УДК 616.24-076:578.262.7

# SP-D КОНТРОЛИРУЕТ БАЛАНС TH1 И TH2 ЦИТОКИНОВ И ОБЛАДАЕТ ПРИЗНАКАМИ ЭНДОГЕННОГО ФАКТОРА РЕПРОГРАММИРОВАНИЯ МАКРОФАГОВ

**Е.Н. Вассерман[#], С.В. Лямина, Ш.Л. Шимшелашвили, Е.В. Абрамова[#], В.А. Назаров, С.В. Круглов*, Е.В. Малышева, М.Ф. Беарс[#], А.Д. Гоу[§], И.Ю. Малышев**

*Московский государственный медико-стоматологический университет, г. Москва, igor.malyshev@mtu-net.ru;*
*[*]НИИ общей патологии и патофизиологии РАМН, Москва, Россия;*
*[#]Пенсильванский университет, Филадельфия, Пенсильвания, США;*
*[§]Ратгерс университет, Пискатавэй, Нью-Джерси, США*

**Макрофаги играют исключительно важную роль в иммунных ответах. В зависимости от микроокружения макрофаги могут приобретать или M1, или M2 фенотип. Факторы, которые влияют на этот процесс, представляют кардинальный интерес для современной иммунопатологии. В этом отношении сурфактантный белок D (SP-D) привлекает особое внимание. В легких SP-D может связываться с разными типами рецепторов на макрофагах и стимулировать или M1-, или M2-активность макрофагов. Недавно было показано, что SP-D обнаружен не только в легких, но и в других органах. Цель работы состояла в том, чтобы определить: 1). может ли SP-D регулировать секреторную активность других макрофагов, кроме альвеолярных? 2). зависят ли регуляторные эффекты SP-D от фенотипа макрофагов? 3). вовлечен ли SP-D в процесс программирования фенотипа макрофагов? Для того чтобы ответить на эти вопросы, мы сравнили ЛПС-индуцированную продукцию цитокинов (IL-6, IL-10, IL-12, IL-13, TNF-α и IFN-γ) в разных фенотипах перитонеальных макрофагов, выделенных от нормальных и SP-D (-/-) мышей. Показано, что отсутствие SP-D влияет на секреторную активность перитонеальных макрофагов. Это означает, что SP-D является не только локальным фактором легочного иммунитета, но также играет роль в развитии иммунного ответа всего организма. Обнаружено также, что эффекты SP-D зависят от фенотипа макрофагов. Наиболее ярко это проявилось на примере IL-13 – отсутствие SP-D приводило к снижению продукции этого цитокина в M0 фенотипе, не влияло на продукцию в M1 фенотипе и повышало в M2 фенотипе. Также показано, что отсутствие SP-D приводит к инверсии феномена программирования, а именно: программирование нормальных макрофагов привело к тому, что продукция IL-13 в M2 фенотипе была существенно ниже по сравнению с M0 фенотипом, тогда как программирование SP-D (-/-)макрофагов привело к обратному соотношению. Критическая значимость SP-D в формировании фенотипа макрофагов позволяет считать**

**SP-D эндогенным фактором программирования макрофагов и определяет важную роль SP-D в развитии иммунных ответов организма.**

**Ключевые слова: сурфактантный белок D (SP-D), M1 и M2 фенотипы макрофагов, Th1 и Th2 цитокины, репрограммирование макрофагов.**

# SP-D CONTROLS THE BALANCE OF TH1 AND TH2 CYTOKINES AND POSSESSES THE SIGNS OF ENDOGENOUS REPROGRAMMING FACTOR

**E.N. Vasserman[#], S.V. Lyamina, Sh. L. Shemshelashvili, E.V. Abramova[#], V.A. Nazarov, S.V. Kruglov*, E.V. Malysheva, M.F. Bears[#], A.D. Goy[§], I.Yu. Malyshev**

*Moscow state university of medicine and dentistry, Moscow, Russia*
*igor.malyshev@mtu-net.ru;*
**Scientific Research Institute of general pathology and pathophysiology RAMS, Moscow, Russia;*
*#University of Pennsylvania, Philadelphia, Pennsylvania, USA;*
*§Rutgers university, Piskataway, New Jersey, USA*

**The role of macrophages in the immune response is extremely important. Depending on microenvironment macrophages can get either M1 or M2 phenotype. Factors influencing the process are of crucial interest for modern immunopathology. In this respect surfactant protein D (SP-D) draws special attention. In lungs SP-D can связываться contact with different types of receptors on macrophages and stimulate either M1- or M2 macrophages activity. Recently it has been shown that SP-D is present not only in lungs, but also in other organs. The aim of the study consisted in defining: 1. Can SP-D regulate secretory activity of other macrophages except alveolar? 2. Does regulatory effects of SP-D depend on macrophages phenotype? 3. Is SP-D involved in the process of macrophages phenotype programming? To answer these questions we've compared LPS-induced cytokines' production (IL-6, IL-10, IL-12, IL-13, TNF - α and IFN - γ) in different phenotypes of peritoneal macrophages from normal and SP-D (-/-) mice. It had been shown that absence of SP-D influences on secretory activity of peritoneal macrophages. It means that SP-D is not only the local factor of lung immunity, but also plays a role in development of the immune response in the whole organism. We revealed also that effects of SP-D depend on the macrophages phenotype. Most clear it had been shown on the example of IL-13 – absence of SP-D led to decreasing production of this cytokine in M0 phenotype, did not influence the cytokine production in M1 phenotype and increased in M2 phenotype. It was also shown that absence of SP-D leads to inversion of programming phenomenon, i.e. programming of normal macrophages leads to the fact that the production of IL-13 in M2 phenotype was significantly lower than in M0 phenotype, whereas programming of SP-D (-/-) macrophages leads to converse ratio. Considering crucial significance of SP-D in macrophages**

**phenotype formation SP-D is an endogenous macrophages programming factor that determine important role of SP-D in the development of immune responses of the organism.**

**Keywords: surfactant protein D (SP-D), M1-, M2 macrophages phenotypes, Th1- Th2 cytokines, macrophages reprogramming.**

**Введение**

Макрофаги играют исключительно важную роль в иммунных ответах. Это связано с тем, что внедрение в организм чужеродного агента вызывает мощную активацию макрофагов, выделение цитокинов и других медиаторов воспаления. Макрофаги, стимулированные внутриклеточными микробами, такими, как вирусы или бактерии, липополисахаридом (ЛПС) и /или IFN-γ, отвечают классической активацией, т.е. продукцией провоспалительных цитокинов, таких, как IL-1, TNF-α, IL-12 и IFN-γ, и генерацией активных форм кислорода и азота. Такой фенотип макрофагов получил название M1 [6]. M1 макрофаги обладают выраженными фагоцитирующими и бактерицидными свойствами. Макрофаги, стимулированные экстраклеточными паразитами или IL-4, IL-13, TGF-ß или глюкокортикоидами, формируют альтернативный M2 фенотип [6]. M2 макрофаги продуцируют антивоспалительные цитокины, такие, как IL-10, IL-13 [6], и содействуют ангиогенезу, репарации и ремоделированию тканей.

Провоспалительные цитокины IL-1, TNF-α, IL-12 и IFN-γ, продуцируемые преимущественно M1 фенотипом, потенцируют развитие Th0 клеток в Th1 и угнетают $Th^2$ ответ. Таким образом, M1 макрофаги интегрированы в клеточный Th1 ответ, который обезвреживает микроорганизмы и опухолевые клетки. Антивоспалительные цитокины IL-10, IL-4 и IL-13, продуцируемые преимущественно M2 фенотипом, сдвигают дифференцировку Th0 клеток в $Th^2$ и ингибируют пролиферацию Th1. $Th^2$ клетки способствуют секреции антител В клетками и запускают гуморальный иммунный ответ [6].

Интересно, что Th1 клетки продуцируют тот же набор цитокинов, что и M1 макрофаги, а $Th^2$ — что и M2 макрофаги. Поэтому провоспалительные цитокины иногда называют Th1 цитокинами, а антивоспалительные — $Th^2$ цитокинами.

Нарушение в правильном выборе между Th1 и $Th^2$ ответами лежит в основе развития большого количества заболеваний. Соответственно факторы, которые могут влиять на этот выбор, представляют кардинальный интерес для современной иммунопатологии.

В этом отношении наше внимание привлек сурфактантный белок D (SP-D). Главным образом, SP-D продуцируется в легких. Основная функция легочного SP-D состоит в модулировании воспаления и иммунной защиты в легких. В легких SP-D связываются с разными рецепторами на поверхности альвеолярных макрофагов и в зависимости от своей олигомерной структуры может стимулировать про- или антивоспалительную активность макрофагов [5]. В настоящее время изучение влияния SP-D на продукцию Th1 и $Th^2$ цитокинов становится ключевым моментом в понимании роли SP-D в регуляции воспаления и всего иммунного ответа.

Недавно было показано, что SP-D обнаружен не только в легких, но и в сердце, желудке и кишечнике [9]. Отсюда возникает первый важный вопрос: может ли SP-D регулировать секреторную активность других макрофагов, кроме альвеолярных? То есть, вовлечен ли SP-D в иммунный ответ всего организма? Второй важный вопрос — зависят ли регуляторные эффекты SP-D от фенотипа макрофагов? И, наконец, третий вопрос — вовлечен ли SP-D в сам процесс программирования макрофагов и приобретение того или иного фенотипа секреторной активности?

**Цель исследования**

Цель работы заключалась в определении роли SP-D в регуляции баланса макрофагальных Th1 и $Th^2$ цитокинов. Для этого было необходимо ответить на три вышеобозначенных вопроса. Для того чтобы ответить на эти вопросы, мы сравнили динамику ЛПС-индуцированной продукции цитокинов в разных фенотипах перитонеальных макрофагов, выделенных от нормальных и SP-D (-/-) мышей.

**Материал и методы исследования**

C57BL/6 мыши, не имеющие SP-D гена (SP-D (-/-)), были получены в лаборатории S. Hawgood и переданы в Пенсильванский университет, США [3]. В качестве контроля были использованы сопоставимые по возрасту (8-10 недель) C57BL/6 нормальные мыши. Мыши содержались в условиях, не допускающих попадание патогенных микроорганизмов, в соответствии с протоколом Комиссии по содержанию животных (Пенсильванский университет, США). Перитонеальные макрофаги выделяли из перитонеального смыва мышей, которым за 4 дня вводили в / б 2 мл 4% бульона тиогликолята. Перитонеальные макрофаги культивировали в среде RPMI 1640 с 10%-ной сывороткой с 100 U/мл пенициллина и 100 μг/мл стрептомицина. Для получения M1 и M2 фенотипов макрофагов была использована методика Zhang and Morrison [1]. Для этого первичная культура наивных перитонеальных макрофагов была разделена на три пула. В первый пул для формирования M1 фенотипа было добавлено на 6 часов 0,5 нг/мл ЛПС (из E. coli O111:B4, List Biologic Laboratories, Campbell, CA); во второй пул для формирования M2 фенотипа — 5 нг/мл ЛПС. Третий пул служил контролем (нативный M0 фенотип). Для активации макрофагов использовали ЛПС в концентрации 500 нг/мл.

Для измерения цитокинов, 200 мкл культуральной среды замораживали при –80 ºC. Оценку содержания INF-γ, TNF-α, IL-12, IL-6, IL-10 и IL-13 проводили с помощью SearchLight® Technology multiplex cytokine assay (Pierce Biotechnology, Woburn, MA).

Результаты представляли как M ± m и обрабатывали статистически с использованием t-критерия Стьюдента. Отличие между группами считалось достоверным при $p < 0,05$.

**Результаты исследования и их обсуждение**

Макрофаги, репрограммированные на M1 фенотип, на действие ЛПС в высоких концентрациях (500 нг/мл) отвечали преимущественным увеличением Th1 цитокинов, а репрограммированные на M2 — $Th^2$ цитокинов (рис. 1). Например, в нативном M0 фенотипе макрофагов ЛПС-стимулированная продукция Th1 цитокинов TNF-α и IL-12 составляла 4812+666 и 44+5 пг/мл соответственно, а $Th^2$ цитокинов IL-10 и IL-13 —

475+38 и 17+6 пг/мл соответственно. В М1 фенотипе ЛПС-стимулированная продукция Th1 цитокинов TNF-α и IL-12 составляла 8714+865 и 51+3 пг/мл соответственно, а антивоспалительного IL-10 и IL-13 — 329+40 и 6+2 пг/мл соответственно. Тогда как в М2 фенотипе продукция Th1 цитокинов TNF-α и IL-12 составляла всего 4412+468 и 11+2 пг/мл, соответственно, а $Th^2$ цитокинов IL-10 и IL-13 — 780+35 и 6+1 пг/мл соответственно. В результате оказалось, что продукция Th1 цитокина IL-12 в М1 фенотипе макрофагов была в 5 раз выше, а $Th^2$ цитокина IL-10 почти в 2,5 раза ниже по сравнению с М2 фенотипом макрофагов нормальных мышей. Таким образом, мы воспроизвели методический прием альтернативного репрограммирования нативных М0 макрофагов на М1 (провоспалительный) и М2 (антивоспалительный) фенотип.

В макрофагах SP-D (-/-) мышей в ответ на стимуляцию высокими концентрациями

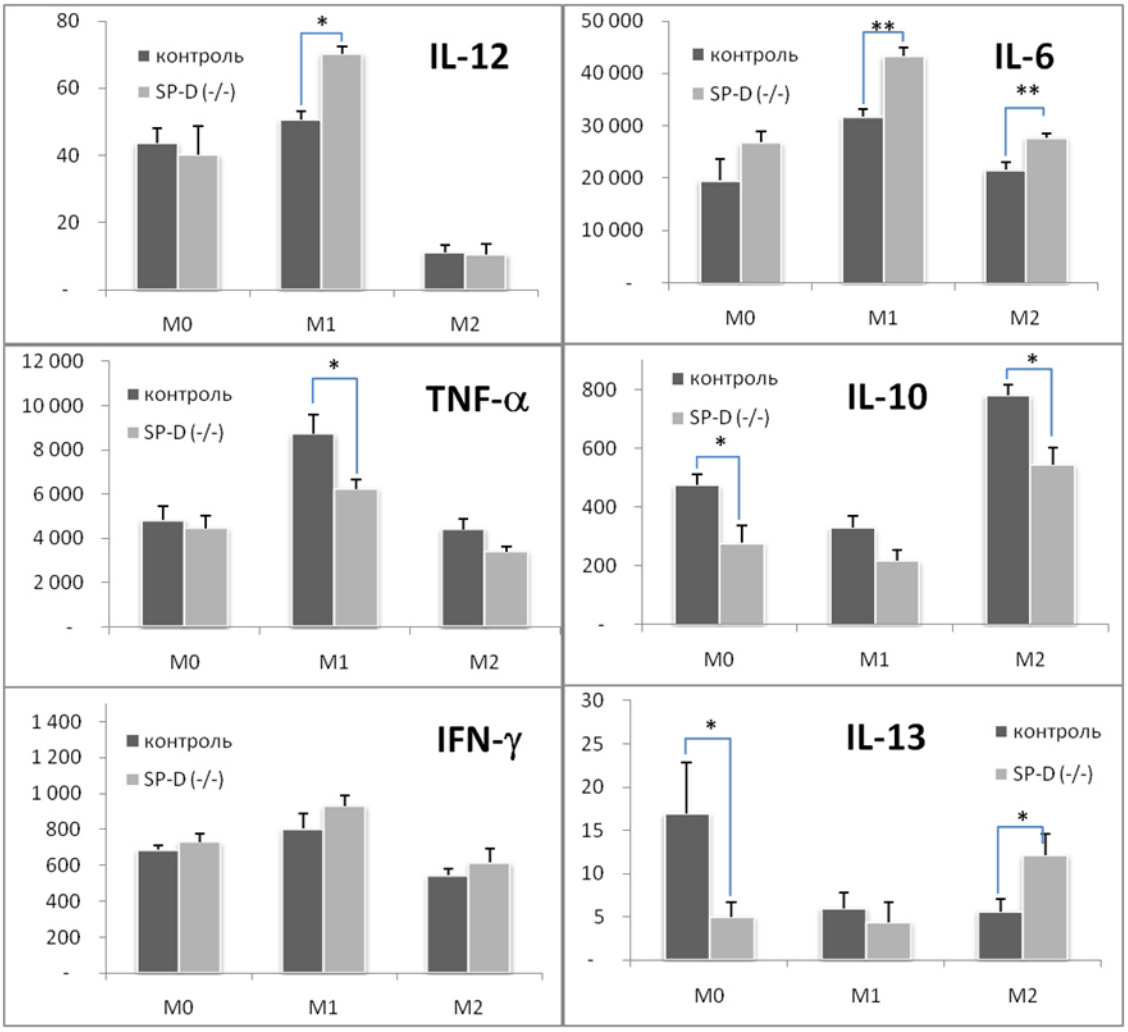


*Рис. 1. Изменение продукции Th1 и Th2 цитокинов у контрольных и SP-D (-/-) макрофагов разных фенотипов в ответ на стимуляцию ЛПС (500 нг/мл)*

*По оси ординат: концентрация цитокинов в культуральной среде, пикограмм/мл*

*Достоверность различий между контролем и SP-D (-/-): * - p<0,05 и ** - p<0,01*

ЛПС (500 нг/мл) наблюдалась следующая картина (рис. 1). В нативном M0 фенотипе ЛПС-индуцированная продукция Th1 цитокинов IL-12, TNF-α и IFN-γ и $Th^2$ цитокина IL-6 достоверно не различалась между макрофагами нормальных и SP-D (-/-) мышей. Продукция $Th^2$ цитокинов IL-10 и IL-13 в M0 фенотипе макрофагов SP-D (-/-) мышей была снижена в 2 и 3 раза соответственно по сравнению с M0 фенотипом макрофагов нормальных мышей.

В M1 фенотипе SP-D (-/-) макрофагов изменение продукции разных Th1 цитокинов было разнонаправленным. Продукция IL-12 была достоверно увеличена, TNF-α — снижена, а IFN-γ практически не изменилась по сравнению с M1 фенотипом макрофагов нормальных мышей. Изменение продукции разных $Th^2$ цитокинов в M1 фенотипе SP-D (-/-) макрофагов также было разнонаправленным. А именно: продукция IL-6 достоверно увеличилась, а продукция IL-10 и IL-13 практически не изменилась по сравнению с M1 фенотипом макрофагов нормальных мышей.

В M2 фенотипе SP-D (-/-) макрофагов продукция Th1 цитокинов IL-12, TNF-α и IFN-γ достоверно не изменялась по сравнению с M2 фенотипом макрофагов нормальных мышей. В M2 фенотипе SP-D (-/-) макрофагов изменение продукции разных $Th^2$ цитокинов было разнонаправленным. А именно: продукция IL-6 и IL-13 достоверно увеличивалась, а IL-10 достоверно снижалась по сравнению с M2 фенотипом нормальных макрофагов.

До 90-х годов исследования механизмов активации макрофагов фокусировались, главным образом, на индукции воспалительных и эффекторных функций. Открытие и описание M1 и M2 фенотипов макрофагов, вырабатывающих разный спектр Th1 и Th2 цитокинов, привело к разработке новой M1/M2 концепции роли макрофагов в иммунитете. В этой концепции качество, интенсивность и специфичность активации макрофагов зависят от природы действующего патогена и модулирующих цитокинов. При этом, Th1 цитокины способствуют формированию M1 фенотипа, тогда как Th2 цитокины, напротив, M2 фенотипа. Эти исследования обеспечили физиологическую основу для объяснения функциональной гетерогенности макрофагов, роли микроокружения в формировании фенотипа макрофагов и механизмов пластичности иммунного ответа. Поэтому в нашей работе мы сосредоточились на SP-D, который, как известно, является компонентом микроокружения макрофагов в легких и одним из ключевых регуляторов их активности [5]. Полученные данные позволяют ответить на важные вопросы и сделать вывод о значении SP-D в регуляции иммунного ответа организма в целом.

Первый вопрос. Регулирует ли SP-D активность других макрофагов, кроме альвеолярных? Представленные здесь данные показывают, что отсутствие SP-D в организме мышей оказывает влияние на секреторную активность перитонеальных макрофагов. Это означает, что SP-D является не только локальным фактором легочного иммунитета, но, вероятно, также играет роль в развитии иммунного ответа всего организма. Вместе с тем обнаружилась определенная специфика в эффектах SP-D на макрофаги разной локализации. Так, хорошо известно, что удаление SP-D гена приводит к увеличению количества и размера альвеолярных макрофа-

гов [7]. В случае SP-D (-/-) перитонеальных макрофагов изменения размера и количества макрофагов не происходило [2].

Второй вопрос. Зависят ли регуляторные эффекты SP-D от фенотипа макрофагов? Наши результаты позволяют положительно ответить на этот вопрос. Так, например, отсутствие гена SP-D не влияло на продукцию Th1 цитокинов IL-12 и TNF-α в нативном и M2 фенотипах, но приводило к увеличению секреции IL-12 и к снижению TNF-α в M1 фенотипе. При оценке влияния SP-D на секрецию Th[2] цитокинов выяснилось следующее. Отсутствие гена SP-D не влияло на продукцию IL-6 в M0 фенотипе, но приводило к увеличению продукции этого цитокина в M1 и M2 фенотипе. Зависимость эффектов SP-D от фенотипа макрофагов также обнаружилась и на примере IL-10. Однако наиболее ярко она проявилась на примере IL-13 — отсутствие SP-D приводило к снижению продукции этого Th2 цитокина в M0 фенотипе, не влияло на продукцию в M1 фенотипе и повышало в M2 фенотипе. Исключение из правила о зависимости эффектов SP-D на секреторную активность макрофагов составил IFN-γ: удаление гена SP-D не приводило к изменению продукции этого цитокина ни в одном из фенотипов макрофагов.

Зависимость влияния SP-D на продукцию разных Th1 и Th2 цитокинов от фенотипа макрофагов предопределяет изменение баланса Th1/Th2 цитокинов. Так, в ЛПС-стимулированном нативном M0 фенотипе SP-D (-/-) макрофагов за счет снижения продукции Th2 цитокинов IL-10 и IL-13, Th1/Th2 баланс цитокинов сдвигается в сторону Th1 цитокинов. В M1 фенотипе отсутствие SP-D оказывает разнонаправленный эффект на разные Th1 и Th2 цитокины. И, наконец,

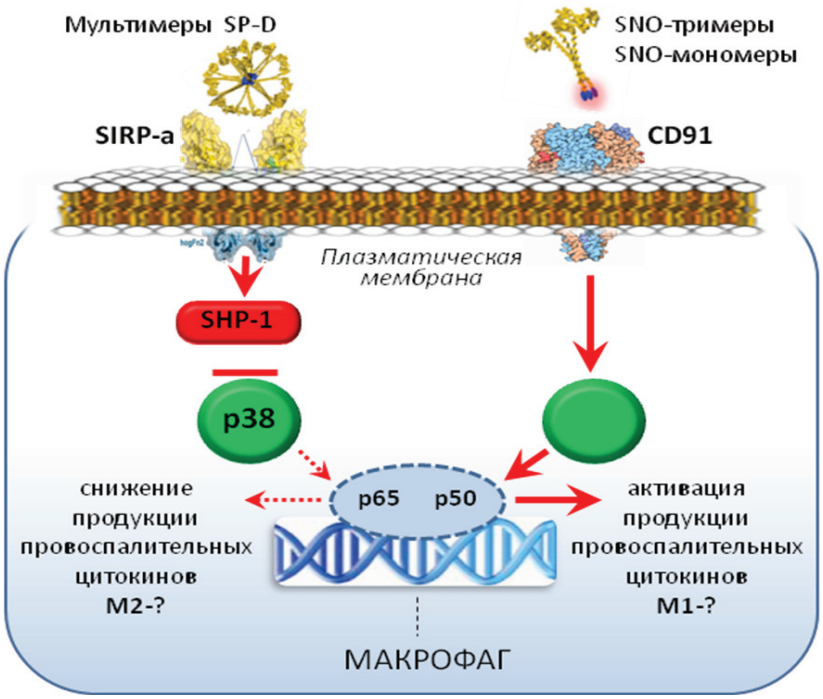


*Рис. 2. Схема про-и противовоспалительных функций SP-D (модифицированная схема Gardai, 2003) [4]*

в М2 фенотипе за счет усиления продукции продукции Th2 цитокинов баланс Th1/Th2 цитокинов сдвигается в сторону Th2.

Выяснение механизмов, определяющих зависимость эффектов SP-D от фенотипа макрофага, осложняется тем, что на первичное влияние SP-D на продукцию цитокинов вторично могут накладываться усиливающие и ослабляющие эффекты одних цитокинов на синтез других. Кроме того, разные олигомерные формы SP-D могут оказывать противоположное влияние на активность макрофагов, связываясь с разными рецепторами на поверхности этих клеток [5]. Так, SP-D в нативной мультиолигомерной форме через свой карбоксильный домен связывается с рецептором SIRP-α и блокирует провоспалительные ответы благодаря ингибированию активацию p38 MAPK и NFkB (рис. 2). Также подтверждено, что именно мультиолигомерная структура SP-D ингибирует ЛПС-индуцированный воспалительный ответ макрофагов [5].

Во время воспаления SP-D становиться мишенью для NO. В результате мультиолигомерная структура SP-D распадается на S-нитрозилированные тримеры и мономеры. Тримеры и мономеры в отличие от мультимеров SP-D связываются с другим рецепторным комплексом — кальретикулин/C91, и, таким образом, активируют продукцию провоспалительных цитокинов благодаря фосфорилированию p38 и активации NFkB [5].

И, наконец, недавно было показано, что количество рецепторов SIRP-α, с которыми связывается мультиолигомерная форма SP-D на поверхности макрофагов, значительно уменьшается после стимуляции ЛПС [8]. Понятно, что этот феномен также будет интерферировать с механизмами зависимости эффектов SP-D от фенотипа макрофагов.

Третий вопрос, на который позволяет ответить наше исследование: вовлечен ли SP-D в механизмы программирования макрофагов и формирование того или иного фенотипа секреторной активности? Наши данные позволяют сделать предположение о важной роли SP-D в механизме программирования фенотипа макрофагов. Мы обнаружили, что отсутствие SP-D приводит к инверсии феномена репрограммирования в отношении цитокина IL-13 (рис. 1), а именно: ЛПС-зависимое программирование макрофагов нормальных мышей привело к тому, что продукция этого цитокина в М2 фенотипе была существенно ниже по сравнению с М0 фенотипом, тогда как программирование макрофагов SP-D (-/-) мышей привело к обратному соотношению: продукция IL- 13 в М2 фенотипе была существенно выше по сравнению с М0 фенотипом. При этом известно, что IL-13 сам по себе является мощным фактором программирования макрофагов в сторону М2 фенотипа. Критическая значимость SP-D в программировании секреторного фенотипа макрофагов позволяет считать SP-D важным эндогенным фактором репрограммирования макрофагов и определяет важную роль SP-D в развитии врожденных и адаптивных иммунных ответов организма.

Для понимания биологической значимости функций SP-D в качестве эндогенного фактора репрограммирования макрофагов необходимо также учитывать следующие обстоятельства. Нативные нерепрограммированные М0 макрофаги при активации

одновременно продуцируют и провоспалительные (Th1), и антивоспалительные (Th2) цитокины с противоположными эффектами на дифференцировку Th0 клеток. Это может приводить к задержке в развитии альтернативного Th1/Th2 приобретенного иммунитета. Предварительное SP-D-зависимое репрограммирование макрофагов может иметь место на самых ранних стадиях инфекции при действии низких концентраций ЛПС. Репрограммированные макрофаги в ответ на действие высоких концентраций патогена будут отвечать преимущественной продукцией или Th1, или Th2 цитокинов. Это помогает быстро предопределить вектор и скорость развития воспалительного процесса и адекватного Th ответа и способствует более эффективному уничтожению патогена.

**Выводы**

В целом наши данные позволяют дополнить существующие знания о роли SP-D в регуляции активности макрофагов, а именно: впервые начинает складываться представление 1) о генерализованной роли SP-D в развитии иммунного ответа организма; 2) о том, что регуляторная роль SP-D зависит от фенотипа макрофагов и 3) о том, что SP-D может регулировать формирование врожденных и адаптивных иммунных ответов как за счет влияния на Th1/Th$^2$ баланс цитокинов, так и за счет участия в репрограммировании макрофагов малыми дозами патогенна.

**Список литературы**

1. Atochina E., Beers M., Tomer Y. et al. Attenuated allergic airway hyperresponsiveness in C57BL/6 mice is associated with enhanced surfactant protein (SP) -D production following allergic sensitization. Respir Res., 2003; 4: 15

2. Atochina-Vasserman E. N., Abramova H., Tomer Y. et al. SP-D-dependent regulation of NO metabolism in LPS-stimulated peritoneal macrophages. Journal of Bulletin Experimental Biology & Medicine, 2009; 147 (4):415-20

3. Botas C., Poulain F., Akiyama J. et al. Altered surfactant homeostasis and alveolar type II cell morphology in mice lacking surfactant protein D. Proc.Natl.Acad. Sci. USA 95; 1998:11869-11874

4. Gardai S. J., Xiao Y. Q., Dickinson M. et al. By binding SIRPalpha or calreticulin/CD91, lung collectins act as dual function surveillance molecules to suppress or enhance inflammation. Cell, 2003;115:13-23.

5. Guo C. J., Atochina-Vasserman E. N., Abramova H. et al. S-Nitrosylation of surfactant protein-D controls inflammatory function. PLoS Biology, 2004; 6 (11).

6. Martinez F. O., Sica A., Mantovani A. et al. Macrophage activation and polarization. Front Biosci., 2008; 13: 453-61.

7. Wert S. E., Yoshida M., LeVine A. M. et al. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 97, 2000: 5972-5977

8. Kong X.-N., Yan H.-X., Chen L. et al. Journal of Experimental Medicine, 2007; 204: 2719-2731.

9. J. H. Fisher, V. Sheftelyevish, Y.-S. Ho et al. Pulmonary-specific expression of SP-D corrects pulmonary lipid accumulation in SP-D gene-targeted mice. Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol., 2000; 278: L365-L373.