

**БОЛЕЗНЬ НИМАНА-ПИКА В С «ПСЕВДОНОРМАЛЬНОЙ»
АКТИВНОСТЬЮ КИСЛОЙ СФИНГОМИЕЛИНАЗЫ:
МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ
И ОСОБЕННОСТИ БИОХИМИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ**

¹ГУ Институт генетической и регенеративной медицины НАМН Украины (г. Киев)

²Центр орфанных заболеваний НДСБ «ОХМАТДИТ» МЗ Украины (г. Киев)

nolhovich@gmail.com

Представленная работа является фрагментом НИР «Оценка роли генетических факторов в формировании и течении лизосомных болезней накопления для оптимизации клинической и лабораторной диагностики этих заболеваний» и выполнена на базе ГУ «ИГРМ НАМН Украины», № государственной регистрации 0115U003006.

Вступление. Болезнь Нимана-Пика А/В – врожденное нарушение метаболизма, являющееся результатом недостаточности кислой сфингомиелиназы (ASM, сфингомиелин фосфодиэстеразы; EC 3.1.4.12) с последующей аккумуляцией сфингомиелина в клетках и тканях [8]. *SMPD1* ген локализован в локусе 11p15.4-p15.1, имеет протяженность 5 kb и кодирует последовательность, разделенную на шесть экзонов. Известно свыше 100 мутаций вызывающих недостаточность ASM (Human Gene Mutation Database: <http://www.hgmd.org/>).

Недостаточность ASM традиционно подразделяется на нейронопатическую (болезнь Нимана-Пика А) и не нейронопатическую (болезнь Нимана-Пика В) [9]. Различие между типами А и В базируется на тяжести клинических проявлений заболевания. Тип А представляет собой быстро прогрессирующее нейродегенеративное заболевание, которое манифестирует в раннем детстве задержкой развития, тяжелым психомоторным отставанием, гепатоспленомегалией и приводит к летальному исходу в возрасте 2-3 лет. К болезни Ниманна-Пика типа В относится широкий спектр соматических и неврологических нарушений разной степени тяжести. Тип В характеризуется прежде всего накоплением сфингомиелина в ретикулоэндотелиальной системе, что приводит к гепатоспленомегалии и легочной патологии при отсутствии неврологической манифестации и выживаемости до взрослого возраста. Клиническое течение болезни Нимана-Пика В очень вариабельно, кроме того, между этими состояниями встречаются промежуточные формы [5]. Более того, пациенты с обоими типами болезни Нимана-Пика имеют приблизительно одинаковую остаточную активность ASM (~ 1 – 10% от нормы), таким образом на биохимическом уровне различить эти два фенотипа не представляется возможным.

Диагностика недостаточности ASM требует измерения ферментативной активности в лимфоцитах периферической крови или в культивируемых кожных фибробластах [8]. Разработано несколько способов измерения активности ASM, которые включают методы с использованием как натурального радиоактивно меченного сфингомиелина в качестве ферментатического субстрата, так и методы с использованием синтетических флуоресцентно или абсорбционно меченых субстратов, имеющих некоторые незначительные отличия в химических свойствах по сравнению с натуральным сфингомиелином [1,10]. В связи с тем что, по сравнению с радиоактивно меченым сфингомиелином, процедура определения активности ASM с использованием синтетических субстратов является более легкой в исполнении, большинство лабораторий используют именно этот метод для диагностики болезни Нимана-Пика А/В в диагностической практике.

Однако в ходе определения активности ASM с использованием синтетических субстратов существует потенциальная проблема, связанная с вероятностью получения ложнонегативных результатов. Этот феномен получил название «псевдонормальная» активность ASM – нормальная активность фермента при определении *in vitro*, в то время как в физиологических условиях организма наблюдается недостаточность фермента и, как следствие, развиваются клинические признаки заболевания [3]. На сегодняшний день явление «псевдонормальной» активности ASM при определении с синтетическим субстратом связывают с мутацией Q292K во 2-м экзоне гена *SMPD1*. Разработан модифицированный метод определения активности ASM, который позволяет избежать ложнонегативной диагностики болезни Нимана-Пика [6]. Таким образом, для обеспечения ранней и точной лабораторной диагностики этого заболевания необходимо использование широкого арсенала биохимических и молекулярно-генетических методов исследования.

Целью нашей работы является изучение особенностей лабораторного обследования пациентов с подозрением на наличие болезни Нимана-Пика В на примере двух сибсов, у которых было диагно-

стировано это заболевание с «псевдонормальной» активностью ASM.

Объект и методы исследования

В работе использовали плазму и цельную периферическую кровь пациентов и здоровых доноров, которые не имели лизосомных болезней накопления и предоставили согласие на использование их биологического материала для исследования.

Активность кислой сфингомиелиназы определяли в лейкоцитах периферической крови. Для исследования брали 5 мл гепаринизированной крови. Лейкоциты выделяли стандартным методом с использованием 3% раствора декстрана (Мм 50 000 – 70 000) в 0,85% NaCl [10]. Очищенный лейкоцитарный осадок ресуспендировали в деионизированной воде. Разрушение клеток проводили на льду путем трехразовой обработки ультразвуковым гомогенизатором SONOPULS (Bandelin). Общее количество белка в лейкоцитах определяли стандартным методом Лоури [2].

Активность ASM определяли с использованием синтетического субстрата 6-гексадеканоиламино-4-МУФ-фосфорилхолина (Mosserdam Substrats) в концентрации 1,32 мМ в 0,1 М Na-ацетатном буфере pH 5,2. До 2006 года использовали классическую процедуру определения активности ASM, предполагающую приготовление реакционной смеси из 10 мкл субстрата и 10 мкл гомогената лейкоцитов [10]. После 2006 года использовали модифицированную методику с использованием 12мМ лизосфингомиелина в качестве натурального субстрата ASM [6]. Реакционную смесь готовили в двух параллелях – с добавлением 10 мкл лизосфингомиелина или субстратного буфера. Инкубацию проводили при 37°C в течение 17 часов. Реакцию останавливали добавлением 200 мкл глицинового буфера pH 10,7. Флуоресценцию высвобожденного 4-метилумбеллиферона измеряли на флуориметре Victor (WallacOy) при длине волны возбуждения 365 нм и эмиссии 448 нм. В качестве контроля параллельно ставили пробу здорового донора, который не является кровным родственником обследуемого.

Хитотриозидазную активность в плазме оценивали по деградации флуорогенного субстрата 4-МУФ-триацетилхитотриозида (Sigma) в концентрации 22 мкМ в цитрат-фосфатном буфере pH 5,2 [7].

ДНК выделяли из цельной периферической крови, полученной с ЭДТА в качестве антикоагулянта, с использованием коммерческого набора «ДНК – сорб – В» (ЦНИИ эпидемиологии МЗ РФ). Качество препаратов ДНК оценивали путем измерения абсорбции при 260 нм на спектрофотометре Specord-40 (AnalytikJena AG). Мутацию Q292K в гене *SMPD1* определяли методом ПДРФ, как описано Pavlu et al, 1997 [4]. Для реакции использовали стандартную амплификационную смесь и праймеры: F 5' – TC CTC TGC TCT GCC TCT GAT TTC TCA CCA T – 3'; R 5' – AAT CAG AGA CAA TGC CCC AGG TTC CCT TCT – 3'. Полученный продукт обрабатывали эндонуклеазой Avall. Визуализацию результатов осуществляли в 3% агарозном геле с окраской бромистым этидием.

Результаты исследования и их обсуждение

Впервые семья обратилась в 2004 году с целью уточнения диагноза у девочки 12 лет (пациент Ч.В.). На момент обследования у девочки отмечались грубые черты лица, легкая гепатоспленомегалия, умственная отсталость. При исследовании пункта-та костного мозга были выявлены клетки «голубого моря» (рис. 1).

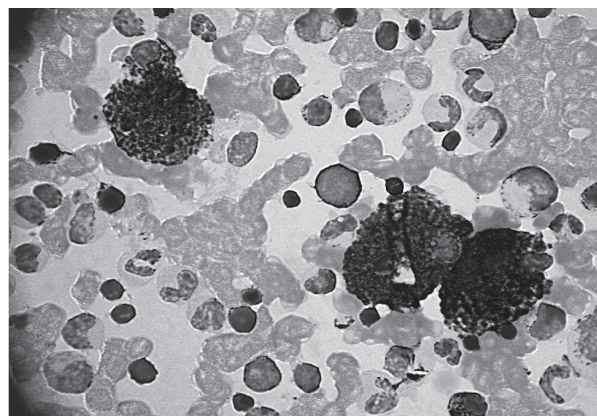


Рис. 1. Клетки «голубого моря» в пунктате костного мозга у пациента Ч.В.

В ходе биохимического обследования было выявлено повышенную активность хитотриозидазы в плазме крови (2506 нмоль/ч/мл плазмы, норма – 3-81 нмоль/ч/мл плазмы), что в комплексе с клиническими признаками и наличием характерных клеток в костном мозге позволило заподозрить у пациента болезнь Нимана-Пика В. Однако при определении активности ASM в лейкоцитах классическим методом с флюорогенным субстратом 6-гексадеканоиламино-4-метилумбеллиферил-фосфорилхолином был получен показатель 5,2 нмоль/ч/мг белка, который не только не соответствовал значениям у других пациентов с дефицитом ASM (0,07 – 0,44 нмоль/ч/мг белка), но был даже выше значений у здоровых доноров (0,56-3,5 нмоль/ч/мг белка) (табл.). Несмотря на наличие характерных для болезни Нимана-Пика клеток в пунктате костного мозга и повышенной хитотриозидазной активности в плазме крови, высокая активность ASM не позволила подтвердить этот диагноз у пробанда.

Повторно семья была обследована в 2012 году с целью уточнения диагноза у второго ребенка (пациент Ч.Ю.). На момент обследования: мальчик 8 лет, клинические проявления такие же, как у старшей сестры, клетки «голубого моря» в пунктате костного мозга. В ходе биохимического обследования было выявлено повышенную активность хитотриозидазы в плазме крови (3024 нмоль/ч/мл плазмы, норма – 3-81 нмоль/ч/мл плазмы). При исследовании активности кислой сфингомиелиназы с флюорогенным субстратом в модификации van Diggelen et al, 2005 была выявлена нормальная активность ASM при реакции с чистым субстратом и резко повышенная активность ASM при реакции со смесью субстрата

Активность кислой сфингомиелиназы пациентов Ч.В. и Ч.Ю.

Пациенты	Год обследования	Активность ASM, нмоль/ч/мг белка		Соотношение
		Без добавления лизосфингомиелина	С добавлением лизосфингомиелина	
Ч.В.	2004	5,2	- *	-
Ч.В. (повторно)	2012	5,9	6	0,98
Ч.Ю.	2012	4,9	5,6	0,88
Пациенты с классической формой болезни Нимана-Пика А/В (n = 4)	2004 – 2015	0,07 – 0,44	0,048 – 0,14	1,46 – 3,14
Контроль (n = 48)	2004 – 2015	0,56 – 3,5	0,024 – 0,27	12,9 – 23,3

Примечание: * в 2004 году исследование еще не проводилось

с лизосфингомиелином (табл.). Такой биохимический вариант описан как «псевдонормальная» активность ASM и характерен для некоторых генетических форм болезни Нимана-Пика В. Было проведено повторное обследование пациента Ч.В. и было показано, что старшая сестра также имеет «псевдонормальную» активность ASM. Для подтверждения диагноза был проведен молекулярный анализ мутации Q292K в гене *SMPD 1* (рис. 2).

У обоих сибсов была выявлена эта мутация в гомозиготном состоянии, что позволило подтвердить диагноз болезни Нимана-Пика В у описанных пациентов.

Лабораторная диагностика болезни Нимана-Пика А/В базируется на выявлении комплекса характерных для этого заболевания первичных и вторичных изменений [8]. Наиболее информативными являются вторичные маркеры, отображающие развитие патологического процесса в организме больного. Прежде всего, это наличие пенистых, нагруженных нерасщепленным сфингомиелином клеток в пунктате костного мозга, которые часто имеют вид клеток «голубого моря» (sea-blue cells). Вторым наиболее часто используемым вторичным маркером является хитотриозидазная активность в плазме крови. Внутриклеточное накопление недеградированного сфингомиелина в макрофагах приводит к патологической их активации и, как следствие, повышению экскреции хитотриозидазы этими клетками, что обуславливает повышение активности этого фермента в плазме крови. Однако, оба эти показателя не являются специфичными и могут выявляться при некоторых других, как наследственных, так и приобретенных заболеваниях. Поэтому, окончательное подтверждение диагноза болезни Нимана-Пика А/В осуществляется исключительно путем демонстрации первичного биохимического дефекта, а именно дефицита активности кислой сфингомиелиназы в лейкоцитах или фибробластах кожи, с последующим выявлением первичного генетического дефекта.

Особенность биохимического фенотипа, описанная в 2003 году как артефакт диагностики у не-

которых пациентов с болезнью Нимана-Пика В, связана с мутацией в Q292K в гене *SMPD1* и получила название «псевдонормальной» активности ASM [3]. Показано, что эта мутация находится в сайте связывания натуральных субстратов фермента – сфингозина и его жирной кислоты, и приводит к парадоксальному увеличению аффинности мутантного протеина к синтетическому субстрату. Это приводит к тому, что, при классическом методе определения активности ASM с использованием

1 2 3 4 Mm

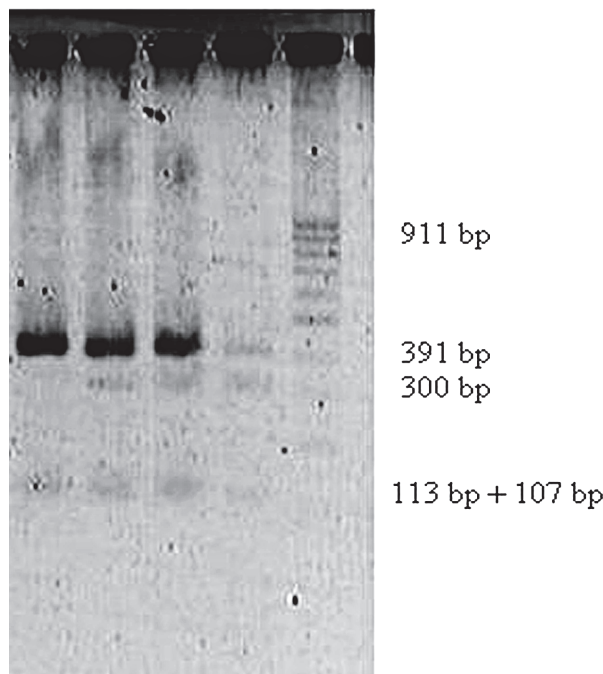


Рис. 2. Молекулярно-генетический анализ мутации Q292K в гене *SMPD 1*:

1 – контроль;
2, 3 – гетерозиготные носители мутации (родители пациентов);
4 – гомозигота по мутации Q292K в гене *SMPD 1* (пациент Ч.Ю.).

6-гексадеканоиламино-4-МУФ-фосфорилхолина, не только не выявляется дефицит истинной активности фермента, но и наоборот, полученные показатели необычно высоки. Этот феномен был ярко продемонстрирован и у наших пациентов. Активность ASM при определении с чистым субстратом у них составила 5,0 и 5,2 нмоль/ч/мг белка при норме 0,56 -3,5 нмоль/ч/мг белка.

VanDiggelen et al предположили, что истинную способность ASM связывать природные субстраты можно оценить путем анализа со смешанными субстратами: флуорогенным синтетическим субстратом в качестве индикатора активности ASM, и немеченным натуральным субстратом в качестве конкурентного ингибитора [6]. В нашей работе показано успешное применение этого принципа в биохимической диагностике болезни Ниман-Пика В, в том числе у пациентов с «псевдонормальной» активностью ASM, которое позволило избежать ложнонегативной диагностики заболевания и провести эффективное медико-генетическое консультирование в отегещенной семье.

Выводы

1. Лабораторная диагностика болезни Нимана-Пика А/В базируется на выявлении комплекса характерных для этого заболевания первичных и вторичных изменений;

2. Наиболее информативными являются вторичные маркеры, отображающие развитие патологического процесса в организме больного – пенистые

клетки в пунктате костного мозга (клетки «голубого моря») и хитотриозидазная активность в плазме крови;

3. Окончательное подтверждение диагноза болезни Нимана-Пика А/В осуществляется исключительно путем демонстрации первичного биохимического дефекта, а именно дефицита активности кислой сфингомиелиназы в лейкоцитах или фибробластах кожи, с последующим выявлением первичного генетического дефекта;

4. Наличие феномена «псевдонормальной» активности ASM приводит к повышенному риску ложнонегативной диагностики болезни Нимана-Пика А/В;

5. Во избежание диагностических ошибок, связанных с наличием «псевдонормальной» активности ASM, необходимо проводить двух этапный биохимический анализ ASM активности с использованием чистого и смешанного с немеченным натуральным субстрата.

Перспективы дальнейших исследований

В дальнейшем планируется изучить спектр первичных генетических нарушений в гене *SMPD 1y* пациентов с болезнью Нимана-Пика В в Украине и долю мутации Q292K среди них для разработки алгоритма лабораторной диагностики и снижения вероятности ложноотрицательной диагностики этого заболевания у пациентов с «псевдонормальной» активностью ASM.

Литература

1. Blau N. Laboratory Guide to the Methods in Biochemical Genetics/ Nenad Blau, Marinus Duran, K. Michael Gibson. – Berlin : Springer, 2008. – P.325-331.
2. Hartree E. F. Determination of protein: A modification of the Lowry method that gives a linear photometric response / E. F. Hartree // Anal Biochem. – 1972. – Vol.48(4). – P.422-427.
3. Harzer K. Niemann-Pick disease type A and B are clinically but also enzymatically heterogeneous: pitfall in the laboratory diagnosis of sphingomyelinase deficiency associated with the mutation Q292 K / K. Harzer, A. Rolfs, P. Bauer, M. Zschesche, E. Mengel, J. Backes, B. Kustermann-Kuhn, G. Bruchelt, O. P. van Diggelen., H. Mayrhofer, I. Krageloh-Mann // Neuropediatrics. – 2003. – Vol. 34. – P.301-306.
4. Pavlu H. Two novel mutations in patients with atypical phenotypes of acid sphingomyelinase deficiency / H. Pavlu, M. Elleder // J. Inher. Metab. Dis. – 1997. – Vol.20. – P. 615- 616.
5. Pavlu-Pereira H. Acid sphingomyelinase deficiency. Phenotype variability with prevalence of intermediate phenotype in a series of twenty-five Czech and Slovak patients. A multi-approach study / H. Pavlu-Pereira, B. Asfaw, H. Poupctova, J. Ledvinova, J. Sikora, M. T. Vanier, K. Sandhoff, J. Zeman, Z. Novotna, D. Chudoba, M. Elleder // J Inherit Metab Dis. – 2005. – Vol. 28. – P.203-227.
6. van Diggelen OP. A new fluorimetric enzyme assay for the diagnosis of Niemann-Pick A/B, with specificity of natural sphingomyelinase substrate / O. P. van Diggelen, Y. V. Voznyi, J. L. Keulemans, K. Schoonderwoerd, J. Ledvinova, E. Mengel, M. Zschesche, R. Santer, K. Harzer // J Inherit Metab Dis. – 2005. – Vol.28. – P.733-741.
7. van Dussen L. Value of plasma chitotriosidas to assess non-neuronopathic Gaucher disease severity and progression in the era of enzyme replacement therapy / L. van Dussen, E. J. Hendriks, J. E. Groener, R. G. Boot, C. E. Hollak, J. M. Aerts // J Inherit Metab Dis. – 2014. – Vol. 37(6). – P.991-1001.
8. Schuchman E. H. Niemann-Pick disease types A and B: acid sphingomyelinase deficiencies / In: Scriver C. R., Beaudet A. L., Sly W.S., Valle D., Vogelstein B. (eds) The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease (OMMBID) / Schuchman E.H., McGovern M. M., Desnick R. J. – New York : McGraw-Hill, 2014. – P.144-352.
9. Wasserstein M. P. The natural history of type B Niemann-Pick disease: results from a 10-year longitudinal study // M. P. Wasserstein., R. J. Desnick, E. H. Schuchman, S. Hossain, S. Wallenstein, C. Lamm, M. M. McGovern / Pediatrics. – 2004. – Vol. 114. – P. 672-677.
10. Wenger D. A. Screening for lysosomal disorders / D. A. Wenger, C. Williams // Techniques in Diagnostics of Human Biochemical Genetics. – New York: Wiley-Liss, 1991. -P 587-619.

УДК 616-056.7-07

ХВОРОБА НІМАНА-ПІКА В З «ПСЕВДОНОРМАЛЬНОЮ» АКТИВНІСТЮ КИСЛОЇ СФІНГОМІЄЛІНАЗИ: МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНІ ОСНОВИ ТА ОСОБЛИВОСТІ БІОХІМІЧНОЇ ДІАГНОСТИКИ

Ольхович Н. В., Пичкур Н. А., Трофимова Н. С., Горовенко Н. Г.

Резюме. Хвороба Німана-Піка А/В – вроджене порушення метаболізму, що є результатом недостатності кислоти сфінгомієлінази (ASM, сфінгомієлін фосфодієстерази; EC 3.1.4.12) з подальшою акумуляцією сфінгомієліна в клітинах і тканинах. Діагностика недостатності ASM вимагає вимірювання ферментативної активності в лімфоцитах або в фібробластах шкіри. При визначенні активності ASM з використанням синтетичних субстратів описаний феномен «псевдонормальної» активності ASM – нормальної активності ферменту *in vitro*, при недостатності *in vivo*. Це явище пов'язують з мутацією Q292K у 2-му екзоні гена *SMPD1*. Існує модифікований метод визначення активності ASM, який дозволяє діагностувати хворобу Німана-Піка А/В навіть за наявності «псевдонормальної» активності цього ферменту. У нашій роботі показано успішне застосування цього принципу в біохімічній діагностиці хвороби Німана-Піка В у пацієнтів з «псевдонормальною» активністю ASM, яке дозволило уникнути ложнонегативної діагностики захворювання і провести ефективне медико-генетичне консультування в обтяженій родині.

Ключові слова: хвороба Німана-Піка А/В, кислота сфінгомієліназа, біохімічна діагностика.

УДК 616-056.7-07

БОЛЕЗНЬ НИМАНА-ПИКА В С «ПСЕВДОНОРМАЛЬНОЙ» АКТИВНОСТЬЮ КИСЛОЙ СФИНГОМИЕЛИНАЗИ: МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ И ОСОБЕННОСТИ БИОХИМИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ.

Ольхович Н. В., Пичкур Н. А., Трофимова Н. С., Горовенко Н. Г.

Резюме. Болезнь Нимана-Пика А/В – врожденное нарушение метаболизма, являющееся результатом недостаточности кислоты сфингомиелиназы (ASM, сфингомиелин фосфодиэстеразы; EC 3.1.4.12) с последующей аккумуляцией сфингомиелина в клетках и тканях. Диагностика недостаточности ASM требует измерения ферментативной активности в лимфоцитах или в кожных фибробластах. При определении активности ASM с использованием синтетических субстратов описан феномен «псевдонормальной» активности ASM – нормальной активности фермента *in vitro*, при недостаточности *in vivo*. Это явление связывают с мутацией Q292K во 2-м экзоне гена *SMPD1*. Существует модифицированный метод определения активности ASM, который позволяет диагностировать болезнь Нимана-Пика А/В даже при наличии «псевдонормальной» активности этого фермента. В нашей работе показано успешное применение этого принципа в биохимической диагностике болезни Ниман-Пика В у пациентов с «псевдонормальной» активностью ASM, которое позволило избежать ложнонегативной диагностики заболевания и провести эффективное медико-генетическое консультирование в отягощенной семье.

Ключевые слова: болезнь Нимана-Пика А/В, кислая сфингомиелиназа, биохимическая диагностика.

UDC 616-056.7-07

NIEMANN-PICK A/B DISEASE WITH «PSEUDONORMAL» ACID SPHINGOMYELINASE ACTIVITY: MOLECULAR-GENETIC BASIS AND FEATURES OF BIOCHEMICAL DIAGNOSTICS.

Olkhovych N. V., Pichkur N. A., Trofimova N. S., Gorovenko N. G.

Abstract. Niemann-Pick A/B disease – congenital metabolic disorder resulting from deficiency of acid sphingomyelinase (ASM, sphingomyelin phosphodiesterase; EC 3.1.4.12), followed by sphingomyelin accumulation in cells and tissues. The ASM deficiency traditionally divided into neuronopathic Niemann-Pick type A disease (NPA) and noneuronopathic Niemann-Pick type B disease (NPB). The clinical course of the Niemann-Pick type B disease is highly variable; in addition, the intermediate forms occur. Diagnosis of ASM deficiency requires measuring the enzymatic activity in lymphocytes or skin fibroblasts. In determining the ASM activity using synthetic substrates the phenomenon of «pseudonormal» ASM activity exists – the normal enzyme activity *in vitro*, while deficiency *in vivo*. This phenomenon is associated with a mutation Q292K in 2 exon *SMPD1* gene.

The study of two siblings who have been diagnosed with the Niemann-Pick type B disease with «pseudonormal» ASM activity described in our report. The modified method of determining the ASM activity was used, which allows diagnosing the Niemann-Pick type A/B disease, even with «pseudonormal» activity of this enzyme. It is shown that the mutation Q292K in 2 exon *SMPD1* gene is located in the binding site of natural enzyme substrates – sphingosine and a fatty acid, and leads to a paradoxical increase in the affinity of the mutant protein to a synthetic substrate. This leads to the fact that the true deficiency of the enzyme activity is not detected in the classical method for determination of ASM activity by using 6-hexadecanoylamino-4-MUF-phosphorylcholine but, on the contrary, obtained activity are unusually high. This phenomenon has been clearly demonstrated in our patients. High ASM activity in the determination by the classical method is not allowed to diagnose NPB in patient firstly. Only the using the additional incubation of the substrate with lysosphingomyelin allowed us to identify true ASM deficiency and to confirm the NPB diagnosis. There is showed the successful application of this principle in the biochemical diagnosis of Niemann-Pick type B disease in patients with «pseudonormal» ASM activity, which allowed us to avoid false-negative diagnosis of the disease and to conduct an effective medical genetic counseling in family.

Keywords: Niemann-Pick type A/B disease, acid sphingomyelinase, biochemical diagnostics.

Рецензент – д. мед. н. Кирилова Л. Г.

Стаття надійшла 28.09.2015 р.