

• 论著 •

活血解毒中药配伍对大鼠缺血后适应心肌组织的保护作用

张 蕾, 张大武, 刘剑刚, 王承龙, 史大卓

(中国中医科学院西苑医院, 北京 100091)

【摘要】目的 观察活血中药川芎、当归和解毒中药黄连有效组分配伍后处理联合缺血后适应(IPOC)干预对大鼠心肌缺血/再灌注(I/R)损伤后炎症因子和氧化应激的作用。方法 将 75 只 SD 大鼠按随机数字表法分为 5 组, 每组 15 只。①假手术组: 左冠状动脉(冠脉)前降支下穿线不结扎; ②I/R 组: 结扎左冠脉前降支致心肌缺血 30 min 后, 再灌注 1 h; ③IPOC 组: 结扎左冠脉前降支 30 min 后, 给予短暂再灌注 10 s, 再次缺血 10 s, 重复 3 次后持续再灌注 1 h; ④西药对照组: 连续灌胃福辛普利钠(0.9 mg/kg) 14 d 后行 IPOC; ⑤活血解毒组: 连续灌胃中药复方川芎胶囊(有效成分川芎嗪 3.20 mg/g、阿魏酸 1.73 mg/g) 0.40 g/kg 和黄连生物碱(0.16 g/kg) 2 ml, 14 d 后行 IPOC。假手术、I/R、IPOC 组连续 14 d 灌胃等量蒸馏水。实验结束后腹主动脉取血, 检测血清肌酸激酶同工酶(CK-MB)、肌钙蛋白 T(cTnT)、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、白细胞介素(IL-1 β 、IL-6)、高敏 C-反应蛋白(hs-CRP)水平; 取心肌组织, 光镜下观察其形态结构, 并计算大鼠左室梗死率。结果 与 I/R 组比较, IPOC 组大鼠血清 CK-MB 活性和 cTnT 含量显著降低, 左室梗死率显著下降, 氧化应激指标明显改善, 血清炎症因子 IL-1 β 、IL-6 和 hs-CRP 含量均显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。活血解毒中药预处理与 IPOC 联合作用可进一步降低大鼠左室梗死率和 CK-MB 活性, 并可升高血清 SOD 水平, 降低 IL-6 水平($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论 活血解毒中药配伍联合 IPOC 可显著减轻 I/R 所造成的炎症反应及氧化应激, 抑制心肌酶的释放, 减小动物心肌梗死面积, 保护心肌组织。

【关键词】 心肌梗死, 急性; 缺血/再灌注损伤; 缺血后适应; 活血解毒中药; 氧化应激; 炎症因子

中图分类号: R285.5; R256.2 文献标识码: A DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2010.03.002

Protective effect of Chinese herbs for activating blood circulation and detoxification (活血解毒) combined with ischemic postconditioning on rats ZHANG Lei, ZHANG Da-wu, LIU Jian-gang, WANG Cheng-long, SHI Da-zhuo. Department of Cardiology, Xiyuan Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100091, China

Corresponding author: LIU Jian-gang, Email: liujiangang2002@sina.com

【Abstract】 Objective To investigate the protective effect of Chinese herbs [rhizoma chuanxiong (川芎), radix angelicae sinensis (当归), rhizoma coptidis (黄连)] for activating blood circulation and detoxification (活血解毒, ABCD) associated with ischemic postconditioning (IPOC) on inflammatory factors and oxidative stress after myocardial ischemia/reperfusion (I/R) injury in rats. **Methods** Seventy-five Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into five groups (each, $n=15$): ① sham-operated group: a suture was penetrated around the left anterior descending coronary (LAD), but not tied; ② I/R group: ligation of the LAD leading to ischemia for 30 minutes followed by 1 hour reperfusion; ③ IPOC group: occlusion of the LAD for 30 minutes, followed by repetitive three times of alternate reperfusion 10 s and ischemia 10 s, and lasted 1 hour of reperfusion; ④ western medicine control group: pretreated with intragastric administration of fosiopril sodium for 14 days, 0.9 mg/kg, then treated with IPOC 2 hours after the final gavage; ⑤ ABCD group: pretreated with intragastric administration of 0.40 g/kg Fufang Chuanxiong capsule (复方川芎胶囊) which was composed of two constituents: ligustrazine (3.20 mg/g) and ferulic acid (1.73 mg/g), combined with 2 ml rhizoma coptidis alkaloids (黄连生物碱, 0.16 g/kg) for 14 days, then treated with IPOC 2 hours after the final gavage. Sham-operated, I/R and IPOC groups were given intragastric administration with equivalent distilled water for 14 days. After 60 minutes of reperfusion, blood was drawn from abdominal aorta and serum was separated, and the rat heart was taken. The serum levels of MB isoenzyme of creatine kinase (CK-MB), cardiac troponin T (cTnT), superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA), interleukin (IL-1 β , IL-6) and high sensitive-C reactive protein (hs-CRP) were detected. Under light microscope, the myocardial structures were observed, and the rate of myocardial infarct in the left ventricle was calculated. **Results** Compared with the I/R group, the serum CK-MB activity and cTnT levels decreased significantly, myocardial infarct rate reduced remarkably, index of oxidative stress improved and the levels of serum inflammatory cytokines IL-1 β , IL-6 and hs-CRP decreased obviously in IPOC group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared with I/R group, the myocardial infarct rate and CK-MB activity were further decreased significantly in ABCD group, the serum level of SOD increased remarkably, the serum level of IL-6 decreased obviously in ABCD group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** The combination of Chinese herbs for ABCD and IPOC can play an important role in the protection of myocardial tissues and reduction of the size of myocardial infarct by alleviating the inflammatory reaction and oxidative stress induced by I/R injury and inhibiting the release of myocardial enzymes.

【Key words】 Acute myocardial infarction; Ischemia/reperfusion injury; Ischemic postconditioning; Chinese medicine for activation of blood circulation and detoxification; Oxidative stress; Inflammatory factor

在急性心肌梗死(AMI)血管再通的同时,心肌缺血/再灌注(I/R)损伤所带来的微循环障碍问题日益凸显出来。如何既能保证再灌注治疗优势又能最大限度地减少再灌注损伤是目前研究的难点和热点^[1]。近年来研究表明,缺血后适应(IPOC)是一项能保护心肌、减少再灌注损伤的有效措施,且其操作简便,可控性强,有良好的应用前景^[2]。药物预处理和 IPOC 在相关临床观察中已有报道^[3]。本实验中以活血解毒中药的代表药物川芎、当归和黄连进行有效组分配伍,观察其与 IPOC 联合对动物 I/R 损伤心肌的保护作用。

1 材料与方方法

1.1 实验材料:复方川芎胶囊(有效成分川芎嗪 3.20 mg/g 和阿魏酸 1.73 mg/g),0.37 g/粒,批号:0802205,由山东凤凰制药股份有限公司生产;黄连(主要组分黄连生物碱),含生药 6.25 g/g,由北京同仁堂制药有限公司提供;福辛普利钠片(商品名:蒙诺),10 mg/粒,批号:0804087,由中美上海施贵宝制药有限公司生产。肌钙蛋白 T(cTnT)试剂盒由美国 RapidBio Lab 公司生产;肌酸激酶同工酶(CK-MB)试剂盒由北京中生北控生物科技股份有限公司提供;白细胞介素(IL-1 β 、IL-6)放射免疫试剂盒由北京北方生物技术公司生产;高敏 C-反应蛋白(hs-CRP)试剂盒由美国 E&E labs Inc. 公司生产;超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)试剂盒由南京建成科技有限公司生产;氯化硝基四氮唑兰(N-BT)由上海化学试剂厂生产。

1.2 动物分组和模型制备:SD 大鼠 75 只,雌雄兼用,体重 180~200 g,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,许可证号:SCXK(京)2007-0001。按随机数字表法分为假手术组、I/R 组、IPOC 组、西药对照组、中药活血解毒组 5 组,每组 15 只。乌拉坦腹腔注射麻醉大鼠,行气管插管,连接动物呼吸机(潮气量 20 ml/kg,呼吸频率 50 次/min)。穿线结扎左冠状动脉(冠脉)前降支以阻断左冠脉血流,30 min 后立即给予 3 次 10 s 的再灌注、缺血循环的 IPOC 操作。假手术组仅穿线、不结扎。

1.3 处理方法:西药对照组和中药活血解毒组大鼠每日灌胃福辛普利钠 0.9 mg/kg 或复方川芎胶囊(0.40 g/kg)加黄连生物碱 2 ml(0.16 g/kg),于末

次灌胃后 2 h 行 IPOC;其余 3 组每日灌胃等量蒸馏水。各组均连续灌胃 14 d。I/R 组和 IPOC 组于末次灌胃后 2 h 建立 I/R 损伤模型(缺血 30 min,持续再灌注 1 h)或行 IPOC。实验过程中因灌胃、结扎部位过高、出血过多等原因,各组大鼠均有死亡;其中假手术组 1 只、I/R 组 4 只、IPOC 组 2 只、西药对照组 2 只、活血解毒组 2 只。动物实验过程中严格遵守动物伦理学要求。

1.4 检测指标及方法:再灌注结束后,腹主动脉取血分离血清,检测各项指标;摘除大鼠心脏,随机取 5 只用 N-BT 染色观察心肌梗死面积,另取 5 只用中性甲醛水溶液保存,其余置-80℃冰箱冻存。

1.4.1 血清学检测指标:用放射免疫法测定血清中 IL-1 β 、IL-6、SOD 含量;用酶联免疫吸附法(ELISA)测定 hs-CRP 含量;用酶法测定 CK-MB 活性;用电化学发光法测定 cTnT 含量;用硫代巴比妥酸法测定 MDA 含量。

1.4.2 心肌梗死面积:采用 N-BT 法测量。左室梗死率(%)=心肌梗死面积/左室面积 \times 100%。

1.4.3 心肌组织病理学观察:心肌组织切片,苏木素-伊红(HE)染色,光镜下观察其形态结构。

1.5 统计学处理:使用 SPSS 14.0 软件处理数据,所有数据以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 *q* 检验,*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 活血解毒中药预处理联合 IPOC 对 I/R 大鼠心肌酶学和左室梗死率的影响(表 1):与假手术组比较,I/R 组 CK-MB 活性和 cTnT 水平均明显升高(均 *P*<0.01)。与 I/R 组比较,IPOC 组 CK-MB 活性、cTnT 水平显著降低(均 *P*<0.01)。与 IPOC 组比较,西药对照组和活血解毒组 CK-MB 活性显著降低(*P*<0.05 和 *P*<0.01),cTnT 含量虽也有降低,但差异无统计学意义(均 *P*>0.05)。以定量组织学 N-BT 染色法显示心肌梗死范围,假手术组未见梗死区,I/R 组梗死区明显。与 I/R 组比较,IPOC 组左室梗死率显著减小(*P*<0.01)。与 IPOC 组相比,西药对照组和活血解毒组左室梗死率亦明显减小(均 *P*<0.05)。

2.2 活血解毒中药预处理联合 IPOC 对 I/R 大鼠氧化应激指标的影响(表 2):与假手术组比较,I/R 组大鼠血清 SOD 含量明显降低,MDA 含量明显升高(均 *P*<0.01)。与 I/R 组比较,IPOC 组和两个给药组 SOD 含量均明显升高,MDA 含量均明显降低

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30772868);国家“十一五”科技支撑计划资助项目(2006BAI04A01-2)

通信作者:刘剑刚,Email:liujiangang2002@sina.com

作者简介:张 蕾(1984-),女(汉族),山东省人,博士研究生。

(均 $P < 0.01$)。与 IPOC 组比较,西药对照组和活血解毒组 SOD 含量明显升高(均 $P < 0.05$),MDA 含量降低,但差异无统计学意义(均 $P > 0.05$)。

表 1 各组血清 CK-MB 活性、cTnT 含量及左室梗死率比较($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数	CK-MB(kU/L)	cTnT($\mu\text{g/L}$)	左室梗死率(%)
假手术组	14	0.69 \pm 0.11	0.02 \pm 0.01	0
I/R 组	11	1.64 \pm 0.23 ^a	4.41 \pm 0.93 ^a	35.28 \pm 3.85 ^a
IPOC 组	13	1.22 \pm 0.19 ^c	2.53 \pm 0.51 ^c	21.02 \pm 2.29 ^c
西药对照组	13	1.05 \pm 0.22 ^{cd}	2.36 \pm 0.96 ^c	17.17 \pm 3.12 ^{cd}
活血解毒组	13	0.95 \pm 0.29 ^{ce}	2.32 \pm 1.21 ^c	16.01 \pm 3.26 ^{cd}

注:与假手术组比较,^a $P < 0.01$;与 I/R 组比较,^c $P < 0.01$;与 IPOC 组比较,^d $P < 0.05$,^e $P < 0.01$

表 2 各组血清 SOD、MDA 含量比较($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数	SOD($\mu\text{g/L}$)	MDA($\mu\text{mol/L}$)
假手术组	14	48.55 \pm 6.24	7.45 \pm 0.84
I/R 组	11	37.85 \pm 6.54 ^a	9.01 \pm 0.60 ^a
IPOC 组	13	53.23 \pm 7.73 ^c	8.17 \pm 0.59 ^c
西药对照组	13	61.26 \pm 8.63 ^{cd}	8.10 \pm 0.56 ^c
活血解毒组	13	63.90 \pm 16.53 ^{cd}	8.10 \pm 0.72 ^c

注:与假手术组比较,^a $P < 0.01$;与 I/R 组比较,^c $P < 0.01$;与 IPOC 组比较,^d $P < 0.05$

2.3 活血解毒中药预处理联合 IPOC 对 I/R 大鼠炎症细胞因子的影响(表 3):与假手术组比较,I/R 组 IL-1 β 、IL-6、hs-CRP 含量均明显升高(均 $P < 0.01$)。与 I/R 组比较,IPOC 组 IL-1 β 、IL-6、hs-CRP 含量明显降低(均 $P < 0.05$)。与 IPOC 组比较,西药对照组和活血解毒组 IL-6 含量明显降低($P < 0.05$ 和 $P < 0.01$)。

2.4 活血解毒中药预处理联合 IPOC 对大鼠 I/R 心肌组织病理形态的影响(图 1):假手术组心肌组织有轻微损伤,但细胞排列整齐、无变性;细胞间质无水肿、出血,心肌组织肌纤维横纹及细胞核染色清晰。I/R 组中心区心肌纤维排列较紊乱,局部呈波纹状改变,部分肌纤维溶解液化;心肌间质可出现少许

表 3 各组血清 IL-1 β 、IL-6、hs-CRP 含量比较($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数	IL-1 β ($\mu\text{g/L}$)	IL-6(ng/L)	hs-CRP(ng/L)
假手术组	14	0.31 \pm 0.87	129.33 \pm 31.70	1.40 \pm 0.51
I/R 组	11	0.55 \pm 0.13 ^a	288.31 \pm 45.53 ^a	2.59 \pm 1.03 ^a
IPOC 组	13	0.44 \pm 0.09 ^b	243.13 \pm 37.68 ^b	2.00 \pm 0.60 ^b
西药对照组	13	0.43 \pm 0.15 ^b	201.88 \pm 59.67 ^{cd}	1.93 \pm 0.55 ^b
活血解毒组	13	0.40 \pm 0.09 ^c	193.67 \pm 64.60 ^{ce}	1.64 \pm 0.51 ^c

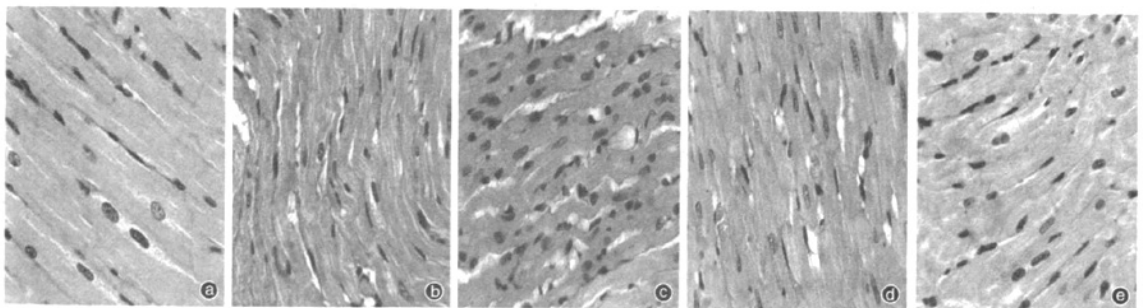
注:与假手术组比较,^a $P < 0.01$;与 I/R 组比较,^b $P < 0.05$,^c $P < 0.01$;与 IPOC 组比较,^d $P < 0.05$,^e $P < 0.01$

红细胞,心肌细胞核固缩、碎裂或溶解消失,部分心肌呈灶状与片状坏死,炎性细胞浸润明显,心肌纤维紊乱;梗死区心肌纤维红染,间隙增宽,横纹消失,边缘可见充血、出血及不等量中性粒细胞浸润。IPOC 组及各给药组心肌细胞肥大、炎性渗出、心肌纤维紊乱及核固缩、溶解均较 I/R 组减轻,其中活血解毒组变化较为明显。

3 讨论

IPOC 即冠脉再灌注开始时对冠脉进行短暂、重复的开通及再闭操作,随后恢复冠脉血流的过程,对 I/R 心脏有显著保护作用。心肌再灌注发生时及其后的一系列变化,如再灌注开始时的氧化应激,中性粒细胞在冠脉血管内皮的黏附聚集,再灌注开始后冠脉内皮损伤持续加重及钙超载造成细胞结构的迅速破坏等,都是 IPOC 所亟需干预及解决的问题^[4]。CK-MB 和 cTnT 是反映心肌损伤的重要指标^[5];而梗死面积大小与血栓的形成及其溶解以及侧支循环建立密切相关。Fujita 等^[6]发现,IPOC 可以通过开放酸中毒时 ATP 敏感的钾通道而起到减小心肌梗死面积的作用。近年来的几项研究也在不同生物模型上证实了在再灌注早期间断缺血可减小梗死面积^[7]。本研究显示,活血解毒中药联合 IPOC 可明显减少心肌酶的释放,降低 cTnT 含量,并可明显减小因心肌 I/R 造成的梗死范围。

当机体接受 I/R 或存在全身性炎症时,心肌细



①:假手术组; ②:I/R 组; ③:IPOC 组; ④:西药对照组; ⑤:活血解毒组

图 1 各组大鼠心肌组织病理变化(HE, $\times 400$)

胞可表达一些前炎症和抗炎症因子,如 IL-6、IL-10 及肿瘤坏死因子- α (TNF- α),启动和调节局部炎症反应,从而加重心肌损伤^[8]。hs-CRP 是肝脏分泌的、IL-6 调控下的一种急性时相反应蛋白,是炎症标志中最主要、最敏感的指标。近年来研究证实 hs-CRP 水平升高与心肌梗死、中风、突发冠脉疾病等有关^[9]。炎症反应在心肌缺血阶段即被激活,再灌注期间则显著加剧,在 I/R 的损伤机制中也起着重要作用,这些炎症反应过程主要包括炎症细胞的趋化、浸润以及炎症因子的合成和分泌。IPOC 对心脏的保护作用,包括缩小心肌梗死面积、对抗心律失常等,其机制涉及腺苷、一氧化氮、线粒体 ATP 敏感钾通道、再灌注损伤存活激酶通路、线粒体可渗透转运孔隙等许多方面和信号转导途径。本研究结果显示,活血解毒中药与 IPOC 联合作用可明显降低炎症因子的表达,减轻再灌注损伤的炎症反应。

研究表明,氧自由基与 I/R 损伤有密切关系,心肌 I/R 时氧自由基产生增加,而 SOD 活性降低,导致氧自由基堆积,使膜脂质过氧化产物 MDA 增多,破坏了膜的结构和功能,加重心肌细胞损害程度,出现严重的心律失常^[10]。Galagudza 等^[11]研究证实,IPOC 仅通过短暂的全心缺血,能有效终止持续的再灌注导致的心室纤颤并转为正常心律,并在 IPOC 的缺血后再灌注过程中能保证心律持续稳定。Kin 等^[12]研究表明,IPOC 的心肌保护作用可能直接或间接地与其抗炎和抗氧化作用有关。本研究结果显示,活血解毒中药与 IPOC 联合作用可明显增强 SOD 活性,提高细胞的应激反应能力,减轻 I/R 对组织的损伤,保护细胞的结构和功能。

现代医学的毒性氧自由基、微小血栓、致癌因子、炎症介质和血管活性物质的过度释放等,均可看成是中医的毒邪,这些疾病过程中形成的“内生毒邪”直接影响着疾病的病理变化、预后和转归。复方川芎胶囊由川芎和当归组成,为传统的活血化瘀药。川芎嗪是川芎中的一种有效生物碱,具有抑制血管平滑肌细胞增殖、保护血管内皮、改善血液流变学、减少钙内流、抑制自由基生成等作用^[13];阿魏酸是当归和川芎共有的活性成分,阿魏酸在体内或体外均能抑制血小板聚集与释放,具有改善心肌缺血和抗心律失常的作用^[14]。黄连有效成分小檗碱有明显抗心肌缺血、抑制炎症因子作用^[15-16]。活血中药川芎、当归和解毒中药黄连配伍具有多重药理作用,尤其是在抗心肌梗死后心律失常、抗氧化应激和减少

炎症因子在血液中的释放方面,共同对 I/R 后心肌组织起到保护作用。

综上所述,活血解毒中药与 IPOC 联合作用可通过减少炎症因子释放、增强氧化应激能力而减少心肌组织坏死物质的释放,是其减小心肌梗死面积发挥对心肌 I/R 损伤保护作用的机制之一。

参考文献

- [1] 陈德昌. 从体循环监测向微循环检测. 中国危重病急救医学, 2010, 22(2): 65-66.
- [2] Vinten-Johansen J, Yellon DM, Opie LH. Postconditioning: a simple, clinically applicable procedure to improve revascularization in acute myocardial infarction. *Circulation*, 2005, 112(14): 2085-2088.
- [3] Sakai K, Yamagata T, Teragawa H, et al. Nicorandil-induced preconditioning as evidenced by troponin T measurements after coronary angioplasty in patients with stable angina pectoris. *Jpn Heart J*, 2002, 43(5): 443-453.
- [4] Tsang A, Hausenloy DJ, Mocanu MM, et al. Postconditioning: a form of "modified reperfusion" protects the myocardium by activating the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway. *Circ Res*, 2004, 95(3): 230-232.
- [5] Panteghini M. Role and importance of biochemical markers in clinical cardiology. *Eur Heart J*, 2004, 25(14): 1187-1196.
- [6] Fujita M, Asanuma H, Hirata A, et al. Prolonged transient acidosis during early reperfusion contributes to the cardioprotective effects of postconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2007, 292(4): H2004-2008.
- [7] Vanagt WY, Cornelussen RN, Baynham TC, et al. Pacing-induced dyssynchrony during early reperfusion reduces infarct size. *J Am Coll Cardiol*, 2007, 49(17): 1813-1819.
- [8] Di Napoli M, Papa F, Bocola V. C-reactive protein ischemic stroke: an independent prognostic factor. *Stroke*, 2001, 32(4): 917-924.
- [9] 吴海云, 王士雯, 朱姝, 等. 川芎嗪在急性冠状动脉综合征中抗炎作用的研究. 中国中西医结合急救杂志, 2004, 11(4): 196-198.
- [10] 周伟君, 董建菁, 叶静, 等. 超敏 C-反应蛋白与脑血管疾病危险因素的相关性研究. 中国危重病急救医学, 2007, 19(6): 325-328.
- [11] Galagudza M, Kurapeev D, Minasian S, et al. Ischemic postconditioning: brief ischemia during reperfusion converts persistent ventricular fibrillation into regular rhythm. *Eur J Cardiothorac Surg*, 2004, 25(6): 1006-1010.
- [12] Kin H, Zhao ZQ, Sun HY, et al. Postconditioning attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury by inhibiting events in the early minutes of reperfusion. *Cardiovasc Res*, 2004, 62(1): 74-85.
- [13] 刘剑刚, 史大卓. 影响血液流变学的活血化瘀中药药物研究. 中国血液流变学杂志, 2004, 14(1): 133-137.
- [14] 上官海娟, 徐江, 官洪山, 等. 当归对心肌梗死后心肌细胞凋亡和心室重构的影响. 中国中西医结合急救杂志, 2008, 15(1): 39-44.
- [15] 杨小玉, 陆付耳, 黄琳, 等. 黄连解毒汤和黄连单煎剂对胰岛素抵抗大鼠氧化应激和内质网应激的影响. 中国医院药学杂志, 2008, 28(17): 1433-1437.
- [16] Ko WH, Yao XQ, Lau CW, et al. Vasorelaxant and antiproliferative effects of berberine. *Eur J Pharmacol*, 2000, 399(2-3): 187-189.

(收稿日期: 2010-04-10)

(本文编辑: 李银平)