Журнал «Life Sciences» ([www.elsevier.com/locate/lifesci](http://www.elsevier.com/locate/lifesci))

**Расслабляющее воздействие микротитановых частиц на деятельность вегетативной нервной системы мышей**

**Ватару Аои** *– Лаборатория медицинских наук, Высшая школа наук о жизни и окружающей среде, Университет Префектуры Киото, Япония; Кафедра гастроэнтерологии и гепатологии, Медицинский Университет Префектуры Киото, Япония.*

**Юджи Наито** *- Кафедра гастроэнтерологии и гепатологии, Медицинский Университет Префектуры Киото, Япония.*

**Йошикадзу Таканами*,* Юкари Каваи** *– Кафедра профилактической медицины, Медицинский Университет Префектуры Киото, Япония.*

**Такеши Оцуки** – *Факультет здравоохранения и социального обеспечения, Университет Св. Екатерины, Мацуяма, Япония.*

**Тошиюки Каваке** – *Компания «Phiten, Ltd.», Япония*

**Тошикадзу Йошикава** - *Кафедра гастроэнтерологии и гепатологии, Кафедра профилактической медицины, Медицинский Университет Префектуры Киото, Япония.*

21 января 2009

К Р А Т К А Я А Н О Т А Ц И Я

**Цели:** Предыдущие эксперименты продемонстрировали потенциальную возможность воздействия микротитановых частиц на нервную систему. В рамках данного исследования было экспериментально проверено воздействие микротитановых частиц на спонтанную активность во время сна и деятельность вегетативной нервной системы.

**Основной метод:** Ученые Института исследований раковых заболеваний выделили две группы лабораторных мышей, к которым применялись плацебо и микротитан соответственно. В обеих группах замерялись спонтанная активность, параметры обмена веществ и вариабельность сердечного ритма.

**Ключевой результат:**  В группе мышей, в которой применялись изделия с частицами микротитана, спонтанная активность сократилась в дневной период, в сравнении с группой, к которой применяли плацебо. Также наблюдалось снижение уровня норадреналина. Посредством телеметрической системы была измерена вариабельность сердечного ритма, оценивалась нервная активность. Анализ состояния энергетических спектров длительности интервала отдыха и восстановления выявил, что высокочастотный диапазон парасимпатической активности, был существенно увеличен при применении микротитана, в то время как энергетическое спектральное отношение низких частот к высоким снизилось в сравнении с группой, в которой использовали плацебо.

**Вывод:** Применение микротитановых частиц позволило улучшить отдых и восстановление во время сна посредством регулирования активности вегетативной нервной системы, что подтверждает расслабляющий эффект микротитана.

**Введение**

 Титан – это металл, который является одним из переходных элементов и применяется в качестве компонента различных материалов, включая такие, как металлические сплавы и краски. В медицине из-за высокой биологической совместимости, он применяется в качестве материала, из которого изготавливают различные имплантаты. Кроме того, известны некоторые значимые свойства титана как противовоспалительного средства и антиоксиданта, а также дополнительного фактора, способствующего росту нервных клеток (Carballo-Vila 2008; Overgaard 1998; Sahlin 2006; Suzuki 2003). Далее было обнаружено, что подвергшийся определенной обработке титан может оказывать воздействие на нервную систему млекопитающих в силу сокращения скорости электрически вызванного ответа[[1]](#footnote-1) и преобразования сигналов в седалищном нерве (Cehrel 2003; Onur 2004). Недавнее исследование (Korte 2008) продемонстрировало, что применение микротитана (частиц титана диаметром в микроны) сокращает разность электрических потенциалов в клеточных мембранах и частоты биоэлектрического потенциала пирамидальных нейронов в гиппокампе даже в тех случаях, когда остается пространство между металлом и нейронами. Такое воздействие микротитана на пирамидальные нейроны способно снизить болевые ощущения. Все эти наблюдения привели нас к гипотезе о том, что обработанный определенным образом титан способен подавлять возбудимость нейронов и регулировать биоэлектрический потенциал клеточных мембран клеток вегетативной нервной системы.

 Вегетативная нервная система – это один из главных факторов, регулирующих работу сердечно-сосудистой системы (Julius, Johnson 1985; Kawashima 2005: Schultz 2007), внутренних органов (Kiba 2002; Tougas 1999) и иммунной системы (Bellinger 2008; Nance, Sanders 2007). Таким образом, устойчивое нарушение баланса между симпатической и парасимпатической активностью приводит к различным отклонениям. Деятельность вегетативной нервной системы также напрямую связана с эмоциональным состоянием, процессами возбуждения, стрессом и умственной активностью. Умственное и эмоциональное напряжение приводит к усилению активности симпатического нерва и служит причиной возбуждения (Ziegler 1993). Если микротитан успокаивает активность симпатического нерва, то он также регулирует аномальные реакции, например, такие как нарушения деятельности сердечнососудистой системы, возникающие в результате физиологического стресса. Это означает, что микротитан вызывает преобладание парасимпатической активности над симпатической, что может оказывать расслабляющий эффект на организм.

 Для проверки данной гипотезы мы изучили воздействие микротитана на вегетативную нервную систему и эмоциональное состояние мышей. Помещенные в новое пространство мыши демонстрируют повышенную возбудимость и активно передвигаются в пространстве клетки, время их сна при этом значительно сокращается. В случае если воздействие микротитаном на контрольную группу мышей способно привести к снижению симпатической активности, это означало бы снижение уровня возбуждения и увеличение времени сна. Таким образом, мы проверили воздействие титана в условиях психологического стресса для мышей.

**Материалы и методы**

*Подготовка материала с микротитаном*

 Микротитан был создан посредством разделения титана на частицы диаметром 26,7 нм (по технологии компании Phiten, Киото, Япония). Были подготовлены резиновые листы, содержавшие микротитан в концентрации 0,94% от массы, а также, необработанные микротитаном для применения в качестве плацебо. Эти листы были прикреплены к стенам клеток изнутри и снаружи.

*Животные и исходные параметры эксперимента*

Данное исследование проводилось с соблюдением принципов Японского совета по защите животных и было одобрено Комитетом исследований на животных Медицинского университета Префектуры Киото (Разрешение № М19-42). Мыши возрастом 10 недель были поставлены из Института исследований раковых заболеваний (Киото, Япония) и прошли акклиматизацию в течение 6 недель при температурном режиме 22±2°С при искусственном создании цикла из дневного и ночного времени суток длиной в 12 часов (включение света с 7:30 до 19:30). В эксперименте были задействованы только мыши самцы с целью исключить спонтанную активность, вызванную сменой фаз менструального цикла. Мыши были разделены на две группы: контрольную группу и группу, подвергавшуюся воздействию микротитана. В обеих группах замерялись спонтанная активность, параметры обмена веществ и вариабельность сердечного ритма. Замер показателей мышей в группах проводились без изъятия их из клеток, в которых они были размещены на протяжении всего эксперимента. В дополнение, для изучения особенностей воздействия микротитана, применялись листы, обернутые алюминием. В 7:30 мыши размещались по индивидуальным клеткам, где они могли свободно перемещаться и имели доступ к корму и питьевой воде. Замеры показателей осуществлялись в 19:30.

*Определение спонтанной активности и уровня обмена веществ*

 Спонтанная активность каждой мыши исследовалась, как это было описано ранее (Shibakura 2006) с использованием множества линз, которые фиксировали тепловое излучение животных в течение 12 часов, начиная с 19:30 ежедневно. Активное движение фиксировалось как единичный случай, если животное перемещалось из одного участка наблюдаемого пространства в другой, что могло оптически фиксироваться различными линзами, расположенными на разных участках. Мыши были малоподвижны и не подвергались никаким физическим нагрузкам до проведения измерения показателей. Общая подвижность замерялась как сумма всех случаев спонтанной активности на протяжении периода в 12 часов.

 В то же время, непрямой калориметрический анализ выполнялся с целью оценки активности обмена веществ в период отдыха. Детали таких измерений были описаны ранее (Aoi 2008). Уровень потребления кислорода и выделения углекислого газа замеряли каждые 3 минуты в течение 12 часов с применением анализатора обмена веществ для малых животных (модель MK-5000R производства Muromachi Kikai, Токио, Япония). Показатели газового обмена высчитывались исходя из количества потребляемого кислорода и выделяемого углекислого газа.

*Вариабельность сердечного ритма*

 В целях оценки вегетативной активности мы провели анализ состояния энергетических спектров вариабельности сердечного ритма (Lanfranchi, Somers 2002; Stein, Kleiger 1999). Электрокардиограммы (ЭКГ) были сделаны и применением систем телеметрии (производства Daiya Medical Co., Ltd., Токио, Япония). За 5 дней до записи в спину каждой мыши подкожно под анестезией был имплантирован небольшой передатчик, через нижний к верхнему грудному отделу и брюшной полости были пропущены электроды. Частота сердечных сокращения (ЧСС) фиксировалась ЭКГ у мышей в состоянии бодрствования во временной период с 19:30 до 20:30. Данные ЭКГ были подвергались анализу и преобразовывались из аналогового в цифрой формат, а энергетический спектр длительности интервала отдыха и восстановления подсчитывался по методу максимальной энтропии с использованием программного обеспечения (разработки Suwa Trust Co. Ltd., Саппоро, Япония). Для анализа были взяты следующие частотные диапазоны: 0-0,75 Гц в низких частотах и 0,75-2,4 Гц в высоких частотах.

*Уровень норадреналина*

У группы мышей, размещенных в клетках, покрытых листами (микротитана или плацебо) брали пробы мочи в течение 24 часов. Впоследствии взятые образцы были обследованы на предмет содержания и концентрации норадреналина.

*Статистика*

Все данные приведены в виде средних значений с учетом стандартной погрешности. Различия между группами были оценены с применением однофакторного дисперсионного анализа или критерия Стьюдента. В то время как однофакторный дисперсионный анализ применяется для выявления значимых различий, в целях определить значимость различий между средними величинами, применялся тест Фишера на наименьшее достоверное различие. Во всех тестах, статистический уровень значимости принимался за p<0,05.

**Результаты**

*Спонтанная активность и непрямая калориметрия*

Замеры спонтанной активности и непрямой калориметрический анализ выполнялись в течение 12 часов в дневной период. Спонтанная активность вне этого времени существенно снижалась в группе, в которой применялся микротитан, в сравнении с контрольной группой (p=0,031) (Диаграмма 1). Однако, подобное снижение не обнаруживалось в том случае, если титановые листы были обернуты алюминием. Средний уровень потребления кислорода в двух группах не различался, равно как и дыхательный коэффициент (Таблица 1).



***Диаграмма 1***. Оценка спонтанной активности в дневной период. Число движений замерялось множественными линзами, фиксирующими инфракрасное излучение животных. Общее значение подсчитывалось для каждой мыши в период в 12 часов. Приведены средние значения для 8 мышей с учетом стандартной погрешности. Статистический уровень значимости принимался за p<0,05.

**Таблица 1**

*Показатели газообмена при дыхании.*

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  | Контрольная группа | Титан |
| Потребление кислорода (мл/кг/мин) | 36,4 ± 0,8 | 36,4 ± 0,6 |
| Дыхательный коэффициент | 0,88 ± 0,04 | 0,91 ± 0,03 |

 Непрямая калориметрия осуществлялась в дневной период. Дыхательный коэффициент выведен на основе данных о потреблении кислорода и выделении углекислого газа. Среднее значение за 12 часов высчитывалось для каждой мыши в отдельности. Приведены средние значения для 8 мышей с учетом стандартной погрешности.

 *Анализ вариабельности сердечного ритма*

 Анализ вариабельности сердечного ритма, проводимый на основе данных замера ЧСС и интервала отдыха и восстановления, осуществлялся в течение 1 часа после двигательной активности с целью избежать влияния на результаты естественного снижения вегетативной активности в ходе сна. Средние часовые значения ЧСС, мощность на низких частотах, высокие частоты и соотношение ВЧ/НЧ были подсчитаны для каждой мыши после имплантации передатчика и электродов. В группе, в которой применялся микротитан, ЧСС была ниже, чем в контрольной группе (Таблица 2). Хотя мощность в низкочастотном диапазоне не менялась в результате применения микротитана, на высоких частотах она значительно возрастала (p=0,001) (Таблица 2). Соотношение ВЧ/НЧ также снижалось у мышей в клетках, покрытых листами с микротитаном по отношению к контрольной группе (p=0,017) (Таблица 2).

**Таблица 2**

*Вариабельность сердечного ритма.*

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  | Контрольная группа | Титан |
| ЧСС (ударов в минуту) | 652 ± 7 | 636 ± 6 |
| НЧ (мс2) | 1,74 ± 0,14 | 1,65 ± 0,15 |
| ВЧ (мс2) | 2,83 ± 0,16 | 3,77 ± 0,18 |
| НЧ/ВЧ | 0,60 ± 0,08 | 0,45 ± 0,03 |

Активность вегетативной нервной системы определялась при помощи энергетического спектрального анализа. ЧСС замерялась ЭКГ с использованием телеметрической системы во временной период с 19:30 до 20:30 у бодрствующих мышей. Частотный диапазон: НЧ – 0-0,75 Гц, ВЧ – 0,75-2,4 Гц. Среднее значение з 1 час подсчитывалось для каждой мыши. Приведены средние значения для 7-8 мышей с учетом стандартной погрешности.

*Уровень норадреналина*

С целью оценить активность симпатической нервной системы, были произведены замеры норадреналина в моче, собранной за период в 24 часа. В группе, к которой применялся микротитан, уровень норадреналина был значительно ниже в сравнении с контрольной группой (p=0,035) (Диаграмма 2). Однако, такого снижения не обнаруживалось в группе, к которой применялся титан, покрытый в алюминиевом покрытии.



***Диаграмма 2.*** Содержание норадреналина в моче, собранной за 24 часа. Приведены средние значения для 7-8 мышей с учетом стандартной погрешности. Статистический уровень значимости принимался за p<0,05.

**Комментарии**

 Была проведена экспериментальная проверка расслабляющего эффекта микротитана в условиях психологического стресса для мышей. Мыши спят в дневные часы, поэтому спонтанная активность всегда снижается в данный период. Таким образом, дальнейшее сокращение числа спонтанных действий, отмеченное в микротитановой группе в ходе эксперимента, следует отнести на счет продления времени сна, лишь с некоторой долей вероятности оно может дополнительно свидетельствовать о расслабляющем воздействии микротитана. Также была проведена оценка воздействия микротитана на активность вегетативной нервной системы посредством энергетического спектрального анализа вариабельности сердечного ритма, что применяется в качестве неинвазивного маркера активности вегетативной нервной системы (Ohnuki 2001; Stein, Kleiger 1999). В ходе данного исследования, диапазон 0-0,75 Гц был определен как низкочастотный, а 0,75-2,4 Гц – как высокочастотный, в соответствии с предыдущими исследованиями малых животных (Marusato 1998; Waki 2003). Активность вегетативной нервной системы была оценена на основе показателей вариабельности периода отдыха и восстановления на указанных частотах в условиях влияния различных факторов стресса, таких как: повышенная эмоциональность, умственный стресс и физическая активность (Lanfranchi, Somers 2002; Terkelsen 2005). Соотношение НЧ/ВЧ, отражающее уровень симпатической нервной активности, сокращалось у группы мышей, к которой применялся микротитан, в сравнении с показателями контрольной группы, что вместе с повышением мощности в ВЧ диапазоне стимулирует парасимпатическую активность. В дополнение, у микротитановой группы был снижен уровень норадреналина в моче. Выделение норадреналина преимущественно провоцируется деятельностью симпатической нервной системы, поэтому снижение уровня норадреналина в моче поддерживает предположение о воздействии микротитана на активность симпатической нервной системы. Наблюдения предполагают подтверждают, что микротитан может воздействовать на активность симпатической нервной системы мышей посредством изменения внешней среды, способствуя тем самым релаксации и продлению времени сна.

 Механизм воздействия микротитана остается понятным не до конца, но одним из главных факторов этого воздействия может выступать его влияние на порог деполяризации нейронов. Ранее было установлено (Korte 2008), что пластырь ,содержащий частицы титана может воздействовать на синаптическую пластичность и значительно снижает частоты пульсации отдельных пирамидальных нейронов в сравнении с пластырем, содержащем плацебо. Таким образом, регуляция электрических потенциалов клеточных мембран при помощи микротитана может также работать в случае с симпатической нервной системой, как и в случае с пирамидальными нейронами, что было установлено в ходе предыдущих исследований. С другой стороны, мощность в высокочастотном диапазоне (индикатор парасимпатической активности) была выше у группы мышей ,к которой применялся микротитан, чем в группе, к которой применяли плацебо. Симпатическая и парасимпатическая нервные системы могут напрямую взаимодействовать (Benthem 2001; Berthoud, Neuhuber 2000; Smith 2002; Vahhoutte, Levy 1980), таким образом наблюдаемое усиление парасимпатической активности может быть частично спровоцировано угнетением симпатической активности. Хотя для детального определения механизма воздействия микротитана на вегетативную нервную систему потребуются дальнейшие исследования, предполагается, что баланс вегетативной нервной системы изменяется, а преобладание парасимпатической активности над симпатической в условиях стресса обеспечивается за счет эффекта на электрический потенциал мембраны клеток симпатической нервной системы.

 Было обнаружено, что снижения симпатической нервной активности и уровня норадреналина не происходило в тех случаях когда листы с содержанием микротитана были обернуты алюминием. Предыдущее исследование (Korte 2008) также продемонстрировало, что воздействие на пирамидальные нейроны материала, содержащего микротитан, блокируется, если между ними разместить свинцовую пластину диаметром 0,5 см. Таким образом, оказывается, что воздействие микротитана на нейроны осуществляется посредством неких факторов, которые пересекают открытые пространства, но не могут преодолеть металлическое заграждение, как это происходит с электромагнитными волнами, или напрямую воздействует на организм через кожу при контакте с материалами, содержащими микротитановые частицы. В ходе данного исследования, наблюдалось воздействие титана даже в том случае, когда материал, его содержащий не вступал в непосредственный контакт с нейронами, а это означает, что микротитан может оказывать воздействие на нейроны даже при наличии расстояний между металлом и целью воздействия. В исследовании применялись материалы с концентрацией титана лишь в 0,94%, что является максимально возможной концентрацией микротитана в резиновых листах, при которой не изменяются из физические свойства. В дальнейших исследованиях стоит подробней изучить зависимость воздействия микротитана от концентрации, как это было сделано в ходе предыдущего исследования (Korte 2008).

 В заключение, микротитан вызвал снижение спонтанной активности в течение дневного периода времени у мышей, подвергавшихся нервно-психическому стрессу. В соответствии с результатами энергетического спектрального анализа вариабельности сердечного ритма, в сочетании с замером уровня норадреналина в моче, активность симпатической нервной системы была снижена у мышей, к которым применялся микторитан. Эти наблюдения свидетельствуют о том, что, посредством регулирования активности вегетативной нервной системы, микротитан способствует продлению периода сна и оказывает расслабляющие воздействие.

**Список литературы:**

Aoi W, Naito Y, Takanami Y, Ishii T, Kawai Y, Akagiri S, Kato Y, Osawa T, Yoshikawa T. Astaxantin improves muscle lipid metabolism in exercise via inhibitory effect of oxidative CPT I modification. Biochemical and Biophysical Research Communications 366 (4), 892-897, 2008.

Bellinger DL, Millar BA, Perez S, Carter J, Wood C, ThyagaRajan S, Molinaro C, Lubahn C, Lorton D, Sympathetic modulation of immunity: releavance to disease. Cellular Immunology 252 (1-2), 27-56, 2008.

Benthem L, Mundinger TO, Taborsky Jr Gj. Parasympathetic inhibition of sympathetic neural activity to the pancreas. American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism 280 (2), E378-E381, 2001.

Berthoud HR, Neuhuber WL, Functional and chemical anatomy of the afferent vagal system. Autonomic Neuroscience 85 (1-3), 1-17, 2000.

Cehreli MC, Onur MA, Sahin S. Effects of hydroxyapatite-coated and commercially pure titanium oral implant surfaces on compound nerve action potentials. Clinical Oral Implants Research 14 (3), 269-272, 2003.

Carballo-Vila M, Moreno-Burriel B, Chinarro E, Jurado JR, Casan-Pastor N, Collazos-Castro JE, Titanium oxide as substrate for neural cell growth. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2008.

Julius S, Johnson EH. Stress, autonomic hyperactivity and essential hypertension: an enigma. Journal of Hypertension 3 (4), S11-S17, 1985.

Kawashima T. The autonomic nervous system of the human heart with special reference to its origin, course, and peripheral distribution. Anatomy and Embryology 209 (6), 425-438, 2005.

Kiba T. The role of the autonomic nervous system in liver regeneration and apoptosis – recent developments. Digestion 66 (2), 79-88,202.

Korte M. Influence of Aquatitan Tape on nerve cells of the central nervous system. Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition 43, 1-4, 2008.

Lanfranchi PA, Somers VK. Arterial baroreflex function and cardiovascular variability: interactions and implications. American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology 283 (4), R815-R826, 2002.

Marusato Y, Hirakawa H, Harada Y, Nakamura T, Hayashida Y. Effects of systemic hypoxia on R-R interval and blood pressure variabilities in conscious rats, American Journal of Physiology (3), H797-H804, 1998.

Nance DM, Sanders VM. Autonomic innervation and regulation of the immune system (1987-2007). Brain, Behavior and Immunity 21 (6), 736 – 745, 2007.

Ohnuki K, Moritani T, Ishihara K, Fushiki T. Capsaicin increases modulation of sympathetic nerve activity in rats: measurement using power spectral analysis of heart rate fluctuations. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry 65 (3), 638-643, 2001.

Onur MA, Tas Z, Gurpinar A, Sahin S, Cehreli MC, Morphologic, functional and behavioral effects of titanium dioxide exposure on nerves. Clinical Oral Implants Research 15 (5), 513 – 519, 2004.

Overgaard L, Danielsen N, Bjursten LM. Anti-inflammatory Properties of titanium in the joint environment. An experimental study in rats. The Journal of Bone and Joint Surgery British 80 (5), 888 – 893, 1998.

Sahlin H, Contreras R, Gaskill DF, Bjursten LM, Frangos JA.. Anti-inflammatory properties of micropatterned titanium coating. Journal of Biomedical Materials Research Part A 77 (1), 43-49, 2006.

Schultz HD, Li YL, Ding Y. Arterial chemoreceptors and sympathetic nerve activity: implications for hypertension and heart failure. Hypertension 50 (1), 6 – 13, 2007.

Shibakura T, Iwai Y, Mizunoya W, Matsumura S, Nishizawa Y, Inoue K, Fushiki T. The physiological and behavioral effects of CRF. Biomedical Research 27 (6). 297-305, 2006.

Smith PG, Warn JD, Steine JJ, Krizsan-Agbas D, Hasan W. Modulation of parasympathetic neuron phenotype and function by sympathetic innervations. Autonomic Neuroscience 96 (1), 33-42, 2002.

Stein PK, Kleiger RE, Insights from the study of heart rate variability. Annual Review of Medicine 50, 249-26, 1999.

Suzuki R, Muyco J, McKittrick J, Frangos JA, Reactive oxygen species inhibited by titanium, oxide coating. Journal of Biomedical Materials Research Part A 66 (2), 396-402, 2003.

Terkelsen AJ, Molgaard H, Hansen J, Andersen OK, Jensen TS. Acute pain increases heart rate: differential mechanisms during rest and mental stress. Autonomic Neuroscience 121 (1-2), 101-109, 2005.

Tougas G, The autonomic nervous system in functional bowel disorders. Canadian Journal of Gastroenterology 13, 15A-17A, 1999.

Vanhoutte PM, Levy MN, Prejunctional cholinergic modulation of adrenergic neurotransmission in the cardiovascular system. American journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology 238 (3), H275-281, 1980.

Waki H, Kasparov S, Wong LF, Murphy D, Shimizu T, Paton J. Chronic inhibition of endothelial nitric oxide synthase activity in nucleus tractus solitarii enhaces baroreceptor reflex in conscious rats. Journal of Physiology 546 (1), 233-242, 2003.

Ziegler MG, Ruiz-Ramon P, Shapiro MH, Abnormal stress responses in patients with diseases affecting the sympathetic nervous system. Psychosomatic Medicine 55 (4), 339-346, 1993.

1. неспецифический компонент возбуждения мышцы в ответ на стимуляцию этой мышцы или нерва, иннервирующего эту мышцу, импульсными воздействиями пороговой интенсивности [↑](#footnote-ref-1)