تماس انسان با آلاینده‌ها و خطرات بهداشتی ناشی از آن‌ها

بخش سوم- محاسبه توابع دُز-واکنش

۱- محاسبه دُز از طریق intake

محاسبه دز پتانسیلی (D_{pot})، بعد از اینکه یک ماده شیمیایی وارد شد با استفاده از انتگرال سرعت intake (با استنشاق یا بلعیدن) و زمان تماس به صورت زیر انجام می‌شود:

$$D_{pot} = \int_{t_1}^{t_2} C(t) IR(t) dt \qquad (۱)$$

سرعت intake، حاصل‌ضرب غلظت ترکیب شیمیایی در درون واسطه C(t)، با سرعت بالاگیری واسطه، IR(t) می‌باشد. مدت زمان تماس با عبارت $t_۲-t_۱$ بیان می‌شود. دُز را می‌توان به صورت جمع دُزها در فواصل زمانی خاص و شرایط تماس i به صورت زیر بیان نمود:

$$D_{pot} = \sum_i C_i \times IR_i \times ED_i \qquad (۲)$$

اگر غلظت ماده شیمیایی و سرعت بالاگیری واسطه ثابت باشند، می‌توان نوشت:

$$D_{pot} = \overline{C} \times I\overline{R} \times ED \qquad (۳)$$

که ED کل مدت زمان تماس است. فرضیات فوق موقعی صادق است که تداوم و مدت زمان تماس کم باشد. در مواردی که محاسبه دُز، درون محدوده‌ای از یک محاسبه از ریسک انسانی ناشی از تماس با ماده شیمیایی خاصی صورت می‌گیرد، در آن صورت دُز را (مورد انتظار یا محیط بسته) را به صورت سرعت متوسط در فاصله زمانی خاص بیان می‌کنند. مخصوصاً در مواردی که تماس با ماده شیمیایی متوالی و آرام باشد معمولاً از عبارت (ADD) استفاده می‌کنند. متوسط دُز روزانه به صورت انتگرال دُز در فاصله زمانی خاص (روز) با وزن انسان محاسبه می‌شود. با این حال، عملاً جمع‌آوری داده‌هایی که به نیمرخ زمانی تماس و ورود ترکیبات شیمیایی در فواصل زمانی طولانی مدت مربوط (تماس مزمن) می-

شود ناممکن است. بنابراین برای محاسبه ADD، مقادیر میانگین غلظت و سرعت بالاگیری مورد استفاده قرار می‌گیرد:

$$ADD_{pot} = \left[\overline{C} \times \overline{IR} \times ED\right] / \left[BW \times AT\right] \quad (۴)$$

که در آن، BW وزن انسان و AT مدت زمان تماس (روز) است. وقتی هدف تخمین احتمال ظهور سرطان از طریق توابع واکنش-دُز باشد، معمولاً از متوسط روزانه دُزی که انسان در طی حیات خود دریافت کرده است استفاده می‌شود (LADD) که عبارت است از:

$$ADD_{pot} = \left[\overline{C} \times \overline{IR} \times ED\right] / \left[BW \times LT\right] \quad (۵)$$

که LT چرخه زندگی انسان بر حسب روز است.

۲- محاسبه دُز در محیط بسته از طریق جذب پوستی

محاسبه دُزی که از طریق بالاگیری از تماس پوستی یک انسان با یک واسطه که دارای ترکیب شیمیایی باشد می‌تواند از دو طریق انجام شود. اولین روش در مواردی که شناوری کلی یا جزئی در مایع (مثلاً شناگرها) وجود داشته و ترکیبات شیمیایی ناشی از تماس پوستی جذب وجود دارد، به کار برده می‌شود. در این حالت دُز مورد انتظار به صورت انتگرال سرعت ورود ماده شیمیایی در فاصله زمانی خاص $t_۲$-$t_۱$ به صورت زیر محاسبه می‌شود:

$$D_{pot} = \int_{t_1}^{t_2} C(t) \times K_p \times SA(t) \times dt \quad (۶)$$

در معادله (۶)، جمله C غلظت ترکیب شیمیایی در ماده واسطه، SA سطح تماس و K_p ضریب نفوذپذیری می‌باشد. غلظت و سطح تماس می‌تواند با زمان تغییر کند در صورتی که ضریب نفوذپذیری نسبت به سطح بدن (در مقایسه با ساختار و پهنای قسمت میانی پوست) تغییر می‌کند. در مورد جذب پوستی واسطه ترکیب شیمیایی حل شده از محدود تماس عبور نکرده و بنابراین جریانی از ترکیب شیمیایی از طریق محدوده تماس که به ساختار شیمیایی، خصوصیات فیزیکی و شیمیایی محدوده

تماس وابسته است برقرار شده و گرادیان غلظت ترکیب شیمیایی در دو سوی محدوده تماس ایجاد می‌گردد. جریان ترکیبات شیمیایی (J) با استفاده از قانون فیک (Fick`s law) با عبارت $J=K_pC$ تحت غلظت ثابت C مشخص می‌شود. در دامنه گسترده‌ای از غلظت‌ها، ضریب نفوذپذیری ثابت باقی مانده و می‌تواند به صورت آزمایشی اندازه‌گیری شود. دُز در محیط بسته را می‌توان از طریق رابطه زیر محاسبه نمود:

$$D_{\text{int}} = \overline{C} \times K_p \times S\overline{A} \times ED \qquad (۷)$$

و متوسط دُز محیط بسته روزانه را می‌توان به صورت زیر محاسبه نمود:

$$ADD_{\text{int}} = \left[\overline{C} \times K_p \times S\overline{A} \times ED\right] / \left[BW \times AT\right] \qquad (۸)$$

در موردی که غلظت و تغییر سطح در طی دوره تماس تغییر کند، معادله (۸) نمی‌تواند نتایج واقع-گرایانه‌ای را بدست دهد.

در رهیافت دوم، محاسبه دُز از طریق بالاگیری و تماس پوستی بر مبنای مشاهدات تجربی بوده و می‌تواند در موردی که مقدار ماده‌ای که در تماس با پوست بوده کم یا معلوم باشد به کار برده شود. دُز مورد انتظار وقتی می‌تواند محاسبه شود که مقداری از ماده واسطه (M_{medium}) که در ترکیب شیمیایی حل شده و غلظت ماده شیمیایی (C) معلوم باشد. برای نمونه می‌توان دُز ناشی شده از تماس پوستی با خاک را با عبارت زیر محاسبه نمود:

$$D_{pot} = \overline{C}.M_{median} = \overline{C}.F_{adh}.S\overline{A}.ED \qquad (۹)$$

که F_{adh} ضریب چسبندگی خاک روی پوست است که مقدار خاکی را که در واحد سطح و زمان روی پوست جذب شده بیان می‌کند. در مورد تماس پوستی، اختلاف بین دز مورد انتظار و به کار برده شده به مقدار ترکیب شیمیایی ربط دارد که برای تخمین دز، مقداری است که در ماده واسطه‌ای که در روی پوست جذب شده می‌باشد در صورتی که دز مورد انتظار، تنها مقداری از ترکیب شیمیایی است که در تماس مستقیم با پوست قرار داشته باشد.

به لحاظ نظری، عبارت بین دز در محیط بسته و جذب شده را می‌توان با معادله زیر بیان نمود:

$$D_{\text{int}} = D_{app}\int_{t_1}^{t_2} f(t)dt \qquad (۱۰)$$

که $f(t)$ یک تابع جذب غیر خطی پیچیده است که واحد آن جرم جذب شده ماده شیمیایی بر واحد جرم واسطه‌ای که بر واحد زمان بر روی پوست مورد استفاده قرار گرفته است می‌باشد. تابع فوق به شیب غلظت ترکیب شیمیایی، نوع پوست، رطوبت و خصوصیات پوست، سطح تماس و خصوصیات ماده واسطه بستگی دارد (مثلاً در موردی که ماده واسطه خاک باشد آن محتوی آلی، شکل دانه‌بندی‌ها و رطوبت آن‌ها خواهد بود).

انتگرال تابع f در طی دوره تماس نسبت جذب AF است که می‌تواند با زمان افزایش یابد تا وقتی که به مقدار ۱ (۱۰۰٪) یا به وضعیتی پایدار در مقادیر پایین برسد. بنابراین عبارت بین دز محیط بسته و بیان شده را می‌توان به صورت زیر محاسبه نمود:

$$D_{\text{int}} = D_{app}AF \qquad (۱۱)$$

که نسبت جذب شده AF به صورت جرم جذب شده/ بیان شده توصیف و بدون بُعد نیز می‌باشد.

فرض نمایید که مقدار کل ترکیب شیمیایی که در ماده واسطه وجود داشته باشد در تماس مستقیم با پوست باشد، در این صورت می‌توان دز در محیط بسته را به صورت تابعی از دز بکار رفته از طریق عبارت زیر بیان نمود:

$$D_{\text{int}} = D_{pot}AF \qquad (۱۱)$$

و متوسط دز محیط بسته روزانه را به صورت زیر محاسبه نمود:

$$ADD_{\text{int}} = \left[\overline{C} \times M_{median} \times AF\right]/\left[BW \times AT\right] \qquad (۱۲)$$

در استفاده از معادله فوق باید احتیاط کرد زیرا نتایج واقعی تنها در مواقعی که مقدار ترکیب شیمیایی درون ماده واسطه در تماس مستقیم با پوست باشد به دست می‌آید. با این حال، در بیشتر موارد مقدار

ترکیب شیمیایی در تماس مستقیم با پوست نیست. مخصوصاً اگر مقدار آن زیاد باشد، زمانی که برای گونه‌های شیمیایی برای انتقال به درون واسطه مورد نیاز است به نسبت جذب از پوست افزایش یافته و می‌تواند از دوره مورد انتظار فراتر رود. همچنین این امکان برای دوره تماس ممکن است کمتر از زمانی که برای تابع جذب برای رسیدن به حالت پایدار مورد نیاز است برسد مخصوصاً برای ترکیبات شیمیایی که با یک سرعت متوسط جذب می‌شوند.

۳- محاسبه دز در محیط بسته از طریق استنشاق و ورود غذا

مقداری از یک ترکیب شیمیایی که از طریق بلعیدن و استنشاق وارد بدن انسان می‌شود در مکان-هایی با اهمیت بیولوژیکی زیاد (مثل شُش، جهاز معده‌ای) ذخیره شده و انباشته می‌گردد. علاوه بر این، به ارگان‌های خاصی نیز حرکت می‌کند. دز محیط بسته ناشی از ورود ترکیبات و اجزاء شیمیایی از طریق سطح شُش‌ها یا از طریق جهاز معده‌ای می‌تواند محاسبه شود. در روشی مشابه با این روش، دز محیط بسته ناشی از جذب پوستی را نیز می‌شود مورد محاسبه قرار داد. با این حال، ولو اینکه جزئیات مطالعات فعالیت و واکنش (*pharmacokinetics*) ترکیبات شیمیایی را می‌توان معلوم نمود، ولی دانستن داده‌هایی دیگر از سطح شش‌ها، سیستم معده‌ای و ضریب نفوذ امکان‌پذیر نیست. این داده‌ها به طور مستقیم قابل اندازه‌گیری نبوده و گذشته از این به وسیله خصوصیات فیزیولوژی، آناتومیکی در هر شرایط بهداشتی و خاصی نیز تأثیر می‌پذیرند (مثلا بیماری‌های ناحیه حباب‌دار). اگر فرض کنیم تمام مقدار یک ترکیب شیمیایی که وارد بدن می‌شود جذب گردد (دز کاربردی و بیان شده برابر باشند)، آنگاه دز موجود در محیط بسته را می‌توان از معادله زیر محاسبه نمود:

$$D_{\text{int}} = D_{app}AF = D_{pot}AF = \overline{C} \times \overline{IR} \times ED \times AF \qquad (۱۳)$$

بنابراین مقدار متوسط روزانه ترکیبات و اجزاء شیمیایی بعد از تماس از طریق استنشاق یا بلعیدن را می‌توان به صورت عبارت زیر مشخص نمود:

$$ADD_{\text{int}} = ADD_{pot}AF = \left[\overline{C} \times \overline{IR} \times ED \times AF\right]/\left[BW \times AT\right] \quad (۱۴)$$

که استفاده از سرعت ورود متوسط و غلظت متوسط نوسانات آن را در مقابل زمان نیز در محاسبه دخیل می‌کند.

۴- توابع دز-واکنش یا پاسخ

اثرات متضاد ناشی از آلاینده‌های زیست محیطی در نتیجه رشته حوادثی رخ می‌دهد که با آزادسازی آلاینده از منبع شروع شده و در برگیرنده انتقال و تغییر وضعیت محیطی شده، در محیط‌های ریزمقیاس انباشته شده (محیط‌های نسبتاً یکنواخت در حول و حوش گیرنده‌ها)، به وسیله انسان بالاگیری شده و انتقال بیولوژیکی به بافت‌ها و اماکن بسته صورت گرفته و نهایتاً عبارت دز-واکنش اثر متضاد خود را می‌گذارد.

معمولاً مشاهدات تجربی نشان داده‌اند که مقدار مشخصی از یک ماده شیمیایی که افزایش می‌یابد (بر حسب شدت و یا میزان نفوذ اثر) پاسخ سمّیتی آن نیز افزایش می‌یابد. از این رو، برای یک آلاینده خاص (معمولاً عامل شیمیایی) یک رابطه دز-پاسخ ممکن است اثر تماس قابل اندازه‌گیری (دز) را روی اشیاء که تغییرات خاص و بیولوژیکی (پاسخ) دارند نشان دهد. به عبارت دیگر، آن چگونگی ترازهای مختلف از تماس را به تغییرات احتمالی آلاینده و همچنین شدت اثرات بهداشتی آن را نیز برآورد می-کند. مفهوم روابط دز-پاسخ به طور گسترده در تئوری و عملی علوم سم‌شناسی، داروشناسی و همه-گیرشناسی مورد استفاده قرار می‌گیرد، با این حال نظم ارزیابی دز تماس شده/دز درونی جوان بوده و سریعاً در حال توسعه است و علم پایه خیلی مهمی در سازوکارهای درگیر در آن هنوز به طور کامل شناخته نشده‌اند.

در مورد بیشتر آلاینده‌ها و مواد شیمیایی، یک نوع عدم وجود اطلاعات مناسب از تأثیر آن‌ها بر روی انسان وجود دارد. در چنین مواردی، اطلاعات بنیادین از کارهای آزمایشی روی پستاندارانی غیر از

انسان که اغلب خرگوش، موش، موش صحرایی، خوکچه هندی، موش بزرگ، سگ یا میمون باشد به دست می‌آید. داده‌های انسانی گاهی اوقات در اجرای کیفی وجود اثرات متضاد در جمعیت‌های انسانی تماس شده مورد استفاده قرار می‌گیرد. وقتی اطلاعات تراز تماس مرتبط با یک endpoint مناسب وجود داشته باشد، مطالعات همه‌گیرشناسی می‌تواند پایه‌ای برای ارزیابی‌های کمّی دز-واکنش مهیا نماید. وجود چنین داده‌هایی ضرورت برون‌یابی از حیوانات به انسان‌ها را ممکن می‌سازد، بنابراین وقتی مطالعات انسانی قابل استفاده است که اولاً اولویت‌بندی شود و به عبارتی، مطالعات سمیتی تکمیل کننده و مکمّل آن‌ها خواهد بود.

در منابع علمی عبارت‌های دُز و پاسخ از یک تعریف استاندارد پیروی نکرده‌اند. بسته به سرشت مطالعه، دُز ممکن است مقداری از یک ماده شیمیایی باشد که به طور شفاهی اعلام شده، به صورت خارجی مصرف شده (مثلاً غلظت محیطی) یا به صورت درونی جذب شده باشد. به همین طریق پاسخ ممکن است مقدار بروز مشاهده شده یا اندازه‌گیری شده، درصد واکنش در گروه‌های اهداف (مثلاً جمعیت‌ها) یا احتمال بروز در درون یک جمعیت باشد. معمولاً در مطالعات سم‌شناسی دُز را بر حسب مقدار اعلام شده بر کیلوگرم از وزن بدن هدف در روز بیان می‌کنند. در مطالعات گروه اپیدمولوژی، دز معمولاً حسب تماس خارجی مثلاً غلظت در هوا، آب نوشیده شده و . . . بیان می‌شود. همچنین در مطالعات اخیر غلظت را بر حسب پارامترهای ورودی درونی مثلاً غلظت ماده شیمیایی در سرم نیز بیان می‌کنند. بنابراین، باید در توسعه روابط دز-واکنش، گزینه‌ها و فرضیات معینی در دستیابی به یک معیار مناسب از اثرات بهداشتی تماس محیطی چند مسیره مورد انتظار در نظر گرفته شود. مهم‌ترین جنبه-هایی که باید مورد ملاحظه قرار گیرند عبارتند از:

۱- انتخاب تابع ریاضی مناسب برای توصیف واکنش پایین دز، همزمان استفاده از اندازه‌گیری صحیحی از دز (یعنی دز بیرونی، جذب شده یا دز موجود در بافت هدف). ابزار پیشنهادی برازش خوب اجرای

ارزیابی‌های پالوده است زیرا آن مدلسازی تماس چند مسیره (استنشاق، پوست) را به ضمیمه مدلسازی (PBPK) انتگرال گرفته و یکپارچه می‌کند.

۲- برون‌یابی بین اجزایی یا درون گونه‌ای، به طوری که برای تبدیل داده‌های به دست آمده از حیوانات به دزهای معادل در انسان مورد نیاز است.

۳- اثر نمونه دزها و زمان‌بندی، به طوری که برای ارزیابی دراز مدت، تماس مزمن از تماس‌های کوتاه مدت واقعی باشد.

۴- اتصال و به هم پیوسته نمودن پاسخ ناشی از ورود همزمان چندین ماده شیمیایی.

از دید فیزیولوژیکی، تمایز واضحی بین سنجه‌های متنوع ″دز″ وجود دارد که بر مبنای آژانس محافظت از محیط زیست ایالات متحده (۱۹۹۲) می‌توانند به صورت دز محیط باز (یا تماس شونده)، دز بکار رفته، دز محیط بسته و دز تحویل شده طبقه‌بندی شوند.″دز خارجی″ یا تماس شده به معنی تماس یک عامل با لایه بیرونی یک ارگانیزم؛″ دز بکار رفته″ اشاره به مقداری از یک عامل که به مانع جذب ارائه شده و برای جذب مهیا است (مثل جرم رسوبی در سیستم تنفسی)؛ ″دز درونی″ اشاره به مقدار عبور یک مانع جذب (مثلاً مرزهای تبادلی پوست، شُش، و سیستم گوارش) اطلاق می‌شوند، در حالی که″دز تحویلی″ به یک ارگان یا سلول به معنی مقدار قابل استفاده و در دسترس به منظور برهمکنش با ارگان یا سلول است. با این حال، معمولاً داده‌های دز-پاسخ این چنین تفکیک‌های واضحی ندارند.

به منظور کارهای پیشنهادی و در موقع عدم وجود داده‌های مناسب، توابع پاسخ-دز جبری که استفاده خواهند شد، برای کمّی نمودن پاسخ به همه شکل‌های دُز شامل دُز خارجی، دُز به کار برده شده، دُز درونی یا دُز تحویلی مورد استفاده قرار می‌گیرند.

برای آلاینده‌های عامل سرطان، رابطه‌ای خطی فرض خواهد شد، همان طور که این فرض به وسیله آژانس محافظت از محیط زیست ایالات متحده پیشنهاد شده است. فرض اصلی در این فرضیات این است که حتی یک دُز بی‌نهایت کم، مقداری خطر خواهد داشت ولو اینکه تنها به وسیله مقداری کوچک

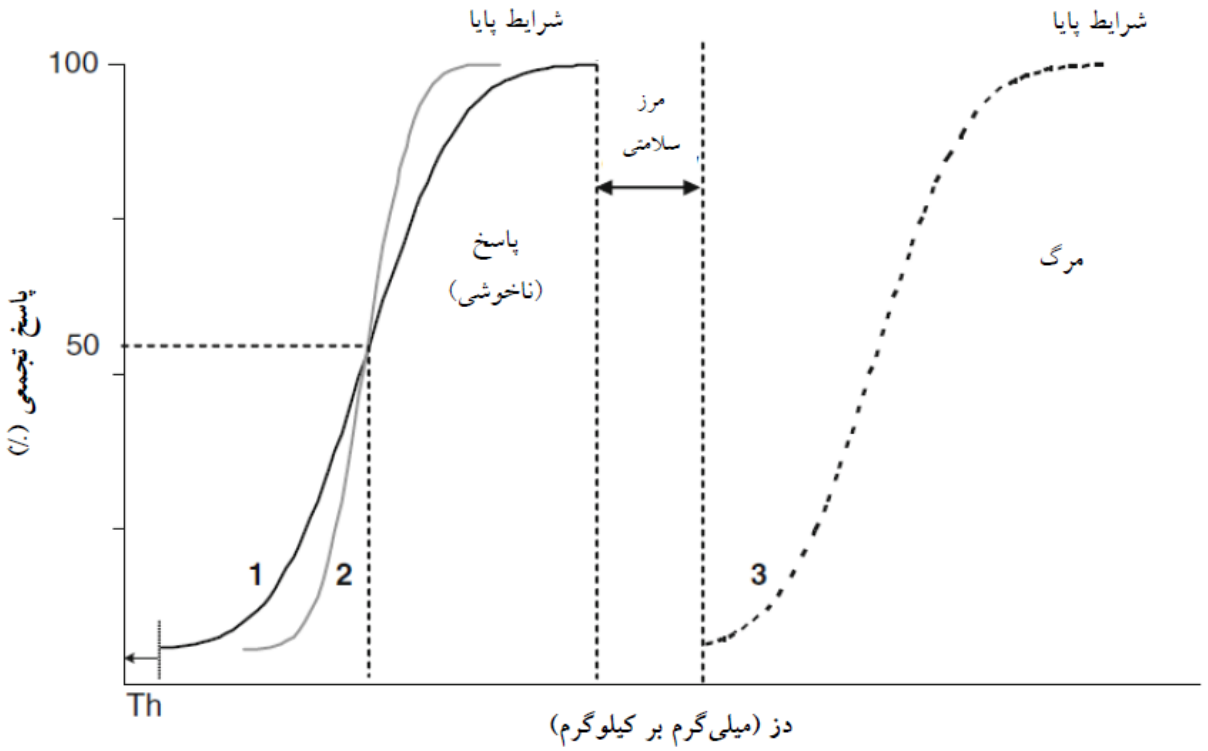
به وجود آمده باشد. بدیهی است چنین رابطه دز–واکنشی کاملاً تعیین شده حتی اگر هر یک از شیب یا نقطه غیر صفر تکی نیز مشخص شده باشد (برای نمونه دز مؤثر $ED_{۱۰}$ دز متناظر با افزایش ۱۰٪ یک واکنش متناظر است).

برای آلاینده‌های غیر سرطان‌زا تراز دز کمتر ممکن است هیچ اثرات بهداشتی که مورد انتظار است رخ دهد نداشته باشند (NOAEL: هیچ تراز اثر متضاد مشاهده نشده). در چنین موردی فراوانی یا شدت پاسخ بیولوژیکی متناسباً با مقدار دز اختلاف نداشته و در نتیجه رفتاری غیر خطی را نشان خواهد داد. تا وقتی که تراز دُز متناظر به دزی که دز مرجع نامیده (*reference dose*) (RfD) می‌شود نرسد هیچ واکنشی وجود نخواهد داشت. نقطه RfD با استفاده از نقطه NOAEL با کاربرد نامتناقض از مرتبه بزرگی فاکتورهای عدم قطعیت جامع به دست می‌آید. سپس منحنی‌های واکنش مطابق با شکل S مشخصه و سازگار با آزمایش‌های بیولوژیکی بیشتر توسعه خواهند یافت.

از دیاگرام‌های دُز–واکنش می‌توان دز آستانه (*threshold dose*) (Th) را که برای واکنش‌های قابل مشاهده ارگانیزم‌ها لازم است حل نمود. همچنین این امکان وجود دارد که از این دیاگرام‌ها سمّیت ترکیبات شیمیایی مختلف و دزهای آن‌ها و همچنین واکنش‌های تعیین شده در فواصل زمانی انتخاب شده را به دست آورد. به طور نمونه، یک منحنی دز–واکنش در محیط طبیعی و محیط آزمایشگاهی در مقابل دز، توزیعی متعارف خواهد داشت. با این حال، منحنی‌های تجمعی مورد استفاده قرار می‌گیرند زیرا آن‌ها اطلاعات مستقیم‌تری ارائه نموده و برای تعیین اختلاف سمّیت‌های بین ترکیبات شیمیایی مختلف آسان هستند.

شکل ۱ سه منحنی دز–واکنش را نشان می‌دهد. منحنی‌های ۱ و ۳ با دزی مشابه ترکیب شیمیایی A متناظر است ولی در پاسخی متفاوت، در حالی که منحنی ۲ به واکنشی مشابه با منحنی ۱ متناظر بوده ولی برای ترکیب B می‌باشد. در شکل دیده می‌شود که مقدار آستانه (Th) اثرات معکوس مشاهده شده در بدن‌های تحت مطالعه را ارائه می‌کند. این مقدار محدود به صورت NOAEL (تراز اثر معکوس

مشاهده نشده (*No Observed Adverse Effect Level*))، LOAEL (کمترین تراز اثر معکوس مشاهده شده (*Lowest Observed Adverse Effect Level*)) یا TLV (مقدار محدود آستانه (*Threshold Limit Value*)) معروف است. همچنین مشاهده می‌شود که منحنی تجمعی دز-واکنش به یک شرایط پایدار رسیده و در دزهای بالاتر، واکنش بدون تغییر است. دو ترکیب شیمیایی A و B (منحنی‌های ۱ و ۲) مقایسه شدند و مشاهده می‌شود که ولو اینکه واکنش متوسط از دز مشابه به دست می‌آید (دز مؤثر-$ED_{۵۰}$)، دزها در درصدهای مختلف از دز مشابه پاسخ نیز متفاوت دارند (مثلاً، $ED_{۹۹}$، $ED_{۱}$). دز متوسط ($ED_{۵۰}$) به صورت مقداری از ترکیب شیمیایی (ترکیب سمی) تعریف می‌شود که منجر به واکنش خاصی (علامتی از بیماری) برای ۵۰ درصد از جمعیت تماس شده ایجاد نماید. در موردی که برای ۵۰٪ از جمعیت تحت مطالعه واکنش به صورت مرگ باشد، این دز را به عنوان دز کشنده (*Lethal dose*) نامیده و با علامت $LD_{۵۰}$ مشخص می‌کنند. مرز سلامتی نیز اختلاف حداکثر دز محدود که باعث واکنش مشخص می‌شود (مثلاً حالت مریضی) و حداقل دزی از ترکیب شیمیایی مشابه که باعث مرگ می‌شود نشان می‌دهند (مثلاً $LD_{۰.۱}/ED_{۹۹}$ یا $LD_{۵۰}/ED_{۵۰}$). اگر یک ماده سمی درصد مشابهی از واکنش تجمعی دز کمتر از ماده دیگری داشته باشد مؤثرتر است، در صورتی که وقتی دز مشابه متناظر با دامنه بیشتری از پاسخ‌ها باشد به صورت مؤثرتر توصیف می‌گردد.



شکل ۱- منحنیهای تجمعی برای روابط دز-پاسخ و خصوصیات بنیادی آنها. منحنی ۱ و ۲ به ترکیبات مختلف A و B اشاره دارد که پاسخ متوسط مشابه دارند ولی اختلاف اثراتشان در سایر ترازهای دز وجود دارد. منحنی ۳ اشاره به میرایی در مقابل دز در ترکیب A دارد.