

**МОНОАМИНОКСИДАЗА МОЗГА У ГЕНЕТИЧЕСКИ
ПРЕДРАСПОЛОЖЕННЫХ
К МАЯТНИКООБРАЗНЫМ ДВИЖЕНИЯМ КРЫС В ПОЗДНЕМ
ОНТОГЕНЕЗЕ.**

Н.Н.ВОЙТЕНКО, Н.Н.БАРЫКИНА, КОЛПАКОВ В.Г.

Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской Академии наук, 630090, Новосибирск, проспект Лаврентьева 10. Факс: (3832) 35-65-58

Изучались, крысы генетически предрасположенные (PM⁺) и не предрасположенные (PM⁻) к маятникообразным движениям головы и плечевого пояса. В возрасте 8-ми месяцев, различия в активности MAO А между крысами PM⁺ и PM⁻ в 16ч исчезали. У старых PM⁺ и PM⁻ крыс в стволе мозга активность MAO А в 16ч была выше, чем у молодых. Актиномицин Д понижал активность MAO А в стволе PM⁺ и PM⁻ старых крыс. Эмоциональный стресс повышал активность MAO Б в стволе мозга PM⁺ крыс, а предварительное введение актиномицина Д предотвращало активирующее действие стресса на MAO Б. Обсуждаются возможные различия в регуляции активности на уровне транскрипции А и Б типов MAO мозга у PM⁺ PM⁻ крыс.

Ключевые слова: моноаминоксидазы мозга, поздний онтогенез, стереотипия, крысы PM⁺.

ВВЕДЕНИЕ. Моноаминоксидаза ((MAO) амин: кислород оксидоредуктаза (дезаминирующая) (содержащая флаavin) КФ 1.4.3.4) мозга, как известно [1,2], принимает участие в передаче нервного импульса, поэтому изменение активности MAO при старении [3-7] не могло не сказаться на MAO-зависимых физиологических функциях организма [3,8-12]. Особое значение в нейромедиации принадлежит MAO типа А, поскольку уровень ее активности определял содержание нейромедиаторов дофамина и серотонина на рецепторах [1,2] и в синапсах [13].

Однако нет четкого представления о том, какие изменения происходят в активности MAO типа А при старении, поскольку имеются данные как о повышении ее активности [5,14-16], так и о понижении [16-19]. До сих пор не учитывалось влияние генотипа особи на изменение активности MAO типа А при старении, хотя множественность MAO [20,21], а также регуляция активности MAO как на уровне транскрипции, так и на посттранскрипционном уровне [22], позволяют предполагать существенную роль генотипа изучавшихся особей в характере изменений активности MAO типа А при старении.

Изучение MAO мозга у животных с разным генотипом позволит выявить роль генотипа в возрастном изменении активности MAO типа А. Линия крыс с наследственной предрасположенностью к стереотипному гиперкинезу в виде маятникообразных движений головы и плечевого пояса (PM⁺) [23], является удобной моделью для изучения влияния генотипа на активность и регуляцию активности MAO типа А в начальном периоде старении. У молодых, 4-х месячных крыс, предрасположенных к маятникообразным движениям, активность MAO А в стволе выше, а в полушариях мозга активность MAO типа А ниже [24], чем у крыс, не имеющих наследственной предрасположенности к маятникообразным движениям (PM⁻).

Цель настоящего исследования заключалась в изучении влияния начального периода старения на активность и на регуляцию активности на уровне транскрипции MAO типа А и MAO типа Б у крыс предрасположенных (PM⁺) и не предрасположенных (PM⁻) к маятникообразным движениям.

МЕТОДИКА. Изучались самцы крыс 3-го поколения селекции в возрасте 8-ми месяцев на предрасположенность и на не предрасположенность к маятникообразным движениям головы и плечевого пояса. Селекция велась из крыс линии Вистар. Возраст 8 месяцев у крыс является периодом позднего онтогенеза, когда появляются признаки старения в виде нарушения эстрального цикла у самок и снижения уровня тестостерона у самцов [25], но репродуктивная функция еще продолжает сохраняться. Этот период в жизни крыс представляет большой интерес, поскольку является начальным этапом старения; у стареющих крыс наряду с изменением активности MAO мозга начинают появляться необратимые изменения в MAO-зависимых физиологических функциях. За два дня до эксперимента крыс помещали в индивидуальные клетки для снятия зоосоциальных влияний на поведение и на MAO мозга. Корм и вода не ограничивались. Световой режим соответствовал сезону (июль). Опыты проводились в 8 ч и в 16 ч. В связи с тем, что активность MAO мозга в течение суток не постоянна [26,27] и колеблется в зависимости от циркадных ритмов, для изучения активности MAO в мозге у PM⁺ и PM⁻ крыс были выбраны две временные точки: 8 и 16ч. Крысы, как известно, являются ночными животными, с активностью ночью и сном днем, и время 8ч утра было выбрано как начало периода покоя после ночной активности. Время 16ч было выбрано как промежуточное время покоя между состоянием дневного покоя и состоянием ночной активности крыс. Кроме того у молодых крыс PM⁺ в 16ч было найдено понижение активности MAO А в стволе при синхронно повышенной активности MAO А в полушариях [24]. Какова активность MAO А у крыс PM⁺ и PM⁻ в начальном периоде старения в это время суток известно не было. Эмоциональный стресс вызывали содержанием крыс в тесных проволочных клетках в течение 60 мин с 8 до 9 ч [17]. Контролем служили предрасположенные и не предрасположенные к маятникообразным движениям крысы 3-го поколения селекции, которые находились в это время в своих домашних клетках. Актиномицин Д в дозе 10 мкг на 100 г массы тела [17] вводили крысам внутривентриально за 60 мин до помещения их в тесную клетку [17]. Контролем служили крысы, которые получали актиномицин Д и продолжали оставаться в своих домашних клетках. После быстрой декапитации мозг делили на ствол и полушария. Методом дифференциального центрифугирования выделяли неразделенную фракцию митохондрий P₂, содержащую MAO. Активность MAO определяли по образованному в процессе дезаминирования аммиаку [18]. В качестве субстратов использовали серотонин 1,0 мМ (MAO А) и бензиламин 1,0 мМ (MAO Б). Активность MAO выражали в нмоль аммиака на мг белка за мин. Белок определяли по Лоури. Полученные данные обрабатывали статистически с применением t-критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Полученные данные свидетельствуют о том, что 8-ми месячные, предрасположенные и не предрасположенные к маятникообразным движениям крысы в начальный период старения характеризовались сходной активностью MAO А в стволе и в полушариях головного мозга как в утренние (8ч) часы, так и в послеобеденное (16ч) время (рис.1). Наряду с этим крысы PM⁺ в начальном периоде старения характеризовались повышенной активностью MAO Б в стволе по сравнению с крысами PM⁻ в утренние (8ч) часы (рис.1).

Функциональная нагрузка в виде эмоционального стресса позволила выявить существенное отличие в стрессорной реактивности MAO Б у крыс PM⁺ по сравнению с крысами PM⁻. Так у крыс PM⁻ в начальном периоде старения под влиянием стресса активность MAO Б повышалась в стволе (табл.1), в то время как у крыс PM⁺ в начальном периоде старения изменений в активности MAO Б при этом

не наблюдалось (табл.). Активирующее действие эмоционального стресса на MAO B ствола мозга крыс PM- в начальном периоде старения предотвращал актиномицин Д, ингибитор синтеза ДНК-зависимой РНК-полимеразы (табл.). Под влиянием функциональной нагрузки в виде эмоционального стресса у 8-ми месячных PM+ крыс появилась тенденция к понижению активности MAO A в полушариях мозга (табл.) и достоверное понижение активности MAO A в полушариях мозга при стрессе в условиях предварительного введения актиномицина Д (табл.). У интактных крыс обеих линий в начальном периоде старения актиномицин Д вызывал понижение активности MAO A в стволе мозга, не влияя существенно на активность MAO A полушарий (табл.).

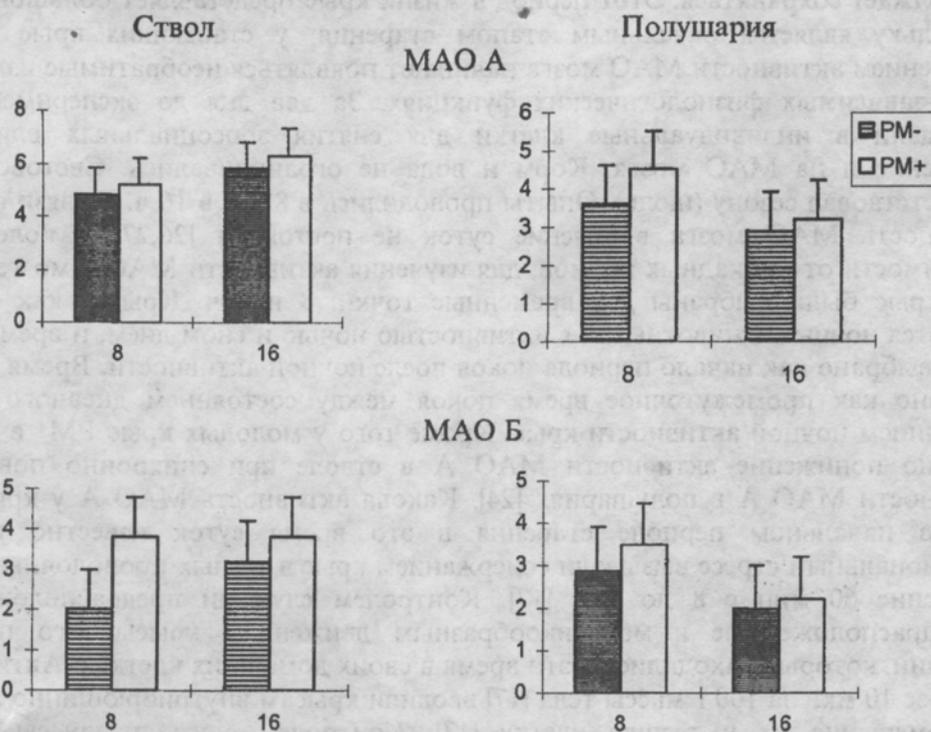


Рис. 1.

Моноаминоксидазы мозга старых (8 мес.) предрасположенных (PM+) и не предрасположенных (PM-) к маятникообразным движениям крыс.

В каждой группе животных 6. * - $P < 0,05$ по сравнению с PM-.

Обсуждая полученные данные, следует отметить, что молодые, 4-х месячные, крысы PM+ по сравнению с крысами PM- характеризовались повышенной активностью MAO в полушариях мозга при синхронном понижении активности MAO A в стволе [24]. С возрастом эти различия в активности MAO A между крысами PM+ и PM- стерлись, и активность MAO A у обеих линий крыс в возрасте 8-ми месяцев уже не отличалась (рис.1). Однако, с исчезновением различий в активности MAO-A в мозге животных этих групп (рис.1), стереотипные движения в виде маятникообразных движений головы и плечевого пояса, возникшие на 3-ей недели жизни у крысят PM+ [23], с возрастом не исчезали и продолжали сохраняться у 4-х и у 8-ми месячных крыс PM+.

Эти факты, естественно, порождают вопрос о том, насколько существенна наблюдавшаяся нами пониженная активность MAO A в стволе у 4-х месячных крыс линии PM+ в этиологии маятникообразных движений. Прямых литературных данных по этому вопросу не найдено, хотя не прямые - существуют.

Таблица. Моноаминоксидазы мозга старых предрасположенных (А) к непредрасположенных (Б) маятникообразным движениям крыс, нмоль аммиака/мг белка-мин.

Серии опытов	Ствол		Полушария	
	МАО А	МАО Б	МАО А	МАО Б
А				
Контроль	5,16±0,14 (6)	3,86±0,57 (6)	4,55±0,91 (6)	3,45±0,91 (6)
Стресс	5,11±0,41 (5)	3,72±0,46 (6)	3,29±0,46 (6)	2,41±0,30 (6)
Актиномицин Д	3,52±0,30* (4)	2,34±0,36 (4)	5,13±0,61 (4)	2,59±0,57 (4)
Актиномицин Д + стресс	4,55±0,60 (5)	2,52±0,25 (5)	3,14±0,40** (5)	2,45±0,32 (5)
Б				
	МАО А	МАО Б	МАО А	МАО Б
Контроль	4,75±0,81 (6)	1,96±0,31 (6)	3,68±0,15 (6)	2,69±0,40 (6)
Стресс	5,10±0,50 (6)	3,35±0,08* (6)	3,00±0,43 (6)	2,79±0,16 (5)
Актиномицин Д	2,26±0,15* (6)	2,72±0,23 (6)	2,87±0,22 (6)	2,21±0,27 (6)
Актиномицин Д + стресс	3,67±0,38 (6)	2,19±0,38 (6)	2,69±0,30 (6)	2,59±0,24 (6)

* - $p < 0,05$ по сравнению с контролем. ** - $p < 0,05$ по сравнению с актиномицином Д. В скобках число животных. Опыт проводился с 8 до 9 ч.

Прежде всего следует остановиться на фармакологических стереотипиях, которые исчезают после прекращения действия фармакологического препарата. Известные в настоящее время серотониновая [28]), β -фенилэтиламинавая [29], дофаминовая [30] стереотипии впервые были получены при введении животным ингибиторов МАО перед введением предшественников субстратов МАО, нейромедиаторов мозга. Ингибиторы МАО защищали серотонин, β -фенилэтиламин, дофамин от дезаминирования и способствовали повышению уровня этих нейромедиаторов в мозге над физиологическим.

Найденная нами сниженная активность МАО А в стволе мозга 4-х месячных крыс линии PM^+ могла способствовать повышению уровня серотонина в мозге. Однако тот факт, что стереотипные движения у крыс PM^+ сохраняются в возрасте 8-ми месяцев, когда активность МАО А в стволе у них становится высокой и не отличается от активности МАО А в стволе у крыс PM^- , наводит на мысль о том, что стереотипные движения у крыс PM^+ могли возникнуть в более раннем возрасте, возможно в критический период развития МАО А-серотонин компетентных структур мозга в результате морфологических изменений, которые являются необратимыми, сохраняются в течение всей жизни и проявляются в виде маятникообразных движений вне зависимости от последующих колебаний активности МАО А в ходе онтогенеза или под влиянием циркадных ритмов. Наше предположение не лишено оснований и совпадает до некоторой степени с данными [31], которые показали, что у трансгенных мышей линии $Tg8$ с дефицитом гена МАО А и с высоким уровнем серотонина в мозге наблюдается нарушение в развитии 4-го слоя нейронов сенсомоторной коры головного мозга. При этом экспериментальное снижение уровня серотонина в мозге путем блокады его синтеза *n*-хлорфенилаланином в критический период развития этого слоя сенсомоторной коры препятствовало возникновению у мышей $Tg8$ линии морфологических изменений в мозге. Несмотря на то, что нельзя провести полной аналогии между пониженной функциональной активностью МАО А в стволе мозга молодых крыс PM^+ и отсутствием активности МАО А у мышей $Tg8$ в мозге, нельзя и исключить

возможное влияние измененной активности MAO A у крыс PM⁺ на развитие MAO A-компетентных структур мозга в раннем онтогенезе и, как следствие, возникновение необратимых изменений физиологических функций, в частности, появление двигательной стереотипии в виде маятникообразных движений головы и плечевого пояса. Если у крыс PM⁺ возникновение стереотипии вызвано изменением структуры мозга в раннем онтогенезе вследствие пониженной активности MAO A и повышенного уровня серотонина в мозге, то более низкая активность MAO A у 4-х месячных крыс линии PM⁺ по сравнению с крысами линии PM⁻ в стволе, не является непосредственной причиной возникновения стереотипных движений ни в 4-х, ни в 8-ми месячном возрасте.

Помимо этого крысы PM⁺ в начальном периоде старения отличались от молодых крыс PM⁺ устойчивостью А и Б типов MAO к эмоциональному стрессу: ни одна из изоформ MAO у старых, 8-ми месячных крыс PM⁺, не реагировала на стресс в стволе мозга (табл.), в то время как у молодых, 4-х месячных, крыс PM⁺ под влиянием стресса в стволе мозга активность А и Б типов MAO [24] возрастала. Однако, несмотря на повышенную активность MAO A при стрессе у молодых PM⁺ крыс, стереотипные движения головы и плечевого пояса продолжали сохраняться так же, как они сохранялись у PM⁺ крыс в начальном периоде старения при стрессе. Это еще один факт в пользу того, что повышение активности MAO A в посткритический период развития MAO A-серотонин компетентных структур мозга у молодых крыс PM⁺ не влияет на существование стереотипных движений головы и плечевого пояса у крыс линии PM⁺.

Второй вопрос, рожденный экспериментом, заключался в том, какие факторы вызывают изменение активности MAO мозга в позднем онтогенезе у интактных крыс PM⁺ и PM⁻ и у этих крыс при функциональной нагрузке в виде эмоционального стресса. Применение актиномицина Д, ингибитора синтеза ДНК-зависимой РНК-полимеразы, позволило выявить сложную регуляцию активности MAO типа А мозга старых интактных крыс предрасположенных и не предрасположенных к маятникообразным движениям головы и плечевого пояса. Под влиянием актиномицина Д в стволе мозга, где находятся перикарионы моноаминергических нейронов, понижалась активность MAO типа А как у предрасположенных, так и у не предрасположенных к маятникообразным движениям интактных старых крыс (табл.). Можно предположить, что у интактных крыс предрасположенных и не предрасположенных к маятникообразным движениям, в начальный период старения актиномицин Д ингибирует синтез мРНК, кодирующей регуляторный белок-активатор гена конститутивной MAO A в стволе мозга, и высокая активность MAO A в стволе мозга PM⁺ и PM⁻ крыс в период позднего онтогенеза связана с регуляторными белками-активаторами гена конститутивной MAO A. Эти данные показали, что старение активности MAO A мозга находится под контролем генома, регулируется, по всей видимости, аутосомными генами, которые включаются в регуляцию активности MAO A у крыс PM⁺ и PM⁻ в позднем онтогенезе, поскольку у интактных молодых крыс PM⁺ и PM⁻ актиномицин Д не тормозил активность MAO A [24]. Кроме того эти данные свидетельствуют еще и о том, что генетические программы молекулярных механизмов регуляции активности MAO A в мозге с возрастом изменяются.

Предваряя эмоциональный стресс введением актиномицина Д, удалось выявить различия в регуляции на уровне транскрипции активности MAO A и Б типов мозга при стрессе у крыс линии PM⁺ и PM⁻ в начальный период старения. Так у предрасположенных к маятникообразным движениям крыс в начальный период старения в присутствие актиномицина Д стресс существенно понижал активность MAO A в полушариях мозга, в то время как в отсутствие актиномицина Д наблюдалась только тенденция к снижению активности MAO A. Эти данные позволяют высказать предположение о том, что актиномицин Д не предотвращал ингибирующее действие эмоционального стресса на активность MAO A у крыс

линии РМ⁺. Можно предположить, что при стрессе у РМ⁺ крыс появляется эндогенный фактор, изменяющий конформацию МАО А и соответственно ее активность.

Несколько иначе вела себя МАО Б при старении у крыс РМ⁺. Полученные нами данные показали, что интактные предрасположенные и непрасположенные к маятникообразным движениям крысы в начальном периоде старения не отличались от молодых активностью МАО типа Б ни в стволе, ни в полушариях головного мозга в послеобеденное время суток (16ч) (рис.1), хотя в 8ч утра крысы РМ⁻ характеризовались пониженной активностью МАО Б в стволе мозга. Можно думать, что регуляция активности и транспорт МАО типа Б из перикарионов ствола в синапсомы полушарий у РМ⁺ крыс по сравнению с крысами РМ⁻ в возрасте 8-ми месяцев в 16ч одинаковы, но в утреннее время (8ч), возможно, синтез МАО Б в перикарионах ствола снижен у крыс РМ⁻. О роли МАО Б в возникновении генетической стереотипии литературные данные отсутствуют.

Поскольку актиномицин Д предотвращал активирующее действие стресса на МАО Б в стволе мозга непрасположенных к маятникообразным движениям крыс в начальном периоде старения (табл.), можно предполагать, что актиномицин Д ингибировал синтез мРНК, кодирующей синтез индуцибельной МАО Б или регуляторного белка-активатора гена конститутивной МАО Б, которые появляются при стрессе у непрасположенных к маятникообразным движениям крыс в начальном периоде старения.

У молодых непрасположенных к маятникообразным движениям крыс индуцибельной МАО типа Б или регуляторного белка-активатора гена конститутивной МАО типа Б при стрессе, вероятно, не было, поэтому полученный факт в пользу существования индуцибельной МАО Б или регуляторного белка-активатора гена конститутивной МАО Б в стволе мозга непрасположенных к маятникообразным движениям крыс при стрессе свидетельствует с одной стороны об измененной регуляции активности МАО типа Б при стрессе у непрасположенных к маятникообразным движениям крыс в начальный период старения, а с другой стороны, о включении МАО типа Б этих крыс в генетическую программу стресса.

Таким образом, в начальном периоде старения происходят неодинаковые изменения в активности и в регуляции активности на уровне транскрипции МАО мозга у предрасположенных и непрасположенных к маятникообразным движениям крыс. Эти данные свидетельствуют о том, что в позднем онтогенезе происходит изменение в генетической программе молекулярных механизмов регуляции активности МАО мозга, причем эти программы у РМ⁺ и РМ⁻ крыс не одинаковые и включают, по всей видимости, аутомные гены. Изменения активности МАО А мозга в позднем онтогенезе не имеют непосредственного отношения к этиологии изучаемой стереотипии в виде маятникообразных движений головы и плечевого пояса.

Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований, (грант 96-04-50123).

ЛИТЕРАТУРА

1. Lay J.C.K., Leung Th.K.C., Guest J.F. et al. (1980) *Biochem. Pharmacol.*, **29**, 2763-2767.
2. Liccione J., Azzaro A.J. (1988) *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, **337**, 151-156.
3. Fowler C.J., Wieberg A., Orelan L., Marcusson J., Winblad B. (1980) *J. Neural Transmission*, **49**, 1-20.
4. Jossan S.S., Lindgren S., Orelan L. (1988) *Pharmacol. Research Commun.* **20**, 93-95.
5. Strolin-Benedetti M., Keane P.S. (1980) *J. Neurochem.*, **35**, 1026-1032.

6. Suzuki O., Yagi K. (1977) Satelites Symposium 6-th Meeting Int. Soc. Neurochemistry.- Mutation of Neurotransmission.- Saint-Vincent, pp. 110-117.
7. Venero J.L., Machado A., Cano J. (1990) Mech. Ageing and Devel. **56**, 253-263.
8. Бурчинский С.Г., Кузнецова С.М. (1988) Вопр. мед. химии. N4, 2-9.
9. Knoll J. (1982) Strategy in Drug Research. (Ed. J.F.Keverling Buisman), Elsevier Amsterdam. pp. 107-135.
10. Orelund L., Gottfries C.-Ger. (1986) Progr. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiat. **10**, 533-540.
11. Strolin-Benedetti M., Dostert Ph. (1989) Biochem. Pharmacol., **38**. N4, 555-561.
12. Wiener H.L., Hashim A., Sershen H. Age. N4, 159.
13. Kelder D., Fagervall I., Fowler C.J., Ross S.B. (1989) Biogenic Amines., **6**, 1-14.
14. Войтенко Н.Н. (1992) Вопр. мед. химии., **38**, N3, 32-35.
15. Жубрикова Л.А. (1979) Актуальные проблемы возрастной физиологии, биохимии и биофизики/ Сборник научных трудов.- Киев: Наукова думка, 160-171.
16. Singer T.P., Castagnoli N.J., Ramsay R.R. J. Neurochem., **49**, 1-18.
17. Войтенко Н.Н., Попова Н.К. (1991) Вопр. мед. химии, **37**, 28-31.
18. Горкин В.З. (1981) Всесоюзный симпозиум "Молекулярные и клеточные механизмы старения", Тезисы докладов. Киев, с. 51-52.
19. Arai Y., Kinemuchi A. (1988) J. Neural Transmission, **72**, N2. 99-105.
20. Камышанская Н.С., Москвитина Т.А. (1981) Вопр. мед. химии. N2. 261-266.
21. Москвитина Т.А., Кучина Н.Е., Горкин В.З. (1982) Вопр. мед. химии, N5, 127-131.
22. Войтенко Н.Н. (1990) Нейрохимия, **9**, N2. 259-262.
23. Kolpakov V.G., Barykina N.N., Alekhina T.A., Ponomarev I. Yu. (1996) Some Genetic Animal Models for Comparative Psychology and Biological Psychiatry. (Ed. A.L.Markel). Russian Acad. of Sci. Siberian Division. Institute of Cytology and Genetics. Novosibirsk., p.172.
24. Войтенко Н.Н., Барыкина Н.Н., Колпаков В.Г. (1998) Журнал высшей нервной деятельности. (в печати)
25. Meites J. (1988) Exper. Gerontology, **23**, 349-358.
26. Bhaskaran D., Radha E. (1984) Exp. Gerontol. **19**, 153-170.
27. Chevillard C., Barden N., Saavedra J.M. (1981) Brain Res. **223**, 205-209.
28. Grahame-Smith D.G. (1971) J. Neurochem., **18**, 1053-1066.
29. Mantegazza P., Riva M. (1963) J. Pharm. Pharmacol., **15**, 472-478.
30. Fog R. (1972) Acta Neurologica Scand., **50**, 11-66.
31. Casses O., Vitalis T., Seif I., De Maeyer E., Sotelo C., Gaspar P. (1996) Neuron., **16**, 297-307.

Поступила 23.02.98.

BRAIN MONOAMINE OXIDASE IN AGEING OF RATS GENETICALLY PREDISPOSED TO PENDULUM MOVEMENT.

VOITENKO N.N., BARYKINA N.N., KOLPAKOV V.G.

Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Acad.Sci., Lavrenteva 10 av., 630090, Novosibirsk, Russia. Fax: (3832) 35-65-58.

Rats genetically predisposed (PM+) and non-predisposed (PM-) to pendulum movement (spontaneous nystagm) were studied at different age. In old PM+ and PM- rats the brain MAO-A activity did not differ, unlike between young PM+ and PM- rats. In old PM+ and PM- rats, brain stem MAO-A activity was higher than in young ones. Actinomycin D lowered brain stem MAO-A activity in PM+ and PM- rats. In the absence of actinomycin D, stress elevated MAO-B activity in the brain stem of PM- rats, and a preliminary actinomycin D administration prevent the MAO-B activating effect of stress. Possible differences in MAO-A and MAO-B regulation attranscription level in PM+ and PM- are discussed.

Key Words: monoamine oxidase, brain, spontaneous nystagm, age.