

нальному чорнилопишучому
50 мм/сек.

у білих щурів за методом
10%-ного розчину хлористого
включали електрокардіограф,
щоб та її латентного періоду
едення хлористого кальцію

х і значної кількості піддос-
100% випадків розвивалась
Зменшення частоти її виник-
протязі одного, двох і п'яти
білих щурів 4, 10, 13, 14, 15

серії тварин ($25 \pm 3,16$ сек);
сек (13 серія), досягаючи

урів дорівнював $8 \pm 3,17$ сек.
шості тварин, яким вводили
ким вводили МК, — більшою.

12—21) на фібриляцію

№	Загальна тривалість діяльнос- ті серця в сек	
	M+m	p
	125 ± 31,4	—
05	91 ± 31,7	<0,5
01	66 ± 3,6	<0,25
25	213 ± 85,2	<0,5
5	203 ± 42,1	<0,25
01	140 ± 55,8	>0,5
05	93 ± 22,2	>0,5
05	118 ± 31,0	>0,5
25	131 ± 38,7	>0,5
25	600 ± 207,1	<0,1
05	920 ± 342,5	<0,05
01	88 ± 13,4	<0,5
25	176 ± 42,6	<0,5
05	254 ± 80,3	<0,25
01	184 ± 23,9	<0,25
1	110 ± 22,8	>0,5
02	183 ± 55,6	<0,5
01	142 ± 93,6	>0,5
1	114 ± 19,9	>0,5
02	90 ± 20,0	<0,5
01	76 ± 3,8	<0,25

ний ритм, як правило, не
я, частота яких поступово
введення хлористого каль-
їдних тварин була значно
яким вводили на протязі
де у щурів, яким вводили
еншою, ніж у контрольних

Обговорення результатів досліджень

Проведені досліди показують, що ДТ і МК виразно впливають на діяльність серця при експериментальній фібриляції його шлуночків. На це вказують зміни тривалості латентного періоду фібриляції, частоти виникнення і тривалості її, а також ЗТД у білих щурів, яким перед введенням хлористого кальцію на протязі одного — п'яти днів вводили в шлунок ДТ або МК. Результати дослідів дають підстави вважати, що здатність ДТ і МК викликати всі згадані зміни в діяльності серця зумовлена їх безпосереднім впливом на міокард, а не рівнем антитиреоїдної активності, яка, як відомо [3, 6, 7, 8], дуже висока у МК і низька у ДТ. На міокард ці речовини, очевидно, діють неоднаково: так, великі дози ДТ (100 мг/кг) не змінюють частоти виникнення експериментальної фібриляції, але збільшують латентний період фібриляції і ЗТД; такі ж дози МК, навпаки, зменшують частоту виникнення фібриляції, латентний період її за ЗТД, що дає підстави вважати вплив ДТ на міокард менш токсичним, ніж вплив МК.

Висновки

1. Введення в шлунок білим щурам 20 і 100 мг/кг дейодтирозину або 25 і 100 мг/кг мерказолілу зменшує частоту виникнення смертельної фібриляції шлуночків серця, викликаній внутрішнім введенням хлористого кальцію.
2. Після введення білим щурам дейодтирозину і мерказолілу змінювалась тривалість експериментальної фібриляції шлуночків серця і латентного періоду її.
3. Введення білим щурам великих доз дейодтирозину збільшувало загальну тривалість серцевої діяльності від моменту введення хлористого кальцію.

Література

1. Баранов В. Г., Драчинская Е. В., Давидовский Н. М.—Вестник хирургии, 1956, 12, 86.
2. Баранов В. Г., Благосклонная Я. В., Николаенко Н. Ф., Степанов Г. С.—Терапевт. архив, 1964, 36, 2, 110.
3. Кабак Я. М., Симон И. Б., Коникова А. С.—ДАН СССР, 1954, 94, 6, 1193.
4. Клячко В. Р., Славина Л. С., Вольнова М. К.—Пробл. эндокринолог., 1967, 3, 56.
5. Сахарчук И. И.—Врач. дело, 1959, 7, 753.
6. Симон И. Б., Ковтуновская-Левшина И. И.—В кн.: Тиоловые соединения в медицине, К., 1959, 193.
7. Шерешевский Н. А.—Клин. эндокринолог., М., 1957.
8. Шерешевский Н. А.—Тиреотоксикозы, М., 1962.
9. Malinow M., Batlle F., Malamud B.—Circulation Res., 1953, 1, 554.

Надійшла до редакції
10.XI 1971 р.

УДК 591.147.6

ВПЛИВ АДРЕНАЛІНУ НА АКТИВНІСТЬ ДЕПОЛІМЕРАЗ НУКЛЕІНОВИХ КИСЛОТ ОКРЕМИХ ДІЛЯНОК ГОЛОВНОГО МОЗКУ АДРЕНАЛЕКТОМОВАНИХ КРОЛИКІВ

А. Г. Хмелько

Лабораторія нейроендокринології Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця АН УРСР,
Київ

Наші раніше проведені дослідження [5—8] показали, що сумарний вміст РНК і кількість ДНК в окремих ділянках центральної нервової системи залежать від функціонального стану надниркових залоз. Встановлено, що найбільш чутливою до гормональних зрушень стероїдів в організмі є гіпоталамічна область. Водночас слід відзначити, що в усіх досліджуваних ділянках центральної нервової системи (сіра, біла речовина, мозочок, гіпокамп) спостерігались коливання сумарного вмісту нуклеїнових кислот, які залежать від рівня гормонів надниркових залоз в організмі. Одер-

жані дані послужили підставою для вивчення активності ферментів перетворення нуклеїнових кислот у центральній нервовій системі.

Відомо, що деполімерази беруть участь у гідролізі полінуклеотидів. Гідроліз їх супроводжується розривом складних ефірних зв'язків, які йдуть від залишків фосфорної кислоти до спиртових груп пентози. Рибонуклеазна активність виявлена в цілому ряді тканин і органів тварин [1, 2].

Ми вивчали так звані кислі деполімерази мозку — рибонуклеазу і дезоксирибонуклеазу, які проявляють свою активність у кислому середовищі, при рН 5,6—5,2 відповідно.

Підставою для вивчення саме цих ферментів послужили дослідження, які показали, що активність рибонуклеази і дезоксирибонуклеази в мозку при рН у кислій зоні у кілька разів вища, ніж у лужній [1].

Методика досліджень

Досліди провадили на кроликах вагою 2,0—2,5 кг. Одна група тварин служила контролем, друга зазнала адrenaлектомії, третя — адrenaлектомії та введення адреналіну. Адреналін вводили на десятій день після видалення надниркових залоз.

Активність рибонуклеази і дезоксирибонуклеази визначали у кроликів через десять днів після адrenaлектомії і в третій серії — у адrenaлектомованих кроликів через 1 год після внутрішнього введення адреналіну в дозі 0,02 мг/кг. Активність ферментів визначали в сірій і білій речовині головного мозку, гіпоталамічній ділянці, гіпокампі і мозочку. Для порівняння з іншими тканинами активність деполімераз досліджували і в екстрактах печінки піддослідних тварин. Про активність ферментів судили за оптичною щільністю продуктів розпаду відповідних субстратів при використанні осаджувачів — хлорнокислого барію в етиловому спирті (для рибонуклеази [10]) і хлорної кислоти (для дезоксирибонуклеази [9]).

Оптичну щільність визначали на спектрофотометрі СФ-4А при довжині хвиль 270 і 290 мкм [4]. Визначення продуктів розпаду проводилось за фосфорними залишками після перерахування із застосуванням коефіцієнта для фосфору.

Суміш для визначення активності ферментів складалась: для рибонуклеази — з 1 мл 0,1 М ацетатного буфера, рН 5,6; 0,5 субстрату (0,2%-ний розчин лондонського препарату РНК фірми Лоусон Кемікалс) і 1 мл екстракту тканини; для дезоксирибонуклеази — з 1 мл 0,1 М ацетатного буфера, рН 5,2; 0,5 мл субстрату (0,2%-ного розчину препарату високополімерної ДНК фірми Ренал) і 1 мл тканинного екстракту. Досліджувані суміші ставили на 2 год в термостат при температурі 37°С, після чого припиняли ферментативну реакцію додаванням осаджувачів. При визначенні активності ДНКаз до суміші додавали 1,0 мл 12%-ного розчину хлорної кислоти. При визначенні активності РНКаз брали 1 мл досліджуваної суміші, вливали в 5 мл охолодженого розчину осаджувача (5 мл 83,5%-ного Ва (ClO₄)₂ і 10 мл ізопропанолу, доведених до 100 мл етанолом). Контролем завжди були ті самі ферментні суміші без попередньої інкубації.

Активність ферментів виражали за фосфором після перерахунку із застосуванням коефіцієнта Спірина [4] в мг/мг білка тканини. Білок визначали мікрометодом Лоурі з співавторами [11]. У таблицях наведені дані, одержані при визначенні оптичної щільності. Весь цифровий матеріал оброблений статистично за методом Манцевичюте-Ерінгене [3].

Результати досліджень

Середні дані по вивченню деполімераз у мозку і печінці кроликів у нормі, при адrenaлектомії та при введенні адреналіну на фоні адrenaлектомії наведені в табл. 1. У зведеній табл. 2 представлені середні дані по визначенню вмісту білка в нормі, при адrenaлектомії і після введення адреналіну.

Як видно з табл. 1, активність РНКаз в нормі у два — півтора рази більше активності ДНКаз в тканинах мозку і печінки. У печінці активність полімераз значно вища в порівнянні з тканиною мозку. У мозку активність ферментів не в усіх тканинах однакова, хоч рівень активності, в основному, ідентичний. Найвища активність виявлена в гіпоталамічній області: РНКаз — 66,13 мг РНК/мг білка і ДНКаз — 26,00 мг ДНК/мг білка. Активність у сірій речовині кори головного мозку, гіпокампі і мозочку однотипна і коливається в межах 66—61 мг РНК/мг білка РНКаз та 27—36 мг ДНК/мг білка для ДНКаз.

Визначення білка (табл. 2) показало, що в нормі в досліджуваних тканинах мозку вміст білка коливався від 31,18 мг білка/г тканини до 24,96 мг білка/г тканини.

У адrenaлектомованих кроликів виявлені зміни активності деполімераз мозку і печінки. Нашими дослідженнями встановлено зниження активності ДНКаз в гіпоталамічній області, гіпокампі і білій речовині головного мозку. У печінці в цей час спостерігалось підвищення активності як РНКаз, так і ДНКаз. Паралельне визначення вмісту білка в досліджуваних тканинах показало, що в печінці він збільшився,

Таблиця 1
Активність деполімераз (РНКаз і ДНКаз в мг Р/мг білка тканини) мозку (сіра, біла речовина, гіпоталамічна область, гіпокамп, мозочок) і печінки кроликів у нормі, після адrenaлектомії і введення адреналіну

Сіра речовина	Біла речовина	Гіпоталамічна область	Гіпокамп	Мозочок	Печінка
---------------	---------------	-----------------------	----------	---------	---------

і ферментів перетворення

полінуклеотидів. Гідроліз їх
кі йдуть від залишків фос-
на активність виявлена в

рибонуклеазу і дезоксирибо-
сердовиці, при рН 5,6—5,2

жили дослідження, які пока-
в мозку при рН у кислій

Одна група тварин служила
лектомії та введення адрена-
ння надниркових залоз.
изначали у кроликів через
адреналектомованих кроликів
дозі 0,02 мл/кг. Активність
мозку, гіпоталамічній ділянці,
ами активність деполімераз
и. Про активність ферментів
відних субстратів при вико-
ду спирті (для рибонуклеази

СФ-4А при довжині хвиль
илось за фосфорними залиш-
для фосфору.
алась: для рибонуклеази — з
1,2%-ний розчин лондонського
тракту тканини; для дез-
рН 5,2; 0,5 мл субстрату
ірни Ренал) і 1 мл тканин-
в термостат при температурі
даванням осаджувачів. При
мл 12%-ного розчину хлорної
д досліджуваної суміші, вли-
3,5%-ного Ва (ClO₄)₂ і 10 мл
ем завжди були ті самі фер-

перерахунку із застосуванням
изначали мікрометодом Лоурі
ні при визначенні оптичної
чно за методом Манцевичюте-

печінці кроликів у нормі, при
налектомії наведені в табл. 1.
аченню вмісту білка в нормі,

у два — півтора рази більше
ні активність полімераз знач-
тивність ферментів не в усіх
і, ідентичний. Найвища актив-
мг РНК/мг білка і ДНКаз —
ри головного мозку, гіпокампі
мг РНК/мг білка РНКаз та

і в досліджуваних тканинах
и до 24,96 мг білка/г тканини.
ктивності деполімераз мозку і
активності ДНКаз в гіпота-
мозку. У печінці в цей час
і ДНКаз. Паралельне визна-
що в печінці він збільшився,

Таблиця 1
Активність деполімераз (РНКаз і ДНКаз в мг Р/мг білка тканини) мозку (сіра, біла речовина, гіпоталамічна область, гіпокамп, мозочок) і печінки кроликів у нормі, після адреналектомії і введення адреналіну

	Сіра речовина		Біла речовина		Гіпоталамічна область		Гіпокамп		Мозочок		Печінка	
	РНКаз	ДНКаз	РНКаз	ДНКаз	РНКаз	ДНКаз	РНКаз	ДНКаз	РНКаз	ДНКаз	РНКаз	ДНКаз
Норма												
n	16	14	14	14	14	14	14	13	16	16	13	13
M	63,06	32,95	26,00	66,13	31,33	61,75	36,08	27,95	61,33	27,95	41,43	28,90
± m	5,76	1,60	2,34	5,08	2,21	2,81	2,79	3,43	3,01	3,43	2,18	2,03
Адреналектомія (10 днів)												
n	11	10	10	10	9	10	11	10	9	9	11	9
M	64,85	35,59	18,41	63,55	19,84	65,19	23,24	63,12	25,53	50,65	39,84	39,84
± m	4,70	5,55	2,32	4,78	3,23	4,81	3,58	6,21	4,14	5,43	3,19	3,19
p	>0,1	>0,1	<0,01	>0,1	<0,01	>0,1	<0,01	>0,1	>0,1	>0,1	>0,1	<0,1
Введення адреналіну адреналектомованим кроликам												
n	10	8	11	9	10	8	9	9	9	9	10	8
M	10,11	46,75	8,47	17,72	20,99	8,63	27,17	9,06	13,14	15,65	45,74	45,74
± m	2,36	5,87	1,66	2,43	2,70	1,53	2,22	1,46	3,11	1,88	7,01	7,01
p	0,001	0,01	0,001	0,01	0,01	0,001	0,01	0,001	0,001	0,001	0,001	0,01

а у сірій речовині головного мозку дещо зменшився. В інших тканинах мозку коливання у вмісті білка і активності деполімераз залишались у межах норми.

Через 1 год після введення в організм кролика адреналіну спостерігалось різке зниження активності РНКази в усіх досліджуваних тканинах мозку і печінки.

Таблиця 2

Вміст білка в мг/г тканини в мозку (сіра, біла речовина, гіпоталамічна область, гіпокамп, мозочок) і печінці у нормальних, адреналектомованих кроликів і після введення адреналіну в дозі 0,02 мл/кг

	Сіра речовина	Біла речовина	Гіпоталамічна область	Гіпокамп	Мозочок	Печінка
Норма						
<i>n</i>	13	14	12	15	13	16
<i>M</i>	31,16	26,60	26,08	30,83	24,96	72,40
$\pm m$	1,06	1,15	2,03	1,36	0,69	3,34
Адреналектомія (10 днів)						
<i>n</i>	12	11	10	11	11	11
<i>M</i>	25,43	23,43	27,00	27,22	24,73	87,09
$\pm m$	1,69	0,93	2,01	1,70	0,89	8,25
<i>p</i>	<0,001	>0,01	>0,01	>0,01	>0,01	>0,01
Введення адреналіну адреналектомованим кроликам						
<i>n</i>	11	11	11	11	11	11
<i>M</i>	39,72	34,45	34,45	40,12	38,18	93,72
$\pm m$	4,73	2,32	2,29	2,39	1,37	2,64
<i>p</i>	>0,01	<0,001	<0,01	<0,01	<0,001	<0,001

Активність ДНКази знизилась у гіпоталамічній області, гіпокампі, мозочку і білій речовині головного мозку. У сірій речовині відзначалось підвищення активності цього ферменту.

Аналіз наших даних показав, що введення адреналіну супроводжується збільшенням вмісту білка, можливо відносного характеру, в усіх досліджуваних тканинах мозку і печінки.

Одержаний матеріал свідчить про те, що гормони надниркових залоз беруть участь в активації деполімераз.

Порівняння раніше одержаних нами результатів дослідження ролі надниркових залоз у регуляції сумарного вмісту РНК і кількості ДНК в цих же тканинах з активністю деполімераз в умовах певної функціональної активності надниркових залоз не зводиться тільки до регуляції активності деполімераз, а має ще й інші точки прикладання в механізмі регуляції нуклеїнового обміну.

Наведені дані вказують на глибоку патологію, що розвивається при дисфункції надниркових залоз в організмі, і дозволяють пов'язувати раніше виявлені зміни у вмісті сумарної РНК та кількості ДНК при наднирковій недостатності з пригніченням активності деполімераз у досліджуваних тканинах центральної нервової системи і в печінці.

Висновки

1. Ферменти нуклеїнового обміну РНКази і ДНКази окремих тканин головного мозку (сіра, біла речовина головного мозку, гіпоталамічна область, гіпокамп, мозочок) і печінки чутливі до змін рівня гормонів надниркових залоз в організмі кроликів.

2. Видалення надниркових залоз приводить до зниження каталітичної активності ДНКази в білій речовині головного мозку, гіпоталамічній області і гіпокампі; в печінці активність деполімераз підвищується.

3. Введення адреналіну адреналектомованим кроликам різко знижує активність РНКази в усіх досліджуваних тканинах мозку і печінки. Активність ДНКази знижується в усіх тканинах крім сірої речовини головного мозку і печінки, де спостерігається підвищення активності ферменту.

1. Бабій Т. П., Сквир
2. Епштейн С. Ф.—
3. Манцевичуте-Эр
4. Спирин А. С.—Би
5. Хмелько А. Г.—Ф
6. Хмелько А. Г.—Ф
7. Хмелько А. Г.—Ф
8. Хмелько А. Г.—Ф
9. De Duve C., Pro
- mans F.—Biochem.
10. Fiers W., Stockx
11. Lowry O., Rosen

193, 265.

НА ОКИСНЕННІ У ДЕЯКИХ ВІД

Лабораторія обміну речовин

Літературні дані вказують на те, що в головному мозку, які працюють свідчать про вплив гідрокортизону [2, 5], зокрема про дію стероїдних гормонів у процесі перетворення біогенних амінів в оксидоредуктази, дезамінування до альдегідів, що вивчається в центральній нервовій системі.

Ми досліджували вплив гідрокортизону на білий, сірий речовини півкулі, а також печінки кроликів.

Досліди проведені на кроликах. Моноаміноксидазу вивчали в інкубації одного з субстратів — 10%-ним гомогенатом мозку (1 мл) у кисневій атмосфері при 37°C. Після закінчення інкубації, відокремлювали центрифугу за методом Конвея з кислоти [1].

Було досліджено вплив гідрокортизону на активність ферменту з розрахунку 5 мг/кг. Активність ферменту вивчали в присутності кортикостероїду. Вивчали вплив гідрокортизону протягом дня по 10 мг на протязі 3-6 год. В досліді використано ментальні дані оброблені с

Результати

Активність ферменту вивчали в присутності гідрокортизону через 3—6 год після введення гідрокортизону в контрольних тварин, особливо в моноаміноксидазу активність моноаміноксидазу збільшувалась у порівнянні з контролем.

інших тканинах мозку коли-
ть у межах норми.
еналіну спостерігалось різке
инах мозку і печінки.

Таблиця 2

на, гіпоталамічна область,
ектомованих кроликів

12 мл/кг

Мозочок	Печінка
13	16
24,96	72,40
0,69	3,34
11	11
24,73	87,09
0,89	8,25
>0,01	>0,01
кроликам	
11	11
38,18	93,72
1,37	2,64
<0,001	<0,001

сті, гіпокампі, мозочку і
ють підвищення активності

ну супроводжується збіль-
іх досліджуваних тканинах

надниркових залоз беруть

ідження ролі надниркових
К в цих же тканинах з
активності надниркових
аз, а має ще й інші точки

звивається при дисфункції
раніше виявлені зміни у
недостатності з пригнічен-
тральної нервової системи

окремих тканин головного
область, гіпокамп, мозо-
их залоз в організмі кро-

ія каталітичної активності
області і гіпокампі; в пе-

різко знижує активність
ивність ДНКаз знижуєть-
печінки, де спостерігається

Література

1. Бабій Т. П., Сквирська Є. В.—Укр. біохім. журн., 1962, XXXIV, 6.
2. Епштейн С. Ф.—Укр. біохім. журн., 1964, XXXVI, 6.
3. Манцевичуте-Эрингене Е.—Экспер. терап. и патол., 1964, 4.
4. Спирин А. С.—Биохимия, 1958, 23, 656.
5. Хмелько А. Г.—Фізіол. журн. АН УРСР, 1969, 5.
6. Хмелько А. Г.—Фізіол. журн. АН УРСР, 1970, 3.
7. Хмелько А. Г.—Фізіол. журн. АН УРСР, 1971, 2.
8. Хмелько А. Г.—Фізіол. журн. АН УРСР, 1971, 5.
9. De Duve C., Pressman B., Gianetto R., Wattiaux R., Appel-
mans F.—Biochem. J., 1955, 60, 604.
10. Fiers W., Stockx J.—Naturwissenschaften, 1957, 44, 115.
11. Lowry O., Rosenbrough N., Farr A., Randall R.—Biol. chem., 1951,
193, 265.

Надійшла до редакції
31.I 1972 р.

УДК 612.8.015:615.361.45—092

ВПЛИВ ГІДРОКОРТИЗОНУ НА ОКИСНЕ ДЕЗАМІНУВАННЯ БІОГЕННИХ АМІНІВ У ДЕЯКИХ ВІДДІЛАХ МОЗКУ ТА ПЕЧІНЦІ КРОЛИКІВ

О. М. Баликіна

Лабораторія обміну речовин Київського інституту ендокринології та обміну речовин

Літературні дані вказують на складність і різноманітність метаболічних ефектів у головному мозку, які виникають після введення кортикостероїдів [7, 16]. Деякі праці свідчать про вплив гормонів кори надниркових залоз на обмін біогенних амінів [2, 5], зокрема про дію стероїдних гормонів на окисне дезамінування. Проте про роль стероїдних гормонів у регуляції окисного дезамінування, одного з важливих шляхів перетворення біогенних амінів під впливом ферменту моноаміноксидази (моноамін-О₂-оксидоредуктаза, дезамінуюча, КФ 1.4.3.4) свідчать лише окремі дані. Особливо мало досліджень по вивченню впливу гормонів кори надниркових залоз на окисне дезамінування в центральній нервовій системі [8].

Ми досліджували вплив гідрокортизону на моноаміноксидазну активність у білій, сірій речовині півкуль головного мозку, середньому, довгастому мозку, мозочку, а також печінці кроликів.

Методика досліджень

Досліди проведені на 40 кроликах-самцях вагою 1800—2500 г. Моноаміноксидазну активність визначали за кількістю звільненого аміаку при інкубації одного з субстратів (тираміну, серотоніну, дофаміну—по 1 мг у пробі) з 10%-ним гомогенатом мозкової тканини (1 мл), К—Na фосфатним буфером, рН 7,4 (1 мл) у кисневій атмосфері з температурою 37°С протягом 60 хв в апараті Варбурга. Після закінчення інкубації білки осаджували 10%-ною трихлороцтовою кислотою, відокремлювали центрифугуванням і в надосадовій рідині визначали вміст аміаку за методом Конвея з дальшим йодометричним титруванням залишку сірчаної кислоти [1].

Було досліджено вплив одноразово введенного гідрокортизону. Гормон вводили з розрахунку 5 мг/кг. Активність ферменту визначали через 3—6 год після введення кортикостероїду. Вивчали також вплив багаторазового введення гідрокортизону (щодня по 10 мг на протязі місяця). Контрольним тваринам вводили фізіологічний розчин. В досліді використовувалась препарат гідрокортизону фірми «Ріхтер». Експериментальні дані оброблені статистично [6].

Результати досліджень та їх обговорення

Активність ферменту щодо дезамінування тираміну (табл. 1) збільшувалась через 3—6 год після введення гідрокортизону в порівнянні з активністю його в мозку контрольних тварин, особливо в середньому, довгастому мозку, а також мозочку. Моноаміноксидазна активність в усіх відділах мозку після тривалого введення гормона збільшувалась у порівнянні з активністю ферменту в мозку контрольних кроли-