



ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА І КЛІНІЧНА МЕДИЦИНА

№ 2 (59), 2013

Експериментальна
і клінічна медицина

Науково-практичний журнал
Періодичність видання - 4 рази на рік
Заснований у вересні 1998 р.

Засновник, редакція та видавець -
*Харківський національний
медичний університет*

Свідоцтво про державну реєстрацію
друкованого засобу ЗМІ
КВ № 16434-4906П? від 21.01.10.
Журнал віднесено до наукових фахових
видань України в галузі медичних наук
(додаток до постанови президії ВАК України
від 26.05.10 № 1-05/4)

Редактор *В.М. Ходоревська*
Комп'ютерне верстання *Л.К. Сокол*

Адреса редакції та видавця:
6/022, Харків, просп. Леніна, 4
Тел. (057) 707-73-00
e-mail: *ekt.klmgkiv@mai.gov.ua*

Свідоцтво про внесення до Державного
реєстру суб'єктів видавничої справи
ДК № 3242 від 18.07.2008 р.

Номер рекомендовано до друку
Вченою радою ХНМУ
(протокол № 5 від 16.05.13)

Підписано до друку 17.05.13
Ум. друк. арк. 10,8
Обл.-вид. арк. 12,8
Формат 60x84 1/8. Папір офс. Друк. офс.
Тираж 500 пр. Зам. № 13-3078

Надруковано у редакційно-видавничому
відділі ХНМУ.

© **Експериментальна і клінічна
медицина, 2013**

Головний редактор *В.М. ЛІСОВИЙ*

Перший заступник головного редактора
В.В. М'ясоєдов

Заступники головного редактора:

В.А. Капустник, О.М. Ковальова, В.О. Сипливий

Відповідальний секретар *О.Ю. Степаненко*

Редакційна колегія

*В.І. Жуков, Г.М. Кожина, В.М. Козько,
В.О. Коробчанський, І.А. Криворучко,
В.А. Огнєв, Ю.С. Парацук, Є.М. Рябоконь,
Г.С. Сенаторова, І.А. Тарабан, Т.В. Фролова*

Редакційна рада

*О.Я. Бабак (Харків), П.А. Бездітко (Харків),
О.М. Біловол (Харків),
Р.В. Богатирьова (Київ), В.В. Бойко (Харків),
Дж/сенс П. Бонд (Копенгаген, Данія),
В. О. Вишневецький (Москва, РФ), О.Ф. Возіанов (Київ),
П.В. Волошин (Харків), О.Я. Гречанина (Харків),
І.Я. Григорова (Харків), Д. Заболотний (Київ),
Т.В. Звягінцева (Харків), Н.А. Жернакова (Белгород, РФ),
В.М. Козаков (Донецьк), Ю.М. Колесник (Запоріжжя),
М.О. Корз'є (Харків), І. Ф. Костюк (Харків),
В.А. Лупальцов (Харків), В.Д. Марковський (Харків),
С.Ю. Масловський (Харків)
В.В. Мінухін (Харків), В.Ф. Москаленко (Київ),
М.І. Пиштенко (Харків), Г.П. Рузін (Харків),
Ж.Д. Семидоцька (Харків)
Даніела Стрітт (Кройцлінген, Швейцарія),
А. О. Терещенко (Харків), Ю.І. Феценко (Київ)*

Харків -ХНМУ -2013

- Э.В. Карнаух, М.В. Майорова.** Седативная фитотерапия
50
- В.А. Мороз.** Современный тренд лекарственного лечения инфекции нижних отделов мочевыводящего тракта
57
- В.В. Гринь.** Влияние лекарственных средств с фотопротекторными свойствами на содержание циркулирующих иммунных комплексов при локальном ультрафиолетовом облучении кожи морских свинок в постэритемный период
63
- А.Н. Шевченко, Л.И. Коваленко.** Костномозговое кроветворение при вторично хроническом воспалении на фоне применения натрия нуклеиата
67
- Х.А. Кирик.** Стереометрична характеристика гемомікроциркуляторного русла судинної оболонки очного яблука в нормі та на ранніх етапах перебігу цукрового діабету (експериментальне дослідження)...
74
- В.В. Хазієв, І.В. Сорокіна.** Експресія онко-маркерів Ki-67 і P53 у фолікулярних неоплазіях щитовидної залози
77
- Н.В. Жарова.** Сравнительный анализ миелоархитектоники нервов эндокринних желез у женщин репродуктивного возраста
82
- ТЕРАПІЯ
- О.М. Ковальова, Н.М. Герасимчук, Н.А. Сафаргаліна-Корнілова.** Рівень 8-ізопростану та активність супероксид дисмутазі і каталази у хворих на гіпертонічну хворобу з надмірною масою тіла й ожирінням на фоні комбінованої антигіпертензивної терапії
86
- О.В. Гончарь, О.М. Щедрое, В.Т. Хмара, А.Т. Хмара.** Особливості ремоделювання лівого шлуночка у хворих на гіпертонічну хворобу з ожирінням
93
- В.А. Капустник, А.Я. Меленевич.** Роль дисплазии соединительной ткани в формировании хронического обструктивного заболевания лёгких (обзор литературы)
98
- В.Н. Погорелое, В.В. Брек, С.В. Денисова, И.В. Волкова, Л.В. Кибенко.** Антигипертензивная терапия больных хроническими обструктивными заболеваниями лёгких
105
- Б.А. Пасибуллин, И.К. Тагунова, А.В. Андреев.** Корреляты изменений клеточного состава жидкости полости рта у больных с разной патологией глотки и показатели активности иммунной системы
110
- E. V. Karnaukh, M. V. Mayorova.** Sedation
50
- V.A. Moroz.** Modern trend of drug treatment of lower urinary tract infections
57
- V.V. Grin.** Influence of agents with photoprotectors on the circulatory immune complexes plasma level of guinea pigs after local ultraviolet irradiation in posterythematos period
63
- A.N. Shevchenko, L.I. Kovalenko.** The bone marrow hematopoiesis in the time of secondary chronic inflammation during treatment with sodium nucleinate
67
- K.A. Kyryk.** Stereometrical character of hemomicrocirculation stream of the vascular layer of eyeball in normal conditions and on early stage of diabetes mellitus (experimental investigation)
74
- V.V. Khaziev, I. V. Sorokina.** Expression of onco-markers Ki-67 and p53 in thyroid follicular neoplasias
77
- N.V. Zharova.** Comparative analysis myeloarchitectonic of nerves of endocrine organs women reproductive age
82
- THERAPY
- O.N. Kovaleva, N.N. Gerasimchuk, N.A. Safargalina-Kornilova.** Level of the 8-isoprostan and activity of the superoxidodismutase and katalase in patients with essential hypertension with overweight and obesity by combination antihypertensive therapy
86
- O.V. Honchar, O.M. Shchedrov, V.T. Hmara, A.T. Hmara.** Peculiarities of left ventricular remodelling in obese patients with hypertension
93
- V.A. Kapustnyk, A.Ya. Melenevich.** Role of heritable disorders of connective tissue in forming of chronic obstructive pulmonary disease (literature review)
98
- V.N. Pogorelov, V.V. Brek, S. V. Denisova, I. V. Volkova, L. V. Kibenko.** Antihypertensive treatment of patients with chronic obstructive pulmonary disease
105
- B.A. Nasibullin, I.K. Tagunova.** Correlates changes of cellular cc fluid in patients with different and indicator of immune syst
110

УДК 616.441-006.55-074

В.В. Хазіса, І.В. Сорокіна*

ДУ «Інститут проблем ендокриної патології ім. В.Я. Дзішневського
НАМН України», м. Харків

*Харківський національний медичний університет

**ЕКСПРЕСІЯ ОНКОМАРКЕРІВ Ki-67 І P53
У ФОЛІКУЛЯРНИХ НЕОПЛАЗІЯХ ЩИТОВИДНОЇ ЗАЛОЗИ**

Виявлено високу частоту експресії Ki-67 в препаратах фолікулярних аденом (100 %), фолікулярного (100 %) та папілярного (78.95 %) раку щитовидної залози. Найбільш висока сила експресії характерна для фолікулярного раку. Слабка експресія p53 з максимальною частотою реєструвалася в препаратах фолікулярних аденом (66,7 %) і значно рідше в препаратах фолікулярного (18,7 %) та папілярного (21,05%) раку щитовидної залози. Отримані дані не можуть підтвердити гіпотезу про цінність онкомаркерів Ki-67 і p53 для диференційної діагностики тиреоїдних фолікулярних неоплазій і вказують на необхідність глибокого вивчення патогенетичних факторів існування несхожих форм пухлинної патології щитовидної залози.

Ключові слова: щитовидна залоза, фолікулярна аденома, фолікулярний рак, папілярний рак.

Сукупна точність клінічних, інструментальних і лабораторних методів діагностики щодо встановлення морфологічного походження вузлових новоутворень щитовидної залози навіть за самими сміливими висновками не перевищує 80 % [1]. Такий результат не може задовольнити ні хірургів (невиправдана гіпердіагностика раку щитовидної залози, ні ендокринологів (неадекватний і несвочасний відбір пацієнтів для хірургічного лікування). Клінічно встановити злоякісність вузла на ранньому етапі практично неможливо, а діагноз, як правило, встановлюється на пізніх стадіях при наявності регіонарних і віддалених метастазів [2-4]. В якості критеріїв диференційної діагностики вузлового зоба і раку щитовидної залози пропонуються чисельні імуногістохімічні, імуноцитохімічні та молекулярні маркери, жоден з яких, на жаль, не має стовідсоткової специфічності [5, 6].

Перспективним маркером вважається Ki-67. Антитіла Ki-67 розпізнають ДНК-зв'язаний ядерний протеїн, що присутній в ядрах клітин в G1-, S-, G2-таM-фазах і відсутній в G0-фазі. Проліферативна активність багатьох новоутворень оцінюється за допомогою Ki-67. Виявлено зв'язок між значеннями індексу проліферації, ступенем гістологічної диференціації пухлини і клінічним прогнозом при раку ендометрія, яєчників, легенів, молочної залози, сечового міхура, лімфомах та пухлинах нервової системи [7-10].

Багатообіцяючим для діагностичного застосування є також онкомаркер p53. Білок p53 - продукт гена-супресора пухлини TP53, експресується в усіх клітинах організму. Результатом його активації є зупинка клітинного циклу і реплікації ДНК, при сильному стресовому сигналі - запуск апоптозу. Білок p53 активується при ушкодженнях генетичного апарату, а також при стимулах, які можуть призвести до подібних пошкоджень або є сигналом при несприятливому стані клітини (стресовому стані). Функція білка p53 полягає у видаленні з пулу тих клітин, які є потенційно онкогенними, звідси образна назва білка p53 - англ. *guardian of the genome* - хранитель геному. За даними літератури, втрата функції білка p53 встановлювалася приблизно у 50 % випадків злоякісних пухлин людини, у тому числі і щитовидної залози [11, 12].

Мета даного дослідження - визначення експресії маркерів Ki-67 і p53 в якості потен-

© В.В. Хазіса, І.В. Сорокіна, 2013

ціальних критеріїв диференційної діагностики фолікулярних неоплазій щитовидної залози.

Матеріал і методи. Імуногістохімічним методом досліджено 24 препарати фолікулярних аденом щитовидної залози (ФАЩЗ), 16 препаратів фолікулярного раку щитовидної залози (ФРЩЗ) та 19 препаратів папілярного раку щитовидної залози (ПРЩЗ). Використано моноклональні антитіла до p53-онкопротеїну (клон DO-7, DakoCytomation), Ki-67 (клон MIB-1, DakoCytomation). Зрізи товщиною 4-5 мкм наносили на предметні скельця, заздалегідь оброблені адгезивною рідиною (poly-L-lysine) з подальшою депарафінізацією відповідно до прийнятих стандартів. Для кожного маркера виконувалися контрольні дослідження з метою виключення помилково позитивного або помилково негативного результату. Подальшу обробку проводили з використанням систем візуалізації B8AB2 і LabVision (UltraOne) впродовж 10 хв з кожним реагентом з проміжним промиванням у ТРИС-буферному розчині. Після цього проводили реакцію з хромогеном (DAB, DakoCytomation), мікроскопічно оцінюючи якість взаємодії протягом 20 с - 3 хв. Для диференціювання структур тканин зрізи додатково фарбували гематоксилином Майєра протягом 3 хв. Дегідратація і заливка в бальзам здійснювалися згідно з відомими принципами. Результат оцінювали як позитивний при випаданні солей хромогенів саме в пухлинних клітинах, причому у вигляді специфічної реакції (мембранної або реакції цитоплазми).

Клітини, що були позитивними відносно експресії маркерів, вивчали як мінімум на 4-6 випадково вибраних гістологічних зрізах в полях зору мікроскопа з використанням об'єктивів x10 і 40. Після підрахунку 300 гістологічно ідентифікованих об'єктів (ядер або клітин) обчислювали показники експресії за результатами усіх вивчених ділянок. Враховували позитивну реакцію в нормальних клітинах фолікулярного тиреоїдного епітелію, а також в пухлинних клітинах. При оцінці імуногістохімічного забарвлення з антитілами до Ki-67 і p53 позитивна реакція в клітинних ядрах виявлялася коричневим забарвленням різного ступеня інтенсивності.

Оцінка імуногістохімічної реакції ґрунтувалася на інтенсивності забарвлення і розподілі імунопозитивних клітин: «-» - немає експресії; «+» - слабка; «++» - помірна і «+++» - інтен-

сивна експресія. Експресію p53 і Ki-67 обчислювали незалежно від інтенсивності забарвлення як відсоток клітин з інтрануклеарною реакцією від загального числа клітин в середньому за результатами усіх вивчених ділянок.

Результати та їх обговорення. У досліджуваному матеріалі ФАЩЗ експресія Ki-67 коливалася від 1-2 до 3-4 забарвлених ядер в полі зору (24 випадки; 100,0 %), рис. 1.

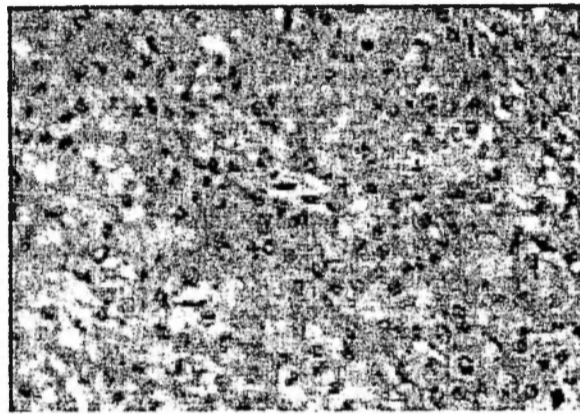


Рис. 1. Мікроструктура нормофолікулярної аденоми. Фокальна нуклеарна реакція на Ki-67, додаткове фарбування гематоксилином Майєра, x 400

Нуклеарна експресія Ki-67 у ФРЩЗ була більш вираженою у порівнянні з такою у ФАЩЗ, що відображає значно більшу проліферативну активність фолікулярних карцином. У нашому дослідженні експресія даного маркера коливалася в діапазоні 8—20 забарвлених ядер у полі зору (16 випадків; 100,0 %), рис. 2.

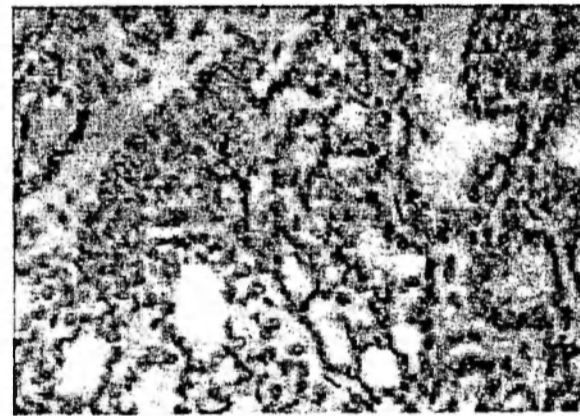


Рис. 2. Експресія Ki-67 у фолікулярному раці щитовидної залози. Додаткове забарвлення гематоксилином Майєра в полі зору до 20 забарвлених ядер, x 400

Експресія Ki-67 в ПРЩЗ була слабо вираженою. Забарвлення мало фокальний нуклеарний характер, причому в полі зору визначалося не більше 1-2 ядер з помірною реакцією на цей маркер (рис. 3). Необхідно відмітити, що позитивну експресію було виявлено в 15 випадках із 19 (78,95 %). Решта препаратів не показала активності проліферативних процесів і була властивою ГІРЩЗ.



Рис. 3. Незначна експресія *Ki-67* у папілярному раці щитовидної залози. Додаткове забарвлення гематоксиліном Майєра, х 400

При визначенні онкопротеїну p53 у ФАЩЗ виявлено, що він був присутнім у 66,7 % усіх вивчених випадків аденом. Експресія маркера була слабо вираженою і специфічною для мікрофолікулярних аденом щитовидної залози (рис. 4). Тільки у трьох випадках (18,7 %)



Рис. 4. Мікроструктура фолікулярної аденоми щитовидної залози. Незначна ядерна реакція на p53. Додаткове забарвлення гематоксиліном Майєра, х 400

ФАЩЗ нуклеарна експресія онкопротеїну p53 була слабопозитивною (рис. 5). Аналогічні дані

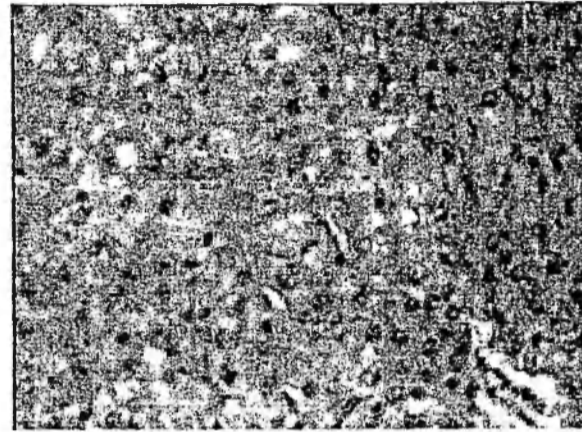


Рис. 5. Слабопозитивна експресія p53 у фолікулярному раці щитовидної залози. Додаткове забарвлення гематоксиліном Майєра, х 400

нами виявлені і при дослідженні p53 в препаратах ПРЩЗ - позитивна експресія визначалася в 4 із 19 випадків (21,05 %). Забарвлення на цей маркер мало фокальний характер, причому в одному полі зору визначалося не більше 6-7 ядер (рис. 6).

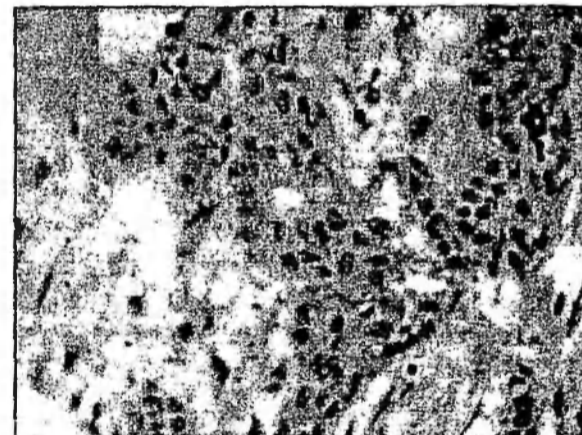


Рис. 6. Незначна нуклеарна експресія p53 в папілярній карциномі щитовидної залози. Додаткове забарвлення гематоксиліном Майєра, х 400

Отримані дані свідчать про різний характер експресії досліджуваних маркерів у препаратах новоутворень фолікулярного епітелію щитовидної залози. Щодо експресії Ki-67, то максимальну проліферативну активність демонстрували зразки ФРЩЗ і ФАЩЗ, тоді як у зразках ПРЩЗ вона була менш вираженою. Існують дані, що в злоякісних пухлинах щитовидної

залежно від типу раку виражаються рецептори p53 і Ki-67 в близько 10% – доброякісні. На цьому етапі варто прийняти рівень 20% за межу між доброякісними та злоякісними захворюваннями щитовидної залози, то за допомогою Ki-67 можна визначити малігнізуючі на функційному матеріалі з чутливістю до 82% і точністю до 84% [7–10]. Отримані нами дані не підтверджують таку гіпотезу у зв'язку із високою частотою експресії досліджуваного маркера для всіх видів патології, як доброякісної, так і злоякісної.

Відповідно до сучасних поглядів, білок p53 задіяний у трансформації високодиференційованого тиреоїдного раку в анапластичний. За деякими даними, мутації в гені p53 характерні для 25% випадків диференційованих раків щитовидної залози, що узгоджується з нашими даними, і 86% випадків анапластичних карцином, тому пропонується використовувати цей онкомаркер як прогностичний чинник [13, 14]. Але відповідно до отриманих нами даних p53 значно частіше експресувався у ФАЦЗ, ніж у злоякісних новоутвореннях щитовидної залози, що вказує, по-перше, на неможливість його використання як чинника диференційної діагностики, по-друге, на генетичну неоднорідність фолікулярного та папілярного раку щитовидної залози.

Отже, виявлений неоднозначний характер експресії онкомаркерів p53 та Ki-67 вказує на існування різних типів пухлин фолікулярного

епітелію щитовидної залози з розбіжними патогенетичними механізмами розвитку, перебігу та прогнозу.

Висновки

1. Дослідження експресії Ki-67 виявило її високу частоту в препаратах фолікулярних аденом щитовидної залози (100%), фолікулярного (100%) і папілярного (78,95%) раку щитовидної залози. Найбільш висока сила експресії характерна для фолікулярного раку щитовидної залози.

2. Слабка експресія p53 з максимальною частотою рееструвалася в препаратах фолікулярних аденом щитовидної залози (66,7%) і значно рідше – у випадках фолікулярного (18,7%) і папілярного (21,05%) раку щитовидної залози.

3. Отримані дані не можуть підтвердити гіпотезу про цінність онкомаркерів Ki-67 і p53 для диференційної діагностики фолікулярних неоплазій щитовидної залози і вказують на необхідність глибокого вивчення патогенетичних факторів існування несхожих форм пухлинної патології щитовидної залози.

Перспективою подальших досліджень є поглиблене вивчення патогенетичних факторів існування несхожих форм пухлинної патології щитовидної залози та впровадження отриманих результатів в практику з метою покращення морфологічної діагностики пухлин щитоподібної залози.

Список літератури

1. Рожкова Е.Б. Экспрессия p53 и EGFR в папиллярном раке щитовидной железы / Е.Б. Рожкова // *Фундаментальные науки и прогресс клинической медицины* : Матер. III конф. молодых ученых России с междунар. участием. – М., 2004. – С. 232–233.
2. Роль первичного морфологического диагноза папиллярного рака щитовидной железы / Л.Е. Демидчик, Е.П. Демидчик, М.В. Фридман [и др.] // *Вопросы онкологии*. – 2009. – Т. 55, № 3. – С. 351–357.
3. Diagnosis of the follicular variant of papillary thyroid carcinoma. Significance of immunohistochemistry / S. Guyetant, S. Michalak, I. Valo [et al.] // *Ann. Pathol.* – 2003. – V. 23, № 1. – P. 11–20.
4. False-negative fine-needle aspiration cytology results delay treatment and adversely affect outcome in patients with thyroid carcinoma / M. W. Yeh, O. Demircan, P. Ituarte [et al.] // *Thyroid*. – 2004. – № 14. – P. 207–215.
5. Онкомаркеры в дифференциальной диагностике и прогнозе при папиллярном раке щитовидной железы / Е. Б. Рожкова, Е. А. Коган, М. Sobrinho-Simoes [и др.] // II Всероссийский съезд патологоанатомов, 11–14 апреля 2006 г. : материалы съезда. – М., 2006. – С. 355–357.
6. Parameswaran R. Molecular pathogenesis of follicular cell derived thyroid cancers / R. Parameswaran, S. Brooks, G. P. Sadler // *Int. J. Surg.* – 2010. – № 8 (3). – P. 186–193.

7. Choudhury M. Diagnostic utility of Ki-67 and p53 immunostaining on solitary thyroid nodule – a cytohistological and radionuclide scintigraphic study / M. Choudhury, S. Singh, S. Agarwal // *Indian J. Pathol. Microbiol.* – 2011. – № 54 (3). – P. 472–475.
8. Class distinction between follicular adenomas and follicular carcinomas of the thyroid gland on the basis of their signature expression / B. S. Stolf, M. M. S. Santos, D. F. Simao [et al.] // *Cancer.* – 2006. – № 106. – P. 1891–1900.
9. Immunohistochemical expression of cyclin D1, E2F-1 and Ki-67 in benign and malignant thyroid lesions / A. D. Saiz, M. Olvera, S. Rezk [et al.] // *J. Pathol.* – 2002. – № 198. – P. 157–162.
10. Ki-67 positive fractions in benign and malignant thyroid tumours: application of flow cytometry / A. Horii, J. Yoshida, M. Sakai [et al.] // *Acta Otolaryngol.* – 1999. – Vol. 119, № 5. – P. 617–620.
11. A new oncogene in human thyroid papillary carcinomas and their lymph nodal metastases / A. Fusco, M. Grieco, M. Santoro [et al.] // *Nature.* – 1987. – Vol. 328, № 5. – P. 170–172.
12. Ret oncogene activation in papillary thyroid carcinoma: prevalence and implication on the histological parameters / A. K. Lam, K. T. Montone., K. Nolan [et al.] // *Hum. Pathol.* – 1998. – Vol. 29, № 6. – P. 565–568.
13. Farid N. R. Molecular pathogenesis of cancer: the significance of oncogenes, tumor suppressor genes, and genomic instability / N. R. Farid // *Endocrinol. and Diabets.* – 1996. – Vol. 104, № 14. – P. 1–12.
14. Significance of P53 in human thyroid tumors / D. Simon, P. E. Goretzki, V. Gorelev [et al.] // *World J. Surg.* – 1994. – Vol. 18, № 3. – P. 535–541.

В.В. Хазиев, И.В. Сорокина

ЭКСПРЕССИЯ ОНКОМАРКЕРОВ Ki-67 И P53 В Фолликулярных неоплазиях щитовидной железы

Выявлена высокая частота экспрессии Ki-67 в препаратах фолликулярных аденом (100 %), фолликулярного (100 %) и папиллярного (78,95 %) рака. Наиболее высокая сила экспрессии характерна для фолликулярного рака. Слабая экспрессия p53 с максимальной частотой регистрировалась в препаратах фолликулярных аденом (66,7 %) и значительно реже – в препаратах фолликулярного (18,7 %) и папиллярного (21,05 %) рака щитовидной железы. Полученные данные не могут подтвердить гипотезу о ценности онкомаркеров Ki-67 и p53 для дифференциальной диагностики тиреоидных фолликулярных неоплазий и указывают на необходимость глубокого изучения патогенетических факторов существования непохожих форм опухолевой патологии щитовидной железы.

Ключевые слова: щитовидная железа, фолликулярная аденома, фолликулярный рак, папиллярный рак.

V.V. Khaziev, I.V. Sorokina

EXPRESSION OF ONCOMARKERS Ki-67 AND P53 IN THYROID FOLLICULAR NEOPLASIAS

It was revealed a high prevalence of Ki-67 expression in thyroid follicular adenomas (100 %), follicular (100 %) and papillary (78.95 %) cancer. The highest power of expression was specific for follicular cancer. Partly expression of p53 with a maximum frequency was recorded in preparations of follicular adenomas (66.7 %) and much less for follicular (18.7 %) and papillary thyroid (21.05 %) cancer. The data can not confirm the hypothesis about the value of tumor markers Ki-67 and p53 for the differential diagnosis of thyroid follicular neoplasia and point to the need for in-depth study of pathogenic factors of diverse forms of thyroid tumor existence.

Key words: thyroid, follicular adenoma, follicular carcinoma, papillary carcinoma.

Поступила 24.04.13