

Conjugated Linoleic Acid (CLA)가 돼지 지방세포와 근육세포의 증식과 분화에 미치는 영향

정정수 · 김혜림 · 강지나 · 김내수

충북대학교 농업생명환경대학 축산학과

Effect of Conjugated Linoleic Acid (CLA) on Proliferation and Differentiation of Porcine Adipocyte and Muscle Cell

C. S. Chung, H. R. Kim, J. N. Kang and N. S. Kim

Department of Animal Science, Chungbuk National University

ABSTRACT

The current study was undertaken to determine the effect of conjugated linoleic acid (CLA) isomers, cis-9, cis-11 (c9c11), cis-9, trans-11 (c9t11), trans-9, trans-11 (t9t11), trans-10, cis-12 (t10c12) on differentiation of pig preadipocytes and myogenic satellite cells during culture. Cells were isolated from new born pigs. The t10c12 isomer decreased differentiation of pig preadipocytes (92%), but not that of myogenic cells. The t9t11 isomer decreased differentiation of preadipocytes (14%) and increased that of myogenic cells (26%). No other CLA isomers affected differentiation of preadipocytes or myogenic cells. The effects of CLA on proliferation of preadipocytes and myogenic cells were small, compared to the effects on differentiation. These results suggest that CLA isomers have different effects on differentiation of pig preadipocytes and myogenic cells.

(Key words : CLA, Pig, Preadipocyte, Myogenic satellite cells, Differentiation)

I. 서 론

Conjugated linoleic acid(CLA)는 linoleic acid (LA)의 이성체로서, LA는 이중결합이 9번과 12번 탄소에 있고, 모두 cis형인데, CLA는 이중결합이 9번과 11번 또는 10번과 12번 등의 탄소에 있고, cis형 뿐만 아니라 trans형도 있다. CLA의 항암작용, 항동맥경화작용, 항비만작용 등이 알려졌기에(Pariza 등 2000; Brown과 McIntosh, 2003; Azain, 2004), 최근에 와서 건강보조제로서 주목을 받게 되었다. CLA의 가축의 생산과

관련된 작용으로는 지방축적 억제작용이 중요시되고 있는데 돼지에게 CLA를 급여한 결과 지방축적이 억제되었음이 보고되었다(Dugan등, 1997; Ostrowska 등, 2003; Dugan 등, 2004). 이에 대한 작용 구명과 관련해서 CLA의 지방전구세포의 분화에 미치는 작용에 대한 연구가 수행되어 왔다(Brodie 등, 1999; Evans 등, 2001; Kang 등, 2003). Brown 등(2003)은 trans-10, cis-12 CLA가 사람 지방전구세포의 분화를 억제했다고 보고했는데 McNeel과 Mersmann(2003) 돼지 지방전구세포를 이용한 실험에서 CLA가

Corresponding author : C.S. Chung, Department of Animal Science, Chungbuk National University, Cheongju, Chungbuk 361-763, Korea.
Tel : +82-43-261-2549, Fax : +82-43-276-3140, E-mail : chungpig@hotmail.com

돼지지방세포의 분화를 촉진시켰다고 보고했다. 이 사실은 CLA 급여가 돼지의 지방축적을 억제한 연구결과를 설명해 주기는 어려운 것이다. 그리고 대부분의 CLA의 지방세포 분화에 미치는 작용에 관한 연구는 한, 두가지 CLA 이성체의 작용만 구명했는데 CLA를 돼지의 생산성 향상을 위한 사료첨가제로 사용할 경우 가급적 여러 이성체의 작용을 구명할 필요가 있다.

한편 CLA가 근육세포의 분화에 미치는 작용에 대한 연구는 극히 적은 편이다(Hurley 등, 2006). 근육이 많고 지방이 적은 돼지고기 생산의 측면에서 볼 때 어느 특정 CLA 이성체가 지방세포의 분화는 억제하고, 근육세포의 분화를 촉진한다면 매우 이상적일 것이다. 그러나 지금까지 CLA의 지방세포와 근육세포의 분화에 미치는 작용을 동시에 수행한 연구는 없었다.

따라서 본 연구는 여러 CLA 이성체가 돼지에서 분리, 배양한 지방전구세포와 근육세포의 분화에 미치는 작용을 구명하기 위해서 수행하였다.

II. 재료 및 방법

1. 지방전구세포 배양 및 CLA 처리

1) 돼지 지방전구세포의 분리 및 배양

지방전구세포(stroma-vascular cell)는 신생자돈의 등지방 조직에서 분리해서 배양했는데, 세포분리 및 배양은 Suryawan 등(1997)의 방법을 따르면서 본 연구실에서 변경해서 확립한 방법(문과 정, 2004)을 이용했다. 본 연구에서 사용한 돼지 지방전구세포의 분리 및 배양 방법을 간략히 설명하면 다음과 같다.

생후 1~2일령 된 신생자돈을 CO₂ gas를 주입하여 질식사 시킨 후 등지방 조직을 떼어냈다. 떼어낸 지방조직을 잘게 세절한 후 collagenase와 함께 shaking water bath에서 40분 동안 배양

후 250 μ m nylon screen으로 여과해서 소화 안된 지방조직을 제거했다. 여과 후 원심분리해서 지방전구세포가 들어있는 침전물을 KRB 용액으로 분산해서 다시 원심분리 후 75 μ m nylon screen으로 여과해서 지방전구세포를 수집했다. 10% fetal bovine serum(FBS)를 함유한 Dulbecco's Modified Eagle's Medium/F-12 ham (DMEM/F-12)를 이용하여 6-well plate에 1X 10⁶ cell/well을 접종했다. 접종한 다음날 적혈구 등을 제거하기 위해 세척한 후 분화유도(day 0)를 위해 insulin(600 ng/ml), transferrin(1 ng/ml) 및 hydrocortisone(500 ng/ml)과 5% FBS를 함유한 DMEM/F-12를 세포배양이 끝날 때까지 사용했으며 배지는 2일마다 교체했다.

2) 배양 중인 지방세포에 Conjugated linoleic acid (CLA) 처리

본 실험에 사용한 CLA는 ci-9, cis-11(c9c11), cis-9, trans-11(c9t11), trans-9, trans-11(t9t11) 그리고 trans-10, cis-12(t10c12) 이었으며, 미국 Materya 사(State College, Pennsylvania, USA)에서 구입했다. 대조구로는 이들 CLA를 녹이는 같은 부피의 dimethyl sulfoxide(DMSO)를 처리했다. 최종 CLA 처리농도는 50 μ M 이었고 4일 동안(day 0~day 4) CLA를 처리하였다. 세포분화는 CLA 처리 종료 3일 후에 측정했고, 세포 수는 CLA 처리 종료 시에 측정했다.

3) 지방세포 분화 및 세포 수 측정

돼지 지방전구세포의 성숙세포로의 분화정도는 배양중인 세포의 glycerol-3-phosphate dehydrogenase(GPDH)의 활성도를 측정함으로써 구명했는데, 문과 정(2004)의 방법을 따랐다. 그리고 세포수의 측정은 Roche에서 제조한 kit로 formazan 형성을 측정하는 WST-1을 사용했다.

위에서 설명한 지방세포의 분화 및 증식, 그리고 다음에 설명할 근육세포의 분화 및 증식에 미치는 CLA의 작용을 구명하기 위해 4마리의 신생자돈으로부터 세포를 분리하였다.

2. 근육세포의 배양 및 CLA 처리

1) 돼지 근육 satellite cell의 분리 및 배양

돼지 근육 satellite cell의 분리는 Doumit 등 (1992)의 방법을 주로 따랐는데 구체적으로 설명하면 다음과 같다. 생후 1~2일령 된 신생 암 돼지를 CO₂ gas를 주입하여 질식사 시킨 후 요 오드와 70% alcohol로 깨끗이 씻었다. 뒷다리의 대퇴부의 안쪽의 피부를 벗겨낸 후 얇은 근육 층 아래에 있는 근육(semimembranous)을 떼어냈다. 근육조직을 잘게 세절한 뒤 삼각 플라스크에 옮긴 후 조직 g당 6 unit의 protease를 3 ml의 PBS에 녹인 후 37°C에서 shaking water bath에서 40분 동안 배양하였다. 배양 후 1200 xg에서 15분동안 원심분리 후 침전물을 수집했다. 300 xg에서 5분동안 원심분리 후 근육세포가 들어있는 상층액을 수집했다. 모든 상층액을 1200 xg에서 15분동안 원심분리 후 침전물을 10% FBS를 함유한 Minimum Essential Medium (MEM)으로 분산하였다. 분산한 것을 75 µm mash로 여과했다. 6-well plate에 well당 근육조직 0.3 g을 접종하였다. 접종한 다음날 적혈구 등을 제거하기 위해 세척했으며(day 0), 분화 유도시까지 10% FBS를 함유한 MEM을 사용했다. 분화유도(day 4)를 위해 10% FBS 대신에 2% horse serum을 함유한 MEM 배지를 세포배양이 끝날 때까지 사용하였으며 배지는 2일마다 교체했다.

2) 배양 중인 근육세포에 Conjugated linoleic acid (CLA) 처리

근육세포 배양에 사용한 CLA는 지방세포의 것과 같았으며 최종 CLA 처리농도는 50µM이었고, 4일 동안 (day 0~day 4) CLA를 처리하였다. 세포분화는 CLA 처리 종료 4일후에 측정했고, 세포 수는 CLA 처리 종료 시에 측정했다.

3) 근육세포 분화 및 세포 수 측정

돼지 근육 satellite cell의 성숙 세포로의 분화

정도는 배양중인 세포의 creatine kinase(CK)의 활성도를 측정함으로써 구명했는데 Sigma kit CK-15를 사용하였다. 그리고 세포수의 측정은 Roche에서 제조한 kit로 formazan 형성을 측정하는 WST-1을 사용했다.

3. 통계분석

본 연구에서 얻어진 자료의 특성을 요약하면 다음 모형 방정식으로 나타낼 수 있다. $y_{ijk} = \mu + \tau_i + P_j + (\tau \times P)_{ij} + R_{(ijk)}$ 로서 y_{ijk} 는 관측값이고, μ 는 전체 평균이며, τ_i 는 i 번째 처리로서 고정효과로 가정하였고, P_j 는 j 번째 돼지(반복)로서 임의효과로 가정하였으며, $(\tau \times P)_{ij}$ 는 처리와 돼지(반복) 간의 상호작용이고, $R_{(ijk)}$ 는 각 돼지 당 반복 측정된 것으로 이 역시 임의 효과로 가정하였다. 얻어진 자료는 변이의 원인을 알기 위해서 위의 모형 방정식을 이용하여 SAS(SAS, 1998)의 GLM 모듈로 분산 분석을 하였다. 가장 큰 변이의 원인은 돼지(반복)이었고 분산 분석 결과 처리 간에 고도의 유의차가 있었다. 그러나 돼지(반복)의 변이가 가장 큰 이유는 돼지간의 차이 뿐만 아니라 세포배양 특히 primary cell 배양 성격상 배양 시마다 세포의 분화 정도가 다른데 따른 변이 등 두 효과가 confounding되어 나타난 것으로 사료된다. 그러므로 각 처리의 값은 각 반복 당 대조구에 대한 상대적인 값으로 표현하는 것이 합리적일 것으로 사료되어, 각 처리구의 대조구에 대한 상대적 값(백분율)의 평균과 표준 편차로 나타내도록 하였다.

III. 결과 및 고찰

지금까지 대부분의 CLA 관련 연구들이 주로 c9t11과 t10c12 이성체만을 대상으로 했는데 본 연구에서는 이들 이외에 c9c11과 t9t11 이성체의 작용도 함께 조사했다. Fig. 1에는 이들 4가지 CLA 이성체를 배양중인 돼지 지방전구세포에 4일간 처리했을 때 세포분화에 미치는 작용

이 나타나 있다. t10c12의 세포분화억제 작용이 두드러졌고(92% 억제), 그 다음으로 t9t11도 세포분화를 억제했는데(14% 억제) 다른 이성체의 작용은 미미했다. Brandeboug와 Hu (2005)도 t10c12 이성체가 돼지 지방전구세포의 분화를 크게 억제했다고 보고했고, Brown 등(2001)은 t10c12가 사람 지방전구세포의 분화를 억제했다고 보고했고, Kang 등(2003)은 t10c12가 cell line인 3T3-L1 지방전구세포의 분화를 억제했다고 보고했다. 위의 결과들은 t10c12는 동물의 종에 관계없이 모든 지방전구세포의 분화를 억제함을 나타낸다. 그래서 돼지(Ostrowska 등, 2003; Dugan 등, 2004)와 생쥐(Park 등, 1999; Wang 등, 2004)에서 나타난 CLA의 지방축적 억제작용도 여러 이성체 중 t10c12의 작용에 의한 것으로 사료된다.

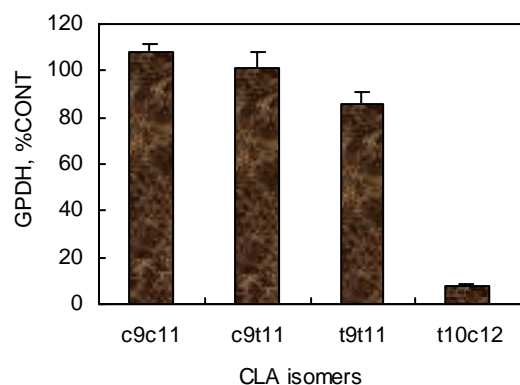


Fig. 1. Effects of conjugated linoleic acids (CLA) on differentiation of pig preadipocytes. The cells were treated with various CLA isomers for four day during culture. Dimethyl sulfoxide (DMSO) was used as control (CONT). Cell differentiation was determined by measuring glycerol-3-phosphate dehydrogenase (GPDH) activity. Data are means \pm SE from four experiments, each performed with cells harvested from a different pig.

본 연구에 나타난 t10c12 이성체의 세포분화 억제작용을 더 명확하게 구명하기 위해서 농도 간의 차이를 구명한 것이 Fig. 2에 나타나 있

다. 농도(10 μ M, 20 μ M 및 50 μ M)에 비례해서 세포분화가 억제되었음을 잘 보여주고 있다. Fig. 3은 세포배양 시간이 경과함에 따라 t10c12 이성체의 작용이 나타나 있는데, CLA를 녹이는데 사용한 DMSO(대조구)에 비해 t10c12를 처리한 세포의 분화가 크게 억제되었음을 잘 보여주고 있다. 특히 day 6에 t10c12의 처리 효과가 더 명확하게 드러나 있다. 이 Fig. 3의 결과는 Fig. 1에 나타난 t10c21의 작용을 잘 반영해 주고 있다.

본 연구에서는 c9c11 이성체가 돼지 지방전구세포의 분화를 촉진시킨 경향만 나타냈고 (Fig. 1) 그 작용이 두드러지지 않았는데, 문과 정(2004)은 c9c11의 세포분화 촉진작용이 뚜렷했다고 보고했다. 이와 같이 서로 다른 결과에 대한 이유는 명확하지 않지만 CLA의 처리기간의 차이가 일부 이유로 사료된다. 문과 정(2004)은 본 연구에 비해 훨씬 오랫동안 c9c11 CLA를 처리했다. c9c11의 돼지 지방전구세포의 분화 촉진작용이 명확하다면, 앞으로 CLA를 돼지의 지방축적 억제를 위해 사료첨가제로 사용할 경우 c9c11 이성체가 함유되어 있는지를

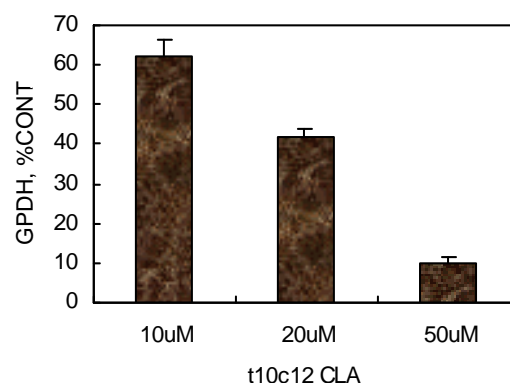


Fig. 2. Effects of the concentration of t10c12 CLA isomer on differentiation of pig preadipocytes. The cells were treated with the t10c12 isomer for four day during culture. Dimethyl sulfoxide (DMSO) was used as control (CONT). Cell differentiation was determined by measuring glycerol-3-phosphate dehydrogenase activity.

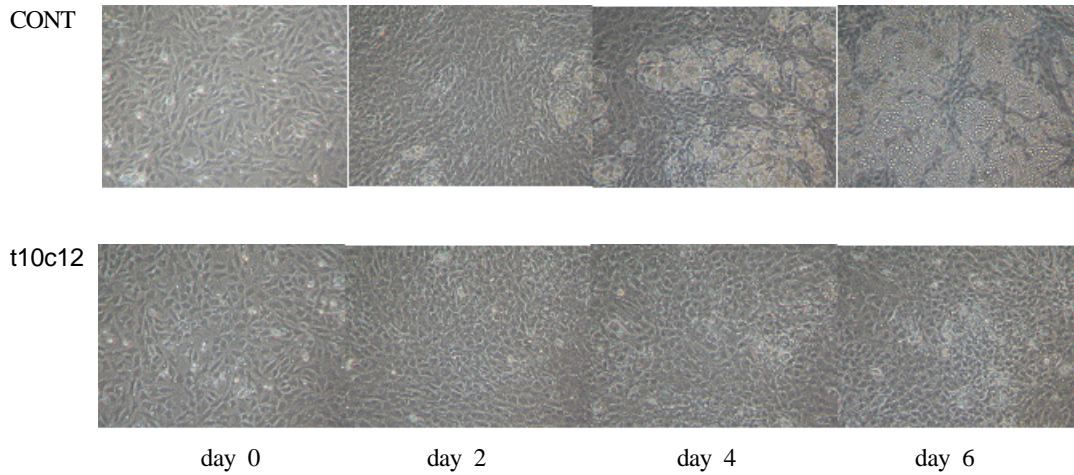


Fig. 3. Effects of t10c12 CLA treatment on differentiation of pig preadipocytes. Dimethylsulfoxide (DMSO) was used as control. The progress of differentiation was shown as culture continued.

확인해야 할 것이다. 그 이유는 c9c11가 t10c12의 지방축적 억제에 반대작용을 해서 CLA의 투여효과가 감소될 가능성이 있기 때문이다.

본 연구에 나타난 CLA의 돼지 지방전구세포의 분화에 미치는 작용이 세포의 증식에 미치는 작용을 통해서 행해지는지를 구명하기 위해서 CLA 처리가 지방세포 수에 미치는 작용을 구명했다. Fig. 4에서 보는 대로 모든 CLA 이성체가 세포의 증식을 억제하는 경향을 나타냈으나 그 작용이 미미했다. 예상외로 t10c12의 작용도 미미했는데 이 사실은 t10c12의 돼지 지방전구세포의 분화 억제작용은 세포의 증식단계보다 협의의 세포 분화단계에 작용함을 나타낸다.

Fig. 5에는 여러 CLA 이성체가 돼지 근육세포의 분화에 미치는 작용이 나타나 있다. 지방세포의 분화에 미치는 작용과는 달리 CLA의 뚜렷한 작용이 없었는데, 특히 지방세포의 분화를 크게 억제했던 t10c12 이성체의 분화억제 작용도 나타나지 않았다. Hurley 등 (2006)은 L6 myoblast를 이용한 실험에서 t10-c12 이성체가 세포분화를 억제했다고 보고해서 본 연구의 결과와는 달랐는데 이에 대한 이유는 동물 종간 또는 cell line과 primary cell 간의 차이로 사

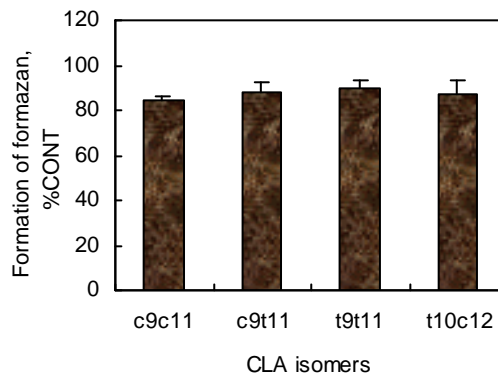


Fig. 4. Effects of conjugated linoleic acids (CLA) on proliferation of pig preadipocytes. The cells were treated with various CLA isomers for four day during culture. Dimethyl sulfoxide (DMSO) was used as control (CONT). Cell proliferation was determined by measuring formation of formazan. Data are means \pm SE from four experiments, each performed with cells harvested from a different pig.

료된다. 그리고 지방세포의 분화를 억제했던 t911t는 오히려 근육세포의 분화를 촉진하는 경향을 나타냈다. 위의 결과들은 여러 CLA 이성체가 돼지의 지방전구세포와 근육세포 분화에

서로 다르게 작용함을 나타내고, 이런 사실은 앞으로 CLA의 돼지의 생산성 향상을 위해 사용할 때 유의해야 할 점이다. Fig. 6에는 대조구와 t10c12를 처리한 근육세포의 배양시기에

따른 및 세포의 변화정도를 보여주고 있는데 Fig. 5의 결과를 반영하듯, 대조구와 t10c12 구간에 큰 차이를 보이지 않고 있다.

Fig. 7에는 CLA가 돼지 근육세포의 증식에

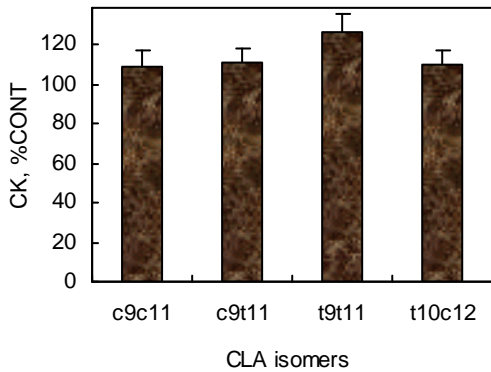


Fig. 5. Effects of conjugated linoleic acids (CLA) on differentiation of pig myogenic satellite cells. The cells were treated with various CLA isomers for four day during culture. Dimethyl sulfoxide (DMSO) was used as control (CONT). Cell differentiation was determined by measuring creatine kinase (CK) activity. Data are means \pm SE from four experiments, each performed with cells harvested from a different pig.

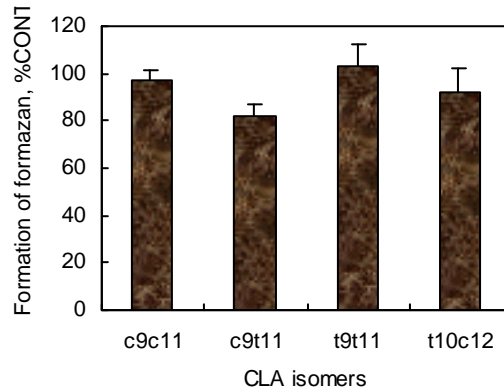


Fig. 7. Effects of conjugated linoleic acids (CLA) on proliferation of pig myogenic satellite cells. The cells were treated with various CLA isomers for four day during culture. Dimethyl sulfoxide (DMSO) was used as control (CONT). Cell proliferation was determined by measuring formation of formazan. Data are means \pm SE from four experiments, each performed with cells harvested from a different pig.

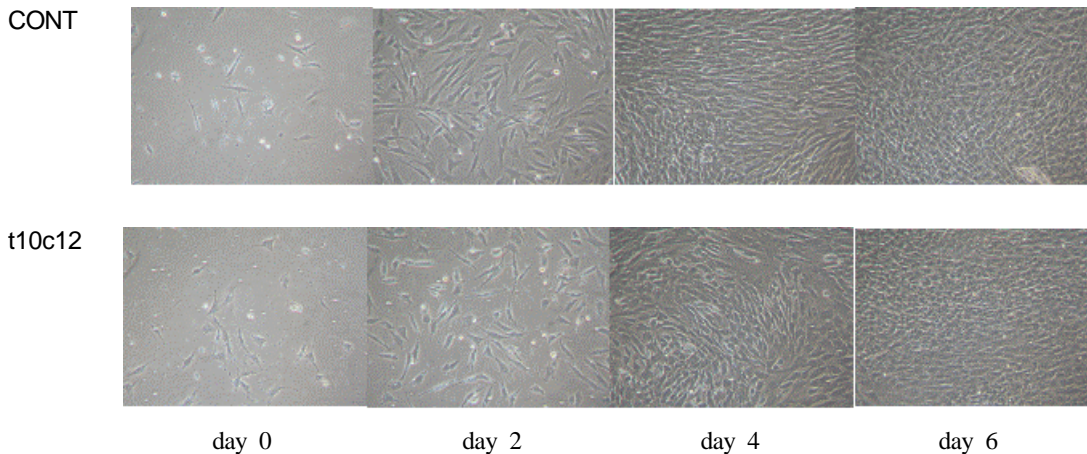


Fig. 6. Effects of t10c12 CLA treatment on differentiation of pig myogenic satellite cells. Dimethylsulfoxide (DMSO) was used as control (CONT). There was no big difference between CONT and t10c12 treatment.

미치는 작용이 나타나 있는데, 대조구에 비해 뚜렷한 작용을 보이지 않았다. 그리고 세포분화를 약간 증가시켰던 c9t11 이성체는 세포증식을 억제시켰다. 이런 사실들은 CLA가 돼지 근육세포의 분화에 미치는 작용은 세포의 증식 단계보다 혐의의 세포 분화단계에 작용함을 나타낸다.

IV. 요약

본 연구는 여러 CLA 이성체, 즉 cis-9, cis-11(c9c11), cis-9, trans-11(c9t11), trans-9, trans-11(t9t11) 및 trans-10, cis-12(t10c12)가 배양 중인 돼지 지방세포와 근육세포의 분화와 증식에 미치는 영향을 구명하고자 실시하였다. 세포는 신생자돈으로부터 분리했다. t10c12 이성체는 지방세포의 분화를 억제했는데(92%) 근육세포의 분화는 억제시키지 않았다. t9t11 이성체는 지방세포의 분화를 억제했는데(14%), 근육세포의 분화는 촉진시켰다(26%). 다른 CLA 이성체는 지방세포나 근육세포의 분화에 영향을 미치지 않았다. 그리고 CLA가 지방세포와 근육세포의 증식에 미치는 영향은 분화에 미치는 영향에 비해서 작았다. 위의 결과는 여러 CLA 이성체는 돼지 지방세포와 근육세포의 분화에 다른 영향을 미침을 나타낸다.

V. 사사

이 논문은 2005년도 충북대학교 학술연구지원사업의 연구비 지원에 의하여 연구되었음.

VI. 인용문헌

1. Azain, M. J. 2004. Role of fatty acids in adipocyte growth and development. *J. Anim. Sci.* 82:916-924.
2. Brandebourg, T. D. and Hu, C. Y. 2005. Isomer-specific regulation of differentiating pig preadipocytes by conjugated linoleic acids. *J. Anim. Sci.* 83:2096-2105.
3. Brodie, A. E., Manning, V. A., Ferguson, K. R., Jewell, D. E. and Hu, C. Y. 1999. Conjugated linoleic acid inhibits differentiation of pre- and post-confluent 3T3-L1 preadipocytes but inhibits cell proliferation only in pre-confluent cells. *J. Nutr.* 129:602-606.
4. Brown, J. M., Halvorsen, Y. D., Lea Curris, Y. R., Geigerman, C. and McIntosh, M. 2001. Trans-10, cis-12, but not cis-9, trans-11, conjugated linoleic acid attenuates lipogenesis in primary cultures of stromal vascular cells from human adipose tissue. *J. Nutr.* 131:2316-2321.
5. Brown, J. M. and McIntosh, M. K. 2003. Conjugated linoleic acid in humans: Regulation of adiposity and insulin sensitivity. *J. Nutr.* 133:3041-3046.
6. Doumit, M. E. and Merkel, R. A. 1992. Conditions for isolation and culture of porcine myogenic satellite cells. *Tissue and cell.* 24:253-262.
7. Dugan, M. E., Aalhus, J. L. and Kramer, J. K. 2004. Conjugated linoleic acid pork research. *Am. J. Clin. Nutr.* 79:1212S-1216S.
8. Dugan, M. E., Aalhus, J. L., Schaefer, A. L. and Kramer, J. K. G. 1997. The effect of conjugated linoleic acid on fat to lean repartitioning and feed conversion in pigs. *Can. J. Anim. Sci.* 77:723-725.
9. Evans, M., Park, Y., Pariza, M., Curtis, L., Kuebler, B. and McIntosh, M. 2001. Trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid reduces triglyceride content, while differentially affecting peroxisome proliferator activated receptor gamma2 and AP2 expression in 3t3-l1 preadipocytes. *lipids* 36:1223-1232.
10. Hurley, M. S., Flux, C., Salter, A. M. and Brameld, J. M. 2006. Effects of fatty acids on skeletal muscle cell differentiation *in vitro*. *Br. J. Nutr.* 95:623-630.

11. Kang, K., Liu, W., Albright, K. J., Park, Y. and Pariza, M. W. 2003. Trans-10, cis-12 CLA inhibits differentiation of 3t3-l1 adipocytes and decreases PPAR expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 303:795-799.
12. McNeel, R. L. and Mersmann, H. J. 2003. Effects of isomers of conjugated linoleic acid on porcine adipocyte growth and differentiation. *J. Nutr. Biochem.* 14:266-274.
13. Ostrowska, E., Suster, D., Muralitharan, M., Cross, R. F., Leury, B. J., Bauman, D. E. and Dunshea, F. R. 2003. Conjugated linoleic acid decrease fat accretion in pigs: evaluation by dual-energy X-ray absorptiometry. *J. Nutri.* 89:219-229.
14. Pariza, M. W., Park, Y. and Cook, M. E. 2000. Mechanisms of action of conjugated linoleic acid: Evidence and speculation. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 223:8-13.
15. Park, Y., Jayne, M. S., Karen, J. A., Wei, L. and Michael, W. P. 1999. Evidence that the trans-10, cis-12 isomer of conjugated linoleic acid induces body composition changes in mice. *Lipids.* 34: 235-241.
16. SAS. 1998. SAS user's guide. SAS Inst. Inc., Cary, NC, USA.
17. Suryawan, A., Swanson, L. V. and Hu, C. Y. 1997. Insulin and hydrocortisone, but triiodothyronine, are required for the differentiation of pig preadipocytes in primary culture. *J. Anim. Sci.* 75:105-111.
18. Wang, Y. W. and Jones, P. J. 2004. Conjugated linoleic acid and obesity control: efficacy and mechanisms. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 28:941-955.
19. 문현석, 정정수. 2004. Conjugated Linoleic Acid (CLA) 이성체가 돼지 지방전구세포의 분화에 미치는 영향. *동물자원지* 46:967-974.
(접수일자 : 2007. 1. 18. / 채택일자 : 2007. 2. 14.)