

NGHIÊN CỨU ĐẶC ĐIỂM TUỔI, GIỚI, HÒA HỢP HLA VÀ MỐI LIÊN QUAN VỚI ĐÁI THÁO ĐƯỜNG Ở BỆNH NHÂN SAU GHEP THẬN

Nguyễn Đức Thuận^{1*}, Đặng Thành Chung^{2,**}

TÓM TẮT

Mục tiêu: Phân tích làm rõ đặc điểm tuổi, giới, hòa hợp HLA và mối liên quan đến phát triển đái tháo đường trên đối tượng sau ghép thận. **Phương pháp:** 508 bệnh nhân có thời gian sau ghép thận ≥ 3 tháng được theo dõi và điều trị sau ghép tại BV Việt Đức, từ 09/2017 đến 04/2018. Tất cả các bệnh nhân đều tự nguyện tham gia nghiên cứu. Thông tin tuổi, giới, mức độ hòa hợp kháng nguyên bạch cầu (HLA) của đối tượng nghiên cứu được thu thập qua bệnh án tuyển chọn trước ghép. Bệnh nhân được xét nghiệm chẩn đoán đái tháo đường theo tiêu chuẩn của Hiệp hội đái tháo đường Hoa kỳ. **Kết quả:** Tuổi trung bình của đối tượng là $42,41 \pm 11,18$; nam giới chiếm 68,11%, nữ giới chiếm 31,89%; các đối tượng ghép có 2 và 3 alen hòa hợp chiếm tỉ lệ cao nhất là 26,91% và 23,23%; nhóm tuổi từ 50-59 chiếm tỉ lệ đái tháo đường cao nhất 41,03% sự khác biệt về tỉ lệ phân bố nhóm tuổi có ý nghĩa thống kê với $p < 0,01$; Tỉ lệ bệnh nhân bị đái tháo đường sau ghép thận là 15,35%, trong đó tỉ lệ đái tháo đường ở nam 17,63% cao hơn ở nữ 10,49% cao hơn so với nữ giới 1,81 lần với sự khác biệt có ý nghĩa thống kê $= 0,038$. **Kết luận:** Kết quả cho thấy nhóm tuổi 50-59 chiếm tỉ lệ đái tháo đường cao nhất 41,03%, và nam giới có tỉ lệ mắc đái tháo đường sau ghép thận cao hơn nữ giới 1,81 lần đây là cơ sở giúp cá nhân hóa những đối tượng có nguy cơ cao để có chiến lược điều trị và biện pháp ngăn ngừa phát triển đái tháo đường sau ghép thận.

Từ khóa: tuổi, giới, HLA, đái tháo đường sau ghép thận.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Đái tháo đường sau ghép đề cập đến đái tháo đường xuất hiện sau ghép các tạng đặc hoặc sau ghép tủy và các tế bào gốc tạo máu ở những người trước đây không có tiền sử đái tháo đường [1], [2]. Ở bệnh nhân ghép thận đây là một biến chứng được biết khá rõ, gây ảnh hưởng đến chức năng và thời gian sống của bệnh

nhân. Một số nghiên cứu đã đánh giá ảnh hưởng của đái tháo đường sau ghép thận tới kết quả sau ghép thận. Theo kết quả của các nghiên cứu 10 năm gần đây, đái tháo đường sau ghép thận được xem như là một yếu tố tiên lượng độc lập gây giảm khả năng sống [3] và tăng các yếu tố nguy cơ gây tử vong do tất cả các nguyên nhân lên đến 87% và làm tăng tỉ lệ thất bại sau ghép khi so sánh với những người sau ghép không có tiểu đường [4]. Một số yếu tố nguy cơ được cho là có thể dẫn đến phát triển NODAT và cần được đánh giá để ngăn ngừa đái tháo đường ở bệnh nhân sau ghép thận. Tuổi là một yếu tố quan trọng trong phát triển đái tháo đường sau ghép thận. Những người ghép thận có tuổi trên 45 có khả năng phát triển đái tháo đường cao gấp 2,2 những người trẻ hơn

¹ Bộ môn - Khoa nội thần kinh, Bệnh viện Quân y 103

² Bộ môn Sinh lý bệnh, Học viện Quân y

*Tác giả thực hiện chính:

Nguyễn Đức Thuận

** Tác giả chịu trách nhiệm chính:

Đặng Thành Chung

Email: đangthanhchung@vmmu.edu.vn

Ngày tiếp nhận: 25/2/2021

Ngày phản biện: 1/3/2021

Ngày chấp nhận đăng: 25/3/2021

[5], và bằng chứng về tuổi có liên quan đến tăng nguy cơ phát triển đái tháo đường sau ghép thận đã được xác nhận [4]. Vấn đề giới cũng ảnh hưởng đến phát triển đái tháo đường sau ghép thận, nguy cơ phát triển đái tháo đường ở người nhận cũng cao hơn khi người hiến thận là nam giới [4]. Yếu tố di truyền có thể góp phần vào sự phát triển của đái tháo đường sau ghép thận, và mặc dù ảnh hưởng của các yếu tố di truyền khác nhau đã được đánh giá, việc xác định tính nhạy cảm về di truyền cho tất cả các bệnh nhân vẫn cần phải được tiếp tục nghiên cứu thêm. Trong những năm qua, một số kháng nguyên bạch cầu người (HLA - human leukocyte antigens) như HLA-B2 [6] và HLA-B27 [7] đã được phân tích và được coi như là yếu tố dự báo của đái tháo đường sau ghép thận. Gần đây, các kiểu hình HLA-B13 và HLA-B15 đã được xác định là các yếu tố dự báo độc lập của đái tháo đường sau ghép thận [8]. Tại Việt Nam đánh giá đặc điểm tuổi, giới, hòa hợp HLA và mối liên quan với đái tháo đường ở bệnh nhân sau ghép thận còn chưa được đánh giá một cách cụ thể, vì thế nghiên cứu của chúng tôi tập trung làm rõ vấn đề này.

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Gồm 508 bệnh nhân, không có tiền sử sử dụng đái tháo đường trước đó, có thời gian sau ghép thận ≥ 3 tháng được theo dõi và điều trị sau ghép tại BV Việt Đức. Thời gian nghiên cứu từ 09/2017 đến 04/2018.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Thông tin tuổi, giới, mức độ hòa hợp kháng nguyên bạch cầu (HLA) của đối tượng nghiên cứu được thu thập qua bệnh án tuyển chọn trước ghép. Bệnh nhân được lấy máu vào buổi sáng trước khi ăn và uống thuốc ức chế miễn dịch.

Tiêu chuẩn chẩn đoán đái tháo đường sau ghép tạng: dựa trên tiêu chuẩn của Hiệp hội Đái tháo đường Hoa Kỳ (ADA - American Diabetes Association) đối với đái tháo đường tuýp 2 [9, 10], như sau: Glucose huyết tương lúc đói (nhịn ăn trước thời điểm xét nghiệm ít nhất 8 tiếng) $\geq 7,0$ mmol/ L (126 mg/ dL)/ hoặc Glucose huyết tương trong 2 giờ sau Nghiệm pháp gây tăng đường huyết theo đường uống (OGTT - Oral glucose tolerance test) ≥ 11.1 mmol/ L (200 mg/ dL)/ hoặc Glucose huyết tương bình thường ≥ 11.1 mmol/ L (200 mg/ dL), ở 3 lần đo khác nhau.

Tiêu chuẩn chẩn đoán tiền đái tháo đường: Glucose máu lúc đói 5,6 - 6,9 mmol/1 và glucose máu giờ thứ 2 của nghiệm pháp dung nạp glucose đường uống 7,8 - 11 mmol/1. Glucose lúc đói 5,6 - 6,9 mmol/1 và glucose máu giờ thứ 2 của nghiệm pháp dung nạp glucose đường uống $< 7,8$ mmol/1. Glucose lúc đói $< 5,6$ mmol/1 và glucose máu giờ thứ 2 của nghiệm pháp dung nạp glucose đường uống 7,8 - 11 mmol/1.

2.3. Phương pháp xử lý số liệu

Số liệu được xử lý theo các thuật toán thống kê y học sử dụng phần mềm Stata 12.0 với $p < 0,05$ sẽ được chấp nhận là sự khác biệt có ý nghĩa thống kê.

2.4. Đạo đức nghiên cứu: bệnh nhân đồng ý tham gia nghiên cứu và đồng ý lấy máu làm xét nghiệm.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

Nhận xét bảng 1: Tổng số có 508 bệnh nhân đủ tiêu chuẩn lựa chọn nghiên cứu. Tuổi của quần thể nghiên cứu dao động từ 15 đến 75 trong đó: Nhóm tuổi từ 30-39 chiếm tỉ lệ cao nhất với 33,27%, tuổi trung bình của đối tượng là $42,41 \pm 11,18$ tuổi.

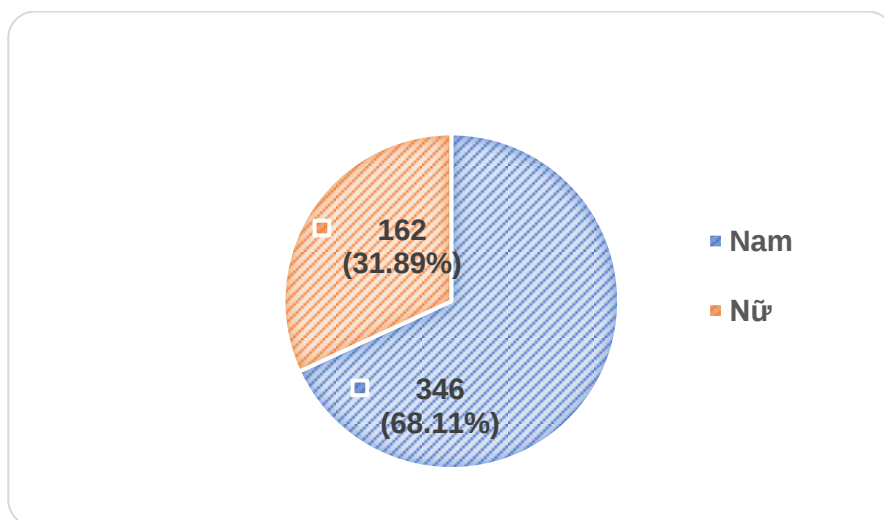
Nhận xét biểu đồ 1, 2: Trong 508 đối tượng nghiên cứu, có 353 đối tượng có thông tin về hòa hợp HLA. Trong đó, các đối tượng ghép có 2 và 3 alen hòa hợp chiếm tỉ lệ cao nhất là 26,91% và 23,23%.

Nhận xét bảng 2: Với đái tháo đường sau ghép thận, nhóm tuổi từ 50-59 chiếm tỉ lệ cao nhất 41,03%. Tỷ lệ phân bố về nhóm tuổi trong chẩn đoán đái tháo đường sau ghép thận là khác biệt có ý nghĩa thống kê với độ tin cậy 95% $p < 0,01$. Với tiền đái tháo đường, nhóm tuổi từ 40 - 49 chiếm tỉ lệ cao nhất 38,24%. Tỷ lệ phân bố

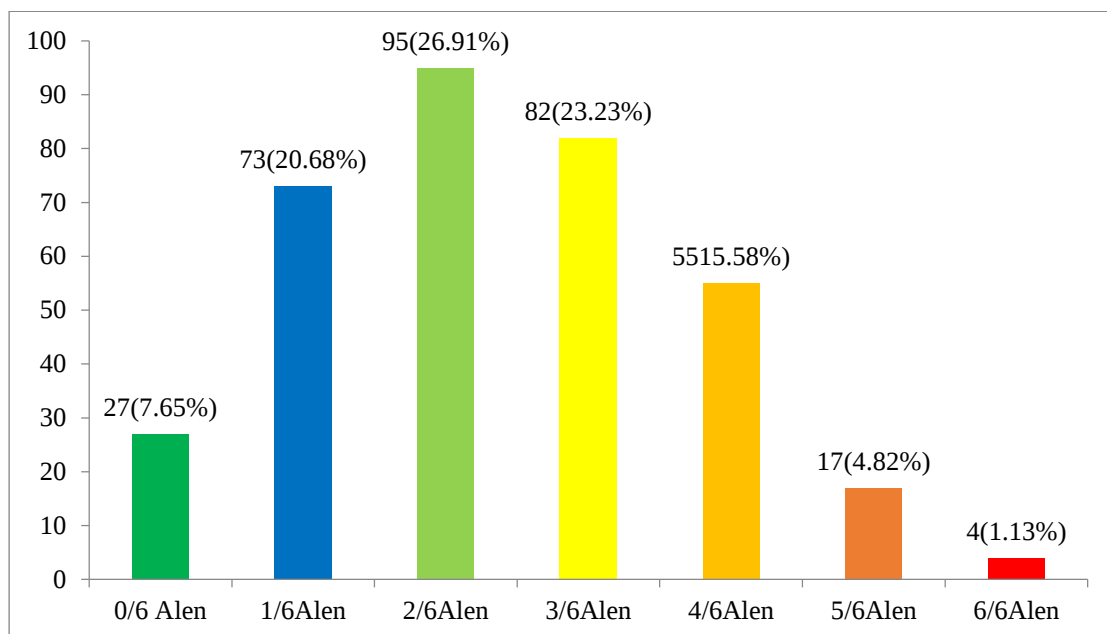
về nhóm tuổi trong chẩn đoán tiền đái tháo đường là khác biệt không có ý nghĩa thống kê với $p = 0,622$. Trong nhóm Glucose máu bình thường, nhóm tuổi 30-39 chiếm tỉ lệ cao nhất 38,13%. Tỷ lệ phân bố nhóm tuổi trong nhóm Glucose máu bình thường là khác biệt không có ý nghĩa thống kê với $p = 0,622$.

Bảng 1. Phân bố đối tượng nghiên cứu theo nhóm tuổi

Nhóm tuổi	Số lượng (n)	Tỷ lệ (%)
< 20	5	0,98
20 – 29	49	9,65
30 – 39	169	33,27
40 – 49	148	29,13
50 – 59	96	18,90
≥ 60	41	8,07
Tổng số	508	100
Tuổi trung bình	42,41±11,18	
Min-Max	15 - 75	



Biểu đồ 1. Phân bố đối tượng nghiên cứu theo giới.



Biểu đồ 2. Phân bố đối tượng nghiên cứu theo sự hoà hợp HLA

Bảng 2. Liên quan giữa đái tháo đường sau ghép thận và tiền đái tháo đường theo nhóm tuổi.

Nhóm tuổi	Đái tháo đường n (%)	Tiền đái tháo đường n (%)	Glucose bình thường n (%)
<20	1 (1,28)	0 (0,00)	4 (1,01)
20-29	1 (1,28)	3 (8,82)	45 (11,36)
30-39	9 (11,54)	9 (26,47)	151 (38,13)
40-49	19 (24,36)	13 (38,24)	116 (29,29)
50-59	32 (41,03)	6 (17,64)	58 (14,65)
≥60	16 (20,51)	3 (8,82)	22 (5,56)
Tổng số	78 (100)	34 (100)	396 (100)
p	< 0,01	0,622	0,622

Bảng 3. Liên quan giữa đái tháo đường (ĐTĐ) sau ghép thận và tiền đái tháo đường với giới.

Giới	ĐTĐ (n,%)	Glucose BT và Tiền ĐTĐ (n, %)	Tổng số (n, %)	P	OR
Nam	61 (17,63)	287 (82,37)	346 (100)	P=0,038	1,81
Nữ	17 (10,49)	145 (89,51)	162 (100)		
Tổng	78 (15,35)	432 (84,55)	508 (100)		

Nhận xét: Tỷ lệ bệnh nhân bị đái tháo đường sau ghép thận là 15,35%. Trong số 346 bệnh nhân nam, có 61 bệnh nhân được chẩn đoán đái tháo đường sau ghép thận chiếm tỷ lệ 17,63%. Trong 162 bệnh nhân nữ có 17 bệnh nhân được chẩn đoán đái tháo đường sau ghép thận chiếm 10,49%. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p = 0,038$. Bệnh nhân nam có tỷ lệ mắc đái tháo đường sau ghép thận cao hơn nữ 1,81 lần.

4. BÀN LUẬN

Trong nghiên cứu này đối tượng suy thận mạn có chỉ định ghép thận có tuổi dao động trong khoảng 15 đến 75 tuổi, với độ tuổi trung bình là $42,41 \pm 11,18$. Tuổi trung bình của đối tượng trong nghiên cứu của chúng tôi cao hơn so với kết quả trong nghiên cứu của Nguyễn Văn Thuận với tuổi trung bình của bệnh nhân là $36,84 \pm 9,97$ năm [11] và tương đương với Lê Thị Hương Thủy $40,9 \pm 10,5$ [12]. Có kết quả này là do đây là độ tuổi bị mắc các bệnh dẫn đến suy thận nhiều nhất. Tuy nhiên ở các nước phát triển trên thế giới những đối tượng có chỉ định ghép thận thường có độ tuổi cao hơn so với nghiên cứu của chúng tôi, như trong một phân tích thống kê tổng hợp của Margaret và cộng sự trên 4.839 đối tượng có chỉ định ghép thận thì độ tuổi trung bình là $62,6 \pm 14,0$ ở nam giới và $64,0 \pm 12,6$ ở nữ giới [13]. Điều này có thể do một phần điều kiện chăm sóc y tế ở các nước phát triển tốt hơn, đặc biệt có thể do cơ cấu gây suy thận là khác nhau giữa các nước phát triển và đang phát triển, đái tháo đường và tăng huyết áp là nhóm đối tượng chủ yếu gây ra suy thận ở các nước phát triển nhóm đối tượng này thường cao tuổi, trong khi Việt Nam nguyên nhân gây suy thận chủ yếu là viêm cầu thận mạn tính [11]. Việt Nam cũng có xu hướng tăng độ tuổi bệnh nhân có chỉ định ghép thận, điều này được thể hiện qua kết quả nghiên cứu của chúng tôi so với nghiên cứu của

Nguyễn Văn Thuận hay của Lê Thị Hương Thủy [11], [12].

Tuổi cao được cho là yếu tố nguy cơ quan trọng cho phát triển đái tháo đường sau ghép thận. Coisio và cộng sự đã chỉ ra người nhận tuổi trên 45 có nguy cơ phát triển đái tháo đường sau ghép thận cao gấp 2,2 lần so với người trẻ hơn ở cùng một thời điểm ghép với $p < 0,0001$ [5]. Tương tự, trong một phân tích của Hệ thống dữ liệu thận của Hoa Kỳ trên 11000 người được ghép thận trong khoảng thời gian 1996 – 2000, Kasiske và cộng sự đã chỉ ra có mối liên quan chặt chẽ giữa tuổi cao với đái tháo đường sau ghép thận [4]. Khi so sánh giữa khoảng tuổi 18 – 44 với khoảng 45 – 59, nguy cơ tương đối của đái tháo đường sau ghép thận ở nhóm tuổi cao là 1,9 với $p < 0,0001$, trong khi những người ≥ 60 có nguy cơ tương đối là 2,09 với $p < 0,0001$ [5]. Chúng tôi tiến hành đánh giá sự khác nhau về tỷ lệ bị đái tháo đường sau ghép thận giữa các nhóm tuổi, kết quả cho thấy nhóm tuổi 50 – 59 chiếm tỷ lệ cao nhất là 41,03%, nhóm ≥ 60 chiếm 20,51%, sự khác biệt về tỷ lệ đái tháo đường sau ghép thận giữa các nhóm tuổi có ý nghĩa thống kê với $p < 0,001$. Kết quả của chúng tôi cũng cho thấy ở nhóm tuổi dưới 59 tuổi càng cao tỷ lệ mắc đái tháo đường sau ghép thận càng cao, điều này phù hợp với các kết quả nghiên cứu khác trên thế giới, tuy nhiên ở nhóm tuổi ≥ 60 , tỷ lệ này giảm xuống. Sự khác biệt này có thể do ở nhóm tuổi này bệnh nhân bị suy thận giai đoạn cuối tỷ lệ tử vong cao hơn so với các nước phát triển trên thế giới.

Trong nghiên cứu của chúng tôi nam giới chiếm 68,11% cao gấp đôi so với nữ giới chiếm 31,89%. Kết quả này tương đương với nghiên cứu của tác giả Trần Ngọc Sinh thực hiện trên 176 bệnh nhân ghép thận tại bệnh viện Chợ Rẫy, tỷ lệ nam/nữ là 122/54 tương đương với tỷ lệ nam là 69,3% [14]. Trong khi đó tỷ lệ nam/nữ của một số nghiên cứu khác trên

thể giới cho tỉ lệ tương đương giữa hai giới. Trong nghiên cứu của Tse và cộng sự tỉ lệ nam/nữ là 122/99 (nam chiếm tỉ lệ là 55,2%) [15]. Điều này cho thấy ở Việt Nam, tỉ lệ ghép thận ở nam giới cao hơn rất nhiều so với nữ giới, có lẽ do nam giới là nhóm đối tượng có nguy cơ suy thận cao hơn. Sự phân bố theo giới của Việt Nam cũng rất khác biệt so với các nghiên cứu khác trên thế giới. Để làm rõ vấn đề này cần phải thực hiện nghiên cứu sâu hơn về các yếu tố nguy cơ và cơ chế bệnh sinh của suy thận liên quan đến giới tính ở Việt Nam.

Yếu tố giới tính ít được nhắc đến trong nguy cơ phát triển đái tháo đường sau ghép thận, mặc dù số ít nghiên cứu cho rằng người hiến tạng là nam giới có nguy cơ phát triển đái tháo đường sau ghép thận cao hơn nữ giới. Trong nghiên cứu của chúng tôi cho thấy không có sự khác biệt về giới trong sự phát triển đái tháo đường sau ghép thận.

Trong số các yếu tố nguy cơ liên quan đến cấy ghép dẫn đến sự phát triển đái tháo đường sau ghép thận, có nói đến sự hòa hợp HLA (human leukocyte antigens) giữa người hiến tạng và người nhận. Ít hòa hợp HLA làm tăng nguy cơ phát triển đái tháo đường sau ghép thận. Trong nghiên cứu của chúng tôi, tỉ lệ bệnh nhân được hiến tạng bởi người tình nguyện khác huyết thống chiếm tỉ lệ cao nhất 77,36% và tương ứng với đó là sự hòa hợp HLA có 2 và 3 alen hòa hợp chiếm tỉ lệ cao nhất là 26,91% và 23,23%. Như vậy đây cũng là một trong những yếu tố nguy cơ quan trọng chiếm tỉ lệ lớn có thể tham gia vào cơ chế phát triển đái tháo đường sau ghép thận ở các đối tượng tham gia vào nghiên cứu này.

5. KẾT LUẬN

Kết quả cho thấy nhóm tuổi 50-59 chiếm tỉ lệ đái tháo đường cao nhất 41,03%, và nam giới có tỉ lệ mắc đái tháo

đường sau ghép thận cao hơn nữ giới 1,81 lần đây là cơ sở giúp cá nhân hóa những đối tượng có nguy cơ cao để có chiến lược điều trị và biện pháp ngăn ngừa phát triển đái tháo đường sau ghép thận.

Lời cảm ơn

Chúng tôi xin chân thành cảm ơn Học viện Quân y; Bộ môn Sinh lý bệnh, Học viện Quân y đã giúp đỡ chúng tôi hoàn thành nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Viberti G (2001)**, Diabetes mellitus: A major challenge in transplantation. *Transplantation Proceedings*, 33(5A):3S - 7S.
2. **Woo M, Przepiorka D, Ippoliti C et al (1997)**, Toxicities of tacrolimus and cyclosporin A after allogeneic blood stem cell transplantation, *Bone Marrow Transplant*, 20(12):1095-8.
3. **Cosio FG, Pesavento TE, Kim S, et al (2002)**, Patient survival after renal transplantation: IV. Impact of post-transplant diabetes, *Kidney Int*, 62(4):1440-1446.
4. **Kasiske BL, Snyder JJ, Gilbertson D, et al (2003)**, Diabetes mellitus after kidney transplantation in the United States, *Am J Transplant*, 3(2):178-185.
5. **Cosio FG, Pesavento TE, Osei K, et al (2001)**, Post-transplant diabetes mellitus: increasing incidence in renal allograft recipients transplanted in recent years, *Kidney Int*, 59(2):732-737.
6. **Sumrani NB, Delaney VERA, Ding ZK, et al (1991)**, Diabetes mellitus after renal transplantation in the cyclosporine era--an analysis of risk factors, *Transplantation*, 51(2): 343-347.
7. **Hjelmsaeth J, Hartmann A, Kofstad J, et al (1997)**, Glucose

- intolerance after renal transplantation depends upon prednisolone dose and recipient age, *Transplantation*, 64(7):979-83.
8. **Bee YM, et al (2011)**, Incidence and risk factors for development of new-onset diabetes after kidney transplantation, *Ann Acad Med Singapore*, 40(4):160-7.
 9. **Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus (2003)**, Follow-up report on the diagnosis of diabetes mellitus, *Diabetes Care*, 26(11):3160-3167.
 10. **American Diabetes Association (2010)**, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus, *Diabetes Care*, 33(Suppl 1): S62-S69.
 11. **Nguyễn Văn Thuận (2013)**, Nghiên cứu đặc điểm lâm sàng, chức năng thận ghép và rối loạn lipid máu ở bệnh nhân sau ghép thận, *Học viện Quân y*.
 12. **Trương Văn Việt, Từ Thành Trí Dũng (2005)**, Kết quả các trường hợp ghép thận tại Bệnh viện Chợ Rẫy Tạp chí Y học Việt Nam, Tổng hội Y-Dược học Việt Nam, 503-07.
 13. **Margaret KY, Lyles CR, Bent-Shaw LA (2012)**, Risk factor, age and sex differences in chronic kidney disease prevalence in a diabetic cohort: The Pathways Study, *American journal of nephrology*. 36(3):245-251.
 14. **Trần Ngọc Sinh (2000)**, Suy nghĩ qua theo dõi các trường hợp ghép thận tại Trung Quốc, in *Kỷ yếu công trình 1992-2000*, Hội nghị tổng kết chương trình ghép thận, Bệnh viện Chợ Rẫy, 6-79.
 15. **Tse KC, Lam M.F, Yip PS, et al (2004)**, A long-term study on hyperlipidemia in stable renal transplant recipients, *Clin Transplant*, 18(3):274-80.

SUMMARY

CHARACTERISTICS OF AGE, GENDER, HUMAN LEUKOCYTE ANTIGEN (HLA) MATCHING, AND RELATIONSHIP WITH THE NEW-ONSET DIABETES MELLITUS AFTER RENAL TRANSPLANTATION

Nguyen Duc Thuan¹, Dang Thanh Chung^{2*}

¹Department of Neurology, Military Hospital 103, Vietnam Military Medical University

²Department of Pathophysiology, Vietnam Military Medical University

Objectives: Investigate the characteristics of age, gender, human leukocyte antigen (HLA) matching, and relationship with the new-onset diabetes mellitus after renal transplantation. **Subjects and methods:** We recruited 508 patients more than three months after the kidney transplant at Viet Duc University Hospital from September 2017 to April 2018 in the study. All patients volunteered to participate in the research and collecting the information on age, gender, and (HLA) matching of study subjects through pre-transplant selection records. Patients diagnosed with diabetes according to the American Diabetes Association. **Results:** Average age of patients was 42.41 ± 11.18 ; male accounted for 68.11%, female for 31.89%; HLA matching with 2 and 3 alleles were 26.91% and 23.23%, respectively; the age group 50-59 onset diabetes were the highest proportion as 41.03%, with $p < 0.01$; The prevalence of diabetes in male is 17.3%, higher than that of female 10.49% with the difference having a statistically significant difference $p = 0.038$. **Conclusion:** The results show that age and gender factors are related to the development of diabetes after kidney transplantation, which is the basis for personalizing high-risk subjects to develop treatment strategies and preventive the new-onset diabetes mellitus after renal transplantation.

Key words: Age, gender, HLA, new-onset diabetes mellitus after renal transplantation.