Министерство образования и науки РК

Карагандинский государственный медицинский университет

Кафедра молекулярной биологии и медицинской генетики

**СРС**

**На тему: «Основные принципы лечения наследственных болезней. Генотерапия»**

Выполнил: Гизатова З.

145 группа ОМ.

Проверил: Рогова Н.Р.

Джангильдина С.А.

г. Караганды 2012 г.

Наряду с болезнями, этиологически строго детерминированными наследственностью (генные и хромосомные) или факторами среды (травмы, ожоги), есть большая и нозологически разнообразная группа болезней, развитие которых определяется взаимодействием определённых наследственных факторов (мутаций или сочетаний аллелей) и факторов среды. Эту группу болезней называют болезнями с наследственной предрасположенностью. Этиология и патогенез данных болезней сложны, многоступенчаты и во многом ещё неясны. Естественно, что они разные для каждой болезни. Однако по поводу общего принципа развития таких болезней существует уже согласованное мнение. В основе наследственной предрасположенности к болезням лежит широкий генетический балансированный полиморфизм популяций человека по ферментам, структурным и транспортным белкам, Аг. В популяциях человека не менее 25—30% локусов (из 40 000) представлено двумя аллелями и более. Следовательно, индивидуальные комбинации аллелей невероятно многообразны. Они обеспечивают генетическую уникальность каждого человека, которая выражается не только в способностях, физических отличиях, но и в реакциях организма на патогенные факторы окружающей среды.

Болезни с наследственной предрасположенностью возникают у лиц с соответствующим генотипом (сочетание «предрасполагающих» аллелей) при провоцирующем действии факторов среды. Наследственная предрасположенность к болезни может иметь полигенную или моногенную основу. Болезни с наследственной предрасположенностью с определённой долей условности можно подразделить на следующие основные группы: 1) врожденные пороки развития; **2)** распространенные психические и нервные болезни; 3) распространённые болезни среднего возраста. Механизмы возникновения болезней с наследственной предрасположенностью, несмотря на их сложность, все больше и больше подвергаются генетическому анализу в связи с успехами расшифровки генома человека.

Эмпирические попытки лечить больных с наследственной патологией, предпринимаемые в течение 200 лет, вплоть до 30-х годов XX века, не дали положительных результатов. Диагноз наследственной болезни оставался приговором больному и его семье, такие семьи считались вырождающимися. Эта позиция в медицине в первые десятилетия XX века опиралась, по-видимому, на генетическую концепцию об очень строгой детерминации менделирующих наследственных признаков. В связи с этим в начале XX века возникло направление, названное негативной евгеникой, концепция которой состояла в том, что необходимо насильственно ограничить деторождение у лиц с наследственной патологией. К счастью, практическая реализация негативной евгеники была недолгой из-за общественного давления.

Переломным периодом в отношении лечения наследственных болезней можно считать 20—30-е годы. Так, в середине 20-х годов в экспериментах на дрозофиле были получены факты, показывающие разную степень проявления действия генов в зависимости от влияния генотипической или внешней среды. На основе этих фактов были сформированы понятия о пенетрантности, экспрессивности и специфичности действия генов, поэтому стала возможной логическая экстраполяция: если среда влияет на экспрессивность генов, то, следовательно, можно уменьшить или исключить патологическое действие генов при наследственных болезнях. На основе этих положений выдающийся русский биолог Н.К. Кольцов предложил и обосновал новое направление в медицинской генетике — евгенику — «учение о хорошем проявлении наследственных задатков». По его мнению, евгеника должна изучать все условия среды, стимулирующие проявления положительных наследственных и непроявления отрицательных (наследственные болезни) свойств.

Впервые в мире невропатолог и генетик С.Н. Давиденков, основываясь на собственном клиническом опыте и достижениях экспериментальной генетики, в начале 30-х годов указал на ошибочность мнения о неизлечимости наследственных болезней и вырождении семей с такими болезнями. Он, как и Н.К. Кольцов, исходил из признания роли факторов внешней и внутренней среды в проявлении наследственных болезней. С.Н. Давиденков настаивал на принципиальных возможностях вмешательства в функционирование патологических аллелей и сам много сделал для разработки методов лечения наследственных болезней нервной системы. Такая исходная позиция позволяла разрабатывать различные подходы и методы лечения лиц с наследственными болезнями на основе достижений генетики, теоретической и клинической медицины. Однако отсутствие сведений о патогенетических механизмах развития наследственных болезней в тот период ограничивало возможности разработки методов и все подобные попытки, несмотря на правильные теоретические установки, оставались длительное время эмпирическими.

В настоящее время благодаря успехам генетики в целом (всех её разделов) и существенному прогрессу теоретической и клинической медицины можно твёрдо утверждать, что уже многие наследственные болезни успешно лечатся. Именно такая установка должна быть у врача.

В настоящее время благодаря успехам генетики в целом (всех её разделов) и существенному прогрессу теоретической и клинической медицины можно твёрдо утверждать, что уже многие наследственные болезни успешно лечатся. Именно такая установка должна быть у врача.

Общие подходы к лечению наследственных болезней сходны с подходами к лечению болезней любой другой этиологии. При лечении наследственных болезней полностью сохраняется принцип индивидуализированного лечения -ведь врач и при наследственной патологии лечит не просто болезнь, а болезнь у конкретного человека. Возможно даже, что при наследственной патологии принцип индивидуализированного лечения должен соблюдаться ещё строже, потому что гетерогенность наследственных болезней далеко не расшифрована, а следовательно, с одной и той же клинической картиной могут протекать разные наследственные болезни с различным патогенезом. В зависимости от условий пре- и постнатального онтогенеза, а также от генотипа фенотипические проявления мутаций у конкретного индивида могут модифицироваться в ту или другую сторону. Следовательно, необходима разная коррекция наследственной болезни у разных лиц.

Как и при лечении других хорошо изученных болезней (например, инфекционных), можно выделить три подхода к лечению наследственных болезней и болезней с наследственной предрасположенностью: симптоматическое, патогенетическое, этиологическое. Применительно к наследственным болезням в отдельную группу можно выделить хирургические методы, поскольку иногда они выполняют функции симптоматической терапии, иногда патогенетической, иногда и той и другой вместе.

При симптоматическом и патогенетическом подходах используются все виды современного лечения (лекарственное, диетическое, рентгенорадиологическое, физиотерапевтическое, климатическое и т.д.). Генетический диагноз, клинические данные о состоянии больного и вся динамика болезни определяюттактику врача на протяжении всего периода лечения со строгим соблюдениемгиппократовского принципа «не навреди». При лечении наследственных болезней надо быть особенно внимательным в соблюдении этических и деонтологических принципов в отношении пациента и его членов семьи, ведь часто речь идет о хронически больных с детского возраста.

Хотя неспецифическое лечение не является главным, оно фактически всегда используется врачом, в том числе при лечении пациентов с наследственными болезнями. Симптоматическое лечение применялся практически при всех наследственных болезнях, даже тогда, когда врач располагает методами патогенетической терапии. Для многих форм наследственной патологии симптоматическое лечение — единственно возможное.

Лекарственная симптоматическая терапия — наиболее часто используемый метод, зависящий от формы наследственных болезней. Одним из древних примеров симптоматической терапии, сохранившейся до наших дней, является применение колхицина при острых приступах подагрического артрита. Этот метод открыт греками античного периода. Другими примерами симптоматического лечения могут быть применение анальгетиков при наследственных формах мигрени, специфических транквилизаторов при психических проявлениях наследственных болезней, противосудорожных препаратов при судорожных симптомах и т.д. Успехи этого раздела терапии связаны с прогрессом фармакологии, обеспечивающим все более широкий выбор лекарств. Вместе с тем расшифровка патогенеза каждой болезни позволяет понять причину возникновения симптома, а на этой основе становится возможной более тонкая лекарственная коррекция симптомов в тех случаях, когда первичная патогенетическая терапия ещё невозможна. В качестве примера можно привести общую схему многокомпонентного симптоматического лечения муковисцидоза.

Первичное звено патогенеза (нарушение транспорта ионов ) скорригировать при этом заболевании ещё не удаётся.

1. В связи с тем, что у больных выделяется много хлорида натрия с потом, для детей с муковисцидозом в жарком сухом климате рекомендуется дополнительное введение поваренной соли в пищу. В противном случае иногда может наступить коллапс с тепловым ударом.
2. Недостаточность функции поджелудочной железы у больных (рано или поздно это наступает) восполняется капсулированными препаратами сухих экстрактов поджелудочной железы животных или ферментов (панкреатин, панзинорм, фестал) и желчегонных средств. При выявлении клинических признаков нарушения функции печени проводится курс соответствующей терапии (эссенциале, метионин, холин и др.).

Наиболее серьёзными и трудными для лечения являются нарушения в бронхолёгочной системе. Закупорка просветов малых бронхов густой слизью обусловливает развитие инфекции в лёгочной ткани. На закупорку бронхов и инфекцию и направлена симптоматическая (почти патогенетическая) терапия. Для уменьшения обструкции применяют бронхоспазмолитические и отхаркивающие смеси (изопреналин, эуфиллин, атропин, эфедрин и др.), препараты муколитического действия (в основном тиолы — мукосольвин, местабон). Способ введения препарата (ингаляционный, пероральный, внутримышечный) зависит от выраженности клинической картины. Применяют лекарства, уменьшающие внутриклеточную продукцию слизи, например мукодин (карбоксиметилцистеин).

4. Лечение воспалительных осложнений в лёгких при муковисцидозе представляет трудную задачу, поскольку эти осложнения обусловлены несколькими видами бактерий, а иногда и грибов. С этой целью проводится интенсивная, микробиологически контролируемая антибиотикотерапия (уреидоденициллин, цефалоспорины третьего поколения и др.), а также лечение фторхинолонами для борьбы с синегнойной инфекцией. Выбор антибиотиков осуществляется в зависимости от чувствительности высеваемой флоры к конкретному препарату. Наибольший эффект проявляется при сочетанном введении антибиотиков ингаляционным и парентеральным путём.

Как видно на примере лекарственного лечения муковисцидоза, многосимптомные проявления болезни требуют от врача применения сложных фармакокинетически совместимых лекарств.

Симптоматическое лечение — не только лекарственное. Многие виды физических методов лечения (климатотерапия, бальнеолечение, разные виды электротерапии, теплолечение) применяются при наследственных болезнях нервной системы, наследственных болезнях обмена веществ, заболеваниях скелета. Больные после таких курсов лечения чувствуют себя намного лучше, продолжительность их жизни увеличивается.

Практически нет таких наследственных болезней, при которых не было бы показано физиотерапевтическое лечение. Например, лекарственное лечение муковисцидоза постоянно «подкрепляется» многообразными физиотерапевтическими процедурами (ингаляция, массаж и др.).

К симптоматическому можно отнести рентгенорадиологическое лечение при наследственно обусловленных опухолях до и после хирургического вмешательства.

Возможности симптоматического лечения при многих болезнях ещё далеко не исчерпаны, особенно лекарственной и диетической терапии.

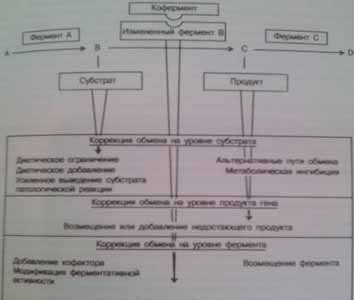
Следует подчеркнуть, что симптоматическое лечение будет использоваться в большом объёме и в будущем наряду с самым совершенным патогенетическим или даже этиотропным лечением наследственных болезней.

**Патогенетическое лечение**. Лечение любых болезней по принципу вмешательства в патогенез всегда эффективнее, чем симптоматическое лечение. При наследственных болезнях патогенетические методы наиболее обоснованы, хотя они и не противопоставляются симптоматическому лечению. Известно, что по мере изучения патогенеза каждой болезни появляются различные возможности вмешательства в процесс развития болезни, в её течение или процесс выздоровления. Согласно этому принципу развивалась клиническая медицина на основе теоретических представлений о патологических процессах. Таким же путем идет клиническая генетика в разработке методов лечения.

Для патогенетического лечения наследственных болезней в последние годы применяются принципиально новые подходы, основанные на достижениях молекулярной и биохимической генетики, расшифрованных нарушенных звеньев обмена всех биохимических механизмов, по которым развивается наследственно обусловленный патологический процесс, от аномального генного продукта до клинической картины болезни. Естественно, что на этой основе можно целенаправленно вмешиваться в патогенез болезни, а такое лечение фактически равнозначно этиотропному. потому что, хотя и не устраняется первопричина, т.е. мутантный ген, цепь патологического процесса прерывается и патологический фенотип (болезнь) не развивается, т.е. происходит нормококопирование.

Патогенетическое лечение должно во многом расширяться по мере прогресса генетики развития. Пока ее вклад в разработку методов лечения наследственной патологии незначителен, хотя прогресс в последние годы не вызывает сомнений. В настоящее время лечение основано на коррекции отдельных нарушенных звеньев, но более эффективно было бы вмешиваться в патологический процесс на уровне системных реакций.

При патогенетических подходах к лечению наследственных болезней исходят из того, что у больных либо образуется аномальный белок (фермент), либо нормального белка вырабатывается недостаточно (до полного отсутствия). За этими событиями следуют изменения цепи превращения субстрата или его продукта. Знание этих принципов и конкретных путей реализации действия гена помогает правильно разрабатывать схемы лечения и даже терапевтическую стратегию. Это особенно чётко можно проследить на примере наследственных болезней обмена веществ.



Как видно, для различных болезней могут быть выбраны разные пути коррекции. Для одной и той же болезни можно использовать вмешательств в разных звеньях и на различных этапах развития патологического процесса

В целом патогенетические подходы к лечению наследственных болезней систематизирован но в зависимости от уровня биохимического дефекта можно представить следующим образом. Суть любых подходов к лечению схематично сводится к возмещению или выведению чего-то. Если ген не работает, то необходимо возместить его продукт; если ген производит не то, что нужно, и образуются токсичные продукты, то необходимо удаление таких продуктов и возмещение основной функции; если ген производит много продукта, то избыток последнего удаляют.

**Используются диетотерапия и медикаментозное лечение**.

Патогенетическое лечение основано на знании патофизиологических последствий[метаболических нарушений](http://humbio.ru/humbio/har/0036ae07.htm).

**Нарушение функции дефектного белка вызывает заболевание из-за**:

- накопления токсической концентрации субстрата;

- избыточной активности альтернативного метаболического пути;

- дефицита продукта реакции или его метаболита;

- сочетания перечисленных причин.

Хотя эти варианты легче всего проиллюстрировать на примере ферментов, они справедливы практически для всех белков.

Нарушение метаболизма может быть местным - в отдельной клетке или ткани, которые синтезируют дефектный белок, или включает системные биохимические эффекты, вызванные нарушением концентрации метаболитов во внеклеточной жидкости. Например, [неврологические](http://humbio.ru/humbio/har_nevr/000008b9.htm)проявления [болезни Тея-Сакса](http://humbio.ru/humbio/lip-dis/00042e06.htm) обусловлены [разрушением нейронов](http://humbio.ru/humbio/apon/x004f83b.htm) из-за местной[недостаточности гексозаминидазы A](http://humbio.ru/humbio/lip-dis/000435d1.htm) , а [умственная отсталость](http://humbio.ru/humbio/eclin/001d61e5.htm) при нелеченной [фенилкетонурии](http://humbio.ru/humbio/pathology/0001a2e3.htm)- отдаленное следствие систематического накопления [фенилаланина](http://humbio.ru/humbio/01122001/prot_dr/x000183f.htm), вызванного[недостаточностью фенилаланингидроксилазы](http://humbio.ru/humbio/pathology/0001a2e3.htm) в [печени](http://humbio.ru/humbio/physiology/00148715.htm).

**Этиологическое лечение.** Наиболее перспективным и эффективным способом лечения наследственной патологии человека является коррекция генетического дефекта на уровне генов, то есть воздействие на этиологические факторы возникновения заболевания. Именно это направление в лечении наследственной патологии часто обозначают как генотерапия («молекулярное протезирование»). Разрабатываются три основные подхода к коррекции генетических дефектов посредством гемотерапии: I) компенсация экспрессии функционально неактивных аллелей введением в клетку дополнительных копий гена; *2)* угнетение избыточной экспрессии гена; 3) усиление иммунного ответа организма. Первый подход основан на введении в определенные клетки и ткани организма дополнительного генетического материала, корригирующего нарушение экспрессии одного или нескольких мутантных генов. Этот подход наиболее часто используют дли коррекции генетического дефекта при моногенных и некоторых мультифакториальных заболеваниях. Коррекция генетического дефекта осуществлется как в половых, так и в соматических клетках организма. Более предпочтительна генотерапия на уровне соматических клеток, так как она позволяет модифицировать экспрессию генов в определенном типе клеток и тканей и не приводит к передаче измененной генетической информации в ряду поколений. Второй подход основан на подавлении избыточной функции генов и их продуктов в клетках. Этот подход чрезвычайно перспективен для лечения онкологических заболеваний. В этом случае используют несколько генотерапевтических методов: 1) введение генов, продукты которых приводят к гибели избыточно пролиферируюших клеток (генов-убииц); 2) блокирование экспрессии онкогенов путем введения антисмысловых нуклеотидных последовательностей или генов, продукты экспрессии которых являются антителами для ряда белковых продуктов опухолевой клетки; 3) введение в опухолевые клетки нормальных копий генов-супрессоров. Третий подход направлен на повышение иммунореактивности клеток-мишеней или активации иммунной системы организма и разрабатывается для онкологических и вирусных заболеваний.

Рассмотрим более подробно использование этих трех способов генотерапии.

Коррекцию функции мутантных генов и восстановление их экспрессии можно осуществить двумя путями: 1) заменой мутантного гена его нормальной копией; 2) введением нормальной копии гена при сохранности мутантной. Наиболее часто применяют второй подход генотерапевтической коррекции наследственных дефектов, что обусловлено техническими трудностями, возникающими как при удалении мутантного аллеля, так и при последующем встраивании его нормальной копии.

Первые успешные опыты по гемотерапии наследственных заболеваний проведены в 1990 г. в США Они были направлены на коррекцию генетического дефекта при тяжелом комбинированном иммунодефиците, обусловленном мутацией в гене аденозиндезаминазы. Снижение активности этого фермента приводит к выраженному подавлению иммунного ответа в результате накопления в организме дезоксиаденозина, оказывающего токсическое действие на Т- и В-лимфоциты. Введение двум больным с этим тяжелым заболеванием нормальной копии гена с Т-лимфоцитами или стволовыми клетками костного мозга привело к практически полнойкомпенсации иммунодефицита. На сегодняшний день проведено уже более 600 клинических испытаний по генотерапии ряда моногенных и онкологических заболеваний человека. Однако до настоящего времени генотерапевтическая коррекция наследственных дефектов не нашла широкого применения в клинической практике. Это связано прежде всего с проблемой доставки генетического материала и не возможностью существующими методами добиться стабильной экспрессии трансдуцированного гена в клетках и тканях больного. Разрабатываются два основных способа доставки генов в соматические клетки человека - *invitro* и*invivo.* Первый способ предполагает перенос генов в культуру клеток человека, после чего транcдуцированные клетки вводятся в организм хозяина. При втором способе доставка нормального гена осуществляется непосредственно в организм человека. Используются два основных способа доставки генетического материала в клетки человека: прямой переноснекомпактизированной («голой») плазмидной ДНК, свободной от белков, с которыми она обычно связана в хромосомах, и доставка генных конструкций с помощью векторных систем.

Для прямого переноса генетического материала в клетку используют флуоресцентно меченную плазмидную ДНК, методику гидродинамического шока, насыщение ДНКполианионом (гепарином, декстран-сульфатом), а также ряд физических способов доставки ДНК. Среди физических методов доставки генетических конструкций в организм человека: электропорация, баллистическаятрансфекция(«генное ружье») и безигальное введение (бомбардировка клеток молекулами ДНК, связанными с различными металлами - Аи+,Са++).

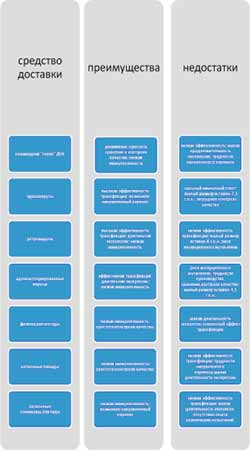
В качестве векторных систем могут быть использованы некоторые вирусы, липосомы (липидные пузырьки с включенными в них фрагментами ДНК) и катионные полимеры (полиэтиленамин, полилизин, лизин-гистидиновый полимер).

Наиболее перспективными при проведении генотерапии считаются вирусные векторные системы, содержащие человеческий ген, встроенный в определенный участокгенома вируса. Более чем в 80% всех генотерапевтических испытаний для доставки генетического материала были использованы именно вирусные векторы Известно,что вирусы легко проникают в клетку, взаимодействуя с белками мембраны и клеточными рецепторами, и могут интегрироваться в ядерный геном. Наличие специфического набора поверхностных белков позволяет различным вирусам внедриться в определенный тип клеток, осуществляя тканеспецифическую экспрессию гена. Наиболее часто в качестве векторных систем используются аденовирусы, ретровирусы и лентивирусы, которые различаются по ряду характеристик:

1. способности трансфекции пролиферирующих и непролиферирующих клеток,
2. способности интеграции в геном хозяина и, следовательно, длительности и направленности экспрессии;
3. уровню иммуногенности (степени иммунного ответа на введение векторной системы);
4. степени риска возникновения инсерционных мутаций; 5) пакующей способности вектора, определяющей размер генетического материала, который может быть введен в вектор.

**Биоэтические проблемы генотерапии.** Несмотря на то, что все процедуры генотерапии строго регламентированы и подчиняются принятым на сегодняшний день правилам безопасности, введение генных конструкций в организм человека требует особого внимания. Важнейшее значение имеет тип клеток, служащих объектом генотерапии. Любое введение в клетки человека генетического материала может иметь отрицательные последствия, связанные с неконтролируемым встраиванием и нарушением функции генов. Однако отрицательные последствия генотерапии соматических и половых клеток несоизмеримы по своему масштабу. В первом случае речь вдет о судьбе одного тяжелобольного индивида, и риск, вызываемый лечебными процедурами обычно ниже, чем риск смертельного исхода от первичного заболевания. Кроме того, степень генетического риска при генотерапии соматических клеток снижается при использовании генетических конструкций, неспособных к встраиванию в геном клетки-реципиента. При введении генетических конструкций в половые клетки возникает опасность внесения нежелательных изменений в геном будущих поколений. В международных документах Всемирной организации здравоохранения, ЮНЕСКО, Совета Европы признается этически допустимой только генотера- пия соматических клеток.

Можно надеяться, что внедрение генотерапии в практическое здравоохранение поможет преодолеть, хотя бы частично, и некоторые нравственные проблемы. Тем более, что ведущей тенденцией развития новых генетических технологий является все большая миниатюризация процедур генодиагностики и генотерапии и сдвиг времени их выполнения на все более ранние сроки беременности.



Заключение

Концепция генной терапии существует уже на протяжении последних десятилетий. Она заключатся в том, что наиболее радикальным способом борьбы с разного рода заболеваниями, вызываемыми изменениями генетического содержания клеток, должна быть обработка, направленныая непосредственно на исправление или уничтожение самой генетической причины заболевания, а не ее следствий. Причиной может быть мутация в зародышевой линии клеток, которая передается по наследству при наследственных заболеваниях, это может быть соматическая мутация, которая вызывает, например, рак, или это может быть изменение вследствие появления в клетке чужеродного генетического материала, например, в результате вирусной инфекции. Способ же борьбы с этими генетическими изменениями заключается в искусственном введению в пострадавшую клетку новой генетической информации, призванной поправить ту, с которой связана болезнь. Эта концепция, по-видимому, появилась сразу после осознания механизмов трансформации клеток опухолеродными вирусами. Они, эти вирусы, осуществляли стабильное внедрение генетического материала в геном клетки хозяина, и поэтому тогда же было предложено использовать их, как векторы для доставки желаемой генетической информации в геном клеток, чтобы в случае необходимости поправлять клеточные дефекты и лечить болезни генома. Однако это были только общие идеи. Предстояло решить массу технических и этических проблем, прежде чем достичь сегодняшних успехов и надежд. Серьезным уроком и предостережением послужила крайне неудачная попытка вылечить талассемию с помощью введения гена -глобина. Это было сделано в 1980 году. Исторически генная терапия нацеливалась на лечение наследственных генетических заболеваний, но впоследствии поле ее применения, по крайней мере теоретически, расширилось таким образом, что она стала рассматриваться, как потенциально универсальный подход к лечению практически всего спектра болезней, начиная от инфекционных, включая так называемые болезни современного общества такие как рак, атеросклероз, диабет и кончая классически генетическими, наследственными заболеваниями.

Список использованной литературы

* Н.П.Бочков: «Клиническая генетика», издательство «ГЭОТАР-МЕД», 2002г.,Москва, 271-280 стр.
* В.И.Иванов, Н.В.Барышникова, Дж.С.Билева, Е.Л.Дадали,Л.М. Константинова,О.В.Кузнецова,А.В.Подяков : «Генетика», ИКЦ «АКАДЕМКНИГА»,2006 г.,Москва, 592-601 стр.
* <http://humbio.ru/humbio/har/0017ecf3.htm>
* <http://humbio.ru/humbio/har/003bea87.htm>
* С.Б. Бокуть, Н.В. Герасимович, А.А. Милютин«Молекулярная биология» – Минск, 2005. – 463 с.