

# AFERESI NELLE MALATTIE DEL SISTEMA NERVOSO CENTRALE

**Carlo Antozzi**

U.O. Neurologia IV – Neuroimmunologia e Patologia Muscolare, Fondazione Istituto Neurologico C. Besta, Milano

## Plasmapheresis in central nervous system disorders

*Therapeutic plasmapheresis (TPE) has an established role in disorders of the peripheral nervous system, but its use in disorders of the central nervous system (CNS) does not rely upon evidence-based data. Nevertheless, TPE is currently used in severe acute forms of demyelinating disease (multiple sclerosis/acute encephalomyelitis) unresponsive to corticosteroids. Recently, antibodies against the water channel aquaporin-4 have been detected in patients affected by neuromyelitis optica (Devic syndrome) and their pathogenetic role has been demonstrated, supporting the use of TPE in this disease.*

*TPE has been reported to be effective in some patients affected by stiff-person syndrome or limbic encephalitis associated with antibodies against voltage-gated potassium channels. TPE has also been used in selected patients with treatment-resistant epilepsy or status epilepticus within complex syndromes of various etiologies. The available data still do not support the use of TPE in most paraneoplastic disorders of the CNS.*

Conflict of interest: None

Financial support: The author received no financial support for the preparation of this article.

## KEY WORDS:

Autoimmunity,  
Plasmapheresis,  
Central nervous  
system

## PAROLE CHIAVE:

Autoimmunità,  
Plasmaferesi,  
Sistema nervoso  
centrale

## Indirizzo degli Autori:

Dr. Carlo Antozzi  
U.O. Neurologia IV – Neuroimmunologia e Patologia Muscolare  
Fondazione Istituto Neurologico  
C. Besta  
Via Celoria 11  
20133 Milano  
e-mail: antozzi@istituto-besta.it

## INTRODUZIONE

L'afèresi terapeutica ha un ruolo riconosciuto in varie patologie immunomediata del sistema nervoso periferico, in particolare nelle canalopatie autoimmuni e in alcune polineuropatie acquisite (1, 2). In queste patologie, i meccanismi patogenetici sono conosciuti molto meglio rispetto alle malattie autoimmuni del sistema nervoso centrale; basti pensare alle canalopatie autoimmuni nelle quali sono noti con precisione sia il bersaglio del processo autoimmune che le caratteristiche degli autoanticorpi specifici coinvolti in ciascuna patologia appartenente a questo gruppo. Un ulteriore fattore di cruciale importanza è il comportamento dell'organo bersaglio, come, per esempio, la giunzione neuromuscolare, una volta attaccata da autoanticorpi specifici; anche se facilmente accessibile alle immunoglobuline circolanti, presenta, comunque, possibilità riparative in relazione ai diversi meccanismi d'azione degli anticorpi in causa, spiegando il miglioramento clinico osservabile dopo il trattamento afereti-

co in una parte dei pazienti trattati.

Il quadro è, invece, molto più complesso a livello del sistema nervoso centrale, in parte per la complessità patogenetica delle malattie autoimmuni che possono coinvolgerlo (con interessamento contemporaneo sia dell'immunità umorale che di quella cellulo-mediata), e, in parte, per la diversa capacità di recupero intrinseca al tessuto nervoso. Inoltre, alcuni autoanticorpi descritti fino a oggi non hanno un chiaro ruolo patogenetico e in molte condizioni rappresentano soltanto un *marker* diagnostico.

Non disponiamo di Linee Guida, percorsi terapeutici o casistiche sufficientemente ampie o di dati basati sull'evidenza e, pertanto, la decisione di effettuare un trattamento aferetico in patologie del sistema nervoso centrale si basa essenzialmente su considerazioni di tipo patogenetico e sui risultati ottenuti con la terapia farmacologica nelle singole patologie. Inoltre, in alcuni casi, la decisione di effettuare un trattamento aferetico tradizionale o selettivo può rappresentare un momento di ricerca, soprattutto nei casi in cui si pre-

suppone sussista un'eziologia disimmune.

L'ASFA ha evidenziato le seguenti patologie del SNC e il relativo grado di evidenza in merito al trattamento aferetico tradizionale, sulla base delle esperienze riportate in letteratura (3):

Encefalomielite acuta disseminata	III
Sclerosi Multipla (SM):	
Demielinizzazione acuta	II
Sindrome di Devic	III
SM cronico-progressiva	III
Sindromi Paraneoplastiche	III
Encefalite di Rasmussen	II
Sindrome dell'uomo rigido	III
PANDAs	I
Sclerosi laterale amiotrofica	IV

## MALATTIE DEMIELINIZZANTI E SCLEROSI MULTIPLA

La sclerosi multipla (SM) è una malattia multifocale del SNC caratterizzata da un processo infiammatorio cronico, da demielinizzazione, da danno assonale e, infine, da gliosi (4). Si ritiene che, in un contesto di suscettibilità genetica, cellule T autoreattive vengano attivate, entrino nel SNC e determinino il danno tissutale mediante il rilascio di citochine infiammatorie, la stimolazione di linfociti B e macrofagi e l'attivazione del sistema del complemento. La letteratura disponibile in merito all'uso della plasmateresi nel trattamento della SM, di non recente pubblicazione, non ha evidenziato un significativo vantaggio sul profilo clinico, in particolare per quanto concerne le forme progressive. Bisogna tenere, peraltro, conto dei considerevoli progressi nel trattamento immunomodulante della SM nel corso degli ultimi dieci anni e della recente introduzione di farmaci biologici altamente efficaci dal punto di vista clinico e neuroradiologico, quali il Natalizumab.

La plasmateresi può, invece, essere considerata nel trattamento delle riacacerbazioni della SM. Lo studio più ampio sull'effetto dell'afesi nelle forme acute di demielinizzazione risale al 1993 (5), con il riscontro di un miglioramento nei pazienti trattati con afesi rispetto al gruppo di controllo. Successivamente, Weinshenker ha dimostrato l'effetto favorevole del trattamento aferetico in pazienti affetti da forme di demielinizzazione acuta non responsiva al trattamento steroideo endovenoso ad alte dosi (6). I pazienti sottoposti al trattamento plasmatico hanno mostrato un grado di disabilità minore rispetto ai pazienti sottoposti a "sham" plasmateresi. Pur trattandosi di uno studio con un numero limitato di pazienti, la plasmateresi è considerata un presidio terapeutico indicato in pazienti con forme gravi fulminanti

di demielinizzazione del sistema nervoso centrale dopo il fallimento del trattamento steroideo. A tale proposito, è importante sottolineare l'osservazione di Keegan et al., che hanno riesaminato l'andamento della malattia in 19 pazienti sottoposti a plasmateresi. Gli stessi pazienti erano stati sottoposti a una biopsia cerebrale prima del trattamento (7). Gli Autori hanno osservato una correlazione tra l'effetto favorevole della plasmateresi e uno specifico *pattern* di demielinizzazione, come descritto da Lucchinetti et al., vale a dire il *pattern* tipo II caratterizzato da demielinizzazione anticorpo-mediata e da deposizione di complemento (8). Tale osservazione pone l'accento sulla potenziale eterogeneità dei meccanismi patogenetici nelle diverse forme di malattia e pone le basi razionali per la possibile applicazione ed efficacia dell'afesi in forme di demielinizzazione acuta non responsiva al trattamento steroideo. A questo riguardo, abbiamo avuto l'opportunità di sottoporre una paziente con tali caratteristiche all'immunoassorbimento selettivo delle IgG mediante proteina A; la paziente aveva presentato due gravi ricadute cliniche a distanza di sei mesi l'una dall'altra, senza risposta al trattamento cortisonico. In entrambe le occasioni, la paziente ha mostrato un marcato miglioramento del quadro clinico. L'effetto della rimozione selettiva delle IgG conferma indirettamente il possibile ruolo dell'immunità umorale in pazienti selezionati, come suggerito dall'esperienza di Keegan, utilizzando la plasmateresi tradizionale. Inoltre, il recente riscontro di efficacia dopo il trattamento con rituximab nella sclerosi multipla ha riaperto il possibile ruolo dei linfociti B nella patogenesi della malattia (9) e rinforza il potenziale ruolo dell'afesi quale presidio terapeutico aggiuntivo in casi selezionati. Purtroppo, non disponiamo ancora di parametri predittivi della risposta clinica alle diverse forme di terapia e, pertanto, il trattamento steroideo ad alte dosi costituisce il trattamento di attacco delle forme di demielinizzazione acuta, sia essa nel contesto della SM o dell'encefalomielite acuta disseminata (ADEM); una volta verificata l'assenza di risposta clinica, è possibile far seguire un ciclo di trattamento aferetico.

Nel corso degli ultimi anni è stata dedicata sempre più attenzione alla neuromielite ottica di Devic con importanti riscontri dal punto di vista patogenetico (10). Si tratta dell'associazione di neurite ottica e mielite trasversa con un esteso interessamento del midollo spinale (>3 segmenti vertebrali). Le lesioni infiammatorie a carico del SNC sono caratterizzate da perdita di astrociti, infiltrato di cellule T, macrofagi, microglia e deposizione di immunoglobuline e frammenti del complemento sui processi astrocitari della glia perivascolare, interessamento di sostanza

grigia e bianca e, quale reperto caratteristico, perdita di canali per l'acqua. È stata, infatti, descritta la presenza di anticorpi anti-AQP4 (aquaporina), ovvero contro il canale dell'acqua espresso sui processi della glia perivascolare. Gli anticorpi anti-AQP4 sono rilevanti dal punto di vista patogenetico, peggiorano la malattia sperimentale e inducono lesioni analoghe a quelle osservate nell'uomo. Non disponiamo di Linee Guida o studi controllati sul trattamento della malattia di Devic. Il riscontro di un meccanismo patogenetico umorale ha, comunque, rivalutato il ruolo dell'aferesi in questa malattia, senza, ovviamente, prescindere dall'uso indiscusso di steroidi e immunosoppressori.

### SINDROME DELL'UOMO RIGIDO

La sindrome dell'uomo rigido (*Stiff Person Syndrome*, SPS) è caratterizzata da rigidità muscolare e spasmi della muscolatura assiale e degli arti. Esistono anche forme atipiche, asimmetriche o monoartuali. La malattia si associa alla presenza di anticorpi anti-GAD (*glutamic acid decarboxylase*) o anti-amfifisina. È stata dimostrata la sintesi intratecale degli anticorpi anti-GAD, anticorpi che si ritiene agiscono su interneuroni inibitori intracorticali e midollari; gli anticorpi anti-amfifisina sono stati, invece, osservati in forme di SPS paraneoplastica. Il trattamento della malattia prevede l'utilizzo di farmaci antiepilettici e benzodiazepine. Utile il trattamento con immunoglobuline a scadenza periodica in associazione a steroidi e immunosoppressori. Non sono disponibili studi controllati sull'uso della plasmateresi nella SPS, ma è disponibile solo la descrizione di singoli casi con una risposta apparentemente favorevole.

### SINDROMI PARANEOPLASTICHE

Le sindromi paraneoplastiche rappresentano un complesso ed eterogeneo gruppo di malattie del sistema nervoso centrale e periferico; dal punto di vista clinico, le forme centrali si presentano come encefalomieliti, encefalite limbica o del tronco cerebrale, degenerazione cerebellare e sindrome opsoclonomiocloni (11). Sono state descritte numerose immunoreattività in associazione con tali patologie, ma la loro presenza riveste, a oggi, un ruolo di notevole utilità dal punto di vista diagnostico, non essendo stata dimostrata la loro patogenicità. I casi descritti trattati con plasmateresi o immunoadsorbimento non hanno presentato alcun miglioramento dal punto di vista clinico. Uno studio prospettico effettuato da Vernino, utilizzando un ciclo di aferesi associato a

ciclofosfamide per sei mesi, non è stato in grado di evidenziare un effetto direttamente imputabile allo scambio plasmatico (12).

### ENCEFALOPATIE DISIMMUNI ASSOCIATE AD ANTICORPI ANTI-VGKC E ANTI-NMDA

Nell'ambito delle encefalopatie disimmuni (di possibile origine anche paraneoplastica), è importante ricordare le forme di encefalite limbica associate ad anticorpi contro il canale del potassio voltaggio-dipendente (VGKC) (13) e una patologia paraneoplastica di recente descrizione, l'encefalite associata ad anticorpi anti-N-methyl-D-aspartato (NMDA) (14). Gli anticorpi anti-VGKC sono responsabili della neuromiotonia acquisita, patologia periferica che presenta una chiara risposta al trattamento aferetico tradizionale. Gli stessi anticorpi sono stati descritti in associazione a quadri di encefalite limbica (senza attività neuromiotonica periferica). Il ruolo di tali anticorpi non è ancora chiarito nella genesi del danno al sistema limbico documentato dalla risonanza magnetica cerebrale. Il trattamento prevede l'uso di steroidi endovenosi ad alte dosi, mentre il ruolo della plasmateresi non è ancora chiarito. Dal punto di vista patogenetico, non è stata descritta una sintesi intratecale degli anticorpi anti-VGKC, che sono comunque presenti nel *liquor*. È, comunque, ipotizzabile l'uso dello scambio plasmatico in pazienti con esordio recente della malattia, condizione, peraltro, di rara osservazione, dato l'esordio generalmente subacuto della patologia (15). Di più recente descrizione è, invece, l'encefalite associata ad anticorpi anti-NMDA; ne sono stati descritti oltre cento casi in letteratura, con un esordio sia in età pediatrica che in età adulta. I casi inizialmente descritti riguardavano giovani donne con teratoma ovarico ma, più recentemente, è stata descritta anche in soggetti di sesso maschile e in età pediatrica. La malattia è caratterizzata da disturbi psichiatrici (psicosi acuta o subacuta), epilessia, movimenti involontari, discinesie, disautonomia e ipoventilazione; la risonanza magnetica cerebrale è, generalmente, non informativa come la rachicentesi, che può mostrare pleiocitosi o la presenza di bande oligoclonali, in alcuni casi. Le casistiche riportate hanno evidenziato la risposta favorevole oltre che alla rimozione del teratoma ovarico, se presente, al trattamento con steroidi e immunoglobuline; la presenza di tali autoanticorpi potrebbe rappresentare il razionale per l'applicazione dell'aferesi terapeutica.

### EPILESSIA FARMACO-RESISTENTE, ENCEFALITE DI RASMUSSEN

Il ruolo dell'autoimmunità nell'epilessia è ancora ampiamente dibattuto. È stata, infatti, riportata (ma di-

scussa e, talora, negata) l'associazione tra epilessia e anticorpi anti-VGKC, anti-GAD e contro diverse subunità del recettore del glutammato. Del resto, è nota da tempo l'osservazione clinica dell'efficacia delle immunoglobuline endovenose ad alte dosi in alcune forme di epilessia pediatrica, e sono stati descritti singoli casi di risposta dello stato di male epilettico al trattamento con plasmateresi. Pertanto, l'afèresi terapeutica è stata utilizzata nel trattamento di pazienti selezionati affetti da epilessia/stato di male farmaco-resistente, nel contesto di sindromi di varia complessità ma con risultati contrastanti e spesso non facilmente documentabili, data la concomitanza di farmaci antiepilettici e immunomodulanti.

Una considerazione a parte merita l'Encefalite di Rasmussen (16). Si tratta di un'encefalopatia infiammatoria cronica uniemisferica, caratterizzata, dal punto di vista clinico, da epilessia farmaco-resistente, polimorfismo delle crisi, frequente epilessia parziale continua e *deficit* neurologico e cognitivo progressivo, in relazione con l'emisfero coinvolto. La patogenesi della malattia è complessa e ancora sconosciuta solo in parte. Non è noto l'evento scatenante. Dal punto di vista neuropatologico, la malattia è caratterizzata dalla presenza di linfociti T citotossici CD3+CD8+, dall'attivazione della microglia e degli astrociti e, infine, da degenerazione astrocitaria e perdita neuronale. Nel corso di studi condotti su un modello animale nel coniglio immunizzato con frammenti ricombinanti del recettore 3 del glutammato (GluR3) era stata osservata la comparsa di episodi critici e di alterazioni istopatologiche encefaliche, paragonabili a quelle osservate nell'uomo. Pertanto, era stato ipotizzato un ruolo patogenetico dell'immunità umorale (oltre che di quella cellulare) da parte degli anticorpi antiGluR3. Tale osservazione è stata successivamente messa in discussione, in quanto la presenza di tali anticorpi è stata osservata soprattutto in pazienti affetti da varie forme di epilessia, specialmente se farmaco-resistente. Inoltre, con l'utilizzo di varie metodiche, la loro reale incidenza è stata messa in discussione. Rimane, pertanto, certa la presenza di un chiaro quadro infiammatorio a carico dell'emisfero cerebrale coinvolto, mentre il ruolo dell'immunità umorale è un problema ancora aperto. L'unico presidio terapeutico in grado di interrompere la fenomenologia critica è rappresentato dall'emisferotomia funzionale, intervento indispensabile in molti casi, con le ovvie cautele in caso di coinvolgimento dell'emisfero dominante. Per una trattazione dettagliata si rimanda al *Consensus Europeo* sulla malattia (16). Nel complesso *iter* che porta, in ultima istanza, al ricorso alla neurochirurgia, i pazienti vengono trattati con steroidi e immunoglobuline endovenose a scadenza periodica. Nella nostra esperienza, l'afèresi terapeutica non ha modificato significativamente l'anda-

mento della malattia. Pertanto, la plasmateresi rimane un presidio terapeutico da prendere in considerazione in alternativa alle immunoglobuline endovenose ad alte dosi, per tentare di interrompere lo stato di male epilettico. È stato, infine, segnalato l'utilizzo dell'immunoassorbimento delle IgG circolanti in singoli pazienti selezionati, e tale procedura può essere associata al trattamento immunomodulante cronico nei pazienti che, per tipologia della malattia e per interessamento dell'emisfero dominante, non possono ancora essere sottoposti al trattamento chirurgico (17).

## SINDROMI "PANDA"

Infine, ricordiamo i dati della letteratura in merito al capitolo "PANDAS" (*Pediatric Autoimmune Neuropsychiatric Disorders Associated with Streptococcal infections*). Si tratta di forme a esordio acuto con disturbo ossessivo-compulsivo o tic, con decorso spesso fluttuante, disturbi vari del movimento e una relazione temporale con una pregressa infezione streptococcica. La classificazione clinica di queste forme è molto complessa ed è ancora oggetto di discussione tra gli specialisti in materia. Sono stati descritti anticorpi diretti contro i gangli della base in grado di legare *targets* neuronali nello striato, ma non disponiamo di dati a sostegno della loro patogenicità. Uno studio clinico ha valutato l'efficacia delle immunoglobuline e della plasmateresi con il riscontro di un miglioramento del quadro psichiatrico soprattutto nei pazienti trattati con plasmateresi (18). Data la mancanza di studi controllati, l'ente americano NIH ha consigliato la terapia immunomodulante soltanto in bambini con forme acute gravi.

## RIASSUNTO

*L'afèresi terapeutica ha un ruolo riconosciuto in alcune patologie del sistema nervoso periferico, mentre il quadro è più complesso a livello del sistema nervoso centrale (SNC) per la complessità delle patologie che lo coinvolgono e per la limitata capacità di recupero intrinseca al tessuto nervoso stesso. Non disponiamo di dati basati sull'evidenza e la decisione di effettuare un trattamento aferetico in patologie del SNC si basa essenzialmente su considerazioni di tipo patogenetico e sui risultati ottenuti con la terapia farmacologica, se prevista, nelle singole patologie. L'afèresi terapeutica viene utilizzata nel trattamento delle forme acute e gravi della malattia demielinizzante (sclerosi multipla/encefalomielite acuta), in caso di mancata risposta al trattamento steroideo; il recente riscontro di efficacia dopo il trattamento con rituximab nella sclerosi multipla ha riaperto il possibile ruolo dei linfociti B nella patogenesi della malattia e rinforza il potenziale ruolo dell'afèresi quale presidio terapeutico*

aggiuntivo in casi selezionati. Più recenti sono il riscontro di anticorpi anti-aquaporina nella neuromielite ottica di Devic e la dimostrazione del loro ruolo patogenetico, supportando, quindi, in modo più consistente l'utilizzo dello scambio plasmatico in questa patologia. Esistono, infine, segnalazioni di efficacia in casi isolati di Stiff Person Syndrome e nell'encefalite limbica associata ad anticorpi anti-canale del potassio. L'aferesi terapeutica è stata utilizzata anche nel trattamento di pazienti selezionati affetti da epilessia/stato di male farmaco-resistente nel contesto di sindromi di varia complessità, ma con risultati contrastanti. Ricordiamo, infine, l'ampio capitolo della malattie paraneoplastiche, nell'ambito delle quali l'aferesi terapeutica non ha, per il momento, assunto un ruolo terapeutico.

#### DICHIARAZIONE DI CONFLITTO DI INTERESSI

Gli Autori dichiarano di non avere conflitto di interessi.

#### CONTRIBUTI ECONOMICI AGLI AUTORI

Gli Autori non hanno ricevuto sponsorizzazioni economiche per la preparazione dell'articolo.

#### BIBLIOGRAFIA

1. Lehman Hc, Hartung HP, Hetzel GR, Stuve O, Kieseier BC. Plasma Exchange in neuroimmunological disorders: Part 1: rationale and treatment of inflammatory central nervous system disorders. Arch Neurol 2006; 63: 930-5.
2. Lehman Hc, Hartung HP, Hetzel GR, Stuve O, Kieseier BC. Plasma Exchange in neuroimmunological disorders: Part 2: treatment of neuromuscular disorders. Arch Neurol 2006; 63: 1066-71.
3. Szczepiorkowski ZM, Winters JL, Bandarenko N, et al. Apheresis Applications Committee of the American Society for Apheresis Guidelines on the use of therapeutic apheresis in clinical practice--evidence-based approach from the Apheresis Applications Committee of the American Society for Apheresis. J Clin Apher 2010; 25: 83-177.
4. Ramagopalan SV, Dobson R, Meier UC, Giovannoni G. Multiple sclerosis: risk factors, prodromes, and potential causal pathways. Lancet Neurol 2010; 9: 727-39.
5. Rodriguez M, Karnes WE, Bartleson JD, Pineda AA. Plasmapheresis in acute episodes of fulminant CNS inflammatory demyelination. Neurology 1993; 6: 1100-4.
6. Weinschenker BG, O'Brien PC, Petterson TM, et al. A randomized trial of plasma exchange in acute central nervous system inflammatory demyelinating disease. Ann Neurol 1999; 46: 878-86.
7. Keegan M, König F, McClelland R, et al. Relation between humoral pathological changes in multiple sclerosis and response to therapeutic plasma exchange. Lancet 2005; 366: 579-82.
8. Lassmann H, Brück W, Lucchinetti CF. The immunopathology of multiple sclerosis: an overview. Brain Pathol 2007; 17: 210-8.
9. Hauser HL, Waubant E, Arnold DL, et al. B cell depletion with rituximab in relapsing-remitting multiple sclerosis. New Engl J Med 2008; 358: 676-88.
10. Wingerchuk DM, Lennon VA, Lucchinetti CF, Pittock SJ, Weinschenker BG. The spectrum of neuromyelitis optica. Lancet Neurol 2007; 6: 805-15.
11. Dalmau J, Rosenfeld MR. Paraneoplastic syndromes of the CNS. Lancet Neurol 2008; 7: 327-40.
12. Vernino S, O'Neill BP, Marks RS, O'Fallon JR, Kimmel DW. Immunomodulatory treatment trial for paraneoplastic neurological disorders. Neuro Oncol 2004; 6: 55-62.
13. Rueff L, Graber JJ, Bernbaum M, Kuzniecky RI. Voltage-gated potassium channel antibody-mediated syndromes: a spectrum of clinical manifestations. Rev Neurol Dis 2008; 5: 65-72.
14. Dalmau J, Lancaster E, Martinez-Hernandez E, Rosenfeld MR, Balice-Gordon R. Clinical experience and laboratory investigations in patients with anti-NMDAR encephalitis. Lancet Neurol 2011; 10: 63-74.
15. Wong SH, Saunders MD, Larner AJ, Das K, Hart IK. An effective immunotherapy regimen for VGKC antibody-positive limbic encephalitis. J Neurol Neurosurg Psychiatry 2010; 81: 1167-9.
16. Bien CG, Granata T, Antozzi C, et al. Pathogenesis, diagnosis and treatment of Rasmussen encephalitis: a European consensus statement. Brain 2005; 128: 454-71.
17. Antozzi C, Granata T, Aurisano N, et al. Long-term selective IgG immuno-adsorption improves Rasmussen's encephalitis. Neurology 1998; 51: 302-5.
18. Perlmutter SJ, Leitman SF, Garvey MA, et al. Therapeutic plasma exchange and intravenous immunoglobulin for obsessive-compulsive disorder and tic disorders in childhood. Lancet 1999; 354: 1153-8.