

脾虚痰湿型2型糖尿病患者Th1/Th2细胞亚群漂移与糖代谢指标的关系

汪晓娟, 曾慧妍, 周钦云, 赵玲, 张园

□背景资料

现代医学研究发现2型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM)的发病机制与免疫功能失调有关,而祖国医学中的脾虚、痰湿也均与免疫存在密切联系。脾虚痰湿证是T2DM的重要证型,故研究脾虚痰湿在T2DM发生和发展中的作用,特别是对免疫功能的影响,具有重要的意义。

汪晓娟, 广州中医药大学 广东省广州市 510400
 曾慧妍, 周钦云, 赵玲, 张园, 广东省中医院内分泌科 广东省广州市 510000
 汪晓娟, 在读博士, 主要从事中医药防治糖尿病及并发症的研究。
 广东省中医药管理局基金资助项目, No. 粤中医20131193号
 广东省自然科学基金资助项目, No. S2013040013379
 作者贡献分布: 此课题由曾慧妍设计; 研究过程由汪晓娟、曾慧妍、周钦云及张园操作完成; 研究所用试剂及分析工具由曾慧妍及赵玲提供; 数据分析由汪晓娟、曾慧妍及周钦云完成; 本论文写作由汪晓娟与曾慧妍完成。
 通讯作者: 曾慧妍, 副主任医师, 医学博士, 510000, 广东省广州市番禺区大学城内环西路55号, 广东省中医院内分泌科。13924011881@126.com
 电话: 020-39318881
 收稿日期: 2014-11-18 修回日期: 2014-12-16
 接受日期: 2014-12-30 在线出版日期: 2015-02-18

Guangzhou 510000, Guangdong Province, China.
 13924011881@126.com
 Received: 2014-11-18 Revised: 2014-12-16
 Accepted: 2014-12-30 Published online: 2015-02-18

Abstract

AIM: To explore the relationship between the changes of drift and proportion of Th1/Th2 cell subsets and glucose metabolism in type 2 diabetes mellitus (T2DM) patients with spleen-deficiency and phlegm stagnation syndrome.

METHODS: According to traditional Chinese medicine (TCM) syndrome classification, 45 type 2 diabetic patients were divided into a spleen-deficiency and phlegm stagnation syndrome group (23 cases) and a non-spleen-deficiency and phlegm stagnation syndrome group (22 cases). Meanwhile, 20 healthy subjects were recruited as a normal control group (NC group). Glycometabolic indexes such as fasting blood glucose (FBG) and glycosylated hemoglobin (HbA1c) were observed. Th1 and Th2 cell proportions and Th1/Th2 ratio in CD4⁺ T-cell subsets were determined by flow cytometry using monoclonal immunofluorescence method. The relationship between Th1/Th2 ratio and glycometabolic indexes was analyzed.

RESULTS: Th1 cell proportion and Th1/Th2 ratio were both significantly increased in the spleen-deficiency and phlegm stagnation syndrome group compared with the non-spleen-deficiency and phlegm stagnation syndrome group and NC group ($P < 0.05$). Th2 cell proportion was significantly

Relationship between Th1/Th2 balance and indexes of glucose metabolism in type 2 diabetes patients with spleen-deficiency and phlegm stagnation syndrome

Xiao-Juan Wang, Hui-Yan Zeng, Qin-Yun Zhou, Ling Zhao, Yuan Zhang

Xiao-Juan Wang, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510400, Guangdong Province, China
 Hui-Yan Zeng, Qin-Yun Zhou, Ling Zhao, Yuan Zhang, Department of Endocrinology, Guangdong Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510000, Guangdong Province, China
 Supported by: Administration of Traditional Chinese Medicine of Guangdong Province, China, No. 20131193; Natural Science Foundation of Guangdong Province, China, No. S2013040013379
 Correspondence to: Hui-Yan Zeng, Associate Chief Physician, Department of Endocrinology, Guangdong Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, 55 Neihuan West Road, University Town, Panyu District,

□同行评议者

门秀丽, 教授, 河北联合大学(原华北煤炭医学院)病理生理学教研室

decreased in the spleen-deficiency and phlegm stagnation syndrome group compared with the NC group ($P < 0.05$), although there was no significant difference between the two T2DM groups. Correlation analysis showed that Th1 cell proportion and Th1/Th2 ratio both had a significant correlation with FBG, and HbA1c ($r = 0.898, 0.678; 0.869, 0.630$) in spleen-deficiency and phlegm stagnation syndrome T2DM group, but there was no correlation between Th2 cell proportion and FBG or HbA1c. The similar results were obtained in the non-spleen-deficiency and phlegm stagnation syndrome group. Th1 cell proportion and Th1/Th2 ratio both had a significant correlation with FBG and HbA1c ($r = 0.751, 0.589; 0.658, 0.545$), and there was no correlation between Th2 cell proportion and FBG or HbA1c.

CONCLUSION: There is obvious Th1/Th2 imbalance in T2DM patients, and the imbalance correlates with the severity of glycometabolic disturbance, which is especially significant in T2DM patients with spleen-deficiency and phlegm stagnation syndrome. Altered cell immunological characteristics in T2DM patients may be one of the mechanisms by which spleen deficiency aggravates T2DM.

© 2015 Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

Key Words: Type 2 diabetes mellitus; Flow cytometry; Glycometabolism; T-lymphocyte subsets; Spleen-deficiency and phlegm stagnation syndrome

Wang XJ, Zeng HY, Zhou QY, Zhao L, Zhang Y. Relationship between Th1/Th2 balance and indexes of glucose metabolism in type 2 diabetes patients with spleen-deficiency and phlegm stagnation syndrome. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2015; 23(5): 876-880 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/23/876.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v23.i5.876>

摘要

目的: 探讨脾虚痰湿型2型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM)患者Th1/Th2细胞亚群漂移及其比例变化与糖代谢指标的关系。

方法: 共入选45例T2DM患者, 根据中医症候分型分为脾虚痰湿组(23例)与非脾虚痰湿组(22例)2组, 另招募20例健康者作为正常对照组, 观察各组空腹血糖(fasting blood

glucose, FBG)及糖化血红蛋白(glycosylated hemoglobin, HbA1c)等糖代谢相关指标, 同时采用流式细胞仪单克隆免疫荧光法检测CD4⁺ T细胞亚群Th1、Th2的细胞比率, 并对Th1/Th2比值与糖代谢相关指标进行相关性分析。

结果: 脾虚痰湿型T2DM组的Th1细胞比率、Th1/Th2比值明显高于非脾虚痰湿T2DM组及正常对照组(均 $P < 0.05$); Th2细胞比率明显低于正常对照组($P < 0.05$), 但与非脾虚痰湿型T2DM组相比差异无统计学意义。相关分析结果显示, 脾虚痰湿型T2DM组的Th1细胞比率及Th1/Th2比值均分别与FBG、HbA1c呈显著正相关($r = 0.898, 0.678; 0.869, 0.630$), 而Th2细胞比率与FBG、HbA1c未见明显相关关系。非脾虚痰湿型T2DM组Th1细胞比率及Th1/Th2比值均分别与FBG、HbA1c亦呈正相关($r = 0.751, 0.589; 0.658, 0.545$), 而Th2细胞比率与FBG、HbA1c未见明显相关关系。

结论: T2DM患者体内均存在明显的Th1/Th2细胞比率失衡且与糖代谢紊乱严重程度明显相关, 在脾虚痰湿型患者中这种变化尤为显著。改变T2DM患者的细胞免疫学特点可能是脾虚痰湿加重T2DM的作用机制之一。

© 2015年版权归百世登出版集团有限公司所有。

关键词: 2型糖尿病; 流式细胞术; 糖代谢; T细胞亚群; 脾虚痰湿

核心提示: 2型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM)患者体内均存在明显的Th1/Th2细胞比率失衡且与糖代谢紊乱严重程度明显相关, 在脾虚痰湿型患者中这种变化尤为显著。改变T2DM患者的细胞免疫学特点可能是脾虚痰湿加重T2DM的作用机制之一。

汪晓娟, 曾慧妍, 周钦云, 赵玲, 张园. 脾虚痰湿型2型糖尿病患者Th1/Th2细胞亚群漂移与糖代谢指标的关系. *世界华人消化杂志* 2015; 23(5): 876-880 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/23/876.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v23.i5.876>

0 引言

大量临床观察表明^[1,2], 脾虚痰湿人群极易发生糖代谢紊乱。痰湿不仅是消渴病的重要病理产物, 而且可作为一个主要病因导致消渴病的发

□ 研究前沿

动物实验和体外实验已证实1型糖尿病的发病与免疫功能失衡有关, 近期研究发现免疫机制也参与了T2DM的发病过程, 慢性低度炎症、胰岛素抵抗均与免疫功能紊乱密切相关。此外中医研究发现脾虚、痰湿亦与免疫有关, 脾虚痰湿人群的细胞免疫学特点及其与糖代谢之间的关系随之成为研究热点。

□ 相关报道

研究发现痰湿体质与T2DM的发病有关, 且与胰岛素抵抗相关。T2DM的发病机制与炎症和固有免疫激活有关, T2DM的某些危险因素、糖代谢恶化等均与免疫功能紊乱有关, 但具体机制尚未明确。T淋巴细胞如CD4⁺ Th1、Th2亚群与胰岛素抵抗相关。脾虚患者的细胞免疫功能较正常明显降低, 主要表现为T细胞减少、淋巴转化率、T淋巴细胞亚群、自然杀伤细胞的结合性及杀伤性降低等。T淋巴细胞与脂肪组织炎症有关, 肥胖状态下, Th1/Th2比例失衡, Th1细胞数量明显上升, Th2细胞数量下降。免疫细胞如何参与脂肪组织炎症、胰岛素抵抗和T2DM的具体机制还需进一步研究。

创新亮点

目前对T2DM与免疫功能失衡的关系研究较少,且主要集中在CD4⁺、CD8⁺与血糖水平、胰岛素抵抗等的关系上,但对Th细胞亚群漂移与糖代谢指标的关系研究较少。另外,研究脾虚痰湿型T2DM的细胞免疫特点有助于为中医的病机研究提供实验依据,也可以为中医证型量化提供新的思路。

应用要点

本研究通过对脾虚痰湿型T2DM患者T细胞亚群进行检测,观察该人群的Th1/Th2细胞亚群漂移及其比例变化特点,初步探讨其与糖代谢相关指标的关系,为T2DM的中医病因病机深入研究提供实验基础。

表 1 3组一般资料及糖代谢相关指标比较

	<i>n</i>	男/女(<i>n</i>)	年龄(岁)	FBG(mmol/L)	HbA1c(%)
脾虚痰湿型T2DM组	23	13/10	42.55 ± 6.90	12.87 ± 4.30 ^a	10.77 ± 2.72 ^a
非脾虚痰湿型T2DM组	22	13/9	44.65 ± 6.79	11.23 ± 3.91 ^a	9.45 ± 2.31 ^a
正常对照组	20	13/7	41.97 ± 6.70	5.20 ± 0.50	5.15 ± 0.41

^a*P*<0.05 vs 正常对照组。T2DM: 2型糖尿病; FBG: 空腹血糖; HbA1c: 糖化血红蛋白。

病及多种并发症的产生。然而,脾虚痰湿在2型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM)的发生及发展中的作用机制尚缺乏相应的深入研究。近年来研究发现糖代谢紊乱与免疫细胞功能紊乱密切相关,并逐渐成为一大研究热点^[3-5]。有关脾虚痰湿人群的细胞免疫学特点及其与糖代谢之间的关系研究目前尚未见报道。本研究通过对脾虚痰湿型T2DM患者T细胞亚群进行检测,观察该人群的Th1/Th2细胞亚群漂移及其比例变化特点,初步探讨其与糖代谢相关指标的关系,为T2DM的中医病因病机深入研究提供实验基础。

1 材料和方法

1.1 材料 45例T2DM[按美国糖尿病协会(American Diabetes Association, ADA)2010年诊断标准]均取自广东省中医院住院患者根据中医症候分型[参考1995年卫生部《中药新药临床研究指导原则(第二辑)》诊断标准]分为脾虚痰湿组和非脾虚痰湿组,其中脾虚痰湿组23例,男性13例,女性10例,平均年龄42.55岁±6.90岁;非脾虚痰湿组22例,男性13例,女性9例,平均年龄44.65岁±6.79岁。正常对照组为同期健康体检者20例,男性13例,女性7例,平均年龄41.97岁±6.70岁。排除标准:排除1型糖尿病、糖尿病急性并发症、恶性肿瘤、有严重心、脑、肝及肾病、自身免疫性疾病、血液病、各种感染、妊娠或哺乳妇女、有精神病史或其他不合作情况者、使用糖皮质激素、细胞毒制剂或非选择性免疫抑制剂者等。

1.2 方法 所有研究对象抽取外周血,分离单个核细胞。流式细胞术单克隆免疫荧光法测定外周血Th1、Th2细胞亚群比率,采用FACSCalibur流式细胞仪,winMDI 2.9软件进行数据分析,抗体用FITC标记的CD3、PE-Cyanine5标记的CD8a、PE标记的白介

素-4(interleukin 4, IL-4)、PE-Cyanine7标记的γ-干扰素(interferon γ, IFN-γ)单克隆抗体(eBioscience公司)葡萄糖氧化酶法检测空腹血糖(fasting blood glucose, FBG);单克隆抗体法测定糖化血红蛋白(glycosylated hemoglobin, HbA1c)。

统计学处理 实验数据计量资料以mean±SD表达。采用SPSS17.0软件进行统计分析。年龄、FBG、HbA1c、Th1比率、Th2比率及Th1/Th2比值采用单因素方差分析(One-way ANOVA)以及非独立样本*t*检验。相关性采用Pearson相关性分析。检验标准α定为0.05。*P*<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 3组一般资料及糖代谢相关指标比较 3组间例数、年龄及性别构成上差异均无统计学意义(*P*>0.05),具有可比性。脾虚痰湿型T2DM组及非脾虚痰湿型T2DM组的FBG及HbA1c水平明显高于正常对照组,差异有统计学意义(*P*<0.05);脾虚痰湿型T2DM组与非脾虚痰湿型T2DM组相比,FBG及HbA1c水平差异均无统计学意义(表1)。

2.2 3组Th1、Th2细胞比率及Th1/Th2比值比较 脾虚痰湿型T2DM组及非脾虚痰湿型T2DM组的Th1比率、Th1/Th2比值均明显高于正常对照组,其中以脾虚痰湿型T2DM组最高,非脾虚痰湿型T2DM组次之,3组间两两比较差异均具有统计学意义(均*P*<0.05)。脾虚痰湿型T2DM组及非脾虚痰湿型T2DM组的Th2比率均明显低于正常对照组(均*P*<0.05),但脾虚痰湿型T2DM组与非脾虚痰湿型T2DM组比较差异无统计学意义(表2)。

2.3 3组糖代谢指标与Th1、Th2比率、Th1/Th2比值之间的相关性分析 Pearson相关性分析结果显示,脾虚痰湿型T2DM组的FBG及HbA1c分别与Th1比率、Th1/Th2比值之间均存在

表 2 各组Th1、Th2比率及Th1/Th2比值的比较 (mean ± SD)

	Th1(%) (CD3 ⁺ CD8 ⁺ IFN- γ ⁺)	Th2(%) (CD3 ⁺ CD8 ⁺ IL-4 ⁺)	Th1/Th2 比值
脾虚痰湿型T2DM组	24.30 ± 7.87 ^{ac}	4.48 ± 1.37 ^c	6.30 ± 4.75 ^{ac}
非脾虚痰湿型T2DM组	14.03 ± 4.40 ^c	4.31 ± 1.01 ^c	3.35 ± 1.00 ^c
正常对照组	5.48 ± 1.04	7.95 ± 3.71	0.78 ± 0.25

^a $P < 0.05$ vs 非脾虚痰湿型T2DM组; ^c $P < 0.05$ vs 正常对照组. T2DM: 2型糖尿病; IFN- γ : γ -干扰素; IL-4: 白介素-4.

正相关关系($r = 0.898$ 、 0.678 , 均 $P < 0.05$)($r = 0.869$ 、 0.630 , 均 $P < 0.05$); 而Th2比率与FBG、HbA1c均未见明显相关关系. 非脾虚痰湿型T2DM组的结果与脾虚痰湿型T2DM组相似, FBG及HbA1c分别与Th1比率、Th1/Th2比值之间均呈正相关关系($r = 0.751$ 、 0.589 , 均 $P < 0.05$)($r = 0.658$ 、 0.545 , 均 $P < 0.05$); Th2比率与FBG、HbA1c均无明显相关关系. 正常对照组各T细胞亚群与FBG、HbA1c未见明显相关关系.

3 讨论

现代医学认为, 胰岛素抵抗和 β 细胞功能障碍是T2DM的病理生理基础. 近年来, 无论是T2DM动物模型还是T2DM患者的研究均表明^[5-8], 胰岛素抵抗与CD4⁺辅助性T细胞亚群的极化和动态平衡密切相关. 现代中医研究表明“脾虚”“痰湿”均与免疫存在着密切的联系. 中医“脾”的防卫功能与现代医学的免疫功能有许多相似之处. 既往研究^[7-11]证实脾虚证存在细胞免疫功能异常, 主要表现为T细胞减少、淋巴转化率、T淋巴细胞亚群、自然杀伤(natural killer, NK)细胞的结合性及杀伤性等细胞免疫功能都有不同程度的变化. 故不难看出脾虚痰湿可能导致免疫细胞功能紊乱. 上述研究均提示脾虚痰湿作为T2DM的重要病机之一, 其加重T2DM的作用机制可能与改变机体的免疫细胞功能有关, 但尚未有明确答案.

本研究结果显示无论是脾虚痰湿型还是非脾虚痰湿型T2DM患者, 其体内Th1比率、Th1/Th2比值均比健康成人明显升高, Th2比率则明显降低, 该结果与文献报道相符^[4,12]. CD4⁺辅助性T细胞在适应性免疫应答中发挥调节作用, 按照分化和功能特征其可分为Th1、Th2等

多个细胞亚群. Th1细胞主要通过产生IFN- γ 、IL-2等前炎症因子发挥促炎作用, Th2细胞则产生IL-4、IL-10等抗炎因子以发挥抗炎作用^[13]. 一旦Th1/Th2平衡被打破, Th1亚群过度激活就会出现炎症反应瀑布效应, 导致胰岛素抵抗的发生^[14,15]. 该结果提示T2DM患者体内存在明显的细胞免疫异常, 这种异常以Th1细胞比率增多, Th2细胞比率减少为特征, Th1/Th2比例失衡并向Th1方向漂移, 导致机体处于慢性低度炎症状态.

我们的研究还发现在T2DM患者中, 虽然脾虚痰湿型患者的Th2细胞比率变化与非脾虚痰湿型患者相似, 但其Th1细胞比率明显增加, 远远高于非脾虚痰湿型患者, 从而导致Th1/Th2比值失衡明显增加, 说明T2DM患者体内虽普遍存在Th1/Th2比例失衡, 但脾虚痰湿证的患者比非脾虚痰湿证的患者体内的Th1/Th2比例向Th1方向偏移更加明显, 脾虚痰湿可能是T2DM患者这种免疫失衡的加重因素之一. 该结果进一步提示脾虚痰湿可能是通过进一步加重T2DM患者的外周血Th1/Th2细胞比例失衡, 加重其功能紊乱, 使机体CD4⁺ Th细胞向Th1细胞亚群优势漂移介导脂肪组织炎症、胰岛素抵抗, 引发慢性炎症和免疫紊乱, 进而加重糖代谢紊乱.

相关性分析显示T2DM患者的Th1比率、Th1/Th2比例变化均与血糖水平呈正相关关系, 而健康成人则无此相关关系. 该结果进一步说明机体免疫状态与糖代谢紊乱严重程度密切相关, 细胞免疫损伤参与了T2DM的发生和发展.

总之, T2DM患者体内存在明显的T细胞亚群比例失衡, Th1/Th2比例向促炎方向漂移且与糖代谢紊乱的严重程度相关; 而脾虚痰湿型T2DM患者的这种T细胞亚群比例漂移尤为

名词解释

CD4⁺ Th细胞: 是构成机体免疫系统的主要细胞, 分为Th0、Th1、Th2亚群, Th0是Th1、Th2的前体细胞, Th1亚群细胞主要分泌 γ -干扰素(interferon γ)、肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor)- α 、白介素(interleukin, IL)-2等, 参与细胞免疫和迟发型超敏性炎症的形成, Th2亚群细胞通过分泌IL-4、IL-5、IL-6, 参与体液免疫应答.

同行评价

本文主要通过流式细胞仪检测患者外周血单个核细胞Th1/Th2细胞亚群, 对临床进一步明确T2DM的发生机制有一定指导意义, 同时可为T2DM的中医病因病机深入研究提供一定实验基础。

显著, 提示进一步加重T细胞亚群比例失衡可能是脾虚痰湿参与T2DM发生发展的作用机制之一。

参考文献

- 1 王震, 崔刚. 痰湿体质糖尿病的发病机理及治疗思路. 现代中医药 2010; 30: 57-58
- 2 范梦男. 痰湿体质与2型糖尿病胰岛素抵抗的相关性. 辽宁中医药大学学报 2008; 10: 69-70
- 3 Pickup JC. Inflammation and activated innate immunity in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2004; 27: 813-823 [PMID: 14988310 DOI: 10.2337/diacare.27.3.813]
- 4 Zhao R, Tang D, Yi S, Li W, Wu C, Lu Y, Hou X, Song J, Lin P, Chen L, Sun L. Elevated peripheral frequencies of Th22 cells: a novel potent participant in obesity and type 2 diabetes. *PLoS One* 2014; 9: e85770 [PMID: 24465695 DOI: 10.1371/journal.pone.0085770]
- 5 Chen H, Wen F, Zhang X, Su SB. Expression of T-helper-associated cytokines in patients with type 2 diabetes mellitus with retinopathy. *Mol Vis* 2012; 18: 219-226 [PMID: 22312190]
- 6 Chatzigeorgiou A, Karalis KP, Bornstein SR, Chavakis T. Lymphocytes in obesity-related adipose tissue inflammation. *Diabetologia* 2012; 55: 2583-2592 [PMID: 22733483 DOI: 10.1007/s00125-012-2607-0]
- 7 段永强, 成映霞, 程容, 梁玉杰, 朱立鸣. 脾虚证进程中小鼠特异性/非特异性免疫功能变化及中药的干预作用. 中国老年学杂志 2011; 31: 2874-2876
- 8 陈学习, 张英杰, 李美霞, 吴赞. 脾虚证与免疫系统关系研究概况与思考. 中国当代医药 2010; 17: 6-8
- 9 赵荣华, 谢鸣, 李聪, 王旭丹, 张敬升, 张雪庭. 肝郁、脾虚和肝郁脾虚证模型大鼠的免疫功能变化. 北京中医药大学学报 2013; 36: 821-824
- 10 王明明, 郁晓维. 脾虚证免疫学研究. 吉林中医药 2011; 31: 1035-1037
- 11 钱泽南, 钱会南. 脾虚证与神经-内分泌-免疫调节相关机制研究. 辽宁中医杂志 2010; 37: 401-403
- 12 王旭方. 肥胖与免疫炎症. 肾脏病与透析肾移植杂志 2011; 20: 455-460
- 13 Awasthi A, Kuchroo VK. Th17 cells: from precursors to players in inflammation and infection. *Int Immunol* 2009; 21: 489-498 [PMID: 19261692 DOI: 10.1093/intimm/dxp021]
- 14 Seijkens T, Kusters P, Chatzigeorgiou A, Chavakis T, Lutgens E. Immune cell crosstalk in obesity: a key role for costimulation? *Diabetes* 2014; 63: 3982-3991 [PMID: 25414012 DOI: 10.2337/db14-0272]
- 15 Guzmán-Flores JM, López-Briones S. [Cells of innate and adaptive immunity in type 2 diabetes and obesity]. *Gac Med Mex* 2012; 148: 381-389 [PMID: 22976756]

编辑: 韦元涛 电编: 都珍珍

