SERUM GALEKTİN-3 VE DİFERANSİYE TİROİD KANSER İLİŞKİSİ

The Relation Between Serum Galectin-3 and Differential Thyroid Cancers

Tuba ÇANDAR[1](0000-0002-3922-5915), Zekiye HASBEK[2] (0000-0002-8119-3363), Gülhan DUMAN[3] (0000-0002-4057-5701), Seyit Ahmet ERTÜRK[2] (0000-0002-6030-9662), Ali ÇAKMAKCILAR[2] (0000-0002-8512-3207)

[1]Ufuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya AD, Ankara/Türkiye

[2]Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Nükleer Tıp AD, Sivas/Türkiye

[3]Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Endokrinoloji ve Metabolizma Bilim Dalı, Sivas/Türkiye

Tuba ÇANDAR, Dr. Öğr. Üyesi
Zekiye HASBEK, Doç. Dr.
Seyit Ahmet ERTÜRK, Araş. Gör.
Ali ÇAKMAKCILAR, Araş. Gör.
Gülhan DUMAN, Dr. Öğr. Üyesi

İletişim:
Dr. Öğretim Üyesi Tuba ÇANDAR
Ufuk Üniversitesi Tıp Fakültesi
Biyokimya Anabilim Dalı
Dr. Rıdvan Ege Hastanesi Mevlana Bulvarı No:84-86 B Blok 3. Kat
Balgat Çankaya/Ankara
Tel: 05324940890
e-mail:
tubacandar@msn.com

Geliş tarihi/Received: 28.10.2018
Kabul tarihi/Accepted: 14.12.2018
DOI: 10.16919/bozoktip.475555

Bozok Tıp Derg 2019;9(3):11-5
Bozok Med J 2019;9(3):11-5

ÖZET

Amaç: Diferensiye tiroid kanserli (DTK) hastalarda total tiroidektomi sonrası risk skorlamasına göre verilen I-131 (radyoiyot) ile ablasyon, tüm dünyada ve ülkemizde sıklıkla kullanılan bir tedavi yöntemidir. Kanser gelişimindeki rolü açıklanamamakla birlikte, Galektin-3'ün artmış ekspresyonunun tümör hücrelerinin adhezyon ve motilitelerini değiştirerek metastaz potansiyelini artırdıkları bildirilmektedir. Araştırmalara göre Galektin-3 (Gal-3) özellikle papiller tiroid kanserlerinde olmak üzere DTK'da pozitiftir.

Bu çalışmada amacımız, DTK nedeniyle total tiroidektomili, ardından yüksek doz radyoiyot ablasyon tedavisi alma amacı olan hastalarda ölçülen serum Galektin-3 (sGal-3) seviyelerinin, hastaların tüm vücut tarama sintigrafileri ile değerlendirilerek prognostik ilişkisinin varlığının araştırılmasıdır.

Gereç ve Yöntem: sGal-3 seviyeleri Abbott *i* sistem otoanalizörde çalışıldı. İyi prognoz göstergesi ve ablasyon başarısı; TSH stimüle durumda iken, serum Tg seviyeleri ölçülemeyecek kadar düşük düzeyde (stimüle Tg <1ng/ml veya non-stimüle Tg <0.2 ng/ml), normal fizik muayene bulguları ve/veya ablasyon sonrası 8-12. ayda yapılan düşük doz radyoiyot tüm vücut tarama sintigrafisi negatif olan, lenf nodu veya uzak metastaz ile uyumlu radyolojik ve klinik bulgusu olmayan olgular olarak kabul edildi.

Bulgular: Çalışmaya 48 hasta dahil edildi. Hastaların ikisinde sGal-3 seviyesi sınırda yüksek, diğerlerinde normaldi. İmmünohistokimyasal olarak Galectin-3 bakılan hastalardan 25'inde Galectin-3 pozitif iken, 23'ünde negatifti. İmmünohistokimyasal olarak bakılan Gal-3-ile sGal-3 seviyeleri arasında korelasyon yoktu (p=0.663). Ablasyon başarısı ile sGal-3 arasında anlamlı ilişki yoktu (p>0.05).

Sonuç: Bu çalışmada ablasyon başarısı ile sGal-3 düzeyleri arasında anlamlı ilişki bulunamadı. Bunun nedeni, sGal-3'ün tümör dokusundan kaynaklanması ve ancak sGal-3 ölçümü için yapılan örnekleme sırasında anlamlı tümör yükünün bulunmaması olabilir. Bu nedenle, sGal-3'ün normal seviyelerde olmasının iyi prognoz göstergesi olduğunu düşünmekteyiz.

Anahtar Kelimeler: *Galektin-3; Diferensiye tiroid kanserleri; Ablasyon; İmmünohistokimya*

ABSTRACT

Aim: I-131 (radioiodine) ablation following total thyroidectomy in patients with differential thyroid cancer (DTC) is a routine treatment method. Increased expression of Galectin-3 in tumor cells has been shown to alter adhesion and motility resulting with increased metastatic potential although its role in cancer development has not been demonstrated yet. Galectin-3 (Gal-3) was declared positive in DTC, especially in papillary thyroid carcinomas.

The aim of study is to investigate whether there is a prognostic association between serum Galectin-3 levels measured in patients with total thyroidectomy due to DTC, followed by high-dose radioiodine ablation therapy and whole body screening scintigraphy.

Materials and Methods: sGal-3 levels were studied in the Abbott *i* system autoanalyzer. Success of ablation and good prognosis were defined via too low Tg levels under TSH stimulation, normal physical examination findings and/or post-ablation negative low dose whole body radioiodine scintigraphy 8 to 12 months after ablation, absence of any findings suggesting lymph node and distant metastasis in radiological or clinical evaluation.

Findings: Forty-eight patients were included in the study. sGal-3 levels were within the normal range in whole patients of whom two had values close to upper limit.

Immunohistochemically, Galectin-3 was positive in 25 of the patients, whereas negative in other 23. There was no correlation between immunohistochemically evaluated levels of Gal-3 and sGal-3 (p = 0.663). The relationship between ablation success and sGal-3 was not statistically significant (p> 0.05).

Conclusion: There was no significant relationship between ablation success and sGal-3.

A possible explanation for this result might be excretion of sGal-3 from the tumor tissue and absence of tumour tissue at the time of sampling for sGal-3 in the study population. In conclusion, the authors suggest that sGal-3 is a good prognostic indicator when it is at normal levels during ablation.

Key words: *Galectin-3; Differential thyroid cancers; Ablation; Immunohistochemistry*

Bozok Tıp Derg 2019;9(3):11-5
Bozok Med J 2019;9(3):11-5

GİRİŞ

Tiroid kanserleri en sık görülen endokrin malignite olup, foliküler epitelyal hücrelerden köken alan diferensiye tiroid kanserleri (DTK), tüm tiroid kanserlerinin % 95'ten fazlasını oluşturur (1). Diferensiye tiroid kanserli hastalarda total tiroidektominin ardından risk skorlaması yapılarak verilen radyoiyot (131I) ile remnant ablasyon (RRA), tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de uygulanan bir tedavi yöntemidir. Diferensiye tiroid kanserlerinde, sitolojik olarak maligniteyi kesin gösteren veya ekarte edilebilen optimum bir test henüz yoktur. Bununla birlikte, birçok araştırma sonuçlarına göre immunohistokimyasal olarak bakılan Galektin-3 (ihGal-3), özellikle papiller tiroid kanserleri (PTK)'nde olmak üzere differensiye tiroid kanserlerinde pozitiftir (2). Kanser gelişimindeki rolü tam olarak bilinmemekle birlikte, Galektin-3'ün artmış ekspresyonunun tümör hücrelerinin adhezyon ve motilitelerini değiştirerek metastaz potansiyelini artırdıkları bildirilmektedir (3). Özellikle şüpheli tiroid nodüllerinde, operasyon öncesinde malignitenin ekarte edilmesi açısından tanısal değerlendirmedeki yeri konusunda araştırmalar yapılmaktadır (4). Ancak Galektin-3'ün tiroid malignitelerinde duyarlılığı yüksek olmakla birlikte özgüllüğü düşüktür.

Bu çalışmada amacımız, DTK nedeniyle total tiroidektomi olmuş, ardından yüksek doz radyoiyot ablasyon tedavisi alması amaçlanan hastalardan alınan örneklerde ölçülen serum Galektin-3 (sGal-3) seviyelerinin, hastaların tüm vücut tarama sintigrafileri ile birlikte değerlendirilerek ablasyon başarısı ve prognoz ile ilişkisinin olup olmadığının araştırılmasıdır.

GEREÇ VE YÖNTEM:

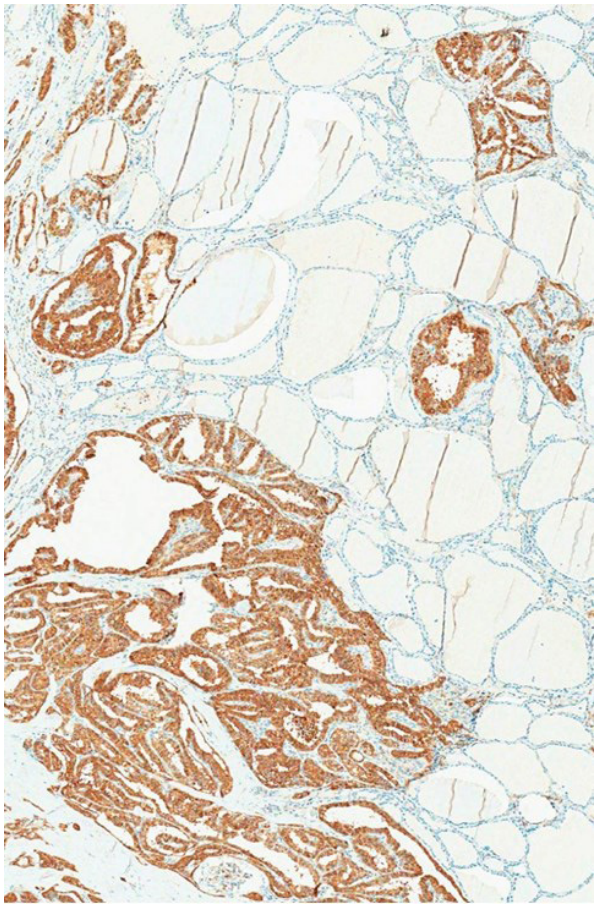
Bu çalışmaya Nükleer Tıp Anabilim Dalı'na DTK tanısıyla total tiroidektomi yapılmış ve yüksek doz ^{131}I tedavisi almak üzere gönderilen yaşları 25-73 olan (ort:47.35±11), 42 kadın, 6 erkek hasta olmak üzere 48 hasta dahil edildi. Cinsiyet ayrımı tiroid papiller ca'nın daha çok kadınlarda görülmesi ve literatürde ayırım bulunmaması nedeniyle önemli kabul edilmedi. Hastalardan başvuru sırasında kan örneği alındı, serumları ayrıldı ve sGal-3 seviyeleri bakılıncaya kadar -80^{0}C'de saklandı. Bu çalışma Helsinki Deklarasyonu prensiplerine uygun olarak yapıldı ve Etik Kurul onayı alındı.

Tüm hastalarda RRA öncesi en az dört hafta süreyle tiroid hormon replasman tedavisi kesildi ve iyotsuz diyet uygulandı. Radyoiyot remnant ablasyon sonrası 3-8. günlerde, anterior ve posteriordan tüm vücut tarama sintigrafisi (TVTS) yapıldı. Tüm vücut tarama sintigrafisi için tek-başlı gamma kamerada (Toshiba GCA-7100A) yüksek enerjili paralel delikli kolimatör kullanıldı (364 kEv-%20 enerji penceresi- 7cm/dk). Tüm hastalara RRA sonrası L-T4 replasman tedavisi başlandı. Çalışmaya dahil edilen hastaların hem radyoiyot remnant ablasyon sırasındaki hem de takipleri sırasındaki klinik, radyolojik ve laboratuvar verileri kaydedildi. Klinik takip için, fizik muayene, boyun ultrasonografi ve serum Tg, anti-TgAb, TSH, fT4 düzeylerine bakıldı. Radyoiyot remnant ablasyon sonrası 8-10. aylarda tanısal doz TVTS yapılan hastaların verileri de kaydedildi. TSH stimüle durumda iken, serum Tg seviyesinin dedekte edilemeyecek kadar düşük düzeyde olan (stimüle Tg <1ng/ml veya non-stimüle Tg <0.2 ng/ml,), normal fizik muayene bulguları ve/veya ablasyon sonrası 8-12. ayda yapılan düşük doz radyoiyot tüm vücut tarama sintigrafisi negatif olan, lenf nodu veya uzak metastaz ile uyumlu radyolojik ve klinik bulgusu olmayan hastalar, ablasyon başarılı ve iyi prognozlu olarak kabul edildi.

SGal-3 seviyeleri kemilüminesan mikropartikül immünolojik ölçüm prensibi kullanılarak Abbott i sistem otoanalizör kullanılarak çalışıldı. Serum Gal-3 seviyesi sağlıklı kontrol grubu planlaması yapılmadığından halihazırda kullanılan ölçüm yöntemi için sağlıklı bireylerde referans aralık üst sınırı olan 25.9 ng/mL üzeri pozitif olarak kabul edildi. İmmünohistokimyasal galektin-3 (ihGal-3) seviyeleri patoloji raporları taranarak elde edildi. Ventana, BechMark LT tam otomatik immünohistokimya boyama cihazı kullanılarak elde edilen sonuç için bir örnek resim sunuldu (Resim 1).

İstatistiksel Analiz:

İstatistiksel analizler SPSS versiyon 14.0 yazılımı kullanılarak yapıldı. İstatistiksel olarak sonuçların değerlendirilmesinde, ablasyon başarısı ve immünohistokimyasal olarak bakılan Gal-3 ile sGal-3'ün pozitif/negatif olması arasındaki fark bulunup bulunmadığı Ki-Kare testi kullanılarak karşılaştırıldı. P-değerinin <0.05 olması durumunda istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



Resim 1. Ventana, BechMark LT tam otomatik immünohistokimya boyama cihazı ile immünohistokimyasal galektin-3 (ihGal-3) görüntüsü

BULGULAR

Çalışmaya yaşları 25-73 olan (ort:47.35±11), 42 kadın (% 87), 6 erkek (% 13) hasta olmak üzere 48 papiller tiroid kanser hastası dahil edildi. Hastalardan 18'i (% 37.5) mikrokarsinom, 12'si folliküler varyant (% 25), 11'i (% 22.9) klasik varyant ve yedisi (% 14.6) enkapsüle foliküler varyant alt grubundaydı. Median tümör boyutu 12.5 mm idi (range: 2-60mm). Tümör boyutu ile ihGal-3'ün ve sGal-3'ün pozitif/negatif olması arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık yoktu (p=0.454 ve p=0.363, sırasıyla). Ablasyon sırasında 100-200 mCi arasında dozlar uygulandı. 48 hastadan yalnızca ikisinde sGal-3 seviyesi sınırda yüksek olarak bulundu. Ancak diğer tüm hastalarda sGal-3 seviyeleri normaldi. Çalışmaya dahil edilen hastalardan 10'unda ihGal-3 bakılmamış olup, ihGal-3 bakılan hastalardan 25'inde (% 52.1) galektin-3 pozitif iken, 13'ünde (% 27.1) negatifti. Tanı anında hastalardan altısında lenf nodu metastazı vardı. Bu hastaların tamamında sGal-3 negatifti. Ancak bu hastalardan yalnızca iki tanesinde ihGal-3 bakılmış olup, onlarda da pozitif olarak bulundu. İmmünhistokimyasal olarak bakılan Gal-3-ile sGal-3'ün pozitif/negatif olup olmaması arasındaki ilişki değerlendirildiğinde; ihGal-3'ün negatif veya pozitif olduğu toplam 46 hastanın tamamında sGal-3 negatifti (p=0.019) (Tablo 1). sGal-3 pozitif olan iki hastada ise ne yazık ki ihGal-3 çalışılmamıştı. Hastalardan 3'ünde 8-10 ay sonra düşük doz RAI ile tüm vücut taraması yapılamamış olmakla birlikte, tüm hastalar dikkate alındığında takipte median serum Tg düzeyi 0.02 ng/mL (range:0.02-0.39 ng/mL) (AntiTg negatif iken) idi. Ablasyon başarısı ile sGal-3 arasında anlamlı ilişki yoktu (p=0.812).

Tablo 1; Serum Galektin-3 (sGal-3) ve immünohistokimyasal olarak bakılan Galektin-3 (ihGal-3)'ün pozitif/negatif olup olmaması arasındaki ilişki

		sGal-3	
		Pozitif	Negatif
ihGal-3	Pozitif	0	25 (%100)
	Negatif	0	13 (%100)
	Çalışılmadı	2 (%20)	8 (%80)

TARTIŞMA

Literatürde, Galektin-3 gibi immunohistokimyasal boyaların, kanser deteksiyonu için spesifitesinin yüksek ancak sensitivitesinin düşük olduğunu gösteren çok sayıda çalışma mevcuttur (5). Galektin-3 ekspresyonunun özellikle, gastrointestinal sistem, santral sinir sistemi, baş ve boyun, meme, pankreas, uterus, mesane, dil ve tiroid kanserlerinde arttığı bilinmektedir (6). Tiroid malignitelerinden, özellikle papiller karsinomlarda Gal-3 ekspresyonunun arttığı ve benign lezyonlardan ayırıcı tanıda kullanılabileceği ifade edilmiştir. Kovács ve ark. (7) 91 hastada yaptıkları çalışmada, papiller tiroid kanseri olan 20 hastanın 19'unda güçlü ihGal-3 ekspresyonu olduğunu, oysa foliküler tiroid kanseri olan 10 hastanın üçünde ihGal-3 ekspresyonunun negatif olduğunu bulmuşlardır. Aynı çalışmada, 19 folliküler adenoma olan hastanın

dördünde fokal pozitiflik varken, nodüler guatr ve normal tiroid dokusu olan tüm hastalarda ihGal-3 negatif olarak bulunmuştur. Al-Sharaky ve ark. (8), tiroid karsinomanın teşhisinde, Gal-3'ün Glypican-3'e göre daha sensitif olduğunu, buna rağmen, Glypican-3'ün Gal-3'e göre foliküler paternde malignitelerin ayrımında daha spesifik olduğunu ve tiroid karsinomunu tiroid adenomundan ayırmada tanısal doğruluğu % 87,5 olarak rapor etmişlerdir. Gal-3 gibi biyobelirteçlerin PTK'lerinin prognozu açısından önemi net değildir. Selemetjev ve ark. (9), PTK hastalarında Gal-3 ekspresyonunun anaplastik tiroid kanserlerine göre daha yüksek olduğunu buldular. Aynı çalışmada survinin ekspresyonunun ise anaplastik tiroid kanserlerinde daha yüksek olduğunu ve Gal-3'ün tümörün ilerlemiş evresi ve lenf nodu metastazı varlığı ile korelasyonu olmadığını buldular. Türköz ve arkadaşları (10) ise, lenf nodu metastazı olanlarda Gal-3 ekspresyonunun daha az sıklıkta olduğunu, primer tümörün lokal invazivlik derecesi arttıkça, tümör hücrelerinde Gal-3 ekspresyonunun şiddetinin azaldığını ve primer odağın metastatik potansiyeli arttıkça, tümör hücrelerinin Gal-3 ekspresyonunun şiddetinin azaldığını göstermişlerdir. Bizim çalışmamızda tanı anında hastalardan altısında lenf nodu metastazı vardı. Bu hastaların tamamında sGal-3 negatifti. Ancak bu hastalardan yalnızca 2 tanesinde ihGal-3 bakılmış olup, onlarda da pozitif olarak bulundu. Koo ve ark (11), DTK'ların daha agresif seyir gösterdiği alt grubu olan diffüz sklerozan papiller kanserlerde Gal-3 ekspresyonunun prevalansının daha düşük olduğunu göstermişlerdir.

İmmunhistokimyasal olarak bakılan Gal-3'ün, klasik PTK'nin teşhisinde yardımcı olabileceği bilinmektedir. Bununla birlikte serum Gal-3 seviyelerinin DTK tanısı ve prognozunu göstermek açısından nadir çalışmalar vardır. Inohara ve ark. (12), PTK'lerinde serum Gal-3'ün diğer tiroid nodülleri olan hastalara göre daha yüksek olduğunu, benign tiroid nodülleri ve sağlıklı bireyler arasında ise fark olmadığını buldular. Xue ve ark. (13) serumda Gal-3'ün pozitif olmasının tiroid malignitelerinin teşhisinde kullanılabileceğini bildirdiler. Oysa Makki ve ark. (14), benign tiroid nodülleri olan hastalar ile PTK olan hastaların serum Gal-3 düzeyleri arasında anlamlı fark olmadığını buldular. Benzer şekilde Išić ve arkadaşları da (15), serum Gal-3'ün tiroid malignitelerinin tespitinde güvenilir bir belirteç olarak kullanılamayacağını rapor ettiler. Bizim bu çalışmada amacımız, serum Galektin-3 seviyelerinin ablasyon başarısı ve prognoz ile ilişkisinin olup olmadığının araştırmaktı. Henüz ön verilerini sunduğumuz bu çalışmamızda sonuç olarak, ihGal-3 pozitif olan hastalarda bile sGal-3 seviyeleri negatif olarak bulundu. Ayrıca ablasyon başarısı ile sGal-3 arasında anlamlı ilişki bulunmadı. Bunun nedeninin, sGal-3'ün vücutta tümör varlığı durumunda yükseldiği ve bizim hasta grubumuzda, ablasyon sırasında anlamlı tümör yükü olmamasından kaynaklandığı, bu nedenle, sGal-3'ün ablasyon sırasında normal seviyelerde olmasının iyi prognoz göstergesi olduğunu düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

1. R. Görges. The Changing Epidemiology of Thyroid Cancer. In: H.-J. Biersack F. Grünwald, Eds. Thyroid Cancer. Springer Science+Business Media, Germany, 2005.p:3-21.

2. Fernández PL, Merino MJ, Gómez M, Campo E, Medina T, Castronovo V, Sanjuán X, Cardesa A, Liu FT, Sobel ME. Galectin-3 and laminin expression in neoplastic and non-neoplastic thyroid tissue. J Pathol. 1997;181(1):80-6.

3. Liu Z, Li X, Shi L, Maimaiti Y, Chen T, Li Z, Wang S, Xiong Y, Guo H, He W, Liu C, Nie X, Zeng W, Huang T. Cytokeratin 19, thyroperoxidase, HBME-1 and Galectin-3 in evaluation of aggressive behavior of papillary thyroid carcinoma. Int J Clin Exp Med. 2014,15;7(8):2304-8.

4. Maruta J, Hashimoto H, Yamashita H, Yamashita H, Noguchi S. Immunostaining of Galectin-3 and CD44v6 using fine-needle aspiration for distinguishing follicular carcinoma from adenoma. Diagn Cytopathol. 2004;31(6):392-6.

5. Haugen BR, Alexander EK, Bible KC, Doherty GM, Mandel SJ, Nikiforov YE, Pacini F, Randolph GW, Sawka AM, Schlumberger M, Schuff KG, Sherman SI, Sosa JA, Steward DL, Tuttle RM, Wartofsky L. 2015 American Thyroid Association Management Guidelines for Adult Patients with Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer: The American Thyroid Association Guidelines Task Force on Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer. Thyroid. 2016;26(1):1-133.

6. Yılmaz E, Karşıdağ T, Tatar C, Tüzün S. Serum Galectin-3: diagnostic value for papillary thyroid carcinoma. Ulus Cerrahi Derg. 2015, 9;31(4):192-6.

7. Kovács RB, Földes J, Winkler G, Bodó M, Sápi Z. The investigation of Galectin-3 in diseases of the thyroid gland. Eur J Endocrinol. 2003;149(5):449-53.

8. Al-Sharaky DR, Younes SF. Sensitivity and Specificity of Galectin-3 and Glypican-3 in Follicular-Patterned and Other Thyroid Neoplasms. J Clin Diagn Res. 2016;10(3):EC06-10.

9. Selemetjev SA, Savin SB, Paunovic IR, Tatic SB, Cvejic D. Changes in the expression pattern of apoptotic molecules (Galectin-3, Bcl-2,

Bax, survivin) during progression of thyroid malignancy and their clinical significance. Wien Klin Wochenschr. 2015;127(9-10):337-44.
10. Türköz HK, Oksüz H, Yurdakul Z, Ozcan D. Galectin-3 expression in tumor progression and metastasis of papillary thyroid carcinoma. Endocr Pathol. 2008;19(2):92-6.
11. Koo JS, Shin E, Hong SW. Immunohistochemical characteristics ofdiffuse sclerosing variant of papillary carcinoma: comparison with con-ventional papillary carcinoma. Acta Pathol, Microbiol Immunol Scand. 2010;118:744–52.
12. Inohara H, Segawa T, Miyauchi A, Yoshii T, Nakahara S, Raz A, Maeda M, Miyoshi E, Kinoshita N, Yoshida H, Furukawa M, Takenaka Y, Takamura Y, Ito Y, Taniguchi N. Cytoplasmic and serum Galectin-3 in diagnosis of thyroid malignancies. Biochem Biophys Res Commun. 2008, 21;376(3):605-10.
13. Xue G, Liu J, Huang J, Zhang J, Zhang W, Wu J, Shang X. Detection of Galectin-3 in both serum and tissue for early diagnosis of thyroid carcinoma. Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao. 2013;33(7):1027-30.
14. Makki FM, Taylor SM, Shahnavaz A, Leslie A, Gallant J, Douglas S, Teh E, Trites J, Bullock M, Inglis K, Pinto DM, Hart RD. Serum biomarkers of papillary thyroid cancer. J Otolaryngol Head Neck Surg. 2013, 7;42:16.
15. Išić T, Savin S, Cvejić D, Marečko I, Tatić S, Havelka M, Paunović I. Serum Cyfra 21.1 and Galectin-3 protein levels in relation to immunohistochemical cytokeratin 19 and Galectin-3 expression in patients with thyroid tumors. J Cancer Res Clin Oncol. 2010;136(12):1805-12.