

## ДИНАМИКА ПРОЦЕССОВ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ У СВИНОК КРУПНОЙ ЧЁРНОЙ ПОРОДЫ В РАЗНЫЕ ПЕРИОДЫ РЕПРОДУКТИВНОГО ЦИКЛА

С. А. УСЕНКО

Полтавская государственная аграрная академия,  
г. Полтава, Украина

(Поступила в редакцию 01.02.2020)

Глубоким эндокринным изменениям в организме свиней принадлежит важное место в формировании гомеостаза и реализации наследственной программы в ходе их индивидуального развития. Поэтому в последние годы особенно возросло количество исследований, посвященных проблемам формирования гормонального фона у животных и участия отдельных про- и антиоксидантов в процессах онтогенеза.

Целью работы было установить особенности формирования прооксидантно-антиоксидантного гомеостаза у свинок крупной чёрной породы в разные периоды полового цикла и супоросности. В опытах использовано 5 клинически здоровых свинок крупной чёрной породы возрастом 8 месяцев и массой тела 125–130 кг. В свинок проводили забор крови натощак в разные периоды воспроизводительного цикла: лютеальная фаза, эструс, на 30, 60, 90, 113-е сутки супоросности, а также через 12 часов после опороса.

Состояние прооксидантно-антиоксидантного гомеостаза в крови исследовали по активности ксантинооксидазы, концентрацию диеновых конъюгатов, содержанием ТБК-активных комплексов. Оценивали уровень антиоксидантной защиты по активности супероксиддисмутазы, активности каталазы, содержанию восстановленного глутатиона, аскорбиновой и дегидроаскорбиновой кислот, содержанию витамина А и концентрации витамина Е, перекисной резистентности эритроцитов. Также определяли содержание в сыворотке крови таких гормонов: тироксина, трийодтиронина, эстрадиола-17β, прогестерона и тестостерона.

Результаты исследований позволяют утверждать, что воспроизводительная функция у свинок крупной чёрной породы в значительной степени определяется циклической лабильностью гормонального и прооксидантно-антиоксидантного гомеостаза, который характеризуется определенными периодическими колебаниями, обусловленными изменением их физиологического состояния, направленные на поддержание параметров физиологической нормы течения метаболических процессов. В циклирующих свинок этой породы существенная лабильность гомеостаза направлена на создание необходимых условий для оплодотворения. При наступлении супоросности сдвиги констант прооксидантно-антиоксидантного гомеостаза способствуют обеспечению роста и развитию эмбрионов, а также нормальному протеканию опороса.

**Ключевые слова:** свинки, эструс, диэструс, супоросность, антиоксиданты, гомеостаз.

*Deep endocrine changes in the body of pigs play an important role in the formation of homeostasis and the implementation of the hereditary program in the course of their individual development. Therefore, in recent years, the number of studies devoted to the problems of the formation of the hormonal background in animals and the participation of individual pro- and antioxidants in the processes of ontogenesis has especially increased.*

*The aim of the work was to establish the features of the formation of prooxidant-antioxidant homeostasis in large black pigs at different periods of the sexual cycle and gestation. In the experiments, 5 clinically healthy guinea pigs of large black breed with an age of 8 months and a body weight of 125–130 kg were used. In pigs, blood was taken on an empty stomach at different periods of the reproductive cycle: luteal phase, oestrus, on the 30th, 60th, 90th, 113th day of gestation, and also 12 hours after farrowing.*

*The state of prooxidant-antioxidant homeostasis in the blood was studied by xanthine oxidase activity, the concentration of diene conjugates, and the content of TBA-active complexes. The level of antioxidant protection was assessed by the activity of superoxide dismutase, catalase activity, the content of reduced glutathione, ascorbic and dehydroascorbic acids, the content of vitamin A and the concentration of vitamin E, and peroxidation resistance of red blood cells. The content of such hormones in the serum was also determined: thyroxine, triiodothyronine, estradiol-17 $\beta$ , progesterone and testosterone.*

*The results of the studies suggest that the reproductive function in large black pigs is largely determined by the cyclic lability of hormonal and prooxidant-antioxidant homeostasis, which is characterized by certain periodic fluctuations due to changes in their physiological state, aimed at maintaining the physiological norm of metabolic processes cessov. In cycling pigs of this breed, the significant lability of homeostasis is aimed at creating the necessary conditions for fertilization. With the onset of gestation, shifts in the constants of the prooxidant-antioxidant homeostasis contribute to the growth and development of embryos, as well as the normal course of farrowing.*

**Key words:** *mumps, estrus, diestrus, pregnancy, antioxidants, homeostasis.*

**Введение.** На протяжении последних десятилетий накоплено значительное количество экспериментальных данных о ведущей роли процессов перекисного окисления в формировании функциональной активности мышц, печени, сердечно-сосудистой системы и репродуктивных органов [2, 8]. Ход процессов перекисного окисления в организме животных находится под динамическим контролем прооксидантно-антиоксидантного гомеостаза, изменения которого регулируют интенсивность развития оксидативного стресса, созревание половых клеток, оплодотворение и эмбриональное развитие. При этом контроль прооксидантно-антиоксидантного гомеостаза [7, 10]. При этом организм самки находится в условиях постоянно меняющегося гормонального профиля, который, регулируя метаболические процессы, ускоряет или замедляет процессы перекисного окисления в течение воспроизводительного цикла [7, 8, 14, 15]. Наиболее выразительной чертой периода супоросности свиньи является быстрый рост плодов, особенно пород сального направления продуктивности. Будучи специализированными регуляторами биохимических процессов в организме матери и плода, гормоны составляют основу обмена веществ и репродукции. Однако на сегодня еще отсутствуют материалы, в которых изложены вопросы динамики гормонального и биохимического статуса у свиней сального направления продуктивности в зависимости от их физиологического состояния.

Проведение исследований по установлению особенностей формирования гомеостаза, где ведущая роль принадлежит гормонам и прооксидантно-антиоксидантной системе в разные периоды воспроизводительного цикла дадут возможность к разработке эффективных методов направленных на управления процессами роста и развития плодов, повышение многоплодия, крупноплодности и интенсивности использования свиноматок.

Целью работы было установить особенности формирования прооксидантно-антиоксидантного гомеостаза у свинок крупной чёрной породы в разные периоды полового цикла и супоросности.

**Основная часть.** В опытах по принципу аналогов использовано 5 клинически здоровых свинок крупной чёрной породы возрастом 8 месяцев и массой тела 125–130 кг. В свинок проводили забор крови натошак в разные периоды воспроизводительного цикла: лютеальная фаза, эструс, на 30, 60, 90, 113-е сутки супоросности, а также через 12 часов после опороса. Содержание тироксина, трийодтиронина, эстрадиола-17 $\beta$  и прогестерона в сыворотке крови определяли стандартными радиоиммунологическим, а тестостерона – иммуноферментным методами. Состояние прооксидантно-антиоксидантного гомеостаза (ПАГ) в крови исследовали по активности ксантиноксидазы (КСО), концентрацию диеновых конъюгатов (ДК), содержанием ТБК-активных комплексов. Оценивали уровень антиоксидантной защиты по активности супероксиддисмутазы (СОД), активности каталазы (КТ), содержанию восстановленного глутатиона, аскорбиновой и дегидроаскорбиновой кислот, содержанию витамина А и концентрации витамина Е, перекисной резистентности эритроцитов. Полученные данные свидетельствуют, что в крови циклирующих свинок в фазе эструса относительно лютеиновой, происходят гормональные изменения (табл. 1) [1, 3, 4].

Таблица 1. Динамика содержания гормонов в сыворотке крови свиной крупной чёрной породы в течение репродуктивного цикла,  $M \pm m$  (n=10)

Гормоны	Фазы репродуктивного цикла						
	Лютеальная	Эструс	Сутки супоросности				Через 12 часов после опороса
			30-е	60-е	90-е	113-е	
Тироксин, нмоль/л	38,38 $\pm 7,34$	51,57 $\pm 9,70$	64,14 $\pm 12,20$	58,43 $\pm 9,92$	46,15 $\pm 7,78$	30,59 $\pm 5,42$	37,78 $\pm 5,78$
Трийодтиронин, нмоль/л	1,09 $\pm 0,25$	1,24 $\pm 0,35$	1,77 $\pm 0,48$	1,15 $\pm 0,35$	1,27*** $\pm 0,17$	0,93*** $\pm 0,23$	1,20*** $\pm 0,31$
Прогестерон, нмоль/л	39,17 $\pm$ 6,85	14,38* $\pm 3,52$	62,16 $\pm 9,06$	80,72 $\pm 12,58$	140,30*** $\pm 18,20$	90,28 $\pm 23,42$	66,14 $\pm 13,98$
Тестостерон, нмоль/л	4,73 $\pm 0,99$	6,13*** $\pm 1,37$	5,25 $\pm 1,20$	5,67 $\pm 1,18$	6,29 $\pm 1,05$	7,95 $\pm 1,28$	5,42 $\pm 1,12$
Эстрадиол-17 $\beta$ , нмоль/л	0,25 $\pm 0,04$	0,63* $\pm 0,12$	0,72** $\pm 0,13$	0,83** $\pm 0,14$	2,68*** $\pm 0,28$	5,94*** $\pm$ 1,24	1,07*** $\pm 0,11$

\*-p<0,05; \*\*-p<0,01; \*\*\*-p<0,001 по сравнению с показателями лютеальной фазы.

Так, в период полового возбуждения установлено увеличение количества тироксина и трийодтиронина в 1,3 и 1,1 раза соответственно. Наиболее отчетливые изменения в этот период были характерны для половых гормонов: концентрация прогестерона уменьшалась в 2,7 (p<0,01), а те-

стостерона и эстрадиола-17 $\beta$  увеличивалась в 1,3 ( $p<0,001$ ) и 2,5 раза ( $p<0,01$ ) соответственно. Данные эксперимента свидетельствуют, что в крови циклирующих свинок в фазе эструса по сравнению с лютеальной, наблюдается существенная перестройка метаболических процессов в направлении ускорения течения перекисного окисления. Это подтверждается повышением активности прооксидантного фермента – КСО на 22,5 %, что существенно ускорило гемолиз эритроцитов на 32,1 %. Количество восстановленной формы аскорбиновой кислоты уменьшалось на 28,3 % ( $p<0,05$ ), что свидетельствует об интенсивном использовании ее в этот период. Такие изменения сопровождаются увеличением содержания ДК в 27,4 % и ТБК-активных комплексов 13,8 % (табл. 2).

Таблица 2. Состояние ПАГ в крови свинок крупной чёрной породы в течение репродуктивного цикла,  $M\pm m$  ( $n=10$ )

Показатели	Фазы репродуктивного цикла						Через 12 часов после опороса
	Лютеальная	Эструс	Сутки супоросности				
			30-е	60-е	90-е	113-е	
Перекисная резистентность эритроцитов, %	11,72 $\pm 2,22$	17,27 $\pm 2,63$	15,56 $\pm 3,07$	10,58 $\pm 2,21$	8,13 $\pm 1,37$	11,41 $\pm 1,45$	9,14 $\pm 1,36$
Ксантиноксидаза, мккат/сек/л	24,30 $\pm 2,09$	31,39 $\pm 2,48$	41,38* $\pm 5,11$	33,70 $\pm 4,06$	27,23 $\pm 4,63$	34,70 $\pm 6,34$	29,11 $\pm 7,07$
Супероксиддисмутазы, мУ/мл	0,45 $\pm 0,09$	0,55 $\pm 0,10$	0,44 $\pm 0,10$	0,39 $\pm 0,08$	0,65 $\pm 0,16$	0,72 $\pm 0,19$	0,42 $\pm 0,09$
Каталаза, $H_2O_2$ /мин/л	1,56 $\pm 0,14$	1,44 $\pm 0,11$	1,34 $\pm 0,09$	1,71 $\pm 0,05$	1,99 $\pm 0,09$	1,66 $\pm$ 0,12	1,84 $\pm 0,09$
Восстановленный глутатион, мкмоль/л	0,47 $\pm 0,09$	0,39 $\pm 0,11$	0,36 $\pm 0,09$	0,29 $\pm 0,08$	0,51 $\pm 0,09$	0,49 $\pm 0,07$	0,38 $\pm 0,08$
Аскорбиновая кислота, мкмоль/л	22,84 $\pm 2,92$	16,38* $\pm 1,34$	13,76** $\pm 1,79$	14,31* $\pm 2,07$	12,13** $\pm 1,15$	10,58*** $\pm 0,97$	12,41** $\pm 1,11$
Дегидроаскорбиновая кислота, мкмоль/л	20,69 $\pm 2,83$	21,47 $\pm 1,29$	23,58 $\pm 3,66$	19,76 $\pm 1,80$	15,19 $\pm 1,53$	12,37* $\pm 1,03$	15,93 $\pm 1,39$
Витамин А, мкмоль/л	2,17 $\pm 0,47$	2,78 $\pm 0,52$	1,93 $\pm 0,27$	1,65 $\pm 0,34$	1,08 $\pm 0,16$	1,29 $\pm 0,20$	1,26 $\pm 0,19$
Витамин Е, мкмоль/л	1,46 $\pm 0,18$	2,18* $\pm 0,22$	1,67 $\pm 0,18$	1,25 $\pm 0,17$	0,94 $\pm 0,28$	0,69** $\pm 0,15$	0,55** $\pm 0,10$
Дневные конъюгаты, ммоль/л	1,49 $\pm 0,12$	1,17 $\pm 0,15$	2,53*** $\pm 0,12$	2,05* $\pm 0,16$	2,48 $\pm 0,44$	2,76** $\pm 0,24$	1,85 $\pm 0,29$
ТБК-активные комплексы, мкмоль/л	16,71 $\pm 2,08$	19,38 $\pm 2,19$	24,32* $\pm 1,98$	12,17 $\pm 1,89$	10,76 $\pm 1,65$	15,31 $\pm 2,14$	9,17* $\pm 1,38$
ТБК-активные комплексы после инкубации, мкмоль/л	17,68 $\pm 1,47$	22,93 $\pm 2,56$	25,44 $\pm 3,13$	13,55 $\pm$ 2,86	12,58 $\pm 1,79$	16,63 $\pm 1,47$	11,31* $\pm 1,38$

\*- $p<0,05$ ; \*\*- $p<0,01$ ; \*\*\*- $p<0,001$  по сравнению с показателями лютеальной фазы.

Важно отметить что инкубирование образцов в прооксидантном буфере сопровождалось увеличением количества ТБК-активных комплексов на 18,3 %, что подтверждает интенсификацию процессов перекисного окисления в период полового возбуждения наблюдалась ускорения функциональной активности антиоксидантов – СОД на 8,3 %. Именно в этот период выявлено снижение концентраций: восстановленного глутатиона на 20,5 % и аскорбиновой кислоты на 28,3 % ( $p < 0,05$ ), а также увеличение количества витамина А на – 21,9 и витамина Е – 49,3 % ( $p < 0,05$ ).

На протяжении первых 30 суток развития супоросности установлено существенное изменение гормонального фона в направлении увеличения концентраций тироксина на 67,1 %, трийодтиронина – 62,4 %, прогестерона – 11,0 %, эстрадиола-17 $\beta$  – 63,9 % ( $p < 0,01$ ) относительно лютеальной фазы. Такие изменения гормонального фона существенно интенсифицировали процессы перекисидации, что проявлялось в активизации энзимов КСО – 70,3 % ( $p < 0,05$ ), увеличении концентрации ДК – 69,8 % ( $p < 0,001$ ), ТБК-активных комплексов на 45,5 % ( $p < 0,05$ ), а также ускоренное использование низкомолекулярных антиоксидантов – снижению содержания восстановленного глутатиона и аскорбиновой кислоты соответственно на 23,4 % и 39,8 % ( $p < 0,01$ ) по сравнению с лютеальной фазой.

В течение второго месяца беременности в организме свинок выявлено последующее незначительное увеличение количества прогестерона и эстрадиола-17 $\beta$ , которое сопровождалось снижением интенсивности перекисидации липидов – уменьшение активности КСО на 18,6 %, содержания ДК – 19,0 и ТБК-комплексов – 50,0 %, а также устойчивости эритроцитов к перекисного гемолиза – 32,0 %. На протяжении этого периода установлено снижение уровня системы антиоксидантной защиты за счет уменьшения функциональной активности СОД на 11,43 %, содержания восстановленного глутатиона – 19,4 %, витамина А – 14,5 % и витамина Е – 25,1 %.

Установлено, что от 60-го до 90-го дней супоросности у свинок стремительно увеличивались концентрации прогестерона в 1,7 и эстрадиола-17 $\beta$  – 3,2 раза ( $p < 0,05$ ). Изменения гормонального фона сопровождалось снижением активности КСО на 19,2 % и повышением уровня СОД – 39,1 %. При этом выявлено существенное увеличение концентрации восстановленного глутатиона в 1,8 раза. Такие изменения ПАГ происходили на фоне существенного уменьшения количества

витамина А в 1,5 и витамина Е в 1,3 раза, что очевидно обусловлено интенсивным транспортом к плодам.

У свинок на протяжении четвертого месяца супоросности выявлено изменения гормонального фона: концентрации тироксина и трийодтиронина уменьшались соответственно на 33,7 и 26,8 %, а половых гормонов увеличивалась тестостерона на 26,4 и эстрадиола-17 $\beta$  – 121,6 %, а прогестерона уменьшалась на 35,7 %. Такая динамика изменения гормонального фона сопровождалась смещением ПАГ в направлении интенсификации процессов пероксидации, за счет увеличения активности КСО на 227,4 % ( $p < 0,05$ ) и СОД на 10,8 %, что сопровождалось повышением количества диеновых конъюгатов 11,3 % и ТБК-активных комплексов на 11,6 %, а также снижением концентрации низкомолекулярных антиоксидантов: восстановленного глутатиона на 4 % и витамина Е на 26,6 %. Очевидно, такие метаболические изменения привели к снижению уровня устойчивости эритроцитов к перекисному гемолизу.

В послеродовой период отмечено снижение индикативных показателей интенсивности пероксидации липидов: активности КСО в 1,2 раза, концентрации диеновых конъюгатов в 1,5 и ТБК-активных комплексов в 1,7 раза, что сопровождалось повышением резистентности эритроцитов в 1,3 раза к перекисному окислению. В результате установлено повышение уровня функциональной активности КТ на 10,8 %. Такие изменения происходили на фоне уменьшения концентрации витамина Е – 20,3 %, что является свидетельством ведущей роли данных компонентов ПАГ в обеспечении адаптационных процессов в послеродовой период для свиноматок и поросят. Данная закономерность подтверждается увеличением уровня адаптационных гормонов тироксина и трийодтиронина соответственно на 23,5 и 29,0 %.

Обобщенные результаты исследований свидетельствуют о том, что в крови свинок крупной чёрной породы в течение воспроизводительного цикла изменение гормонального фона существенно влияет на состояние ПАГ. В период эструса параллельно с увеличением концентрации эстрадиола-17 $\beta$  и тиреоидных гормонов повышается уровень КСО, СОД, количество ДК и ТБК-активных комплексов, но снижалось содержание восстановленного глутатиона и АК, что свидетельствует о напряженном протекании процессов пероксидации [13]. С нарастанием доминанты супоросности существенно повышались концентрации прогестерона и эстрадиола-17 $\beta$ , которые вызвали изменение баланса в функциональной активности прооксидантных и антиоксидантных фе-

рментов, что согласуется с утверждениями К. Duhig [10], S.O. Ogbodo [11], M.S. Purdey [12].

В период становления функционирования отдельных органов и систем плодов и появлением собственного синтеза отдельных гормонов плацентой наблюдалось замедление течения процессов перекисного окисления – снижение функциональной активности СОД, КТ и содержания ДК и ТБК-активных комплексов. При этом предродовой период характеризовался существенным максимальным уровнем половых гормонов и интенсивным течением процессов пероксидации, что подтверждается данными В. Н. Романенко, И. А. Бойко [6], Д. Н. Мытарева [5]. С изменением фазы воспроизводительного цикла – после опороса отмечается смещение гомеостатических констант – увеличение содержания тиреоидных и уменьшение стероидных гормонов сопровождается изменением прооксидантно-антиоксидантного гомеостаза в направлении замедления процессов пероксидации.

**Заключение.** Результаты исследований позволяют утверждать, что воспроизводительная функция у свинок крупной чёрной породы в значительной степени определяется циклической лабильностью гормонального и прооксидантно-антиоксидантного гомеостаза, который характеризуется определенными периодическими колебаниями, обусловленными изменением их физиологического состояния, направленные на поддержание параметров физиологической нормы течения метаболических процессов. У циклирующих свинок этой породы существенная лабильность гомеостаза направлена на создание необходимых условий для оплодотворения. При наступлении супоросности сдвиги констант прооксидантно-антиоксидантного гомеостаза способствуют обеспечению роста и развития эмбрионов, а также нормальному протеканию опороса.

#### *ЛИТЕРАТУРА*

1. Кісельова, І. К. Визначення активності ксантинооксидазної активності реакції тимуса щурів / І. К. Кісельова, А. В. Майданюк, С. П. Імедадзе // Вісник КНУ ім. Тараса Шевченка. – 2005. – С. 28.
2. Кузьменко, Л. М. Прооксидантно-антиоксидантний гомеостаз у тканинах матки свині залежно від періодів відтворювального циклу / Л. М. Кузьменко, А. А. Поліщук, С. О. Усенко, А. М. Шостя, В. Г. Стояновський, В. І. Карповський, С. М. Білаш // Світ медицини і біології – 2018. – № 2. – С. 198–203.
3. Методы лабораторного определения общей перекисной разрушающей активности ферментов растений / А. К. Величко [и др.] // Весн. Пензенского гос. пед. ун-та. – 2009. – № 14 (18). – С. 44–48.
4. Методические положения по изучению процессов свободнорадикального окисления в системе антиоксидантной защиты организма / С. В. Шабунин // Воронеж, 2010. – С. 36–37, 51–52.

5. Мытарев, Д. Н. Ранняя диагностика беременности свиней методом иммуноферментного анализа (ИФА): автореф. дисс. на соиск. науч. степени канд. вет. наук: 16.00.07 / Д. Н. Мытарев. – Краснодар, 2009. – 19 с.
6. Романенко, В. Н. Гормонорегулирующие свойства синтетического тимогена при стимуляции воспроизводительной функции у свиноматок / В. Н. Романенко, И. А. Бойко // Вестник Краснодарского ГАУ. – №4. – С. 144–149.
7. Ступарь, І. І. Прооксидантно-антиоксидантний гомеостаз у свинок у різні фази статевого циклу / І. І. Ступарь // Вісник Полтавської державної аграрної академії. – 2018. – №4. – С.178–184.
8. Физиологические аспекты метаболизма в системе мать-плацента-плод свиньи: монография. / В. Ф. Коваленко [та ін.]. – Полтава, 2012. – 204 с.
9. Al-Gubory K. H. Different enzymatic antioxidative pathways operate within the sheep caruncular and intercaruncular endometrium throughout the estrous cycle and early pregnancy / K. H. Al-Gubory, P. Faure, C. Garrel // Theriogenology – 2017. – Vol. 99. – P. 111–118.
10. Duhig K. Oxidative stress in pregnancy and reproduction / K. Duhig, L. C. Chappell, A. H. Shennan. // Obstet Med. – 2016. – Vol. 9(3). – P. 113–116.
11. Ogbodo S. O. Free Radicals and Antioxidants Status in Pregnancy: Need for Pre- and Early Pregnancy Assessment / S. O. Ogbodo, A. N. Okaka, U. I. Nwagha, F. E. Ejezie // Am. J. Med. and Med. Sc. – 2014. – Vol. 4 (6). – P. 230–235.
12. Purdey M. S. Boronate probes for the detection of hydrogen peroxide release from human spermatozoa. / M. S. Purdey, H. Connaughton, S. Whiting // Free Radic Biol Med. – 2015. – Vol. 81. – P. 69–76.
13. Villamor E. Reactive oxygen species as mediators of oxygen signaling during fetal-to-neonatal circulatory transition / E. Villamor, L. Moreno, R. Mohammed // Free Radical Biology and Medicine – 2019. – Vol. 142. – P. 82–96.
14. Unfer T. C. Estrogen plus progesterin increase superoxide dismutase and total antioxidant capacity in postmenopausal women / C. G. Figueiredo, M. M. Zanchi, L. H. Maurer, D. M. Kemerich, M. M. Duarte, C. K. Konopka, T. Emanuelli // Climacteric. – 2015. – Jun. 18 (3). – P. 379–88.
15. Zelko I. N. Regulation of Decidual Protein Induced by Progesterone (DEPP) Gene Expression by Extracellular Oxidative Stress / I. N. Zelko, W. S. Marcus, J. Y. Rodney, J. Folz // Free Radical Biology and Medicine. – Vol. 51. – November 2011. – P. 18.