

بررسی اثرات پیراستام در اختلالات تثبیت حافظه ناشی از قرارگیری در معرض میدان مغناطیسی

شیرین ببری^۱، ناصر خلجی^۲

^۱ نویسنده مسئول: استادیار گروه فیزیولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز E-mail: shirinb46@yahoo.com

^۲ کارشناس ارشد فیزیولوژی

چکیده

زمینه و هدف: پیراستام از ترکیبات محرک مغزی است که عملکرد سیستم عصبی را تقویت می کند. تشکیل حافظه ترکیبی از روندهای مختلف است که عوامل متفاوتی قادر به اختلال در آن هستند. با توجه به افزایش احتمال قرارگیری در معرض میدانهای مغناطیسی در سالهای اخیر و اثرات مطرح این میدانها بر روند تثبیت حافظه مذکور طرح ریزی گردید تا نقش این دو عامل در ارتباط با حافظه مشخص شود.

روش کار: در این مطالعه یازده گروه ده تایی از موش های سفید صحرایی نر، نژاد ویستار با متوسط وزنی 25 ± 275 گرم و سن ۳-۴ ماه انتخاب گردید. گروه کنترل توسط روش اجتناب غیر فعال آموزش دیده، و ۲۴ ساعت بعد آزمون شدند. چهار گروه از موش ها جهت بررسی اثرات میدان مغناطیسی بلافاصله پس از آموزش به ترتیب برای مدت ۸، ۱۶، ۲۴ و ۴۸ ساعت در معرض میدان مغناطیسی با شدت ۵ میلی تسلا و ۵۰ هرتز قرار گرفتند. شش گروه دیگر یک ساعت قبل از آموزش، پیراستام با دوز ۲۵۰ میلی گرم بر کیلو گرم و ۵۰۰ میلی گرم بر کیلو گرم به فرم خوراکی دریافت نموده و بلافاصله پس از آموزش برای مدت ۸، ۱۶، ۲۴ ساعت در معرض میدان مغناطیسی قرار گرفتند. آزمون فراخوانی در تمام گروهها ۲۴ ساعت بعد از آموزش صورت گرفت.

یافته ها: قرارگیری موش ها در معرض میدان مغناطیسی برای مدت یکساعت اثر معنی داری بر تثبیت حافظه نداشت در حالیکه اعمال میدان مغناطیسی در سه گروه دیگر در مقایسه با گروه کنترل به طور معنی دار تثبیت حافظه را مختل نمود ($p < 0.05$). تجویز پیراستام با دو دوز ذکر شده در گروههای فوق اثر معنی داری در بهبود تثبیت حافظه نداشت ($p < 0.05$).

نتیجه گیری: قرارگیری در معرض میدان مغناطیسی با شدت کم به صورت حاد قادر به جلوگیری از تثبیت حافظه است و استفاده از پیراستام از بروز اختلالات ناشی از میدان مغناطیسی بر تثبیت حافظه جلوگیری می کند.

واژه های کلیدی: تثبیت حافظه، فراخوانی، یادگیری، میدان الکترومغناطیسی، پیراستام

پذیرش: ۸۵/۷/۱۷

دریافت: ۸۴/۸/۲۸

مقدمه

وسایل و تجهیزات الکتریکی قادر به تولید میدانهای الکترو مغناطیسی هستند، این میدانها به عنوان خطوط نیروی غیر قابل رویت که وسیله الکتریکی را احاطه می کنند تعریف شده اند [۱]. با توجه به گستردگی استفاده از لوازم برقی در کشورهای صنعتی در سال های اخیر، احتمال تاثیر این میدان ها بر سیستمهای بیولوژیک، از جمله سیستم عصبی مرکزی مورد توجه

قرار گرفته است. در مطالعات اپیدمیولوژیک عوارض جانبی مربوط به میدان های الکترومغناطیسی بیشتر در زمینه تومورهای مغزی، سرطان پستان و لوسمی بوده است [۲، ۳، ۴]. اما مطالعات تجربی جدید بیشتر در جهت ارزیابی این اثرات بر EEG [۵]، اعمال شناختی [۶]، آزادسازی نوروترانسمیترها [۷]، نفوذ پذیری سد خونی- مغزی و نفوذپذیری عروق متمرکز شده است [۸].

روش کار

جهت انجام آزمایشات از موشهای سفید صحرایی نر نژاد ویستار با متوسط وزنی 25 ± 275 g و سن ۳ الی ۴ ماه استفاده شد. موشها به طور تصادفی در گروه های ده تایی مورد آزمایش قرار گرفتند. در طول انجام آزمایشات موش ها در قفس های پنج تایی نگهداری شده و دسترسی آزادانه به آب و غذا داشتند. دمای حیوان خانه $22 \pm 1^\circ\text{C}$ بوده و سیکل نور و تاریکی ۱۲ ساعت در آن رعایت گردید.

برای آموزش موش ها از دستگاه آموزش اجتنابی غیر فعال^۱ استفاده گردید. محفظه این دستگاه از دو اتاقک مجزا تشکیل شده است که توسط یک در گیوتینی به ابعاد 8×8 cm از هم جدا می شوند، داخل درب یک گیرنده مادون قرمز تعبیه شده است که عبور موش از حد فاصل در را به سیستم اطلاع داده و سبب قطع زمان سنج عبور می گردد. کف هر کدام از این دو اتاقک میله هایی به قطر ۳ میلی متر با فاصله ۱ سانتی متر از هم قرار گرفته اند. ابعاد هر اتاقک $20 \times 21 \times 30$ سانتی متر بوده و بالای آن یک لامپ ۱۲ ولت، ۱۰ وات وجود دارد.

موش ها یک ساعت قبل از آموزش در محفظه روشن قرار داده شده و ۱۰ ثانیه بعد، درب بین دو اتاقک محفظه باز می شد. بلافاصله بعد از ورود حیوان به محفظه تاریک درب بسته شده و حیوان از محفظه تاریک خارج شده و به قفس برگردانده شد. این عمل ۳۰ دقیقه بعد تکرار گشت. بعد از سازش بار دوم، آموزش اجتنابی غیر فعال صورت گرفت، به این ترتیب که این بار بعد از قرار گیری موش در محفظه روشن در بین دو قسمت محفظه باز شده و بلافاصله بعد از ورود موش به قسمت تاریک، درب بین دو قسمت بسته شده و شوک الکتریکی با فرکانس ۵۰ هرتز و شدت $0/65$ میلی آمپر برای مدت ۵ ثانیه اعمال گردید. بعد از ۱۰ ثانیه موش از قسمت تاریک گرفته شده و به قفس برگردانده شد. جهت اطمینان از اکتساب آموزش اجتنابی غیر فعال دو دقیقه پس از

نتایج حاصل از مطالعات انجام گرفته در رابطه با تاثیرات میدان های الکترومغناطیسی بر روی حافظه تا حدودی متناقض بوده و نیاز به بررسی بیشتر در این مورد وجود دارد. بر اساس یک گزارش قرار گیری موشهای صحرایی^۱ در معرض میدان مغناطیسی باعث بروز فراموشی قبلی^۲ در یادگیری اجتنابی غیر فعال شده است [۹] در حالیکه گزارش دیگری مبنی بر عدم تاثیر میدان های الکترومغناطیسی در حافظه وجود دارد [۱۰].

چنین به نظر می رسد که در مطالعات مختلف صورت گرفته در این زمینه احتمالاً شدت میدان مغناطیسی و مدت زمان قرار گیری در معرض میدان منجر به نتایج مختلف گردیده است و انجام تحقیقات بیشتر در این زمینه جهت تعریف معیارهای خاص لازم است.

نزدیک به سه دهه از کشف ترکیبات محرک مغزی شامل پیراستام می گذرد. این داروها جهت افزایش توانایی های سیستم عصبی در روندهای شناختی و حافظه و بیماری های مختلفی از جمله الکلیسم، سکت، سرگیجه، دیسلکسی و مشکلات مشابه مورد استفاده قرار می گیرند [۱۱].

پیراستام از مشتقات گابا است، امادلایی مبنی بر تاثیر این دارو از طریق سیستم کلینرژیک وجود ندارد و بر اساس برخی شواهد گابا قادر به مهار یادگیری و حافظه است. بر اساس برخی تحقیقات تجویز پیراستام قبل از آموزش اجتنابی غیر فعال از فراموشی ناشی از عواملی از قبیل دی اکسید کربن، نیتروژن، شوک الکتریکی [۱۲] و ترکیبات فارماکولوژیکی نظیر اسکوپولامین جلوگیری می نماید [۱۳].

مطالعه بر این اساس طرح ریزی گردید تا مشخص گردد آیا پیراستام قادر به تاثیر بر تثبیت حافظه در موشهای صحرایی که در معرض میدان مغناطیسی قرار گرفته اند می باشد.

¹ Rat

² Retrograde Amnesia

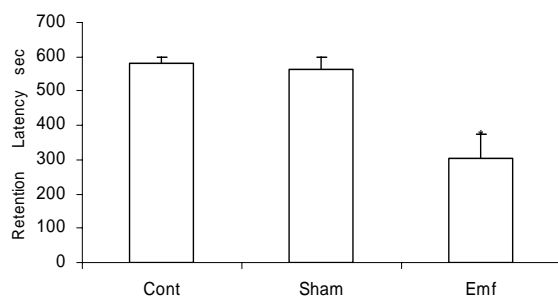
¹ Shuttle Box

بررسی آماری نتایج بدست آمده با استفاده از برنامه آماری SPSS صورت گرفت. مقایسه گروههای آزمایشی مختلف با هم توسط روش آماری آنالیز واریانس یکطرفه انجام شد و در مواردی که اختلاف معنی‌دار وجود داشت از روش Tukey برای روشن شدن اختلاف بین گروههای دوتایی استفاده گردید. رسم نمودارها با استفاده از برنامه EXCEL انجام شد.

یافته ها

نتایج بدست آمده در مورد تاثیر میدان مغناطیسی بر تثبیت حافظه در موشهایی که بلافاصله بعد از آموزش در معرض میدان مغناطیسی قرار گرفتند بیانگر این است که تغییر مدت زمان قرارگیری در معرض میدان با شدت ثابت از عوامل موثر در بروز فراموشی است. مقایسه زمان تاخیر در موشهایی که بلافاصله بعد از آموزش برای مدت ۱ ساعت در معرض میدان مغناطیسی قرار گرفتند (به ترتیب با میانگین زمانی 17 ± 583 ثانیه و 76 ± 885 ثانیه) با گروه کنترل تفاوت معنی‌داری نداشت.

به این ترتیب میدان مغناطیسی با فرکانس ۵۰ هرتز در شدت ۵ میلی تسلا در مدت زمان یک ساعت اختلالی در تثبیت حافظه بوجود نیاورد. مقایسه میانگین زمان تاخیر برای موش های که مدت ۴ ساعت (17 ± 303 ثانیه) در معرض میدان مغناطیسی قرار گرفتند با گروه کنترل و نیز گروه شم حاکی از کاهش معنی‌دار ($p < 0.05$) زمان تاخیر در پاسخهای مربوط به موش های این گروه است (شکل ۱).



شکل ۱- مقایسه زمان تاخیر بین گروه کنترل، گروه شم و گروهی که بلافاصله بعد از آموزش برای مدت ۴ ساعت در معرض میدان مغناطیسی قرارگرفتند. مقادیر بر حسب Mean ± SEM است. $P < 0.05$ معنی دار در نظر گرفته شده است.

آموزش بار اول آموزش رفتارموش همانند قبل آزمایش می‌شد. عدم ورود به قسمت تاریک در مدت ۱۲۰ ثانیه یادگیری مثبت در نظر گرفته می‌شد، در غیر این صورت حیوان تا یادگیری کامل شوک مجدد دریافت می‌نمود. آزمون به خاطر آوری ۲۴ ساعت پس از آموزش انجام گرفت. موش مورد آزمایش در اتاقک روشن قرار گرفته و ۵ ثانیه بعد در بین دو اتاقک قرار داده می‌شد. زمانی که طول می‌کشید تا حیوان وارد قسمت تاریک شود، به عنوان زمان تاخیر^۱ یادداشت می‌گردید. موشی که در مدت ۶۰۰ ثانیه وارد بخش تاریک نمی‌شد زمان تاخیر معادل ۶۰۰ ثانیه داشت.

دستگاه مولد میدان مغناطیسی مورد استفاده براساس تئوری پیچه هلمهوتز^۳ ساخته شده است. شدت میدان مغناطیسی که موش ها در معرض آن قرار گرفتند، معادل ۵ میلی تسلا فرکانس آن ۵۰ هرتز بود (شدت مورد استفاده موجب ایجاد میدان مغناطیسی ضعیف می‌شود). گروه های آزمایشی به ترتیب عبارت بودند از:

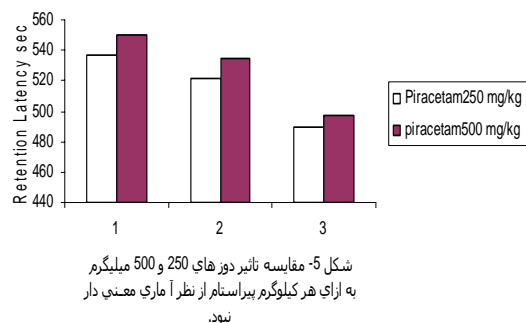
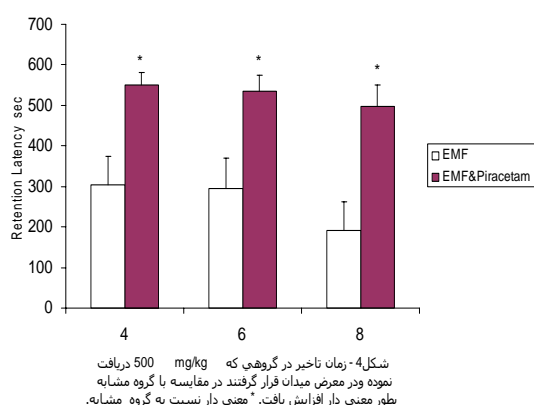
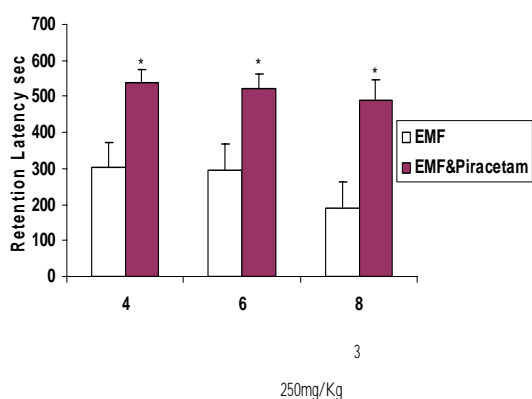
الف- گروه کنترل که فقط آموزش دیده و ۲۴ ساعت پس از آموزش تست گردید.

ب- موشهای گروه شم که بلافاصله پس از آموزش برای مدت ۴ ساعت در داخل میدان مغناطیسی خاموش قرار گرفتند.

ج- چهار گروه ده تایی از موش ها نیز بلافاصله بعد از آموزش به ترتیب برای مدت ۱، ۴، ۶ و ۸ ساعت در معرض میدان مغناطیسی قرار گرفته و ۲۴ ساعت بعد تست شدند.

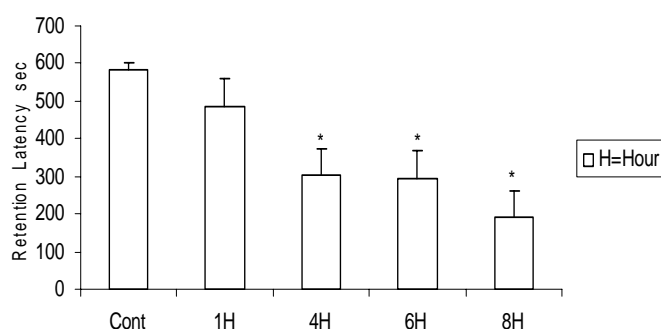
د- پیراستام با دو دوز ۲۵۰ mg/kg و ۵۰۰ mg/kg از طریق خوراکی بلافاصله بعد از آموزش به موشهایی که برای مدت ۴، ۶ و ۸ ساعت در معرض میدان مغناطیسی قرار گرفته بودند تجویز شد. این گروه ها ۲۴ ساعت بعد از آموزش آزمون فراخوانی شدند.

^۱ Retention Latency



به این ترتیب افزایش مدت زمان قرار گیری در میدان مغناطیسی از یک ساعت به ۴ ساعت منجر به بروز فراموشی گردید.

افزایش زمان قرار گیری در میدان از ۴ ساعت به ۶ ساعت زمان تاخیر را تا حدودی کاهش داد این کاهش درمقایسه با گروه کنترل معنی دار بود ($p < 0.01$). اما کاهش ایجاد شده مابین این دو گروه معنی دار نبود. گروه بعدی که برای مدت ۸ ساعت بلافاصله بعد از آموزش در معرض میدان مغناطیسی بودند در مقایسه با گروه کنترل کاهش قابل توجهی ($p < 0.01$) در زمان تاخیر نشان دادند (شکل ۲).



شکل ۲- مقایسه زمان تاخیر بین گروه کنترل و گروههایی که بلافاصله بعد از آموزش برای زمانهای متفاوت در معرض میدان مغناطیسی قرار گرفتند. مقادیر بر حسب Mean \pm SEM است. * معنی دار نسبت به کنترل.

نتایج بدست آمده در موش های که یک ساعت قبل از آموزش پیراستام با دوز ۲۵۰ mg/kg و یا ۵۰۰ mg/kg از طریق خوراکی دریافت نموده و به ترتیب برای مدت ۴، ۶ و ۸ ساعت در معرض میدان مغناطیسی قرار گرفتند حاکی از افزایش معنی دار در زمان تاخیر در مقایسه با گروه هایی بود که تحت همین شرایط پیراستام دریافت نمودند (شکل ۳ و ۴). استفاده از دو دوز مختلف پیراستام در گروههای آزمایشی تفاوت معنی داری در زمان تاخیر ایجاد نمود (شکل ۵).

بحث

شواهد بدست آمده از آزمایشات مختلف حاکی از تاثیر میدان مغناطیسی بر روندهای بیولوژیک بدن موجودات زنده است [۶]. گزارش شده است که میدانهای مغناطیسی با فرکانس پایین، به خصوص میدانهای مغناطیسی ناشی از فرکانسهای صنعتی ۵۰ و ۶۰ هرتز قادر به اعمال نفوذ در عملکرد سیستم عصبی مرکزی می باشند، آنها احساسات خاصی بوجود آورده، آستانه حساسیت به محرکهای حسی را کاهش می دهند، فعالیت الکتریکی مغز را تغییر داده، روند اکتساب

نوروترانسسمیترهایی نظیر سروتونین و متابولیت آن و نیز دوپامین و متابولیت‌های آن گزارش نمودند. قرار گیری مزمن در معرض میدان مغناطیسی برای مدت ۷ روز متابولیسم سروتونین را تحت تأثیر قرار می‌دهد. [۷]

میدان مغناطیسی در فعالیت الکتریکی مغز نیز تداخل می‌نماید. نتایج مطالعه آرونسون^۲ و همکارانش در سال ۲۰۰۰ تایید کننده این مطلب است [۱۷]. دوزل^۳ نیز در سال ۲۰۰۰ اثر میدان مغناطیسی بر فعالیت الکتریکی مغز را تایید نمود [۸]. پس احتمالاً یکی دیگر از مکانیسم‌هایی که میدان مغناطیسی از طریق آن بر حافظه تأثیر می‌گذارد توسط تغییر فعالیت الکتریکی سلول‌های سیستم عصبی مرکزی است. البته در این زمینه تحقیقات بیشتری جهت روشن شدن نکات مبهم مورد نیاز است. استفاده از پیراستام در این تحقیق از بروز عوارض ناشی از میدان مغناطیسی جلوگیری نمود. اما هنوز این سوال باقی است که پیراستام از طریق کدام سیستم نوروترانسسمیتری و با چه مکانیسمی اثرات خود را اعمال نموده و از بروز آثار مربوط به میدان مغناطیسی جلوگیری می‌کند.

نتیجه گیری

با توجه به نتایج حاصل از این مطالعه میدان مغناطیسی با ویژگی‌های ذکر گردیده در این آزمایش قادر است بر روندهای سیستم عصبی مرکزی تأثیر گذارده و تثبیت حافظه را دچار اختلال نماید. مدت زمان قرارگیری در معرض میدان با اختلال به وجود آمده ارتباط مستقیم دارد. احتمالاً میدان مغناطیسی با شدت فوق سبب تغییر در میزان نوروترانسسمیترهای سیستم عصبی مرکزی شده و یا بر فعالیت بیوالکتریکی مغز اثر می‌کند.

پیراستام قادر به جلوگیری از عوارض فوق است، اما مکانیسم سلولی و مولکولی عملکرد آن مشخص نبوده و نیاز به تحقیق بیشتر در این زمینه می‌باشد. با توجه به

مهارتها و ذخیره اطلاعات و فراخوانی آن را دچار اختلال می‌نمایند [۱۴].

نتایج بدست آمده از این تحقیق بیانگر این است که میدان مغناطیسی با فرکانس ۵۰ هرتز و شدت ۵ میلی تسلا در مدت یکساعت تأثیری بر روند تثبیت حافظه نداشته است در حالیکه قرارگیری در همین میدان برای مدت ۴ ساعت و یا بیشتر از آن از تثبیت حافظه جلوگیری نموده و منجر به بروز فراموشی گردید. براساس یک گزارش قرارگیری داوطلبین جوان مونث و مذکر برای مدت ۱ ساعت در معرض میدان مغناطیسی خیلی ضعیف با فرکانس ۵۰ هرتز و شدت ۱ میلی تسلا توام با SPL 45dB^۱ موجب کاهش فوری در کارایی شناختی در تمرکز، درک و کارایی حافظه گردید [۱۵].

این نتیجه با یافته‌های به دست آمده از این تحقیق مغایر است چون در این مطالعه که بر روی رت‌ها انجام گردیده میدان مغناطیسی در طی یک ساعت تأثیری بر تثبیت حافظه نداشت. در تحقیق دیگری که اثر میدانهای مغناطیسی با شدت ۷/۵ میکروتسلا و ۷/۵ میلی تسلا بلافاصله قبل از تست حیوان مورد بررسی قرار گرفته بود (با مدت زمان قرارگیری ۴۵ دقیقه در میدان مغناطیسی) نتایج بدست آمده نشان داد که در مجموع تأثیر معنی داری بر دقت انتخاب ایجاد نگردید [۱۶].

این گزارش در راستای نتایج بدست آمده از مطالعه حاضر می‌باشد. براساس نتایج بدست آمده از این تحقیق افزایش مدت زمان قرارگیری در میدان مغناطیسی ۵۰ هرتز و ۵ میلی تسلا منجر به اختلال در تثبیت حافظه گردید. مکانیسم تداخل امواج میدان مغناطیسی با روندهای مربوط به تثبیت حافظه کاملاً مشخص نیست اما برخی از تحقیقات انجام یافته حاکی از این است که این میدانها بر میزان نوروترانسسمیترها در نواحی مختلف سیستم عصبی مرکزی موثرند. کابوتو^۱ و همکارانش با اندازه‌گیری میزان

^۲ Aronsson

^۳ Duzel

^۱ Sound Pressure Level

^۱ Kabuto

تشکر و قدر دانی

بدینوسیله از مرکز تحقیقات کاربردی دارویی دانشگاه علوم پزشکی تبریز که هزینه این طرح را تقبل نموده وامکانات لازم برای آزمایشات را فراهم نموده اند تشکر و قدر دانی می گردد. همچنین از زحمات جناب آقای علی نقی نژاد در طی انجام طرح سپاسگزاری می شود.

اینکه احتمال قرارگیری در معرض این گونه میدان ها برای تمام افراد بشری وجود دارد، مطالعات بیشتر در مورد مکانیسم سلولی و مولکولی اثرات ذکر شده جهت دستیابی به راهکارهای مطلوب در راستای جلوگیری از عوارض ناخواسته ضروری به نظر می رسد.

منابع

- ۱- نجم آبادی فریدون. فیزیک تشعشع و رادیولوژی. چاپ دوم. تهران: انتشار دفتر مرکزی جهاد دانشگاهی، سال ۱۳۶۹، صفحات ۴۳-۴۰.
- 2- Hang FT. Magnetic field effects on biomolecules, cells, and living organisms. *Biosystems*. 1995;36: 187-229.
- 3- Moulder JE. Static electric and magnetic fields and human health. *Crit Rev Biomed Engineering*. 1998; 26: 1-116.
- 4- Preece AW, Hand JW, Clarke RN, Stewart A. Power frequency electromagnetic fields and health-where's the evidence? *Phys Med Biol*. 2000 Sep; 45(9): R 139-54.
- 5- Eulitz C, Sperger P, Freude G. Mobile phones modulate response patterns of human brain activity. *Neuroreport*. 1998 Oct 5; 9(14): 3229-32.
- 6- Nikolskaya kA, Shtemler VM, Savonenko AV. Weak magnetic fields and cognitive activity. *Biofizica*. 1996 Jul-Aug; 41(4): 897-903.
- 7- kabuto H, Yokoi I, Mori A, Ogawa N. Effects of an in vivo 60 Hz magnetic field on monoamine levels in mouse brain. *Pathophysiology*. 2000 Jul; 7(2): 115-19.
- 8- Duzel E. When, where, what: the electromagnetic contribution to the WWW of brain activity during recognition. *Acta Psychol (AMST)*. 2000 Dec; 105(2-3): 195-210.
- 9- krylova IN, Dukhanin AS, II'in AB, Kuznetsova ELU, Balaeva NV, Shi manovski NL and et al. The effect of ultrahigh-frequency electromagnetic radiation on learning and memory process. *Biull Eksp Biol Med*. 1992Nov; 114(11):483-4.
- 10- Sienkiwicz ZJ, Bartram R, Haylock RG, Saunders RD. Single, brief exposure to a 50 Hz magnetic field does not affect the performance of object recognition task in adult mouse. *Bioelectromagnetics*. 2001 Jan; 22(1): 19-26.
- 11- Winblad B. Piracetam: A review of pharmacological properties and clinical uses. *CNS Drug Rev*. 2005 summer; 11(2):169-82.
- 12- Christoffersen GRJ, Roloff E, Nielsen ks. Effects of piracetam on the performance of rats in delayed match- to Position task. *Prog Neuro Psychopharmacol Biol Psychiatry* 1998 Jan; 22(1): 211-28.
- 13- Ghelardini C, Galeotti N, Gualtieri F, Romanell MN. DM 235(sunofiram): a novel nootropic with potential as a cognitive enhancer. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2002 Jan; 365(6): 419-26.
- 14- Lyskov EB, Chernyshev MV, Mikhailov VO, kozlov AP. The effect of magnetic field with the frequency of 50Hz on behavior in rats depends on the value of the constant magnetic field. *Biophysics*. 1996; 41(4):881-86.
- 15- Trimmel M, Schweiger E. Effects of ELF(50HZ, 1mT) electromagnetic field(EMF) on concentration in visual attention, perception and memory including effects of EMF sensitivity. *Toxicol Lett*. 1998 Aug; 96-97: 377-82.
- 16- Sienkiwicz ZJ, Haylock RG, Saunders RD. Deficits in spatial learning after exposure of mice to a 50 Hz magnetic field. *Bioelectromagnetics*. 1998; 19(2): 79-84.
- 17- Aronsson P, Liljenstrom H. Non-Synaptic modulation of cortical network dynamics. *Neuro computing*. 2000; 32-33:285-90.
- 18- Sienkiewicz ZJ, Haylock RG, Bartrum R. 50Hz magnetic field effects on the performance of a spatial learning task by mice. *Bioelectromagnetics*. 1998; 19(8): 486-93.