

NGHIÊN CỨU TỔNG HỢP 6-(2-HYDROXY-3-MORPHOLINOPROPYL)-5H-INDENO[1,2-C]ISOQUINOLIN-5,11(6H)-DION

Lục Quang Tấn^{1*}, Nguyễn Hoàng¹, Vũ Ngọc Tân²,
Nguyễn Thị Thu Hòa³, Nguyễn Văn Tuyền⁴

¹ Phân hiệu Đại học Thái Nguyên tại tỉnh Lào Cai

² Trường Đại học Khoa học Thái Nguyên

³ Viện kiểm nghiệm thuốc Trung Ương

⁴ Viện Hoá học – Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

TÓM TẮT

Ung thư là một trong những căn bệnh gây tỉ lệ tử vong hàng đầu trên thế giới bởi ung thư có thể có ở bất kỳ bộ phận nào của cơ thể và phát triển nhanh chóng cùng với nhiều diễn biến bất thường. Ngày nay, chúng ta có thể dễ dàng điều trị ung thư trên cấp độ tế bào với độ chính xác và hiệu quả khá cao. Trong đó, enzym topoisomerase là đích đến hiệu quả trong việc nghiên cứu và tổng hợp thuốc điều trị ung thư. Indenoisoquinolin là nhóm chất có khả năng chống ung thư theo cơ chế ức chế topoisomerase I, do có đặc tính ổn định, không bị thủy phân, không gây độc giống như các thuốc chống ung thư hệ Camptothecin nên trong thời gian gần đây có rất nhiều công trình nghiên cứu nhằm cải thiện và nâng cao hoạt tính sinh học của chúng. Trong bài báo này chúng tôi trình bày phương pháp tổng hợp và phân tích cấu trúc của hợp chất 6-(2-hydroxy-3-morpholinopropyl)-5H-indeno[1,2-c]isoquinolin-5,11(6H)-dion.

Từ khóa: Indenoisoquinolin, camptothecin, topoisomerase I (top I), ung thư, tổng hợp.

Ngày nhận bài: 16/11/2018; **Ngày hoàn thiện:** 06/12/2018; **Ngày duyệt đăng:** 31/12/2018

SYNTHESIS OF 6-(2-HYDROXY-3-MORPHOLINOPROPYL)-5H-INDENO[1,2-C]ISOQUINOLINE-5,11(6H)-DIONE

Luc Quang Tan^{1*}, Nguyen Hoang¹, Vu Ngoc Tan²,
Nguyen Thi Thu Hoa³, Nguyen Van Tuyen⁴

¹Thai Nguyen University – Lao Cai Campus

²TNU University of Sciences

³National Institute of Drug Quality Control

⁴Institute of Chemistry – Vietnam Academy of Science and Technology

ABSTRACT

Cancer is one of the leading causes of death globally that can affect any part of the body. One defining feature of cancer is the rapid creation of abnormal cells that grow beyond their usual boundaries, and which can then invade adjoining parts of the body and spread to other organs. Today, we can treat cancer at the cellular level with high accuracy and efficiency. In which, topoisomerase enzyme is an effective target for researching and synthesizing of cancer treatment drugs. Indenoisoquinolin is a class of agent that has anti-cancer properties according to topoisomerase I inhibition mechanism, due to its stable properties, no hydrolysis, no toxic effects like Camptothecin anti-cancer drugs, thus recently there have been many researches on improving and enhancing their biological activity. In this paper, we present the synthesis method and structural analysis of 6-(2-hydroxy-3-morpholinopropyl)-5H-indeno[1,2-c]isoquinolin-5,11(6H)-dione.

Key words: Indenoisoquinoline, camptothecin, topoisomerase I, cancer, synthesis.

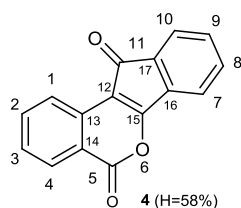
Received: 16/11/2018; **Revised:** 06/12/2018; **Approved:** 31/12/2018

* Corresponding author. Email: tanlq@tnu.edu.vn

MỞ ĐẦU

Ung thư là một trong những căn bệnh nguy hiểm gây tỉ lệ tử vong hàng đầu trên thế giới bởi ung thư có thể có ở bất kỳ bộ phận nào của cơ thể và phát triển nhanh chóng cùng với nhiều diễn biến bất thường. Ngày nay, chúng ta có thể dễ dàng điều trị ung thư trên cấp độ tế bào với độ chính xác và hiệu quả khá cao. Trong đó, enzym topoisomerase là đích đến hiệu quả trong việc nghiên cứu và tổng hợp thuốc điều trị ung thư. Indenoisoquinolin là nhóm chất có khả năng ức chế topoisomerase I (top 1), một số dẫn xuất của Indenoisoquinolin đã được đưa vào nghiên cứu thử nghiệm lâm sàng giai đoạn II thể hiện hoạt tính chống ung thư cao hơn thuốc ung thư hệ camptothecin đồng thời không gây hiệu ứng phụ và không bị thủy phân [1-3], tiếp tục nghiên cứu đó nhóm nghiên cứu của chúng tôi đã tổng hợp thành công một số dẫn xuất indenoisoquinolin có hoạt tính chống ung thư cao [4-6]. Trong bài báo này chúng tôi trình bày phương pháp tổng hợp và xác định cấu trúc của hợp chất 6-(2-hydroxy-3-morpholinopropyl)-5H-indeno[1,2-c]isoquinolin-5,11(6H)-đion.

THỰC NGHIỆM

Tổng hợp indeno[1,2-c]isochromen-5,11-đion (4)

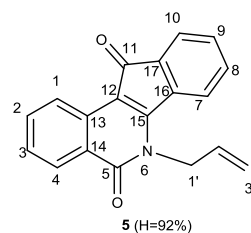
Dung dịch của phthalide (2) (10g; 67 mmol) và 2-cacboxybenzandehit (1) (8,9 g; 67 mmol) trong dung môi EtOAc (300 mL) được thêm NaOMe (58g; 266 mmol) trong 600 mL MeOH. Phản ứng được đun hồi lưu tại 65°C trong 6 giờ. Kết thúc phản ứng, dung môi được loại bỏ bằng áp suất thấp, sau đó nhỏ giọt dung dịch HCl 37% (25 mL) đến khi dung dịch chuyển từ màu đỏ sang màu vàng nhạt, loại bỏ nước nhận được sản phẩm thô 3.

Hòa tan 3 trong toluen (200mL) và thêm *p*-TsOH (0,92 g; 5,3 mmol) đun hồi lưu (Dean-Stark) trong 6 giờ. Kết thúc phản ứng, loại bỏ dung môi toluen nhận được sản phẩm thô. Sản phẩm được hòa tan trong CHCl₃ (1 lít), rửa 3 lần bằng dung dịch muối NaCl (mỗi lần 1 lít), làm khan bằng MgSO₄, cất loại bỏ dung môi bằng máy cất quay nhận được hợp chất 4, kết tinh trong dung môi EtOAc thu được sản phẩm sạch 4 (9,6 g), hiệu suất phản ứng đạt 58%.

Hợp chất 4 là chất rắn có màu vàng cam, có nhiệt độ nóng chảy là 258-259 °C.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ_H ppm: 8,37 (1H, d, *J* = 8,0 Hz, H-1); 8,29 (1H, dd, *J* = 1,0; 8,0 Hz, H-4); 7,59 (1H, d, *J* = 7,0 Hz, H-7); 7,80 (1H, dt, *J* = 1,0; 8,0 Hz, H-2); 7,52 (1H, dt, *J* = 1,0; 8,0 Hz, H-3); 7,47 (2H, m, H-8; H-10); 7,41 (1H, dt, *J* = 2,0; 7,0 Hz, H-9).

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ_C ppm: 189,96 (C-11); 170,59 (C-5); 160,81 (C-15); 136,38 (C-16); 135,99 (C-17); 133,66 (C-2); 132,81 (C-8); 132,67 (C-13); 131,64 (C-9); 130,87 (C-4); 128,39 (C-3); 123,30 (C-1); 123,15 (C-14); 119,82 (C-7); 118,97 (C-10); 107,71 (C-12).

Tổng hợp chất 6-allyl-5H-indeno[1,2-c]isoquinolin-5,11(6H)-đion (5).

Hòa tan hoàn toàn chất 4 (90 mg; 0,36 mmol) trong 5mL CH₂Cl₂, sau đó bổ sung 3-aminoprop-1-en (22,58 mg, 0,396 mmol) vào hỗn hợp trên. Hỗn hợp được khuấy và duy trì ở nhiệt độ 20°C trong 22 giờ. Kết thúc phản ứng, bổ sung 45 mL CH₂Cl₂ (3 lần × 15 mL) vào hỗn hợp, chiết với 25 mL nước, làm khô bằng Na₂SO₄, cất loại bỏ dung môi bằng máy cất quay chân không thu được sản phẩm thô.

Sản phẩm thô được làm sạch bằng sắc ký cột silica gel với hệ dung môi rửa giải hexan/EtOAc (v:v 8:2) thu được sản phẩm **5** (96,68 mg) có màu đỏ cam với hiệu suất phản ứng 92 %.

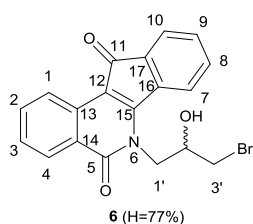
Hợp chất **5** là chất rắn có màu đỏ thẫm, có nhiệt độ nóng chảy là 154-155 °C.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ_H ppm: 8,68 (1H, d, J = 8,0 Hz, H-1); 8,32 (1H, d, J = 8,0 Hz, H-4); 7,71 (1H, t, J = 8,0 Hz, H-2); 7,58 (1H, d, J = 7,0 Hz, H-7); 7,45-7,33 (4H, m, H-3, H-8, H-9, H-10); 6,11 (1H, m, H-2'); 5,30 (1H, td, J = 1,5; 10,5 Hz, H_a-3'); 5,21-5,15 (3H, m, H_b-3', 2H-1').

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ_C ppm: 190,43 (C-11); 163,10 (C-5); 155,79 (C-15); 136,89 (C-16); 134,47 (C-17); 133,93 (C-2); 133,08 (C-8); 132,30 (C-2'); 131,39 (C-13); 130,92 (C-9); 128,57 (C-4); 127,18 (C-3); 123,49 (C-1); 123,10 (C-14); 122,92 (C-7); 122,65 (C-10); 117,40 (C-3'); 108,99 (C-12); 46,41 (C-1').

IR (KBr): 3061; 2924; 2852; 1766; 1689; 1662; 1606; 1571; 1546; 1498; 1421; 1377; 1313; 1068; 960; 798; 750 cm⁻¹

Tổng hợp hợp chất 6-(3-bromo-2-hydroxypropyl)-5H-indeno[1,2-c]isoquinolin-5,11(6H)-đion



Hòa tan hoàn toàn chất **5** (96,68 mg; 0,336 mmol) trong 5 mL CH₂Cl₂, làm lạnh hỗn hợp phản ứng tới 0 °C, bổ sung 0,012 mL H₂O, nhỏ từ từ 0,035 mL Br₂ vào hỗn hợp phản ứng. Hỗn hợp được khuấy và duy trì ở nhiệt độ 0-5 °C trong 3 giờ. Kết thúc phản ứng, hỗn hợp được bổ sung 15 mL NaOH 30%, lắc đều trong vòng 5 phút rồi chiết bằng CH₂Cl₂, làm khô bằng Na₂SO₄, quay khô thu được sản phẩm thô. Sản phẩm thô được làm sạch bằng

sắc ký cột silica gel với hệ dung môi rửa giải hexan/EtOAc (v:v 9:1) thu được sản phẩm là chất rắn có màu đỏ tím (15 mg) với hiệu suất phản ứng 10% và hệ dung môi rửa giải hexan/EtOAc (v:v 7:3) thu được sản phẩm **6** (99,3 mg) với hiệu suất phản ứng 77 %.

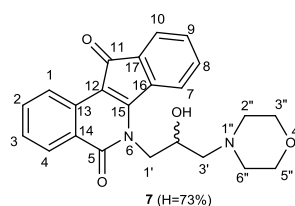
Hợp chất **6** là chất rắn có màu đỏ, có nhiệt độ nóng chảy 176-177 °C.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ_H ppm: 8,71 (1H, d, J = 8,0 Hz, H-1); 8,31 (1H, dd, J = 1,0; 8,0 Hz, H-4); 7,83 (1H, d, J = 7,5 Hz, H-7); 7,65 (1H, t, J = 8,0 Hz, H-2); 7,52 (1H, t, J = 8,0 Hz, H-3); 7,37-7,42 (2H, m, H-8, H-10); 7,31 (1H, t, J = 7,5 Hz, H-9); 4,70 (1H, dd, J = 4,5, 14,5 Hz, H_a-1'); 4,60 (1H, dd, J = 8,0, 14,5 Hz, H_b-1'); 4,36-4,40 (1H, m, H-2'); 3,67 (2H, dd, J = 6,5, 11,5 Hz, H-3').

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃& MeOD) δ_C ppm: 190,81 (C-11); 164,49 (C-5); 156,07 (C-15); 137,19 (C-16); 134,70 (C-17); 134,14 (C-2); 133,28 (C-8); 132,27 (C-13); 130,89 (C-9); 128,18 (C-4); 127,26 (C-3); 123,67 (C-1); 123,43 (C-14); 123,09 (C-7); 122,57 (C-10); 109,02 (C-12); 69,07 (C-2'); 48,86 (C-1'); 36,60 (C-3').

IR (KBr): 3412; 2970; 2931; 1695; 1641; 1608; 1573; 1546; 1496; 1413; 1311; 1261; 1192; 1047; 1004; 796; 746; 692; 578 cm⁻¹

Tổng hợp hợp chất 6-(2-hydroxy-3-morpholinopropyl)-5H-indeno[1,2-c]isoquinolin-5,11(6H)-đion (7).



Hòa tan hoàn toàn hỗn hợp gồm **6** (50 mg; 0,13 mmol) trong 3 mL Axeton trong khoảng 5 phút, sau đó bổ sung Morpholin (17 mg; 0,195 mmol) và K₂CO₃ (36 mg; 0,26 mmol) vào hỗn hợp trên. Hỗn hợp được khuấy và duy trì ở nhiệt độ 60 °C trong 28h. Kết thúc phản ứng, quay khô cô đuổi dung môi, sau đó

chiết hỗn hợp bằng CH_2Cl_2 , làm khô bằng Na_2SO_4 , quay khô thu được sản phẩm thô. Sản phẩm thô được làm sạch bằng sắc ký cột silica gel với hệ dung môi rửa giải hexan/EtOAc (v:v 1:9) thu được sản phẩm **7** (37 mg) với hiệu suất phản ứng 73%.

Hợp chất **7** là chất rắn có màu vàng chanh, có nhiệt độ nóng chảy 227-228 °C.

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ_{H} ppm: 8,70 (1H, d, $J = 8,0$ Hz, H-1); 8,30 (1H, d, $J = 8,0$ Hz, H-4); 7,93 (1H, d, $J = 7,5$ Hz, H-7); 7,72 (1H, t, $J = 1,0, 8,0$ Hz, H-2); 7,61 (1H, d, $J = 7,0$ Hz, H-10); 7,45 (1H, dt, $J = 1,0, 8,0$ Hz, H-3); 7,44 (1H, dt, $J = 1,0, 7,5$ Hz, H-8); 7,37 (1H, t, $J = 7,5$ Hz, H-9); 4,75 (1H, dd, $J = 5,0, 14,5$ Hz, $\text{H}_a\text{-1'}$); 4,51 (1H, dd, $J = 6,5, 14,5$ Hz, $\text{H}_b\text{-1'}$); 4,20 (1H, m, H-2'); 3,79-3,68 (4H, m, H-3''+H-5''); 2,67-2,60 (4H, H-2''+H-6''); 2,51-2,49 (2H, m, 2H-3').

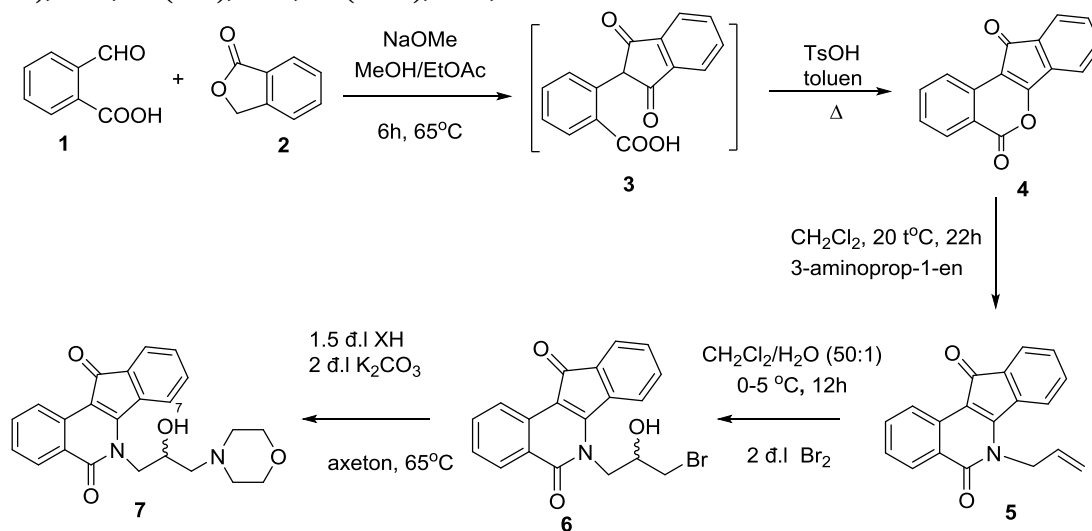
^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3 & MeOD) δ_{C} ppm: 190,65 (C-11); 164,38 (C-5); 156,10 (C-15); 137,53 (C-16); 135,04 (C-17); 134,10 (C-2); 133,14 (C-8); 132,41 (C-13); 130,90

(C-9); 128,42 (C-4); 127,27 (C-3); 123,71 (C-1); 123,60 (C-14) 123,31 (C-7); 123,14 (C-10); 108,94 (C-12); 67,03 (C-3''+C-5''); 66,60 (C-2') 62,77 (C-3'); 53,88 (C-2''+C-6'') 48,69 (C-1').

IR (KBr): 3444; 3080; 2947; 2848; 2808; 1734; 1685; 1639; 1608; 1548; 1502; 1456; 1411; 1261; 1112; 1008; 964; 864; 763 cm^{-1} .

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

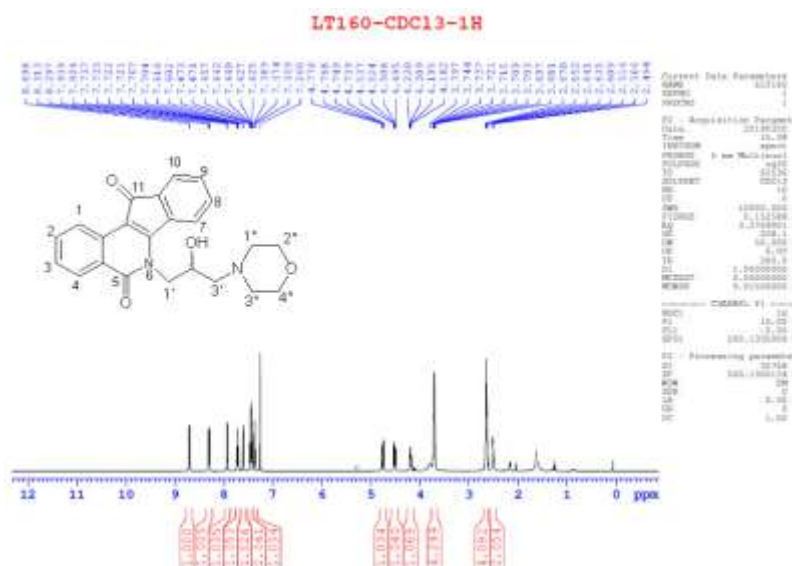
Để tổng hợp hợp chất 6-(2-hydroxy-3-morpholinopropyl)-5H-indeno[1,2-c]isoquinolin-5,11(6H)-đion, chúng tôi lựa chọn con đường tổng hợp đi từ các chất đơn giản là phthalide và axit phthaldehydic, thông qua 4 bước phản ứng hóa học sản phẩm đã được tạo thành (sơ đồ dưới), cấu trúc của các sản phẩm trung gian đã được chứng minh trong các công trình của nhóm tác giả [4-6], trong bài báo này chúng tôi trình bày rõ kết quả phân tích cấu trúc hợp chất 6-(2-hydroxy-3-morpholinopropyl)-5H-indeno[1,2-c]isoquinolin-5,11(6H)-đion.



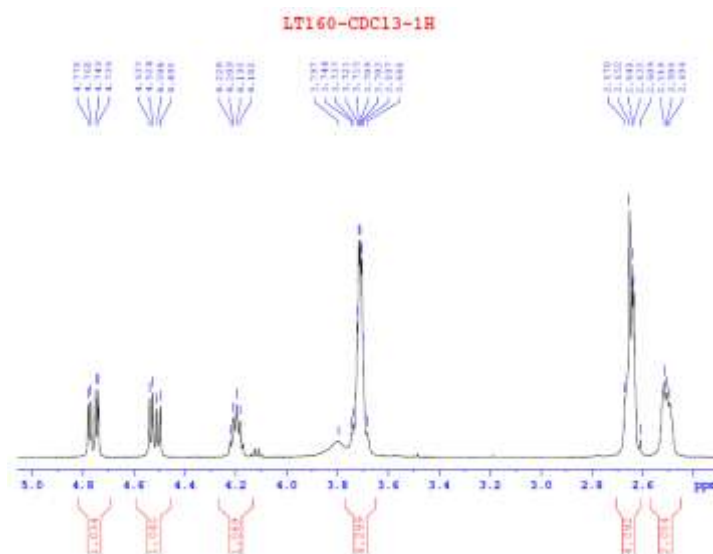
Sơ đồ tổng hợp 6-(2-hydroxy-3-morpholinopropyl)-5H-indeno[1,2-c]isoquinolin-5,11(6H)-đion.

Hợp chất **7** tổng hợp được là chất rắn có màu vàng chanh, có nhiệt độ nóng chảy 227-228 °C. Trên phổ cộng hưởng từ hạt nhân ^1H -NMR của hợp chất **7** xuất hiện đầy đủ tín hiệu cộng hưởng của 21 proton bao gồm 8 proton vòng indenoisoquinolin, 8 proton vòng morpholin và 5 proton mạch nối. Tín hiệu của 5 proton mạch nối giữa nhân indenoisoquinolin và vòng morpholin bao

gồm hai tín hiệu cộng hưởng của 2 proton $H_{a-1'}$ và $H_{b-1'}$ của nhóm metylen gắn với nhân indenoisoquinolin cộng hưởng tại δ_H 4,75 ppm (1H, dd, $J = 5,0; 14,5$ Hz) và δ_H 4,51 ppm (1H, dd, $J = 6,5; 14,5$ Hz), một tín hiệu cộng hưởng của proton $H-2'$ cộng hưởng tại δ_H 4,20 ppm (1H, m) cùng tín hiệu của hai proton $H-3'$ cộng hưởng tại δ_H 2,51-2,49 ppm (2H, m, 2H-3'). Tín hiệu của 8 proton vòng Morpholin cộng hưởng chồng lấp tại hai độ chuyển dịch khác nhau bao gồm 4 proton $H-2''$, $H-4''$ cộng hưởng tại δ_H 3.79-3.68 ppm (4H, m) và 4 proton $H-1''$, $H-3''$ cộng hưởng tại δ_H 2.67-2.60 ppm (4H, m). Tín hiệu cộng hưởng của 8 proton khung indenoisoquinolin cũng được thấy rõ trên phổ tại các độ chuyển dịch: δ_H 8,71 ppm (1H, d, $J = 8,0$ Hz, H-1); δ_H 8,31 ppm (1H, d, $J = 8,0$ Hz, H-4); δ_H 7,93 ppm (1H, d, $J = 7,5$ Hz, H-7); δ_H 7,72 ppm (1H, td, $J = 1,0; 7,0$ Hz, H-2); δ_H 7,60 ppm (1H, d, $J = 7,0$ Hz, H-10); δ_H 7,43-7,47 ppm (2H, m, H-3, H-8); δ_H 7,37 ppm (1H, t, $J = 7,5$ Hz, H-9).

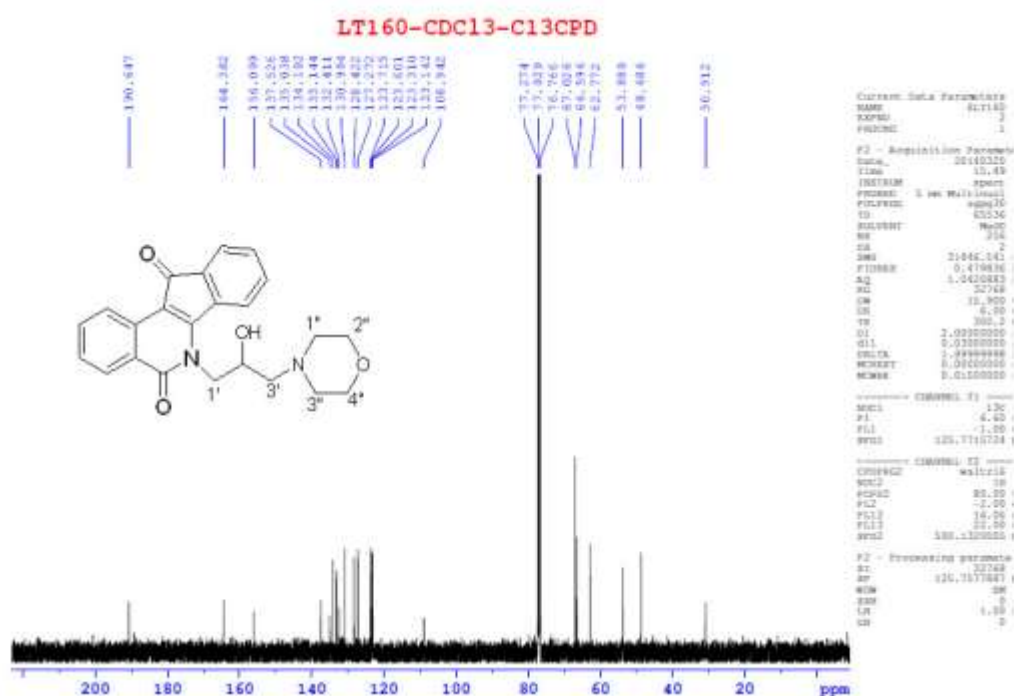


Hình 1. Phổ 1H -NMR của hợp chất 7



Hình 2. Phổ 1H -NMR giãn rộng của hợp chất 7

Trên phổ cộng hưởng từ hạt nhân ^{13}C -NMR của hợp chất **7** xuất hiện đầy đủ tín hiệu cộng hưởng của 23 nguyên tử cacbon. Trong đó tín hiệu của nhóm carbonyl xeton (C-11) cộng hưởng tại 190,6 ppm. Nhóm carbonyl amit (C-5) cộng hưởng tại 164,38 ppm. Tín hiệu cộng hưởng của cacbon tại δ_{C} 66,59 ppm được quy kết cho cacbon C-2', tín hiệu của cacbon nhóm CH_2 nối với nhân indenoisoquinolin cộng hưởng tại δ_{C} 48,68 ppm (C-1'), tín hiệu cộng hưởng tại δ_{C} 62,77 ppm đặc trưng cho cộng hưởng của cacbon C-3', tín hiệu của 4 cacbon vòng morpholin cộng hưởng chồng lấp tại các độ chuyển dịch δ_{C} 67,02 ppm (C-2''+C-4''), δ_{C} 53,8 ppm (C-1'' + C-3''). Qua các dữ kiện vừa phân tích, các dữ liệu phổ chi tiết ở trên cùng dữ liệu phổ khung indenoisoquinolin [7] cho phép khẳng định cấu trúc của hợp chất **7**.



Hình 3. Phổ ^{13}C -NMR của hợp chất **7**

KẾT LUẬN

Đi từ phthalide và phthaldehydic acid, thông qua các phản ứng hóa học chúng tôi đã tổng hợp thành công 6-(2-hydroxy-3-morpholinopropyl)-5H-indeno[1,2-c]isoquinolin-5,11(6H)-đion. Cấu trúc của sản phẩm được xác định bằng các phương pháp phổ hiện đại. Đây là kết quả hết sức ý nghĩa góp phần vào việc tìm kiếm và phát triển các thuốc điều trị ung thư.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Gang Ahn, Amelie Lansiaux, Jean-Francois Goossens, Christian Bailly, Brigitte Baldeyrou, Nadege Schifano-Faux, Pierre Grandclaudon,

Axel Couture, Adina Ryckebusch, (2010), "Indeno[1,2-c]isoquinoline-5,11-diones conjugated to amino acids: Synthesis, cytotoxicity, DNA interaction, and topoisomerase II inhibition properties". *Bioorganic & Medicinal*, 18, 8119-8133.

2. Martin Conda – Sheridan, P. V. Narasimha Reddy, Andrew Morrell, Brooklyn T. Cobb, Christophe Marchand, Keli Agama, Adel Chergui, Amélie Renaud, Andrew G. Stephen, Lakshman K. Bindu, Yves Pommier và Mark Cushman, (2013), "Synthesis and Biological Evaluation of Indenoisoquinolines That Inhibit Both Tyrosyl-DNA Phosphodiesterase I (Tdp1) and Topoisomerase I (Top1)", *J. Med. Chem.*, 56, 182–200.

3. Mathukaman Nagarajan, Andrew Morrell, Brian C. Fort, Marantha Rae Meckley, Smitha Antony, Glenda Kohlhaugen, Yves Pommier and

- Mark Cushman, (2004), "Synthesis and Anticancer Activity of Simplified indenoisoquinoline Topoisomerase I inhibitors Lacking Substituents on the Aromatic Rings", *J. Med. Chem.*, 47, 5651-5661.
4. Tham Pham Thi, Lena Decuyper, Tan Luc Quang, Chinh Pham The, Tuyen Anh Dang Thi, Ha Thanh Nguyen, Thuy Giang Le Nhat, Tra Nguyen Thanh, Phuong Hoang Thi, Matthias D'hooghe, Tuyen Van Nguyen, (2016), "Synthesis and cytotoxic evaluation of novel indenoisoquinoline-propan-2-ol hybrids", *Tetrahedron Letters*, 57, 466-471.
5. Lục Quang Tấn, Đặng Thị Tuyết Anh, Nguyễn Văn Tuyền, (2013), "Nghiên cứu tổng hợp một số dẫn xuất của Indenoisoquinoline có hoạt tính chống ung thư", *Tạp chí Hóa học*, T51(2AB), Tr 534-537.
6. Lục Quang Tấn, Nguyễn Văn Tuyền, (2013), "Nghiên cứu tổng hợp một số dẫn xuất mới của Indenoisoquinoline có nhân thơm ở mạch nhánh và hoạt tính gây độc tế bào", *Tạp chí Hóa học*, T51(6ABC), Tr 82-85.
7. Nguyễn Thị Hiền, Vũ Thị Huyền, Lục Quang Tấn, Nguyễn Hoàng, Vũ Đức Cường, Phạm Thị Thắm, Đặng Thị Tuyết Anh, Nguyễn Văn Tuyền (2017), "Phân tích cấu trúc sản phẩm của phản ứng giữa indeno[1,2-*c*]isochromen-5,11-đion và 3-Aminoprop-1-in", *Tạp chí Hóa học và Ứng dụng* Số 3, Tr 13-16.

