

- 11 Paulino AC, Johnstone PAS. FDG-PET in radiotherapy treatment planning: Pandora's box? Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2004, 59(1): 4-5.
- 12 Frank SJ, Chao KS, Schwartz DL, et al. Technology insight: PET and PET/CT in head and neck tumor staging and radiation therapy planning. Nature Clin Pra Oncol, 2005, 2(10): 526-533.
- 13 Chao KS, Bosch WR, Mutic S, et al. A novel approach to overcome hypoxic tumor resistance: Cu-ATSM-guided intensity-modulated radiation therapy. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2001, 49 (4): 1171-1182.
- 14 Yao M, Crabam MM, Smith RB, et al. Value of FDG PET in assessment of treatment response and surveillance in head-and-neck cancer patients after intensity modulated radiation treatment: A preliminar report. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2004, 60 (5): 1410-1418.
- 15 Bucci MK, Bevan A, Roach M 3rd. Advances in radiation therapy: Conventional to 3D, to IMRT, to 4D, and beyond. CA Cancer J Clin, 2005, 55(2): 117-134.
- 16 Gould MK, Kuschner WC, Rydzak CE, et al. Test performance of positron emission tomography and computed tomography for mediastinal staging in patients with non-small-cell lung cancer. Ann Intern Med, 2003, 139(11): 879-892.
- 17 Bradley JD, Perez CA, Dehdashti F, et al. Implementing biologic target volumes in radiation treatment planning for non-small cell lung cancer. J Nucl Med, 2004, 45 (suppl1): 96-101.
- 18 De Ruyscher D, Wanders S, van Haren E, et al. Selective mediastinal node irradiation on the basis of the FDG-PET scan in patients with NSCLC is safe: results of a prospective clinical study. Radiother Oncol, 2004, 73 (suppl1): 135-143.

(收稿日期: 2006-12-24)

维甲酸在诱导再分化治疗分化型甲状腺癌中的价值

叶智轶 王辉 吴靖川

【摘要】分化型甲状腺癌约有30%肿瘤发生去分化,以致于术后¹³¹I治疗和甲状腺素替代治疗疗效差或无效。维甲酸作为维生素A的生物活性代谢产物,对于多种细胞的发生、增殖、分化起着重要的作用。多项研究发现,维甲酸诱导再分化治疗分化型甲状腺癌的潜力巨大。

【关键词】分化型甲状腺癌; 维甲酸; 再分化

【中图分类号】R817.5 【文献标识码】A 【文章编号】1673-4114(2007)04-221-05

The value of retinoic acid-induced redifferentiation in the treatment of differentiated thyroid carcinoma

YE Zhi-yi, WANG Hui, WU Jing-chuan

(Department of Nuclear Medicine, Xinhua Hospital, School of Medicine, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200092, China)

【Abstract】About 30% of differentiated thyroid carcinoma (DTC) loses its ability of differentiation, which results in poor or no effect of the radioiodine therapy and the thyroid hormone replacement therapy after operation. Retinoic acids, the biologically active metabolite of vitamin A, is of central importance for growth, proliferation and differentiation of various cells. In this review, summarized the mechanism of the dedifferentiation among the DTC, the retinoic acids-induced redifferentiation and the clinical use of retinoic acids. It is demonstrated by many studies that retinoic acids-induced redifferentiaon has a large potential in the treatment of DTC.

【Key words】Differentiated thyroid carcinoma; Retinoic acids; Redifferentiation

甲状腺癌是最常见的内分泌恶性肿瘤,其中大约有90%是乳头状甲状腺癌(papillary thyroid carcinoma, PTC)、滤泡性甲状腺癌(follicular thyroid

carcinoma, FTC)和混合性甲状腺癌(mixed follicular-papillary carcinoma, MTC),统称为分化型甲状腺癌(differentiated thyroid carcinoma, DTC)。目前常用的治疗方法是甲状腺全切术+¹³¹I治疗+甲状腺素替代治疗,进行如上治疗方案的患者5年生存率可以达到85%~90%。DTC中有10%~15%的患者病情呈进

作者单位: 200092, 上海交通大学医学院附属新华医院核医学科

通讯作者: 吴靖川(E-mail: wujingchuan@hotmail.com)

展性变化,出现局部复发或远处转移,其中约30%患者甲状腺细胞发生失分化。失分化的甲状腺癌细胞形态和功能均发生退行性改变,促甲状腺激素受体(thyroid-stimulating hormone receptor, TSHR)表达下降以及摄碘能力丧失,以致于¹³¹I治疗和甲状腺素替代治疗疗效差或无效^[1],这类患者的预后差、生存率低。因此,DTC的失分化已成为目前治疗DTC最棘手的问题之一。

维甲酸(retinoic acid, RA)是维生素A的生物活性代谢产物,它对于多种细胞的发生、增殖、分化起着重要的作用^[1,2]。1988年,我国学者应用全反式维甲酸(all-trans-retinoic acid, ATRA)诱导分化治疗急性早幼粒细胞白血病取得成功,完全缓解率达88%~91%,这一成果极大地推动了国内RA治疗恶性肿瘤的实验室和临床研究。目前已知RA有多种顺反式异构体,包括ATRA、13-顺式RA(13-cisRA)、11-顺式RA(11-cisRA)和9-顺式RA(9-cisRA)。近年来已有不少学者报道利用RA诱导再分化治疗DTC,现就作如下综述。

1 DTC失分化

在DTC发生过程中,肿瘤细胞经历了分化性改变,保留了正常甲状腺的部分功能。分化良好的甲状腺癌能够表达多种甲状腺标志蛋白,例如:甲状腺球蛋白(thyroglobulin, Tg)、甲状腺过氧化物酶(thyroid peroxidase, TPO)、TSHR、钠/碘同向转运体(sodium/iodide symporter, NIS)、5'-脱碘酶(type I iodothyronine-5'-deiodinase, 5'-DI)等,因而肿瘤细胞受TSH调节并能摄取碘。但在疾病发展过程中,肿瘤细胞的分化程度可以发生明显改变,因此可以降低或丧失部分上述标志蛋白基因的表达,以致于标志蛋白的表达亦降低。Elisei等^[3]曾发现随着分化性的降低,肿瘤细胞首先丧失NIS基因的表达,随后是Tg和TSHR基因。Kurebayashi等^[4]则发现某些失分化甲状腺癌肿瘤细胞株不表达上述部分标志蛋白,而分泌了另外一些细胞因子,如白细胞介素6(interleukin-6, IL-6)和白细胞抑制因子(leukemia inhibition factor, LIF)。IL-6经常由未分化甲状腺癌细胞所产生,而LIF则被认为是恶病质相关的细胞因子之一。DTC的失分化,目前认为主要有以下几个原因。

(1) 共存学说。在¹³¹I治疗前,低分化与良好

分化的肿瘤细胞就同时存在,经¹³¹I治疗后,摄碘能力强的细胞被选择性杀死,而摄碘能力差的细胞不易被杀死,由此增加了局部复发和远处转移的发生率。

(2) 在DTC中,p53基因是完整的。但经¹³¹I治疗后,未被杀死的DTC细胞或非肿瘤细胞的p53基因可能因辐射作用而发生变异,通常是p53基因本身或一些调控表达的因子发生异常,由此造成了肿瘤代谢上的改变,特别是Tg的表达下降和摄碘能力的丧失。对于甲状腺癌而言,p53基因的变异可能是一个晚期表现^[5]。

(3) 目前较多学者认为甲状腺癌摄碘能力降低的原因可能是由于NIS基因经¹³¹I多次治疗的辐射作用后发生突变,使NIS蛋白的表达下降。有研究使用逆转录聚合酶链反应定量法发现,PTC细胞的NIS mRNA及蛋白表达有所下降^[6],但在摄取降低的DTC(5例PTC、1例FTC)病例中,至今尚未发现NIS基因突变的证据^[7]。也有些学者发现,在一些甲状腺癌样本中,有超过50%者出现NIS蛋白表达增高,但癌细胞的恶性转变阻碍了NIS蛋白在细胞膜上的定位或干扰了NIS蛋白在细胞膜上的存留,导致摄碘能力很低。因此,¹³¹I治疗此类病例的疗效可能取决于如何提高NIS蛋白在细胞膜的靶向定位^[8,9]。

(4) 部分未经治疗(包括手术全切和放射性治疗)的DTC患者,其局部或远处转移的肿瘤病灶的分化程度要低于原发灶的分化程度,但具体机制尚需进一步研究。

2 RA诱导DTC再分化的机制

(1) RA治疗能影响与甲状腺碘代谢有关的5'-DI的活性,并能使其在甲状腺癌细胞的表达增加。5'-DI的表达水平与甲状腺癌细胞的分化程度相关,因为在5'-DI基因启动子上有一个RA反应元和一个三碘甲状腺原氨酸(triiodothyronine, T₃)反应元,所以RA能使5'-DI表达增加^[1,2]。

(2) FTC细胞株经ATRA治疗后,NIS mRNA及蛋白表达增高,并于治疗2周后摄碘增加^[10]。因此目前认为,RA治疗能上调DTC细胞NIS mRNA的水平,同时降低正常细胞NIS表达及抑制碘的摄取,这一特性在¹³¹I治疗DTC时能明显提高疗效和减少毒副作用。

(3) RA对DTC的再分化治疗需要肿瘤组织中存在完整的受体及信号转导途径。RA受体有2类:RA核受体(retinoic acid receptor, RAR)和RAX受体(retinoid X receptor, RXR),每一类受体又包括 α 、 β 、 γ 3个亚类和多种同分异构体。在甲状腺肿瘤细胞系和肿瘤组织中已经发现有RA受体表达,先前也有实验证明RA诱导DTC细胞再分化与其上调RAR- α 有关,而近期国外对RA受体的研究又有不少新的发现。Klopper等^[11]发现,某些甲状腺癌细胞株表达RXR- γ 和(或)过氧化物酶增殖体激活受体 γ (peroxisome proliferator-activated receptor- γ , PPAR- γ),PPAR- γ 是一种调控脂肪细胞分化的核受体,其配体为前列腺素和大多数噻唑烷二酮类抗糖尿病药物,在体内PPAR- γ 优先与RXR形成二聚体而发挥其作用。研究还发现,同时表达RXR- γ 和PPAR- γ 的DRO-90(未分化甲状腺癌)细胞株,给予其RXR- γ 配体或PPAR- γ 配体后,肿瘤细胞的增殖下降较表达其中一种核受体的细胞株明显,推测这可能是由于二聚体的协同作用所引起,当给予的两种配体各占50%时,作用更为明显;另外,同时表达两种受体可能与细胞凋亡的增加有关,RXR在其中的作用可能更大。Elisei等^[12]发现,ATRA在体外可以抑制NPA(低分化PTC细胞株)和WRO(低分化FTC细胞株)的生长,但无法抑制FRO和ARO(未分化甲状腺癌细胞株)的生长,其机制可能是由于早期的凋亡以及后期的DNA合成下降。实验发现,NPA和WRO的RAR- β mRNA阳性而FRO和ARO则阴性,因而推测细胞生长的抑制可能与RAR- β 有关。

(4) 钙黏蛋白E(E-cadherin)是肿瘤上皮的分化标记,其表达的减少通常被认为与失分化、细胞缺乏多态性、预后差相关。这在甲状腺癌中同样适用。在甲状腺细胞培养中,发现RA可以诱导钙黏蛋白E的表达。

(5) 肿瘤组织表达的细胞间黏附分子1(intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1)可以促进免疫系统对肿瘤细胞的细胞毒作用,RA可以上调PTC的ICAM-1 mRNA及其蛋白的表达。

(6) 碱性磷酸酶的表达水平是甲状腺癌分化的标志之一,研究表明,RA能使甲状腺癌细胞的碱性磷酸酶表达增加^[13]。

(7) CD97是一种分泌素受体超家族的二聚体

糖蛋白,通常用于手术后肿瘤组织的病理分型和分期。作为甲状腺癌的去分化标志,CD97在正常甲状腺组织中不表达,在DTC中不表达或低水平表达,在未分化甲状腺癌则高表达。Hoang-Vu等^[14]通过体外实验发现,在ATRA治疗72h后,CD97阳性的FTC-133细胞株CD97表达下降30%~50%,因而RA可能是通过降低CD97的表达来促进再分化。

(8) T_3 和RA对DTC细胞的相互协调作用。RA诱导DTC细胞再分化,导致5'-DI表达增加,致使体内 T_3 增加并增强 T_3 对细胞和组织的调节作用(包括细胞组织的发展、分化和自身稳定等方面), T_3 经甲状腺素应答元件亦能上调5'-DI的表达,使细胞或组织对RA的反应增强。

3 RA治疗的剂量及毒副作用

目前常用的治疗剂量为1~1.5mg·kg⁻¹·d⁻¹,疗程一般为5~8周^[15,16]。

RA治疗的毒副反应较轻,30%~40%的患者会出现皮肤、黏膜轻度或中度干燥及对紫外线敏感,较少出现皮肤脱屑、贫血、白细胞或血小板减少及因肝脏受损引起的肝酶升高^[17],因副反应终止疗程者更为少见。

4 评价RA疗效的指标

RA诱导再分化治疗的结果可以通过血清Tg水平、摄碘能力、肿瘤病灶的大小和葡萄糖代谢水平综合考虑来检测。血清Tg水平及其动态变化已被临床作为评价DTC复发、转移或活跃的标志。Grünwald等^[18]的研究发现,RA治疗有效组血清Tg值明显升高,表明RA诱导再分化过程中DTC细胞合成Tg的功能恢复。但Simon等^[19]发现,Tg浓度的高低与RA治疗疗效间无相关性,并认为DTC分化程度的增高、肿瘤病灶的增多或病灶体积的增大均可导致Tg增高。他们认为Tg增高主要表明病灶进展,而不是说明再分化。应用RA治疗后,DTC病灶恢复摄碘能力或对碘摄取能力的提高,是评价RA治疗有效的最主要和客观的指标,是能否进一步用¹³¹I治疗的关键指征,也是研究RA诱导分化治疗DTC的主要目的。但是RA治疗后摄碘能力的提高并不总是伴随着肿瘤病灶减小。肿瘤体积是最能反映分化影响力的指标,而超声或CT

测得的肿瘤病灶体积大小往往与实际值有较大的偏差,另外,一些有广泛转移灶的患者如肺转移,肿瘤体积的直接检测往往有较大的困难,对于这样的患者应用 ^{18}F -脱氧葡萄糖 (^{18}F -fluorodeoxyglucose, ^{18}F -FDG) PET 测定 DTC 病灶的葡萄糖代谢变化可以起到辅助判断肿瘤体积的作用,因为葡萄糖代谢在正常的甲状腺组织和 DTC 组织中比较低,而在失分化的 DTC 组织或转移灶中则增高^[19]。也有学者曾以如下流程图为方法^[15]。因而评价 RA 的疗效应该结合多个指标综合考虑。

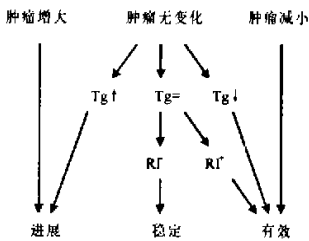


图1 评价 RA 疗效流程图

图中, RI: 摄碘率; ↑: 升高; =: 无变化; ↓: 降低

5 临床应用

Simon 等^[20]的一项研究在 20 例患者中进行, 结果发现 50% 患者经 RA 诱导后摄取碘; 19 例患者进行 Tg 检测, 其中 12 例升高 (63%)、6 例降低 (32%)、1 例无变化 (5%)。这次研究中, Tg 水平的高低和肿瘤大小或肿瘤再分化无相关性, 因而 Tg 变化的意义不清楚。另外, 8 例患者在 RA 治疗前后分别行 ^{18}F -FDA 检查, RA 治疗后 3 例摄取较治疗前有所减少, 5 例无明显改变; 3 例 ^{18}F -FDG 摄取减少者, 其结果与摄碘率、Tg 水平和肿瘤大小相符合。

之后, Simon 等^[19]用 RA 治疗 DTC 并长期随访 5~46 个月, 共有 75 例中的 50 例患者最终完成了临床数据的采集, 包括 25 例 PTC、14 例 FTC、6 例嗜酸性 FTC 和 5 例 MTC, 所有患者均接受过一次或数次外科和放射性核素治疗。患者用 RA $1.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ (除非因副作用治疗剂量减少到 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) 治疗 5 周, 评价疗效的参数为血清 Tg 水平、摄碘率和肿瘤大小, 数据分别在 RA 治疗前、治疗后立即和 6 个月以后采集。有 58% 的患者在治疗后出现副作用, 包括皮肤、口腔黏膜干燥以及较少发生的恶心、鼻出血、脱发、咳嗽和血象

的改变, 除有 1 例患者因为肝酶升高使治疗中断外, 其余患者对治疗的耐受性均较好。结果: RA 治疗后 21 例 (42%) 摄碘率提高, 29 例 (58%) 无变化, 没有患者摄碘率降低; 30 例 (60%) Tg 水平升高、12 例 (24%) 降低和 8 例 (12%) 无变化; 37 例患者进行了肿瘤大小的评估, 9 例 (18%) 增大、6 例 (12%) 减小和 22 例 (44%) 无变化; 有 20% 的患者 RA 治疗后有效 (包括肿瘤体积减小或稳定不变) 并伴有 Tg 水平降低或摄碘率提高; 长期的随访表明, 摄碘率提高并不总是和肿瘤体积减小相关, 一些肿瘤在体积增大的同时, 聚碘能力也相应增强。此项研究更好地说明了血清 Tg 水平和肿瘤大小的相互关系: 当肿瘤增大时 Tg 总是升高, 而当肿瘤体积稳定不变时 Tg 可以升高或降低。事实上, 6 例肿瘤减小的患者中有 5 例 Tg 是水平降低的。

Grünwald 等^[18]对 12 例患者进行 RA 治疗至少 8 周 ($1.18 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) 后, 2 例患者摄碘率明显提高, 3 例轻度提高, 其中 2 例为 PTC、2 例 FTC 和 1 例 MTC; 血 Tg 水平在 RA 治疗前和治疗后立即检测, 发现治疗有效组 Tg 水平升高。

Grüning 等^[11]研究了 14 例放射性核素扫描阴性但临床证实有肿瘤复发的患者: 这些患者的摄碘率降低并且 11 例被证实疾病呈进展性改变, RA 治疗后 5 例 (20%) 摄碘率提高, 尽管 2 例疾病仍持续进展。

6 RA 治疗疗效的影响因素及疗效的预测

研究表明, 肿瘤类型、局部复发、淋巴结转移或远处转移以及所用 RA 的剂量均不能决定 RA 治疗是否有效^[16]。至于疗效的预测, Haugen 等^[21]研究表明, 甲状腺癌细胞 RAR- β 和 RXR- γ 的表达不同, 似乎可以用来预测甲状腺癌患者对 RA 治疗的反应, 但这还需进一步观察。

7 存在的问题

(1) 明确 RA 治疗的指征。在 RA 治疗前, 应判定患者是否对 RA 治疗有反应, 从而选择性地进行治疗, 以获得更好的疗效。

(2) 如何提高 RA 治疗失分化 DTC 患者的疗效, 是目前面临的主要问题。

(3) RA 诱导失分化 DTC 细胞再分化的作用机制有待于进一步研究。

(4) RA 治疗的正确时间点如何控制。

(5) 如何评价 RA 治疗的疗效也是需要进一步探讨并且统一的问题。

(6) RA 能否用于预防 DTC 细胞的失分化, 此研究极有实用价值。

总之, RA 诱导再分化治疗失分化 DTC 患者的潜力是令人鼓舞的, 随着研究的进一步开展, 相信将会有更多的患者从中受益。

参 考 文 献

- Grüning T, Tiepolt C, Zphel K, et al. Retinoic acid for redifferentiation of thyroid cancer—does it hold its promise?. *Eur J Endocrinol*, 2003, 148(4):395–402.
- Schmutzler C, Hoang-Vu C, Ruger B, et al. Human thyroid carcinoma cell lines show different retinoic acid receptor repertoires and retinoid responses. *Eur J Endocrinol*, 2004, 150(4): 547–556.
- Elisei R, Pinchera A, Romei C, et al. Expression of thyrotropin receptor (TSH-R), thyroglobulin, thyroperoxidase, and calcitonin messenger ribonucleic acids in thyroid carcinomas: evidence of TSH-R gene transcript in medullary histotype. *J Clin Endocrinol Metab*, 1994, 78(4): 867–871.
- Kurebayashi J, Tanaka K, Otsuki T, et al. All-trans-retinoic acid modulates expression levels of thyroglobulin and cytokines in a new human poorly differentiated papillary thyroid carcinoma cell line, KTC-1. *J Clin Endocrinol Metab*, 2000, 85(8): 2889–2896.
- Schmutzler C, Khrle J. Innovative strategies for the treatment of thyroid cancer. *Eur J Endocrinol*, 2000, 143(1): 15–24.
- Ringel MD, Anderson J, Souza SL, et al. Expression of the sodium iodide symporter and thyroglobulin genes are reduced in papillary thyroid cancer. *Mod Pathol*, 2001, 14(4): 289–296.
- Russo D, Manole D, Arturi F, et al. Absence of sodium/iodide symporter gene mutations in differentiated human thyroid carcinomas. *Thyroid*, 2001, 11(1): 37–39.
- Dohan O, Baloch Z, Baurevi Z, et al. Predominant intracellular overexpression of the Na⁺/I⁻ symporter (NIS) in a large sampling of thyroid cancer cases. *J Clin Endocrinol Metab*, 2001, 86(6): 2697–2700.
- Tonacchera M, Viacava P, Agretti P, et al. Benign nonfunctioning thyroid adenomas are characterized by a defective targeting to cell membrane or a reduced expression of the sodium iodide symporter protein. *J Clin Endocrinol Metab*, 2002, 87(1): 352–357.
- 张一帆, 李彪, 赵龙, 等. 维甲酸诱导甲状腺癌细胞摄碘的实验研究. *中华核医学杂志*, 2005, 25(2): 90–93.
- Klopper JP, Hays WR, Sharma V, et al. Retinoid X receptor-gamma and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma expression predicts thyroid carcinoma cell response to retinoid and thiazolidinone treatment. *Mol Cancer Ther*, 2004, 3(8): 1011–1020.
- Elisei R, Vivaldi A, Agate L, et al. All-trans-retinoic acid treatment inhibits the growth of retinoic acid receptor β messenger ribonucleic acid expressing thyroid cancer cell lines but does not reinduce the expression of thyroid-specific genes. *J Clin Endocrinol Metab*, 2005, 90(4): 2403–2411.
- Coelho SM, Vaisman M, Carvalho DP. Tumor redifferentiation effect of retinoic acid: a novel therapeutic approach for advanced thyroid cancer. *Curr Pharm Des*, 2005, 11(19): 2525–2531.
- Hoang-Vu C, Bull K, Schwarz I, et al. Regulation of CD97 protein in thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab*, 1999, 84(3): 1104–1109.
- Simon D, Korber C, Krausch M, et al. Clinical impact of retinoids in redifferentiation therapy of advanced thyroid cancer: final results of a pilot study. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 2002, 29(6): 775–782.
- 张一帆, 贾士铨, 李彪, 等. 维甲酸诱导分化治疗甲状腺癌的临床研究. *中华内分泌代谢杂志*, 2006, 4(22): 101–110.
- 张雯杰, 郑容, 林琳, 等. 维甲酸诱导分化在分化型甲状腺癌治疗中的初步应用. *实用癌症杂志*, 2005, 20(4): 396–401.
- Grünwald F, Menzel C, Bender H, et al. Redifferentiation therapy-induced radioiodine uptake in thyroid cancer. *J Nucl Med*, 1998, 39(11): 1903–1906.
- Wang W, Larson SM, Fazzari M, et al. Prognostic value of [18F] fluorodeoxyglucose positron emission tomographic scanning in patients with thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab*, 2000, 85(3): 1107–1113.
- Simon D, Khrle J, Reiners C, et al. Redifferentiation therapy with retinoids: therapeutic option for advanced follicular and papillary thyroid carcinoma. *World J Surg*, 1998, 22(6): 569–574.
- Haugen BR, Larson LL, Pugazhenti U, et al. Retinoic acid and retinoid X receptors are differentially expressed in thyroid cancer and thyroid carcinoma cell lines and predict response to treatment with retinoids. *J Clin Endocrinol Metab*, 2004, 89(1): 272–280.

(收稿日期: 2006-12-24)