

(Aus der Pathomorphologischen Abteilung des Institutes für Laboratoriumsdia-
gnostik [Prof. G. Derman] und der Pathobiochemischen Abteilung [Vorstand: Prof.
S. Leites] des Institutes für Röntgenologie, Radiologie und Onkologie [Direktor:
Prof. G. Charmandarjan] in Charkow USSR).

Experimentell-morphologische Studien über den Einfluß von Autolysaten unbestrahlten und bestrahlten Milzgewebes.

I. Mitteilung.

Von

G. Derman und S. Leites.

Mit 4 Abbildungen im Text.

(Eingegangen am 21. Juni 1934.)

Die Produkte des Abbaues und der Lebenstätigkeit von Geweben und Organen besitzen zweifellos eine physiologische Aktivität und spielen in den korrelativen Vorgängen des pflanzlichen und tierischen Organismus eine wichtige Rolle (*Haberlandt, Weichardt, Guthertz, Richet, Miyagawa, Tuschnow, Kasakow u. a.*). Diese unter der Bezeichnung Histohormone zusammengefaßten Produkte werden gewöhnlich mittels fermentativer Heterolyse oder Autolyse, oder endlich durch Extraktion aus entsprechenden Organen und Geweben gewonnen. Die biologische Wirkung des Histohormonenkomplexes eines bestimmten Gewebes oder Organes — sog. Histolysate bzw. Autolysate — wird einerseits durch die spezifische Wirkung einer Reihe aktiver Substanzen wie Histamin, Tyramin, Cholin u. a. biogene Amine bestimmt, andererseits aber durch die unspezifische stimulierende Einwirkung unmittelbarer Produkte des Umsatzes, vorwiegend aber des Eiweißmetabolismus. Außerdem wird von einigen Verfassern (*Miyagawa, Tuschnow, Belonowski und Erstein u. a.*) angenommen, daß der Wirkungsmechanismus der Bestandteile von Organen und Geweben in bedeutendem Maße von der spezifischen Einwirkung dieser Substanzen auf die homologen Organe und Gewebe abhängig ist. Die Frage der deutlich ausgeprägten organspezifischen Einwirkung der Produkte des Gewebeumsatzes und -abbaues ist noch lange nicht endgültig erwiesen, obwohl die relative Spezifität der Wirkung einiger höheren Eiweißabbauprodukte den ihnen homologen Geweben gegenüber offenbar tatsächlich existiert.

Im Anschluß an eine Reihe von Untersuchungen, die in der Pathobiochemischen und Biochemischen Abteilung unseres Institutes über die biologische Aktivität von Autolysaten bestrahlten und unbestrahlten Milzgewebes angestellt wurden, machten wir es zu unserer Aufgabe,

das Bild der morphologischen Reaktionen zu beleuchten, die sich bei Einführung der erwähnten Autolysate in den tierischen Organismus abspielen; dies geschah zwecks Entscheidung der Frage nach ihrer organ- und wirkungsspezifischen Einstellung. Wir interessierten uns besonders für das Studium des morphologischen Bildes, das die Gewebe und Organe nach Einführung von Autolysaten bestrahlten Milzgewebes boten, insoweit durch die Untersuchungen von *S. Leites*, *R. Olschanetzkaia* und *R. Isabolinskaia* der Nachweis erbracht wurde, daß die Röntgenbestrahlung des Milzgewebes die Wirkung von Autolysaten dieses Gewebes auf den Gewebeumsatz (Fett-, Lipoid-, Stickstoff-, Kohlehydratumsatz), sowie auf experimentelle Tumoren verändert. Außerdem untersuchten wir morphologische Reaktionen nach Einverleibung von Autolysaten pathologischer menschlicher Milzen (die von Fällen des M. Banti und der myeloiden Leukämie stammten). In vorliegender Mitteilung werden die Versuchsergebnisse mitgeteilt, die nach Einführung einer eiweißfreien Summe *thermostabiler* bestrahlter und unbestrahlter Histohormone normaler und pathologischer Milzen, welche durch Autolyse gewonnen wurden, erzielt wurden.

Methodik und Versuchsanordnung.

Wir gebrauchten Milzautolysate von zwei Serien: Die eine wurde durch Autolyse in saurem Milieu ($p_H = 3,36$), die andere durch Autolyse in alkalischem Milieu ($p_H = 8,89$) gewonnen. Die erstere Serie soll des weiteren mit L I, die letztere mit L III bezeichnet werden. Die Methode der Bereitstellung von Autolysaten bestand im folgenden: Zerkleinertes Milzgewebe (das wir aus Schlachthäusern bezogen) wurde in ein entsprechendes Puffergemisch (1 Teil Gewebe + 9 Teile Gemisch) in den Brutschrank auf 24–72 Stunden gebracht, wo es bei 37° verweilte. Sodann wurde das Lysat durch Filtrierung von dem übriggebliebenen Gewebe befreit, das p_H des Filtrates auf 6,0 gebracht, dann kochte man das Filtrat auf, um es von Eiweißstoffen zu befreien. Das nunmehr eiweißfreie Autolysat wurde auf 5% der Lösung (im Verhältnis zum festen Rückstand) konzentriert; die Konzentration wurde nach dem spezifischen Gewicht festgestellt. Die erzielte Lösung wurde in Flaschen getan, sterilisiert und diente in solchem Zustande dem Experiment. Bestrahlte Autolysate wurden in der Weise bereitet, daß Milzgewebebrei vor Aufenthalt im Brutschrank mit Röntgenstrahlen bestrahlt wurde (Dosisierung: 50%, 200%, 400% und 800% HED, 160 KV, 0,5 Cu + 1,0 Al); des weiteren erfolgte die nämliche Behandlung der Gewebe wie bei den unbestrahlten Lysaten.

(Eingehenderes über Bereitstellung der Autolysate und ihre chemische Charakteristik siehe die Arbeiten von *E. J. Sterkin*, *B. B. Warschawskaja* und *S. N. Ledanow* aus der Biochemischen Abteilung unseres Institutes.)

Als Versuchstiere dienten Kaninchen und Meerschweinchen. Milzautolysate wurden ihnen zu je 1,0 cem einer 5%igen Lösung subcutan eingeführt; die Zahl der Injektionen betrug 20–30–40–50–70 (eingehend bei der Versuchsbeschreibung angegeben). Nach Beendigung der Injektionen wurden die Tiere geköpft. Schnittfärbung mit Hämatoxilineosin teils nach *van Gieson*. Die Tiere der Kontrollreihe wurden mit Autolysate von nichtbestrahltem und bestrahltem Muskelgewebe injiziert. Im ganzen wurden 17 Kaninchen und 30 Meerschweinchen untersucht.

Untersuchungsergebnisse.

1. Reihe. *Morphologische Reaktionen auf Einverleibung von Autolysaten unbestrahlten Milzgewebes.* Die Versuche wurden an 6 Meerschweinchen und 4 Kaninchen ausgeführt. Zahl der Injektionen: 20—30. Die histologische Untersuchung zeigte: a) *Leber.* Erscheinungen der Proliferation mäßigen Grades in den Kupfferschen Zellen; außerdem geringe Entartungserscheinungen in den Leberzellen. Diese Alterationen waren nach Einführung von LI bedeutend stärker als nach LIII ausgeprägt. b) *Milz.* Nach Einführung von LI und LIII Hyperämie der Malpighischen Körperchen und Sinuserweiterung; bei 2 Meerschweinchen kamen in der Milzpulpa Megakaryocyten vor. c) *Knochenmark.* Nach Einführung von LI und LIII beträchtliche regenerative Erscheinungen im Knochenmark mit zahlreichen Megakaryocyten. d) *Nieren.* Geringe degenerative Erscheinungen im Epithel der Kanälchen, besonders der gewundenen. e) *Nebennieren.* Ohne besondere Veränderungen.

2. Reihe. *Morphologische Reaktionen auf Einführung von Autolysaten von bestrahltem Milzgewebe.* Zahl der Injektionen: 20—30. Versuche an 4 Kaninchen und 14 Meerschweinchen. Histologische Analyse ergab: a) *Leber.* Nach Einverleibung von Autolysaten von Milzgewebe, das mit 50 und 200% HED bestrahlt worden war, zeigten Kupffersche Zellen geringe proliferative Erscheinungen; nach Einführung von „sauren“ Autolysaten (LI), die mit 400% HED bestrahlt waren, und „alkalischen“ (LIII), welche mit 200% HED bestrahlt waren, zeigten sich starke proliferative Erscheinungen an den Kupfferschen Zellen (s. Abb. 1). Das Leberparenchym zeigt Entartungserscheinungen und in einigen Fällen Areale fettiger Infiltration. b) *Milz.* Hyperplasie der Malpighischen Körperchen; Sinuserweiterung; in einigen Fällen kommen Megakaryocyten und Herde von Zellen vor, die mit braunem körnigem Pigmenthämösiderin beladen sind. Nach Einführung von LIII-Autolysaten, die mit

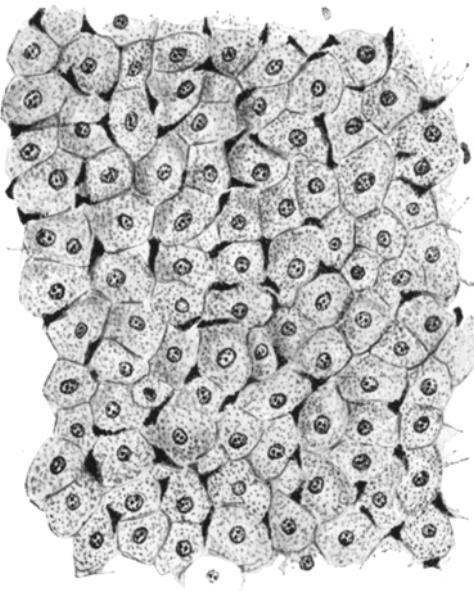


Abb. 1. Meerschweinchenleber nach chronischer Einführung von Autolysate bestrahlten (200% HED) Milzgewebes. Ok. 5, Ob. 6, Tub. 200 mm, Zeiß (Präp. Nr. 870).

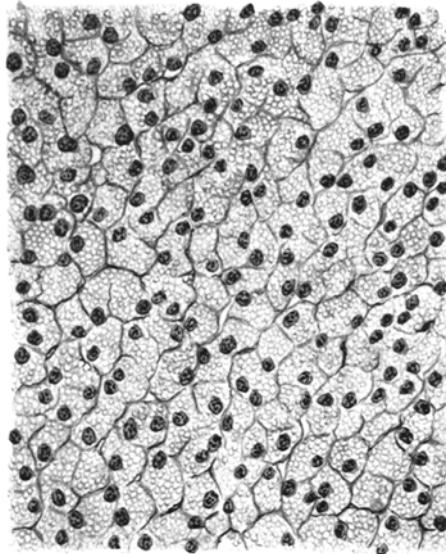


Abb. 2. Meerschweinchennebennierenrinde nach Einführung von Autolysate bestrahlten (200 % HED) Milzgewebes. Ok. 4, Ob. 6, Tub. 200 mm, Zeiß (Präp. Nr. 1415).

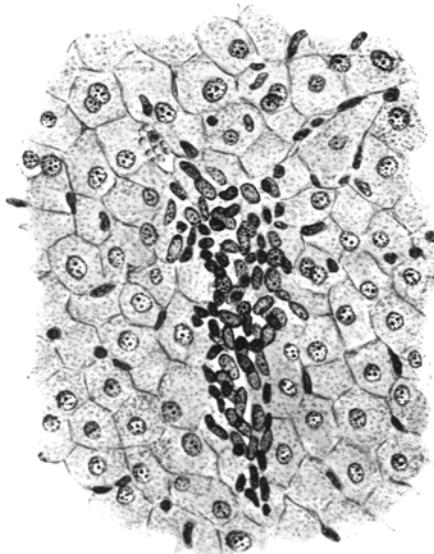


Abb. 3. Kaninchenleber nach Einführung von Autolysaten leukämischer Milz. Ok. 5, Ob. 6, Tub. 200 mm, Zeiß (Präp. Nr. 777).

200 % HED bestrahlten waren und LI-Autolysate nach Bestrahlung mit 400 % HED, erwies sich die Hyperplasie der Malpighischen Körperchen als schärfer ausgeprägt; auch Endotheliosis kam vor; stellenweise Wucherung der roten Pulpa mit fibröser Umwandlung desselben. In einem Fall (Versuch an einem Kaninchen, dem LI 50 % HED eingeführt war) sah man Hyalinose A. centralis. c) Knochenmark. Regenerative Erscheinungen bald stärker, bald schwächer ausgeprägt, zahlreiche Megakaryocyten; eine Abhängigkeit der Intensität der regenerativen Erscheinungen von der Bestrahlungsdosis war nicht festzustellen. d) Nieren. Geringfügige degenerative Veränderungen im Epithel der gewundenen Kanälchen. e) Nebennieren. Charakteristisch ist die deutliche Vermehrung der Lipoide in der Rindenschicht der Nebennieren (Abb. 2) nach saurem Milzautolysat (LI), das mit 200 % HED bestrahlt war.

3. Reihe. Morphologische Reaktionen auf Einführung von Autolysaten aus bestrahltem und unbestrahltem Muskelgewebe. Versuche an 3 Meerschweinchen, Zahl der Injektionen: 18—20. Histologische Analyse ergab: a) Leber. Proliferation von Kupferschen Zellen geringen bis mäßigen Grades; bisweilen Entartungerscheinungen in Leberzellenparenchym. b) Milz. Geringe

Hyperplasie der *Malpighischen* Körperchen, in vereinzelten Fällen mit Sinuserweiterung; es kommen einzelne Herde aus Zellen vor, die mit braunem körnigem Pigment — Hämosiderin — angefüllt sind. c) *Knochenmark*. Regenerative Erscheinungen mit mehr oder minder großem Gehalt an Megakaryocyten. d) *Nieren*. Geringe Entartungsercheinungen

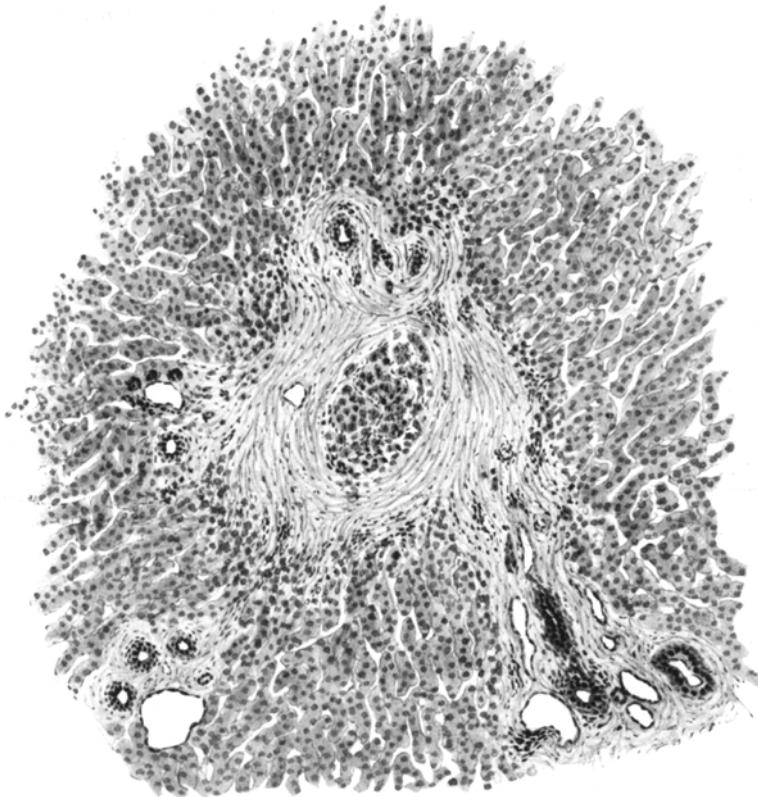


Abb. 4. Kaninchenleber nach chronischer Einführung von Milzautolysaten. Banti. Ok. 4, Ob. 3, Tub. 200 mm, Zeiß (Präp. Nr. 518).

am Epithel der gewundenen Kanälchen. Ein Unterschied in der Wirkung bestrahlter und unbestrahlter Autolysate ist nicht bemerkbar.

4. Reihe. *Morphologische Reaktionen auf Einführung von Autolysaten aus der Milz von Kranken mit M. Banti und myeloider Leukämie*. Versuche an 9 Kaninchen. Zahl der Injektionen: 30—70. Die histologische Analyse zeigte nach Einführung von Autolysaten der „leukämischen“ Milz: a) *Leber*. Deutliche Proliferation der Kupfferschen Zellen, scharf ausgeprägte Entartungsercheinungen im Parenchym der Leberzellen; es kommen Herde von myeloider Metaplasie (nach Einführung von alkalischem LIII-Lysat [Abb. 3]) vor. b) *Milz*. Hyperplasie der

Malpighischen Körperchen und des Endothels in den peripherischen Teilen; Wucherung der roten Milzpulpa; bisweilen sind darin zahlreiche Megakaryocyten enthalten. e) *Knochenmark*. Starke regenerative Erscheinungen mit großer Anzahl von Megakaryocyten; bloß in einem Falle (50 Injektionen) waren keine Erscheinungen der Regeneration nachweisbar. d) *Nieren*. Degenerative Erscheinungen im Kanälchenepithel; in einem Fall (LIII 42 Injektionen) wurde ein Rundzellenherd entdeckt, der auf myeloide Metaplasie verdächtig war.

Die histologische Analyse hatte nach Einführung von Autolysaten der Milz eines M. Bantifalles folgende Ergebnisse erbracht: a) *Leber*. Stark ausgeprägte degenerative Erscheinungen im Parenchym der Leberzellen: *Verdickung und stellenweise Wucherung des Bindegewebes mit Kompression der interlobulären Lebergänge* (Abb. 4). Ab und zu Herde von myeloider Metaplasie. Eine Reizung des reticuloendothelialen Systems ist nicht zu beobachten. b) Hyperplasie der *Malpighischen* Körperchen, stellenweise auch ihres Endothels; geringgradige Wucherung des Bindegewebes im *Malpighischen* Körperchen und Milzpulpa; ab und zu sieht man verdickte Kapseln und Trabekeln; es kommen Megakaryocyten und Gruppen von Zellen vor, die mit körnigem braunem Pigment — Hämosiderin — beladen sind. c) *Knochenmark*. Erscheinungen der Regeneration mit großer Anzahl von Megakaryocyten. d) *Nieren*. Geringe Entartungserscheinungen im Epithel der gewundenen Kanälchen.

Zusammenfassung.

Fassen wir die erzielten Ergebnisse zusammen, so dürfen wir folgende Eigentümlichkeiten der morphologischen Reaktionen auf die Einführung von Milzgewebsautolysaten zurückführen.

Als charakteristische morphologische Reaktion auf Einführung von unbestrahlten Milzautolysaten erscheint eine Aktivierung der Elemente des reticuloendothelialen Systems der Leber und der Milz. Ein gewisser Grad von Aktivierung dieser Elemente macht sich bei Einführung von Autolysaten von Muskelgewebe geltend, ist jedoch schwächer als derjenige, der auf Injektionen von Milzautolysaten folgt. Somit lässt sich außer einer unspezifischen Stimulierung des Reticuloendothels durch Eiweißabbauprodukte, wie sie bei Injektion jeglicher Autolysate zu stande kommt (s. unsere Versuche mit Einverleibung von Myolysaten, die Versuche von *Morgenstern* mit Einführung von Lysaten der Schilddrüse und Nebennieren u. a.), in Versuchen mit Einverleibung von Milzautolysaten auch noch eine relative Spezifität der Wirkung nachweisen; letztere findet in einer deutlicheren Stimulierung des Reticuloendothels ihren Ausdruck. Eine derartige Aktivierung des Reticuloendothels hinsichtlich der Absorption von elektronegativen Kolloiden wurde nach Einführung von Milzextrakt von einer Reihe von Verfassern (*Tangl*,

Schliephake und *Sincke*, *Tanakaya*) nachgewiesen; den Untersuchungen von *Moncorps* und *Günther* nach soll Cytosin (2 oxy-B-Aminopyridin) diejenige Milzsubstanz sein, welche die Absorptionsfähigkeit des Mesenchyms aktiviert. Jedoch war der das Reticuloendothel aktivierende Anreiz der Autolysate der Milz in dieser Reihe sehr mäßig ausgeprägt; Höchstwahrscheinlich lagen in der Methode der Zubereitung der in dieser Reihe gebrauchten Autolysate gewisse Bedingungen vor, welche die spezifische Einwirkung auf das Reticuloendothel abschwächten: Das Kochen, das die Autolysate von den Eiweißsubstanzen befreien sollte, konnte eine Reihe termolabiler Histohormone vernichtet haben. Daher soll unsere nächste Aufgabe darin bestehen, die Methode der Darstellung von Autolysaten solcher Art zu ändern, daß der Verlust termolabiler Stoffe vermieden werde. In folgender Mitteilung sollen Angaben über morphologische Reaktionen nach Einführung termolabiler Histohormone der Milz dargelegt werden.

Was den Charakter der morphologischen Reaktionen auf Einführung von Autolysaten *bestrahlten* Milzgewebes anbetrifft, so ist die wichtige Tatsache hervorzuheben, daß bei Bestrahlung des Milzgewebes mit 200% HED (LIII) und 400% HED (LI) eine deutliche Aktivierung von Autolysaten aus diesem Gewebe in ihrer Wirkung auf das Reticuloendothel von Leber und Milz auftritt. Nach Bestrahlung mit 50 und 800% HED trat keine derartige Aktivierung auf. Somit haben wir in den Röntgenstrahlen nach Anwendung einer bestimmten Dosis davon einen wirksamen Faktor, der die biologische Wirkung der Histohormone der Milz in bezug auf das reticuloendotheliale System aktiviert.

Eine besondere Beachtung verdient der Umstand, daß die Einführung von saurem Autolysat (LI) von Milzgewebe, das mit 200% HED bestrahlt wurde, eine beträchtliche Steigerung des Lipoidgehaltes in der Rindenschicht der Nebennieren bewirkt. Da die Einverleibung von diesem Autolysat eine Steigerung des Glykogengehaltes in den Muskeln zur Folge hat (*S. Leites*, *R. Olschanetzkaia* und *R. Isabolinskaia*), diese Wirkung aber gewissermaßen spezifisch für das Hormon der Nebennierenrinde ist, dürfen wir als recht wahrscheinlich die Vermutung zulassen, daß durch Bestrahlung des Milzgewebes mit 200% HED die Bildung von aktiver Substanz daselbst angeregt wird, welch letztere die Inkretion des Hormons der Nebennierenrinde stimuliert.

Veränderungen des Knochenmarkes, die durch regenerative Alterationen und das Vorhandensein zahlreicher Megakaryocyten gekennzeichnet werden, sind offenbar, sowohl als die geringen degenerativen Erscheinungen des Leber- und Nierenparenchyms, als ein Resultat der unspezifischen Wirkung der Abbauprodukte der Gewebe anzusehen, da solche Veränderungen auch in Erscheinung treten, wenn Autolysate sowohl von bestrahlten und unbestrahlten Milz- als auch von Muskelgewebe eingeführt werden.

Von besonderem Interesse ist das morphologische Bild, das bei chronischen Injektionen von Milzautolysaten von Kranken mit M. Banti und myeloider Leukämie erzielt wird (die Milz wurde bei einem Fall von M. Banti während der Operation gewonnen; die Milz eines Falles von myeloider Leukämie wurde 4 Stunden nach dem Tode des Kranken entnommen). Durch Einverleibung von Autolysaten aus „leukämischer“ Milz wird einerseits eine scharf ausgeprägte Hyperplasie des Reticuloendothels von Leber und Milz, andererseits starke degenerative Erscheinungen in der Leber hervorgerufen; die toxo-regenerative Wirkung der Histo-hormone einer leukämischen Milz sind deutlich genug ausgesprochen und unterscheidet sich von dem biologischen Effekt der Histo-hormone einer normalen Milz.

Außerdem gelingt es durch Injektionen von Autolysaten einer leukämischen Milz Herde von myeloider Metaplasie in der Leber und manchmal auch in den Nieren hervorzurufen. Obwohl vereinzelte Herde myeloider Metaplasie in einigen Versuchen mit Einführung von Autolysaten einer M. Banti-Milz zu erzielen waren, so traten doch solche Herde nach Gebrauch von Autolysaten „leukämischer“ Milz bedeutend häufiger und in stärkerem Grade ausgeprägt auf.

Eine teilweise Reproduktion gewisser Teilstücke des morphologischen Bildes des M. Banti gelingt am Kaninchen auch durch chronische Injektionen von Autolysaten einer M. Banti-Milz. Wie aus den dargestellten Befunden hervorgeht, tritt bei Einverleibung der genannten Autolysate eine Bindegewebswucherung in der Leber und, teilweise auch in der Milz, auf. Dabei ist der Umstand charakteristisch, daß durch Einverleibung von Autolysaten einer M. Banti-Milz keine Aktivierung der reticuloendothelialen Elemente der Leber und der Milz bewirkt wird, während die Autolysate von normaler Milz stets diesen Vorgang zur Folge haben. Offensichtlich erfolgt bei M. Banti eine Störung in der Produktion der das Reticuloendothel stimulierenden Histo-hormone.

Vergleicht man die Wirkung von M. Banti-Milz mit „leukämischer“ Milz, so muß hervorgehoben werden, daß einer jeden von ihnen eine Reihe der obenerwähnten spezifischen Eigentümlichkeiten zukommt. Die Eigentümlichkeiten des pathologischen Vorganges in der Milz werden in den Besonderheiten der biologischen Wirkung der Histo-hormone widergespiegelt, die bei dem genannten pathologischen Prozeß zur Ausbildung kommen. Anders gesagt, entspricht einem bestimmten pathologischen Milzprozeß eine Reihe von Histo-hormonen die für ihn spezifisch sind. Es ist anzunehmen, daß auch die Pathologie anderer Organe und Gewebe durch die Bildung spezifischer Histo-hormone, bzw. durch den Ausfall gewisser diesem Gewebe eigener Histo-hormone, gekennzeichnet wird. Wie uns scheint, stellt die Erforschung der Biologie der Histo-hormone der pathologischen Gewebe und Organe eine der aktuellen Aufgaben der modernen Pathologie dar und kann viele wertvolle Befunde

liefern, die dem Verständnis die Fragen der Pathogenese näherrücken werden.

Schlußfolgerungen.

1. Die chronische Zufuhr von termostabilen Produkten der Autolyse (Autolysate) des Milzgewebes aktiviert bei Kaninchen und Meerschweinchen die Elemente des reticuloendothelialen Systems der Leber und der Milz. Die erwähnte Wirkung der Milzautolysate übertrifft diejenige der Muskelgewebsautolysate.
2. Durch Bestrahlung von Milzgewebe mit 200% und 400% HED wird die aktivierende Wirkung dieses Gewebes auf das Reticuloendothel gesteigert; Dosen zu 50% HED und 800% ändern diese Wirkung nicht.
3. Chronische Zufuhr von nichtbestrahlten und bestrahlten Autolysaten von Milz- und Muskelgewebe ruft regenerative Erscheinungen, Zunahme der Megakaryocyten im Knochenmark, geringe degenerative Erscheinungen im Leber- und Nierenparenchym hervor, was offenbar einer unspezifischen Wirkung der Gewebsabbauprodukte zugeschrieben werden muß.
4. Chronische Zufuhr von Autolysaten der Milz einer an myeloider Leukämie leidenden Kranken bewirkt bei Kaninchen eine scharf ausgeprägte Proliferation der Elemente des Reticuloendothels der Leber und der Milz, degenerative Veränderungen und Herde von myeloider Metaplasie in der Leber.
5. Chronische Zufuhr von Autolysaten der Milz eines M. Banti-Kranken bewirkte bei Kaninchen eine Wucherung des Bindegewebes der Leber und, teilweise auch in der Milz sowie degenerative Veränderungen in der Leber.

Schrifttum.

- Belanowsky u. Erstein:* Arch. biol. Nauk. (russ.) **1931**, 231. — *Gutherz:* Der Partialtod in funktioneller Betrachtung. Jena: Gustav Fischer 1926. — *Kasakow, J. N.:* Klin. Med. (russ.) **1933**, H. 11/12. — *Miyagawa:* Jap. J. of exper. Med. 8, Nr 3, 185 (1930). — *Moncorps u. Günther:* Klin. Wschr. **1933**, Nr 25, 979. *Morgenstern:* Sovjet. Klinika **1933**, Nr 2 (russ.). — *Ricket:* Presse méd. **1926**, Nr 91. *Schliephake:* Dtsch. Arch. klin. Med. **172**, 523 (1932). — *Schliephake u. Sincke:* Klin. Wschr. **1931**, 246. — *Sincke:* Z. exper. Med. **63**, 223 (1928). — *Ssaharow:* Sovjet. Klinika **1933**, Nr 2 (russ.). — *Tangl:* Biochem. Z. **1926**. — *Tanakaya:* Ber. Physiol. **72**, 540 (1933). — *Tuschnow:* Klin. Med. **1933**, 11—12. — *Weichardt:* Klin. Wschr. **1931**, Nr 4, 153.
-