

Otrzymano:  
23.03.2018  
Zaakceptowano:  
31.05.2018  
Opublikowano:  
06.09.2018

## Charakterystyka fenotypowa sekwencji akrania–egzencefalia–anencefalia z zastosowaniem ultrasonografii dwu- i trójwymiarowej między 11. a 13. tygodniem i 6. dniem ciąży

Acrania-exencephaly-anencephaly sequence phenotypic characterization using two- and three-dimensional ultrasound between 11 and 13 weeks and 6 days of gestation

Eduardo Félix Martins Santana<sup>1,2</sup>, Edward Araujo Júnior<sup>1</sup>,  
Gabriele Tonni<sup>3</sup>, Fabricio Da Silva Costa<sup>4,5</sup>, Simon Meagher<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Department of Obstetrics, Paulista School of Medicine – Federal University of São Paulo (EPM-UNIFESP), São Paulo-SP, Brazylia

<sup>2</sup> Department of Perinatology, Albert Einstein Hospital, São Paulo-SP, Brazylia

<sup>3</sup> Department of Obstetrics & Gynecology, Guastalla Civil Hospital, AUSL Reggio Emilia, Reggio Emilia, Włochy

<sup>4</sup> Monash Ultrasound for Women, Melbourne, Wiktoria, Australia

<sup>5</sup> Department of Obstetrics and Gynaecology, Monash University, Melbourne, Australia

Adres do korespondencji: Prof. Edward Araujo Júnior, PhD, Rua Belchior de Azevedo, 156, apto. 111 Torre Vitória, São Paulo-SP, Brazil, CEP 05303-000, tel./fax: +55 11 37965944, e-mail: araujojred@terra.com.br

DOI: 10.15557/JoU.2018.0035

### Abstract

The study presents a pictorial essay of acrania-exencephaly-anencephaly sequence using two- (2D) and three-dimensional (3D) ultrasonography, documenting the different phenotypic characterization of this rare disease. Normal and abnormal fetuses were evaluated during the first trimester scan. The International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology practice guidelines were adopted to standardize first trimester anatomical ultrasound screening. The guidelines outline the importance of systematic fetal head and brain examination including the formation of cranial bones, choroid-plexus and ventricles. Acrania-exencephaly-anencephaly sequence and/or other neural tube defects, such as meningoencephalocele, may be identified during a routine 11–14 week scan. Early first trimester detection of acrania-exencephaly-anencephaly sequence with the characterization of different related phenotypes, 2D and 3D ultrasound imaging as well as differential diagnosis are also presented in this pictorial essay. The main diagnostic ultrasound features of the disease may be characterized by findings of acrania with increased amniotic fluid echogenicity; “Mickey-Mouse” bi-lobular face, cystic, elongated, irregular and overhanging head morphology. Lightening techniques have also been added to 3D ultrasound to enhance anatomical details. Moreover, discordant amniotic fluid echotexture in the setting of twin pregnancies may be the first sign of acrania-exencephaly-anencephaly sequence. Extracranial malformations, aneuploidy and genetic syndromes associated with acrania-exencephaly-anencephaly sequence are also reported and described. First trimester neuroscan by an expert sonographer with appropriate training together with the application of standardized protocol are essential for a high detection rate of this rare type of neural tube defect malformation during a scan performed at 11 and 13 weeks and 6 days.

### Słowa kluczowe

sekwencja akrania–  
egzencefalia–  
anencefalia,  
USG ośrodkowego  
układu nerwowego,  
USG w pierwszym  
trymestrze ciąży,  
dwuwymiarowe  
badanie USG,  
trójwymiarowe  
badanie USG

### Keywords

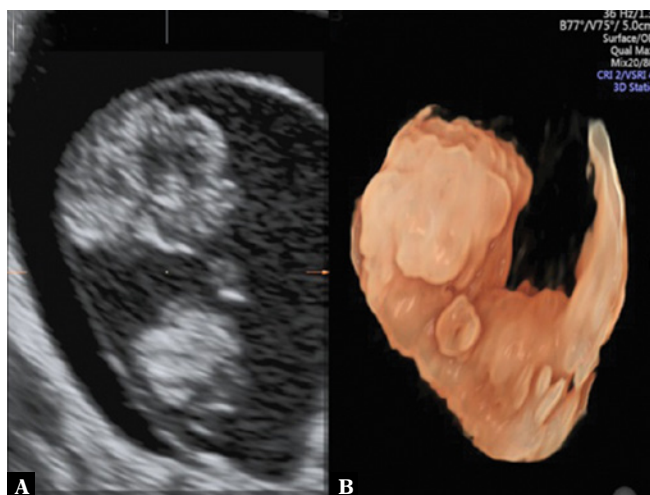
acrania-exencephaly-  
anencephaly sequence,  
central nervous  
system scan,  
first trimester scan,  
two-dimensional  
ultrasound,  
three-dimensional  
ultrasound

## Wstęp

Badanie w pierwszym trymestrze ciąży, które rutynowo wykonuje się w okresie od 11. do 13. tygodnia i 6. dnia ciąży, jest nie tylko dobrze ugruntowanym rutynowym badaniem przesiewowym w kierunku aneuploidii, ale również umożliwia ocenę anatomiczną pozwalającą na wczesne rozpoznanie anomalii strukturalnych płodu<sup>(1)</sup>. Wytyczne Międzynarodowego Towarzystwa Ultrasonografii w Ginekologii i Położnictwie (International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology, ISUOG) dotyczące badań w pierwszym trymestrze ciąży podkreślają konieczność identyfikacji głowy płodu, oceny prawidłowego rozwoju kości czaszki oraz identyfikacji splotu naczyniówkowego i komór mózgu<sup>(2)</sup>. Kostnienie czaszki powinno być widoczne od 11. tygodnia ciąży.

Sekwencja akrania–egzencefalia–anencefalia to rzadka wada wrodzona, o szacowanej częstości występowania w zakresie od 3,68 do 5,4 przypadku na 10 000 żywych urodzeń<sup>(3)</sup>. Duński zespół badaczy<sup>(3)</sup> wykazał, że wykrywalność tego zaburzenia z zastosowaniem ultrasonografii dwuwymiarowej (2D) wzrasta dzięki prowadzonym szkoleniom oraz wówczas, gdy badanie jest wykonywane przez perinatologa; mieści się ona w zakresie od 69% do 86% (średnia wykrywalność podczas badania podstawowego – 58,5%), z wieloma niewykrytymi przypadkami przed 11. tygodniem ciąży<sup>(3)</sup>. Dla porównania inna grupa badaczy przedstawiła wyższe wskaźniki wykrywalności – 100%<sup>(4)</sup>.

Wprowadzenie przezpochwowego badania ultrasonograficznego umożliwiło wykrywanie sekwencji akrania–egzencefalia–anencefalia we wczesnym stadium rozwoju płodowego, z najwcześniejszym rozpoznaniem w 9. tygo-



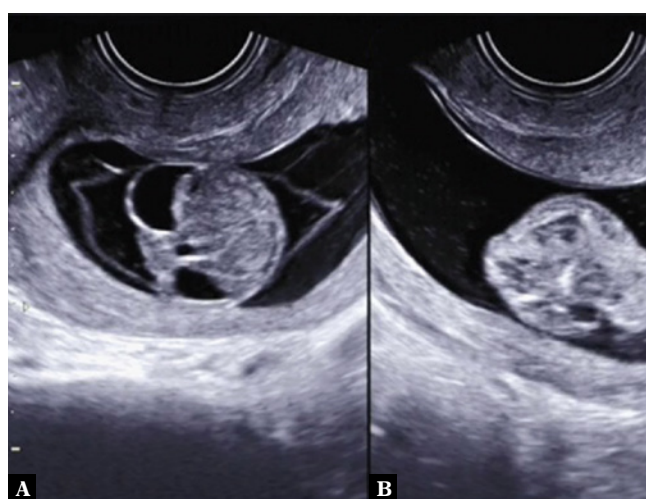
Ryc. 1. Akrania wykryta za pomocą ultrasonografii 3D w 8. tygodniu i 6. dniu ciąży, w prezentacji wielopłaszczyznowej (A) oraz w trybie renderowania HDlive™: uwagę zwraca zwiększona echogeniczność płynu owodniowego (B)



Ryc. 2. Dwuwymiarowa ultrasonografia przezbrzuszną wykonana w 11. tygodniu i 3. dniu ciąży. Wyraźnie widoczna dwupłatkowa twarz typu Myszki Miki



Ryc. 3. Dwuwymiarowa ultrasonografia przezpochwowa uwidaczniająca akranie typu torbielowatego w 10. tygodniu i 5. dniu ciąży



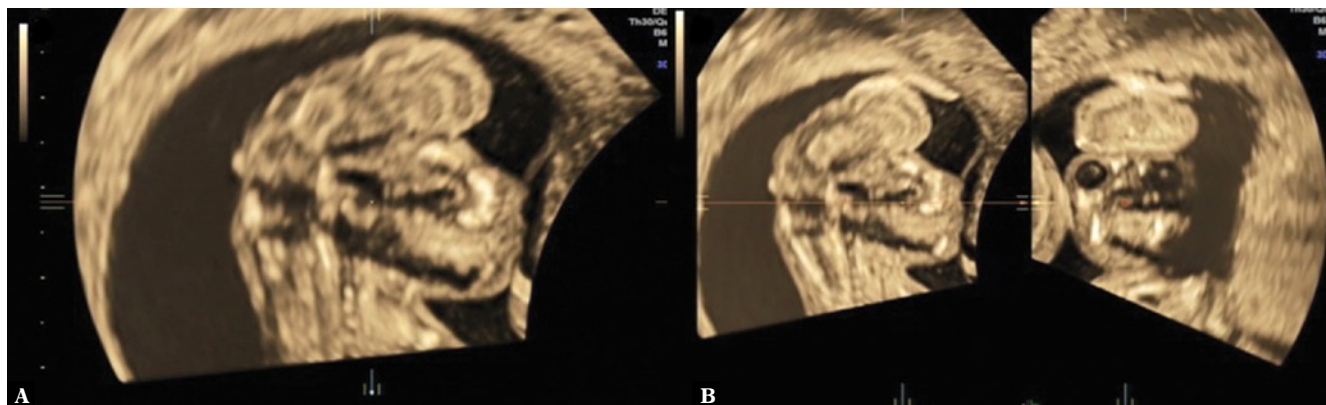
Ryc. 4. Odmiana fenotypowa akranii torbielowatej (A) z towarzyszącą przepukliną pępowinową (B) wykryta w 10. tygodniu i 2. dniu ciąży



Ryc. 5. Fenotyp akranii ze skróconą częścią czołową zdiagnozowany w 11. tygodniu i 1. dniu ciąży na podstawie badania USG 3D z trybem renderowania HDlive™



Ryc. 6. Wydłużony fenotyp akranii w badaniu ultrasonograficznym 2D w 11. tygodniu i 1. dniu ciąży



Ryc. 7. Ultrasonografia 3D w prezentacji wieloplanej w płaszczyźnie strzałkowej (A, szczegółowa) oraz strzałkowej i czołowej (B): dobrze widoczny fenotyp „zwisający”

dniu i 3. dniu ciąży oraz od 10. tygodnia ciąży<sup>(5-10)</sup>. Ponadto użytecznym markerem ultrasonograficznym w tej chorobie, obserwowanym w 89% przypadków, jest stwierdzona w badaniu USG 2D zwiększona echogeniczność płynu owodniowego w 11.–14. tygodniu ciąży<sup>(11)</sup>.

Celem pracy było przedstawienie różnych cech fenotypowych uwidocznionych w dwu- i trójwymiarowym badaniu USG płodów z rozpoznaniem sekwencji akrania–egzencefalia–anencefalia w pierwszym trymestrze ciąży.

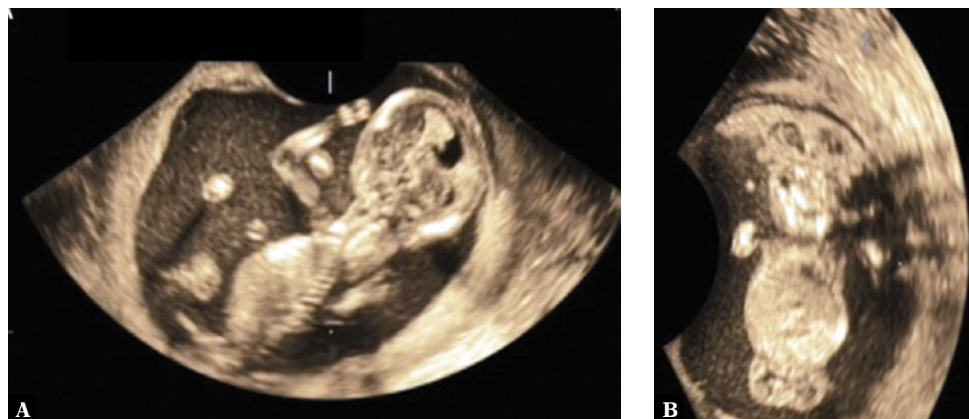
## Materiał i metody

W badaniu stosowano aparat Voluson E8/E10 (GE Medical Systems, Milwaukee, WI), wyposażony w sondy wysokiej częstotliwości do badania przezbrzusznego/przezpochwowego w prezentacji 2D w czasie rzeczywistym oraz sondy wolumetryczne 3D/4D (RIC 5-9W i RAB 4-8L). W celu standaryzacji badanie USG przeprowadzono zgodnie z wytycznymi ISUOG dotyczącymi badania w pierwszym trymestrze ciąży. W pewnych przypadkach akranie wykrywano we wczesnym

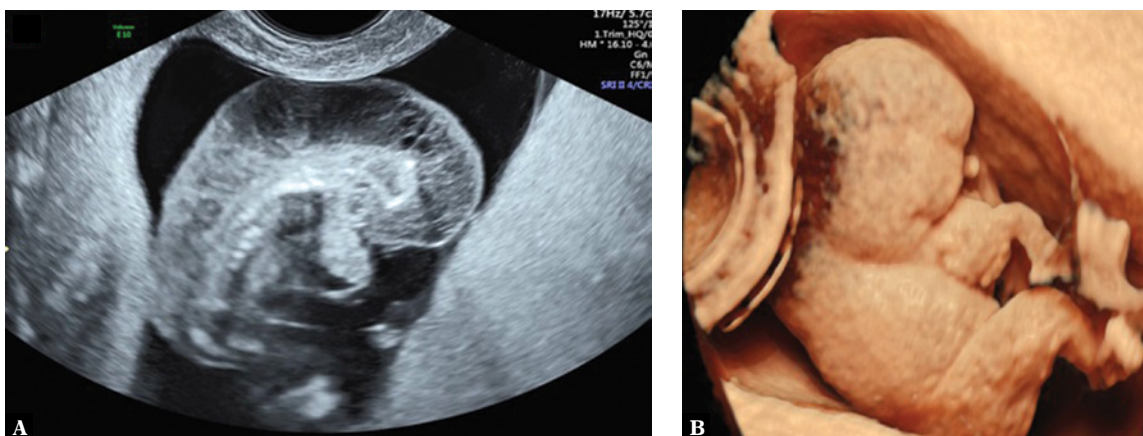


Ryc. 8. Nieprawidłowa echostruktura płynu owodniowego w ciąży bliźniaczej jednokosmówkowej dwuowodniowej może być pierwszym objawem sekwencji akrania–egzencefalia–anencefalia





Ryc. 9. Ultrasonografia 3D ze skanowaniem objętościowym podnoszącym rozdzielczość i kontrast w płaszczyźnie strzałkowej (A) i czołowej (B) w ciąży bliźniaczej jednokosmówkowej jednoowodniowej; uwagę zwraca zwiększona echogeniczność płynu owodniowego



Ryc. 10. Ultrasonografia przezpochwowa 2D: sekwencja TRAP (podwójna odwrócona perfuzja tętnicza) u jednego z bliźniąt udokumentowana w ciąży bliźniaczej jednokosmówkowej jednoowodniowej (A). Badanie USG 3D w trybie renderowania HDlive™ (B)

stadium (8. tygodniu ciąży) – wówczas stosowane było USG dopochwowe. Uzyskano dwu- i trójwymiarowe (3D) dane wolumetryczne w okresie spoczynkowym płodu, które analizowano w systemie USG podczas prowadzenia badania. Zarodki i płody badano w płaszczyźnie czołowej i strzałkowej z czasem przemiatań 8–15 s w celu uzyskania objętości. Jako standardowe obrazowanie ultrasonograficzne 3D stosowano prezentację wieloplanarną z renderowaniem powierzchni. W celu poprawy renderowania obrazu zastosowano odpowiednią technikę oświetlenia (HDlive™). Od każdej uczestniczki badań przeprowadzonych w ośrodku Monash Ultrasound for Women (Clayton, Wiktoria, Australia) otrzymano świadomą pisemną zgodę na udział w badaniu.

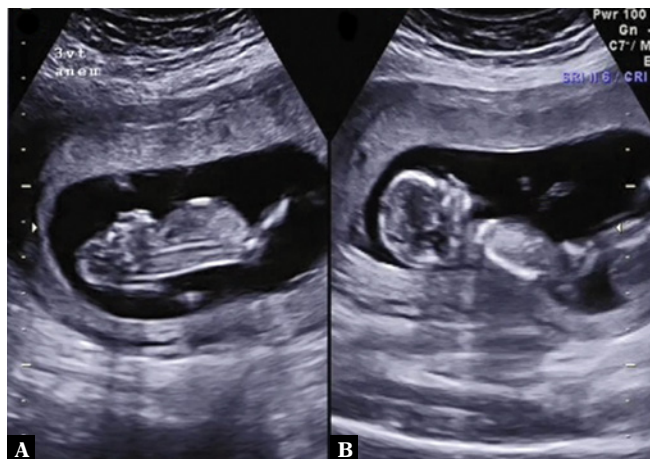
## Wyniki

Rutynowemu dwuwymiarowemu badaniu USG poddano zarówno płody prawidłowe, jak i płody z zaburzeniami. W przypadku płodów z zaburzeniami jako badanie uzupełniające stosowano ultrasonografię trójwymiarową. W pracy opisano ultrasonograficzną prezentację różnych fenotypów sekwencji akrania–egzencefalia–anencefalia (akranie ze zwiększoną echogenicznością płynu owodnio-

wego, dwupłatową twarz typu Myszki Miki, torbielowatą, wydłużoną, nieregularną i zwisającą morfologię głowy) i przedstawiono na zdjęciach (Ryc. 1–7).

Pierwszym objawem sekwencji akrania–egzencefalia–anencefalia może być nieprawidłowa echostruktura płynu owodniowego w przypadku ciąży bliźniaczej (Ryc. 8, Ryc. 9). Ponadto tę bardzo rzadką wadę rozwojową odnotowano w 13. tygodniu i 6. dniu ciąży, gdy akranie i egzencefalię zaobserwowano u bliźniąt jednokosmówkowych jednoowodniowych (*monochorionic monoamniotic*, MCMA). W tym przypadku przyczyną akranii i akardii u jednego z bliźniąt był zespół odwróconej perfuzji tętniczej (*twin reversed arterial perfusion*, TRAP) (Ryc. 10). Sekwencja akrania–egzencefalia–anencefalia może być również obecna u jednego z płodów w ciąży bliźniaczej dwukosmówkowej (Ryc. 11).

Egzencefalię można bardzo dobrze zobrazować na wczesnym etapie rozwoju zarodkowego (w 8. tygodniu i 2. dniu ciąży) z zastosowaniem ultrasonografii 3D. Możliwa jest także dokumentacja związanych z tą patologią dymorficznych cech twarzy widocznych w późniejszym etapie rozwoju, takich jak nisko położone uszy (Ryc. 12). Wada ta jest wyraźnie widoczna podczas sekcji (Ryc. 13).



Ryc. 11. A, B. Ciąża bliźniacza dwukosmówkowa dwuowodniowa z sekwencją akrania–egzencefalia–anencefalia u jednego płodu

Choć może się to okazać wyzwaniem, dokładna przedporodowa diagnostyka różnicowa uwzględniająca sekwencję akrania–egzencefalia–anencefalia i inne wady cewy nerwowej, takie jak przepuklina oponowo-mózgowa, ma fundamentalne znaczenie dla właściwego poradnictwa genetycznego i prowadzenia ciąży (Ryc. 14). Dodatkowe wykorzystanie badania USG 3D pozwala na lepsze zrozumienie wad rozwojowych mózgu, co może okazać się cenne w pewnych sytuacjach, gdy pacjentka ma wątpliwości związane z rozpoznaniem, zwłaszcza jeśli stosowała profilaktykę kwasem foliowym.

Kolejnym zaburzeniem, które warto rozważyć w diagnostyce różnicowej, jest *craniopagus parasiticus* (Ryc. 15) – bardzo rzadka postać bliźniąt syjamskich, występująca u około 5 na 10 milionów urodzeń, w której do głowy prawidłowej bliźniaka przytwierdzona jest głowa pasożytnicza.

## Dyskusja

Badanie USG w pierwszym trymestrze ciąży jest dobrze ugruntowane, wykonywane w ramach rutynowej prakty-

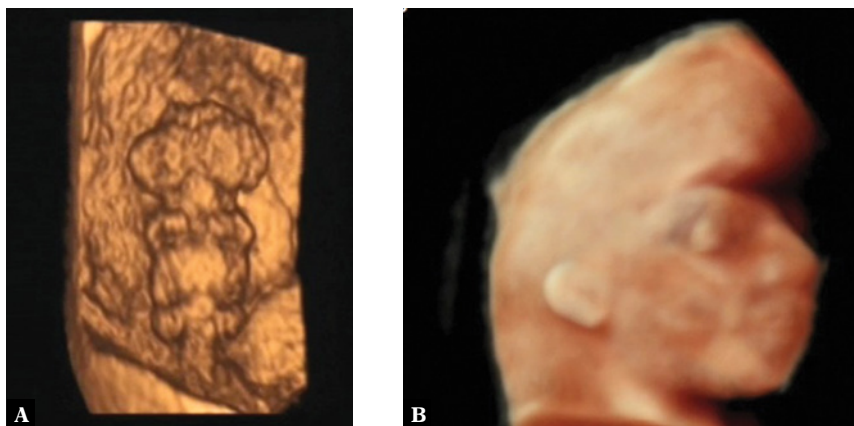
ki położniczej. Daje ono możliwość zidentyfikowania wad zarodka lub płodu u kobiet w ciąży, u których występuje zwiększone ryzyko wystąpienia wad wrodzonych.

Zastosowanie standaryzowanego protokołu w ocenie ultrasonograficznej anatomii zarodka lub płodu ma kluczowe znaczenie dla wczesnej diagnostyki prenatalnej zaburzeń płodu. Jeśli badanie ultrasonograficzne jest wykonywane przez lekarza perinatologa z wykorzystaniem urządzenia USG z możliwością obrazowania 2D/3D oraz o wysokiej częstotliwości, to szacowana czułość wykrywania poważnych wad wrodzonych wynosi około 60% w przypadku populacji wysokiego ryzyka, przy czym wykrywalność akranii wynosi prawie 100%<sup>(1)</sup>.

Połączenie ultrasonografii przezbrzuszej i przezpochwowej może okazać się niezwykle pomocne w osiągnięciu zwiększonej dokładności diagnostycznej. Stosowanie ultrasonografii przezpochwowej przynosi korzyści w większości przypadków tyłożęcięcia macicy, podwyższonego wskaźnika masy ciała i mięśniaków macicy. Do czynników, które mogą ograniczyć wartość ultrasonografii przezpochwowej, należą mniejsze możliwości manewrów sondą oraz brak zgody pacjentki na wykonanie badania<sup>(12,13)</sup>.

Akrania stanowi pierwszy etap omawianej sekwencji malformacyjnej, do której dochodzi 18–20 dni po zapłodnieniu<sup>(14)</sup>. Progresja z egzencefalii do anencefalii została po raz pierwszy opisana przez Wilkingsa i wsp.<sup>(15)</sup> W przypadku rozpoznania akranii na wczesnym etapie rozwoju powyżej oczodolów można zaobserwować zdeorganizowaną tkankę mózgową (naczyniowo-błonowy obszar) – zaburzenie to określa się mianem egzencefalii<sup>(16)</sup>. Anencefalia powstaje w wyniku nieudanego zamknięcia śródmózgowia i przedomózgowia, przy prawidłowej fuzji na poziomie tyłomózgowia i odcinka szyjnego<sup>(17)</sup>. Wykazano, że około 12–25% tych przypadków towarzyszą inne nieprawidłowości, przy czym aneuploidia stanowi 1–5%<sup>(3,18,19)</sup>.

Tonni i wsp.<sup>(20)</sup> opisali przypadek wczesnego rozpoznania sekwencji akranii/egzencefalii za pomocą trójwymiarowej ultrasonografii u płodu z rozpoznaniem tetraploidii na podstawie celocentezy. Autorzy ci doszli do wniosku, że ultrasono-

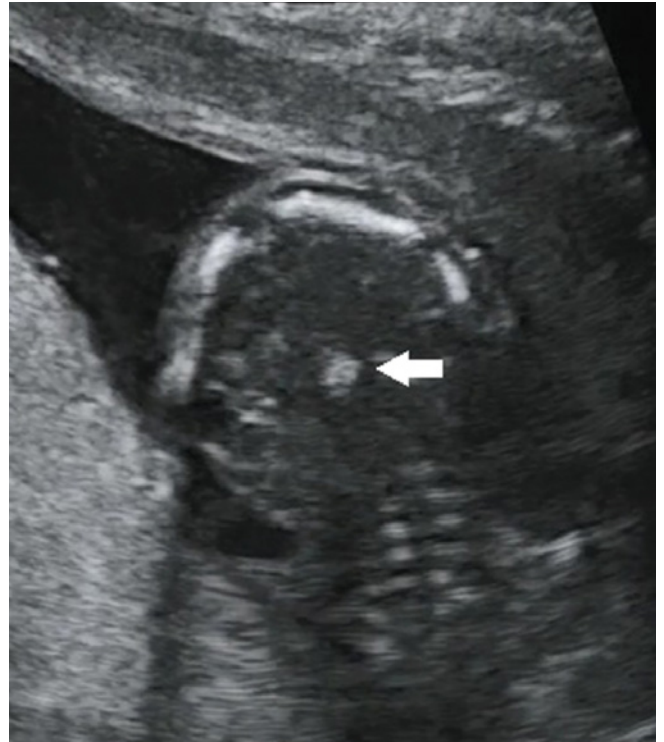


Ryc. 12. Egzencefalię można uwidocznnić z zastosowaniem ultrasonografii 3D z trybem renderowania, w szczególności na wczesnym etapie rozwoju zarodka (A, 8. tydzień i 2. dzień ciąży) lub w celu uwidocznienia związanej z patologią dysmorfii twarzy, taką jak niskie położenie uszu w późniejszym etapie rozwoju (B, 13. tydzień ciąży)





Ryc. 13. Egzencefalia: uwagę zwraca rozwijający się mózg, w całości zlokalizowany poza czaszką płodu



Ryc. 14. Przepuklina mózgowa (strzałka) to jedna z wad cewy nerwowej, którą należy różnicować z sekwencją akrania–egzencefalia–anencefalia



Ryc. 15. Akrania u bliźniąt syjamskich craniopagus parasiticus: USG 2D (A) i 3D (B) z trybem renderowania HDlive™ w 9. miesiącu i 3. dniu ciąży



grafia przezpochwowa 3D stanowiła uzupełnienie wczesnej diagnozy prenatalnej sekwencji akrania/egzencefalia i okazała się skuteczna w wykluczeniu innych zaburzeń, takich jak iniencefalia i/lub holoprozencefalia bezpłatowa<sup>(20)</sup>. Ultrasonografia trójwymiarowa, zwłaszcza w pierwszym trymestrze ciąży, oraz zastosowanie dostępu przezpochwowego w celu obrazowania w płaszczyźnie czołowej i strzałkowej mogą być szczególnie pomocne w tym zakresie. Wiadomo przykładowo, że płaszczyzna czołowa może być trudna do osiągnięcia przy użyciu konwencjonalnego USG dwuwymiarowego<sup>(21–24)</sup>.

Program szkoleniowy dotyczący wykrywania i określania różnych wad cewy nerwowej, jak również szczegółowa

wiedza na temat rozwoju zarodkowego według klasyfikacji Carnegie<sup>(25)</sup> są ważne dla zrozumienia patogenezy i trafnej diagnozy w praktyce klinicznej<sup>(26,27)</sup>. Rozpoznanie sekwencji akrania–egzencefalia–anencefalia jest trudne zwłaszcza w niskim wieku ciążowym i wiele przypadków pozostaje nierozpoznanych na tym etapie ciąży<sup>(4,28)</sup>.

#### Konflikt interesów

Autorzy nie zgłaszają żadnych finansowych ani osobistych powiązań z innymi osobami lub organizacjami, które mogłyby negatywnie wpłynąć na treść niniejszej publikacji oraz rościć sobie do niej prawo.

## Piśmiennictwo

1. Karim JN, Roberts NW, Salomon LJ, Papageorgiou AT: Systematic review of first-trimester ultrasound screening for detecting of fetal structural anomalies and factors that affect screening performance. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2017; 50: 429–441.
2. Salomon LJ, Alfirevic Z, Bilardo CM, Chalouhi GE, Ghi T, Kagan KO *et al.*: ISUOG practice guidelines: Performance of first-trimester fetal ultrasound scan. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2013; 41: 102–113.
3. Fleurke-Rozema JH, van Leijden L, van de Kamp K, Pajkrt E, Bilardo CM, Snijders RJ: Timing of detection of anencephaly in The Netherlands. *Prenat Diagn* 2015; 35: 483–485.
4. Syngelaki A, Chelemen T, Dagklis T, Allan L, Nicolaides KH: Challenges in the diagnosis of fetal non-chromosomal abnormalities at 11–13 weeks. *Prenat Diagn* 2011; 31: 90–102.
5. Johnson SP, Sebire NJ, Snijders RJ, Tunkel S, Nicolaides KH: Ultrasound screening for anencephaly at 10–14 weeks of gestation. *Ultrasound Obstet Gynecol* 1997; 9: 14–16.
6. Sepulveda W, Sebire NJ, Fung TY, Pipi E, Nicolaides KH: Crown-chin length in normal and anencephalic fetuses at 10–14 weeks' gestation. *Am J Obstet Gynecol* 1997; 176: 852–855.
7. Kennedy KA, Flick KJ, Thurmond AS: First-trimester diagnosis of exencephaly. *Am J Obstet Gynecol* 1990; 162: 461–463.
8. Cuillier F: [Prenatal diagnosis of exencephaly at 10 weeks gestation, confirmed at 13 weeks gestation]. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)* 2001; 30: 706–707.
9. Beinder E, Grüner C, Erhardt I, Mauch E, Begon S: [The exencephaly-anencephaly sequence. Ultrasound diagnosis in early pregnancy]. *Ultraschall Med* 1995; 16: 192–195.
10. Becker R, Mende B, Stiemer B, Entezami M: Sonographic markers of exencephaly at 9 + 3 weeks of gestation. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2000; 16: 582–584.
11. Cafici D, Sepulveda W: First-trimester echogenic amniotic fluid in the acrania-anencephaly sequence. *J Ultrasound Med* 2003; 22: 1075–1079.
12. Abu-Rustum RS, Daou L, Abu-Rustum SE: Role of first-trimester sonography in the diagnosis of aneuploidy and structural fetal anomalies. *J Ultrasound Med* 2010; 29: 1445–1452.
13. Ebrashy A, El Kateb A, Momtaz M, El Sheikah A, Aboulghar MM, Ibrahim M *et al.*: 13–14-week fetal anatomy scan: A 5-year prospective study. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2010; 35: 292–296.
14. Müller F, O'Rahilly R: Development of anencephaly and its variant. *Am J Anat* 1991; 190: 193–218.
15. Wilkins-Haug L, Freedman W: Progression of exencephaly to anencephaly in the human fetus – an ultrasound perspective. *Prenat Diagn* 1991; 11: 227–233.
16. Cox GC, Rosenthal SJ, Holsapple JW: Exencephaly: sonographic findings and radiologic-pathologic correlation. *Radiology* 1985; 155: 755–756.
17. Gilbert-Barness E, Kapur RP, Oligny LL, Siebert JJ: *Potter's Pathology of the Fetus, Infant and Child*. Mosby, Chicago (IL) 2007.
18. Chen CP: Chromosomal abnormalities associated with neural tube defects (I): full aneuploidy. *Taiwan J Obstet Gynecol* 2007; 46: 325–335.
19. Pitt D, Leversha M, Sinfield C, Campbell P, Anderson R, Bryan D, Rogers J: Tetraploidy in a liveborn infant with spina bifida and other anomalies. *J Med Genet* 1981; 18: 309–311.
20. Tonni G, Ventura A, Bonasoni MP: Acrania/encephalocele sequence (exencephaly) associated with 92,XXXX karyotype: Early prenatal diagnosis at 9+5 weeks by 3D transvaginal ultrasound and coelocentesis. *Congenit Anoma (Kyoto)* 2009; 49: 113–115.
21. Chitty LS, Pilu G: The challenge of imaging the fetal central nervous system: An aid to prenatal diagnosis, management and prognosis. *Prenat Diagn* 2009; 29: 301–302.
22. Timor-Tritsch IE, Monteagudo A, Pilu G, Malinger G: *Ultrasonography of the prenatal brain*. McGraw-Hill, New York 2012.
23. Monteagudo A, Timor-Tritsch IE, Mayberry P: Three-dimensional transvaginal neurosonography of the fetal brain: 'Navigating' in the volume scan. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2000; 16: 307–313.
24. Nelson TR, Pretorius DH: Three-dimensional ultrasound imaging. *Ultrasound Med Biol* 1998; 24: 1243–1270.
25. O'Rahilly R, Müller F: *Carnegie: The Embryonic Human Brain: An Atlas of Developmental Stages*. Wiley-Liss Inc, New York 1999.
26. Taipale P, Ammälä M, Salonen R, Hiilesmaa V: Learning curve in ultrasonographic screening for selected fetal structural anomalies in early pregnancy. *Obstet Gynecol* 2003; 101: 273–278.
27. Iliescu D, Tudorache S, Comanescu A, Antsaklis P, Cotarcea S, Novac L *et al.*: Improved detection rate of structural abnormalities in the first trimester using an extended examination protocol. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2013; 42: 300–309.
28. Johnson SP, Sebire NJ, Snijders RJ, Tunkel S, Nicolaides KH: Ultrasound screening for anencephaly at 10–14 weeks of gestation. *Ultrasound Obstet Gynecol* 1997; 9: 14–16.