

НЕИНВАЗИВНЫЕ МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ ФИБРОЗА ПЕЧЕНИ И ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ В КЛИНИЧЕСКОЙ ПРАКТИКЕ

А. Балашова¹,
В. Романова¹,
О. Аришева¹, кандидат медицинских наук,
И. Гармаш¹, кандидат медицинских наук,
Н. Терехина², кандидат медицинских наук,
Ж. Кобалава¹, доктор медицинских наук, профессор,
В. Моисеев¹, доктор медицинских наук, профессор

¹Российский университет дружбы народов, Москва

²Национальный научный центр наркологии
Минздрава России, Москва

E-mail: nastasya.balashova@yandex.ru

Обсуждаются преимущества и недостатки разных методов диагностики фиброза печени и перспективы их рационального использования в клинической практике.

Ключевые слова: фиброз печени, эластометрия, биохимические маркеры фиброза.

При хроническом повреждении печени происходит накопление соединительной ткани, которое прогрессирует с развитием последовательных стадий фиброза вплоть до цирротической трансформации. Цирроз печени (ЦП) определяет неблагоприятный жизненный прогноз, низкую выживаемость пациентов, повышает риск формирования гепатоцеллюлярной карциномы (ГЦК) [3, 8, 16]. Длительное время фиброз считался необратимым процессом. Однако при устранении этиологического фактора (воздержание от приема алкоголя, успешная противовирусная терапия, кровопускания при гемохроматозе, прием урсодезоксихолевой кислоты при первичном билиарном циррозе) удается добиться обратного развития фиброза или уменьшить выраженность клинических проявлений ЦП. Степень выраженности фиброза, его стадия – достоверный индикатор прогрессирования заболевания [2, 31] и одна из базовых характеристик, влияющих на исход терапии [1, 9]. Пациенты с выраженным фиброзом входят в группу высокого риска развития ЦП и рака печени [7, 10, 12].

Таким образом, раннее выявление и установление стадии фиброза позволяет своевременно начать терапию, направленную на уменьшение темпов его прогрессирования, и, следовательно, провести своевременную профилактику ЦП и ГЦК [6].

Биопсия остается «золотым стандартом» в диагностике хронических заболеваний печени, позволяет судить об этиологии хронического гепатита, определить степень его активности, установить стадию фиброза/наличие ЦП, выявить ГЦК, прогнозировать течение заболевания и контролировать эффективность лечения, получить данные о состоянии трансплантата печени и т.д. [4, 13]. Однако инвазивный характер процедуры, потенциальный риск развития осложнений, необходимость госпитализации, нехватка квалифицированных морфологов, способных объективно описать и оценить

морфологические признаки, отсроченность результата ограничивают внедрение биопсии печени в более широкую клиническую практику [11, 17, 18, 20, 40, 35, 50], что послужило основанием для разработки неинвазивных методик. Преимущество современных методов неинвазивной диагностики заболеваний печени – их безопасность, быстрота и удобство, информативность, воспроизводимость, относительная дешевизна, возможность применения как скрининг-методов для групп риска [22, 54].

Существуют следующие методы неинвазивной оценки фиброза печени: лабораторные – определение наличия в сыворотке крови маркеров фиброза; инструментальные – непрямая ультразвуковая эластометрия, УЗИ в В-режиме, доплеровское исследование сосудов печени, магнитно-резонансная эластография и т.д. К истинным, или «прямым», маркерам фиброза относятся компоненты экстрацеллюлярного матрикса, определяемые в сыворотке крови: трансформирующий фактор роста; коллаген I, III, IV типов; аминотерминальный пропептид III проколлаген; гиалуроновая кислота; матричные металлопротеиназы; тканевые ингибиторы матричных металлопротеиназ. Применение истинных маркеров ограничено, поскольку они неспецифичны для печеночной ткани, отражают процессы в других органах и системах, при наличии активного воспалительного процесса в печени могут давать ложноположительный результат. Непрямые (косвенные), или суррогатные маркеры фиброза достаточно просто определить в рутинной клинической практике. К ним относятся количество тромбоцитов, протромбиновое время, соотношение аспартатаминотрансферазы (АСТ), аланинаминотрансферазы (АЛТ) и др. В качестве одиночных тестов для диагностики ЦП пригодны как истинные, так и суррогатные маркеры [32]. С целью повышения информативности был предложен ряд панелей, сочетающих прямые и непрямые показатели (табл. 1). Их дискриминантные функции позволяют косвенно судить о стадии фиброза [22, 26, 41].

Наиболее изученными и широко используемыми при большинстве хронических заболеваний печени (HCV-, HBV-инфекции, ко-инфекция с ВИЧ, алкогольным и неалкогольным стеатогепатитом) являются Fibrotest® и тест APRI. Fibrotest® демонстрирует отличные результаты при определении всех стадий фиброза с максимальной диагностической точностью на стадиях F3–F4 [42]. По его результатам можно прогнозировать осложнения и смертельные исходы у пациен-

тов с хроническими вирусными гепатитами [39]. Ограничивают тестирование следующие состояния: острые гепатиты (острый вирусный гепатит, лекарственный гепатит); внепеченочный холестаз (рак желудка/желудочной железы, холедохолитиаз); гемолитическая анемия (протез сердечного клапана, лечение рибавирином); доброкачественная неконъюгированная гипербилирубинемия; острое воспаление [15, 43, 44]. Тест APRI наиболее информативен для выявления цирротической трансформации [48]. Имея не столь высокую чувствительность и специфичность, он все же достаточно активно применяется в связи с экономичностью и доступностью определяемых параметров. К этой же категории незапатентованных сывороточных панелей можно отнести FIB-4, Fibroindex, GUCI и Forns Index [22].

Теоретической предпосылкой к разработке непрямой ультразвуковой эластометрии послужили метод пальпации, а также закон Гука, определяющий реакцию материала на сжатие. Основная рабочая часть аппарата представлена преобразовательным датчиком, который генерирует ультразвуковые волны средней амплитуды и низкой частоты. Датчик отслеживает распространение волн в подлежащую ткань органа и оценивает их скорость [45, 46]. Эластичность (плотность) печени – точный физический параметр, выраженный в килопаскалях (кПа): чем выраженнее фиброз, тем менее эластична печень. Измерения производятся минимум в 10 точках, что увеличивает возможность оценки более значительной области. Суммарный объем подвергающейся исследованию печеночной ткани – в среднем 6 см³ (1/500 объема печени), что многократно превышает таковой при пункционной биопсии (1/50 000 объема печени). Во время исследования пациент лежит на спине, правая рука – за головой; измерения проводятся в межреберном промежутке в области правой доли печени. Никаких неприятных ощущений исследование не вызывает. Длительность обследования не менее 10 мин. Специальной подготовки и госпитализации пациента не требуется.

Данный метод апробирован у пациентов с хроническими HCV-, HBV-инфекциями, жировой и алкогольной болезнями, холестатическими заболеваниями печени [24, 51, 52, 54]. Показатели непрямой эластометрии информативны на всех стадиях фиброза, но наиболее точно позволяют диагностировать выраженный фиброз и ЦП (чувствительность и специфичность достигает 90%) [30]. У больных ЦП установлена связь между значениями эластичности и клинически важными параметрами. Наличие варикозных вен пищевода II–III степени ассоциируется с плотностью

>27,5 кПа, присутствие в анамнезе асцита – >49 кПа, кровотечений – >63 кПа [27]. Плотность печени коррелирует с риском развития ГЦК [36], что важно в наблюдении пациентов с тяжелым фиброзом печени. В связи с отсутствием общепринятых пороговых значений этот метод обладает меньшей чувствительностью в отношении разграничения минимального фиброза (F0) и отдельных его стадий [5, 28].

Кроме фиброза, на эластичность печени могут оказывать влияние и другие факторы, в частности этиология заболеваний. Так, при хронических

Панели сывороточных маркеров фиброза

Таблица 1

Fibrotest®	α_2 -Акроглобулин, ГГТП, аполипопротеин A ₁ , гаптоглобин, общий билирубин, возраст, пол
Hepascore®	Билирубин, ГГТП, α_2 -акроглобулин, гиалуроновая кислота, возраст, пол
Fibrometers®	Количество тромбоцитов, протромбиновый индекс, АСТ, α_2 -акроглобулин, гиалуроновая кислота, мочевины, возраст
Отношение АСТ к тромбоцитам (APRI)	АСТ, количество тромбоцитов
Goteborg University Cirrhosis Index (GUCI)	АСТ, МНО, количество тромбоцитов
Forns Index	Возраст, тромбоциты, холестерин, ГГТП
Fibroindex	Количество тромбоцитов, АСТ, γ -глобулин
FIB-4	Количество тромбоцитов, АСТ, АЛТ
Примечание. ГГТП – гамма-глутамилтранспептидаза; МНО – международное нормализованное отношение.	

холестатических заболеваниях печени каждой стадии фиброза свойственны более высокие пороговые значения, чем, например, при хроническом гепатите С [33]. При острых вирусных гепатитах с обширными некровоспалительными изменениями отмечается повышение плотности печени. Показатели плотности увеличиваются по мере повышения гистологической активности печеночного процесса [29]. Внепеченочный холестаз приводит к значительному уменьшению эластичности, что может интерпретироваться как ЦП [37]. К переоценке плотности печени приводят венозная застой, декомпенсация сердечной недостаточности [25, 38], а также прием пищи непосредственно перед процедурой [14].

Таким образом, для интерпретации результатов непрямой ультразвуковой эластометрии необходимо иметь информацию об этиологии заболевания печени, спектре сопутствующей патологии, основных лабораторных параметрах (уровень трансаминаз, показатели холестаза). Следует тщательно соблюдать рекомендации завода-изготовителя: число действительных измерений – ≥ 10 , отношение действительных измерений к общему числу измерений – $>60\%$; интерквартильный диапазон, отражающий изменчивость измерений, – $<30\%$ среднего значения эластичности [21].

Эластометрию невозможно провести у пациентов с асцитом и узкими межреберными промежутками. Использование датчика для тучных пациентов позволяет выполнить эту процедуру у лиц с индексом массы тела $>30 \text{ кг/м}^2$ [34].

Преимущества и недостатки биопсии, лабораторных маркеров и эластометрии представлены в табл. 2.

При УЗИ в В-режиме ЦП верифицируют по бугристости ее контуров, огрублению эхоструктуры, сужению внутрипеченочных сосудов и увеличению селезенки. Однако все эти показатели не позволяют отличить цирроз от продвинутого фиброза [47].

При доплеровском исследовании изменения скорости кровотока в системе воротной вены зависят от тяжести фиброза, ЦП и степени варикозного расширения вен пищевода. Наиболее информативными с точки зрения определения выраженности фиброза считаются индекс пульсации селезеночной артерии и средняя скорость кровотока по воротной вене [19, 23]. Поскольку УЗИ-оборудованием оснащены многие центры, использование этих параметров представляется заманчивым. К недостаткам можно отнести отсутствие пороговых значений; индекс пульсации селезеночной артерии невозможно измерить у больных со спленэктомией, и, безусловно, на качество измерения влияют квалификация врача и качество оборудования.

В связи с распространением магнитно-резонансных томографов весьма перспективна магнитно-резонансная эластография. В ее основе – определение и визуализация акустических волн, генерируемых передатчиком и регистрируемых в ткани печени. Показатели плотности печени отображаются в виде эластограмм. Магнитно-резонансная эластография оценивает плотность печени в целом, может определять то-

Таблица 2

Сравнительная характеристика методов изучения фиброза печени

	Биопсия	Лабораторные маркеры	Эластометрия
Преимущества	Эталонный метод	Высокая воспроизводимость результата	Определяет собственно свойства печени
		Высокая применимость	Простота в использовании
		При отсутствии патента – низкая стоимость и доступность	Высокая чувствительность при ЦП
Недостатки	Субъективизм в интерпретации результатов	Неспецифичны для печени	Требуется специальный аппарат
	Инвазивность	Требуется предварительное обследование	Ложноположительные результаты (например, при воспалении)
	Требуется госпитализация	При наличии патента – высокая стоимость и ограниченная доступность	

пографию распределения фиброзной ткани и ее процент относительно массы всего органа; она способна выявлять различия плотности печени у пациентов со стадией фиброза F0 в сравнении с таковой у здоровых добровольцев. Метод обладает высокой чувствительностью и специфичностью в диагностике фиброза [53].

Использовать неинвазивные методы необходимо у тех пациентов, у которых они применяются с высокой точностью или имеющих ограничения для биопсии печени. Интерпретация результатов должна быть критичной и соответствовать демографии пациента, основным лабораторным параметрам, рекомендациям производителя. Неинвазивные методы помогают клиницисту отобрать пациентов для биопсии. Если результаты оценки степени фиброза 2 неинвазивными методами согласуются, проведение пункционной биопсии нецелесообразно. В случае расхождения результатов применения неинвазивных методов биопсия печени необходима [49].

Выбирая метод определения фиброза, необходимо руководствоваться его эффективностью в каждом конкретном случае, а также удобством при ведении пациента с хроническими диффузными заболеваниями печени.

Литература

1. Глушенков Д.В., Павлов Ч.С., Маевская В. и др. Возможности эластометрии и фибро-теста в диагностике цирроза печени // Рос. журн. гастроэнтерол., гепатол. и колопроктол. – 2008; 18 (1): 9.
2. Жданов К.В. Новые и старые критерии прогноза эффективности комбинаций противовирусных препаратов прямого действия. «Белые ночи» гепатологии, Санкт-Петербург, 6–7 июня 2013 г., устное выступление.
3. Ивашкин В.Т. Оценка функционального состояния печени // Болезни печени и желчевыводящих путей. Под ред. В.Т. Ивашкина. 2-е изд., испр. и доп. / М.: М-Вести, 2005; с. 66–84.
4. Майер К.П. Гепатит и последствия гепатита. Практич. рук-во. Пер. с нем. / М.: ГЭОТАР-Медицина, 2004; 717 с.
5. Морозов С.В., Труфанова Ю.М., Павлова Т.В. и др. Применение эластографии для определения выраженности фиброза печени: результаты регистрационного исследования в России // Экспер. и клин. гастроэнтерол. – 2008; 2: 40–9.
6. Павлов Ч.С. Принципы диагностики и подходы к терапии фиброза и цирроза печени // Рос. мед. журн. – 2007; 9 (1): 11–5.
7. Павлов Ч.С., Ивашкин В.Т. Как оценить и уменьшить риск фиброза, цирроза и гепатоцеллюлярной карциномы у пациентов с хронической инфекцией вирусами гепатитов В и С // Рос. журн. гастроэнтерол., гепатол. и колопроктол. – 2007; 17 (5): 16–23.

8. Павлов Ч.С., Золоторевский В.Б., Томкевич М.С. и др. Возможность обратимости цирроза печени (клинические и патогенетические предпосылки) // Рос. журн. гастроэнтерол., гепатол. и колопроктол. – 2006; 16 (1): 20–9.
9. Павлов Ч.С., Золоторевский В.Б., Ивашкин В.Т. и др. Динамика показателей воспаления и фиброза печени у больных хроническим вирусным гепатитом С (ХВГ-С) на фоне комбинированной терапии (интерфероном- α + рибавирином) // Рос. журн. гастроэнтерол., гепатол. и колопроктол. – 2006; 16 (1): 45
10. Павлов Ч.С., Золоторевский В.Б., Ивашкин В.Т. и др. Современные методы ранней диагностики фиброза печени // Клин. мед. – 2005; 83 (12): 58–60.
11. Павлов Ч.С., Котович М.М. Место биопсии и морфологического исследования ткани печени у детей и взрослых в практике клинициста // Клин. мед. – 2007; 85 (9): 72–7.
12. Практическая гепатология. Пособие. Под ред. Н.А. Мухина / М., 2004; 294 с.
13. Хронический вирусный гепатит. Под ред. В.В. Серова, З.Г. Апросиной / М.: Медицина, 2002; 384 с.
14. Arena U., Lupsor Platon M., Stasi C. et al. Liver stiffness is influenced by a standardized meal in patients with chronic hepatitis C virus at different stages of fibrotic evolution // Hepatology. – 2013; 58: 65–72.
15. Afdhal N., Nunes D. Evaluation of liver fibrosis: a concise review. Am. J. Gastroenterol. – 2004; 99 (6): 1160–74.
16. Batts K., Ludwig J. Chronic hepatitis: an update on terminology and reporting // Am. J. Surg. Pathol. – 1995; 19: 1409–17.
17. Blanc F., Bioulac-Sage P., Balabaud C. et al. Investigation of liver fibrosis in clinical practice // Hepatol. Res. – 2005; 27: 1–8.
18. Brunt E., Janney C., Di Bisceglie A. et al. Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions // Am. J. Gastroenterol. – 1999; 94: 2467–74.
19. Bolongnesi M., Sacerdoti D., Merkel C. et al. Noninvasive grading of the severity of portal hypertension in cirrhosis patients by echoColor Doppler // Ultrasound Med. Bio. – 2001; 27: 901–7.
20. Cadranel J., Rufat P. Practices of liver biopsy in France: results of a prospective nationwide survey. For the Group of Epidemiology of the French Association for the Study of the Liver (AFL) // Hepatology. – 2000; 32: 477–81.
21. Castera L., Forns X., Alberti A. Non-invasive evaluation of liver fibrosis using transient elastography // J. Hepatol. – 2008; 48: 835–47.
22. Castera L., Vergniol J., Foucher J. et al. Prospective comparison of transient elastography, Fibrotest, APRI and liver biopsy for the assessment of fibrosis in chronic hepatitis C // Gastroenterology. – 2005; 128: 343–50.
23. Chen-Hua Liu, Shih-Jer Hsu, Jou-Wei Lin et al. Noninvasive Diagnosis of Hepatic Fibrosis in Patients With Chronic Hepatitis C by Splenic Doppler Impedance Index // J. Clin. Gastroenter. – 2007; 5: 1199–206.
24. Corpechot C., El Naggar A., Poujol-Robert A. et al. Assessment of biliary fibrosis by transient elastography in patients with PBC and PSC // Hepatology. – 2006; 43: 1118–24.
25. Colli A., Pozzoni P., Berzuini A. Decompensated chronic heart failure: increased liver stiffness measured by means of transient elastography // Radiology. – 2010; 257 (3): 872–8.
26. Ferard C., Piton A., Messous D. et al. Intermethod calibration of alanine aminotransferase (ALT) and gamma-glutamyltransferase (GGT) results: application to FibroTest and ActiTest scores // Clin. Chem. Lab. Med. – 2006; 44: 400–6.
27. Foucher J., Chanteloup E., Vergniol J. et al., Diagnosis of cirrhosis by transient elastography (FibroScan): a prospective study // Gut. – 2006; 55: 403–8.
28. Friedrich-Rust M., Ong M., Martens S. et al. Performance of transient elastography for the staging of liver fibrosis: A meta-analysis // Gastroenterology. – 2008; 134: 960–74.
29. Fraquelli M., Rigamonti C., Casazza G. et al. Reproducibility of transient elastography in the evaluation of liver fibrosis in patients with chronic liver disease // Gut. – 2007; 56: 968–73.
30. Ganne-Carrie N., Zioli M., de Ledinghen V. et al. Accuracy of liver stiffness measurement for the diagnosis of cirrhosis in patients with chronic liver diseases // Hepatology. – 2006; 44: 1511–7.
31. Ghany M., Doo E. Assessment of liver fibrosis: palpate, poke or pulse? // Hepatology. – 2005; 42 (4): 759–61.
32. Lackner C., Struber G., Liegl B. et al. Comparison and validation of simple noninvasive tests for prediction of fibrosis in chronic hepatitis C // Hepatology. – 2005; 41: 1376–82.
33. Ledinghen V., Vergniol J. Transient elastography (FibroScan) // Gastroenterol. Clin. Bio. – 2008; 32: 58–67.
34. Ledinghen V., Fournier C., Miette V. et al. New FibroScan probe for obese patients: A pilot study of feasibility and performances in patients with BMI \geq 30 kg/m² // J. Hepatol. – 2009; 50 (Suppl. 1): 359.
35. Marcellin P., Zioli M., Bedossa P. et al. Noninvasive assessment of liver biopsy by stiffness measurement in patient with chronic hepatitis B // Liver Int. – 2009; 29: 242–7.
36. Masuzaki R., Tateishi R., Yoshida H. et al. Prospective risk assessment for hepatocellular carcinoma development in patients with chronic hepatitis C by transient elastography // Hepatology. – 2009; 49: 1954–61.
37. Millonig G., Reimann F., Friedrich S. et al. Extrahepatic cholestasis increases liver stiffness (FibroScan) irrespective of fibrosis // Hepatology. – 2008; 48: 1718–23.
38. Millonig G., Friedrich S., Adolf S. et al. Liver stiffness is directly influenced by central venous pressure // J. Hepatol. – 2010; 52: 206–10.
39. Ngo Y., Benhamou Y., Munteanu M. et al. FibroTest and ActiTest accurately predict risk of liver decompensation and death in patients with chronic hepatitis B (CHB) // Hepatology. – 2007; 46: 637A.
40. Poinard T., Ratzu V., Bedossa P. Appropriateness of liver biopsy // Can. J. Gastroenterol. – 2000; 14 (6): 543–8.
41. Poinard T., Imbert-Bismut F., Ratzu V. et al. Biochemical markers of liver fibrosis in patients infected by hepatitis C virus: longitudinal validation in a randomized trial // J. Viral. Hep. – 2002; 9: 128–33.
42. Poinard T., Morra R., Halfon P. et al. Meta-analyses of Fibrotest diagnostic value in chronic liver disease // BMC Gastroenterol. – 2007; 7: 40.
43. Poinard T., Munteanu M., Imbert-Bismut F. et al. Prospective analysis of discordant results between biochemical markers and biopsy in patients with chronic hepatitis C // Clin. Chem. – 2004; 10: 10.
44. Pinzani M. Non-invasive evaluation of hepatic fibrosis: don't count your chickens before they're hatched // Gut. – 2006; 55: 310–2.
45. Sandrin L., Tanter M., Gennisson J. et al. Shear elasticity probe for soft tissues with 1D transient elastography // Ultrason Ferroelectr. Freq. Control. – 2002; 49: 436–46.
46. Sandrin L., Fourquet B., Hasquenoph J. et al. Transient elastography: a new non-invasive method for assessment of hepatic fibrosis // Ultrasound Med. Biol. – 2003; 29: 1705–13.
47. Sandford N., Walsh P., Matis C. et al. Is ultrasonography useful in the liver assessment of diffuse parenchymal liver disease? // Gastroenterology. – 1985; 89: 186–91.
48. Shaheen A., Myers R. Diagnostic accuracy of the aspartate aminotransferase-to-platelet ratio index for the prediction of hepatitis C-related fibrosis: a systematic review // Hepatology. – 2007; 46: 912–21.
49. Sebastiani G. et al. SAFE biopsy: a validated method for large-scale staging of liver fibrosis in chronic hepatitis C // Hepatology. – 2009; 49: 1821.
50. Tobkes A., Nord H. Liver biopsy: review of methodology and complication // Digestion. – 1995; 13: 267.
51. Wong G., Wong V., Choi P. et al. Clinical factors associated with liver stiffness in hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B patients // Clin. Gastroenterol. Hepatol. – 2009; 7: 227–33.
52. Wong V., Vergniol J., Wong G. et al. Diagnosis of fibrosis and cirrhosis using liver stiffness measurement in nonalcoholic fatty liver disease // Hepatology. – 2009; 51: 454–62.
53. Yin M., Talwalkar J., Glaser K. et al. Assessment of hepatic fibrosis with magnetic resonance elastography // Clin. Gastroenterol. Hepatol. – 2007; 5 (10): 1207–13.
54. Zioli M., Hadravsky A., Kettaneh A. et al. Non-invasive assessment of liver fibrosis by stiffness measurement: a prospective multicentre study in patients with chronic hepatitis C // Hepatology. – 2005; 41 (1): 48–54.

NONINVASIVE METHODS FOR THE DIAGNOSIS OF LIVER FIBROSIS AND THEIR USE IN CLINICAL PRACTICE

A. Balashova¹; V. Romanova¹; O. Arisheva¹, Candidate of Medical Sciences; **I. Garmash¹**, Candidate of Medical Sciences; **N. Terebilina²**, Candidate of Medical Sciences; **Professor Zh. Kobalava¹**, MD; **Professor V. Moiseev¹**, MD
¹Peoples' Friendship University of Russia, Moscow
²National Narcology Research Center, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow

The paper discusses the advantages and disadvantages of different methods for the diagnosis of fibrosis and promises for their rational clinical application.

Key words: liver fibrosis, elastometry, biochemical markers of fibrosis.