

河豚毒素对不同类型突触分泌的影响

朱佳晖, 阳小飞*

中南民族大学生物医学工程学院, 脑认知国家民委重点实验室, 医学信息分析及肿瘤诊疗湖北省重点实验室, 膜离子通道与药物研发实验室, 湖北 武汉

Email: 1391103844@qq.com, sunlittlefly@hotmail.com

收稿日期: 2021年7月15日; 录用日期: 2021年8月17日; 发布日期: 2021年8月25日

摘要

目的: 研究河豚毒素(tetrodotoxin, TTX)抑制阻断诱发的神经递质释放浓度是否存在差异, 以及探讨最低TTX的完全阻断工作浓度大小。方法: 采用小鼠的大脑皮层神经元细胞作为实验材料, 在外液中加入不同浓度的TTX, 分别记录诱发的兴奋性突触前电流(evoked inhibitory post-synaptic current, eIPSC)和诱发的兴奋性突触前电流(evoked excitatory post-synaptic current, eEPSC)的幅值。结论: 在诱发神经细胞释放神经递质时, TTX阻断eEPSC的半抑制浓度低于eIPSC, 相较于eIPSC, eEPSC对于TTX更为敏感; 在使用TTX阻断神经递质诱发性释放时, 需要使用高于0.2 μM 的工作浓度。

关键词

河豚毒素, 皮层神经元细胞, 神经递质释放

Effects of Tetrodotoxin on Different Types of Synaptic Secretion

Jiahui Zhu, Xiaofei Yang*

Key Laboratory of Cognitive Science, Key Laboratory of Medical Information Analysis and Tumor Diagnosis and Treatment, Laboratory of Membrane Ion Channels and Medicine, College of Biomedical Engineering, South-Central University for Nationalities, Wuhan Hubei

Email: 1391103844@qq.com, sunlittlefly@hotmail.com

Received: Jul. 15th, 2021; accepted: Aug. 17th, 2021; published: Aug. 25th, 2021

Abstract

Objective: The purpose of this study is to investigate whether the concentration of tetrodotoxin

*通讯作者。

文章引用: 朱佳晖, 阳小飞. 河豚毒素对不同类型突触分泌的影响[J]. 生物物理学, 2021, 9(3): 57-63.

DOI: 10.12677/biphy.2021.93007

(TTX) has an effect on neurotransmitter release, and try to find out the lowest working concentration of TTX. Method: Using mouse cortical neurons as experimental materials, different concentrations of TTX were added to the external solution, recording the amplitudes of evoked inhibitory post-synaptic current (eIPSC) and evoked excitatory post-synaptic current (eEPSC). Conclusion: When inducing cortical neurons to release neurotransmitters, the semi inhibitory concentration of TTX blocking eEPSC was lower than that of eIPSC. So, eEPSC is more sensitive to TTX than eIPSC. When blocking neurotransmitter induced release with TTX, working concentration need is higher than 0.2 μM .

Keywords

Tetrodotoxin, Cortical Neurons, Neurotransmitter Release

Copyright © 2021 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



1. 前言

河豚毒素(tetrodotoxin, TTX)作为豚毒鱼类体内含有的一种生物碱, 是毒性很强的一种非蛋白生物毒素, 是一种典型的选择性极高的快速可逆的钠离子通道阻断剂, 可阻止钠离子进入细胞从而影响细胞膜动作电位产生[1] [2] [3] [4]。神经细胞之间通过释放神经递质进行信号传导与输出, 诱发释放神经递质是在细胞去极化刺激条件下由大量囊泡释放的。通过给神经细胞一个电刺激, 可以诱发神经细胞释放神经递质, 产生 eEPSC 或者 eIPSC [5] [6]。

实验中 TTX 常被使用于阻断钠离子通道, 为了研究 TTX 在抑制阻断神经递质的诱发释放的两种不同电流中是否存在差异, 以及探求 TTX 的最低完全阻断的工作浓度, 本实验分别采用不同浓度的 TTX 作用于原代小鼠大脑皮层神经元细胞, 记录不同浓度 TTX 存在下的 eIPSC 与 eEPSC。实验结果显示, TTX 对诱发的兴奋性突触前电流与突触后电流作用效果不同, 半抑制浓度(IC50)前者远小于后者, 即 TTX 对诱发的兴奋性突触后的神经递质释作用效果更明显; 以及完全阻断钠离子通道的 TTX 工作浓度需大于 0.2 μM 。

2. 材料与方

2.1. 材料

葡萄糖(Glucose)、乙二醇双四乙酸(EGTA)、4-羟乙基哌嗪乙磺酸(HEPES)、阿糖胞苷(Ara-C)、胰岛素(Insulin)、多聚-L-赖氨酸(Poly-L-lysine)、NaCl、CaCl₂、MgCl₂、CsCl、KCl、NaHCO₃、Na₂GTP、Na₂ATP、平衡盐溶液(Hanks)均采购于 Sigma 公司; B-27、转铁蛋白(Transferrin, Gibco)、MEM (Gibco 公司)、牛血清(FBS, Gibco 公司)、胰蛋白酶(Gibco 公司); 印防己毒素(PTX, Tocris 公司)、6-氰基-7-硝基喹啉-2,3-二酮(CNQX, Tocris 公司)、利多卡因 N-乙基溴(QX-314, Tocris 公司); 河豚毒素(TTX, 上海玉博生物科技有限公司)。

2.2. 仪器

倒置显微镜, 全自动膜片钳放大器系统, 微电极拉制仪, CO₂ 恒温细胞培养箱, 超净工作台, 高压

灭菌锅分别购于奥林巴斯, HEKA, 普升科技, 世尔科技, Thermo, 苏州 Air Tech, 上海博讯有限公司。

2.3. 方法

2.3.1. 实验溶液配制

配制神经元细胞培养基(2% B-27, 0.5% Glucose, 100 mg/L Transferrin, 5% FBS 和 2 μM Ara-C); 外液(140 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM MgCl_2 , 2 mM CaCl_2 , 10 mM HEPES, 10 mM Glucose); 电极内液(120 mM CsCl, 5 mM NaCl, 1 mM MgCl_2 , 10 mM HEPES, 10 mM EGTA, 3 mM Na-ATP, 0.3 mM Na-GTP); HBS 解剖液(0.5 mM Hanks, 0.283 mM HEPES, 0.35 mM NaHCO_3) [7] [8]。

2.3.2. 原代小鼠大脑皮层神经元细胞的获取与培养

取新生 24 小时内的野生型小鼠, 将新生鼠消毒后放入超净工作台中, 断头处死, 分离出大脑皮层, 放入提前预冷的 HBS 缓冲液中。将 HBS 缓冲液倒掉, 加入 1 mL 0.25% 的胰酶, 放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中消化, 倒计时 12~13 分钟, 消化完成后将胰酶吸干净, 加入 3 mL plating 溶液, 清洗三遍防止胰酶残留, 加入 2 mL plating 溶液轻轻吹打 8~12 次, 将细胞吹散。接下来用 70 μm 的细胞筛滤去组织块, 加入一定体积的 plating 溶液定容(按一只老鼠种植 12 个孔的比例定容), 上下颠倒混匀后每个孔加入 1 mL 细胞悬浮液。最后将细胞悬液滴于玻片上进行培养。培养的第一天换上无 Ara-C 培养基, 在培养的第四天和第九天换上含 4 μM 的 Ara-C 培养基, 培养 13~14 天至细胞成熟后进行电生理实验记录[9]。

2.3.3. 全细胞膜片钳实验

拉制硼硅酸玻璃管电极, 电阻约为 3~5 M Ω 。钳制电压设定为 -70 mV [10], 在浴槽中加入 2~3 mL 外液, 地线接入浴槽中, 在显微镜下挑选一个状态良好的神经元细胞, 调至视野中央, 使用双极胞外刺激电极对其进行全细胞膜片钳实验[11], 选择全细胞电压钳模式记录。记录 eIPSC 时在外液中加入 20 μM AMPA-受体阻断剂 CNQX 及 50 μM NMDA-受体阻断剂 APV 阻断其他电流, 实验时在外液中分别加入 0 μM , 0.0008 μM , 0.0016 μM , 0.008 μM , 0.04 μM , 0.2 μM , 1 μM 的 TTX 阻断通道。记录 eEPSC 时, 在外液中加入 100 μM GABA-受体阻断剂 PTX 和 50 mM NMDA-受体阻断剂 APV 用于阻断其他电流, 同时在电极内液中加入 5 mM 的 QX-314 以阻断 Na^+ 通道, 以消除细胞发放动作电位的干扰, 其余实验操作与上述相同。

2.4. 数据处理

数据用 HEKA EPC10 记录完成后, 然后通过软件 Clampfit 处理, 统计幅值。再用 Graphpad prism 7.00, Igor Pro 完成分析。

3. 结果

3.1. 不同浓度 TTX 对神经元细胞 eIPSC 的阻断作用

为探究 TTX 在阻断 eIPSC 的浓度效率如何, 使用成熟(培养 13~14 天)的新生鼠大脑皮层神经元细胞, 电生理实验记录两种细胞突触后电流, 分别重复 3 次独立实验, 分析处理所得的实验数据。结果如下图 1 所示, 外液中加入 CNQX 和 APV, 且内液中含有 QX-314 的条件下, 分别加入 0 μM , 0.0008 μM , 0.0016 μM , 0.008 μM , 0.04 μM , 0.2 μM , 1 μM 的 TTX, 随着 TTX 的浓度增高, 记录到的 eIPSC 幅值降低, 使用 Hill 方程拟合记录到的各 TTX 浓度下的 eIPSC 幅值归一化后的数据, 得到 IC_{50} 为 0.030055 μM 。

图 1 的结果说明, TTX 能有效抑制阻断 eIPSC, 在 TTX 0.2 μM 的浓度下几乎可以阻断全部的 eIPSC, 因此在使用 TTX 阻断钠离子通道时, 有效的工作浓度选择应在 0.2 μM 以上。

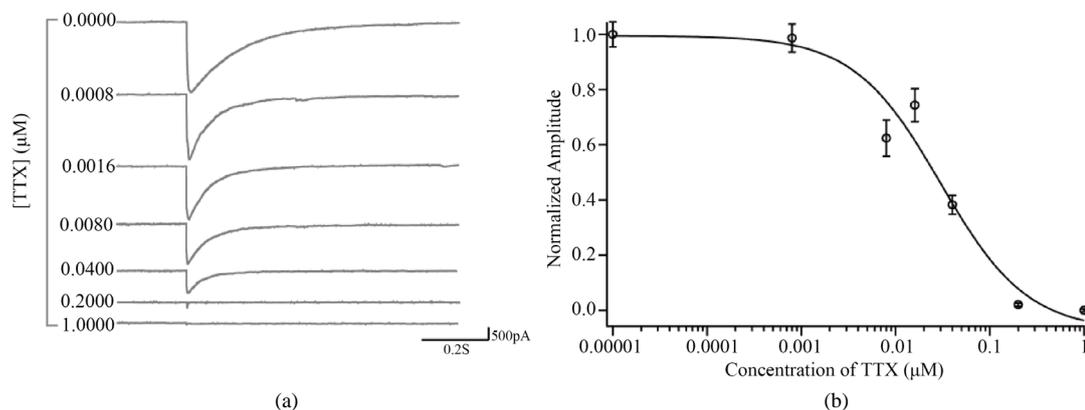


Figure 1. The efficiency of TTX at different concentrations to block eIPSC in cerebral cortex neurons. (a) When the concentration of TTX is 0 μM, 0.0008 μM, 0.0016 μM, 0.008 μM, 0.04 μM, 0.2 μM, 1 μM, the surface curve of eIPSC generation of cerebrum cortex was recorded. (b) It is recorded in (a) that the normalized value of each piece is fitted by Hill equation, and the curve is tested for four times alone. The total sample size of each concentration group is 11~15

图 1. 不同浓度 TTX 阻断大脑皮层神经细胞 eIPSC 的效率。(a) 在 TTX 浓度为 0 μM, 0.0008 μM, 0.0016 μM, 0.008 μM, 0.04 μM, 0.2 μM, 1 μM 时, 记录大脑皮层神经细胞 eIPSC 代表曲线; (b) (a) 中记录到各条件数据归一化的值用 Hill 方程拟合后的曲线, 四次独立实验, 每个浓度组总样本量为 11~15 个

3.2. 不同浓度 TTX 对神经元细胞 eEPSC 的阻断作用

同样的, 为探究不同浓度 TTX 对 eEPSC 阻断作用, 重复上述实验, 使用培养 13~14 天的小鼠大脑皮层神经元, 内液中加入 QX-314, 且在外液中加入 PTX 和 APV 时, 分别加入 0 μM, 0.0008 μM, 0.0016 μM, 0.008 μM, 0.04 μM, 0.2 μM, 1 μM 的 TTX, 记录 eEPSC。结果与 eIPSC 组相似, 伴随着 TTX 浓度的升高, 记录到的 eEPSC 幅值随之降低。通过 Hill 方程进行拟合, 将记录到的各 TTX 浓度下的 eEPSC 幅值归一化后做出拟合曲线, 并求出 IC₅₀ 为 0.011208 μM。结果如图 2 所示, 在有 TTX 存在的情况下, 随 TTX 浓度的增加 eEPSC 得到有效抑制, 在 TTX 浓度为 0.2 μM 时, 已能阻断极大部分的 eEPSC, 只有极小部分的电流有残余, 由此可知, 为完全抑制 Na⁺通道电流, TTX 的工作浓度应该选择高于 0.2 μM 的浓度。

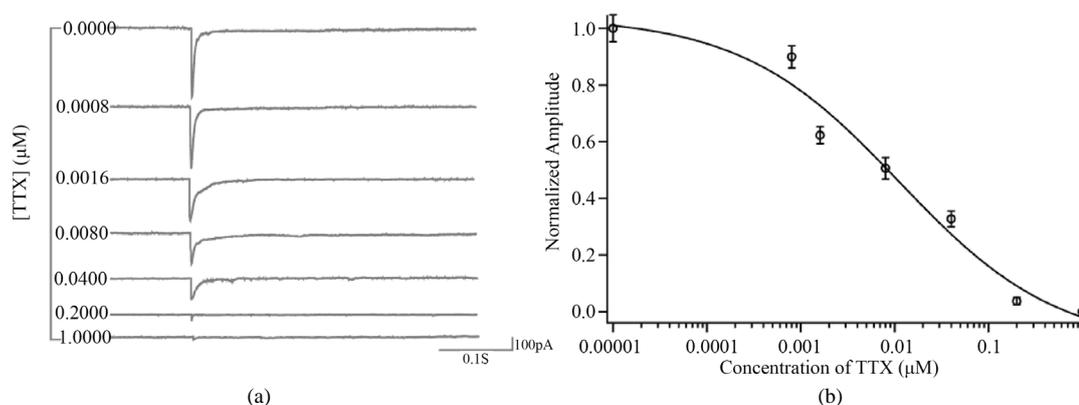


Figure 2. The efficiency of TTX at different concentrations to block eEPSC in cerebral cortex neurons. (a) When the concentration of TTX is 0 μM, 0.0008 μM, 0.0016 μM, 0.008 μM, 0.04 μM, 0.2 μM, 1 μM, the surface curve of eEPSC generation of cerebrum cortex was recorded. (b) It is recorded in (a) that the normalized value of each piece is fitted by Hill equation, and the curve is tested for four times alone. The total sample size of each concentration group is 11~15

图 2. 不同浓度 TTX 阻断大脑皮层神经细胞 eEPSC 的效率。(a) 在 TTX 浓度为 0 μM, 0.0008 μM, 0.0016 μM, 0.008 μM, 0.04 μM, 0.2 μM, 1 μM 时, 记录大脑皮层神经细胞 eEPSC 代表曲线; (b) Hill 方程拟合(a)中记录到各条件数据归一化的值, 四次独立实验, 每个浓度组总样本量为 11~15 个

3.3. eEPSC 比 eIPSC 对 TTX 的浓度变化更为敏感

IC₅₀ 是指待测拮抗剂的半抑制浓度, 它是衡量拮抗剂作用的一种方式, 反映的是物质在抑制某些生物程序时所需的半量[12]。将记录到的 eIPSC 组和 eEPSC 组的幅值进行归一化, 所得值再通过 Hill 方程进行拟得到曲线如上图 1, 图 2 所示, 获取该曲线的 IC₅₀。通过数据分析软件计算可得到 eIPSC 组和 eEPSC 组的 TTX 的半抑制浓度分别是 0.030055 μM 和 0.011208 μM。可以看出 eIPSC 组的 IC₅₀ 值远大于 eEPSC 组, 说明 TTX 作用于 eEPSC 所需的半抑制浓度低于 eIPSC 的半抑制浓度, 这就意味着诱发神经信号释放兴奋性电流的机制对于 TTX 的浓度变化更为敏感。

4. 讨论

在神经细胞分泌神经递质这一过程中, 钙离子起到了重要的作用, 钙离子的浓度升高会促进神经递质的释放[13] [14], 突触后电流就是由于释放的神经递质与相应的突触后受体结合后产生的。神经细胞的突触后电流由兴奋性突触后电流 EPSC 和抑制性突触后电流 IPSC 两种成分组成。兴奋性氨基酸递质谷氨酸和天冬氨酸会引起 EPSC, IPSC 则与抑制性氨基酸递质 γ-氨基丁酸有关[15] [16]。

神经递质的释放又可以分为自发释放与诱发释放, 两者的主要区别在于神经递质的释放是否需要动作电位的触发, 诱发释放是需要动作电位的触发的, 而自发释放不需要[17]。

本实验将关注点侧重于 TTX 抑制阻断 eIPSC 与 eEPSC 是否有区别以及不同浓度对于两者之间的影响趋势。

本实验通过使用大脑皮层神经元细胞在不同浓度 TTX 存在的条件下进行电生理实验来验证, 可以从最后的实验结果中发现, 随着 TTX 浓度的增加, 它对诱发的突触后电流的抑制作用逐步增强, 呈现出一种浓度依赖性关系。将 eIPSC 组与 eEPSC 组相比较, eEPSC 组的 IC₅₀ 明显大于 eIPSC 组, 这意味着诱发的突触后兴奋性神经递质的释放会对 TTX 的浓度变化更为敏感。

突触传递是一种突触前膜释放兴奋性或抑制性递质引起突触后膜产生兴奋性突触后电位或抑制性突触后电位的过程。至今尚未发现兴奋性突触与抑制性突触在精细结构上的特征性区别[18], 因此 eEPSC 比 eIPSC 对 TTX 的浓度变化更为敏感大概率不是因为受突触结构的影响。突触前膜释放兴奋性递质, 作用突触后膜上的受体, 引起细胞膜对 Na⁺、K⁺等离子的通透性, 主要是 Na⁺通透性增加, 因而 Na⁺内流, 出现局部去极化电位产生 EPSC。可以推测 eEPSC 对于河豚毒素浓度变化更敏感或许是 TTX 直接特异性作用于 Na⁺通道的原因, eEPSC 的出现必须有 Na⁺内流这一行为发生, TTX 阻断 Na⁺通道以至于 eEPSC 直接无法产生; 而 IPSC 是突触前膜释放抑制性递质, 导致突触后膜主要对 Cl⁻通透性增加, Cl⁻内流产生局部超极化电位, 此外 IPSC 的形成也可能与突触后膜 K⁺通道的开放或 Na⁺、Ca²⁺通道的关闭有关。所以 eIPSC 的产生主要是通过改变突触后膜上 Cl⁻通道的通透性, TTX 能够特异性得作用于 Na⁺通道, 对 K⁺、Ca²⁺等其它离子通道却无直接影响[19], 因此它对 eIPSC 的作用并不是影响主要通路 Cl⁻通道, 这是一种间接性的旁路影响行为, 因此在作用效率上 eEPSC 组会更高。至于 TTX 对于不同类型的神经递质是否会有不同的作用, 例如兴奋性递质的释放效率在受到 TTX 的影响, 更快得作用于突触后的受体, 或是在 TTX 影响下突触后受体与兴奋性递质结合速度比抑制性递质更快都还尚未可知, 仍需要进一步的研究进行探讨论证。

作为一种强效特异性的 Na⁺通道阻断剂, TTX 具有活性极高, 使用剂量极低的特点[20], 因此, 探求阻断钠离子通道电流的最低有效的 TTX 工作浓度也显示出一定重要性, 从本实验的结果也可以看出, 0.2 μM 是 TTX 在细胞层面上的一个浓度节点, 实验中至少要使用高于 0.2 μM 的 TTX, 突触后电流才能被完全阻断。已有的研究结果中, 河豚毒素处理实验已明确的工作浓度是 0.5 μM 或 1 μM [3] [4], 是远高于

本实验结论 0.2 μM 的, 这些浓度都可以完全抑制 Na^+ 通道信号的产生。在 Na^+ 通道电流对实验影响较大时选择较高浓度例如 0.5 μM 或 1 μM 的 TTX 进行实验, 以尽可能排除其干扰; 而在进行一些 Na^+ 通道电流对实验影响因素较小但仍需要阻断其信号时, 或者实验对 Na^+ 通道信号的抑制条件并不苛刻之时选择 0.2 μM 浓度的 TTX 可节约实验成本; 或是在实验细胞对于 TTX 毒性较为敏感时, 选取较低的工作浓度来抑制 Na^+ 通道可以在维持细胞充分活性时完成对 Na^+ 通道的阻断。

综上所述, 河豚毒素对不同类型的突触后电流影响不同, 且诱发的兴奋性突触后电流对河豚毒素浓度变化更敏感。

基金项目

湖北省自然科学基金(2020CFA025)、中南民族大学科学基金引进人才科研启动基金自科项目(ZZ13002)。

参考文献

- [1] Ragelis, E.P. (1982) Report on Seafood Toxins. *Journal of Association of Official Analytical Chemists*, **65**, 327-331.
- [2] Kao, C.Y. (1966) Tetrodotoxin, Saxitoxin and Their Significance in Study of Excitation Phenomen. *Pharmacological Reviews*, **18**, 997-1049.
- [3] 徐英, 张永鹤, 库宝善. 河豚毒素对钠通道的影响及其可能的镇痛机制[J]. 中国药理学通报, 2003, 19(3): 249-252.
- [4] 邓兴朝, 陈欢, 陈静, 黄连生. 河豚毒素对敏感性钠离子通道的作用及其与疼痛的关系[J]. 生物化工, 2019, 5(1): 127-131.
- [5] Ramirez, D.M. and Kavalali, E.T. (2011) Differential Regulation of Spontaneous and Evoked Neurotransmitter Release at Central Synapses. *Current Opinion in Neurobiology*, **21**, 275-282. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2011.01.007>
- [6] Meliom, J.E., Akbergenova, Y., Gavornik, J.P. and Troy Littleton, J. (2013) Spontaneous and Evoked Release Are Independently Regulated at Individual Active Zones. *Journal of Neuroscience*, **33**, 17253-17263. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3334-13.2013>
- [7] Wang, S., Chou, U.B., Gong, J., Yang, X., Li, Y., Wang, A.L., et al. (2017) Conformational Change of Syntaxin Linker Region Induced by Munc13s Initiates SNARE Complex Formation in Synaptic Exocytosis. *EMBO Journal*, **36**, 816-829. <https://doi.org/10.15252/emboj.201695775>
- [8] Gong, J., Lai, Y., Li, X., Wang, M., Leitz, J., Hu, Y., et al. (2016) C-Terminal Domain of Mammalian Complexin-1 Localizes to Highly Curved Membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **113**, E7590-E7599. <https://doi.org/10.1073/pnas.1609917113>
- [9] 阳小飞, 梅颖, 余意, 陈恒玲. 印防己毒素在不同类型突出分泌中的作用[J]. 中南民族大学学报, 2016, 35(3): 80-84.
- [10] Yang, X., Cao, P. and Südhof, T.C. (2013) Deconstructing Complexin Function in Activating and Clamping Ca^{2+} -Riggered Exocytosis by Comparig Knockout and Knockdown Phenotypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **110**, 20777-20782. <https://doi.org/10.1073/pnas.1321367110>
- [11] Kaeser-Woo, Y.J., Yang, X. and Südhof, T.C. (2012) C-Terminal Complexin Sequence Is Selectively Required for Clamping and Priming But Not for Ca^{2+} Triggering of Synaptic Exocytosis. *Journal of Neuroscience*, **32**, 2877-2885. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3360-11.2012>
- [12] 余意, 梅颖, 荣伊, 林显光. CNQX 在小鼠脑不同类型突出分泌中的作用[J]. 现代生物医学进展, 2017, 27(5): 5219-5222.
- [13] Yao, J., Gaffaney, J., Kwon, S.E. and Chapman, E.R. (2011) Doc2 Is a Ca^{2+} Sensor Required for Asynchronous Neurotransmitter Release. *Cell*, **147**, 666-677. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.09.046>
- [14] Smith, S.M., Chen, W., Vyleta, N.P., Williams, C., Lee, C.-H., Phillips, C., et al. (2012) Calcium Regulation of Spontaneous and Asynchronous Neurotransmitter Release. *Cell Calcium*, **52**, 226-233. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2012.06.001>
- [15] Correa, C.R., Kyle, D.J., Chakraverty, S. and Calixto, J.B. (1996) Antinociceptive Profile of the Pseudopeptide B2 Bradykinin Receptor Antagonist NPC 18688 in Mice. *British Journal of Pharmacology*, **117**, 552-558. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1996.tb15226.x>

-
- [16] Sara, Y., Bal, M., Adachi, M., Monteggia, L.M. and Kavalali, E.T. (2011) Use-Dependent AMPA Receptor Block Reveals Segregation of Apontaneous and Evoked Glutamatergic Neurotransmission. *The Journal of Neuroscience*, **31**, 5378-5382. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5234-10.2011>
- [17] Ge, S., Li, R., Qi, L., He, X. and Xie, Z. (2006) Spontaneous Neurotransmitter Release Depends on Intracellular Rather than ER Calcium Stores in Cultured Xenopus NMJ. *Tsinghua Science and Technology*, **11**, 440-446. [https://doi.org/10.1016/S1007-0214\(06\)70214-0](https://doi.org/10.1016/S1007-0214(06)70214-0)
- [18] 赵岩. 听觉皮层神经元的兴奋性突触后电流(EPSC)和抑制性突触后电流(IPSC)的不对称性[D]: [博士学位论文]. 广州: 南方医科大学, 2010.
- [19] 于翠萍, 王长都, 安建雄, 郭曲练. 河豚毒素可能的镇痛机制及镇痛作用[J]. 中国处方药, 2009(3): 82-84.
- [20] Deniel, M.S., Howard, L.F., Keith, G.D., Duncan, J.L. and Jones, M.R. (1998) Experimental Study of Tetrodotoxin, a Long-Acting Topical Anesthetic. *American Journal of Ophthalmology*, **125**, 481-487. [https://doi.org/10.1016/S0002-9394\(99\)80188-3](https://doi.org/10.1016/S0002-9394(99)80188-3)