



# Иммунологические нарушения и их терапия у пациентов с черепно-мозговой травмой

Э.М. Мамытова

Кыргызская государственная медицинская академия им. И.К. Ахунбаева, Бишкек, Кыргызстан

В данной работе представлены результаты клинического исследования, целью которого явилось изучение влияния препарата «Церебролизин» на состояние цитокинового профиля и клеточного иммунитета у больных в раннем посттравматическом периоде со средне-тяжёлой черепно-мозговой травмой (ЧМТ).

Терапия церебролизином обусловила положительные изменения среди показателей клеточного иммунитета и частичную коррекцию возникшего после ЧМТ Т-клеточного иммунодефицита. Через 10 дней после проведённого лечения церебролизином наблюдался рост противовоспалительного цитокина IL-4 (до лечения  $2,0 \pm 0,5$  пг/л, после – до  $2,8 \pm 0,4$  пг/л), что в 2,1 раза выше референтной нормы; уровень провоспалительных цитокинов ФНО- $\alpha$  ( $5,8 \pm 0,7$  пг/мл;  $6,2 \pm 0,7$  пг/л); IL-6 ( $21,2 \pm 5,0\%$ ;  $28,7 \pm 13,6\%$ ), что в 3,7 раза выше физиологической нормы, а IFN- $\gamma$  и IL-1 – имели тенденцию к снижению: IFN- $\gamma$  – от  $79,6 \pm 16,2$  до  $69,3 \pm 6,9$ ; IL-1 –  $9,1 \pm 2,0$  пг/мл и  $7,3 \pm 1,6$  пг/мл.

Анализ динамики Т-клеточного иммунитета на 10 день лечения церебролизином выявил увеличение процентного содержания CD3+ (от  $34,3 \pm 1,4\%$  до  $41,2 \pm 2,7\%$ ) и CD4+ (от  $20,4 \pm 1,2\%$  до  $21,5 \pm 2,2\%$ ) субпопуляций Т-лимфоцитов.

Использование в комплексе лечения больных с ЧМТ церебролизина, обладающего нейротропным, нейротрофическим и иммуномодулирующим эффектом, позволяет уменьшить проявления иммунодепрессии и, таким образом, снизить частоту гнойно-септических осложнений.

**Ключевые слова:** черепно-мозговая травма, цитокины, субпопуляции лимфоцитов, церебролизин, иммунитет

**Актуальность.** Характерной особенностью течения острого периода травматических повреждений головного мозга является развитие иммунологических дисфункций и сопутствующих им гнойно-септических осложнений.

Наиболее часто выявляют развитие Т-клеточных дисфункций, зависимых от баланса про- и противовоспалительных цитокинов, изучение которых по-прежнему остаётся актуальной проблемой [1,2].

Выявление нарушений иммунного статуса больных и их своевременная коррекция в раннем посттравматическом периоде черепно-мозговой травмы (ЧМТ) может способствовать более эффективному восстановительному периоду и повысить качество жизни пациентов.

ЧМТ приводит к существенным побочным эффектам, связанным со снижением функциональной активности иммунокомпетентных клеток [3].

С учётом того, что одной из причин расстройств иммунитета у больных с ЧМТ является нарушение регулирующей функции центральной нервной системы (ЦНС), в настоящее время разрабатываются принципы нейроиммунокоррекции и нейроиммунотерапии. Нейроиммунокоррекция представляет собой воздействие на патологически изменённую нейроиммунную систему с целью её восстановления и складывается из комплекса мер, повышающих и нормализующих активность нейроиммунной системы в условиях поражения центральной нервной системы [6-9].

Для такой нормализации применяется комплекс мер, состоящих из коррекции гормонального статуса, недостаточности гипоталамо-гипофизарно-адренальной системы, метаболической нейротрофической (антигипоксанты, антиоксиданты и нейротрофические лекарственные препараты), цитокинотерапии, а также иммунокоррекции индивидуально подобранными иммунопрепаратами, прежде всего иммуномодуляторами [2].



Одним из препаратов, обладающих нейроиммунорегулирующим действием, является препарат «Церебролизин» («Ebewe», Австрия), поскольку он содержит удачную комбинацию нейроактивных аминокислот, микроэлементов и нейропептидов с нейротрофическими и иммуномодулирующими свойствами [1,5].

**Цель исследования:** изучение реакции иммунной системы при черепно-мозговой травме, а также терапевтического действия церебролизина у больных со средне-тяжёлой ЧМТ в остром периоде.

**Материал и методы.** Для достижения поставленной цели, нами на базе 1 и 2 отделений нейротравмы НГ МЗ КР (г.Бишкек) было проведено комплексное обследование 10 больных с ЧМТ средне-тяжёлой степени в остром периоде. Средний возраст пострадавших  $38,0 \pm 1,9$  года.

Критерии включения: диагноз ушиб головного мозга средней степени тяжести в остром периоде травмы; отсутствие соматической патологии; отсутствие эпилептических припадков; согласие пациента или его родственника на участие в исследовании. Основную группу составили пациенты, которые получали базовую терапию с добавлением к ней нейропротектора – церебролизина – по 5 мл, вводимого в/в, капельно в 100 мл физиологического раствора в течение 10 дней.

В контрольную группу вошли 20 доноров, сопоставимых по полу и возрасту с больными основной группы.

Исследование состояния иммунного статуса проводили на 1-10 сутки с момента начала терапии по показателям клеточного звена иммунитета периферической крови. Диагностика ЧМТ и её лечение соответствовали требованиям Протокола оказания медицинской помощи при ЧМТ, утверждённым Министерством здравоохранения КР.

Исследование состояния иммунного статуса и цитокинового профиля проводили до и после лечения церебролизинем на 1 и 10 сутки.

Исследовали уровень цитокинов сыворотки крови (интерлейкины IL-1 $\beta$ ; IL-4; IL-6; ФНО- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ) с помощью иммуноферментных тест-систем производства фирмы «Вектор Бест» (г. Новосибирск).

Фенотипическую характеристику субпопуляций лимфоцитов выполняли с помощью моноклональных антител фирмы «Сорбент» (Россия), в непрямом иммунофлуоресцентном тесте. В работе использовали следующие моноклональные антитела: СД3 – для определения Т-лимфоцитов; СД4 – для определения Т-хелперов; СД8 – для определения Т-супрессоров – цитотоксических лимфоцитов; СД16 – для определения натуральных киллеров; СД20 – для определения В-лимфоцитов, ИРИ – для определения иммунорегуляторного индекса, СД95 – для определения активированных лимфоцитов. Полученные из крови больных моноклональные метил- и моноклональные антитела, согласно рекомендации и инструкции фирмы-изготовителя в объёме 0,1 мл, учитывали их реакции на проточном цитофлуориметре Vecton Diskinson.

Статистическую обработку данных проводили с помощью программ STATISTICA 6.0. Значимость различий средних значений показателей устанавливали с помощью t-критерия Стьюдента. Данные представлены в виде средних арифметических и стандартных отклонений ( $M \pm SD$ ).

**Результаты и их обсуждение.** При введении церебролизина у пациентов нежелательных явлений не отмечалось. Спектр провоспалительных (IL-1,6, IFN- $\gamma$  и ФНО- $\alpha$ ) и противовоспалительного (IL-4) цитокинов определяли у всех обследуемых больных с ЧМТ. В таблице 1 представлены данные по определению динамики цитокинов в сыворотке крови до и после лечения церебролизинем.

Содержание IL-1 $\beta$  в сыворотке крови до лечения церебролизинем было повышенным в 2,7 раза ( $P < 0,01$ ) от показателя нормы, и равнялось  $9,1 \pm 2,0$  пг/мл, что, очевидно было связано с особенностями этого цитокина как «стартового» при любом воспалении [9]. Через 10 дней лечения концентрация этого цитокина снизилась незначительно по сравнению с исходными значениями (до  $7,3 \pm 1,6$  пг/мл).

**ТАБЛИЦА 1. ДИНАМИКА ЦИТОКИНОВ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ БОЛЬНЫХ С ЧМТ СРЕДНЕЙ ТЯЖЕСТИ НА ФОНЕ ЛЕЧЕНИЯ ЦЕРЕБРОЛИЗИНОМ (пг/мл)**

Показатель	До лечения (n=10)	После лечения (n=10)	Доноры (n=20)
IL-1	$9,1 \pm 2,0$ ( $P < 0,01$ )	$7,3 \pm 1,6$ ( $P < 0,02$ )	$3,3 \pm 0,4$
IL-4	$2,0 \pm 0,5$ ( $P < 0,1$ )	$2,8 \pm 0,4$ ( $P < 0,001$ )	$1,3 \pm 0,2$
IL-6	$21,2 \pm 5,0$ ( $P < 0,001$ )	$28,7 \pm 13,6$ ( $P < 0,05$ )	$3,0 \pm 0,4$
IFN- $\gamma$	$79,6 \pm 16,2$ ( $P < 0,001$ )	$69,3 \pm 6,9$ ( $P < 0,001$ )	$9,2 \pm 0,5$
ФНО- $\alpha$	$5,8 \pm 0,7$ ( $P < 0,001$ )	$6,2 \pm 0,7$ ( $P < 0,001$ )	$2,6 \pm 0,35$

Концентрация IL-4 в сыворотке крови, определяемая до лечения, повышалась незначительно (до  $2,0 \pm 0,5$  пг/л) и не отличалась статистически значимо от показателей практически здоровых лиц ( $P < 0,1$ ). Через 10 дней после проведенного лечения церебролизином, в отличие от реакции других (провоспалительных) цитокинов, уровень IL-4 повысился до  $2,8 \pm 0,4$  пг/л и стал в 2,1 раза выше референтной нормы, хотя и не отличался статистически достоверно от исходных значений. Это может быть объяснено иммуномодулирующим влиянием церебролизина на активацию противовоспалительных стимулов в ответ на растущие провоспалительные воздействия [8].

Концентрация IL-6 до лечения отмечалась значительно повышенной (в 7 раз) от уровня здоровых лиц, достигала  $21,2 \pm 5,0$  пг/мл ( $P < 0,001$ ), а через 10 дней лечения повысилась по сравнению с исходной до  $28,7 \pm 13,6$  пг/л. Такое повышение указывает на более выраженную активацию синтеза IL-6 и, следовательно, более широкое вовлечение его в воспалительный процесс при ЧМТ. IL-6 является цитокином вторичного каскада, синтез которого запускается ФНО- $\alpha$  и IL-1 $\beta$ . Основными функциями IL-6 является запуск антителообразования В-лимфоцитами и индукция острофазного воспалительного ответа: выработка гепатоцитами печени белков острой фазы воспаления [9].

Значения содержания IFN- $\gamma$  в первые дни после травмы в сыворотке крови обследованных больных были значительно выше референтной нормы – в 8,6 раза ( $79,6 \pm 16,2$ ) ( $P < 0,001$ ). На 10 сутки после лечения происходило понижение содержания IFN- $\gamma$  до  $69,3 \pm 6,9$ , и его значения не отличались статистически достоверно от исходных цифр. IFN- $\gamma$  имеет свойства как противовоспалительных, так и провоспалительных цитокинов, наиболее значимый механизм его действия связан с участием этого цитокина в регуляции Т-клеточного звена иммунитета. Развитие иммунодефицитного состояния при многих патологических состояниях объясняют повышением апоптоза иммунокомпетентных клеток [8]. Вероятно,

обнаруженное нами у больных повышение уровня IFN- $\gamma$  в периферической крови, индуцирует IFN- $\gamma$  – как опосредованный механизм апоптоза клеток иммунной системы. При изучении субпопуляций лимфоцитов было обнаружено развитие Т-клеточного иммунодефицита, что, возможно, свидетельствовало об усилении клеточного апоптоза при ЧМТ.

Содержание ФНО- $\alpha$  до лечения увеличилось в 2,2 раза по сравнению с нормой и достигало значений  $5,8 \pm 0,7$  пг/мл ( $P < 0,01$ ), и через 10 дней лечения его уровень продолжал повышаться до  $6,2 \pm 0,7$  пг/л. Статистически значимого различия между значениями до и после лечения не было выявлено. Вторичный прирост содержания цитокина ФНО- $\alpha$ , как и IL-6, скорее всего, характеризовал формирование качественно нового этапа патогенеза воспалительной реакции – происходила её генерализация.

Таким образом, у пациентов с ЧМТ – ушибом головного мозга средней тяжести, в остром периоде до начала лечения в сыворотке крови отмечалось существенное повышение концентрации провоспалительных цитокинов IL-1 и 6, IFN- $\gamma$  и ФНО- $\alpha$ , которое было статистически достоверным при сравнении с группой доноров. Содержание противовоспалительного цитокина IL-4 не отличалось от уровня здоровых добровольцев. Через 10 дней после проведенного лечения церебролизином наблюдался рост противовоспалительного цитокина IL-4 в сыворотке крови, а уровень провоспалительных цитокинов ФНО- $\alpha$ , IL-6, IFN- $\gamma$  и IL-1 имел тенденцию к снижению.

Согласно литературным данным [2,4], наиболее информативным показателем состояния иммунной системы является Т-звено, так как именно его уровень очень мобилен и быстро реагирует на любую активную стимуляцию иммунного ответа. При исследовании влияния препарата нейропротекторного действия на основные мишени иммунной системы – Т- и В-лимфоциты было выявлено их разнонаправленное действие на исследуемые типы клеток (табл. 2).

**ТАБЛИЦА 2. ДИНАМИКА ОСНОВНЫХ СУБПОПУЛЯЦИЙ ЛИМФОЦИТОВ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ БОЛЬНЫХ С ЧМТ СРЕДНЕЙ ТЯЖЕСТИ НА ФОНЕ ЛЕЧЕНИЯ ЦЕРЕБРОЛИЗИНОМ (%)**

Показатель	До лечения (n=10)	После лечения (n=10)	Доноры (n=20)
CD3+	$34,3 \pm 1,4$ ( $P < 0,001$ )	$41,2 \pm 2,7$ ( $P < 0,5$ )	$40,5 \pm 1,3$
CD4+	$20,4 \pm 1,2$ ( $P < 0,001$ )	$21,5 \pm 2,2$ ( $P < 0,001$ )	$32,0 \pm 0,9$
CD8+	$14,1 \pm 0,8$ ( $P < 0,002$ )	$15,2 \pm 1,6$ ( $P < 0,05$ )	$11,8 \pm 0,4$
CD16+	$16,4 \pm 1,5$ ( $P < 0,001$ )	$18,4 \pm 3,2$ ( $P < 0,001$ )	$5,0 \pm 0,2$
CD20+	$18,9 \pm 0,9$ ( $P < 0,05$ )	$24,9 \pm 1,8$ ( $P < 0,001$ )	$16,0 \pm 0,9$
CD95+	$21,5 \pm 1,6$ ( $P < 0,001$ )	$20,8 \pm 1,6$ ( $P < 0,001$ )	$8,4 \pm 0,3$
ИРИ	$1,5 \pm 0,25$ ( $P < 0,5$ )	$1,4 \pm 0,1$ ( $P < 0,5$ )	$1,5 \pm 0,5$



Содержание Т-лимфоцитов (СД4+) положительных клеток и СД3+ Т-хелперов у больных с ЧМТ до лечения было достоверно снижено и составляло  $20,4 \pm 1,2\%$  и  $34,3 \pm 1,4\%$ , тогда как содержание данных субпопуляций лимфоцитов у здоровых добровольцев составляло  $32,0 \pm 0,9\%$  и  $40,5 \pm 1,3\%$ . После лечения, к 10 суткам отмечается восстановление показателя общего числа Т-лимфоцитов, содержание которого достигло физиологических значений ( $41,2 \pm 2,7\%$ ). Процентное содержание Т-хелперов незначительно повысилось по сравнению с исходными значениями и составило  $21,5 \pm 2,2\%$ .

Анализируя возможные причины диагностированной иммунодепрессии, можно полагать, что продукты распада повреждённых тканей, дериваты гемоглобина, активация окислительных процессов, манифестация продукции острофазовых белков и воспалительных цитокинов способствуют угнетению пролиферации лимфоцитов, что может стать основой для гнойно-септических осложнений.

Содержание СД8+ Т-лимфоцитов отличалось от предыдущих показателей совершенно иной динамикой. До начала лечения отмечали повышение уровня СД8+ лимфоцитов, который составлял  $14,1 \pm 0,8\%$ , что было достоверно выше, чем в группе практически здоровых лиц. На 10 сутки отмечалось дальнейшее нарастание концентрации Т-супрессоров от исходных значений до  $15,2 \pm 1,6\%$ .

Наиболее точно соотношение между лимфоцитами с хелперными и супрессорными свойствами отражает иммунорегуляторный индекс, который был изучен в данной работе. В первые сутки клеточное равновесие не отличалось от контрольных значений ( $1,5 \pm 0,25\%$ ). На 10 сутки лечения церебролизином клеточное равновесие незначительно смещалось в пользу Т-лимфоцитов с супрессорными свойствами ( $1,4 \pm 0,1\%$ ).

Содержание в крови естественных киллерных клеток СД16+ лимфоцитов у больных с ЧМТ до начала лечения достоверно повышалось до  $16,4 \pm 1,5\%$ , что почти в 3 раза больше по сравнению с контролем (здоровые лица). На 10 день процентное содержание СД16+ НК-лимфоцитов продолжает нарастать до  $18,4 \pm 3,2\%$ , что почти в 3,7 раза выше физиологической нормы.

Содержание в крови В-лимфоцитов (СД20+) до начала лечения было увеличено незначительно по сравнению с группой контроля ( $18,9 \pm 0,9\%$ ); на 10 день лечения тенденция к нарастанию данного показателя иммунограммы сохранялась. Процентное содержание В-лимфоцитов после лечения повысилось в 1,5 раза по сравнению с физиологической нормой и составило  $24,9 \pm 1,8\%$ .

Учитывая важное значение процесса апоптоза в поддержании гомеостаза, нами было проанализировано содержание лимфоцитов, экспрессирующих Fas-рецептор (СД95+), как маркер поздней активации, характеризующий готовность клеток к апоптозу. До начала лечения отмечали повышение уровня СД95+ лимфоцитов, который составлял  $21,5 \pm 1,6\%$ , что было достоверно выше, чем в группе практически здоровых лиц. На 10 сутки отмечается незначительное снижение концентрации СД95+ клеток от исходных значений до  $20,8 \pm 1,6\%$ , не достигающей нормальных значений.

При исследовании иммунологических показателей после курса лечения в исследуемой группе обращало на себя внимание увеличение процентного содержания СД3+ и СД4+ субпопуляций Т-лимфоцитов. Процентное содержание общих (СД3+) Т-лимфоцитов увеличилось до 1,2 раза, достигло физиологических значений и достоверно отличалось от исходных значений. Процентное содержание Т-хелперов увеличилось незначительно. СД8, СД16+ и СД20+ субпопуляции лимфоцитов имели тенденцию к вторичному приросту, в целом, достоверно не отличались от исходных значений. Проведённые исследования показали увеличение спонтанного апоптоза иммунокомпетентных клеток периферической крови у пациентов с ЧМТ в сравнении с группой здоровых лиц. Процентное содержание лимфоцитов, экспрессирующих рецепторы готовности к Fas-зависимому апоптозу после курса лечения снизилось незначительно. ИРИ у пациентов с ЧМТ не отличался от значений здоровых добровольцев.

Таким образом, терапия церебролизином обусловила положительные изменения среди показателей клеточного иммунитета и частичную коррекцию возникшего после ЧМТ Т-клеточного иммунодефицита. Через 10 дней после проведённого лечения церебролизином наблюдался рост противовоспалительного цитокина IL-4, уровень провоспалительных цитокинов ФНО- $\alpha$ , IL-6, а IFN- $\gamma$  и IL-1 – имел тенденцию к снижению. Анализ динамики Т-клеточного иммунитета на 10 день лечения церебролизином выявил увеличение процентного содержания СД3+ и СД4+ субпопуляций Т-лимфоцитов. Процентное содержание общих (СД3+) Т-лимфоцитов увеличилось до 1,2 раза и достигло физиологических значений, а Т-хелперов – незначительно.

Использование в комплексе лечения больных с ЧМТ церебролизина, обладающего нейропротективным, нейротрофическим и иммуномодулирующим эффектом, позволяет уменьшить проявления иммунодепрессии и, таким образом, снизить частоту гнойно-септических осложнений.



## ЛИТЕРАТУРА

1. Кульчиков А.Е. Сравнительное изучение иммунокорректирующего действия нейропептидных препаратов при острой экспериментальной цереброваскулярной патологии / А.Е.Кульчиков [и др.] // Цитокины и воспаление. - 2009. - №3. - С 18-23.
2. Пичугина Л.В. Внутриклеточные цитокины: проблемы детекции и клиническое значение / Л.В. Пичугина, Б.В. Пинегин // Иммунология. - 2008. - №1. - С. 55-63.
3. Мамытова Э.М. Особенности иммунных нарушений в остром периоде черепно-мозговой травмы / Э.М.Мамытова // Вестник Авиценны. - 2013. - №4. - С.72-76
4. Бакунц Г.О. Функциональная активность естественных киллеров и антителозависимая цитотоксичность лимфоцитов у больных с острыми нарушениями мозгового кровообращения / Г.О.Бакунц, Л.В.Ковальчук, С.Б.Чекнёв [и др.] // Журн. неврол. и психиатр. им. С.С. Корсакова. - 1998. - №1. - С. 31-34.
5. Alvarez A. Reduced TNFalpha and increased IGF-I levels in the serum of Alzheimer patients treated with the neurotrophic agent / A.Alvarez [et al.] // Int.
6. Eder P. Increased density of glutamate receptor subunit 1 due to cerebrolysin treatment: an immunohistochemical study on aged rats / P.Eder [et al.] // Histochem. J. - 2001. - V.33. - P. 605-612.
7. Gonzalez M.E. Antioxidant systemic effect of short-term cerebrolysin administration / M.E.Gonzalez, L.Francis, O.Castellano // J. Neural Transm. Suppl. - 1998. - 53. - P. 333-341.
8. Grechko A.T. The neurotropic activity of peptide immunomodulators / A.T.Grechko // Eksp. Klin. Farmakol. - 1998. - 61. - P. 14-16.
9. Peptidergic drugs increase the synaptophysin immunoreactivity in brains of 24-month-old rats // Histochem. J. - 1999. - 31. - P. 395-401.

# Summary

## Immunological disorders and therapy of patients with traumatic brain injury

**E.M. Mamytova**

*Kyrgyz State Medical Academy named after IK Ahunbaev, Bishkek, Kyrgyzstan*

This paper presents the results of a clinical study, which aimed to study the influence of drug «Cerebrolysin» on cytokine profile state and cellular immunity in patients in the early posttraumatic period with moderate-to-severe traumatic brain injury (TBI).

Therapy with cerebrolysin led to positive changes of cellular immunity and partial correction T-cell immunodeficiency that occurs after TBI. After 10 days with cerebrolysin treatment there was an increase anti-inflammatory cytokine IL-4 (before treatment  $2,0 \pm 0,5$  pg/L, after – to  $2,8 \pm 0,4$  pg/L), which is 2,1 times higher reference standards, the level of pro-inflammatory cytokines TNF- $\alpha$  ( $5,8 \pm 0,7$  pg/ml;  $6,2 \pm 0,7$  pg/l); IL-6 ( $21,2 \pm 5,0\%$ ;  $28,7 \pm 13,6\%$ ), which is 3.7 times higher than the physiological limits, and IFN- $\gamma$  and IL-1 – tended to decrease: IFN- $\gamma$  – by  $79,6 \pm 16,2$  to  $69,3 \pm 6,9$ ; IL-1 –  $9,1 \pm 2,0$  pg / ml and  $7,3 \pm 1,6$  pg / ml.

Analysis of T-cell immunity dynamics on 10 day after cerebrolysin treatment increase the percentage of CD3+ (from  $34,3 \pm 1,4\%$  to  $41,2 \pm 2,7\%$ ) and CD4+ (from  $20,4 \pm 1,2\%$  up to  $21,5 \pm 2,2\%$ ) subpopulations of T - lymphocytes revealed.

Cerebrolysin using in complex treatment of patients with TBI having neuroprotective, neurotrophic and immunomodulatory effects, can reduce the immunosuppression and thus reduce the incidence of septic complications.

**Key words:** brain injury, cytokines, lymphocyte subpopulations, cerebrolysin, immunity

### АДРЕС ДЛЯ КОРРЕСПОНДЕНЦИИ:

**Мамытова Эльмира Миталиповна** – доцент кафедры нервных болезней с курсом медицинской генетики КГМА им. И.К. Ахунбаева; Кыргызстан, г.Бишкек, ул.Ахунбаева, 92  
E-mail: [elmiramamytova@yahoo.com](mailto:elmiramamytova@yahoo.com)