

ОЦЕНКА ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ СДВИГОВ У ВЗРОСЛЫХ ПОСЛЕ ВВЕДЕНИЯ ВАКЦИНЫ ПРОТИВОГРИППОЗНОЙ ИНАКТИВИРОВАННОЙ СУБЪЕДИНИЧНОЙ АДСОРБИРОВАННОЙ МОНОВАЛЕНТНОЙ, ШТАММ А/CALIFORNIA/7/2009/(H1N1)V

Костинов М.П.¹, Теркачева О.А.¹, Жирова С.Н.¹,
Ястребова Н.Е.¹, Черданцев А.П.²

¹ Учреждение Российской академии медицинских наук Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова РАМН, Москва

² ИМЭиФКУл ГУ, кафедра педиатрии, г. Ульяновск

Резюме. Дана оценка состояния аутореактивности у 70 здоровых волонтеров, привитых вакциной гриппозной субъединичной, штамм А/California/7/2009/(H1N1). Показано, что вакцина безопасна и иммуногена. Выявлено, что двукратное введение вакцины не сопровождается нарастанием аутоантител, как тканевых (к тканям легкого, к общему белку миелина), так и нетканевых (к нативной и денатурированной ДНК), а в некоторых случаях введение вакцины сопровождается значимым снижением уровней аутоантител. Также отмечено, что введение препарата сопровождается снижением общего IgE у лиц с исходным повышением данного показателя. После введения двух доз вакцины по 0,5 мл частота сероконверсии составляет 71,4%, серопротекции – 59,2%, кратность прироста АТ составляет 4,92, что соответствует критериям СРМР.

Ключевые слова: вакцина гриппозная, аутоантитела, безопасность, иммуногенность, аутореактивность

Kostinov M.P., Terkacheva O.A., Girova S.N., Jastrebova N.E., Cherdantsev A.P.

EVALUATION OF IMMUNOLOGICAL SHIFTS IN ADULTS AFTER IMMUNIZATION AGAINST INFLUENZA WITH A SUBUNIT-BASED, ABSORBED MONOVALENT VACCINE STRAIN A/CALIFORNIA/7/2009/(H1N1)

Abstract. Seventy healthy volunteers were immunized with influenza subunit vaccine strain A/California/7/2009 / (H1N1), in order to test possible changes in auto-reactivity. It was shown that the vaccine is safe and immunogenic. In addition, it was revealed that a double injection of the vaccine was not accompanied by development of autoantibody response, both to tissue antigens (specifically, to lung tissue, or basic myelin protein), and to those against non-tissue antigens (native or denatured DNA). In some cases, application of the vaccine was accompanied by a significant reduction in levels of autoantibodies. It was also noted

Адрес для переписки:

Костинов Михаил Петрович,
НИИ ВС им. И.И. Мечникова РАМН
105064, Москва, пер. Малый Казенный, 5-а.
Тел.: (495) 917-41-49.
Факс: (495) 917-41-49
E-mail: lylygin@rambler.ru

that injection of the vaccine is accompanied by a reduction in total IgE levels in patients with increased baseline IgE levels. Following double injection of the vaccine at a single dose of 0.5 ml, the frequencies of seroconversion was 71.4%, seroprotection levels were achieved in 59,2%, whereas seroconversion factor proved to be 4.92, thus meeting the CPMP criteria. (*Med. Immunol.*, 2011, vol. 13, N 1, pp 35-40)

Keywords: influenza vaccine, autoantibodies, safety, immunogenicity, autoreactivity

Введение

В конце апреля 2009 года ВОЗ сообщила о возникновении пандемии гриппа, вызванной с новым вариантом вируса гриппа А/(H1N1) [1, 18]. Уже с весны 2009 года во всем мире, в том числе и в России начата разработка вакцин против пандемического гриппа А/California/7/2009/(H1N1). Осенью 2009 года в Европе, США и России были зарегистрированы несколько вакцин предназначенных для профилактики пандемического гриппа. Вакцины прошли клинические испытания, в которых были показаны безопасность и низкая реактогенность этих препаратов [5, 14, 20, 21]. Однако клинические испытания не могут в полной мере отразить все возможные поствакцинальные реакции, т.к. некоторые из них встречаются крайне редко и для их регистрации необходимо наблюдение за достаточно большим количеством людей. С другой стороны, комплекс иммунологических тестов, рекомендованных при апробации вакцин, не достаточно полно характеризует аутоиммунные процессы. Такие исследования особенно актуальны на современном этапе, когда соматическая патология регистрируется не только у взрослых, но и среди детей. В связи с тем, что по рекомендации ВОЗ данная группа пациентов является приоритетной при вакцинации против гриппа, целесообразно проводить исследование динамики изменений основных параметров, характеризующих аутоиммунный процесс. Аргументы в пользу проведения таких исследований базируются на следующих фактах. Из базы данных американской национальной программы по наблюдению за безопасностью вакцин (VAERS), известно, что в 1976 году, с введением противогриппозных вакцин, содержащих штамм свиного вируса гриппа А/(H1N1), были связаны многочисленные случаи Синдрома Гиена–Барре (СГБ). Рост числа случаев СГБ, связанных с проведением сезонной противогриппозной вакцинации, наблюдался в США позднее. В 1991 году было зафиксировано 23 случая этого осложнения, в 1992 году отмечено уже 40, а в 1993 – 80 случаев. Известно, что СГБ – это вялый паралич, обусловленный аутоиммунной реакцией против антигенов швановских клеток периферических ганглиев и миелина. СГБ является серьезным осложнением противогриппозной вакцинации

и может привести к инвалидизации пациента и даже к его смерти [10, 11, 12, 19].

Способность противогриппозных вакцин стимулировать аутоиммунные реакции до конца не изучена. Сообщения по данному вопросу весьма противоречивы. В 2003 году коллективом авторов (Frank DeStefano, Thomas Verstraeten and al.) было проведено исследование о возможности вакцины против гриппа вызывать демиелинизирующие заболевания посредством активации аутоиммунитета. Авторы не нашли связи между вакцинацией против гриппа и развитием данного вида патологии [7]. Однако в июле 2008 года другие исследователи (Nachamkin I., Shadomy S.V. and al.) отметили, что вакцина, содержащая штамм гриппа А/(H1N1), может стимулировать образование аутоантител к миелину у мышей [17]. Некоторые авторы указывают на связь между вакцинацией от гриппа и параличом лицевого нерва, до конца не выясненная этиология которого не исключает участия аутоантител (аутоАТ) [16].

Цель данной работы – оценить иммунологические сдвиги у волонтеров, привитых вакциной гриппозной субъединичной, штамм А/California/7/2009/(H1N1).

Материалы и методы

В исследовании приняли участие 70 здоровых добровольцев в возрасте 18–60 лет. Первая группа (50 человек) была привита двукратно пандемической вакциной, штамм А/California/7/2009/(H1N1) с антигенной нагрузкой 15 мкг НА с интервалом 28 суток, в дозе 0,5 мл. Вторая (контрольная, 20 человек) получила плацебо (0,5 мл физиологического раствора NaCl) в аналогичные сроки.

Добровольцы находились под пристальным врачебным наблюдением 56 дней, в течение которых осматривались неврологом и врачом-исследователем, а также проводилась динамическая оценка лабораторных показателей (общий анализы крови и мочи, биохимический анализ крови).

Забор крови для исследований осуществлялся до 1-й вакцинации, на 28 день после 1-й и 2-й вакцинации. В указанные сроки определяли уровень IgG антител к ткани легкого, общему белку миелина (ОБМ), к нативной ДНК (нДНК)

и денатурированной ДНК (дДНК) в твердофазном ИФА по методу, разработанному в НИИВС им. Мечникова РАМН (лаборатория иммунохимической диагностики, зав. лабораторией – д.м.н. Ястребова Н.Е.). Результаты выражали в условных единицах, в виде индекса J, рассчитанного по формуле $(\text{ОП}_{\text{ан}}/\text{ОП}_{\text{к}} + 0,15) \times 100$, где $\text{ОП}_{\text{ан}}$ – оптическая плотность анализируемой сыворотки, $\text{ОП}_{\text{к}}$ – оптическая плотность контроля. За условную норму принимали значение $J+2\delta$ в группе до вакцинации [4]. Уровень общего IgE определяли с использованием набора реагентов для количественного определения общего IgE «IgE – Вектор-Бест» (г. Новосибирск). За нормальный уровень общего IgE принимали значения, не превышающие 100 МЕ/мл. Напряженность поствакцинального иммунитета оценивали по нарастанию средне-геометрического титра антител (СТГ АТ) в реакции микронеутрализации (РН), в соответствии с требованиями Европейского комитета по патентованным лекарственным препаратам (СРМР). Защитным считали титр $\geq 1:40$. Учитывали количество лиц с защитными титрами и число лиц с 4-х кратной сероконверсией (титр $\geq 1:20$).

Статистическую обработку данных проводили с применением пакета прикладных программ Statistica.

Результаты

За все время наблюдения за вакцинированными не было отмечено ни одной серьезной реакции и каких-либо изменений в неврологическом статусе.

В реакции микронеутрализации после первой вакцинации сероконверсии выявлены у 46,9% привитых с дальнейшим увеличением после второй вакцинации до 71,4% (по критериям СРМР $\geq 70\%$). Защитный уровень АТ к вакцинному штамму выявлен у 34,7% волонтеров после первой вакцинации и у 59,2% – после второй (по критериям СРМР $> 40\%$). Кратность прироста АТ от 3,46 после первой вакцинации до 4,92 – после второй вакцинации (по критериям СРМР $> 2,5$).

При оценке исходного уровня общего IgE установлено, что у 30% (15 чел.) из 50 добровольцев, получивших вакцину и у 10% (2 чел.) из группы контроля, его показатель превышал нормальное значение (до 100 МЕ/мл) без явных признаков аллергии. После первой вакцинации отмечено значимое снижение уровня общего IgE ($p < 0,001$) в группе привитых с исходно высокими значениями. В группе плацебо у добровольцев с исходно высоким уровнем общего IgE через

28 дней от начала наблюдений показатель увеличился в 2 раза ($p < 0,0001$).

После второй вакцинации тенденция к снижению общего уровня IgE в группе привитых с его исходно повышенным значением сохранялась. Из 15 добровольцев с высоким исходным уровнем IgE через 56 дней от начала наблюдения повышенный уровень выявлен лишь у 5 человек. В группе контроля уровень общего IgE повысился в 1,5–2 раза относительно исходных значений.

Учитывая, что изменения аутоантител к органоспецифическим и органонеспецифическим антигенам не имели значимых различий в группах исследования, а, по данным некоторых авторов, повышенный уровень общего IgE достоверно увеличивает риск развития аутоиммунного заболевания в последующем [9, 15], мы разделили волонтеров на следующие подгруппы:

1) волонтеры с исходно высокими значениями IgE (> 100 МЕ/мл);

2) волонтеры с исходно нормальными показателями IgE (< 100 МЕ/мл).

Нам также было интересно проследить динамику изменений антител к нДНК, дДНК, ткани легкого, к ОБМ у лиц в зависимости от сероконверсии.

При анализе исходных уровней IgG-АТ к нДНК наиболее высокие значения зафиксированы в группе добровольцев, ответивших сероконверсией на вакцинацию. Именно в этой подгруппе концентрация IgG-АТ снизилась после 1-й вакцинации ($p < 0,05$), и после второго введения препарата осталась на более низком уровне по сравнению с исходным. В группе плацебо за весь период наблюдения значимых изменений по данному параметру на 28-й и 56-й день наблюдения не отмечено (табл. 1). Несмотря на выявленные изменения, значения не превышали установленную для данного метода норму.

Анализ динамики IgG-АТ к дДНК и к ткани легкого не позволил выявить статистически значимых различий после первого и второго введения препарата во всех группах наблюдения (табл. 1). Значения в течение наблюдения не превышали установленную для данного исследования норму.

При исследовании уровней аутоАТ к ОБМ наиболее высокие исходные значения были зафиксированы в группе волонтеров, не ответивших сероконверсией на двукратное введение вакцины. Через 28 дней после первой вакцинации отмечена тенденция к нарастанию уровня аутоАТ к ОБМ в группе серонегативных добровольцев, а после второй вакцинации их уровень достоверно снизился ($p < 0,05$). В других подгруппах достоверных изменений показателя как после первого, так и после второго введения препарата

ТАБЛИЦА 1. ДИНАМИКА IGG-АТ (УЕД) К ОРГАНОСПЕЦИФИЧЕСКИМ И ОРГАНОСПЕЧЕЧИЧЕСКИМ АНТИГЕНАМ У ВОЛОНТЕРОВ ПРИВITYХ ВАКЦИНОЙ ГРИППОЗНОЙ ИНАКТИВИРОВАННОЙ СУБЪЕДИННОЙ МОНОВАЛЕНТНОЙ, ШТАММ А/CALIFORNIA/7/2009/(H1N1)

IgG-АТ	Группы	Вакцинированные						Плацебо		
		Сроки введения препарата	Группа в целом (50 чел.)	Волонтеры с уровнем общ. IgE до 100 МЕ/мл (70%)	Волонтеры с уровнем общ. IgE > 100 МЕ/мл (30%)	Серологитивные (90%)	Серонегативные (10%)	Группа в целом (20 чел.)	Волонтеры с уровнем общ. IgE до 100 МЕ/мл (90%)	Волонтеры с уровнем общ. IgE > 100 МЕ/мл (10%)
К нДНК «норма» – 85,06 УЕД	до V'	54,66±15,2	56,4±16,6	50,71±2,81	65,44±15,74	56,32±11,69	54,92±13,02	56±13,22	44,7±2,1	
	через 1 мес. после V'	52,633±14,3	53,63±15,16	51,03±2,92	52,75±14,39*	53,58±11,7	56,51±13,22	56,46±12,57	47,9±3,2	
	через 2 мес. после V'	53,62±15,09	55,16±16,8	50,78±2,59	53,88±15,66*	53,22±9,87	56,51±13,22	57,43±13,6	47,85±1,1	
К дДНК «норма» – 88,68 УЕД	до V'	61,34±13,67	62,97±14,46	57,95±2,92	61,04±13,87	59,82±10,72	59,92±9,37	60,51±9,2	54,65±9,2	
	через 1 мес. после V'	60±14,5	60,36±15,26	59,08±3,36	61,15±14,91	55,42±8,97	63,53±10,68	64,38±10,36	55,75±10,3	
	через 2 мес. после V'	59,99±14,16	60,69±14,69	58,35±3,39	60,25±14,8	58,03±8,63	63,31±11,47	64,14±11,28	55,75±10,3	
К ткани легкого «норма» – 72,98 УЕД	до V'	51,82±10,58	52,97±11,18	49,15±2,26	52,11±10,68	49,73±10,44	47,52±10,41	47,58±10,9	46,9±3,1	
	через 1 мес. после V'	51,43±10,97	51,91±12,22	50,29±2,52	51,81±11,3	48,55±13,43	51,44±11,85	51,45±12,2	51,3±8,25	
	через 2 мес. после V'	49,91±12,02	51,52±12,72	46,14±2,45	50,1±11,64	48,52±15,69	54,32±13,03	52,84±12,4	67,6±10,5	
К ОБМ «норма» – 93,69 УЕД	до V'	67,37±13,16	68,57±12,59	64,57±3,73	66,06±12,86	77±12,18	63,61±11,39	64,02±11,74	59,95±6,75	
	через 1 мес. после V'	70,17±15,79	70,74±14,79	69,07±4,77	67,86±14,46	87±16,09**	62,98±10,98	63,82±11,32	55,45±1,5	
	через 2 мес. после V'	68,61±18,56	68,89±19,16	69,07±4,77	68,6±19,69	68,66±6,53**	65,53±9,87	65,79±10,43	63,15±3,55	

Примечание. * – различия достоверны (p < 0,05) по сравнению с исходными значениями у серопозитивных волонтеров до вакцинации; ** – различия достоверны (p < 0,05) по сравнению со значениями у серонегативных добровольцев после первого введения препарата.

не выявлено (табл. 1). Следует отметить, что все выявленные изменения значений укладывались в установленную для данного метода норму.

Обсуждение

Разработка и внедрение в практику здравоохранения безопасных и эффективных вакцин для специфической профилактики пандемического гриппа является на сегодняшний день приоритетным направлением исследований. Полученные результаты показали, что введение вакцины гриппозной инактивированной субъединичной адсорбированной моновалентной, штамм A/California/7/2009/(H1N1)v не сопровождается необычными явлениями в поствакцинальный период и хорошо переносится.

Введение двух доз препарата против гриппа приводит к формированию поствакцинальных антител: уровень серопротекции – 59,2%, уровень сероконверсий – 71,4%, фактор сероконверсий – 4,92. В соответствии с требованиями Committee for Proprietary Medicinal Products (CPMP) вакцина считается иммуногенной, если соответствует одному из критериев: уровень серопротекции – более 70%, уровень сероконверсий – более 40%, фактор сероконверсий – более 2,5.

Снижение уровня общего IgE в группе добровольцев с исходно высокими значениями этого показателя, после введения препарата косвенно свидетельствует об иммуномодулирующем действии вакцины.

Нами выявлена тенденция к обратной корреляции между концентрацией аутоантител к нДНК, дДНК, к ткани легкого и высокими значениями общего IgE. Наиболее высокие уровни аутоантител к ОБМ зафиксированы у добровольцев не ответивших сероконверсией на вакцинацию. Через 28 дней после первой вакцинации отмечена тенденция к нарастанию уровня аутоАТ к ОБМ в группе серонегативных добровольцев с достоверным ($p < 0,05$) их снижением после второй вакцинации. Учитывая противоречивые данные других исследователей [7, 16, 17], необходимы дальнейшие исследования о возможном участии гриппозных вакцин в стимуляции аутоиммунного ответа к антигенам нервной ткани. Имеются теоретические возможности участия вирусных, в том числе – вакцинальных, антигенов в демиелинирующих процессах, реализуемых за счет молекулярной мимикрии. Так, выявлена гомология аминокислотных последовательностей миелинового белка P2 с неструктурированными белками вируса гриппа NS1 и NS2 и с сиаловыми кислотами оболочек ганглиев – антигенами ганглиозидов Q1b, D1b и M1 [6].

Несмотря на то, что введение вакцины гриппозной инактивированной субъединичной мо-

новалентной, штамм A/California/7/2009/(H1N1) не сопровождается значимым увеличением концентрации IgG-АТ к дДНК, нДНК, к ткани легкого и к ОБМ, что отражает иммунологическую безопасность данного препарата, вопросы формирования поствакцинальной аутореактивности требуют дальнейшего изучения.

Список литературы

1. Безопасность пандемических вакцин. Пандемический грипп (H1N1). – 2009: Всемирная организация здравоохранения 2009 г. / Краткое сообщение № 21.
2. Медуницын Н.В. Вакцинология. Издание третье, перераб. и доп. – М.: «Триада-Х», 2010. – 512 с.
3. Некрасов А.В., Пучкова Н.Г., Харит С.М., Беляева Т.Б., Лиознов Д.А., Ельшина Г.А., Горбунов Н.И., Лонская Н.И. Вакцина Грипол Нео: результаты клинических исследований безопасности и реактогенности (фаза 11) // Эпидем. вакцинопроф. – 2009. – № 5. – С. 48-49.
4. Ястребова Н.Е., Ванеева Н.П., Романова Р.Ю. Антитела к органоспецифическим и органонеспецифическим антигенам в сыворотках крови людей, больных бронхо-легочными заболеваниями // Журн. микробиол. – 1996. – № 6. – С. 67-68.
5. Basta N.E., Chao D.L., Halloran M.E., Matrajt L., Longini I.M. Strategies for pandemic and seasonal influenza vaccination of schoolchildren in the United States // Am J. Epidemiol. – 2009. – Vol. 6. – P. 679-686.
6. Burby, Moran, Makowska A., Kabongo M.L., Steigbigel R., Belshe R.B., Kitt E.R., Chu A.H., Moss R.B. Immune responses to myelin proteins in Guillain-Barré syndrome // J. Neurol Neurosurg Psychiatry. – 2008. – Vol. 79. – P. 664-671.
7. DeStefano F., Verstraeten T., Jackson L.A., Catherine A. Okoro, Benson P., Black S.B., Shinefield H.R., Mullooly J.P., Likosky W., Robert T., Chen M. Vaccinations and risk of central nervous system demyelinating diseases in adults // J. ArchofNeurol. – 2003. – Vol. 60. – P. 504-509.
8. Greene S.K., Kulldorff M., Lewis E.M, Li R., Yin R., Weintraub E.S., Fireman B.H., Lieu T.A., Nordin J.D., Glanz J.M., Baxter R., Jacobsen S.J., Broder K.R., Lee G.M. Near real-time surveillance for influenza vaccine safety: proof-of-concept in the Vaccine Safety Datalink Project // JAMA. – 2006. – Vol. 16. – P. 1990-1997.
9. Gazit V., Tasher D., Hanukoglu A., Landau Z., Ben-Yehuda Y., Somekh E., Dalal I. Atopy in children and adolescents with insulin-dependent diabetes mellitus // Isr. Med Assoc J. – 2008. – Vol. 10. – P. 858-861.

10. Haber P., Sejvar J., Mikaeloff Y., DeStefano F. Vaccines and Guillain–Barr syndrome // *Drug Saf.* – 2009. – Vol. 4. – P. 309–323.
11. Influenza Vaccine and Guillain–Barr Syndrome: CDC, Food and Drug Administration / Vaccine Adverse Event Reporting System (VAERS).
12. Iskander J., Broder K. Monitoring the safety of annual and pandemic influenza vaccines: lessons from the US experience // *Expert Rev. Vaccines.* – 2008. – Vol. 1. – P. 75–82.
13. Kramarz P., DeStefano F., Gargiullo P.M., Braun M.M., Ball R. Inactivated Influenza Vaccines: Reports to the Vaccine Adverse Event Reporting System (VAERS). – United States, 1991–2001 // *Pharmacoepidemiology and Drug Safety.* – 2004.
14. Liang X.F., Wang H.Q., Wang J.Z., Fang H.H., Wu J., Zhu F.C., Li R.C., Xia S.L., Zhao Y.L., Li F.J., Yan S.H., Yin W.D., An K., Feng D.J., Cui X.L., Qi F.C., Ju C.J., Zhang Y.H., Guo Z.J., Chen P.Y., Chen Z., Yan K.M., Wang Y. Safety and immunogenicity of 2009 pandemic influenza A H1N1 vaccines in China: a multicentre, double-blind, randomised, placebo-controlled trial // *Lancet.* – 2010. – Vol. 375. – P. 56–66.
15. Lindel f B., Granath F., Tengvall-Linder M., Lindelöf H., Ekbohm A. Allergy and autoimmune disease: a registry-based study // *Clin Exp. Allergy.* – 2009. – Vol. 3. – P. 110–115.
16. Muetsch M., Zhou W., Rhodes P., Bopp M., Chen R.T., Linder T., Sypyr C., Steffen R. Inactivated intranasal influenza vaccine and the risk of Bell's Palsy in Switzerland // *New Engl. J. Med.* – 2004. – Vol. 350. – P. 896–903.
17. Nachamkin I., Shadomy S.V., Moran A.P., Cox N., Fitzgerald C., Ung H., Corcoran A.T., Iskander J.K., Schonberger L.B., Chen R.T. Anti-ganglioside antibody induction by swine (A/NJ/1976/H1N1) and other influenza vaccines: insights into vaccine-associated Guillain–Barr syndrome // *J. Infect. Dis.* – 2008. – Vol. 2. – P. 226–233.
18. Nicoll A., Ammon A., Amato A., Liff J., Klein M., Mullooly J., Black S., Shinefield H., Ward J., Marcy M. Experience and lessons from surveillance and studies of the 2009 pandemic in Europe // *Public Health.* – 2010. – Vol. 1. – P. 14–23.
19. Stowe J., Andrews N., Wise L., Miller E. Investigation of the temporal association of Guillain–Barr syndrome with influenza vaccine and influenzalike illness using the United Kingdom General Practice Research Database // *Am J. Epidemiol.* – 2009. – Vol. 3. – P. 382–388.
20. Update on Influenza A (H1N1) 2009 Monovalent Vaccines: Centers for Disease Control and Prevention (CDC) // *Morbidity & Mortality Weekly Report.* – 2009. – Vol. 39. – P. 1100–1101.
21. Vajo Z., Tamas F., Sinka L., Jankovics I. Safety and immunogenicity of a 2009 pandemic influenza A H1N1 vaccine when administered alone or simultaneously with the seasonal influenza vaccine for the 2009–10 influenza season: a multicentre, randomised controlled trial // *Lancet.* – 2010. – Vol. 375. – P. 449–455.

*поступила в редакцию 09.06.2010
отправлена на доработку 16.06.2010
принята к печати 06.10.2010*