

论著·临床研究

血清 Th1/Th2 型细胞因子在乙肝感染不同时期的表达及其临床意义*

沈轶骊¹, 喻霞云¹, 丰 斌¹, 黄祖兴², 王 琳^{1△}

(1. 苏州大学附属第一医院临床检测中心, 江苏苏州 215000; 2. 苏州大学, 江苏苏州 215000)

摘要:目的 研究在乙型肝炎病毒(HBV)感染的不同阶段, 患者外周血细胞因子[γ -干扰素(IFN- γ)、白细胞介素(IL)-4、IL-6]的表达水平, 进一步探究其 T 细胞免疫状态与乙型肝炎病毒感染慢性化两者的相关性。方法 采用双抗体夹心法的酶联免疫吸附测定(ELISA)方法比较慢性乙肝患者(CHB 组, 42 例)、肝硬化患者(LC 组, 30 例)、原发性肝癌患者(HCC 组, 30 例)与健康对照组(NC 组, 30 例)外周血清中 IFN- γ 、IL-4、IL-6 水平。综合分析其与 HBV DNA 载量、乙型肝炎 E 抗原(HBeAg)和谷丙转氨酶(ALT)的相关性。结果 IFN- γ 、IL-4、IL-6 水平在各组间比较差异均有统计学意义($H=26.62, 58.63, 47.29, P<0.01$)。经两两相互比较可知, CHB 组、LC 组和 HCC 组的 IFN- γ 、IL-4、IL-6 水平均高于 NC 组, 且差异有统计学意义($P<0.05$); CHB 组的 IL-4 水平高于 LC 组和 HCC 组, 且差异有统计学意义($P<0.05$); HCC 组的 IL-6 水平高于 CHB 组和 LC 组, 且差异有统计学意义($P<0.05$); 与 NC 组相比, IFN- γ /IL-4 的比值在 CHB 组、LC 组和 HCC 组都明显减小, 其差异具有统计学意义($H=9.63, P<0.05$)。通过进一步相关性分析可知, IFN- γ 水平与 HBV DNA 的载量、ALT 呈不同水平程度的负相关($r=-0.786, -0.713, P<0.001$); IL-4 水平与 HBV DNA 载量呈正相关, 差异有统计学意义($r=0.757, P<0.001$); 而 IFN- γ 、IL-4、IL-6 在慢性乙肝患者外周血清中的水平与 HBeAg 没有显著相关性($P>0.05$)。结论 感染 HBV 患者体内 T 细胞免疫功能中, Th2 型细胞处在优势的地位。这有利于对乙肝患者治疗及疗效的观察。而 IL-6 水平在肝癌组显著升高, 提示了肝癌研究的方向。

关键词: 肝炎病毒, 乙型; IL-4; IL-6; IFN- γ ; 免疫功能**DOI:** 10.3969/j.issn.1673-4130.2019.03.017 **中图法分类号:** R575.1**文章编号:** 1673-4130(2019)03-0325-05 **文献标识码:** A

Expression of serum Th1/Th2 cytokines in different stages of hepatitis B and its clinical significance*

SHEN Yili¹, YU Xiaoyun¹, FENG Bin¹, HUANG Zuxing², WANG Lin^{1△}

(1. Clinical Testing Center of the First Affiliated Hospital of Suzhou University, Suzhou, Jiangsu 215000, China; 2. Suzhou University, Suzhou, Jiangsu 215000, China)

Abstract: Objective To investigate the expression levels of IFN- γ , IL-4, IL-6 in the plasma of HBV chronic patients. To acknowledge the correlation between the immune function of T-cell with chronic hepatitis B virus. **Methods** The expression levels of IFN- γ , IL-4, IL-6 in the plasma were determined by ELISA in 42 cases of chronic hepatitis B (CHB group), 30 cases of cirrhosis (LC group), 30 cases of primary liver cancer (HCC group) and 30 cases of health control (NC group). Combine with the load of HBV DNA, HBeAg and ALT, the expression levels of IFN- γ , IL-4, IL-6 were re-analysed. **Results** The expression levels of IFN- γ , IL-4 and IL-6 in the researched groups were statistically significantly different. The expression levels of IFN- γ , IL-4, IL-6 in CHB, LC and HCC groups were higher than NC group with significance. The expression level of IL-4 in the CHB group was higher than LC and HCC groups with significance. The expression level of IL-6 in the HCC group was higher than CHB and LC groups with significance. Compared with the control group, the ratio of IFN- γ / IL-4 in CHB, LC and HCC groups were decreased with significance. There was significantly positive correlation between the expression level of IL-4 with the load of HBV DNA ($r=0.757, P<0.001$). The expression level of IFN- γ had negative correlation between the load of HBV DNA ($r=-0.786, P<$

* 基金项目: 苏州市科技发展计划项目(SYSD2015078)。

作者简介: 沈轶骊, 女, 主管技师, 主要从事临床免疫学检验方面研究。△ 通信作者, E-mail: 13962504512@163.com。

本文引用格式: 沈轶骊, 喻霞云, 丰斌, 等. 血清 Th1/Th2 型细胞因子在乙肝感染不同时期的表达及其临床意义[J]. 国际检验医学杂志, 2019, 40(3): 325-328.

0.001) with the level of ALT($r = -0.713, P < 0.001$) with significance. There was no significant correlation between HBeAg with the cytokines in the serum of patients with chronic HBV. **Conclusion** The results showed the immune function of T-cell play important role in chronic HBV patients. That would provide a good basis on CHB treatment. The expression levels of IL-6 were higher in HCC group with significance, which provided the direction for the deep study of liver cancer.

Key words: Hepatitis B virus; IFN- γ ; IL-4; IL-6; immune function

乙型肝炎病毒(HBV)的持续感染是一类发病机制较为复杂的疾病,目前认为,细胞免疫在乙肝疾病的发生、发展中起着重要的作用^[1]。辅助性 T 细胞(Th 细胞)根据分泌的细胞因子不同分为 Th1、Th2 2 个亚群, Th1/Th2 平衡在维持机体免疫功能中起着重要的作用^[2]。研究发现,当机体发生 HBV 慢性感染时,会出现“Th1/Th2 平衡漂移”的现象。因此,本研究运用酶联免疫吸附测定(ELISA)法检测 HBV 感染患者血清中 Th1 和 Th2 相关细胞因子的表达水平,探讨乙肝患者细胞免疫状态(Th1/Th2)和乙肝慢性化之间的关系。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2012 年 10 月至 2013 年 6 月苏州大学附属第一医院感染病科收治的 102 例 HBV 感染者,其中女 28 例、男 74 例,平均年龄(49.68 ± 15.41)岁。将 102 例 HBV 感染患者分为 3 组:(1)慢性乙型肝炎(CHB)组:共 42 例,其中女 10 例、男 32 例,平均年龄(39.38 ± 14.31)岁。(2)肝硬化(LC)组:共 30 例,其中女 12 例、男 18 例,平均年龄(56.18 ± 11.90)岁。(3)原发性肝癌(HCC)组:共 30 例,其中女 6 例、男 24 例,平均年龄(55.38 ± 13.42)岁。根据 2010 年修订的《慢性乙型肝炎防治指南》诊断标准^[3],所有患者均乙肝表面抗原阳性,并剔除丙型肝炎病毒(HCV)、丁型肝炎病毒(HDV)、艾滋病病毒(HIV)等重叠感染以及其他原因引起的肝脏损害。(4)健康对照组(NC):共 30 例,其中女 15 例、男 15 例,平均年龄(43.51 ± 8.53)岁,健康对照组收集于苏州大学附属

第一医院健康管理中心,无肝炎病史且乙肝标志物测定均为阴性。

1.2 仪器与试剂 Bio-Rad 680 酶标仪购自于美国 Bio-Rad 公司;白细胞介素 4(IL-4)、白细胞介素 6(IL-6)和 γ 干扰素(IFN- γ)ELISA 检测试剂盒购于美国 BioLegend 公司。

1.3 方法

1.3.1 检测方法 采用双抗体夹心 ELISA 法检测血清中 IL-4、IL-6 和 IFN- γ 水平。操作步骤按照美国 BioLegend 公司试剂盒说明书进行。

1.3.2 结果计算 通过标准品测定建立标准曲线,以吸光度 OD 值为纵坐标,水平为横坐标,得到标准曲线回归方程 $Y = aX + b$ 。测定样品的 OD 值,通过标准曲线计算得到其水平。

1.4 统计学处理 使用统计学软件 SPSS 17.0,用 Kolmogorov-Smirnov 检验法作正态性分布检验,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,若数据不符合正态性分布,则以 $M(P_{25} \sim P_{75})$ 表示;使用 Kruskal-Wallis H 检验进行多组间比较,使用 Mann-Whitney U 检验进行两样本间比较,使用 Spearman 检验作相关分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。使用 Graphpad prism 5.0 作图。

2 结果

2.1 一般资料分析 由表 1 可知 HBV 感染者中, CHB、LC、HCC 组患者的年龄、性别 2 个基本临床资料差异有统计学意义($P < 0.05$);与乙肝相关的 HBeAg 阳性率、ALT 水平及 HBV DNA 载量差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

表 1 HBV 感染不同阶段的一般资料分析[$\bar{x} \pm s$ 或 $M(P_{25} \sim P_{75})$]

组别	性别(男/女)	年龄	Log10(HBV DNA)	HBeAg(阳性/阴性)	ALT(U/L)
CHB	32/10	39.38 ± 14.31	4.33 ± 2.03	27/15	128(34.0 ~ 396.0)
LC	18/12	56.18 ± 11.90	3.51 ± 1.09	6/24	30(24.0 ~ 51.5)
HCC	24/6	55.38 ± 13.42	3.43 ± 1.33	3/27	39(20.0 ~ 71.5)
统计量	$\chi^2 = 20.745$	$F = 24.002$	$F = 4.740$	$\chi^2 = 8.824$	$H = 21.523$
P	< 0.01	< 0.01	< 0.05	< 0.01	< 0.01

2.2 HBV 慢性化患者血清细胞因子检测结果分析 由表 2、图 1~4 可知, IFN- γ 、IL-4、IL-6 水平在各组

间比较差异均有统计学意义($H = 26.62、58.63、47.29, P < 0.01$)。经两两相互比较可知, IFN- γ 、IL-

4、IL-6水平在CHB、LC和HCC组均高于对照组,且差异有统计学意义($P < 0.05$);IL-4水平在CHB组高于LC组和HCC组,且差异有统计学意义($P < 0.05$);IL-6水平在HCC组高于CHB组和LC组,且差

异有统计学意义($P < 0.05$);与对照组相比,IFN- γ /IL-4的比值在CHB组、LC组和HCC组都明显减小,其差异有统计学意义($H = 9.63, P < 0.05$)。

表2 HBV感染不同时期患者血清中细胞因子检测结果分析[M($P_{25} \sim P_{75}$)]

组别	IFN- γ (ng/mL)	IL-4 (pg/mL)	IL-6(ng/mL)	IFN- γ / IL-4
CHB	2.07(1.59~3.06) ^b	112.34(89.94~138.92) ^b	2.33(1.67~3.02) ^a	15.97(12.24~51.92) ^a
LC	3.02(1.13~5.24) ^b	79.62(54.54~104.70) ^{bc}	3.89(2.17~4.70) ^b	20.41(4.22~51.07) ^a
HCC	1.22(0.89~2.10) ^a	60.81(32.41~83.95) ^{bc}	17.44(5.25~21.83) ^{bd}	14.89(11.91~23.88) ^b
NC	1.05(0.54~1.16)	26.96(10.66~34.33)	2.21(0.68~3.28)	42.19(25.50~85.56)
H	26.62	58.63	47.29	9.63
P	<0.01	<0.01	<0.01	<0.05

注:与对照组比较,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$; LC组与HCC组IL-4表达水平与CHB组比较,^c $P < 0.01$; CHB组、LC组IL-6表达水平与HCC组比较,^d $P < 0.01$

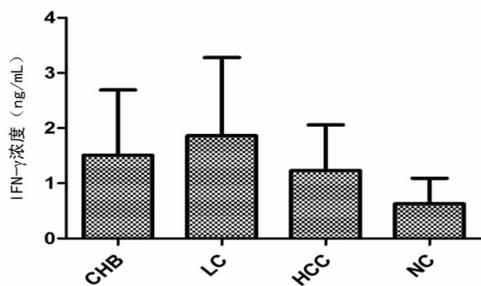


图1 CHB、LC、HCC组与健康对照组IFN- γ 水平比较

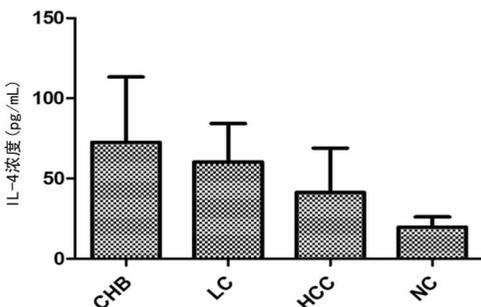


图2 CHB、LC、HCC组与健康对照组IL-4水平比较

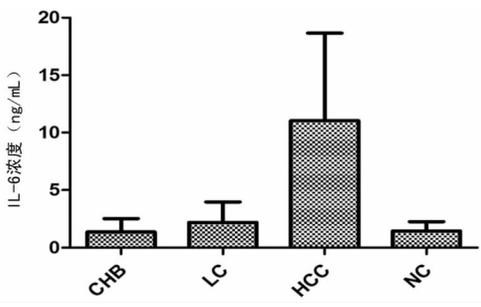


图3 CHB、LC、HCC组与健康对照组IL-6水平比较

IL-4水平与HBV DNA载量呈正相关,差异有统计学意义($r = 0.757, P < 0.001$)(图8);而IFN- γ 、IL-4、IL-6在慢性乙肝患者外周血清中的水平与HBeAg没有显著的相关性($P > 0.05$)(表3)。

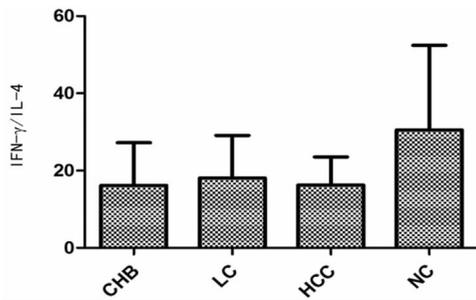


图4 CHB、LC、HCC组与健康对照组Th1/Th2比较

表3 不同阶段HBV感染患者血清中细胞因子水平与HBeAg相关性分析[M($P_{25} \sim P_{75}$)]

HBeAg	n	IFN- γ (ng/mL)	IL-4(pg/mL)	IL-6(ng/mL)
阳性	36	2.06(1.03~3.64)	90.75(66.65~120.20)	3.45(1.94~5.78)
阴性	66	2.06(1.19~3.32)	90.99(54.54~120.38)	3.46(1.86~8.69)
U	—	1 149.50	1 065.50	1 128.00
P	—	>0.05	>0.05	>0.05

注:—表示无数据

2.3 细胞因子表达量与HBV DNA载量、ALT和HBeAg相关性分析 HBV慢性化患者血清中IFN- γ 水平与HBV DNA的载量、ALT呈不同水平程度的负相关($r = -0.786, -0.713, P < 0.001$)(图5~7);

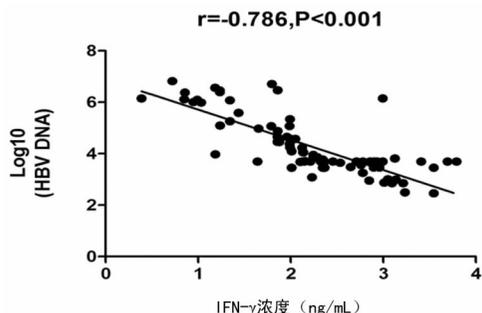


图6 IFN- γ 水平与HBV DNA载量相关性分析

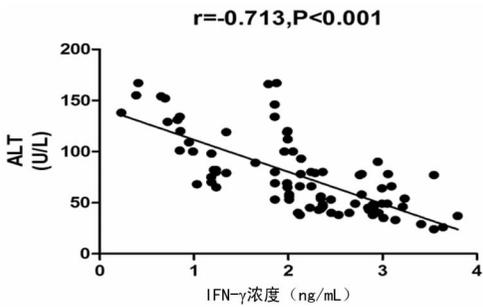


图 7 IFN- γ 水平与 ALT 水平相关性分析

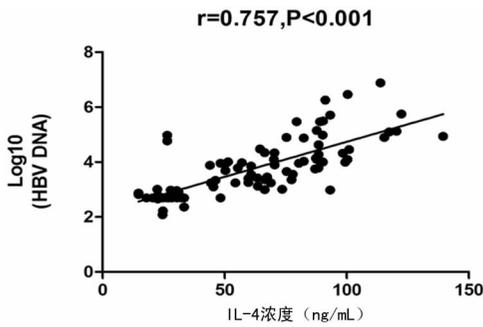


图 8 IL-4 水平与 HBV DNA 载量相关性分析

3 讨 论

HBV 的感染,从携带 HBsAg 抗原发展为 CHB、LC,最后演变为 HCC 是个长期的持续过程^[4]。最新研究发现, Th1/Th2 细胞功能的失衡可能会使 HBV 感染转为慢性化^[5]。当 Th1 细胞占主导时,机体清除 HBV 病毒,使其恢复;而当 Th2 细胞占主导时,机体处于慢性持续感染状态^[6]。最近有研究者对 HBV 感染后处于免疫耐受、免疫清除及急性期乙型肝炎分析发现,患者体内的细胞因子水平及 Th1/Th2 比率都发生了明显的改变,与健康对照组比较,乙肝患者 Th1/Th2 比率显著升高,但在以上 3 个疾病阶段未发现明显差异^[7]。为进一步了解 HBV 感染患者 T 细胞免疫功能状态,在本课题组之前对乙肝患者 T 细胞表面相关免疫分子的研究基础上^[8-9],笔者主要研究了在 HBV 感染的不同阶段,患者外周血细胞因子(IFN- γ 、IL-4、IL-6)的表达水平,进一步探其 T 细胞免疫状态与乙型肝炎病毒感染慢性化两者的相关性。

IFN- γ 和 IL-4 在 HBV 患者血清中的表达水平明显高于健康对照组,但 IFN- γ /IL-4 比值明显低于健康对照组,这与施文娟等^[6]发现 CHB 患者血清中 IFN- γ 水平显著升高相一致。笔者对 CHB、LC 和 HCC 组还进行了两两相互比较,结果显示,IL-4 水平在 CHB 组高于 LC 组和 HCC 组,且差异有统计学意义,IFN- γ 的水平在 CHB、LC 和 HCC 组未见显著变化。推测机体感染乙肝病毒后,激活 Th 细胞,分泌多种细胞因子。与分泌 Th1 型细胞因子相比, Th 细胞分泌了更多 Th2 型细胞因子,诱导细胞免疫平衡向

Th2 方向倾斜,机体表现为 HBV 感染慢性化。根据研究,笔者还发现 IL-6 水平在 HCC 组高于 CHB 组和 LC 组,且差异有统计学意义。已有研究者报道乙型肝炎病毒感染相关肝癌的进展中,IL-6 和 TNF- α 水平会显著升高^[10]。感染乙肝病毒后,机体的免疫系统受到刺激,免疫细胞激活后会分泌多种细胞因子,诱导机体产生 IL-6 等炎性细胞因子,这些炎性细胞因子会介导肝细胞损伤,最终导致肝纤维化^[11]。

同时笔者将乙肝病毒感染患者血清中 IFN- γ 、IL-4、IL-6 水平与 HBV DNA 载量、HBeAg 和 ALT 等检测结果进行相关性分析,结果发现,IFN- γ 的表达水平与 HBV DNA 的载量、ALT 呈不同水平程度的负相关;IL-4 的表达水平与 HBV DNA 载量呈正相关,差异有统计学意义。

HBV DNA 载量可衡量乙肝病毒持续存在,且在乙肝慢性化进程中呈现出显著差异,HBV DNA 载量在 CHB 患者、LC 患者、HCC 患者中逐渐较少。据此笔者推测 IFN- γ 和 IL-4 水平与乙肝病毒感染相关。ALT 的水平可筛选肝脏疾病^[12],ALT 水平在乙肝慢性化的进展过程中,呈现出显著差异,这提示 IFN- γ 可能与乙肝病毒感染相关,由此笔者推测 IFN- γ 可作为监测乙型肝炎患者 T 细胞免疫功能的新指标。

通过对 HBeAg 阳性和阴性分组研究发现,IFN- γ 、IL-4 和 IL-6 在血清中的表达没有明显的统计学差异,但研究表明,在乙肝病毒感染不同阶段,HBeAg 阳性率差异具有统计学意义,提示 HBeAg 可用于筛选肝脏疾病。需要指出的是,笔者在实验中发现,年龄及性别在 HBV 感染不同时期差异有统计学意义,这与多数学者认为两者在乙肝不同时期无差异不一致^[13]。考虑原因是收集不同感染时期的标本数量较少,导致结果有差异,后期将继续扩大标本量研究。

4 结 论

IFN- γ 与 IL-4 水平比例失衡可能与患者乙肝病毒持续感染有关,导致乙肝病毒无法清除。提示 IFN- γ 可作为新的监测指标与 HBV DNA 载量、ALT 和 HBeAg 共同反映 HBV 感染不同阶段患者 T 细胞的免疫功能,这可以为进一步研究乙肝患者免疫功能提供线索,为临床治疗和预后判断带来福音。

参考文献

[1] VANDER MOLEN R G, SPRENGERS D, BIESTA P J, et al. Favorable effect of adefovir on the number and functionality of myeloid dendritic cells of patients with chronic HBV[J]. Hepatology, 2006, 25(44): 907-914.
 [2] EVANS C M, JENNER R G. Transcription factor in terplay in T helper cell differentiation[J]. (下转第 333 页)

25. 肿瘤坏死因子 α 水平和颈动脉粥样硬化的关系[J]. 中国动脉硬化杂志, 2013, 21(12): 1093-1096.
- [3] 李丹, 聂善静, 王宏. Salusin- α , 脂蛋白相关磷脂酶 A2 与颈动脉粥样硬化不稳定斑块并发脑梗死的关系[J]. 实用医学杂志, 2016, 32(7): 1051-1054.
- [4] CHEN D Y, HUANG X L, LU S, et al. The effects of rh-BMP-2 and Treg/Th17 functional disequilibrium in uremic patients with cardiovascular complication after maintenance hemodialysis[J]. Int J Artif Organs, 2013, 36(7): 464-472.
- [5] 王均鹏, 包明威. 2 型糖尿病患者血清 Klotho 水平与冠状动脉粥样硬化的相关性[J]. 山东医药, 2017, 57(14): 58-60.
- [6] 刘章锁, 王沛. K/DOQI 指南关于慢性肾脏病分期的临床指导意义[J]. 中国实用内科杂志, 2008, 28(1): 21-24.
- [7] SUNG J Y, CHUNG W, KIM A J, et al. Calcitriol treatment increases serum levels of the soluble receptor of advanced glycation end products in hemodialysis patients with secondary hyperparathyroidism[J]. Tohoku J Exp Med, 2013, 230(1): 59-66.
- [8] YILMAZ H, ÇELIK H T, GUREL O M, et al. Increased serum levels of GDF-15 associated with mortality and subclinical atherosclerosis in patients on maintenance hemodialysis[J]. Herz, 2015, 40(Suppl 3): 305-312.
- [9] 郑淑蓓. 血清可溶性 Klotho 蛋白与维持性血液透析患者心血管疾病及预后的关系[J]. 中华肾脏病杂志, 2017, 33(4): 264-270.
- [10] EL-SHEHABY A M, EL-KHATIB M M, MARZOUK S, et al. Relationship of BsmI polymorphism of vitamin D receptor gene with left ventricular hypertrophy and atherosclerosis in hemodialysis patients[J]. Scand J Clin Lab Invest, 2013, 73(1): 75-81.
- [11] 邓晓凤, 代青, 万莉, 等. 多模式组合透析对维持性血液透析患者 Klotho 蛋白, FGF-23 和 BNP 的影响[J]. 中华危重病急救医学, 2017, 29(7): 636-639.
- [12] 吴道谓, 徐岩. 维持性血液透析患者的动脉粥样硬化[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(31): 5666-5672.
- [13] 王春光, 赵战云, 陈延涛. 终末期肾病维持性血液透析患者颈动脉结构、形态及血流动力学检测结果分析[J]. 山东医药, 2012, 52(19): 51-52.
- [14] KOMATSU M, OKAZAKI M, TSUCHIYA K, et al. Aortic arch calcification predicts cardiovascular and all-cause mortality in maintenance hemodialysis patients[J]. Kidney Blood Press Res, 2014, 39(6): 658-667.
- [15] 涂曦文, 彭佑铭, 唐东兴, 等. 维持性血液透析患者血管钙化及相关因素分析[J]. 中国动脉硬化杂志, 2015, 23(6): 613-616.
- [16] 郑淑蓓, 金领微, 李占园, 等. 维持性血液透析患者冠状动脉钙化的评价及影响因素分析[J]. 中华肾脏病杂志, 2015, 31(5): 339-344.
- (收稿日期: 2018-09-30 修回日期: 2018-11-12)
-
- (上接第 328 页)
- Brief Funet Genomics, 2013, 12(6): 499-511.
- [3] 中华医学会肝病学会. 中华医学会感染病学分会. 慢性乙型肝炎防治指南(2010 年版)[J]. 中华肝脏病杂志, 2011, 3(1): 40-55.
- [4] MCMAHON B J. Natural history of chronic hepatitis B[J]. Clin Liver Dis, 2010, 13(14): 381-396.
- [5] SAXENA R, KAUR J. Th1/Th2 cytokines and their genotypes as predictors of hepatitis B virus related hepatocellular carcinoma[J]. World J Hepatol, 2015, 7(11): 1572-1580.
- [6] 施文娟, 魏丽, 田鹏飞, 等. HBV 相关慢加急性肝衰竭患者血清 Th1/Th2 型细胞因子水平的研究[J]. 肝脏, 2013, 18(1): 27-29.
- [7] LI M H, ZHANG D, ZHANG L, et al. Ratios of T-helper 2 Cells to T-helper 1 Cells and Cytokine Levels in Patients with Hepatitis B[J]. Chin Med J (Engl), 2017, 130(15): 1810-1815.
- [8] WANG L, ZHAO C, PENG Q, et al. Expression levels of CD28, CTLA-4, PD-1 and Tim-3 as novel indicators of T-cell immune function in patients with chronic hepatitis B virus infection[J]. Biomedical reports, 2014, 2(2): 270-274.
- [9] 王琳, 赵春楠, 祁松楠, 等. 慢性乙型肝炎患者外周血 T 淋巴细胞表面共刺激分子表达量变化及其意义[J]. 中华检验医学杂志, 2014, 37(2): 105-109.
- [10] HAN Y F, ZHAO J, MA L Y, et al. Factors predicting occurrence and prognosis of hepatitis-B-virus-related hepatocellular carcinoma[J]. World J Gastroenterol, 2011, 17(38): 4258-4270.
- [11] ISHIHARA K, HIRANO T. IL-6 in autoimmune disease and chronic inflammatory proliferative disease[J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2002, 13(4/5): 357-368.
- [12] CHENG J L, WANG X L, YANG S G, et al. Non-ALT biomarkers for markedly abnormal liver histology among Chinese persistently normal alanine amino transferase-chronic hepatitis B patients[J]. World J Gastroenterol, 2017, 23(15): 2802-2810.
- [13] 宫航宇, 石铭, 綦盛麟. 乙肝患者性别、血清内 HBV-DNA 含量及年龄对肝脏损害程度的影响[J]. 中国现代药物应用, 2011, 5(5): 83-84.
- (收稿日期: 2018-08-15 修回日期: 2018-10-22)