

بررسی اثر یک نوع محلول تمیزکننده دست دندان روی قارچهای پروتز بیماران مبتلا به کاندیدیازیس آترووفیک مزمن

دکتر محمدحسن شاهروdi

دکتر مسعود امامی

دکتر آریتا کلانتر

چکیده

هدف از این بررسی تعیین میزان خاصیت ضدقارچی محلول تمیزکننده^۱ ساخته شده در ایران بوده است. برای این منظور ۴۰ بیمار که پس از انجام آزمایشات اولیه قارچی معلوم گردید که به کاندیدیازیس مزمن آترووفیک مبتلا هستند، انتخاب شدند و از پروتز فک بالای این بیماران قبل و بعد از استفاده محلول مورد نظر با سواب نمونه برداری شده، نمونه‌ها کشت داده شدند و کلنجهای تشکیل شده روی محیط کشت را شمرده و میزان کلنجهای موجود در یک سی سی از سوسپانسیون نمونه‌ها تعیین شدند. بعد از استفاده محلول نتیجه کشت در تمام این ۴۰ نمونه منفی بوده است. بنابراین از مقایسه نتایج ایندو آزمایش معلوم گردید که پس از استفاده این محلول آلدگی قارچی پروتزها کاملاً از بین رفته و این محلول توانایی از بین بردن کلیه قارچهای موثر در ایجاد کاندیدیازیس آترووفیک مزمن را دارد.

باقی می‌ماند و برای از بین بردن قارچهای رشد کرده در سطح
دنچر از مواد تمیزکننده دنچر استفاده می‌شود.

مقدمه

Review of Literatures

تمیزکننده‌های دنچر بدو صورت مکانیکی و شیمیایی روی آلدگیهای دنچر اثر می‌کنند.^[۱] روش‌های تمیزکننده مکانیکی شامل مسواکزدن، استفاده از خمیرها و پودرها و روش اولتراسونیک می‌باشد. مسواکزدن شایع‌ترین روش برای تمیزکردن دنچر می‌باشد. استفاده از خمیرها و پودرها سبب افزایش سطح پوشش مسواک روی دنچر می‌شوند ولی در اغلب موارد سبب سایش رزین آکریلی نیز می‌گردد.^[۲] تمیزکننده‌های شیمیایی شامل آکالائین هیدروکلرایدها،

کاندیدیازیس مزمن آترووفیک امروزه متراff دنچر - Sore Mouth کاندیدیازیس بصورت التهاب منتشر ناحیه بستر پروتز همراه یا بدون ترک گوشه لب می‌باشد. ضایعات ممکن است بدون علامت و یا دردناک باشند.^[۳] استوماتیت ناشی از پروتز یک حالت شایع است و حدود ۲۴ تا ۴۰ عدرصد افرادی که از دنچر استفاده می‌کنند را شامل می‌شود.^[۴] اگرچه در بروز این ضایعه عواملی از قبیل ترومای ناشی از پروترهای لق، کاهش ارتفاع عمودی صورت و کمبود ویتامین B نیز دخیل می‌باشد، لیکن برطرف شدن این ضایعه متعاقب درمان ضدقارچ تاییدکننده این مطلب است که کاندیدا به عنوان عامل عفونی درونی روی بافت مستعد، به ترومای مزمن و عدم بهداشت عمل می‌کند.^[۵] نکته اساسی این است که ارگانیسم کاندیدا روی رزین قاعده بیس پروتز به میزان بیشتری از روی مخاط کام تشخیص داده می‌شود.^[۶] بنابراین ارگانیسم کاندیدا در سطح یا داخل پروتز

* امدادگر گروه پروتزهای متجر فک و صورت دلنشکده دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران

** استاد گروه فارچ‌شناسی دلنشکده پرستکی دانشگاه علوم پزشکی تهران

*** فارغ‌التحصیل دلنشکده دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران

۱. محلول تمیزکننده کیمیا در ایران و توسط شرکت داروساری کیمیاوار و ساخته شده است که تاکنون تحقیقی بر روی چگونگی اثرات آن انجام نشده است.

تمیزکننده‌های هیدروکلرایدی، پروکسیدی، تمیزکننده‌های ساینده و تمیزکننده‌های اسیدی را مورد بررسی قرارداد و چنین نتیجه گرفت که بیشترین اثرات تمیزکنندگی آکالین پروکسایدها در مراحل اولیه آن است و قدرت آنها به مرور زمان کاهش می‌یابد. تمیزکننده‌های هیدروکلرایدی یک اثر پیوسته و ثابتی را از خود نشان می‌دهند و تمیزکننده‌های ساینده به علت سایشی که روی رزین آکریلی دارند چندان مطلوب نیستند. تمیزکننده‌های اسیدی نسبت به سایرین اثرات بهتری را از خود نشان داده‌اند و لیکن روی اجزاء فلزی پروتزها اثربخش‌تر و سبب خوردگی آنها می‌شوند.^[۱]

روش و مواد مورد تحقیق
Method and Materials
 ۳۴ نفر از سالمدان آسایشگاه کهریزک و تعداد ۲۳ نفر از بیماران مراجعه کننده به دانشکده دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران که از پروتز متحرک کامل استفاده می‌کردند بطور تصادفی انتخاب شده و از مخاط کام این بیماران با سواب استریل نمونه تهیه گردید و نمونه‌ها تا هنگام انتقال به آزمایشگاه قارچ‌شناسی دانشکده بهداشت در لوله‌های استریل حاوی ۲^{cc} سرم فیزیولوژی نگهداری شدند. پس از انجام آزمایش مستقیم نمونه‌های تهیه شده از کام بیماران در زیر میکروسکوپ، میکروارگانیسم‌های قارچی بصورت میسیلومهای کاذب و یا بصورت دستجات سلولهای مخمری در کنار هم مشاهده شدند، برای کشت نمونه‌ها از محیط سابرودکستروزآگار (محیط S) و محیط سابرودکستروز ۵۰mg/lit آغاز به اضافه ۵۰mg/lit کلرامفینیکل و ۵۰mg/lit سیکلوهگزامید (محیط S.C.C) استفاده شد.^[۱] پس از کشت نمونه‌ها روی محیط S و SC.C پلیت‌های کشت به مدت ۲۴ تا ۷۲ ساعت در درجه حرارت ۳۷°C نگهداری شدند. در نمونه‌های مثبت کلئی‌های قارچی با قوام خامه‌ای به رنگ سفید تا کرمی در سطح پلیت وجود داشت. از تعداد ۳۴ نفر که از آسایشگاه کهریزک انتخاب شده بودند ۲۵ نفر و از ۲۳ نفر

آلکالین پروکسیدها، اسیدهای رقيق شده، مواد ضد عفونی کننده و آنزیمه‌ها می‌باشد.^[۲] آکالن هیدروکلرایدها قدرت حل کردن ماتریکس آلی پلاک تشکیل شده روی دنچر را دارند ولی سبب حل کردن جرم نمی‌شوند.^[۳] این مواد سبب تیرگی و خوردگی اجزای فلزی پروتزها می‌شوند. آکالین پروکسیدها از شایع‌ترین مواد تمیزکننده هستند که بطور موثر موسین، دبریها و تغییر رنگ‌های روی دنچر را پاک می‌کنند.^[۴] تمیزکننده‌های اسیدی از اسیدهای رقيق شده تهیه می‌گردند و روی فسفاتهای معدنی موجود در جرم اثر می‌کنند.^[۵] آنزیمهایی که برای ساخته، تمیزکننده‌ها بکار می‌روند آنزیمهایی هستند که خسارت کمی به اجزاء فلزی و آکریلی دست دندان وارد می‌کنند و روی قسمتهای پروتئینی ماتریکس پلاک و غشاء سلولی ارگانیسم‌های موجود در پلاک اثر می‌کنند و سبب انحلال آنها می‌شوند.^[۶]

دکتر Minagi و همکاران چندین تمیزکننده دنچر را براساس خاصیت ضد قارچی آنها بررسی کرده‌اند. یک نوع از این تمیزکننده‌ها دارای آنزیمهای پروتئیناز و گلوكوناز بود که این محلول اثرات بسیار خوبی را بر روی پلاک‌های تشکیل شده روی دنچر داشته است و اثرات ضد قارچی این محلول نیز بیشتر از محلولهای تمیزکننده دیگر که حاوی آنزیم نبوده‌اند، بوده است.^[۷] آقای Nakamoto و همکاران نیز یک نوع محلول تمیزکننده که حاوی هیدروکلراید بربراین (Berberine Hydro Chloride) است را مورد بررسی قرارداده و خاصیت ضدقارچی این محلول را روی سه نوع قارچ کاندیدا آلبیکتس، کاندیدا گلابراتا و کاندیدا تروپیکالیس بررسی نموده و نتیجه‌ای که بدست آمد این بود که محلول حاوی هیدروکلراید بربراین بر روی کاندیدا آلبیکتس بسیار موثر بوده و از رشد آن جلوگیری می‌کند ولی روی کاندیدا گلابراتا چندان موفقیت‌آمیز نبوده است و علت آن تمايل متفاوت گونه‌های مختلف کاندیدا نسبت به هیدروکلراید بربراین می‌باشد.^[۸] دکتر Neill در طی تحقیقی که انجام داد اثرات ۴ دسته

سوسپانسیون هر نمونه تعیین گردید. نمونه های ۳ سی سی که از محلولهای رقیق شده ۱۰۰ سی سی تهیه شده بودند نیز سانتریفوژ شده و مایع سطحی آن دور ریخته شده از محلول تهشین شده آنها کشت تهیه گردید تا معلوم شود آیا میکروارگانیسمی در این محلول زنده میماند، رشد میکند یا خیر؟ برای تشخیص اختلافی انواع کاندیدای دهان از محیط اختصاصی کورن میل آگار با توانین ۸۰ استفاده گردید.^[۱] بدین ترتیب که با آنس استریل از یک کلنی خالص رشد یافته روی محیط S نمونه برداشته و بصورت خطی و نسبتاً عمیق در محیط فوق کشت داده و پلیت ها در درجه حرارت ۳۷°C به مدت ۷۲ ساعت نگهداری شدند. سپس پلیت ها در زیر میکروسکوپ مورد بررسی قرار گرفت. در محیط فوق وجود میسیلیومهای کاذب و حقیقی که در انتهای و اطراف آنها بلاستوکنیدیا و کلامیدوکنیدیا دیده می شود، نشانگر کاندیدآلبکینس می باشد.

نتایج

در شمارش قبل از استفاده محلول تمیزکننده تعداد کلنی ها از ۴۰۰-۲۸۰۰ کلنی در هر سی سی از سوسپانسیون نمونه ها متغیر بودند و پس از استفاده محلول تمیزکننده تعداد کلنی های موجود در ۱ سی سی از سوسپانسیون نمونه ها صفر بود. یعنی هیچ قارچی روی پلیت های کشت رشد نکرد. این مستعلمه بیانگر این نکته است که آلوگی قارچی پروتزاً بطور کامل توسط این محلول از بین رفته است. نتیجه کشت از محلول سانتریفوژ شده نیز در تمام ۴۰ مورد منفی بود بدین معنا که در این محلول تمیزکننده میکروارگانیسم قارچی نمی تواند زنده مانده و یا رشد کند. بدلیل آنکه نمونه ها از دو مرکز جداگانه تهیه شده بودند و نتایج بدست آمده از دو مرکز مشابه هستند. بنابراین خاصیت ضدقارچی این محلول به شرایط سن، مکان، جنس و سایر شرایط بستگی ندارد و این محلول در هر موقعیتی استفاده شود در نتیجه بدست آمده

مراجعین به دانشکده نیز ۱۵ نفر آنها مبتلا به کاندیدیازیس آتروفیک مزمن بودند و برای بررسی اثر ضدقارچی محلول مورد نظر انتخاب شدند. محلول تمیزکننده کیمیا از نوع تمیز کننده های شیمیایی با بیس اسیدی و از دسته اکسیدکننده ها است. PH این محلول ۱/۴ است و برای مصرف ۲۰ سی سی از آن را با ۸۰ سی سی آب مخلوط کرده و دنچرها را به مدت ۶ ساعت در این محلول قرار می دهیم و پس از آن دنچرها را با آب می شویم. فرمول این محلول مطابق اطلاعات داده شده از شرکت داروسازی کیمیا مطابق جدول زیر است:

مواد	درصد
آب اکسیژنه	۱۰
اسید فسفریک	۵
اسید کلریدریک	۵
اسید سیتریک	۵
مواد رنگی مجاز	

برای بررسی اثر ضدقارچی این محلول از پروتزاً های فک بالای بیمارانی که جواب آزمایش اول آنها مثبت بوده است، با سوab استریل نمونه برداری کرده، پس از آن هر کدام از پروتزاً ها به مدت ۶ ساعت درون محلول تمیزکننده کیمیا قرار داده شدند و پس از شستشوی پروتزاً ها با آب از آنها مجدداً نمونه تهیه گردید. از ۱۰۰ سی سی محلول رقیق شده که پروتزاً ها در آنها قرار داده شده بودند از هر کدام ۳ سی سی در لوله های استریل ریخته و برای آزمایش و تهیه کشت به آزمایشگاه برد شدند. بعد از انتقال نمونه ها به آزمایشگاه از نمونه هایی که از پروتزاً ها قبل و بعد از استفاده محلول تهیه گردیده بود روی محیط S کشت داده شد پس از آن محیط ها به مدت ۲۴-۴۸ ساعت در انکوباتور با درجه حرارت ۳۷°C نگهداری شدند. سپس تعداد کلنی های رشد کرده روی هر محیط شمرده شده و تعداد کلنی های موجود در ۱ سی سی از

در آسایشگاه کهریزک ۸۴ درصد افراد در هنگام شب پروتز خود را از دهان خارج نمی‌کنند در مراجعین به دانشکده دندانپزشکی نیز $\frac{73}{3}$ درصد افراد پروتزهای خود را هنگام شب از دهان خارج نمی‌کنند بنابراین می‌توان گفت که این مسئله در ایران عمومیت دارد و می‌توان ارتباط مستقیمی بین خارج نکردن پروتز در شب و دنچر استوماتیت در نظر گرفت.(جدول ۲)

تأثیری نخواهد داشت.

از بررسی جداول آماری نتایج زیر بدست آمده است: در مطالعه‌ای که دانشکده دندانپزشکی به عمل آمد بیشترین درصد سنی بین ۶۱-۶۵ سال بوده‌اند و حدود ۷۳ درصد افراد سنی کمتر از ۶۵ سال داشته‌اند ولی در آسایشگاه کهریزک بیشترین درصد سنی بین ۷۱-۷۵ سال بوده‌اند و ۸۴ درصد افراد دارای سنی بیشتر از ۶۵ سال بودند این تفاوت سنی در دو مرکز می‌تواند به شرایط پذیرش بیماران دانشکده ارتباط داشته باشد (جدول ۱).

جدول ۱-توزیع بیماران مبتلا به کاندیدیازیس آتروفیک مزمن بر حسب سن

درصد	تعداد	آسایشگاه کهریزک	دانشکده دندانپزشکی		محل مطالعه سن
			درصد	تعداد	
۱۶	۴	۱۳/۳	۲		۴۶-۵۰
-	-	۲۰	۲		۵۱-۵۵
-	-	۶/۷	۱		۵۶-۶۰
-	-	۳۲/۳	۵		۶۱-۶۵
۱۶	۴	۲۰	۳		۶۶-۷۰
۳۶	۹	۶/۷	۱		۷۱-۷۵
۱۶	۴	-	-		۷۶-۸۰
۱۶	۴	-	-		۸۱-۸۵
۱۰۰	۲۵	۱۰۰	۱۵	جمع	

جدول ۲-توزیع بیماران مبتلا به کاندیدیازیس آتروفیک مزمن بر حسب خارج کردن پروتز در هنگام شب

درصد	تعداد	آسایشگاه کهریزک	دانشکده دندانپزشکی		محل مطالعه خارج کردن پروتز در شب
			درصد	تعداد	
۱۶	۴	۲۶/۷	۴		خارج می‌کند
۸۴	۲۱	۷۳/۳	۱۱		خارج نمی‌کند
۱۰۰	۲۵	۱۰۰	۱۵	جمع	

امر به فقر یهداشت دهان و دندان در این گروه از بیماران در ایران ارتباط دارد.

در آسایشگاه کهریزک تنها ۱۲ درصد افراد از مسوак برای تمیزکردن پروتزهای خود استفاده می‌کنند در دانشکده نیز تنها حدود ۱۳ درصد افراد پروتزهایشان را مسوак می‌زنند و این

جدول ۳- توزیع بیماران مبتلا به کاندیدیازیس آتروفیک مزمن بر حسب نحوه تمیزکردن پروتز

آسایشگاه کهریزک		دانشکده دندانپزشکی		محل مطالعه نحوه تمیزکردن
درصد	تعداد	درصد	تعداد	
۴۴	۱۱	۲۶/۷	۴	نمی‌شویند
۴۴	۱۱	۶۰	۹	شستشو با آب
۶۲	۳	۱۳/۳	۲	شستشو با مسواك
۱۰۰	۲۵	۱۰۰	۱۵	جمع

جدول ۴- توزیع بیماران مبتلا به کاندیدیازیس آتروفیک بر حسب نوع کاندیدای دهان

آسایشگاه کهریزک		دانشکده دندانپزشکی		محل مطالعه نوع کاندیدا
درصد	تعداد	درصد	تعداد	
۸۸	۲۲	۸۶/۷	۱۳	C.a *
۱۲	۳	۱۳/۳	۲	C.sp **
۱۰۰	۲۵	۱۰۰	۱۵	جمع

* کاندیدا آلیکانس

** گونه‌های دیگر کاندیدا

بحث

تماس مداوم میکروارگانیسمهای پلاک دنچر با مخاط بیماران سبب تغییراتی در مخاط می‌شود. هنگامیکه این مجاورت از بین بروود سلامت بافتی مخاط دهان مجدداً برقرار می‌شود.^[۱] برای این منظور استفاده از محلولهای تمیزکننده می‌تواند بسیار مفید باشد، یکی از اثرات مهم محلولهای

در آسایشگاه کهریزک در ۸۸ درصد مواد کاندیدا آلبیکنس مسئول ضایعات دنچر استوماتیت در این بیماران بوده است در دانشکده نیز ۷/۸۶ درصد مواد کاندیدا آلبیکنس ایجاد دنچر استوماتیت نموده و این امر نشاندهنده نقش این قارچ در بروز کاندیدیازیس دهانی بخصوص در افراد استفاده‌کننده از پروتز می‌باشد.

لازم به پادآوری است که اثرات این محلول روی رزین آکریلی و اجزای فلزی پروتزها از این بررسی حذف شده‌اند.

علت این امر عبارت است از:

- ۱- این موضوعات احتیاج به تحقیقات وسیع‌تری دارد و می‌تواند به عنوان موضوع جدایگانه‌ای برای بررسی تلقی گردد.
- ۲- تنها از پروتزهای کامل در این بررسی استفاده شده و پلاکهای پارسیل بواسطه تأثیر اثرات جانبی از تحقیق حذف گردیدند.

خلاصه

هدف از این بررسی تعیین میزان خاصیت ضدقارچی محلول تمیزکننده ساخته شده در ایران بوده که توسط شرکت داروسازی کیمیا تولید شده است. برای این منظور قبل از استفاده از محلول مورد نظر از پروتز کامل ۴۰ بیمار مبتلا به کاندیدیازیس آتروفیک مزمن نمونه‌برداری شد و پس از کشت روی محیط S کلنی‌های قارچی رشد نموده روی محیط شمرده شدند بعد از استفاده محلول و نمونه‌برداری و تهیه کشت مجدد از پروتز تعداد کلنی‌های قارچی موجود روی هر محیط تعیین شدند. از مقایسه نتایج ایندو مرحله معلوم گردید که پس از استفاده از این محلول آلوگی قارچی دنچرها به میزان ۱۰۰ درصد از بین رفته و این محلول توانایی از بین بردن قارچهای مولد کاندیدیازیس آتروفیک مزمن را داشته است. بنابراین استفاده از این محلول در پیشگیری از ضایعات دنچر استوماتیت می‌تواند موثر باشد.

تمیزکننده اثر ضدقارچی و ضدمیکروبی آنها می‌باشد. آقای Dills و همکاران اثرات ضدمیکروبی و قارچی دو نوع ماده تمیزکننده را مورد بررسی قرار دادند^[۳] از یک خمیر ساینده بنام Dentu - Creme و یک محلول تمیزکننده پروکسایدی بنام Efferdent استفاده گردید. در این بررسی از ۳۰ بیمار که دارای پروتزهای متحرک بودند دعوت به همکاری نمود و برای نمونه‌برداری از سواب خشک استریل استفاده گردید ولی RTF پس از آن نمونه‌ها را به مدت ۲ ساعت در محلول^۱ قرار گرفت و از انواع محیط‌های کشت اختصاصی برای استرپتوبکتیک‌های دهانی، قارچها و Veillonella SP استفاده نمود. نتیجه‌ای که از این بررسی گرفته شد چنین بود که در اثر استفاده از محلول Efferdent به تنهایی و یا استفاده توأم آن با خمیر Denta - Creme حدود ۹۹ درصد از انواع میکروارگانیسم‌های پلاک نسبت به گروهی که هیچ عمل تمیزکننده‌ای روی دنچرهایشان انجام نداده بودند، کاهش یافت در صورتی که در مساواک‌زدن تنها با خمیر Dentu - Creme کاهش چندانی مشاهده نگردید. بنابراین روش خیس کردن پروتز در یک محلول تمیزکننده می‌تواند اثر بهتری داشته باشد.^[۳]

در بررسی انجام شده از پروتز کامل ۴۰ بیمار مبتلا به کاندیدیازیس آتروفیک مزمن استفاده گردید و پس از هر بار نمونه‌برداری، نمونه‌ها در لوله‌های استریل حاوی لاسیسی فیزیولوژی و در یخچال نگهداری شدند. برای جلوگیری از هرگونه تمیزی در میزان و نوع آلوگی نمونه‌های تهیه شده از محلول RTF استفاده نشد، و چون تنها اثر ضدقارچی این محلول مورد نظر بوده است بنابراین برای تهیه کشت فقط از محیط S.CC و S.CC استفاده گردید.

۱- Reduced Transport Fluid

Summary

Chronic atrophic candidiasis, popularly recognized as denture sore mouth is seen as an inflammatory condition of the denture bearing tissues of the oral cavity. Angular chcitis may be seen alongwith the above condition. Denture stomatitis is observed in 24-60% of denture users. Trauma from (loose) denture, decreased vertical dimension and deficiency of vitamin B

are cited as causes of the inflammation. Surprisingly, the line of treatment is antifungal. Also, the candida organism is detected more easily on the resin denture base rather than the oral tissues.

Hence, the role of a denture cleanser produced in Iran which also has antifungal activity was tested upon 40 patients with chronic atrophic candidiasis to evaluate its effectiveness.

منابع فارسی و لاتین:

۱. دکتر مسعود امامی، دکتر پریوش کردبچه، دکتر مهین مقدمی، دکتر فریده زینی، قارچ‌شناسی پزشکی - انتشارات دانشگاه تهران، چاپ سوم ۱۳۷۰
۲. Ambjornsen and Rise (1985): "The Effect of Verbal Information and Demonstration on Denture Hygiene in Elderly People" *Acta Odontol Scand* 43(1): 19.
۳. Dills [et.al], (1979): "Comparsion of the Antimicrobial Capability of an Abrasive Paste and Chemical Soak Denture Cleaners" *J Prosthet Dent* 6(4): 467.
۴. Jorgensen and Odont (1979): "Material and Methods for Cleaning Dentures" *J. Prosthet Dent.* 42(6): 619.
۵. Lynch, M. (1994): "*Burket's Oral Medicine*". Philadelphia, Lippincott.
۶. Minagi., [et.al] (1987): "Objective Testing of the Efficiency of Denture Cleansing Agents" *J Prosthet Dent.* 58(5): 595.
۷. Nakamoto. [et.al] (1991): "Evaluation of Denture Cleansers with and Without Enzymes Against *Candida Albicans*" *J. Rosthet Dent.* 66(6): 792.
۸. Nakamoto. [et.al] (1995): "Invitro Study on the Effects of Trial Denture Cleansers with Berberine Hydrochloride" *J. Prosthet Dent.* 73(6): 530.
۹. Neill. (1989): "A Study of Materials and Methods Employed in Cleaning Dentures *British J. Dent.* 124(3): 107.
۱۰. Nyquist, B. (1989): "A Study of Denture - Sore - Mouth" *ACTA Odont - Secnd* St. Louis, Mosby 152.
۱۱. Wood and Gooz (1991): "Differential Diagnosis of Oral Lesson" St. Louis, Mosby.