

Экспериментальная и профилактическая медицина

УДК 577,112,5;612,8;615,919;616,858

**Синаптические постстимульные процессы
в антиноцицептивном околотоводопроводном сером
веществе мозга при активации большого ядра шва
на модели болезни Паркинсона в условиях
протекции синэстролом**

**Л.Ж. Тадевосян¹, М.В. Погосян¹, М.А. Даниелян¹,
А.Ю. Степанян^{1,2}, А.Л. Минасян², З.А. Аветисян¹,
Дж.С. Саркисян¹**

¹*Институт физиологии НАН РА им. акад. Л.А. Орбели
0028, Ереван, ул. Бр. Орбели, 22,*

²*Университет традиционной медицины
0040, Ереван, ул. Маршала Бабаджаняна, 38*

Ключевые слова: околотоводопроводное серое вещество (PAG), большое ядро шва (RMg), ротеноновая модель болезни Паркинсона, синэстрол

При нейродегенеративных болезнях недостаточное внимание уделяется боли, а терапевтическая стратегия ограничивается неопиоидными анальгетиками, антидепрессантами и/или противосудорожными средствами [2], без оценки лежащих в их основе механизмов [3]. Сложный механизм боли при болезни Паркинсона (БП) связан с изменениями в ноцицептивных структурах мозга, провоцируемых различными факторами (возраст, пол, депрессия, тяжесть или продолжительность болезни). Для улучшения управления ими необходимо последующее изучение механизмов их формирования на модели БП [10]. БП может поразить болевой процесс на множественных уровнях, от передачи с периферических структур к высшим центрам, до их восприятия и ответной реакции [10]. Некоторые из этих структур поражаются рано при БП, в частности, большое ядро шва (*Nucleus raphe magnus* – RMg) [8]. В целом, среди играющих важную роль в модуляции спинальной ноцицептивной передачи и участвующих в нисходящей регуляции антиноцицептивных путей, торможением ноцицептивных стимулов от нейронов дорзального рога, следует отметить голубое пятно, RMg, околотоводопроводное серое вещество (*Periaqueductal gray* – PAG) [6]. Вместе с LC, RMg, вовлекается в аффективное и

когнитивно-оценочное измерение боли, болевую память, и автономные ответы [10]. Нарушение в области, тормозящей боль, может вызвать повышение ощущения боли [11]. В заключение, RMg структура в росто-вентральном продолговатом мозге, будучи важным участком эндогенной болевой тормозной системы, воспринимает проекции от PAG [4].

В настоящем исследовании предпринято изучение соотношения возбуждательных и депрессорных ответов одиночных нейронов PAG при стимуляции RMg, структур, управляющих болевым процессом, с целью оценки механизмов их поражения на модели БП, индуцированной односторонним введением ротенона и успешности протекции синэстролом, в сравнении с нормой.

Материал и методы

Проведены электрофизиологические исследования на 7 крысах линии Альбино (250 г): интактных ($n=2$), на ротеноновой модели БП, индуцированной унилатеральным введением ротенона и выдержанных до опыта 4 нед. ($n=2$), и в условиях протекции синэстролом (по 14 инъекций через день в дозах 1 мг/кг ($n=3$)). Введение ротенона осуществляли в условиях нембуталового наркоза (40 мг/кг, в/б) из расчета 12 мкг в 0,5 мкл ди-мексида (со скоростью 1 мкл/мин) в “medial forebrain bundle” по координатам стереотаксического атласа [9] (AP+0,2; $L\pm 1,8$; DV+8 мм). Исследование проводилось в соответствии с принципами Базельской декларации и рекомендациями руководства ARRIVE [5]. В стереотаксическом аппарате производили трепанацию черепа от брегмы до лямбды и вскрывали твердую мозговую оболочку. Стекланные микроэлектроды с диаметром кончика 1-2 мкм, заполненные 2M NaCl, вводили в PAG, согласно стереотаксическим координатам (AP-4,92; $L\pm 2,0$; DV+5,7 мм), для экстраклеточной регистрации спайковой активности одиночных нейронов. Осуществляли высокочастотную стимуляцию (ВЧС) RMg посредством прямоугольных толчков тока длительностью 0,05 мс, амплитудой 0,12–0,18 мВ, силой тока 0,32 мА и частотой 100 Гц в течение 1 сек, согласно стереотаксическим координатам (AP-11,6; $L\pm 2,0$; DV+10,3 мм) (рис. 1). Операции осуществляли на наркотизированных животных (уретан 1,2 г/кг, в/б) зафиксированных в стереотаксическом аппарате. Также животные обездвигивались 1% дитилином (25 мг/кг, в/б) и переводились на искусственное дыхание.

Активность проявлялась в виде тетанической потенциации (ТП) и тетанической депрессии (ТД) с последующей посттетанической потенциацией (ПТП) и посттетанической депрессией (ПТД) различной латенции, выраженности и длительности. Проводили программный математический анализ одиночной спайковой активности нейронов. Постстимульные проявления активности оценивали on-line регистрацией и программным ма-

тематическим анализом, позволяющим селекцию спайков амплитудной дискриминацией с выводом «растеров» перистимульного спайкинга нейронов, построением гистограмм суммы и диаграмм усредненной частоты спайков (разработчик В.С. Каменецкий). Производили далее многоуровневую статистическую обработку в отдельности для пре- и постстимульного отрезков времени и периода ВЧС. Для избираемых сравниваемых групп спайкинга нейрональной активности, а также произвольно избранных испытаний в отдельном нейроне строили суммированные и усредненные перистимульные (PETH Average) гистограммы и гистограммы частоты (Frequency Average) с вычислением средней частоты спайков.

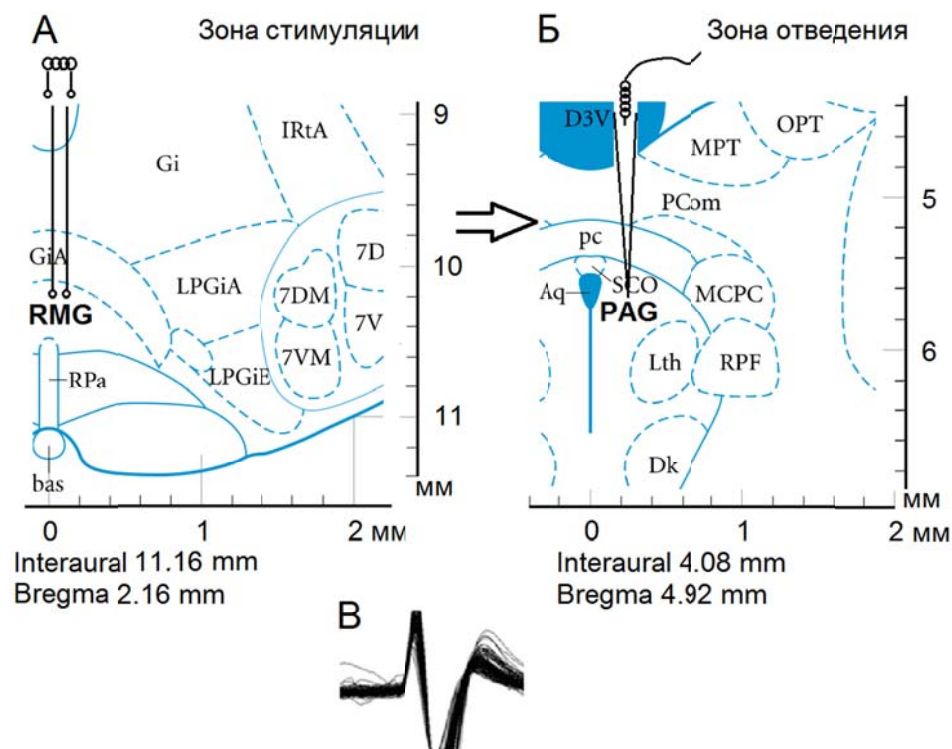


Рис. 1. Схема эксперимента по раздражению RMg и отведению из PAG. Стереотаксическое изображение пункта регистрации нейронной активности – Б, зоны стимуляции – А и характерного потенциала действия – В

Анализ полученных данных производили по специально разработанному алгоритму, обеспечивающему достоверность перистимульных изменений межспайковых интервалов. Однородность двух независимых выборок контролировалась t-критерием Стьюдента. С целью повышения статистической достоверности перистимульных изменений межспайковых

интервалов использовали также двухвыборочный критерий Манна-Уитни Вилкоксона (Wilcoxon-Mann-Whitney test) [9], в качестве непараметрического, оценивающего однородность независимых двух выборок. Так как число регистрируемых спайков было достаточно велико (до нескольких сотен спайков за 10-20 сек. интервал после действия стимула), использовалась разновидность указанного теста – z-тест, определяющий его асимптотическую нормальность. Учет критических значений в сравнении с таковыми нормального распределения при уровнях значимости 0,05; 0,01 и 0,001 (для различных испытаний) показывает, что в большинстве случаев спайкинга нейрональной активности при ВЧС статистически значимое изменение достигало, как минимум, уровня 0,05.

Результаты и обсуждение

Производили экстраклеточную регистрацию спайковой активности одиночных нейронов PAG в норме (50 нейронов, $n=2$), на модели БП (80 нейронов, $n=2$) и с протекцией синэстролом (70 нейронов, $n=3$). Посредством анализа на основе усредненного количества спайков (PETH), с пересчетом в межимпульсные интервалы и частоты в Гц (Frequency Average), были обнаружены следующие изменения нейрональной активности. В нейронах PAG на ВЧС RMg тетаническая депрессия в обеих последовательностях в норме определялась порядка 1,5- и 1,0-кратного снижения престаимпульной активности соответственно (рис. 2 А, группы А, Б). ТП, сопровождаемая ПТП и ПТД, выявлялась в пределах 1,2- и 1,2-кратного превышения престаимпульной активности (рис. 2 Б, группы А, Б). В нейронах PAG при ВЧС RMg тетаническая депрессия на модели БП определялась в пределах 1,16- и 1,14-кратного занижения престаимпульной активности в обеих последовательностях соответственно (рис. 2 В, группы А, Б), а ТП исчислялась порядка 1,02- и 1,01-кратного превышения престаимпульной активности в обеих последовательностях (рис. 2 Г, группы А, Б). Наконец, в нейронах PAG при ВЧС RMg, в условиях воздействия синэстрола, ТД в обеих депрессорных последовательностях достигала, соответственно, 1,41- и 1,20-кратного занижения престаимпульной активности (рис. 2 Д, группы А, Б), а ТП в возбуждительно-постстимульной последовательности определялась в пределах 1,24-кратного превышения престаимпульной активности, при отсутствии таковой возбуждительно-депрессорной (рис. 2 Е, группы А, Б). При отсутствии особой разницы в параметрах активации нейронов PAG в указанных условиях эксперимента следует отметить достаточно высокую частоту активации на модели БП и ее значительное снижение под воздействием синэстрола. В свою очередь, высокая частота активации сопровождается относительно небольшими значениями постстимульной активации.

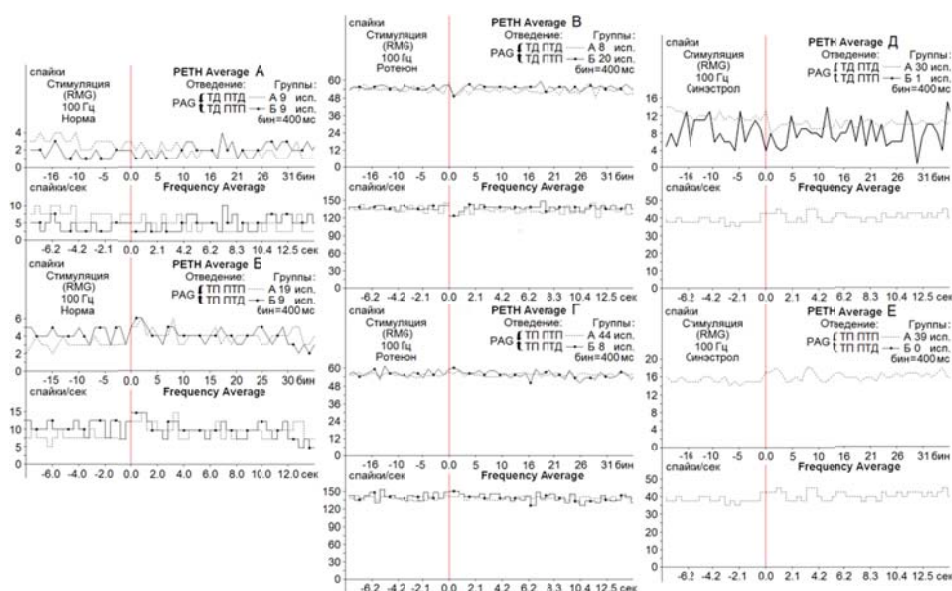


Рис. 2. Усредненные перистимульные (PETN Average) гистограммы и гистограммы частоты (Frequency Average) депрессорных, депрессорно-возбудительных (А, В, Д, группы А, Б) и возбудительных, возбудительно-депрессорных постстимульных проявлений (Б, Г, Е) активности нейронов PAG при ВЧС RMg (100 Гц, 1 сек) в норме (А, Б), на модели БП (В, Г), с протекцией синэстролом (Д, Е). Для групп указано количество испытаний (исп.)

При оценке относительной степени выраженности вышеотмеченных депрессорных и возбудительных эффектов, на примере диаграмм усредненной частоты спайков, выведенных на основе растров пре- и постстимульных депрессорных и депрессорно-возбудительных разнонаправленных проявлений спайковой активности нейронов в норме, на модели БП и в условиях протекции, с указанием средних цифровых значений в реальном времени 20 сек до и после стимуляции, включая время ВЧС, получены значения, представленные в виде дисковых диаграмм для более наглядного представления степени выраженности в частотном отображении (и в %) экспериментальных данных на рис. 4 (на основе рис. 3), которые привели к следующему выводу. Значения ТД в депрессорной и депрессорно-возбудительной последовательности и уровни ТП в возбудительной и возбудительно-депрессорной последовательности нейронов PAG на ВЧС RMg в норме достигали 1,33- и 1,66- кратного занижения и 1,87- и 1,36-кратного превышения в сравнении с престимульным уровнем активности соответственно (рис. 4, А-Г).

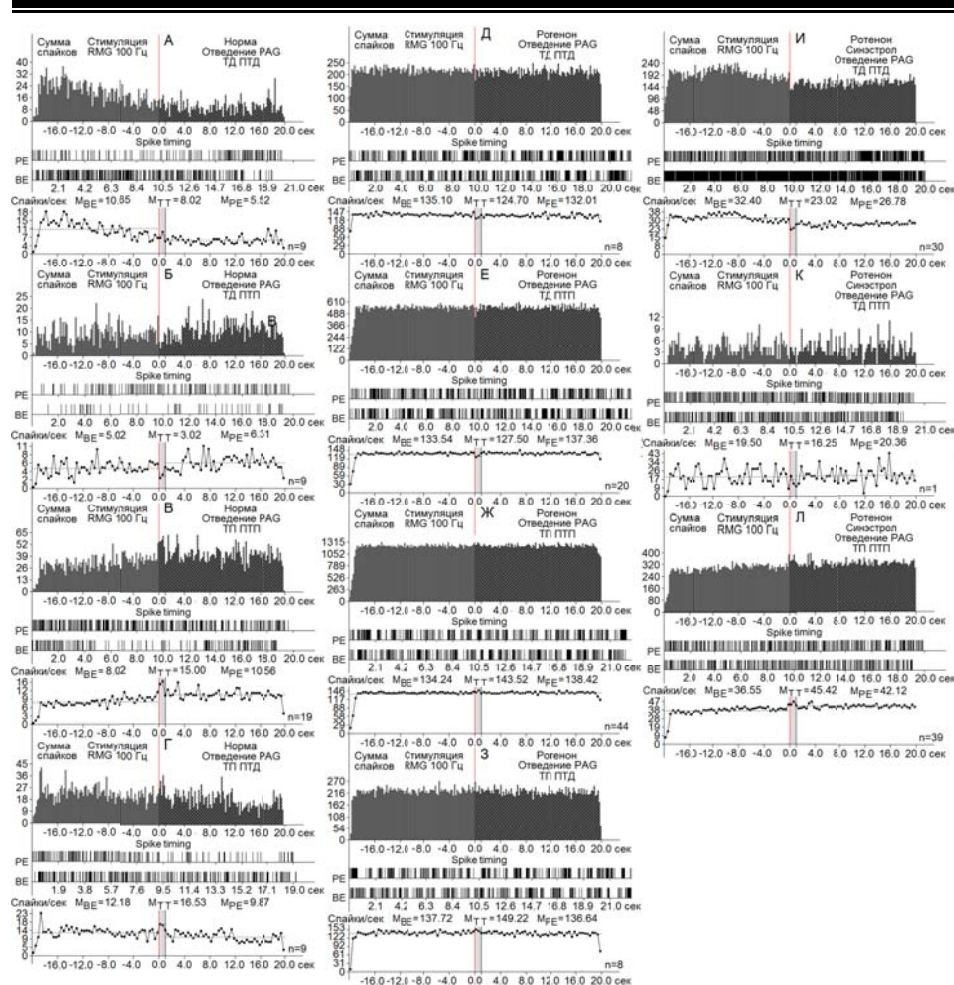


Рис. 3. А-Л – гистограммы суммы спайков пре- и постстимульных тетанических депрессорных проявлений активности – ТД ПТД (А, Д, И), в сочетании с посттетаническими возбуждательными – ТД ПТП (Б, Е, К), возбуждательных – ТП ПТП (В, Ж, Л), сопровождаемых депрессорными (Г, З), нейронов PAG, вызванных на ВЧС RMg в норме (А-Г), на модели БП (Д-З) и с протекцией синэстролом (И-Л). Растеры активности на А-Г – детальный анализ избранных одиночных нейронов из данной группы. Диаграммы частоты спайков с усредненными значениями (М) для временных отрезков до (BE – before event), на время тетанизации (ТТ – time tetanization) и после стимуляции (PE – post event)

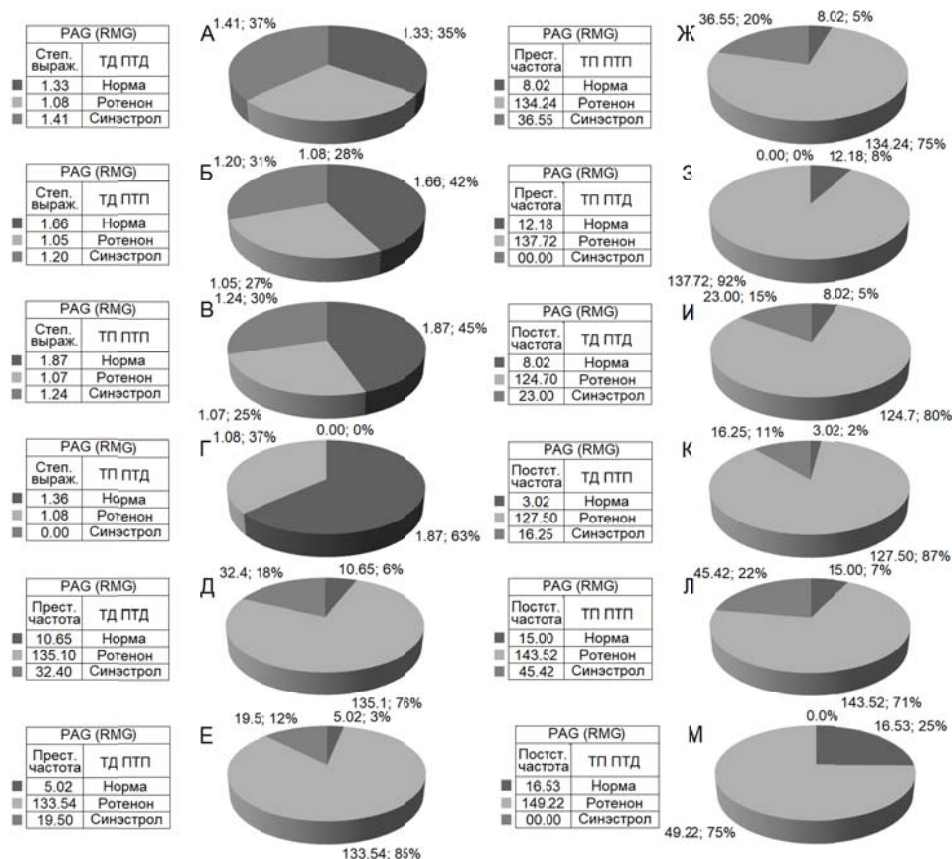


Рис. 4. А-М – процентное соотношение степени выраженности (по усредненной частоте) (А-Г), депрессорных (ТД ПТД), депрессорно-возбудительных (ТП ПТП), возбудительных (ТП ПТП) и возбудительно-депрессорных (ТП ПТП) постстимульных эффектов в одиночных нейронах PAG при ВЧС RMg, а также частоты прерывистой (Д-З) и постстимульной (И-М) активности, предшествующих и сопровождаемых указанными проявлениями постстимульной активации, в норме, на ротеноновой модели БП и в условиях протекции синэстролом. Обозначения: степ. выраж. – степень выраженности, прерыв. – прерывистая, постст. – постстимульная

Значения ТД в депрессорной и депрессорно-возбудительной последовательности и уровни ТП в возбудительной и возбудительно-депрессорной последовательности нейронов PAG на ВЧС RMg на модели БП оказались несколько выше нормы лишь в возбудительной последовательности (1,87- и 1,36- против 1,33- и 1,66-кратно соответственно) (рис. 3, 4, А-Г). В условиях протекции синэстролом на модели БП ТД в обеих последовательностях исчислялась в пределах 1,20- и 1,24-кратного снижения постстимульной активности, а в возбудительной – порядка 1,24-кратного ее превышения, при полном отсутствии возбудительно-депрессорной последовательности (рис. 3, 4, А-Г).

Обратная картина была выявлена при оценке пре- и постстимульной частоты активности нейронов PAG при ВЧС RMg на модели БП, в условиях протекции синэстролом, в сравнении с нормой и таковой без протекции. Престимульная частота активности нейронов PAG, предшествуемая постстимульной депрессорной и депрессорно-возбудительной последовательностями на модели БП исчислялась порядка 135,1 и 133,54 против 10,65 и 5,02 в норме, т.е. 12,7- и 26,6-кратно выше нормы (рис. 3, 4, Д, Е), а таковая, предшествующая возбудительной и возбудительно-депрессорной – также оказалась достаточно высокой, в пределах 16,74- и 11,31-кратного (134,24 и 137,72 против 8,02 и 12,18) (рис. 3, 4, Ж, З). Те же параметры в условиях протекции достигли следующих значений. Престимульная частота активности нейронов PAG на ВЧС RMg, предшествуемая депрессорными постстимульными последовательностями, ограничивалась лишь 32,40 и 19,50 против 135,10 и 133,54 на модели БП и 10,65 и 5,02 в норме, а именно 4,17- и 6,85-кратно снизилась, приблизившись к норме, что свидетельствует о более чем успешном противодействии эксайтотоксичности, неизбежно приводящей к гибели нейронов (рис. 4, Д-Е). Престимульная частота активности нейронов PAG на ВЧС RMg, предшествуемая возбудительной последовательностью, оказалась в пределах 36,55 против 134,24 на модели БП без протекции и 8,02 в норме, достигнув 3,67-кратного снижения, при полном отсутствии возбудительно-депрессорной активности, что, в свою очередь, также свидетельствует о надежном противостоянии эксайтотоксичности (рис. 3, 4, Ж, З).

Постстимульная частота активности нейронов PAG при ВЧС RMg, сопровождаемая постстимульной депрессорной и депрессорно-возбудительной последовательностью, на модели БП, в сравнении с нормой, достигала 15,55- и 42,22-кратного превышения (124,7 и 127,5 против 8,02 и 3,02-кратного) (рис. 3, 4, И, К); постстимульная частота активности нейронов PAG при ВЧС RMg, сопровождаемая возбудительной и возбудительно-депрессорной последовательностью, достигала 9,57- и 9,03-кратного превышения нормы (143,52 и 149,22 против 15,0 и 16,53) (рис. 3, 4, И, К). В условиях протекции на модели БП значения постстимульной частоты активации нейронов PAG, сопровождаемые депрессорными последовательностями, достигали 23,02 и 16,25 против 124,70 и 127,50 на модели БП без протекции и против 8,02 и 3,02 в норме, т.е. снизились 5,42- и 7,84-кратно, в сравнении с патологией без протекции и с тенденцией приближения к норме (рис. 3, 4, И, К). Наконец, постстимульная частота нейронов PAG, сопровождаемая возбудительной последовательностью, в условиях протекции на модели БП исчислялась порядка 45,42 против 143,52 на модели без нормы и против 15,00 в норме, что оказалось 3,16-кратно ниже, чем в патологии без протекции и опять с тенденцией приближения к норме (рис. 3, 4, И, К). Более того, отсутствовала, как было отмечено выше, возбудительно-депрессорная последовательность вообще.

Отмеченное опять очевидно свидетельствует в пользу успешной протекции. Таким образом, особых сравнительных изменений не было выявлено при оценке постстимульных тетанических реакций, но обратная картина сложилась в результате анализа пре- и постстимульной частоты активации нейронов PAG в указанных условиях. По-видимому, при высокой частоте активации нейронов на модели БП без протекции отсутствует нормальная постстимульная синаптическая активация, совершаемая в незначительных пределах. Это оказалось очевидным при анализе пре- и постстимульной частоты активации исследуемых нейронов, предшествуемой депрессорными и возбуждающими проявлениями постстимульной активации соответственно. Иными словами, не лишено оснований вышеотмеченное предположение о необходимости оценки частоты пре- и постстимульной активации исследуемых нейронов для окончательного утверждения значительных сдвигов на модели БП и реальной оценки успешности используемой протекции.

Таким образом, на модели БП выявлена мощная эксайтотоксичность, вследствие сверхактивации NMDA и AMPA глутаматных рецепторов [7], сопровождаемая рядом отрицательных последствий в виде нарушения кальциевой буферизации, генерации свободных радикалов, активации митохондриальной проницаемости [12], что указывает на глубокое нейродегенеративное поражение важной антиноцицептивной структуры PAG при БП, содействующее возникновению стойкой хронической боли. Очевидна необходимость углубления депрессорных эффектов протекторного назначения и снижения чрезмерных возбуждающих [1].

Поступила 07.04.21

**Հակացավային կարի մեծ կորիզի ակտիվացման
Ժամանակ ուղեղի հարջրածորանային գորշ նյութի
հետխթանային սինապթիկ գործընթացները Պարկինսոնի
հիվանդության մոդելում՝ սինեթրոլով պաշտպանության
պայմաններում**

**Լ.Ժ. Թադևոսյան, Մ.Վ. Պողոսյան, Մ.Հ. Դանիելյան,
Հ.Յու. Ստեփանյան, Ա.Լ. Մինասյան, Զ.Ա. Ավետիսյան, Զ.Ս. Սարգսյան**

Էլեկտրաֆիզիոլոգիական հետազոտություններում իրականացվել է հարջրածորանային գորշ նյութի (ՀՋԳ կամ PAG) 200 մեկական նեյրոնների ակտիվության գրանցում կարի մեծ կորիզի (RMg) նեյրոն-

ների բարձր հաճախականությամբ խթանման (ԲՀԽ) ժամանակ՝ 7 առնետների վրա:

Պարկինսոնի հիվանդության (ՊՀ) մոդելում սինէսթրոլի ազդեցության պայմաններում RMg-ի ԲՀԽ-ի ժամանակ PAG-ի նեյրոններում չեն նկատվել արտահայտված տարբերություններ նորմայի հետ համեմատած՝ միայն հետխթանային գրգռող և դեպրեսոր տետանիկ ազդեցությունների համեմատական ցուցանիշների չափումների հաճախականության մակարդակում, բացառությամբ ՊՀ մոդելում դիտվող ակտիվացման զգալիորեն բարձր հաճախականության:

Նշվածն արդեն բավական է էքսայտոտոքսիկության և հետևաբար՝ նեյրոդեգեներացիայի հաստատման համար, ինչը վերահաստատում է նաև նախա- և հետխթանային ակտիվացման հաճախականության հետագա մանրամասն վերլուծությունը, որը նախորդում և ուղեկցվում էր գրգռող և դեպրեսոր հետխթանային տետանիկ ազդեցություններով:

ՊՀ մոդելում սինէսթրոլի ազդեցության պայմաններում RMg-ի ԲՀԽ-ի ժամանակ վերլուծությունը, որը նախորդում էր դեպրեսոր հետխթանային տետանիկ ազդեցություններով, ցույց է տվել ակտիվացման նվազում 4.17 և 6.85 անգամ՝ առանց սինէսթրոլով պաշտպանության ՊՀ մոդելի հետ համեմատած՝ մոտենալով նորմային:

Առանց պաշտպանության ախտաբանական մոդելի հետ համեմատության հետխթանային գրգռող հաջորդականությանը նախորդող PAG-ի նեյրոնների նախախթանային ակտիվացման հաճախականությունը նույնպես զգալիորեն նվազում է մինչև 3.67 անգամ՝ գրգռող-դեպրեսոր ակտիվության լիակատար բացակայության պայմաններում:

Վերը նշվածը վկայում է էքսայտոտոքսիկության դեմ հուսալի պայքարի մասին:

Նաև պաշտպանության պայմաններում դեպրեսոր տետանիկ ազդեցություններով ուղեկցվող PAG-ի նեյրոնների հետխթանային ակտիվացման հաճախականությունը նվազում է 5.42 և 7.84 անգամ, իսկ գրգռող հետխթանային հաջորդականությամբ հետխթանային ակտիվացման հաճախականությունը՝ 3.16 անգամ՝ նորմային մոտենալով միտումով՝ առանց պաշտպանության մոդելի հետ համեմատելու:

Ընդհանուր առմամբ ստացված արդյունքները վկայում են անխուսափելիորեն նեյրոնների մահվանը բերող էքսայտոտոքսիկության դեմ ավելի քան հաջող հակազդման մասին:

Synaptic Poststimulus Processes in Antinociceptive Periaqueductal Gray Matters of the Brain Under Activation Raphe Magnus Nucleus on the Model of Parkinson's Disease with Protection by Synoestrole

**L.Zh. Tadevosyan, M.V. Poghosyan, M.H. Danielyan, H.Y. Stepanyan,
A.L. Minasyan, Z.A. Avetisyan, J.S. Sarkissian**

The electrophysiological study with recording the activity of 200 single neurons of the periaqueductal gray matter (PAG) under high frequency stimulation (HFS) of Raphe magnus neurons (RMg) were conducted on 9 rats. In neurons of PAG at RMg HFS, on the model of Parkinson's disease (PD) with Synoestrole protection, no significant difference was found in comparison with norm, only at the level of accounting for multiple changes of the comparative indications of poststimulus manifestations of excitatory and depressor tetanic effects, except for a significantly high frequency activation on the model of PD.

The mentioned is enough for confirmation of excitotoxicity, and therefore neurodegeneration already, testified also with the subsequent detailed analysis of pre- and poststimulus frequency activation, that accompanied by excitatory and depressor poststimulus tetanic effects. The analyses of prestimulus frequency activation of the PAG neurons at RMg HFS, preceded by depressor posttetanic reaction on the model of PD with Synoestrole protection, led to the conclusion about 4.17- and 6.85- multiple its decline, compared to PD model without protection, with approach to the norm. The prestimulus frequency activation of PAG neurons, preceded by poststimulus excitatory sequency, compared to that in pathology without protection, also decreased significantly, reaching a 3.67-fold decrease, in complete absence of excitatory-depressor activity. The noted is evidence of a reliable opposition to excitotoxicity. Finally, poststimulus frequency activation of PAG neurons in condition of protection, compared to it without it, accompanied depressor tetanic effects was 5.42- and 7.84-fold decrease, and poststimulus frequency activation, accompanied by excitatory poststimulus sequence reached 3.16-fold decrease, with a tendency to approach the norm. The overall evidence about more than successfully counteracting excitotoxicity, inevitably leading to the death of neurons.

Литература

1. *Саркисян Дж.С., Погосян М.В., Даниелян М.А. и др.* Назначение депрессорных синаптических процессов в условиях специфической нейродегенеративной патологии и протекции. LAP LAMBERT Academic Publishing RU 2018. 252с.
2. *Broen M. P. G., Braaksma M. M., Patijn, Weber W. E. J.* Prevalence of pain in Parkinson's disease: a systematic J. review using the modified QUADAS tool. Movement Disorders, 2012, 27(4): 480–484.

3. de Tommaso M., Arendt-Nielsen L., Defrin R. et al. Pain in Neurodegenerative Disease: Current Knowledge and Future Perspectives, Behavioural Neurology. 2016, 2016 (1): 1-14.
4. Hornung J. P. In The Human Nervous System (Third Edition), 2012.
5. Kilkenny C., Browne W., Cuthill I.C., Emerson M., Altman D.G. Animal research: Reporting *in vivo* experiments: The ARRIVE guidelines, 06 July, 2010.
6. Kuraishi Y., Fukui K., Shiomi H. et al. Microinjection of opioids into the nucleus reticularis gigantocellularis of the rat: analgesia and increase in the normetanephrine level in the spinal cord, Biochem. Pharmacol., 1978, 27: 2756-2758.
7. Matthew R.H., Heather L.S., Peter R.D. Glutamate-mediated excitotoxicity and neurodegeneration in Alzheimer's disease, NCI, 2004, 45 (Issue 5): 583–595.
8. Millan M.J. Descending control of pain, Prog Neurobiol., 2002, 66: 355-474.
9. Paxinos G., Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates, Elsevier, Academic Press, 5th ed., 2005, p. 367.
10. Ramiro-González M., Fernández-de-las-Peñas C., Pain in Parkinson disease: A review of the literature, Parkinsonism & Related Disorders, 2013, 19 (Issue 3): 285-294.
11. Scherder E., Wolters E., Polman C. et al. Pain in Parkinson's disease and multiple sclerosis: its relation to the medial and lateral pain systems, Neurosci. Biobehav. Rev., 2005, 29: 1047-105.
12. Xiao-xia Dong, Yan Wang, Zheng-hong Qin Molecular mechanisms of excitotoxicity and their relevance to pathogenesis of neurodegenerative diseases, Acta Pharmacologica Sinica, 2009, 30: 379–387.