

# 活血解毒方对干燥综合征小鼠干扰素- $\gamma$ 、B 细胞活化因子及其受体的干预作用研究

史云晖 柳洋 韦尼 刘小平 朱跃兰

**【摘要】** 目的 探索活血解毒方对干燥综合征小鼠干扰素(interferon, IFN)- $\gamma$ 、B 细胞活化因子(B cell activating factor belonging to the TNF family, BAFF)及其受体 BAFF-R 的影响及其机制。方法 以 C57BL/6j 小鼠及 NOD/Ltj 小鼠为实验动物,分别以蒸馏水、白芍总苷混悬液、活血解毒方汤剂灌胃干预,干预过程中观察小鼠一般状态,于干预 60 天后测量小鼠唾液流率,并取小鼠颌下腺及血清,测量颌下腺指数及血清中 BAFF、BAFF-R、IFN- $\gamma$  及颌下腺 BAFF、BAFF-R 水平。**结果** 正常组唾液流率均较其他各组高( $P<0.05$ ),实验第 40 天开始,对照组及治疗组的唾液流率开始较模型组升高( $P<0.05$ ),而对照组与治疗组之间差异不明显( $P>0.05$ );第 60 天对照组与治疗组之间差异明显( $P<0.05$ )。颌下腺指数,正常组较模型组、对照组、治疗组高( $P<0.05$ )。模型组较对照组、治疗组低( $P<0.05$ ),对照组与治疗组之间差异不明显( $P>0.05$ )。血清 BAFF、BAFF-R、IFN- $\gamma$  及颌下腺 BAFF、BAFF-R 水平,正常组均较模型组、对照组、治疗组低( $P<0.05$ ),模型组较对照组、治疗组高( $P<0.05$ ),其中对照组水平高于治疗组( $P<0.05$ ),各组之间比较,差异具有统计学意义( $P<0.05$ )。**结论** 活血解毒方可减轻 NOD 小鼠颌下腺炎症,增加唾液分泌量,降低血清中 BAFF、BAFF-R、IFN- $\gamma$  及颌下腺 BAFF、BAFF-R 的水平,从而达到治疗干燥综合征的作用。

**【关键词】** 干燥综合征; B 细胞活化因子; 干扰素; 中医; 活血解毒

**【中图分类号】** R285.5 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2016.01.005

---

基金项目:北京中医药大学校级自主课题(2014-JYBZZ-XS-147)

作者单位:100029 北京中医药大学研究生院[史云晖(博士研究生)、柳洋(硕士研究生)];北京中医药大学东方医院风湿病科(韦尼、刘小平、朱跃兰)

作者简介:史云晖(1989-),女,2013 级在读博士研究生。研究方向:中医药治疗风湿免疫病。E-mail: syh890501@163.com

通讯作者:朱跃兰(1959-),女,博士,主任医师,博士生导师。研究方向:中医药治疗风湿免疫病。E-mail: zhuyuelanting@163.com

**Effect of *Huoxue Jiedu* formula on IFN- $\gamma$  and BAFF/BAFF-R in NOD mice with Sjögren's syndrome** SHI Yun-hui, LIU Yang, WEI Ni, et al. Graduate School of Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

Corresponding author: ZHU Yue-lan, E-mail: zhuyuelanting@163.com

**【Abstract】 Objective** To observe the effect of *Huoxue Jiedu* formula on BAFF/BAFF-R in NOD mice and explore the mechanism of *Huoxue Jiedu* formula to Sjögren's syndrome. **Methods** C57BL/6j mice and NOD/Ltj mice were used for research. The mice were intervened with water, total glucosides of peony and *Huoxue Jiedu* formula respectively. The general status was observed. After 60 days of intervention, the flow rate of saliva, index of submandibular gland, BAFF, BAFF-R and IFN- $\gamma$  in serum and BAFF, BAFF-R in salivary gland were tested. **Results** One-way ANOVA was used for statistical analysis. When compared between two groups, LSD was used. The flow rate of saliva of the normal group was higher than other groups in every time point ( $P < 0.05$ ). Since the 40<sup>th</sup> day, the flow rates of saliva of control group and treatment group was higher than that in model group. There was no significant difference between control group and treatment group at that time ( $P > 0.05$ ). At the 60<sup>th</sup> day, the flow rate in treatment group was significantly higher than that in control group ( $P < 0.05$ ). The index of submandibular gland of the normal group was the highest ( $P < 0.05$ ) while that was the lowest of the model group ( $P < 0.05$ ). There was no significant difference between the treatment group and control group ( $P > 0.05$ ). As for BAFF, BAFF-R and IFN- $\gamma$  in serum and BAFF, BAFF-R in salivary gland, the normal group was the lowest ( $P < 0.05$ ), the model group was the highest ( $P < 0.05$ ), the treatment group was significantly lower than the control group ( $P < 0.05$ ). **Conclusions** *Huoxue Jiedu* formula can alleviate the inflammation of salivary gland, increase saliva and reduce BAFF, BAFF-R and IFN- $\gamma$  in serum and BAFF, BAFF-R in salivary gland.

**【Key words】** Sjögren's syndrome; B cell activating factor belonging to the TNF family; Interferon; Traditional Chinese medicine; *Huoxue Jiedu*

干燥综合征是一种以侵犯泪腺、唾液腺等外分泌腺体为主,以口腔或眼干燥为主要表现的慢性自身免疫性疾病。其主要病理表现是外分泌腺体的灶性淋巴浸润。各种细胞因子和炎症递质造成组织损伤,其中在 T 辅助细胞的作用下, B 淋巴细胞功能异常,产生多种自身抗体、多克隆免疫球蛋白以及免疫复合物,致使唾液腺和泪腺等组织发生炎症和破坏性病变。近年来应用利妥昔单抗进行 B 细胞损耗治疗取得良好疗效<sup>[1-2]</sup>。这使得 B 细胞在干燥综合征发病中的重要地位越来越受到关注。研究发现干燥综合征患者的血清及靶器官中的 B 细胞活化因子(B cell activating factor belonging to the TNF family, BAFF)水平升高<sup>[3-4]</sup>。BAFF/BAFF-R 在干燥综合征发病中有着关键的作用。BAFF 的表达受到干扰素(interferon, IFN)- $\gamma$ 、白细胞介素(interleukin, IL)-10、IL-4 等细胞因子的调控,有研究表明 IFN- $\gamma$  处理单核细胞可增加 BAFF 表达。同时, IFN- $\gamma$  又受到 Toll 样受体等调节。

干燥综合征的中医病机离不开瘀毒,临床应用活血解毒方治疗干燥综合征疗效确切<sup>[5]</sup>,但其作用机制尚不明确,目前相关基础研究较少。本课题组前期发

现,活血解毒方对 NOD 小鼠的血清及颌下腺的 Toll 样受体有一定的干预作用<sup>[6]</sup>。本研究拟用活血解毒方干预干燥综合征模型小鼠,测量其唾液流率、颌下腺指数,测定其血清及颌下腺 BAFF/BAFF-R 水平、血清 IFN- $\gamma$  水平,从 IFN- $\gamma$ /BAFF/BAFF-R 信号通路的角度分析干燥综合征的作用机理及活血解毒方的作用途径,为干燥综合征的中医药治疗提供基础研究依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

C57BL/6j 小鼠 10 只,雌性,体质量 16 ~ 18 g; NOD/Ltj 小鼠 30 只,雌性,体质量 16 ~ 18 g。均由北京华阜康生物科技股份有限公司提供,许可证号:SCSY(京)2014-004。饲养于中国中医科学院中药研究所的屏障环境中,恒温恒湿,水瓶给水,自由进食。

### 1.2 材料及仪器

帕夫林胶囊(主要成分为白芍总甙,300 mg/粒,由宁波立华制药有限公司生产,生产批号:121204 EXP2014-11);活血解毒方(丹参 30 g、连翘 15 g、川

表 1 各组小鼠唾液流量比较( $\bar{x}\pm s$ ,mg/min)

组别	n	第 0 天	第 20 天	第 40 天	第 60 天
正常组	9	15.53±1.37	16.07±1.22	16.62±1.34	17.17±1.56
模型组	8	4.25±0.28 <sup>a</sup>	4.56±0.43 <sup>a</sup>	4.70±0.32 <sup>a</sup>	4.86±0.28 <sup>a</sup>
对照组	8	4.56±0.35 <sup>ab</sup>	4.90±0.20 <sup>ab</sup>	6.07±0.25 <sup>ab</sup>	7.56±0.47 <sup>ab</sup>
治疗组	8	4.53±0.31 <sup>ab</sup>	4.78±0.24 <sup>ab</sup>	6.60±0.38 <sup>ab</sup>	8.37±0.29 <sup>abc</sup>

注：与正常组相比，<sup>a</sup> $P<0.05$ ；与模型组相比，<sup>b</sup> $P<0.05$ ；与对照组相比，<sup>c</sup> $P<0.05$ 。

芎 15 g、鸡血藤 20 g、玄参 20 g、甘草 10 g、生地黄 30 g、麦门冬 20 g、石斛 20 g、南沙参 15 g、北沙参 15 g、炒白芍 30 g,由北京中医药大学东方医院中药房提供)制成 200 mL 水煎剂。小鼠 BAFF 试剂盒(购自普博欣生物有限公司);小鼠 BAFF-R 试剂盒(购自普博欣生物有限公司);小鼠 IFN- $\gamma$  试剂盒(购自普博欣生物有限公司);酶标仪(Thermo 公司生产,型号 MK3)。

1.3 实验动物分组及给药

C57BL/6j 小鼠 10 只,作为正常组,NOD 小鼠 30 只,随机分为模型组、对照组、治疗组,每组各 10 只。正常组及模型组小鼠给予蒸馏水灌胃 10 mL/kg;对照组小鼠给予帕夫林胶囊制成的混悬液灌胃,根据小鼠与人的体表面积比值换算,予 234 mg/kg;中药组与活血解毒方中药煎剂灌胃,根据小鼠与人的体表面积比值换算将中药煎剂进行相应比例的浓缩,予 31.2 g/kg。每天给药 1 次,连续 60 天。

1.4 一般状态观察

观察小鼠精神状态、活动、饮水、摄食、睡眠状态。

1.5 唾液流量及颌下腺指数测定

唾液分泌量:于给药后动态测定小鼠唾液分泌量。测量前做好棉球称干重( $5.5\pm1.0$ ) mg。测唾液分泌时将干棉球放入实验用动物口颊内,3 分钟后取出称湿重。唾液分泌量(mg)=湿重(mg)-干重(mg)。

颌下腺指数:将小鼠摘眼球放血处死,取一侧颌下腺称重。颌下腺指数=颌下腺重量(mg)/小鼠体质量(g)。

1.6 BAFF、BAFF-R 及 IFN- $\gamma$  水平测定

血清 BAFF 及 BAFF-R 水平测定:眼眶取血,静置 1 小时后,以 3000 rpm 转速离心 10 分钟,分离血清,用酶联免疫吸附法测定 BAFF、BAFF-R、IFN- $\gamma$  水平;取小鼠一侧颌下腺,匀浆后用酶联免疫吸附法测定 BAFF 及 BAFF-R 水平;按试剂盒提供的操

作流程进行。

1.7 统计学处理

使用统计软件 SPSS 12.0 进行统计分析,所得数据以均数±标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示。经检验数据符合正态分布,方差齐。组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA),两两比较采用 LSD 法,以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 唾液流量

各时间点正常组与模型组、对照组、治疗组相比均有明显差异( $P<0.05$ );实验开始时及第 20 天时,模型组、对照组、治疗组之间无明显差异( $P>0.05$ );第 40 天模型组开始与对照组、治疗组出现明显差异( $P<0.05$ ),而对照组与治疗组之间差异不明显( $P>0.05$ );第 60 天对照组与治疗组之间差异明显( $P<0.05$ )。具体数值见表 1。

2.2 颌下腺指数

正常组与模型组、对照组、治疗组相比,差异显著( $P<0.05$ )。模型组与对照组、治疗组相比,差异显著( $P<0.05$ )。但对照组与治疗组之间差异不明显( $P>0.05$ )。具体数值见表 2。

表 2 各组小鼠颌下腺指数比较( $\bar{x}\pm s$ ,mg/g)

组别	n	颌下腺指数
正常组	9	5.53±0.74
模型组	8	4.06±0.53 <sup>a</sup>
对照组	8	4.81±0.25 <sup>ab</sup>
治疗组	8	4.89±0.66 <sup>ab</sup>

注：与正常组相比，<sup>a</sup> $P<0.05$ ；与模型组相比，<sup>b</sup> $P<0.05$ 。

2.3 血清 BAFF 及 BAFF-R 水平

正常组血清 BAFF 及 BAFF-R 含量较低,模型组血清 BAFF 及 BAFF-R 含量较高,对照组与治疗组血清 BAFF 及 BAFF-R 含量均低于模型组,其中治疗组的血清 BAFF 及 BAFF-R 含量又较对照组低,各组之间比较,差异具有统计学意义( $P<0.05$ )。具体数值见表 3。

表 3 各组小鼠血清 BAFF 及 BAFF-R 水平测定(  $\bar{x}\pm s$ , ng/L)

组别	n	血清 BAFF 水平	血清 BAFF-R 水平
正常组	9	1515.35±50.13	350.74±15.91
模型组	8	2474.32±98.77 <sup>a</sup>	611.02±26.69 <sup>a</sup>
对照组	8	2184.11±31.12 <sup>ab</sup>	545.08±18.70 <sup>ab</sup>
治疗组	8	1905.25±46.09 <sup>abc</sup>	434.96±36.70 <sup>abc</sup>

注:与正常组相比,<sup>a</sup> $P<0.05$ ;与模型组相比,<sup>b</sup> $P<0.05$ ;与对照组相比,<sup>c</sup> $P<0.05$ 。

2.4 颌下腺 BAFF 及 BAFF-R 水平

正常组颌下腺 BAFF 及 BAFF-R 含量较低,模型组颌下腺 BAFF 及 BAFF-R 含量较高,对照组与治疗组颌下腺 BAFF 及 BAFF-R 含量均低于模型组,其中治疗组的颌下腺 BAFF 及 BAFF-R 含量又较对照组低,各组之间比较,差异具有统计学意义( $P<0.05$ )。具体数值见表 4。

表 4 各组小鼠颌下腺 BAFF 及 BAFF-R 水平测定(  $\bar{x}\pm s$ , ng/mL)

组别	n	BAFF 水平	BAFF-R 水平
正常组	9	32.03±8.20	70.99±10.15
模型组	8	73.16±9.71 <sup>a</sup>	112.40±10.89 <sup>a</sup>
对照组	8	63.84±9.38 <sup>ab</sup>	92.98±12.24 <sup>ab</sup>
治疗组	8	47.53±8.16 <sup>abc</sup>	81.87±9.97 <sup>abc</sup>

注:与正常组相比,<sup>a</sup> $P<0.05$ ;与模型组相比,<sup>b</sup> $P<0.05$ ;与对照组相比,<sup>c</sup> $P<0.05$ 。

2.5 血清 IFN- $\gamma$  水平

正常组血清 IFN- $\gamma$  含量较低,模型组血清 IFN- $\gamma$  含量较高,对照组与治疗组血清 IFN- $\gamma$  含量均低于模型组,其中治疗组的血清 IFN- $\gamma$  含量又较对照组低,各组之间比较,差异具有统计学意义( $P<0.05$ )。见表 5。

表 5 各组小鼠血清 IFN- $\gamma$  水平测定(  $\bar{x}\pm s$ , ng/L)

组别	n	IFN- $\gamma$
正常组	9	33.56±11.11
模型组	8	93.22±14.01 <sup>a</sup>
对照组	8	62.85±14.53 <sup>ab</sup>
治疗组	8	50.23±13.94 <sup>abc</sup>

注:与正常组相比,<sup>a</sup> $P<0.05$ ;与模型组相比,<sup>b</sup> $P<0.05$ ;与对照组相比,<sup>c</sup> $P<0.05$ 。

3 讨论

BAFF 又叫 B 淋巴细胞激活因子( B-lymphocyte stimulator, BLyS),主要由单核细胞、树突状细胞、T 细胞、B 细胞和唾液腺上皮细胞分泌产生<sup>[7-8]</sup>,是肿

瘤坏死因子( tumor necrosis factor, TNF)家族中的一员,它能与 B 淋巴细胞特异性结合并诱导期增值、分化并分泌免疫球蛋白( immunoglobulin, Ig) G、IgA 和 IgM 等,在体液免疫中发挥着重要的作用。包括干燥综合征在内的许多自身免疫性疾病患者体内都有 BAFF 过表达的现象<sup>[4-5]</sup>。BAFF 有很强的 B 细胞趋向性,BAFF 可促进 B 细胞的增殖和分化,如果 BAFF 缺失,B 细胞将停留在 T1 阶段。BAFF 还能抑制 B 细胞的凋亡。如果不考虑受体的表达水平,BAFF 是 B 细胞 T2 阶段凋亡的主要阻力因素。BAFF 转基因小鼠的外分泌腺可以表达 T2 细胞,这同干燥综合征患者唾液腺中 B 细胞聚集相同<sup>[9]</sup>。由于新形成的 B 细胞依赖于 BAFF,研究人员推测,在细胞聚集区及其周围细胞可产生大量的 BAFF。有研究证明,BAFF 的异常表达不仅存在于上皮细胞及活化的 T 淋巴细胞,还存在于正常唾液腺分离出来的细胞及从干燥综合征患者唾液腺中分离出来的受 B 细胞浸润的唾液腺细胞<sup>[10]</sup>。体外研究显示,用病毒或拮抗剂刺激 Toll 样受体可诱导干燥综合征唾液腺上皮细胞 BAFF mRNA 高表达,抑制 IFN 可抑制 BAFF 表达<sup>[11]</sup>。双链 RNA 病毒和单链 RNA 病毒感染都可促进 BAFF 的表达,双链 RNA 主要促进树突样细胞的 BAFF 表达,单链 RNA 促进单核细胞和唾液腺上皮细胞的 BAFF 表达,而阻断单核细胞的 IFN 受体,可抑制 BAFF 表达<sup>[12]</sup>。临床研究也发现,单核细胞表达 IFN 信号的患者亚群都具有较高的疾病活动指数及 BAFF mRNA 表达,阻碍 IFN 的表达或活性有望能使这类患者的病情得到改善<sup>[13]</sup>,干燥综合征患者的单核细胞比健康对照者的单核细胞在受到 IFN 刺激后更容易促进 BAFF 的表达和分泌增加<sup>[4,14]</sup>。

干燥综合征在中医古籍中并没有对应的病名,有医家认为按症、证当属“燥证”范畴,亦有医家认为其累及周身关节肌肉、关节疼痛、脏腑损害等而称为“周痹”“痹证”“脏腑痹”等。多数医家多遵从“燥盛则干”的病机理论,认为本病多因先天禀赋不足,阴津亏虚而发病,基本病机是血虚津亏。综合文献检索及临证经验,本研究认为燥痹初起即有燥毒存在,津伤日久,燥毒日盛,邪毒局部聚集,亦可成血瘀之弊,成燥瘀毒交杂之势,三者之间存在有机联系<sup>[15]</sup>。活血解毒方以丹参为君,凉血活血,川芎助君活血之功;玄参解毒凉血清热,连翘清热解毒,生地、麦门冬、石斛、沙参生津;鸡血藤活血养血

通络,生甘草调和诸药,诸药共奏活血解毒,养血生津之功能。本研究发现,经活血解毒方干预后,NOD 小鼠血清及颌下腺中 BAFF、BAFF-R 水平及血清 IFN- $\gamma$ 水平都有不同程度的降低。

由此可见,IFN- $\gamma$ 、BAFF、BAFF-R 在干燥综合症的发病中起着重要的作用,IFN/BAFF/BAFF-R 信号通路在调节 B 细胞稳态中起着重要的作用,以 B 细胞为靶点的治疗,也将成为治疗干燥综合症的一大突破点。目前中医药治疗干燥综合症的基础研究相对缺乏,IFN/BAFF/BAFF-R 在干燥综合症发病及治疗中的作用也属于该领域近年来兴起的新方向,这是本研究的创新点所在。本研究的结果显示活血解毒方可减轻 NOD 小鼠颌下腺炎症,增加唾液分泌量,这一作用机制可能是通过干预 IFN/BAFF/BAFF-R 信号通路而实现的,本研究的结果可为活血解毒方的作用机制提供一部分理论依据。

本研究仍有不足之处,本研究以 NOD 小鼠作为模型,有关研究发现,NOD 小鼠的颌下腺浸润灶的淋巴细胞以 T 细胞为主,并且颌下腺组织表达的多种促炎性因子,可模拟临床干燥综合症表现。但因体积较小,血清及颌下腺标本取材较少,对进行更深入的研究造成一定困难,IFN/BAFF/BAFF-R 上、下游的信号通路的影响以及活血解毒方对干燥综合症病灶中 B 细胞的作用还有待更进一步研究。

### 参 考 文 献

- [1] Cornec D, Saraux A, Devauchelle-Pensec V, et al. The future of B cell-targeted therapies in Sjögren's syndrome[J]. Immunotherapy, 2013, 5(6): 639-646.
- [2] St Clair EW, Levesque MC, Prak ET, et al. Rituximab therapy for primary Sjögren's syndrome: an open-label clinical trial and mechanistic analysis [J]. Arthritis Rheum, 2013, 65(4): 1097-1106.
- [3] Lavie F, Miceli-Richard C, Ittah M, et al. B-cell activating factor of the tumour necrosis factor family expression in blood monocytes and T cells from patients with primary Sjögren's syndrome[J]. Scand J Immunol, 2008, 67: 185-192.
- [4] Quartuccio L, Salvin S, Fabris M, et al. BLyS upregulation in Sjögren's syndrome associated with lymphoproliferative disorders, higher ESSDAI score and B-cell clonal expansion in the salivary glands[J]. Rheumatology (Oxford), 2013, 52(2): 276-281.
- [5] 朱跃兰, 韦尼, 侯秀娟. 活血解毒方治疗干燥综合症 63 例临床观察[J]. 北京中医药大学学报(中医临床版), 2010, 17(5): 1-3.
- [6] 钱荔, 侯秀娟, 刘小平, 等. 活血解毒方干预 NOD 小鼠自发性干燥综合症的机制研究[J]. 北京中医药, 2014, 33(6): 467-469.
- [7] Jonsson MV, Szodoray P, Jellestad S, et al. Association between circulating levels of the novel TNF family members APRIL and BAFF and lymphoid organization in primary Sjögren's syndrome [J]. J Clin Immunol, 2005, 25: 189-201.
- [8] Mariette X, Roux S, Zhang J, et al. The level of BLyS (BAFF) correlates with the titre of autoantibodies in human Sjögren's syndrome[J]. Ann Rheum Dis, 2003, 62: 168-171.
- [9] Groom J, Kalled SL, Cutler AH, et al. Association of BAFF/BLyS overexpression and altered B-cell differentiation with Sjögren's syndrome[J]. J Clin Invest, 2002, 109: 59-68.
- [10] Daridon C, Devauchelle V, Hutin P, et al. Aberrant expression of BAFF by B lymphocytes infiltrating the salivary glands of patients with primary Sjögren's syndrome[J]. Arthritis Rheum, 2007, 56: 1134-1144.
- [11] Ittah M, Miceli-Richard C, Gottenberg JE, et al. Viruses induce high expression of BAFF by salivary gland epithelial cells through TLR- and type-I IFN-dependent and -independent pathways[J]. Eur J Immunol, 2008, 38(4): 1058-1064.
- [12] Ittah M, Miceli-Richard C, Lebon P, et al. Induction of B cell-activating factor by viral infection is a general phenomenon, but the types of viruses and mechanisms depend on cell type[J]. Journal of Innate Immunology, 2011, 3(2): 200-207.
- [13] Zana Brkic, Naomi I Maria, Cornelia G van Helden-Meeuwse, et al. Prevalence of interferon type I signature in CD14 monocytes of patients with Sjögren's syndrome and association with disease activity and BAGG gene expression[J]. Ann Rheum Dis, 2013, 72: 728-735.
- [14] Yoshimoto K, Tanaka M, Kojima M, et al. Regulatory mechanism for the production of BAFF and IL-6 are impaired in monocytes of patients with primary Sjögren's syndrome [J]. Arthritis Res Ther, 2011, 13: R170.
- [15] 崔民英, 侯秀娟, 朱跃兰. 重视干燥综合症的毒邪辨治[J]. 中华中医药学刊, 2012, 30(5): 982-983.

(收稿日期: 2015-06-22)

(本文编辑: 蒲晓田)