

DOI: 10.21802/artm.2022.1.21.18
УДК 616.127-005.8+616.155.194+612.176

ОСОБЛИВОСТІ ОКСИДАТИВНОГО СТРЕСУ У ХВОРИХ НА ГОСТРИЙ ІНФАРКТ МІОКАРДА ІЗ ЗАЛІЗОДЕФІЦИТНОЮ АНЕМІЄЮ

І.П. Вакалюк, О.С. Бойчук

*Івано-Франківський національний медичний університет, кафедра внутрішньої медицини №2 та медсестринства, м. Івано-Франківськ, Україна,
ORCID ID: 0000-0002-4430-6816,
ORCID ID: 0000-0003-2954-9868, e-mail: dr.boichuk11@gmail.com*

Резюме. У статті подані зміни показників гемограми та оксидантного стресу у хворих на гострий інфаркт міокарда (ГІМ) на фоні залізодефіцитної анемії (ЗДА). Залізодефіцитна анемія є додатковим чинником, який сприяє поглибленню ішемії міокарда та поглиблює процеси пероксидації, внаслідок чого відбувається пошкодження кардіоміоцитів, що є важливим чинником несприятливого перебігу, як гострого періоду, так і відновних процесів за виникнення некрозу міокарда. З метою вивчення показників загального аналізу крові та функціонального стану антиоксидантної системи у хворих на гострий інфаркт міокарда із ЗДА обстежено 36 хворих на ГІМ із ЗДА, серед яких чоловіків 39%, жінок – 61%. Першу групу становили 10 хворих на ГІМ без ЗДА, другу 26 хворих на ГІМ та ЗДА різного ступеня важкості, контрольну групу склали 30 практично здорових осіб. Визначали показники гемограми, функціонування глутатіонової системи, рівень в крові оксипроліну, аргінази та магнію. Встановлено, що серед хворих на гострий інфаркт міокарда із супутньою залізодефіцитною анемією переважають жінки із легким і середнім ступенями анемії. Серед чоловіків, у половини хворих, трапляється анемія важкого ступеня. Хворим на гострий коронарний синдром (ГКС) із ЗДА, окрім зниження рівня Hb, властиві наступні лабораторні ознаки анемії: тенденція до підвищення середньої концентрації гемоглобіну в одному еритроциті, зниження рівня сироваткового заліза та зростання в сироватці крові трансферину. За наявності ЗДА у хворих на ГКС спостерігають зміни у показниках антиоксидантної системи. Анемічний синдром у таких хворих супроводжується підвищеною концентрацією глутатіонтрансферази та пероксидази, а також зниженням концентрації оксипроліну.

Ключові слова: гострий коронарний синдром, гострий інфаркт міокарда, залізодефіцитна анемія, оксидативний стрес, антиоксидантна система.

Вступ. Серцево-судинні захворювання є основною причиною смерті у всьому світі, багато таких пацієнтів також страждають і від анемії в результаті гострих чи хронічних супутніх станів. За наявності такої коморбідної патології, як залізодефіцитна анемія, не тільки порушується утворення еритроцитів, але і погіршуються клітинні функції, пов'язані з м'язевим метаболізмом, впливом на функцію мітохондрій та синтезу ДНК. Частота анемії збільшується з віком, що робить її частим супутником серцево-судинних катастроф [1].

Обґрунтування дослідження. Різні дослідження доводили негативний прогноз анемії при інфаркті міокарда (ІМ). Як хронічна, так і гостра анемія призводять до погіршення перебігу ІМ. У цьому фрагменті дослідження було проаналізовано лабораторні показники маркерів залізодефіцитної анемії та впливу оксидативного стресу, щоб визначити зв'язок між гострою анемією та ІМ на основі результатів лабораторного обстеження. Гостра анемія призводить до зниження кровопостачання та раптової гіпоксії серця. Крім того, це посилює наявне порушення коронарного кровопостачання у пацієнтів з ІМ. Таким чином, існує непропорційне співвідношення постачання та потреби в кисні до серця. Встановлено, що анемія збільшує смертність від усіх причин при гострому ІМ. Однак незрозуміло, чи є анемія безпосередньою причиною смертності у цих пацієнтів [2].

Пацієнти з анемією представляють собою терапевтичну проблему в умовах гострого коронарного синдрому. Незважаючи на високу поширеність анемії та велику кількість даних, що підтверджують її сильний вплив на короткострокові та довгострокові результати, загальноживане та точне визначення в контексті пацієнтів, яким проводять черезшкірне коронарне втручання та імплантацію стента з приводу ГКС, досі відсутнє. Крім того, терапевтичні можливості для лікування анемії залишаються обмеженими [3].

Мета дослідження. Вивчити показники гемограми та антиоксидантного стану у хворих на гострий інфаркт міокарда із супутньою залізодефіцитною анемією.

Матеріали і методи. Обстежено 36 хворих із гострим інфарктом міокарда (ГІМ), серед яких 39% чоловіків та 61% жінок (14 і 22 хворих відповідно). Усім хворим з метою відновлення прохідності інфарктзалежної коронарної артерії виконано селективну поліпозиційну коронароангіографію за методикою M. Judkins та реперфузійну терапію шляхом стентування.

Середній вік склав $68,5 \pm 12,5$ роки. Хворих розподілили на групи: перша група – 10 хворих на ГІМ без залізодефіцитної анемії (ЗДА), друга група – хворі на ГІМ та ЗДА різного ступеня важкості (26 осіб), контрольну групу становили 30 відносно здорових осіб.

Визначали наступні гематологічні показники: концентрацію гемоглобіну, що проводили фотометричним методом; гематокриту та кольорового показника – розрахунковим, кількості еритроцитів – кондуктометричним (імпедансним) методом; якісні показники клітин крові: середній вміст гемоглобіну в еритроциті (МСН) та середню концентрацію гемоглобіну в еритроциті (МСНС) – розрахунковим на аналізаторі Medonic M-series; визначено рівень заліза, трансферину, глутатіонпероксидази, глутатіонредуктази, глутатіонтрансферази, супероксиддисмутази, оксипроліну, аргінази, магнію (Mg^{2+}) спектрофотометричним методом на аналізаторах Specord M40 та ULAB 108UV Spectrophotometer. Опрацювання статистичної інформації проводили за допомогою програмного забезпечення Microsoft Excel та Statistica v.10.0 StatSoft, USA. Для оцінки статистичної значущості відмінностей

кількісних ознак у групах був використаний U-критерій Манна-Уїтні. Статистично достовірною різниця при $p < 0,05$.

Результати дослідження та їх обговорення.

У хворих з ГІМ та ЗДА виявлено вірогідне зниження рівня гемоглобіну (Hb): для жінок це < 120 г/л та для чоловіків < 130 г/л.

Розподіл осіб у групі хворих на ГІМ із ЗДА за статтю і ступенем ЗДА відображений в табл.1. У цілому легкий ступінь ЗДА спостерігали в половині хворих (53,8 %), відповідно у 63,2 % жінок і третині чоловіків (28,5 %). Середній ступінь ЗДА констатовано майже у чверті обстежених (27,0 %), а саме у 26,3 % жінок і 28,5 % чоловіків. ЗДА важкого ступеня – у 19,2 % обстежених хворих. Більше того, важкий ступінь ЗДА переважав у чоловіків – 43,0 %, і значно рідше був у жінок (10,5 %).

Таблиця 1

Розподіл обстежених хворих на ГІМ за ступенем залізодефіцитної анемії (n)

Ступінь тяжкості ЗДА	Жінки n=19	Чоловіки n=7	Разом n=26
Легкий ступінь	63,2 % (12)	28,5 % (2)	53,8 % (14)
Середній ступінь	26,3 % (5)	25,5 % (2)	27,0 % (7)
Важкий ступінь	10,5 % (2)	43,0 % (3)	19,2 % (5)

Примітки: 1. Вказаний відсоток до кількості осіб в групі.

2. У дужках зазначені абсолютні числа.

Рівень гемоглобіну у хворих на ГІМ із ЗДА становив $100,7 \pm 22,5$ г/л, що достовірно нижче рівня як у здорових осіб, так і у хворих на ГІМ без ЗДА (табл. 2). У пацієнтів на ГІМ із ЗДА достовірно визначений найнижчий рівень еритроцитів у крові – $3,6 \pm 0,7 \times 10^{12}$ ($p_2 = 0,04$). Натомість у хворих на ГІМ без ЗДА кількість еритроцитів була $4,8 \pm 0,4 \times 10^{12}$, що вірогідно вище, ніж у здорових осіб, так і у хворих на ГІМ із ЗДА. У цій групі хворих найнижчими були значення кольорового показника. Аналогічно не було констатовано вірогідних відмінностей у групі пацієнтів на ГІМ без ЗДА відносно здорових осіб. Показник середнього вмісту гемоглобіну в одному еритроциті (МСН) достовірно нижчий у пацієнтів на ГІМ із ЗДА порівняно зі здоровими особами та з пацієнтами на ГІМ без ЗДА ($p_2 = 0,009$), а от показник середньої концентрації гемоглобіну в одному еритроциті (МСНС) не знайшов своєї достовірності у пацієнтів на ГІМ із ЗДА щодо таких же пацієнтів без ЗДА, але мав достовірні значення відносно здорових осіб. Відсоток гематокриту визначено достовірно нижчим у пацієнтів на ГІМ із ЗДА відносно двох інших груп порівняння ($p < 0,05$).

Показники функціональної здатності глутатіонової системи та обміну заліза були наступними (табл.3): рівень сироваткового заліза у пацієнтів на ГІМ із ЗДА вдвічі нижчий, ніж у здорових та у пацієнтів без ЗДА. А от при визначенні рівня трансферину відмінностей у значеннях не виявлено ($p_2 = 0,1$). Водночас у хворих на ГІМ із ЗДА констатовано вірогідне зростання рівня в сироватці крові глутатіонпероксидази та трансферази, як у порівнянні зі здоровими ($p_1 = 0,01$; $p_1 = 0,001$), так і з хворими на ГІМ без ЗДА ($p_2 = 0,008$; $p_2 = 0,005$). Слід зазначити, що активність глутатіонредуктази в усіх групах пацієнтів залишилася

без змін $0,2 \pm 0,1$ нмоль/(хв×мг). За концентрацією в сироватці крові супероксиддисмутази вірогідної різниці не встановлено, хоч спостерігалася тенденція до її низьких рівнів у хворих на ГІМ із ЗДА – $2,5 \pm 0,4$ нг/мл. Рівень оксипроліну показав свою найбільшу результативність у хворих на ГІМ із ЗДА, що вірогідно нижче, як у здорових осіб ($p_1 = 0,002$), так і у хворих на ГІМ без ЗДА ($p_2 = 0,001$). Аналогічна тенденція спостерігалася за рівнем в сироватці крові аргінази, але ці показники не були достатніми, щоб знайти свою достовірність ($p_2 = 0,2$). Також при визначенні рівня магнію в сироватці крові відмінностей у значеннях не виявлено ($p_2 = 0,6$).

Слід зазначити, що вплив оксидативного стресу, та й анемії в цілому, вже давно є предметом зацікавлення. Вважається, що залізодефіцитна анемія є поганим прогностичним фактором як короткострокових, так і віддалених результатів після ІМ [4]. Тому, з цією метою було визначено певний ряд показників для дослідження їх динаміки, та впливу окислювального стресу (ОС) на перебіг ГІМ. У процесі метаболічних перетворень в організмі відбувається утворення токсичних речовин, здатних чинити шкідливу дію на клітини. Сьогодні ОС – це стан, за якого порушується рівновага прооксидантної й антиоксидантної систем у клітині [5]. Важливе місце серед діагностики ОС посідає супероксиддисмутаза, активність якої, як ферменту антиоксидантного захисту, знижується у хворих, що перенесли інфаркт міокарда [6]; вона відіграє важливу роль у нейтралізації проявів оксидативного стресу при розвитку серцево-судинної патології [7] та пошкодженні міокарда внаслідок ішемії або реперфузії в експерименті [8].

Таблиця 2

Показники загального аналізу крові у хворих на гострий коронарний синдром із залізодефіцитною анемією (n; M±m; p)

Показники, одиниці вимірювання	Здорові n=30	Пацієнти на ГКС	
		Пацієнти на ГКС без ЗДА n=10	Пацієнти на ГКС + ЗДА n=26
Гемоглобін, г/л	143,92 ± 13,03	149,12 ± 11,84 p ₁ = 0,32	100,70 ± 22,54 p ₁ = 0,05 p ₂ = 0,04
Еритроцити, 10 ¹²	4,41 ± 0,52	4,82 ± 0,40 p ₁ = 0,01	3,63 ± 0,75 p ₁ = 0,04 p ₂ = 0,04
Кольоровий показник	1,02 ± 0,13	0,90 ± 0,03 p ₁ = 0,41	0,83 ± 0,12 p ₁ = 0,09 p ₂ = 0,02
МСН, пг	30,54 ± 3,10	31,13 ± 0,93 p ₁ = 0,54	28,54 ± 4,23 p ₁ = 0,08 p ₂ = 0,009
МСНС, г/л	337,52 ± 23,14	355,60 ± 5,02 p ₁ = 0,01	353,64 ± 14,32 p ₁ = 0,005 p ₂ = 0,30
НСТ, %	44,91 ± 6,62	42,33 ± 3,11 p ₁ = 0,02	28,92 ± 6,33 p ₁ = 0,08 p ₂ = 0,02

Примітки: Достовірність різниці показників у порівнюваних групах – p₁ – зі здоровими, p₂ – з хворими на ГКС без ЗДА.

Таблиця 3

Показники функціональної здатності глутатіонової системи та обміну заліза у хворих на ГКС за наявності ЗДА (n; M±m; p)

Показники, одиниці вимірювання	Здорові n=30	Пацієнти на ГКС	
		Пацієнти на ГКС без ЗДА n=10	Пацієнти на ГКС + ЗДА n=26
Сироваткове залізо, мкмоль/л	16,72 ± 6,53	13,51 ± 2,90 p ₁ = 0,01	5,72 ± 2,44 p ₁ = 0,003 p ₂ = 0,004
Трансферин, г/л	2,71 ± 0,43	2,72 ± 0,70 p ₁ = 0,82	3,41 ± 1,73 p ₁ = 0,12 p ₂ = 0,13
Глутатіонпероксидаза, мкмоль/(хв×мг)	0,24±0,05	0,23 ± 0,01 p ₁ = 0,002	0,31 ± 0,08 p ₁ = 0,01 p ₂ = 0,008
Глутатіонредуктаза, нмоль/(хв×мг)	0,22 ± 0,03	0,23 ± 0,04 p ₁ = 0,20	0,21 ± 0,13 p ₁ = 0,50 p ₂ = 0,30
Глутатіонтрансфераза, нмоль/(хв×мг)	0,32 ± 0,11	0,21 ± 0,08 p ₁ = 0,10	0,52 ± 0,31 p ₁ = 0,001 p ₂ = 0,005
Супероксиддисмутаза, нг/мл	3,52 ± 0,32	3,40 ± 0,20 p ₁ = 0,20	2,52 ± 0,41 p ₁ = 0,11 p ₂ = 0,12
Оксипролін, мкмоль/л	57,74 ± 8,91	43,72 ± 2,73 p ₁ = 0,007	27,90 ± 4,00 p ₁ = 0,002 p ₂ = 0,001
Аргіназа, мкмоль/мл	3,01 ± 0,82	3,12 ± 0,50 p ₁ = 0,20	2,42 ± 0,81 p ₁ = 0,11 p ₂ = 0,20
Магній (Mg ²⁺), ммоль/л	0,94 ± 0,20	1,00 ± 0,12 p ₁ = 0,02	0,94 ± 0,16 p ₁ = 0,81 p ₂ = 0,61

Примітки: Достовірність різниці показників у порівнюваних групах – p₁ – зі здоровими, p₂ – з хворими із ЗДА..

Для нейтралізації цих негативних наслідків існує антиоксидантна система, найважливішим ферментом якої є глутатіонпероксидаза. Вона забезпечує перетворення перекису водню і її радикальних похідних в нешкідливі з'єднання. У таких клітинах, як еритроцити, які постійно схильні до високого оксидативного стресу, до 10% споживаної глюкози використовується на відновлення глутатіону глутатіонредуктазою. Супероксидадисмутаза є металопротеїном, що належить до сімейства антиоксидантних ферментів, які забезпечують клітину основним захистом від окисного ушкодження [9]. Наступним показником метаболізму колагену є вміст оксипроліну – однієї з основних амінокислот колагену, що дозволяє вважати його маркером, який відображає катаболізм цього білка [10]. Аргіназа – металоензим, який каталізує гідролітичне розщеплення L-аргініну до сечовини і L-орнітину. Фізіологічна роль аргінази зумовлена її участю в численних метаболічних процесах у клітині, свідчить про те, що ензим належить до важливої ланки у розвитку багатьох патологічних станів організму [7,11].

Висновки:

1. Серед хворих на гострий інфаркт міокарда із супутньою залізодефіцитною анемією переважають жінки із легким і середнім ступенями анемії. Серед чоловіків, у половини хворих, буває анемія важкого ступеня.
2. Хворим на ГКС із ЗДА, окрім зниження рівня Hb, властиві наступні лабораторні ознаки анемії: тенденція до підвищення середньої концентрації гемоглобіну в одному еритроциті, зниження рівня сироваткового заліза та зростання рівня в сироватці крові трансферину.
3. За наявності ЗДА у хворих на ГКС наявні зміни у показниках антиоксидантної системи. Анемічний синдром у таких хворих супроводжується підвищеною концентрацією глутатіонтрансферази та пероксидази, а також зниженням концентрації оксипроліну. При цьому достовірних змін у концентрації глутатіонредуктази не виявлено.

Перспективи подальших досліджень. Анемічний синдром у пацієнтів із ГКС може бути предиктором нових ішемічних подій та несприятливого перебігу відновних процесів, що є передумовою для розробки спрямованих методів прогнозування та лікування таких хворих.

References:

1. Sidoruk SP, Petrova EB, Mitkovskaya NP. Anemia in cardiovascular disease. *Emergency cardiology and cardiovascular risks*. 2017; 1(1):38-45.
2. Jaskamal P, Khizer K, Gazala H, Nitya B, Sindhu P, Ayushi M, Ayden CC, Gutteridge J-C. Acute Anemia and Myocardial Infarction. *Cureus*. 2021 Aug 11; 13(8):e17096. DOI: 10.7759/cureus.17096. eCollection 2021 Aug.
3. Guedeny P, Sorrentino S, Claessen B, Mehran R. The link between anemia and adverse outcomes in patients with acute coronary syndrome. Published online: 2019 19 Feb. P.151-159. DOI: org/10.1080/14779072.2019.1575729
4. Moghaddam N, Graham C Wong, John A. Cairns, Shaun G. Goodman, Perry-Arnesen M, Tocher M, Mackay M, Singer J, Lee T, Sunil V Rao, Christopher

- B Fordyce. Association of Anemia With Outcomes Among ST-Segment–Elevation Myocardial Infarction Patients Receiving Primary Percutaneous Coronary Intervention. 2018 Dec 14; 11(12):e007175. DOI: 10.1161/CIRCINTERVENTIONS.118.007175
5. Pisarenko OI, Bepalova ZhD, Lankin VZ, et al. Antioxidant properties of apelin-12 and its structural analogue at experimental ischemia and perfusion of the heart. *Cardiology*. 2013; 53(5):61-68. DOI: 10.1007/s11010-014-2008-4
6. Askerova TA, Yagubova VI, Velieva GA, Hasanova GT. Some biochemical indicators in the diagnosis of hereditary collagenopathy. *International Journal of Applied and Basic Research*. 2017; 18(1):48-51. URL: <https://applied-research.ru/ru/article/view?id=11757>.
7. Workinger JL, Doyle RP, Bortz J. Challenges in the Diagnosis of Magnesium Status. *Nutrients*. 2018 Sep 1; 10(9):1202. DOI: 10.3390/nu10091202
8. Chung Y-J, Swietach P, Curtis M-K, Ball V, Robbins P, Lakhali-Littleton S. Iron-Deficiency Anemia Results in Transcriptional and Metabolic Remodeling in the Heart Toward a Glycolytic Phenotype. *Front Cardiovasc Med*. 2021 Jan 21; 7:616920. DOI: 10.3389/fcvm.2020.616920.
9. Yoo J-H, Maeng H-Y, Sun Y-K, Kim Y-A, Park D-W, Park TS, Lee ST, Choi J-R. Oxidative status in iron-deficiency anemia. *J Clin Lab Anal*. 2009; 23(5):319-23. DOI: 10.1002/jcla.20335.
10. Zeller T, Altay A, Waldeyer C, Appelbaum S, Ojeda F, Ruhe J, Schnabel RB, Lackner KJ, Blankenberg S, Karakas M. Prognostic Value of Iron-Homeostasis Regulating Peptide Hemohepcidin in Coronary Heart Disease — Evidence from the Large AtheroGene Study. *Biomolecules* 2018; 8:43. DOI: 10.3390/biom8030060.
11. Traghella I, Mastorci F, Alessia P, Pingitore A, Vassalle C. Nontraditional Cardiovascular Biomarkers and Risk Factors: Rationale and Future Perspectives. *Biomolecules*. 2018; 8:40. DOI: 10.3390/biom8030060.

UDC 616.127-005.8+616.155.194+612.176

PECULIARITIES OF OXIDATIVE STRESS IN PATIENTS WITH ACUTE MYOCARDIAL INFARCTION WITH IRON DEFICIENCY ANEMIA

I.P. Vakalyuk, O.S. Boichuk

*Ivano-Frankivsk National Medical University,
Department of Internal Medicine №2 and Nursing,
Ivano-Frankivsk, Ukraine,
ORCID ID: 0000-0002-4430-6816,
ORCID ID: 0000-0003-2954-9868,
e-mail: dr.boichuk11@gmail.com*

Abstract. The article presents changes in hemogram and oxidative stress in patients with acute myocardial infarction (AMI) on the background of iron deficiency anemia (IDA). Iron deficiency anemia is an additional factor that contributes to the deepening of myocardial ischemia and deepens the processes of peroxidation and damage to cardiomyocytes, which is an important factor in the unfavorable course, both acute

period and recovery processes in myocardial necrosis. In order to study the indicators of the general analysis of blood and functional state of the antioxidant system in patients with acute myocardial infarction with IDA, 36 patients with AMI with IDA were examined, including 39% men and 61% women. The first group consisted of 10 patients with AMI without IDA, the second 26 patients with AMI and IDA of varying severity, the control group consisted of 30 healthy individuals. Hemogram parameters, glutathione system function, oxyproline, arginase and magnesium levels in the blood were determined. It has been established that women with mild and moderate anemia predominate among patients with acute myocardial infarction with concomitant iron deficiency anemia. Among men, half of the patients have severe anemia. In addition to a decrease in Hb levels, patients with ACS with IDA have the following laboratory signs of anemia: a tendency to increase the average concentration of hemoglobin in one erythrocyte, low serum iron levels and an increase in serum transferrin levels. In the presence of IDA in patients with ACS there are changes in the antioxidant system. Anemic syndrome in such patients is accompanied by increased concentrations of glutathione transferase and peroxidase, as well as decreased concentrations of oxyproline.

Anemia can trigger oxidative stress, and an increase in OS may be associated with changes in cardiac function. Possible cardiovascular effects in patients with comorbid conditions should also be considered.

Iron deficiency is the most prevalent micronutrient disorder globally. When severe, iron deficiency leads to anemia, which can be deleterious to

cardiac function. Given the central role of iron and oxygen in cardiac biology, multiple pathways are expected to be altered in iron-deficiency anemia, and identifying these requires an unbiased approach.

Oxidative stress is an imbalance between free radicals and antioxidant molecules that can play an important role in the pathogenesis of iron-deficiency anemia (IDA).

Maintenance of the iron homeostasis is essential for metabolic and physiological processes. Iron plays a critical role in erythropoiesis, is incorporated into erythroblasts and reticulocytes, and has a crucial role in oxygen transport and oxygen storage. Moreover, iron is essential for cardiac and skeletal muscle metabolism, the synthesis and degradation of proteins, lipids, ribonucleic acids, and mitochondrial function.

Research has now focused on non-traditional cardiovascular risk factors and the roles of iron and iron deficiency (ID) in patients with cardiovascular disease.

The Iron required for immune response, hormonal balance, and plays an important role in regulating oxidative stress and aerobic metabolism. The myocardial tissue has a mainly aerobic cellular metabolism, which depends of mitochondria's Krebs cycle enzymes that need iron as an essential cofactor. In this regard, there is some evidence that myocardial iron deficiency is highly prevalent in HF and may play a role in the progression of the disease.

Keywords: acute coronary syndrome, acute myocardial infarction, iron deficiency anemia, oxidative stress, antioxidant system.

Стаття надійшла в редакцію 11.02.2022 р.
Стаття прийнята до друку 17.03.2022 р.