

# 发作性睡病研究进展

肖伏龙 张俊 韩芳

**【摘要】** 下丘脑 Hypocretin(Hcrt)/Orexin 能系统的发现及其与发作性睡病之间的关系是睡眠医学领域的重大研究进展之一。Hcrt/Orexin 是睡眠-觉醒周期调节的主要促醒物质。相关研究成果业已转化为临床应用,其中脑脊液 Hcrt/Orexin 测定已作为发作性睡病的诊断“金标准”和分型依据。发作性睡病患者下丘脑 Hcrt/Orexin 能神经元凋亡的遗传免疫学机制研究也获得突破性进展。针对 Hcrt/Orexin 受体的药物也成为睡眠障碍药物治疗的新靶点。

**【关键词】** 发作性睡病; 综述

## Research progress of narcolepsy

XIAO Fu-long<sup>1</sup>, ZHANG Jun<sup>2</sup>, HAN Fang<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Sleep Medicine Center, Department of Respiratory Medicine, <sup>2</sup>Department of Neurology, Peking University People's Hospital, Beijing 100044, China

Corresponding author: HAN Fang (Email: hanfang1@hotmail.com)

**【Abstract】** The discovery of hypothalamus Hypocretin (Hcrt)/Orexin system and its relationship with narcolepsy is one of the major advances in sleep medicine. Hcrt/Orexin is a significant neurotransmitter in the circadian cycle of arousal. Basic research about Hcrt/Orexin system has been applied in clinical practice and the measurement of Hcrt/Orexin in the cerebrospinal fluid (CSF) is the golden criteria and classification basis for diagnosis of narcolepsy. Breakthrough advance has been made in genetic immunology of hypothalamus Hcrt/Orexin neuronal apoptosis of narcolepsy patients. Medications aimed at Hcrt/Orexin receptors are considered to be a novel target in the treatment of sleep disorders.

**【Key words】** Narcolepsy; Review

This study was supported by the National Basic Research Development Program of China (973 Program, No. 2015CB856405) and Key International (Regional) Cooperation Program of National Natural Science Foundation of China (No. 81420108002).

既往 20 年间,睡眠研究领域的最大进展是探究下丘脑 Hypocretin(Hcrt)/Orexin 能系统与发作性睡病发病之间的关系,明确 Hcrt/Orexin 作为主要促醒物质在睡眠-觉醒周期调节和觉醒维持中的重要作用<sup>[1-2]</sup>。相关研究成果业已转化为临床应用,脑脊液 Hcrt/Orexin 测定作为常规检查方法,成为发作性睡病的诊断“金标准”和分型依据;Hcrt/Orexin 受体阻断剂成为治疗失眠的新型药物。更重要的是,发

性睡病患者下丘脑 Hcrt/Orexin 能神经元凋亡的遗传免疫学机制研究取得突破性进展<sup>[3]</sup>,为探索新的治疗方法和探讨其他具有免疫性脑病的机制提供借鉴。

我国发作性睡病研究的历史近 20 年<sup>[4-6]</sup>,搭载国际发作性睡病研究的快车道,针对我国患者发病早的特点,形成独特的研究特色,建立临床、电生理学、生物化学和基因检测的诊断体系,但限于条件,药物研发和引进方面尚待提高。

### 一、发作性睡病的遗传免疫学机制

发作性睡病的病因目前尚不明确,考虑是环境因素与遗传因素相互作用的结果。动物发作性睡病的发病与下丘脑 Hcrt/Orexin 及其受体基因突变有关<sup>[1,3]</sup>;人类发作性睡病的发病是由于免疫损伤致下丘脑 Hcrt/Orexin 能神经元凋亡、激素分泌减少,

doi:10.3969/j.issn.1672-6731.2017.09.004

基金项目:国家重点基础研究发展计划(973 计划)项目(项目编号:2015CB856405);国家自然科学基金重点国际(地区)合作研究项目(项目编号:81420108002)

作者单位:100044 北京大学人民医院呼吸内科睡眠中心(肖伏龙、韩芳),神经内科(张俊)

通讯作者:韩芳(Email:hanfang1@hotmail.com)

导致脑脊液 Hcrt/Orexin 水平显著降低或缺失<sup>[3,7]</sup>。关于下丘脑 Hcrt/Orexin 能神经元凋亡的机制,近年研究显示,病毒特别是甲型 H1N1 流感病毒感染介导的免疫损伤可能是其主要机制之一<sup>[3]</sup>。

首先,目前发现的发作性睡病相关基因均与免疫损伤有关。发作性睡病与人类白细胞抗原(HLA)具有高度相关性,HLA DQB1\*0602(HLA DQw6 亚型)在各种族发作性睡病患者中均呈现较高的阳性率,达 88%~100%,其中,我国典型发作性睡病患者 HLA DQB1\*0602 阳性率高达 95%,远高于正常人群的 23%<sup>[8]</sup>,提示由主要组织相容性复合物 II 型(MHC II)DQA1-DQB1 异二聚体介导的 CD4<sup>+</sup>T 细胞抗原递呈参与 1 型发作性睡病的核心发病机制<sup>[9]</sup>。其他参与发作性睡病发病的编码 MHC II 蛋白的 HLA 基因有 HLA DQB1\*0301、HLA DPB1\*0501、HLA DPB1\*0401、HLA DPB1\*0402。此外,参与自然杀伤 T 细胞(NKT)或 CD8<sup>+</sup>T 细胞抗原递呈的 MHC I 蛋白亦参与发作性睡病的发病,编码这些蛋白的基因主要包括 HLA A\*1101、HLA B\*3501、HLA B\*5101、HLA C\*0401<sup>[9]</sup>。发作性睡病的非 HLA 易感基因包括 P2RY11、ZNF365、IL10RB-IFNAR1 和 T 细胞受体(TCR)。值得注意的是,我国发作性睡病与 TCRA 和 TCRB 基因有关,提示 T 淋巴细胞介导的细胞免疫应答参与发作性睡病的发病<sup>[10]</sup>。

其次,发作性睡病的发病具有季节性,以 4~7 月为发病高峰、12~1 月为发病低谷,符合病毒感染诱发免疫性脑病的规律<sup>[11]</sup>。2009 年,甲型 H1N1 流感暴发后,欧洲国家发作性睡病发病率增加,与应用甲型 H1N1 流感病毒疫苗 Pandemrix 有关<sup>[12]</sup>。我国 2009~2010 年甲型 H1N1 流感暴发期间,发作性睡病发病率也明显增加<sup>[11]</sup>;流感暴发期过后,发作性睡病发病率降至基线水平,而疫苗使用率仅 6%,提示此期间发作性睡病的发病与甲型 H1N1 流感病毒相关<sup>[11,13]</sup>。尽管甲型 H1N1 流感病毒或其疫苗相关发作性睡病的临床表现与其他睡病无明显差异,但甲型 H1N1 流感流行期间,仅携带 HLA DQB1\*0602 杂合子即可发生发作性睡病,而未感染甲型 H1N1 流感病毒的发作性睡病患者多为 HLA DQB1\*0602 纯合子,且遗传相关性随时间和环境因素而改变<sup>[10]</sup>。晚近研究显示,甲型 H1N1 流感病毒感染可以导致动物发作性睡病<sup>[14]</sup>,证实甲型 H1N1 流感病毒本身可能包含诱发免疫反应的抗原,疫苗致病性与其中的流感病毒抗原有关,可能的致病机制为甲型

H1N1 流感病毒 H 抗原与下丘脑 Hcrt/Orexin 受体存在交叉抗原,从而诱发自身免疫反应<sup>[15]</sup>。

由此可见,甲型 H1N1 流感病毒经 HLA DQB1\*0602 递呈到 T 淋巴细胞表面,通过激活 T 淋巴细胞受体的免疫机制损伤下丘脑 Hcrt/Orexin 能神经元是发作性睡病的重要发病机制,然而,周围免疫反应如何突破血-脑屏障而特异性攻击下丘脑 Hcrt/Orexin 能神经元尚待进一步研究。

## 二、发作性睡病的诊断

2014 年,美国睡眠医学会(AASM)发布的睡眠障碍国际分类第 3 版(ICSD-3)<sup>[16]</sup>将发作性睡病分为 1 型和 2 型发作性睡病,即伴(1 型发作性睡病)和不伴(2 型发作性睡病)下丘脑 Hcrt/Orexin 水平降低。其中,1 型发作性睡病的诊断须同时满足下述 2 项标准:(1)每天均出现难以抑制的嗜睡,持续  $\geq 3$  个月。(2)具备以下 2 种条件中 1 种:①猝倒发作和多次睡眠潜伏期试验(MSLT)平均睡眠潜伏期(SL)  $\leq 8$  分钟,出现 2 次或以上睡眠始发的快速眼动睡眠(SOREMP);睡眠起始 15 分钟内出现的快速眼动睡眠(REM)可以替代 MSLT 试验中的一次睡眠始发的快速眼动睡眠。②放射免疫法(RIA)测定脑脊液 Hcrt-1/Orexin-1 水平  $\leq 110$  pg/ml 或低于以同一标准检验的正常对照者平均值的 1/3。对于无猝倒发作的患者,如果同时满足上述(1)和(2)中的②标准,亦诊断为 1 型发作性睡病。2 型发作性睡病的诊断须同时满足下述 5 项标准:(1)每天均出现难以抑制的嗜睡,持续  $\geq 3$  个月。(2)MSLT 试验平均睡眠潜伏期  $\leq 8$  分钟,出现 2 次或以上睡眠始发的快速眼动睡眠;睡眠起始 15 分钟内出现的快速眼动睡眠期可以替代 MSLT 试验中的 1 次睡眠始发的快速眼动睡眠。(3)无猝倒发作。(4)未测定脑脊液 Hcrt-1/Orexin-1,或测定的脑脊液 Hcrt-1/Orexin-1 水平  $> 110$  pg/ml,或超过以同一标准检验的正常对照者平均值的 1/3。(5)嗜睡和(或)MSLT 试验结果不能以其他原因更好地解释,如睡眠不足、阻塞性睡眠呼吸暂停(OSA)、睡眠时相延迟、应用药物或毒品。一旦脑脊液 Hcrt-1/Orexin-1 水平  $\leq 110$  pg/mL 或低于正常对照者平均值的 1/3,2 型发作性睡病的诊断即更改为 1 型发作性睡病。值得注意的是,发作性睡病可以继发于其他疾病,故应考虑病因诊断,引起发作性睡病的病因多见于中枢神经系统疾病,如自身免疫性脑炎、下丘脑肿瘤、缺血性或出血性卒中、颅脑创伤(TBI)等。

发作性睡病的明确诊断还应结合临床表现、实验室检查和客观量表评价,主要包括日间 MSLT 试验、夜间多导睡眠图(PSG)监测、血清人类白细胞抗原分型和脑脊液 Hcrt/Orexin 测定<sup>[17]</sup>。MSLT 试验是评价白天过度嗜睡(EDS)的客观方法,发作性睡病患者 MSLT 试验平均睡眠潜伏期缩短,可见 2 次或以上睡眠始发的快速眼动睡眠,其诊断灵敏度和特异度均约 70%,常于前夜多导睡眠图监测后进行,目的是确保进行 MSLT 试验前有充足的睡眠。此外,约有 50% 的发作性睡病患者多导睡眠图监测显示夜间睡眠 15 分钟内出现睡眠始发的快速眼动睡眠,诊断特异度达 99%<sup>[18]</sup>。多导睡眠图监测还有助于发现共病的其他睡眠障碍或进行鉴别诊断。进行 MSLT 试验前至少佩戴 1 周体动记录仪(actigraphy)并记录睡眠日志,有助于确定是否存在睡眠不足、倒班工作或其他昼夜节律紊乱,从而更好地判读 MSLT 试验结果。

HLA DQB1\*0602 基因呈阳性支持发作性睡病,但是由于特异性不高,已不再作为诊断标准。脑脊液 Hcrt-1/Orexin-1 水平  $\leq 110$  pg/ml 或低于正常对照者平均值的 1/3 可以作为发作性睡病的明确诊断和分型依据。我国发作性睡病患者脑脊液 Hcrt-1/Orexin-1 的诊断界值基本一致<sup>[19]</sup>,对伴猝倒的典型发作性睡病的诊断灵敏度和特异度均达 95% 以上,而仅 25% 不伴猝倒的患者脑脊液 Hcrt-1/Orexin-1 水平  $\leq 110$  pg/ml,对经济条件不允许、幼儿等不能配合检查、应用抗精神病药且试验前难以停药、部分诊断困难患者有重要价值。近年研究显示,同时伴猝倒和 HLA DQB1\*0602 基因阳性的典型发作性睡病患者中 99% 可能存在脑脊液 Hcrt/Orexin 缺乏,无需腰椎穿刺等创伤性手段获取脑脊液即可准确预测并分型,进而统一疾病表型<sup>[17,20]</sup>。

### 三、发作性睡病的治疗

发作性睡病的治疗目标是改善症状,目前尚无针对发病机制的药物问世<sup>[21]</sup>,而静脉注射免疫球蛋白(IVIg)等免疫抑制治疗基本无效。由于下丘脑分泌的 Hcrt/Orexin 难以透过血-脑屏障,只有经脑室内注射或经鼻吸入才能发挥疗效,但后者持续时间较短,难以在临床推广应用。

1. 针对白天过度嗜睡的药物 主要是神经系统兴奋药,包括传统的中枢兴奋药如盐酸哌甲酯、安非他命,新型中枢兴奋药如莫达非尼、 $\gamma$ -羟丁酸钠,此外,单胺氧化酶抑制剂(MAOI)司来吉兰对白天过

度嗜睡和猝倒也有效<sup>[22-23]</sup>。传统的中枢兴奋药起效迅速,但不良反应明显;新型中枢兴奋药安全性良好,无成瘾性,且极少出现不良反应。临床首选的一线药物为莫达非尼、 $\gamma$ -羟丁酸钠;对于耐药或无效者,可选择盐酸哌甲酯、司来吉兰;极少数药物治疗无效者,可选择安非他命。目前尚未见推荐上述药物联合应用的循证医学证据。组胺 H3 受体阻断剂对嗜睡的改善效果良好。

2. 针对猝倒发作的药物 上述药物中  $\gamma$ -羟丁酸钠、司来吉兰同时具有抗猝倒作用<sup>[22-23]</sup>。此外,三环类抗抑郁药如丙咪嗪、氯丙咪嗪、普罗替林也是常用的抗猝倒药且对睡眠瘫痪和睡眠幻觉有效。低于抗抑郁剂量即可发挥疗效,但不良反应较多。新型选择性 5-羟色胺再摄取抑制剂(SSRI)如氟西汀、帕罗西汀以及 5-羟色胺和去甲肾上腺素再摄取抑制剂(SNRI)如文拉法辛对猝倒发作也有效,抗猝倒剂量高于抗抑郁剂量,不良反应较少,但疗效弱于三环类抗抑郁药。

3. 儿童及围产期治疗 儿童首选非药物治疗,如认知行为疗法(CBT);对于猝倒严重的患儿,应首选  $\gamma$ -羟丁酸钠。妊娠期和哺乳期女性患者不建议上述药物治疗。

综上所述,遗传免疫学参与发作性睡病的核心发病机制,脑脊液 Hcrt/Orexin 能神经元凋亡是其重要病理生理学特点,针对 Hcrt/Orexin 受体的治疗是未来睡眠医学领域的主要研究方向之一。

### 参 考 文 献

- [1] Liblau RS, Vassalli A, Seifinejad A, Tafti M. Hypocretin (Orexin) biology and the pathophysiology of narcolepsy with cataplexy. *Lancet Neurol*, 2015, 14:318-328.
- [2] Xu X, Wu HJ, Zhuang JH, Zhao ZX. Circadian characteristics of spontaneous physical activity and body temperature in narcoleptic patients. *Zhongguo Xian Dai Shen Jing Ji Bing Za Zhi*, 2016, 16:435-441.[徐兴, 吴惠涓, 庄建华, 赵忠新. 发作性睡病患者自发性体动及体温昼夜特征分析. *中国现代神经疾病杂志*, 2016, 16:435-441.]
- [3] Singh AK, Mahlios J, Mignot E. Genetic association, seasonal infections and autoimmune basis of narcolepsy. *J Autoimmun*, 2013, 43:26-31.
- [4] Han F. Narcolepsy in China: when the east meets the west. *Sleep Med*, 2014, 15:605-606.
- [5] Han F, Chen E, Wei H, Dong X, He Q, Ding D, Strohl KP. Childhood narcolepsy in North China. *Sleep*, 2001, 24:321-324.
- [6] Han F, Lin L, Li J, Aran A, Dong SX, An P, Zhao L, Li M, Li QY, Yan H, Wang JS, Gao HY, Li M, Gao ZC, Strohl KP, Mignot E. Presentations of primary hypersomnia in Chinese children. *Sleep*, 2011, 34:627-632.
- [7] Wu HJ, Yang T, Zhu Y, Yang Y, Zhao ZX. Research progress of immunologic mechanism of narcolepsy. *Zhongguo Xian Dai*

- Shen Jing Ji Bing Za Zhi, 2013, 13:377-382.[吴惠涓, 杨涛, 朱嫣, 杨洋, 赵忠新. 发作性睡病免疫学机制. 中国现代神经疾病杂志, 2013, 13:377-382.]
- [8] Han F, Lin L, Li J, Dong SX, An P, Zhao L, Liu NY, Li QY, Yan H, Gao ZC, Faraco J, Strohl KP, Liu X, Miyadera H, Mignot E. HLA - DQ association and allele competition in Chinese narcolepsy. *Tissue Antigens*, 2012, 80:328-335.
- [9] Ollila HM, Ravel JM, Han F, Faraco J, Lin L, Zheng X, Plazzi G, Dauvilliers Y, Pizza F, Hong SC, Jennum P, Knudsen S, Kornum BR, Dong XS, Yan H, Hong H, Coquillard C, Mahlios J, Jolanki O, Einen M, Arnulf I, Högl B, Frauscher B, Crowe C, Partinen M, Huang YS, Bourgin P, Vaarala O, Désautels A, Montplaisir J, Mack SJ, Mindrinos M, Fernandez - Vina M, Mignot E. HLA - DPB1 and HLA class I confer risk of and protection from narcolepsy. *Am J Hum Genet*, 2015, 96:136-146.
- [10] Han F, Faraco J, Dong XS, Ollila HM, Lin L, Li J, An P, Wang S, Jiang KW, Gao ZC, Zhao L, Yan H, Liu YN, Li QH, Zhang XZ, Hu Y, Wang JY, Lu YH, Lu CJ, Zhou W, Hallmayer J, Huang YS, Strohl KP, Pollmächer T, Mignot E. Genome wide analysis of narcolepsy in China implicates novel immune loci and reveals changes in association prior to versus after the 2009 H1N1 influenza pandemic. *PLoS Genet*, 2013, 9: E1003880.
- [11] Han F, Lin L, Warby SC, Faraco J, Li J, Dong SX, An P, Zhao L, Wang LH, Li QY, Yan H, Gao ZC, Yuan Y, Strohl KP, Mignot E. Narcolepsy onset is seasonal and increased following the 2009 H1N1 pandemic in China. *Ann Neurol*, 2011, 70:410-417.
- [12] Partinen M, Saarenpää - Heikkilä O, Ilveskoski I, Hublin C, Linna M, Olsén P, Nokelainen P, Alén R, Wallden T, Espo M, Rusanen H, Olme J, Sätälä H, Arikka H, Kaipainen P, Julkunen I, Kirjavainen T. Increased incidence and clinical picture of childhood narcolepsy following the 2009 H1N1 pandemic vaccination campaign in Finland. *PLoS One*, 2012, 7:E33723.
- [13] Han F, Lin L, Li J, Dong XS, Mignot E. Decreased incidence of childhood narcolepsy 2 years after the 2009 H1N1 winter flu pandemic. *Ann Neurol*, 2013, 73:560.
- [14] Tesoriero C, Codita A, Zhang MD, Cherninsky A, Karlsson H, Grassi - Zucconi G, Bertini G, Harkany T, Ljungberg K, Liljeström P, Hökfelt TG, Bentivoglio M, Kristensson K. H1N1 influenza virus induces narcolepsy - like sleep disruption and targets sleep-wake regulatory neurons in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113:E368-377.
- [15] Ahmed SS, Volkmuth W, Duca J, Corti L, Pallaoro M, Pezzicoli A, Karle A, Rigat F, Rappuoli R, Narasimhan V, Julkunen I, Vuorela A, Vaarala O, Nohynek H, Pasini FL, Montomoli E, Trombetta C, Adams CM, Rothbard J, Steinman L. Antibodies to influenza nucleoprotein cross - react with human hypocretin receptor 2. *Sci Transl Med*, 2015, 7:294ra105.
- [16] American Academy of Sleep Medicine. International classification of sleep disorders, 3rd ed. Darien: American Academy of Sleep Medicine, 2014: 1-53.
- [17] Han F. Sleepiness that cannot be overcome: narcolepsy and cataplexy. *Respirology*, 2012, 17:1157-1165.
- [18] Andlauer O, Moore H, Jouhier L, Drake C, Peppard PE, Han F, Hong SC, Poli F, Plazzi G, O'Hara R, Haffen E, Roth T, Young T, Mignot E. Nocturnal rapid eye movement sleep latency for identifying patients with narcolepsy/hypocretin deficiency. *JAMA Neurol*, 2013, 70:891-902.
- [19] Dong XS, Li YQ, Li J, An HY, Liu YN, Zhang XZ, An P, Yan H, Zhao L, Li QH, Yang BX, Gao ZC, Han F. Value of cerebral spinal fluid measurement of hypocretin - 1 in the diagnosis of Chinese patients with narcolepsy. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 2013, 93:2038-2042.[董霄松, 李玉茜, 李静, 安海燕, 刘亚男, 张晓喆, 安培, 闫涵, 赵龙, 李清华, 杨拔贤, 高占成, 韩芳. 脑脊液下丘脑分泌素水平测定对中国发作性睡病患者的诊断价值. 中华医学杂志, 2013, 93:2038-2042.]
- [20] Han F, Lin L, Schormair B, Pizza F, Plazzi G, Ollila HM, Nevsimalova S, Jennum P, Knudsen S, Winkelmann J, Coquillard C, Babrzadeh F, Strom TM, Wang C, Mindrinos M, Fernandez Vina M, Mignot E. HLA DQB1\*06:02 negative narcolepsy with Hypocretin/Orexin deficiency. *Sleep*, 2014, 37: 1601-1608.
- [21] Scammell TE. Narcolepsy. *N Engl J Med*, 2015, 373:2654-2662.
- [22] Li J, Liu L, Li MQ, Zhang WW, Si Y. Evidence - based evaluation of therapeutic measures for sleep disorders. *Zhongguo Xian Dai Shen Jing Ji Bing Za Zhi*, 2013, 13:398-404. [李娟, 刘凌, 李梦秋, 张文武, 司洋. 睡眠障碍的循证治疗. 中国现代神经疾病杂志, 2013, 13:398-404.]
- [23] Yan B, Guo JT, Li LP. Clinical effect of venlafaxine combined with methylphenidate hydrochloride on narcolepsy. *Zhongguo Xian Dai Shen Jing Ji Bing Za Zhi*, 2013, 13:961-963.[闫斌, 郭金涛, 李莉萍. 文拉法辛联合盐酸哌甲酯对发作性睡病的初步疗效观察. 中国现代神经疾病杂志, 2013, 13:961-963.]

(收稿日期:2017-08-07)

## 欢迎订阅 2018 年《中国现代神经疾病杂志》

《中国现代神经疾病杂志》为国家卫生和计划生育委员会主管、中国医师协会主办的神经病学类专业期刊。办刊宗旨为:理论与实践相结合、普及与提高相结合,充分反映我国神经内外科临床科研工作重大进展,促进国内外学术交流。所设栏目包括述评、专论、论著、临床病理报告、应用神经解剖学、神经影像学、循证神经病学、流行病学调查研究、基础研究、临床研究、综述、临床医学图像、病例报告、临床病理(例)讨论、新技术新方法等。

《中国现代神经疾病杂志》为国家科技部中国科技论文统计源期刊,国内外公开发行。中国标准连续出版物号:ISSN 1672-6731;CN 12-1363/R。国际大 16 开型,彩色插图,48 页,月刊,每月 25 日出版。每期定价 15 元,全年 12 册共计 180 元。2018 年仍由邮政局发行,邮发代号:6-182。请向全国各地邮政局订阅,亦可直接向编辑部订阅(免邮寄费)。

编辑部地址:天津市津南区吉兆路 6 号天津市环湖医院 A 座二楼西区,邮政编码:300350。

联系电话:(022)59065611,59065612;传真:(022)59065631。网址:www.xdjb.org(中文),www.cjcn.org(英文)。