

## 4. Diskussion

### 4.1. Allgemeine Betrachtung

Die Ergebnisse dieser Arbeit belegen einen Zusammenhang zwischen hyperoxie-induzierter apoptotischer Neurodegeneration und der verstärkten Expression der Proteine Caspase-1, Interleukin-1 $\beta$  und Interleukin-18 im sich entwickelnden Gehirn von Nagetieren. Mit Hilfe der Unterbrechung der für die Signalübermittlung von IL-1 $\beta$  und IL-18 notwendigen Kaskade, konnte eine Korrelation zwischen den molekularen Veränderungen dieser Proteine und neuronalem Zelltod unter hyperoxischen Bedingungen nachgewiesen werden. Sowohl der Einsatz des IL-18BP als auch die Experimente mit IRAK-4 (-/-) Mäusen führten zu deutlicher Minderung des sauerstoff-induzierten Zellschadens.

Das homeostatische System der Zytokine spielt eine wichtige Rolle in der Immunabwehr, in Wachstums-, Entwicklungs- und Reparaturprozessen. Nachdem in zahlreichen Studien die Apoptose als dominierende Form des neuronalen Zelltod im sich entwickelnden Gehirn angesehen wird, gab die histologische Bestätigung der verstärkten apoptotischen Neurodegeneration unter Bedingungen der Hyperoxie Anlass zur Kontrolle der Genexpression proinflammatorischer Zytokine [69]. Ihr Einfluss auf Pathomechanismen neurodegenerativer Erkrankungen erlangt derzeit zunehmend an Bedeutung, ist jedoch, insbesondere im Fall des IL-18, bisher nur unzureichend untersucht worden. Das sich durch intensive Forschung auf diesem Sektor schnell erweiternde komplexe Netzwerk der sich gegenseitig aktivierenden und hemmenden pro- und antiinflammatorischen Faktoren verdeutlicht, dass scheinbar geringfügige Änderungen bedeutende Folgen haben können [73]. Von hohem klinischen Interesse sind proinflammatorische Mediatoren, unter anderem deshalb, weil sie eine zentrale Stellung in der Entwicklung des perinatalen Hirnschadens, wie der Periventrikulären Leukomalazie und bei neurologischen Langzeitdefiziten einnehmen [86].

### 4.2. Hyperoxie bedingt gesteigerte Genexpression von Caspase-1

Die durch hohe Sauerstoffkonzentration hervorgerufenen apoptotischen Veränderungen im sich entwickelnden Hirn sind assoziiert mit einer verstärkten Expression der für die Aktivierung von IL-1 $\beta$  und IL-18 notwendigen Caspase-1 (ICE). Dieses Enzym spielt bei der Initiierung apoptotischer und inflammatorischer Prozesse eine zentrale Rolle, was in Versuchen mit

ICE (-/-) Mäusen nachgewiesen werden konnte [158]. Auch in Versuchen unter hypoxisch-ischämischen Bedingungen, welche normalerweise einen verstärkten Zelltod zur Folge haben, zeigten sich neonatale Mäuse mit homozygoter Deletion der Caspase-1 resistent gegenüber diesen Bedingungen und einen signifikant geringeren neuronalen Zellschaden. Dieser neuroprotektive Effekt des ICE-Mangels zeigte keine regionalen Begrenzungen, was ein ubiquitäres Vorkommen der Caspase-1 im Hirn der neonatalen Mäuse erwarten lässt. Hierbei wird davon ausgegangen, dass Caspase-1 zum einen über einen proinflammatorischen Weg zu nekrotischen Vorgängen, zum anderen über die Aktivierung weiterer Caspasen zur Einleitung apoptotischer Zellveränderungen führt. Zahlreiche Untersuchungen an verschiedenen Modellen konnten zeigen, dass Caspasen zur Progression von Hirnschäden beitragen, die bedingt sind durch Ischämie- oder Reperfusion nach Ischämie [86, 159]. Interessanterweise bietet die Deletion der Caspase-1 lediglich bei mittelgradiger Hypoxämie-Ischämie einen Schutz vor neuronalem Zelltod. Somit sind hier eher apoptotische Prozesse zu erwarten, während bei schwerwiegenderer Hypoxämie-Ischämie nekrotische Vorgänge für den Zelltod verantwortlich gemacht werden [86, 160]. Diese Überlegungen sind vereinbar mit Resultaten der Forschung am Hyperoxiemodell. In vorangegangenen Arbeiten konnte hier belegt werden, dass die durch Hyperoxie bedingten Zellschäden apoptotischer Natur sind [69]. Ein Ansatzpunkt zur Intervention bei vermehrtem oxidativen Stress, der bei Frühgeborenen möglicherweise bereits bei physiologischen 21% Sauerstoffgehalt der Atemluft auftritt, könnte die Aktivierung antioxidativer Systeme wie des mitochondrialen Glutathions sein [29].

In anderen Arbeiten wurde die Beteiligung der Caspase-1 an der Vermittlung von Hirnschäden mit Hilfe eines spezifischen Caspase-1-Inhibitors (Ac-YVAD-cmk) beschrieben. Mit der so erzielten Hemmung der Caspase-1 wurde ähnlich wie bei den Versuchen mit ICE defizienten Tieren ein Schutz vor ischämischen und traumatischen Ereignissen erzielt [83, 161, 162].

Die Entwicklung von Substanzen, die die enzymatischen Eigenschaften von Caspasen blockieren und auch klinisch eingesetzt werden können, liegt auch in besonderem Interesse der Transplantationsmedizin. IL-18 wurde als ein pathogenetischer Faktor, der die *Graft versus Host Reaktion* (GVHD) begünstigt identifiziert [163]. An tierexperimentellen Modellen konnten bereits mit Pancaspaseinhibitoren der schädigende Einfluss der Ischämie, Schäden an Herz-, Nieren-, Leber- und Hirngewebe sowie apoptotische Prozesse reduziert werden [164, 165]. Auch die spezifische, medikamentöse Hemmung der Caspase-1 könnte ein therapeutischer Weg sein, simultan Apoptose und inflammatorische Vorgänge einzudämmen.

### 4.3. Verstärkte Expression von IL-1 $\beta$ bei Hyperoxie

Diese Arbeit belegt eine gesteigerte Proteinexpression für die Caspase 1 abhängigen Zytokine IL-1 $\beta$  und IL-18 unter hyperoxischen Bedingungen im unreifen Gehirn der Ratte. Bemerkenswerterweise korreliert die Tatsache, dass in RT-PCR sowie in proteinchemischen Untersuchungen die höchste Signifikanz im Bereich von Thalamus und Kortex gefunden wurde, mit den zuvor gemachten histologischen Beobachtungen. Besonders in diesen Bereichen tritt bei Hyperoxie verstärkte Neurodegeneration auf. Erhöhte Konzentrationen für IL-1 $\beta$  konnten auf RNA- und auf Proteinebene bereits nach kurzer Versuchsdauer von zwei Stunden am Modell der Hyperoxie gezeigt werden. Die Beteiligung von IL-1 $\beta$  an der schnellen Immunantwort auf exogene Stimuli konnte bereits in anderen Modellen nachgewiesen werden. Versuche mit unilateraler traumatischer Hirnschädigung führten zu einem schnellen, aber auch regional auf die geschädigte Hemisphäre begrenzten Anstieg von IL-1 $\beta$  [119]. Hypoxisch-ischämische Versuchsreihen weisen für IL-1 $\beta$  neben einem schnellen Anstieg wenige Stunden nach dem schädigenden Ereignis, ein weiteres, zweites Maximum der Werte ein bis zwei Wochen nach dem Insult nach [166].

Abgesehen von proapoptischen Effekten hat IL-1 $\beta$  auch zahlreiche proinflammatorische Auswirkungen, welche in ihrer Konsequenz zum nekrotischen Zelluntergang inklusive Leukozytenreaktion und verstärkter Produktion freier Radikale durch Enzyme wie die Cyclooxygenase-2, NO-Synthase oder Phospholipase A2 führen [86]. Die Bedeutung von IL-1 $\beta$  als Mediator neuronalen Zellverlustes infolge ischämischer, exitotoxischer und traumatischer Ereignisse ist bereits gesichert [73, 167]. Das Verhalten der IL-1 $\beta$ -Expression wurde am Modell der neonatalen Hypoxie-Ischämie sowie unter Bedingungen der fetalen Inflammation untersucht [168, 169]. Hier fand man ebenfalls eine intensivierete Expression von IL-1 $\beta$  was mit unseren Ergebnissen ebenso vergleichbar ist, wie die Resultate von Forschungsarbeiten am Modell des neonatalen, exzitotoxischen Schadens der weißen Gehirnssubstanz, in denen die systemische Injektion von IL-1 $\beta$  zu verstärktem Zellschaden führte [170]. Darüber hinaus lässt sich durch Einsatz von IL-1-Rezeptor-Antagonisten der durch Lipopolysaccharide (LPS) bedingte Untergang von Oligodendrozyten reduzieren [171]. Antiinflammatorische Zytokine wie IL-4, IL-10 oder TGF, welche IL-1RA induzieren und die Expression von IL-1 $\beta$  supprimieren, entfalten so ihre neuroprotektive Wirkung. Somit stellen sie als Mediatoren, die IL-1 $\beta$  regulieren, potenzielle Kandidaten für therapeutische Ansätze dar [82, 172]. Aber auch der IL-1RA selbst könnte eine therapeutische Alternative darstellen. In neuesten Studien konnte nach konvulsiven

Anfällen ein zweigipfeliger Anstieg der IL-1 $\beta$ -Konzentrationen nachgewiesen werden. Die Spitzenwerte fanden sich jeweils nach 6 Stunden und stark verzögert wieder nach 7 Tagen. Sie gelten als mitverantwortlich für die Entwicklung von Ödemen, Degeneration und Nekrose von Nervenzellen, die gesteigerte Infiltration mit inflammatorischen Zellen und verstärkt apoptotische Prozesse [173].

#### **4.4. Verstärkte Expression von IL-18 bei Hyperoxie**

Über die Aufgaben und Wirkungen des Interleukin-18, insbesondere im zentralen Nervensystem, ist derzeit nur wenig bekannt. Daher steht es im Mittelpunkt unseres wissenschaftlichen Interesses. Das auch unter physiologischen Bedingungen produzierte IL-18 zeigt jeweils bei Ratten und Mäusen im Alter von sieben bis 21 Tagen keine Konzentrationsänderungen [166]. In dieser Arbeit wurde das verstärkte Auftreten von IL-18 und seinem Rezeptor IL-18R $\alpha$  mittels histologischer und molekularbiologischer Techniken im Hirn von neonatalen Ratten nachgewiesen, welche zuvor definierten Zeiträumen 80%igem Sauerstoff ausgesetzt wurden. Die histologischen Daten lassen im Bereich des Thalamus und des Kortex einen besonders intensiven Zelluntergang erkennen. Konform hiermit gehen die molekularbiologischen Resultate, welche belegen, dass in diesen Regionen hyperoxiebedingt erhöhte Werte für mRNA bzw. Proteine von IL-1 $\beta$  und IL-18 vorliegen. Auch immunhistologisch konnte dies bestätigt werden. IL-18 und der IL-18R $\alpha$  wurden hier an apoptotischen Zellen nachgewiesen, was ihre Mitbeteiligung am Zelltod vermuten lässt. Interessanterweise zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass IL-18 und IL-18R $\alpha$  in der frühen Phase der Gewebsschädigung verstärkt exprimiert werden. Bereits nach zweistündiger Hyperoxieexposition wurde ein Anstieg für die mRNA des IL-18 und das Protein selbst nachgewiesen. Bei einer Exposition für 24 Stunden wurden maximale Werte beobachtet. Eine länger andauernde Versuchszeit führte im Hyperoxiemodell zu keiner weiteren Steigerung der Zytokinexpression; vielmehr fand eine Annäherung an die Ausgangswerte statt. Welche Mechanismen hierfür verantwortlich gemacht werden können, ist anhand weiterer Versuche zu klären. Es kann sich hierbei um eine verzögert aktivierte Wirkung antiinflammatorischer Mediatoren als Kompensationsmechanismus handeln.

In anderen Modellen der Schädigung neuronaler Zellen, fanden sich ebenfalls erhöhte Werte für IL-18. So wurden beispielsweise 14 Tage nach Trauma oder 24 Stunden bis 6 Tage nach neonataler Hypoxie-Ischämie gesteigerte Konzentrationen festgestellt und eine protrahierte

Wirkung als Mechanismus des IL-18 vermutet [119, 120, 166, 174]. Bemerkenswert ist das unterschiedliche Vorkommen von IL-1 $\beta$  und IL-18 im Hirn nach traumatischen Ereignissen. Während gesteigerte Werte für IL-1 $\beta$ , wie oben bereits erwähnt, auf die traumatisch geschädigte Region beschränkt blieben, konnten erhöhte Werte für IL-18 auch in der kontralateralen Hemisphäre nachgewiesen werden [119]. Weitere Experimente zeigten eine inverse Korrelation intrathekaler IL-18-Konzentrationen und TNF-Level bei Patienten mit traumatischen Hirnschäden. Experimentell konnte daraufhin eine TNF-abhängige Inhibierung des IL-18 nachgewiesen werden, was auf die komplexen Wirkungsspektren der Zytokine hinweist [175]. Die Bedeutsamkeit des IL-18 könnte neben seiner eigenständigen Wirkung und Induktion inflammatorischer und apoptotischer Vorgänge auch in einer potenzierenden Wirkung auf die IL-1 $\beta$ -Expression bestehen [105]. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sind hiermit vereinbar. Die alleinige Neutralisierung der IL-18-Wirkung mit dem IL-18BP führte zwar zu einer signifikanten Minderung des neuronalen Zellschadens. Die Unterbrechung der gemeinsamen Signalkaskade von IL-1 $\beta$  und IL-18 durch die IRAK-4-Defizienz konnte den Effekt jedoch stärker verdeutlichen. Mit Hilfe der selektiven Hemmung der IL-1 $\beta$ -Wirkung z.B. durch einen experimentell eingesetzten IL-1RA, könnte der jeweilige Anteil der beiden Zytokine bei der Vermittlung der hyperoxie-induzierten Neurodegeneration präzisiert werden.

Auf dem Forschungsgebiet intrakranieller Tumoren stellen die Wirkungen des IL-18 einen zentralen Angriffsmechanismus dar. Die Gabe von IL-18 verstärkt die zytotoxische Antitumorimmunantwort und vermindert eine weitere Tumorprogression [176]. Das Interleukin wird verwandt, um die Antitumorantwort auf Gliome zu verstärken. Hierfür werden im Sinne einer lokaladjuvanten Immuntherapie IL-18-beladene Lipidimplantate entwickelt, welche kontinuierlich therapeutisch wirksame Mengen von IL-18 freisetzen. Diese Methode lieferte bisher viel versprechende Ergebnisse [177]. Weiterhin lassen Erfolge von Versuchen, bei denen ein Transfer des IL-18-Gens in Gliomzellen vorgenommen wurde sowie Experimente, in denen IL-18-transfizierte dendritische Zellen eine verstärkte Th1-Immunantwort auf maligne Gliomzellen auslösten, einen zukünftigen Einsatz dieses Interleukins in der Antitumortherapie erwarten [178-180].

Experimente am Modell des hypoxisch-ischämischen Hirnschadens belegen, dass vermutlich das IL-18 allein für die Vermittlung des hierbei entstehenden Schadens verantwortlich ist und IL-1 $\beta$  nur unter Anwesenheit von IL-18 in diesem Modell Neurotoxizität zu vermitteln vermag. So zeigten IL-18 (-/-) Mäuse sowie kombiniert IL-18 und IL-1 $\beta$  defiziente Tiere eine signifikante Reduktion des hypoxisch-ischämischen Hirnschadens. Dies konnte für selektiv IL-1 $\beta$  oder IL-1 $\alpha$  defiziente Mäuse nicht nachgewiesen werden [181]. Weiterhin existiert die Annahme, dass IL-18

im Vergleich zu IL-1 $\beta$  das bevorzugte Substrat der Caspase-1 ist. Dies ließe sich noch im Modell der Hyperoxie untersuchen und könnte richtungweisend sein für die Entwicklung möglicher therapeutischer Interventionen.

Das Potential von IL-18, klinische Anwendung zu finden, liegt jedoch nicht nur in einer Blockade seiner vermittelten Effekte oder der gezielt lokalen Anwendung. Vielmehr könnte sich IL-18 auch als Parameter in der Diagnostik eignen, welcher ein Indikator für den Schweregrad einer Erkrankung sein kann. Experimentell gibt es erste Erfahrungen, um mit Hilfe von IL-18-Konzentrationsspiegeln prädiktive Aussagen bei lakunären Hirninfarkten sowie beim Akuten Koronarsyndrom zu treffen. Bei beiden Erkrankungen zeigte sich eine positive Korrelation der IL-18-Konzentration mit dem Schweregrad der Gewebsschädigung [182, 183].

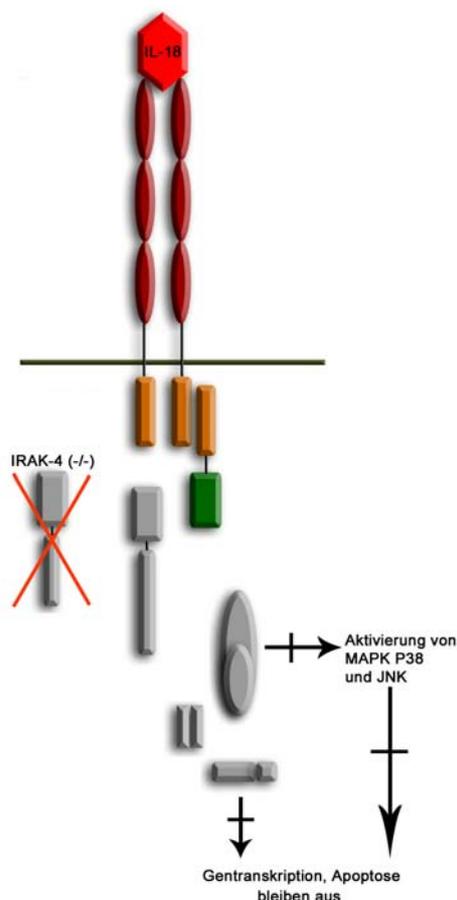
#### **4.5. IL-18BP birgt die potenzielle Fähigkeit für einen therapeutischen Einsatz**

Der antiinflammatorische Effekt des physiologisch vorkommenden IL-18BP wird in der Natur von diversen Pockenviren genutzt, um die eigene Virulenz durch Reduktion der IFN $\gamma$ -Produktion im Zielgewebe und geminderte Aktivität von Natürlichen Killerzellen (NK) und T-Zellen zu verstärken [184]. Die scheinbar universelle Verwendbarkeit des IL-18BP gibt Anlass zu intensiver Forschung und Entwicklung klinisch einsetzbarer Therapiestrategien.

Bereits im adulten Traumamodell führte der experimentelle Einsatz des Interleukin-18 bindenden Proteins zu einer Abschwächung des Zellschadens. Obgleich es in den ersten Stunden nach dem traumatischen Ereignis nicht vermochte, Reaktionen wie die Entstehung des Hirnödems einzudämmen, zeigte sich in den folgenden sieben Tagen eine im Vergleich zu den Kontrolltieren deutlich bessere neurologische Entwicklung [119]. Auch in den hier beschriebenen Versuchen konnte mit Hilfe von IL-18BP eine signifikante Reduktion des hyperoxie-induzierten Zellschadens bewirkt werden. Beobachtet werden konnte dies besonders in jenen Regionen des Hirns, in denen die Hyperoxie einen verstärkten Zelltod auslöst. Hierzu zählen insbesondere der Thalamus und die kortikalen Strukturen. Dies gibt Anlass, IL-18BP als Medikament für therapeutische Interventionen bei akut neurodegenerativen Erkrankungen in Zukunft einzusetzen. Obgleich ein solcher therapeutischer Einsatz zur Zeit auf dem Gebiet der Rheumatoiden Arthritis erprobt wird, bleiben auf dem Gebiet der pädiatrischen Medizin noch Erfolge experimenteller Arbeiten abzuwarten [121].

#### 4.6. IRAK-4 –Ansatzpunkt für die therapeutische Intervention

Einen weiteren Hinweis darauf, dass IL-18 neben IL-1 $\beta$  in die Signalkaskade, welche zum neuronalen Zelltod führt, involviert ist, liefern die Resultate der Versuche mit IRAK-4 (-/-) Mäusen. Diese Tiere zeigten sich im Hyperoxiemodell signifikant weniger empfindlich gegenüber der potenziell schädigenden Wirkung des hohen Sauerstoffgehalts der Atemluft. Die Proteinkinase IRAK-4 stellt ein essenzielles Bindeglied in der Kaskade der Signalübertragung von IL-1 $\beta$  und IL-18 dar [129, 145]. Würde es gelingen, einen spezifischen Hemmstoff zu entwickeln, könnte man diesen im Rahmen experimenteller Arbeiten untersuchen und gegebenenfalls zukünftig auch klinisch einsetzen, um so schädliche Auswirkungen von IL-1 $\beta$  und IL-18 zu minimieren. Es lässt erwarten, dass die Aktivierung der c-jun-terminalen Kinase (JNK) sowie die des p38 durch IL-1 $\beta$  oder IL-18 ausbliebe [185, 186]. Nach bisherigen Erkenntnissen stehen JNK und p38 am Ende der apoptotischen Kaskade und tragen zu ihrer Ausführung bei [187, 188]. Der damit erzielte geringere Zellschaden wäre von hohem therapeutischen Nutzen.



**Abbildung 4.1.:** Schematische Darstellung der unterbrochenen Signaltransduktion bei IRAK-4 (-/-) Mäusen entsprechend Abbildung 1.1.. IRAK-1 kann, bedingt durch das Fehlen der IRAK-4 Proteine, nicht an MyD88 binden. Es kommt zum Abbruch der Signalübermittlung.

## 4.7. Sauerstofftherapie in der kritischen Phase der Gehirnentwicklung

Bei Frühgeborenen wurden, durch Sauerstofftherapie bedingte, erhöhte Konzentrationen inflammatorischer Proteine in ursächlichen Zusammenhang mit pulmonalen Erkrankungen gebracht [71]. Weitere klinische Untersuchungen stellen eine Beziehung zwischen erhöhten Werten von IL-1 $\beta$  und IL-18 im Nabelschnurblut von Früh- und Neugeborenen und dem Auftreten einer Zerebralparese her [189, 190].

Mit Hilfe des spezifischen IL-1-Rezeptor-Antagonisten und der Blockierung der Caspase-1 konnten neuronale Schäden im Tiermodell eingedämmt werden [191].

Langzeituntersuchungen deuten darauf hin, dass die Behandlung mit hochdosiertem Sauerstoff negative Auswirkungen auf die neurologische Entwicklung hat [59]. Diese klinischen Forschungsergebnisse werden gestützt von den hier vorliegenden Daten sowie von Ergebnissen jener Arbeiten, die belegen, dass Hyperoxie diffuse apoptotische Vorgänge mit einem maximalen Auftreten nach 24stündiger Exposition im Hirn 3-7 Tage alter Ratten auslöst [69]. Frühgeborene, deren antioxidative Systeme eine erst unvollständige Reife erlangt haben, sind von den Auswirkungen einer Sauerstofftherapie besonders betroffen. Die detaillierten Prozesse und Mechanismen, welche diese erhöhte Vulnerabilität bedingen, sind gegenwärtig noch nicht bekannt, es wird aber davon ausgegangen, dass das zelluläre Antioxidationsssystem hierbei eine bedeutende Stellung einnimmt. Ist dessen Entwicklung noch nicht weit genug fortgeschritten, wird bei Geburt eine Umstellung und Anpassung an die neuen Bedingungen und verstärkt auftretenden oxidierenden Substanzen nicht rechtzeitig möglich. Antioxidativ wirkende Enzyme wie Superoxiddismutase, Katalase und Glutathionperoxidase können ihre volle protektive Wirkung nicht entfalten, es kommt insbesondere unter supportiver Sauerstofftherapie zu vermehrtem oxidativen Stress und Zellschaden [192, 193].

Weitere Hinweise auf die Besonderheiten des sich entwickelnden Gehirns im Vergleich zum adulten ZNS lieferten Untersuchungen mit Medikamenten, welche auch häufig in der Neonatologie zu klinischem Einsatz kommen müssen. Hierzu zählen Antiepileptika, Sedativa und Anästhetika. Es zeigte sich, dass Substanzen wie Ketamine, Barbiturate, Benzodiazepine, Phenytoin oder Valproat in der empfindlichen Phase des beschleunigten Hirnwachstums im Tierversuch neuronale Schäden verursachen können [194].

Trotz großer Vorsicht und Zurückhaltung im therapeutischen Einsatz von Sauerstoff bei Neonaten stellt Hyperoxie einen potenziellen Faktor für die iatrogene Schädigung des zentralen Nervensystems dar. Neugeborene, die während der Geburt reanimationspflichtig werden, können

nach neuesten Erkenntnissen ebenso effizient mit normaler Raumluft wiederbelebt werden [195]. Der Einsatz 100%igen Sauerstoffs bietet für den Erfolg der Reanimation keine signifikanten Vorteile, birgt jedoch Gefahren negativer Beeinträchtigung der Entwicklung neuronaler Strukturen. So konnte gezeigt werden, dass Neugeborene, welche mit Hilfe reinen Sauerstoffs reanimiert wurden, noch für mehrere Wochen vermehrt oxidativem Stress ausgesetzt waren [195]. Zu bedenken ist weiterhin, dass, besonders aufgrund der höheren Sauerstoffaffinität des fetalen Hämoglobin (HbF), kleine Änderungen der SaO<sub>2</sub> mit großen Änderungen des PaO<sub>2</sub> assoziiert sind [19, 26, 196]. In Zukunft könnten spezifische Beatmungs- und Reanimationsschemata, gestützt von kontinuierlicher und frühzeitiger Messung der arteriellen Sauerstoffsättigung sowie restriktiver Applikation von Sauerstoff zu einer noch effizienteren Versorgung frühgeborener Kinder beitragen.