

СВЯЗЬ ОКИСЛИТЕЛЬНЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ЛИПОПРОТЕИНОВ НИЗКОЙ ПЛОТНОСТИ С ВОЗРАСТОМ В МУЖСКОЙ ПОПУЛЯЦИИ НОВОСИБИРСКА

Рагино Ю. И., Стахнёва Е. М., Садовский Е. В., Щербакова Л. В., Малютина С. К.

Цель. Изучение связи окислительных изменений ЛНП с возрастом (старением), в том числе в зависимости от наличия некоторых основных факторов риска сердечно-сосудистых заболеваний, в мужской популяции Новосибирска.

Материал и методы. В исследование было включено 1024 мужчины 47-73 лет (средний возраст — $61,1 \pm 0,3$ лет) популяционной выборки г. Новосибирска. Биохимическими методами были определены исходный уровень продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в липопротеинах низкой плотности (ЛНП) и резистентность ЛНП к окислению *in vitro*.

Результаты. Выявлены значимое снижение продуктов ПОЛ в выделенных из крови ЛНП и повышение резистентности ЛНП к окислению *in vitro* с увеличением возраста в мужской популяции. Значимых влияний курения и повышенного АД на ассоциацию окислительных изменений ЛНП с возрастом не обнаружено. При значимом влиянии уровней общего ХС, ЛВП-ХС и повышенной массы тела на окислительные изменения частиц ЛНП, тем не менее, в более старшей возрастной группе мужчин отмечены менее выраженные потенциально атерогенные окислительные изменения ЛНП (более низкий исходный уровень продуктов ПОЛ в ЛНП и более высокая резистентность ЛНП к окислению *in vitro*) в сравнении с более молодой возрастной группой мужчин.

Заключение. Полученные результаты указывают на значимое влияние возраста на указанные показатели и отражают тенденцию к снижению с возрастом активности атерогенных окислительных процессов в ЛНП.

Ключевые слова: возраст, резистентность ЛНП к окислению, перекисное окисление липидов, факторы риска, популяция мужчин.

ФГБНУ НИИ терапии и профилактической медицины, Новосибирск, Россия.

Рагино Ю. И.* — д.м.н., профессор, руководитель лаборатории клинических биохимических и гормональных исследований терапевтических заболеваний, Стахнёва Е. М. — к.б.н., с.н.с. лаборатории клинических биохимических и гормональных исследований терапевтических заболеваний, Садовский Е. В. — м.н.с. лаборатории клинических биохимических и гормональных исследований терапевтических заболеваний, Щербакова Л. В. — с.н.с. лаборатории клинко-популяционных и профилактических исследований терапевтических и эндокринных заболеваний, Малютина С. К. — д.м.н., профессор, руководитель лаборатории этиопатогенеза и клиники терапевтических заболеваний.

*Автор, ответственный за переписку (Corresponding author): ragino@mail.ru

АД — артериальное давление, АКМ — активные кислородные метаболиты, ИМТ — индекс массы тела, ЛВП-ХС — холестерин липопротеинов высокой плотности, ЛНП — липопротеины низкой плотности, МДА — малоновый диальдегид, окЛНП — окислено-модифицированные липопротеины низкой плотности, ПОЛ — перекисное окисление липидов, ХС — холестерин.

Рукопись получена 06.08.2015

Рецензия получена 14.09.2015

Принята к публикации 21.09.2015

Российский кардиологический журнал 2016, 6 (134): 41–44

<http://dx.doi.org/10.15829/1560-4071-2016-6-41-44>

RELATION OF OXIDATIVE PARAMETERS OF LOW DENSITY LIPOPROTEIDES WITH THE AGE IN MALE POPULATION OF NOVOSIBIRSK CITY

Ragino Yu. I., Stakhneva E. M., Sadovskii E. V., Sherbakova L. V., Malyutina S. K.

Aim. Assessment of the relation of oxidative LDL changes with the age (getting older), including the dependence from a row of the main cardiovascular risk factors in male population of Novosibirsk city.

Material and methods. Totally, 1024 males included, of 47-73 y.o. (mean age — $61,1 \pm 0,3$ y.o.) of the population cohort of Novosibirsk. Biochemical methods were used to define baseline levels of lipid peroxidation products (LPP) in low density lipoproteides (LDL) and resistance of LDL to oxidation *in vitro*.

Results. The significant decrease of LPP was found in the separated LDL and the increase of LDL resistance to oxidation *in vitro* with increasing age in male population. There were no significant influences of smoking or increased BP on the association of oxidated LDL with the age. With significant relation of the total cholesterol, HDL-cholesterol and higher body weight on oxidation changes of LDL, nevertheless, in older cohort there were less prominent potentially atherogenic

oxidative changes of LDL (lower baseline level of LPP in LDL and higher resistance of LDL to oxidation *in vitro*) comparing with younger men.

Conclusion. The results obtained, point on the significant influence of the age on the mentioned parameters and represent a tendency towards age-related decrease of atherogenic LDL oxidation processes activity.

Russ J Cardiol 2016, 6 (134): 41–44

<http://dx.doi.org/10.15829/1560-4071-2016-6-41-44>

Key words: age, resistance of LDL against oxidation, lipid peroxidation, risk factors, male population.

SRI of Therapy and Preventive Medicine, Novosibirsk, Russia.

Ключевая роль в атерогенезе принадлежит окислительной модификации липопротеинов низкой плотности (окЛНП). Эти частицы характеризуется сниженным содержанием антиоксидантов (α - и γ -токоферолов, ретинола, β -каротина и других) и повышенным содержанием продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ), окисленным модифицированным аполипопротеином апо-В-100 [1–3].

Окислительная модификация циркулирующих в крови ЛНП менее выражена, чем в субэндотелии

сосудистой стенки, где активны процессы клеточного окисления ЛНП моноцит/макрофагами, Т-лимфоцитами и пенистыми клетками, секретирующими активные кислородные метаболиты (АКМ) [4, 5]. В сосудистой стенке (интима) часть ЛНП подвергается окислению и преобразованию в модифицированные частицы. Значительная часть макрофагов после захвата ими модифицированных ЛНП и накопления в них эфиров холестерина (ХС) остается в интима и перерождается в пенистые клетки, которые дают начало первой стадии

атерогенеза. Кроме того, окЛНП оказывают влияние на развитие атеросклероза и при участии других механизмов. Модифицированные ЛНП ингибируют образование эндотелиальными клетками фактора роста, стимулируют проникновение моноцитов в интиму, задерживают миграцию макрофагов из интимы [1, 4, 5]. Также окислительная модификация ЛНП зависит от их антиоксидантного потенциала. Основными антиоксидантами ЛНП являются α - и γ -токоферолы, ретинол, β -каротин, убихинон и другие [6, 7].

Настоящее исследование было посвящено изучению связи окислительных изменений ЛНП с возрастом (старением), в том числе в зависимости от наличия некоторых основных факторов риска сердечно-сосудистых заболеваний, в мужской популяции Новосибирска.

Материал и методы

Обследование популяционной выборки мужчин проводилось в ходе скрининга в рамках международного проекта HAPIEE фонда Wellcome Trust (Великобритания) “Детерминанты сердечно-сосудистых заболеваний в Восточной Европе. Многоцентровое когортное исследование”. Исследование было одобрено этическим Комитетом НИИ терапии СО РАМН, протокол № 1 от 14.03.2002г. В исследование было включено 1024 мужчины 47-73 лет (средний возраст — $61,1 \pm 0,3$ лет, здесь и далее $M \pm m$) — популяционная выборка мужчин Октябрьского района г. Новосибирска.

Все обследованные заполняли форму Информированного согласия на участие в исследовании. В программу обследования входили: демографические и социальные данные, опрос о привычке курения и употреблении алкоголя, диетологический опрос, история хронических заболеваний и употребления медикаментов, кардиологический опрос по Роуз, антропометрия, 3-х кратное измерение АД, спирометрия, запись ЭКГ с расшифровкой по Миннесотскому коду. Средний уровень АД в популяционной группе мужчин был $145,5 \pm 0,74 / 90,5 \pm 0,4$ мм рт.ст. Средний индекс массы тела (ИМТ) был $27,4 \pm 0,38$ кг/м². Средние уровни липидных показателей в популяционной группе мужчин были: общий ХС — $5,56 \pm 0,03$ ммоль/л, триглицериды — $1,35 \pm 0,02$ ммоль/л, ЛВП-ХС — $1,43 \pm 0,01$ ммоль/л.

Образцы крови для исследований забирали однократно из локтевой вены утром натощак через 12 ч после последнего приема пищи.

Определение исходного и стимулированного катализаторами окисления уровней продуктов ПОЛ в ЛНП проводили собственным способом [8, 9]. Кратко: ЛНП получали из сыворотки методом осаждения с буферным гепарином, промывали и растворяли в 1 М растворе NaCl. В ЛНП определяли концентрацию белка по методу Лоури. Окислительную модификацию ЛНП проводили в изотоническом рас-

творе NaCl, содержащем ионы Cu^{2+} при 37° С. До окисления, после 3, 6, 15 и 30 минут инкубации ЛНП оценивали степень их окислительной модификации по концентрации одного из конечных продуктов ПОЛ малонового диальдегида (МДА) флуориметрическим методом на спектрофлуориметре Versafluor.

Статистическую обработку результатов проводили в программе SPSS for Windows с применением дескриптивного, корреляционного, Oneway ANOVA с использованием критерия Даннета, анализов. Критерием статистической достоверности был уровень $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Для оценки окислительной модификации циркулирующих в крови ЛНП используют измерение содержания в них продуктов ПОЛ (диеновых конъюгатов, МДА). Также существует показатель для оценки “предрасположенности” ЛНП к окислению — устойчивость ЛНП к окислению *in vitro* под действием катализаторов окисления. Он отражает не только прооксидантную возможность ЛНП (содержание в них полиненасыщенных жирных кислот, гидроперекисей липидов и др.), но и их антиоксидантный потенциал (содержание α -токоферола и других антиоксидантов) [2, 8].

Нами проведено исследование показателя устойчивости ЛНП к окислению *in vitro* — содержание продуктов ПОЛ в ЛНП через 3 и 6 минут (начальный этап окисления) и через 15 и 30 минут (развернутый этап окисления) их окисления с ионами меди у мужчин г. Новосибирска. Получены популяционные средние значения показателей стимулированных катализатором окисления уровней продуктов ПОЛ в ЛНП через 3 и 30 минут их инкубации — $8,2 \pm 0,1$ и $17,8 \pm 0,2$ нмоль МДА/мг белка ЛНП, соответственно. При этом исходный уровень МДА составил $2,01 \pm 0,05$ нмоль МДА/мг белка ЛНП [9].

Так как диапазон возраста участников исследования достаточно большой (47-74 лет), то был проведен анализ различий по возрастным группам: 1 группа — 47-55 лет ($n=251$), 2 группа — 55-64 года ($n=406$), 3 группа — 65-74 года ($n=344$).

При сравнении 1 и 3 возрастных групп выявлены статистически значимые отличия в окислительных показателях (табл. 1). В более старшей возрастной группе (группа 3) исходная концентрация МДА в ЛНП была в 1,2 раза ниже, а резистентность ЛНП к окислению и на начальном и на развернутом этапе окисления частиц ЛНП с ионами меди была выше в 1,1 раза в сравнении с более молодой возрастной группой (группа 1).

При изучении связи одного из основных факторов риска развития коронарного атеросклероза — курения — с окислительными показателями ЛНП статистически значимых отличий в возрастных группах среди курящих и некурящих мужчин выявлено не было. Только на 15 и 30 минутах окисления ЛНП *in vitro* полу-

Таблица 1

**Окислительные показатели в ЛНП в разных возрастных группах популяции мужчин
г. Новосибирска (M±m)**

Показатели	1 группа	2 группа	3 группа
	47-55 лет (n=251)	55-64 лет (n=406)	65-74 лет (n=344)
Исходный уровень продуктов ПОЛ в ЛНП, нМ МДА/мг белка ЛНП	2,2±0,1	2,0±0,1	1,9±0,1*
Уровень продуктов ПОЛ в ЛНП после 3 мин окисления, нМ МДА/мг белка ЛНП	8,9±0,3	8,2±0,2	7,8±0,2*
Уровень продуктов ПОЛ в ЛНП после 6 мин окисления, нМ МДА/мг белка ЛНП	11,4±0,3	10,6±0,2	10,3±0,2*
Уровень продуктов ПОЛ в ЛНП после 15 мин окисления, нМ МДА/мг белка ЛНП	14,9±0,3	13,9±0,26	13,4±0,29*
Уровень продуктов ПОЛ в ЛНП после 30 мин окисления, нМ МДА/мг белка ЛНП	18,9±0,4	17,9±0,3	17,0±0,3*

Примечание: * — сравнения между 1 и 3 группами (p<0,05).

Таблица 2

**Окислительные показатели в ЛНП в разных возрастных группах популяции мужчин
г. Новосибирска в зависимости от уровня общего ХС (M±m)**

Показатели	1 группа (47-55 лет)		2 группа (55-64 лет)		3 группа (65-74 лет)	
	>190 мг/дл (n=186)	<190 мг/дл (n=63)	>190 мг/дл (n=301)	<190 мг/дл (n=104)	>190 мг/дл (n=238)	<190 мг/дл (n=105)
Исходный уровень продуктов ПОЛ в ЛНП, нМ МДА/мг белка ЛНП	2,2±0,1	2,3±0,2	2,0±0,1	1,8±0,1	1,9±0,1	1,9±0,1
Уровень продуктов ПОЛ в ЛНП после 3 мин окисления, нМ МДА/мг белка ЛНП	8,6±0,3	9,2±0,5	8,4±0,2	7,5±0,3 [#]	7,8±0,3	7,8±0,3*
Уровень продуктов ПОЛ в ЛНП после 6 мин окисления, нМ МДА/мг белка ЛНП	11,2±0,4	11,8±0,6	10,3±0,3	9,7±0,4 [#]	10,2±0,4	10,2±0,4
Уровень продуктов ПОЛ в ЛНП после 15 мин окисления, нМ МДА/мг белка ЛНП	14,7±0,4	15,1±0,7	14,4±0,3	12,5±0,4 [#]	13,3±0,3 ^{**}	13,6±0,6
Уровень продуктов ПОЛ в ЛНП после 30 мин окисления, нМ МДА/мг белка ЛНП	18,9±0,5	18,7±0,8	18,5±0,4	15,8±0,5 [#]	16,9±0,4 ^{**}	17,4±0,7

Примечание: * — сравнения между 1 и 3 группами (p<0,05), [#] — сравнения между 1 и 2 группами (p<0,05), [^] — сравнения между 2 и 3 группами (p<0,05).

чено снижение концентрации МДА в старшей возрастной группе некурящих мужчин на 12% и 11%, соответственно, по сравнению с группой 47-55 лет. Такие результаты, по-видимому, можно объяснить возрастной тенденцией к нормализации липидного обмена. Известно, что наибольшее количество дислипидемий приходится на возраст от 45 до 74 лет, а возраст старше 75 лет, вне зависимости от пола, характеризуется тенденцией к нормализации липидного обмена, что объясняют тем, что долгожительство связано с нормальными значениями липидного обмена [10, 11].

При изучении связи главного фактора риска развития коронарного атеросклероза — уровня общего ХС — с окислительными показателями ЛНП нами выявлены несколько статистически значимых отличий между возрастными группами мужчин (табл. 2). Резистентность ЛНП к окислению на начальном этапе их окисления с катализатором была выше в 1,2 раза у мужчин с нормальным уровнем общего ХС в 3-й и во 2-й возрастных группах в сравнении с более молодой возрастной группой мужчин. Резистентность ЛНП к окислению на развернутом этапе окисления частиц с катализатором была выше в 1,2 раза у мужчин с нормальным уровнем общего ХС во 2-й возрастной группе в сравнении с первой. Кроме того, даже у мужчин с повышенным уровнем общего ХС в более старшей возрастной группе резистентность ЛНП к окислению на развернутом этапе окисления

частиц с катализатором оказалась также выше в 1,1 раза в сравнении с двумя более молодыми по возрасту группами мужчин (1 и 2 группы).

При изучении связи уровня ЛВП-ХС с окислительными показателями ЛНП обнаружено, что у мужчин с нормальным уровнем ЛВП-ХС в более старшей возрастной группе (группа 3) исходная концентрация МДА в ЛНП была в 1,2 раза ниже, а резистентность ЛНП к окислению на начальном и на развернутом этапе окисления частиц ЛНП с ионами меди была выше в 1,2 и в 1,1 раза, соответственно, в сравнении с 1-й возрастной группой мужчин (табл. 3).

Наконец, нами были получены результаты о том, что у мужчин с избыточной массой тела самой старшей возрастной группы резистентность ЛНП к окислению на развернутом этапе окисления частиц ЛНП с ионами меди была также выше в 1,1 раза в сравнении с наиболее молодой возрастной группой мужчин (табл. 4).

Таким образом, в настоящем исследовании нами выявлено значимое снижение продуктов ПОЛ в выделенных из крови ЛНП и повышение резистентности ЛНП к окислению *in vitro* с увеличением возраста в мужской популяции. Значимых влияний курения и повышенного АД на ассоциацию окислительных изменений ЛНП с возрастом нами не обнаружено. Важно, что даже при значимом влиянии уровней общего ХС, ЛВП-ХС и повышенной массы тела на окислительные изменения частиц ЛНП, тем

Таблица 3

**Окислительные показатели в ЛНП в разных возрастных группах популяции мужчин
г. Новосибирска в зависимости от уровня ЛВП-ХС ($M \pm m$)**

Показатели	1 группа (47-55 лет)		2 группа (55-64 лет)		3 группа (65-74 лет)	
	<40 мг/дл (n=27)	>40 мг/дл (n=222)	<40 мг/дл (n=41)	>40 мг/дл (n=364)	<40 мг/дл (n=23)	>40 мг/дл (n=320)
Исходный уровень продуктов ПОЛ в ЛНП, нМ МДА/мг белка ЛНП	2,1±0,3	2,2±0,1	1,7±0,2	2,0±0,1	2,3±0,4	1,8±0,1*
Уровень продуктов ПОЛ в ЛНП после 3 мин окисления, нМ МДА/мг белка ЛНП	9,6±0,7	8,7±0,3	7,9±0,6	8,2±0,2	9,1±0,9	7,7±0,2*
Уровень продуктов ПОЛ в ЛНП после 6 мин окисления, нМ МДА/мг белка ЛНП	12,3±0,9	11,3±0,3	10,3±0,7	10,6±0,2	12,2±1,1	10,1±0,2*
Уровень продуктов ПОЛ в ЛНП после 15 мин окисления, нМ МДА/мг белка ЛНП	15,8±1,0	14,7±0,4	13,6±0,8	14,0±0,3	16,0±1,1	13,2±0,3*
Уровень продуктов ПОЛ в ЛНП после 30 мин окисления, нМ МДА/мг белка ЛНП	20,3±1,3	18,7±0,5	17,6±0,9	17,9±0,3	19,7±1,2	16,8±0,3*

Примечание: * — сравнения между 1 и 3 группами ($p < 0,05$).

Таблица 4

**Окислительные показатели в ЛНП в разных возрастных группах популяции мужчин
г. Новосибирска в зависимости от ИМТ ($M \pm m$)**

Показатели	1 группа (47-55 лет)		2 группа (55-64 лет)		3 группа (65-74 лет)	
	>25 кг/м ² (n=163)	<25 кг/м ² (n=86)	>25 кг/м ² (n=261)	<25 кг/м ² (n=140)	>25 кг/м ² (n=211)	<25 кг/м ² (n=127)
Исходный уровень продуктов ПОЛ в ЛНП, нМ МДА/мг белка ЛНП	2,1±0,1	2,3±0,2	2,1±0,1	1,9±0,1	1,9±0,1	1,9±0,1
Уровень продуктов ПОЛ в ЛНП после 3 мин окисления, нМ МДА/мг белка ЛНП	9,0±0,4	8,6±0,4	8,6±0,2	7,6±0,3	8,0±0,3	7,5±0,3
Уровень продуктов ПОЛ в ЛНП после 6 мин окисления, нМ МДА/мг белка ЛНП	11,6±0,4	11,2±0,4	11,1±0,3	9,8±0,3	10,5±0,3	9,8±0,4
Уровень продуктов ПОЛ в ЛНП после 15 мин окисления, нМ МДА/мг белка ЛНП	15,2±0,5	14,3±0,5	14,5±0,3	12,9±0,4	13,7±0,4*	13,0±0,5
Уровень продуктов ПОЛ в ЛНП после 30 мин окисления, нМ МДА/мг белка ЛНП	19,5±0,6	17,7±0,7	18,6±0,4	16,6±0,5	17,3±0,4*	16,6±0,6

Примечание: * — сравнения между 1 и 3 группами ($p < 0,05$).

не менее, в более старшей возрастной группе мужчин отмечены менее выраженные потенциально атерогенные окислительные изменения ЛНП (более низкий исходный уровень продуктов ПОЛ в ЛНП и более высокая резистентность ЛНП к окислению *in vitro*) в сравнении с более молодой возрастной группой мужчин. Полученные результаты указывают на значимое влияние возраста на указанные показатели

и отражают тенденцию к снижению с возрастом активности атерогенных окислительных процессов в ЛНП, аналогично нормализации липидного обмена в старческом возрасте и, особенно, при долгожительстве [10, 11].

Благодарности. Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта РНФ № 14-45-00030.

Литература

- Ishigaki Y, Oka Y, Katagiri H. Circulating oxidized LDL: a biomarker and a pathogenic factor. Curr. Opin. Lipidol., 2009; 20(5): 363-9.
- Yoshida H, Kisugi R. Mechanisms of LDL oxidation. Clin. Chim. Acta, 2010; 411(23-24): 1875-82.
- Ragino Yul, Malyutina SK, Kashtanova EV, et al. Oxidized low density lipoproteins and their association with some risk factors of atherosclerosis in the male population of Novosibirsk. Cardiology, 2005; 10 (45): 39-44. In Russian (Рагино Ю. И., Малутина С. К., Каштанова Е. В. и др. Окисленные липопротеины низкой плотности и их ассоциации с некоторыми факторами риска атеросклероза в популяции мужчин Новосибирска. Кардиология, 2005; 10 (45): 39-44).
- Stocker R, Keaney JF. New insights on oxidative stress in the artery wall. J. Thromb. Haemost. 2005; 3: 1825-34.
- Estronca LM, Silva JC, Sampaio JL, et al. Molecular etiology of atherogenesis — *in vitro* induction of lipidosis in macrophages with a new LDL model. PLoS One, 2012; 7(4): e34822.
- Vardi M, Levy NS, Levy AP. Vitamin E in the prevention of cardiovascular disease: the importance of proper patient selection. J. Lipid Res., 2013; 54(9): 2307-14.
- Yu Zou, Da-Hong Wang, Noriko Sakano, et al. Associations of Serum Retinol, α -Tocopherol, and γ -Tocopherol with Biomarkers among Healthy Japanese Men. Int. J. Environ. Res. Public Health, 2014; 11: 1647-60.
- Ragino Yul, Kashtanova EV. A simple method for estimating the concentration of vitamins E and A in the low-density lipoproteins. Clin. lab. diag., 2002; 12: 11-4. In Russian (Рагино Ю. И., Каштанова Е. В. Простой способ оценки концентрации витаминов E и A в липопротеинах низкой плотности. Клин. лаб. диаг., 2002; 12: 11-4).
- Ragino Yul, Krivchun AS, Ivanova MV, et al. Oxidation-antioxidant changes LDL and their association with certain risk factors of atherosclerosis in a men population of Novosibirsk. Russ J Cardiol, 2012; 3: 56-62. In Russian (Рагино Ю. И., Кривчун А. С., Иванова М. В. и др. Окислительно-антиоксидантные изменения липопротеинов низкой плотности и их ассоциации с некоторыми факторами риска атеросклероза в популяции мужчин Новосибирска. Российский кардиологический журнал, 2012; 3: 56-62).
- Nagasawa SY, Okamura T, Iso H, et al. Relation Between Serum Total Cholesterol Level and Cardiovascular Disease Stratified by Sex and Age Group: A Pooled Analysis of 65 594 Individuals From 10 Cohort Studies in Japan. J. Am. Heart. Assoc, 2012; 1 (5): e001974.
- Tereshina EV, Pleteneva OP, Osokin NE, et al. Dyslipidemia in older age groups: gender differences. Atherosclerosis, 2013, 9 (1): 14-20. In Russian (Терешина Е. В., Плетенева О. П., Осокина Н. Е. и др. Дислипидемии в старших возрастных группах: гендерные различия. Атеросклероз, 2013, 9 (1): 14-20).