

УДК 616.992.228-02: 615.256.3

*О. М. Павловська, К. М. Павловська***ПАТОГЕНЕТИЧНІ АСПЕКТИ ПЕРСИСТЕНЦІІ КАНДИДОЗНОЇ ІНФЕКЦІЇ
ПРИ ЗАСТОСУВАННІ
КОМБІНОВАНИХ ОРАЛЬНИХ КОНТРАЦЕПТИВІВ**

Одеський державний медичний університет

Реферат*О.Н. Павловская, Е.Н. Павловская***ПАТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ПЕРСИСТЕНЦИИ КАНДИДОЗНОЙ
ИНФЕКЦИИ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ КОМБИНИРОВАННЫХ ОРАЛЬНЫХ
КОНТРАЦЕПТИВОВ**

По данным литературы сегодня в мире имеет место эпидемия оппортунистических инфекций, среди которых микозы занимают одно из ведущих мест. Наиболее часто встречающимся возбудителем является грибок рода *Candida*, который способен вызывать широкий спектр патологических изменений в организме. Одним из факторов, способствующих персистенции *Candida*, является приём пероральных гормональных контрацептивов, которые дестабилизируют основные механизмы противокандидозной защиты организма, что требует проведения в этой категории пациенток своевременной диагностики инфицирования и назначения патогенетически направленной медикаментозной антифунгальной терапии.

Ключевые слова: гормональный контрацептив, кандидозная инфекция**Реферат***О. М. Павловська, К. М. Павловська***ПАТОГЕНЕТИЧНІ АСПЕКТИ ПЕРСИСТЕНЦІІ КАНДИДОЗНОЇ ІНФЕКЦІЇ ПРИ
ЗАСТОСУВАННІ КОМБІНОВАНИХ ОРАЛЬНИХ КОНТРАЦЕПТИВІВ**

За даними наукових досліджень сьогодні в світі спостерігається епідемія оппортуністичних інфекцій, серед яких мікози займають одне з провідних місць. Найбільш частим збудником є гриби роду *Candida*, які здатні викликати широкий спектр патологічних змін в організмі. Одним з факторів, сприяючих персистенції *Candida*, є прийом пероральних гормональних контрацептивів, які дестабілізують основні механізми противокандидозного захисту організму, що потребує проведення у цієї категорії пацієнток своєчасної діагностики інфікування та призначення патогенетично спрямованої медикаментозної антифунгальної терапії.

Ключові слова: гормональні контрацептиви, кандидозна інфекція**Summary***O.N. Pavlovskaya, Ye.N. Pavlovskaya***PATHOGENIC ASPECTS OF CANDIDA INFECTION AT THE USE OF ORAL
CONTRACEPTIVES.**

В настоящее время в мире отмечается эпидемия оппортунистических инфекций, среди которых микозы занимают одно из ведущих мест. Наиболее частым возбудителем являются грибы рода *Candida* которые могут вызывать широкий спектр патологических изменений в организме. Одним из факторов, способствующим персистенции *Candida*, является прием пероральных гормональных контрацептивов, которые дестабилизируют основные механизмы противокандидозной защиты в организме, что требует проведения у этой категории пациенток своевременной диагностики инфицирования и назначения патогенетически направленной антифунгальной терапии.

Ключевые слова: гормональные контрацептивы, кандидозная инфекция

За даними наукових досліджень в світі спостерігається епідемія опортуністичних інфекцій, серед яких мікози займають одне з провідних місць [1-3]. На думку багатьох фахівців це пов'язано з погіршенням екологічної ситуації, широким та іноді безконтрольним застосуванням антибіотиків, глюкокортикоїдів, цитостатиків, імунодепресантів, а також збільшенням захворювань, що супроводжуються метаболічними, ендокринними та імунними порушеннями [2-4]. При цьому найбільш частим збудником є гриби роду *Candida* - аеробні одноклітинні умовно-патогенні мікроорганізми, які можуть викликати широкий спектр патологічних змін в організмі від захворювань шкіри й слизуватих оболонок, представлених багатошаровим плоским, рідше одношаровим циліндричним епітелієм, до інвазивних процесів з ураженням паренхиматозних органів [4-7].

На сьогоднішній день ідентифіковано 196 видів грибів роду *Candida*, сім з яких визнані патогенними (*C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. kefyr*, *C. glabrata* (по старій класифікації *C. torulopsis*), *C. guilliermondii*, *C. Parapsilosis*)), а *Candida albicans* – найпатогенішим та найрозповсюдженішим [1, 3].

Доведено, що *Candida* розмножуються на будь-якому біологічному субстраті шляхом філаментатії з наступною адгезією до поверхні слизуватої оболонки, колонізацією, подоланням епітеліального бар'єру та пенетрацією в сполучену тканину власної пластинки, лімфогематогенною дисемінацією з ураженням органів та систем [8].

Здатність до адгезії у представників різних видів *Candida* значно відрізняється - найбільш висока виявлена у *C. albicans*, *C. tropicalis*, найменша - *C. glabrata*, *C. krusei*. Адгезія виникає внаслідок розчинення грибковими протеїназами, глікозидазами муцину епітеліальних клітин, та специфічної взаємодії адгезинів гриба з комплементарними до них рецепторами епітеліоцитів [9]. Адгезинами можуть виступати кислотостійкі білки, інтегриноподібні поверхневі протеїни (aMb2, aXb2, a5b1), молекули, які беруть участь у лектиноподібних контактах, а також фімбрії (упорядковано розташовані нитковидні вирости на поверхні бактеріальної клітини) [10-13].

Candida мають здатність прикріплюватися один до одного, формуючи агрегати, усередині яких можуть створюватися певні концентрації протеолітичних, ліполітичних ферментів, карбогідроз достатні для подолання бар'єрних властивостей епітелію, руйнування його поверхневих структур та інвазії [8].

Тим не менш, *Candida* є майже обов'язковими компонентами мікробіологічного спектру ротоглотки, шлунково-кишкового тракту, піхвової мікрофлори [1, 4, 14]. Однак надлишковому їх розмноженню протистоїть цілий ряд механізмів: бар'єрні властивості шкіри та слизуватих оболонок, протекторний ефект гликопротеїну епітеліальних клітин (муцин), який перешкоджає прикріпленню гриба до слизуватої оболонки, бактеріальна конкуренція за рецептори на епітеліоцитах та використання живильних речовин, десквамація епітелію, секреція біфідо-лактобактеріями, кишковими паличками, ентерококами речовин з виразною антифунгальною активністю (бактеріоцини), але вирішальне значення в забезпеченні противокандидозної резистентності організму належить імунній системі [15-19].

Так, мононуклеарні фагоцити, поліморфноядерні лейкоцити, НК-клітини знищують інфіковані клітини макроорганізму. Серед інших неспецифічних факторів захисту здійснюються комплементарні реакції, білки гострої фази, манносв'язуючий протеїн, функціональна активність лізоциму, лізину, трансферрину, лактоферрину, церулоплазмину тощо [7, 17, 19, 20]. Специфічний гуморальний імунітет представлений синтезованими В-клітинами противокандидозними IgA, IgM, IgG, а специфічний клітинний – складною взаємодією між CD8+ (розпізнають на уражених клітинах антигени збудника в комплексі з антигенами МНС I типу і шляхом екскреції перфорину індукують їхню загибель) та CD4+ (Т-хелпери), які за участю IL-2 й γ -інтерферону (Th1) активізують цитотоксичні Т-лімфоцити, що знищують інфіковані макрофаги [7, 17, 21, 22].

На даному етапі розвитку мікології доведеним є той факт, що статеві стероїди також значно впливають на реалізацію імунної відповіді при кандидозній інфекції, причому ці ефекти в жіночому організмі є дозозалежними.

Під впливом високих концентрацій естрогенів в перiovуляторному періоді відбувається активація CD4+, які продукують регуляторні цитокіни (Th2) – IL-4, IL-5, IL-10, що стимулюють розмноження В-лімфоцитів з утворенням противокандидозних Ig та одночасно пригнічують реакції системного клітинного імунітету (продукція цитокінів першого типу (Th1) - IL-2, TNF β , γ -інтерферону значно знижена) [1, 21, 23, 24]. Цей імунологічний феномен має велике природне значення у разі запліднення, тому що завдяки пригніченню реакцій клітинного імунітету взагалі можливий розвиток на половину генетично стороннього до материнського організму ембріону. Також Th2 стимулюють синтез прогестерону, хоріонічного гонадотропіну, і тільки при невеликій кількості γ -інтерферону відбувається інвазія трофобласту у межах необхідного.

Статеві стероїди значно впливають й на стан місцевого імунітету.

Так, прогресивне збільшення рівня естрогенів у I фазі менструального циклу сприяє

підвищенню секреції муцинів епітелієм, компонентів комплементарної системи (C_3) та IgM. У лютеїнову фазу значно збільшується активність макрофагів та популяція природних килерів у статевих шляхах, але під впливом прогестерону відбувається пригнічення індукції хемокинових рецепторів на Т-клітинах та продукції самих хемокинів, які є важливими регуляторами Т-клітинної міграції в тканинах. Зазначене пояснює підвищену чутливість до кандидозної інфекції у другій половині оваріально-менструального циклу [1].

Мікрофлора кишечника також здійснює значний регулюючий вплив на імунологічну реактивність організму. За участю індигених мікроорганізмів стимулюється функціонування лімфоїдного апарату Пейєрових бляшок, підвищується синтез лізоциму, пропердину, складових комплементу та Ig E [16, 25].

Проте, незважаючи на наявність складної багаторівневої системи захисту макроорганізму, *Candida* мають здатність оптимізувати механізми свого паразитування при змінненні умов життєдіяльності за рахунок еволюційно сформованих адаптаційних властивостей [17].

У *Candida* спостігається виразна морфологічна нестабільність, яка характеризується феноменом переключення на різні форми існування (дріжджові клітини, псевдогіфи та істинні гіфи) зі зміненням антигенних властивостей [26-28].

Ці мікроорганізми в залежності від умов існування здатні й до активної регуляції кількості та типів адгезинів (деякі адгезини по своїй структурі схожі з рецепторними білками макроорганізму, що не тільки сприяє збільшенню швидкості адгезії, але знижує імовірність запуску реакції імунної відповіді взагалі) [7, 29, 30, 31].

Крім того, мембрана *Candida* може взаємодіяти з Fc-фрагментом IgG з послідуною його інактивацією та пригніченням поглинальної активності нейтрофілів. *C. albicans*, здатні експресувати рецептори для зв'язування з іC3b-, C3d-молекулами, які є продуктами розщеплення C_3 -компонента комплементу (іC3b-, C3d-рецептори мають функціональну аналогію з відповідними рецепторами фагоцитарних клітин, що створює передумови для конкуренції, блокування процесів опсонізації мікроорганізмів та зниженню ефективності фагоцитозу) [12, 32, 33]. У свою чергу, мікотоксини (ендотоксин, плазмокоагулаза, неферментні білки, маннани, глюкокон'югати, вільні ліпіди) пригнічують активність системи комплементу, лізоциму, захисні ефекти лімфоцитів, особливо Т-хелперів [34].

Вагомим фактором, який сприяє персистенції *Candida* є прийом комбінованих оральних контрацептивів (КОК) [35]. Однак патогенетичні ланки цієї взаємодії досить складні й до кінця ще не визначені, проте існуючі наукові дані дозволяють простежити основні з них.

Так, при прийомі навіть низькодозованих КОК пригнічуються процеси овуляції, тому в організмі жінки не відбувається фізіологічних пікових підвишень статевих стероїдів, що є значним дестабілізуючим фактором у стрункій системі балансу клітинного й гуморального протипатогенного імунітету протягом менструального циклу, сприяючим персистенції опортуністичної інфекції, зокрема кандидозної.

За результатами клініко-експериментальних досліджень прийом КОК поступово викликає цитопатичні зміни в печінці по типу внутрішньопечінкового холестазу [35, 36].

Зокрема, відзначається зниження активності ферменту S-аденозилметилсинтетази та продукції S-адеметіоніну, внаслідок чого відбувається погіршення ліпідного складу гепатоцелюлярних мембран, порушення функціональної активності Na^+/K^+ -АТФази (забезпечує градієнт іонів поза та усередині клітини, трансмембранний потенціал між гепатоцитом й навколишнім простором), Na-залежне захоплення жовчних кислот з порушенням плинності мембран, процесів захоплення з крові жовчних кислот, білірубину, холестерину, синтезу інших необхідних складових жовчі, а також зменшення щільності міжклітинних контактів, зниження скорочувальної здатності каналіцевих мікрофіламентів, обумовлюючи загалом погіршення якісного складу жовчі [36].

Сьогодні доведено, що компоненти жовчі мають безпосередній тономоторний вплив на перистальтику кишечника та певний бактеріцидний, бактеріостатичний ефекти, які сприяють підтриманню еубіотичних співвідношень [36, 37]. Тому порушення процесів жовчоутворення неодмінно призводить до надмірної проліферації умовно-патогенної мікрофлори, зокрема й кандидозної.

За даними дослідників етинілестрадіол негативно впливає на обмін вуглеводів шляхом опосередкованого посилення секреції гормону росту, пролактину, підвищення рівня вільних жирних кислот у крові, які є антагоністами інсуліну, а синтетичні гестагени викликають зниження чутливості периферичних тканин до інсуліну, стимуляцію β -клітин підшлункової залози, зменшення печінкового кліренсу інсуліну [38, 39].

Звичайно, КОК останнього покоління зумовлюють мінімальний патологічний вплив на вуглеводний обмін, але за наявності хронічного стресу, нерационального харчування, гіподинамії, вживання деяких лікарських речовин дестабілізується обмін глюкози в тканинах, що стає сприятливим фактором для розмноження та персистенції глікогенофілічних *Candida* [3]. Крім того, синтетичні прогестини підсилюють й адгезивні властивості грибів [40].

КОК знижують також концентрацію аскорбінової кислоти в крові, антиоксидантні властивості якої є основою імуномодулюючих ефектів, зокрема протекторного впливу на мембрани лімфоцитів при активізації процесів пероксидного окислення ліпідів, регуляції механізмів гуморального та клітинного імунітету, процесів міграції лімфоцитів та хемотаксису тощо [3].

Безумовно, КОК зручні для використання та мають високий контрацептивний ефект, що на сьогодні є переважним фактором для вибору саме цього методу контрацепції, але їх складові викликають різновекторні побічні ефекти, серед яких значимим є порушення механізмів противокандидозного захисту організму, що потребує від лікаря більш уважного ставлення до перших проявів кандидозного ураження у цієї групи пацієнток.

Необхідно пам'ятати, що основним резервуаром грибів є кишечник, тому обов'язковим є проведення оцінки саме його мікробіологічного спектру. Слід зазначити, що для правильної інтерпретації результатів дослідження зразки необхідно сіяти на живильні середовища не пізніше 3-4 годин після їх взяття (діагноз дисбіозу кишечника з надмірною колонізацією грибів ставиться на підставі вмісту останніх у випорожненнях більше 10^{3-5} КУО/мл, зниження рівня біфідо-лактобактерій до 10^6 КУО/мл та підвищення вмісту умовно-патогенних *E. coli*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Clostridium*).

Для діагностики вагінального кандидозу матеріал рекомендується брати з заднього склепіння, але за результатами сучасних досліджень саме соскоби з переднього склепіння піхви є найбільш інформативними.

Для мікроскопії застосовують як нефарбовані, так й фарбовані за Грамом мазки, при вивченні яких потрібно оцінювати наявність дріжджових клітин/псевдоміцелію, кількість лейкоцитів, склад бактеріальної флори (позитивні результати мікроскопії відповідають вмісту грибів в матеріалі більше 10^3 КУО/мл). Посів піхвових виділень рекомендується проводити для визначення чутливості до антимікотиків та підтвердження діагнозу у разі негативного результату мікроскопії, але наявності симптомів кандидозного ураження. Діагноз вагінального кандидозу ставиться при проявах захворювання та вмісту грибів у виділеннях більше 10^4 КУО/мл, бессимптомної колонізації - при відсутності клінічних ознак, але 10^4 КУО *Candida*/мл.

Також можливо проведення серологічних тестів, зокрема імуноферментного аналізу з антигеном *Candida*, тесту латекс-аглютинації *Pastorex* або *Platelia* та визначення рівня специфічного Ig E.

При застосуванні пацієнткою КОК на протязі 6 місяців доцільно проводити дослідження функціонального стану печінки. Для внутрішньопечінкового холестазу, зумовленого прийомом гормональних контрацептивів, характерно підвищення рівнів лужної фосфатази, γ -глутамінтранспептидази, холестерину, рівень же коньюгованого білірубину та трансаміназ може бути в нормі або дещо підвищеним, рівень γ -глобулінів – у межах норми.

Таким чином, знання особливостей персистенції кандидозної інфекції при застосуванні КОК дозволяє лікарю своєчасно її діагностувати та призначати патогенетично спрямовану медикаментозну корекцію, що є важливою передумовою ефективності лікування у цієї категорії пацієнток.

Література

1. Татарчук Т.Ф., Сольский Я.П. Эндокринная гинекология (клинические очерки). - К.: Заповіт, 2003. – С. 181-199, 217-227.
2. Заболевания, передаваемые половым путем /Гл. ред. Борисенко К.К. – М.: ГЭОТАР МЕДИЦИНА, 1998. – С. 32-37.
3. Адашкевич В.П. Инфекции, передаваемые половым путем. – Н. Новгород: Издательство НГМА; М.: МЕДИЦИНСКАЯ КНИГА, 2002. – С. 231-245.
4. Хмельницкий О.К. Цитологическая и гистологическая диагностика заболеваний шейки и тела матки. – СПб.: СОТИС, 1999. – С. 23-42.
5. Odds F.C. *Candida* and candidacies. - Baltimore: University Park Press, 1997.- P. 102 - 110.
6. Клиническая гинекология. В 2 - х т, Т. 1 /Дуда И. В., Дуда Вл. И., Дуда В.И. – Минск.: Высшая школа, 1999. – С. 103-109.
7. Тихомиров А.Л. Варианты терапии острого и хронического рецидивирующего кандидозного вульвовагинита // Гинекология. – 2005. – Т.7, № 3.- С.11-17
8. Быков В.Л. Патоморфогенез кандидоза при эндокринных нарушениях: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. - Л., 1988. – 40 с.
9. Evidence for degradation of gastrointestinal mucin by *Candida albicans* secretory aspartyl proteinase /Colina A.R., Aumont F., Deslauriers N. // Infect. Immun. – Vol. 64, № 11. – P. 4514-4519.
10. Kanhe T., Culter J.E. Evidence for adhesin activity in the acid-stable moiety of the phosphomannoprotein cellwall complex of *Candida albicans* // Infect. Immune. – 1994. - Vol. 62, №5. – P.1662-1668.
11. Hoslettieri M.K. An integrin-like protein in *Candida albicans*: Implication for pathogenesis //

- Trends Microbiol. – 1996. – Vol. 4, № 6, P. 242-246.
12. Gustafson K.S., Vercellotti G.M., Bendel C.M., Hostetter M.K. Molecular mimicry in *Candida albicans* // J. Clin. Invest. – 1991.- Vol. 87. – P. 1896 - 1902.
 13. Hostetter M.K. Adhesins and ligands involved in the interaction of *Candida* spp. With epithelial and endothelial surfaces // Clin. Microbiol Rev.- 1994.- Vol. 7.- P. 29 - 42.
 14. Джордж Яков, Йегуда Шейнфельд. Грибок и аутоиммунные заболевания // Международный мед. журн.- 1998. - № 11-12.- С. 971-972.
 15. Прилепская В.Н., Анкирская А.С., Байрамова Г.Р., Муравьева В.В. Вагинальный кандидоз. – М.: Мед. Книга, 1997. – 40 с.
 16. Барановский А.Ю., Кондрашина Э.А. Дисбактериоз и дисбиоз кишечника: Изд. 2-е. – СПб: Питер, 2002. – С. 35 - 45.
 17. Губергриц Н.Б., Лукашевич Г.М., Загоренко Ю.А. Главный оппортунист нормальной кишечной флоры – *Candida albicans* (кандидоз органов пищеварения) //Сучасна гастроентерологія. - 2005. - № 4. – С. 99 - 106.
 18. Глушко Н.И. Антигенные и аллергические свойства маннопротеидного аллергена *Candida albicans* //Современная микология в России. – М.: Изд-во «Национальная академия микологии», 2002. – С. 354-355.
 19. Златкина А.Р., Исаков В.А., Иваников И.О. Кандидоз кишечника как новая проблема гастроэнтерологии //Рос. журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. – 2001. - № 6. – С. 33-38.
 20. Redmond H.P., Shou J., Kelly C.J. et al. Protein-calorie malnutrition impairs host defence against *Candida albicans* // J. Surg. Res. – 1991. – Vol. 50. – P. – 552-559.
 21. Гистология (введение в патологию) / Под ред. Улумбекова Э.Г., Чельшева Ю.А. – М.:ГЭОТАР, 1997. – С. 527-556.
 22. Romani L. Immunity to *Candida albicans* Th1, Th2 cells and beyond // Curr. Opin. Microbiol. – 1999. – Vol. 2, № 4. – P. 363 - 367.
 23. Сидельникова В.М. Привычная потеря беременности. – М.: Триада-Х, 2000. – С. 58-70.
 24. Yamada H., Polgar K., Hill J. Cell-mediated immunity to trophoblast antigens in women with recurrent spontaneous abortion // Am. J. Obstet. Gynecol. – 1994. - № 170 (1) .- 1339 p.
 25. Серов В.Н., Ильенко Л.Н. Биологические эффекты эндотоксина и клинко-патогенетические реакции при воспалительных заболеваниях половых органов у женщин //Акушерство и гинекология. – 1997. - № 3. – С. 11-13.
 26. Rico H., Herrero E., Miragall F., Sentandreu R. An electron microscopy study of wall expansion during *Candida albicans* yeast and mycelial growth using concanavalin A-rerritin labeling of mannoproteins // Arch. Microbiol. – 1991.- Vol. 156.- P. 111 - 114.
 27. Anderson M.L., Odds F.C. Mycosen.- 1985.- Vol. 28 (11).- P. 531-40.
 28. Величко Е.В. Условия и факторы адгезии грибов *Candida* к эпителиоцитам слизистых оболочек: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. - Л., 1987. – 20 с.
 29. Klotz S.A. Plasma and extracellules mutrix proteins mediate in the fate of *Candida albicans* in the human host // Med. Hypotheses. – 1994. – Vol. 42, № 5. – P. 328-334.
 30. Cannon R.D., Chaffin W.L. Oral colonization by *Candida albicans* // Crit. Rev. Oral Biol. – 1999.- Vol. 10, N 3.- P. 359 - 383.
 31. Hoegli L., Ollert M., Korting H.C. The role of *Candida albicans* secrete aspartic proteinase in the development of Candidases //J. Moll. Med. – 1996. – Vol. 74, № 3.- С. 135 - 142.
 32. Gilmore B.J., Retsinas E.M., Lorenz J.S., Hostetter M.K. An iC36 receptor on *Candida albicans*: structure, functuin and correlates for pathogenicity // J. Infec Dis. - 1988. – Vol. 157, N 1. – P. 38 - 46.
 33. Кашкин К.П., Дмитриева Л.Н. Белки системы комплемента: свойства и биологическая активность //Клиническая лабораторная диагностика. – 2000. - № 7. – С. 25 - 32.
 34. Антонов В.Б. Висцеральные микозы в реаниматологической практике //Анестезиология и реаниматология. - 1999. - № 2. – С. 41-50.
 35. Стрижаков А.Н., Давыдов А.И., Шахламова М.И. Современные методы контрацепции. – М.: Медицина, 1997. – С 46 - 64.
 36. Внутрпеченочный холестаза: клинко-патогенетические основы, дифференциальная диагностика, лечение: Методические рекомендации. – Минск-Гродно, 2001. – 67 с.
 37. Яковенко Э.П. Неалкогольные стеатогепатиты как результат нарушения процессов пищеварения и баланса кишечной микрофлоры //Consilium Medicum (Приложение), 2005. – С. 2 - 6.
 38. Шехтман М.М. Терапевтические аспекты контрацепции //Терапевтический архив. – 1999. - № 10. – С. 65-70.
 39. Хабаш Э.С. Современные аспекты гормональной контрацепции //Российский медицинский журнал. – 2004. - № 1. – С. 38-42.
 40. Kalo M.L., Segal E., Sahar E., Dayan D. J. // Infect Dis. – 1998. – Vol. 57, N 6.- P 1253 - 1256.