and Enhanced Oxidative and Nitrosative Stress After Mesenteric Ischemia-Reperfusion in Rats. 21th United European Gastroenterology Week, Berlin, Germany, 2013. október 12-16.; UEG Journal 1(1):p. A393.

M. Z. Poles, N. Bódi, P. Talapka, G. Varga, A. Pál, M. Bagyánszki, J. Kaszaki, É. Fekete, M. Boros, N. Bódi (2014) Effects of Methane Inhalation on the Nitrergic Myenteric Neurons and Intestinal Motility During Mesenteric Ischemia-reperfusion in Rats. 1st Innovation in Science 2014 – Doctoral Student Conference, Szeged, Magyarország, 2014. május 2-3.

M. Z. Poles, P. Talapka, G. Varga, A. Pál, M. Bagyánszki, J. Kaszaki, É. Fekete, M. Boros, N. Bódi (2014) Exogén metán hatása a myentericus nitrerg neuronok kvantitatív sajátságaira és a bélcsatorna motilitására mesenterális ischaemia-reperfúzió alatt kísérletes patkánymodellen. 17. Tavaszi Szél Konferencia, Debrecen, Magyarország, 2014. március 21-23.

M. Poles, N. Bódi, P. Talapka, G. Varga, T. Tőkés, A. Pál, M. Bagyánszki, J. Kaszaki, É. Fekete, M. Boros (2013) Exogén metán hatása a myentericus nitrerg neuronok denzitására mesenterális ischaemia-reperfúzió alatt. A Magyar Élettani, Farmakológiai és Mikrocirkulációs Társaságok 2013. évi közös Tudományos Kongresszusa, Budapest, Magyarország, 2013. június 5-8.