

## مطالعه برهمکنش های مشتقات کوئینازولون با ساختار G-quadruplex DNA به عنوان یکی از استراتژی های نوین ضد سرطان با استفاده از روش های محاسباتی

کیانا غلامجانی مقدم و سید مجید هاشمیان زاده\*

دانشکده شیمی، دانشگاه علم و صنعت ایران، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۹۴/۰۷/۱۳ تاریخ تصحیح: ۹۴/۰۸/۲۰ تاریخ پذیرش: ۹۴/۰۸/۲۳

### چکیده

در سال های اخیر پایدار کردن ساختارهای G-quadruplex به عنوان یک هدف در درمان سرطان توجه زیادی را به خود جلب کرده است. مشتقات کوئینازولون (QD) از دسته لیگاندهایی هستند که جهت پایدار کردن این ساختارها طراحی و سنتز شده اند. درک ماهیت برهمکنش بین این لیگاندها و ساختار G-quadruplex از اهمیت بسیار بالایی برخوردار است. جهت بررسی دقیق تر اینکه چگونه این برهمکنش ها با تغییر ساختار لیگاند تحت تأثیر قرار می گیرند، برهمکنش های بین دو مشتق کوئینازولون (QD1 و QD2) و ساختار G-quadruplex با استفاده از روش های داکینگ مولکولی و شبیه سازی دینامیک مولکولی مورد مطالعه و بررسی قرار گرفت. مطالعات نشان داد که لیگاند QD1 با زنجیره آلکیلی کوتاهتر برهمکنش های قویتری نسبت به لیگاند QD2 دارد. در واقع کوتاهتر کردن طول زنجیره این مشتقات نقش بسیار مهمی در تشکیل پیوندهای هیدروژنی و برهمکنش های الکترواستاتیک با گروه فسفات چارچوب G-quadruplex ایفا می کند که به طور تجربی اطلاعاتی درباره این برهمکنش ها بدست نیامده است.

واژگان کلیدی: G-quadruplex، کوئینازولون، داکینگ مولکولی، شبیه سازی دینامیک مولکولی، انرژی آزاد

### ۱- مقدمه

یکی از ساختارهای DNA، ساختار چهار رشته ای است که G-quadruplex نامیده می شود [۱-۳]. این ساختارها در مناطقی از DNA با توالی های غنی از گوانین تشکیل می شوند که در انتهای کروموزوم یوکاریوت ها موسوم به تلومر<sup>۱</sup> [۴] و راه انداز<sup>۲</sup> برخی از آنکوژن ها [۵-۹] حضور دارند. از آنجاییکه مکانیزم حفظ طول تلومر و تنظیم رونویسی آنکوژن ها از اهداف مهم در طراحی داروهای ضد سرطان محسوب می شوند، در چند دهه اخیر پایدار کردن ساختارهای G-quadruplex تشکیل شده در این نواحی با استفاده از لیگاندهای مختلف به عنوان یک هدف استراتژیک در درمان سرطان شناخته شده است [۱۰-۱۳].

hashemianzadeh@iust.ac.ir

\* نویسنده مسئول: دانشیار دانشکده شیمی دانشگاه علم و صنعت ایران، تهران، ایران

<sup>1</sup> telomere

<sup>2</sup> promoter

جهت طراحی داروهای ضد سرطان می بایست خصوصیات ساختاری G-quadruplex ها، نقش بیولوژیکی آنها و موقعیت های مناسب این ساختارها جهت برهمکنش با لیگاندهای مختلف را مورد بررسی قرار داد. به طور کلی باید نواحی موثر G-quadruplex همچون G-quartet (ساختار های مسطح تشکیل شده توسط گوانین ها به وسیله پیوندهای هیدروژنی هوگستین<sup>۱</sup>)، لوپ ها، شیارها، چارچوب<sup>۲</sup> با بار منفی و کانال مرکزی G-quadruplex جهت برهمکنش با کاندیداهای دارویی در نظر گرفته شود. این نواحی نقش بسیار مهمی در افزایش انتخاب پذیری برهمکنش بین این کاندیداهای دارویی و G-quadruplex ایفا می کنند [۱۴].

c-kit یک پروتوآنکوژن<sup>۳</sup> است که در حالت عادی جهت کنترل رشد و تکثیر سلول ها نقش مهمی دارد. ولی در صورت بروز جهش، به آنکوژن تبدیل می شود و باعث بروز سرطان های معده، خون، پوست و پانکراس می گردد [۱۹-۱۵]. ساختارهای G-quadruplex تشکیل شده در راه انداز این ژن توجه بسیاری از محققان را به خود جلب کرده است تا لیگاندهایی طراحی کنند که بتوانند به طور انتخاب پذیری با این ساختارها برهمکنش کنند که نتیجه آن مهار بیان این ژن در سلول های سرطانی است. تاکنون لیگاندهای زیادی طراحی شده اند که ساختار G-quadruplex تشکیل شده در راه انداز این ژن را پایدار می سازند [۲۰-۲۶]. مشتقات کوئینازولون<sup>۴</sup> بدلیل خواص ضد تومور، ضد التهاب و غیره از آن دسته لیگاندهایی هستند که جهت پایدار سازی ساختار G-quadruplex راه انداز آنکوژن c-kit سنتز شدند [۲۷].

به طور کلی جهت طراحی و سنتز لیگاندهای پایدارکننده ساختارهای G-quadruplex، درک جزئیات برهمکنش بین لیگاند و این ساختارها از اهمیت بسیار زیادی برخوردار است. در واقع می توان از روش های محاسباتی جهت مطالعه و بررسی این برهمکنش ها استفاده نمود [۲۸]. مطالعات داکینگ و شبیه سازی دینامیک مولکولی از جمله روش های محاسباتی هستند که می توان از آنها در درک ساختارها و دینامیک مولکول های زیستی و طراحی داروهای جدید بهره مند شد.

در این مطالعه، برهمکنش های بین دو مشتق کوئینازولون QD1 و QD2 با ساختار G-quadruplex در منطقه راه انداز ژن c-kit با استفاده از روش های محاسباتی مورد بررسی قرار گرفته است.

<sup>1</sup> Hoogsteen

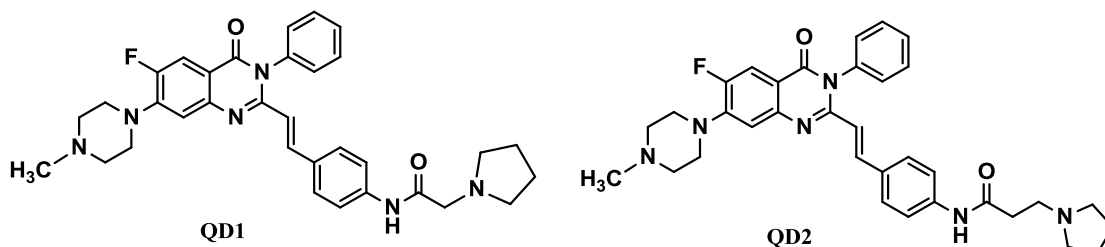
<sup>2</sup> backbone

<sup>3</sup> proto-oncogene

<sup>4</sup> Quinazolone

## ۲- روش های محاسباتی

جهت انجام روش های محاسباتی ساختار G-quadruplex c-kit با کد 2O3M.pdb انتخاب شد و ساختار هندسی دو لیگاند (شکل ۱) با استفاده از نرم افزار گوسین ۰۹ و روش DFT در سطح B3lyp/6-31+G\* بهینه شدند.



شکل ۱. ساختار ۲ مشتق کوئینازولون

## ۲-۱ - داکینگ مولکولی

به منظور پیش بینی جایگاه های اتصال لیگاندها در برهمکنش با ساختار G-quadruplex از نرم افزار AutoDock Vina استفاده گردید. یک محفظه مکعبی با ابعاد  $30 \times 30 \times 30$  آنگستروم با فضای ۱ آنگستروم از مرکز G-quadruplex در نظر گرفته شد. با ادغام کردن هیدروژن های غیر قطبی، مشخص کردن بارهای جزئی و مشخص کردن پیوندهای قابل چرخش لیگاند، محاسبات انجام شد و نتایج بدست آمده با یکدیگر مقایسه گردید.

## ۲-۲ - شبیه سازی دینامیک مولکولی

شبیه سازی دینامیک مولکولی بر روی ساختارهای بدست آمده از داکینگ با استفاده از نسخه ۵-۶-۴ نرم افزار گرومکس<sup>۱</sup> انجام گردید. از میدان نیروی parmbsc0 و GAFF برای ساختار G-quadruplex و لیگاندها جهت مطالعات شبیه سازی استفاده گردید. در ابتدا سیستم ها در یک جعبه تری کلینیک از مولکول های آب با مدل TIP3P قرار گرفتند. سپس بار سیستم ها با اضافه نمودن یون های پتاسیم مورد نیاز خنثی گردید. اولین مرحله بعد از آماده سازی سیستم مرحله به حداقل رساندن انرژی سیستم است که با استفاده از الگوریتم steepest descent در طی ۲۰۰۰ مرحله انجام پذیرفت. سپس سیستم ها تحت شرایط NPT یعنی در دمای ۳۰۰ کلوین و فشار ۱ بار به مدت ۳۰۰ps به تعادل رسیدند. از الگوریتم LINCS و روش ذرات مش اوالد<sup>۲</sup> (PME) به ترتیب جهت مقید کردن پیوندها و محاسبه برهمکنش های دور برد الکترواستاتیک استفاده گردید. همچنین جهت به تعادل رسانی سیستم ها ترموستات velocity rescaling و باروستات

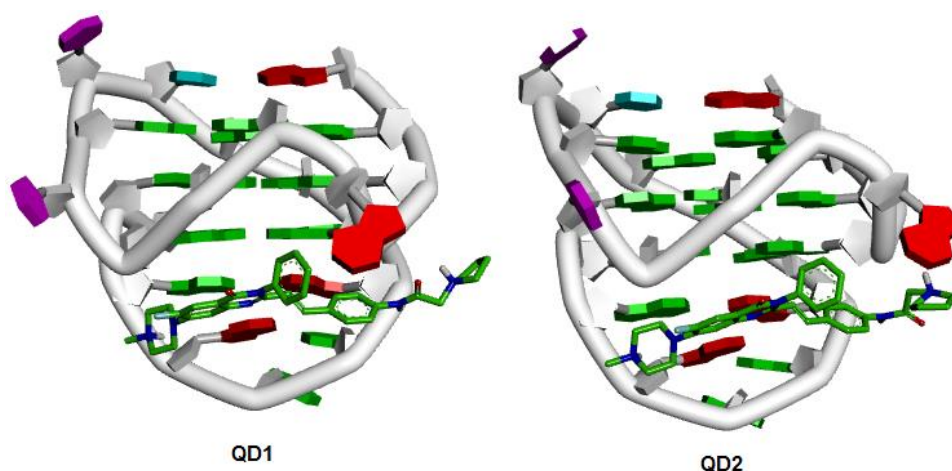
<sup>1</sup> Gromacs<sup>2</sup> Particle Mesh Ewald

Parrinello-Rahman مورد استفاده قرار گرفت. پس از رساندن سیستم به تعادل مرحله تولید<sup>۱</sup> یا نمونه برداری است که در شرایط NPT به مدت ۵۰ نانو ثانیه و گام زمانی ۲ فمتو ثانیه انجام گردید. در نهایت نتایج بدست آمده به کمک دستورات گرومکس و با استفاده از نرم افزارهای گرافیکی مانند Chimera و VMD مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

### ۳- بحث و نتیجه گیری

#### ۳-۱- داکینگ مولکولی

آنالیز نتایج داکینگ نشان می دهد که لیگاندها در انتهای ۳' ساختار G-quadruplex قرار گرفته و دو گروه آمین انتهایی لیگاندها از طریق برهمکنش های الکترواستاتیک و پیوندهای هیدروژنی با چارچوب این ساختار برهمکنش می دهند که در شکل ۲ نشان داده شده است. در جدول ۱ انرژی اتصال کمپلکس های تشکیل شده گزارش شده است که بیان می کند لیگاند QD1 با زنجیره جانبی کوتاهتر نسبت به لیگاند QD2 انرژی برهمکنش بیشتری با ساختار G-quadruplex دارد که منطبق با نتایج تجربی است.



شکل ۲. ساختار بدست آمده از نتایج داکینگ

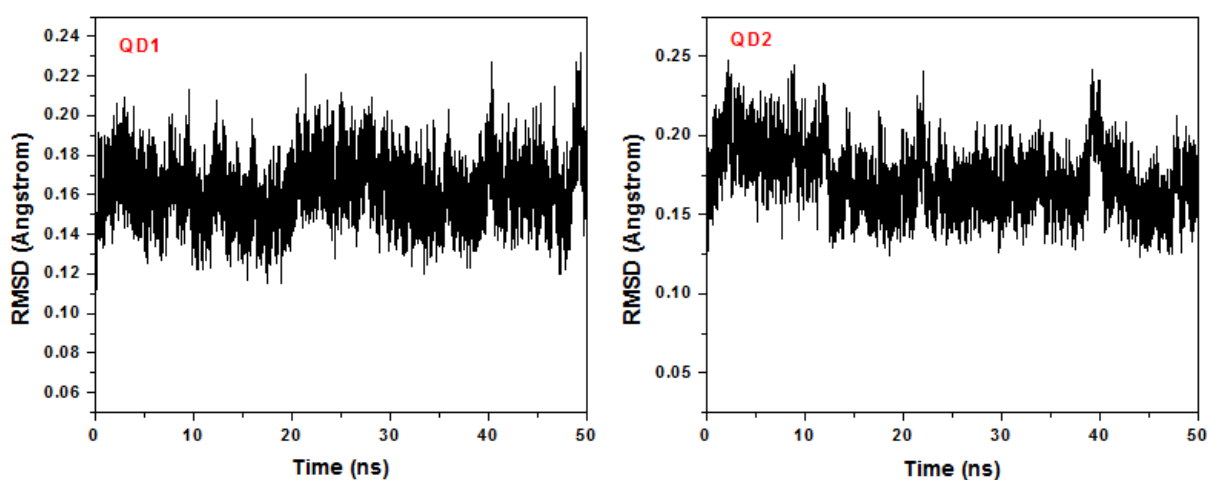
جدول ۱- انرژی اتصال لیگاندها با ساختار G-quadruplex (کیلوکالری بر مول)

کمپلکس	انرژی اتصال
QD1	-۱۲/۸
QD2	-۱۰/۹

<sup>1</sup> Production phase

## ۳-۲- شبیه سازی دینامیک مولکولی

جهت تعیین پایداری ساختاری سیستم ها از معیار انحراف جذر میانگین مربع<sup>۱</sup> (RMSD) استفاده گردید. مقادیر RMSD ساختار G-quadruplex نسبت به ساختار اولیه مرجع اندازه گیری و در طی ۵۰ نانوثانیه شبیه سازی ترسیم گردید. با توجه به نمودار RMSD ساختارهای G-quadruplex ارائه شده در شکل ۳، میزان انحرافات کوچکی در هر دو لیگاند QD1 و QD2 مشاهده می شود که می توان نتیجه گرفت که هر دو کمپلکس در طی زمان شبیه سازی کاملاً پایدار هستند و می توان آنالیزهای بعدی را بر روی مسیرهای شبیه سازی انجام داد.



شکل ۳. نمودار RMSD ساختار G-quadruplex در برهمکنش با لیگاند QD1 و QD2

یکی دیگر از آنالیزهای انجام شده بر روی نتایج شبیه سازی، مطالعه پیوندهای هیدروژنی ایجاد شده بین لیگاندها و ساختار G-quadruplex است که نقش بسیار مهمی در پایداری این ساختار ایفا می کند. جدول ۲، پیوندهای هیدروژنی تشکیل شده در طی شبیه سازی و درصدی از زمان شبیه سازی که این پیوندها تشکیل می شوند (درصد اشغال) را گزارش می کند. همچنین این پیوندها به صورت شماتیک برای هر دو لیگاند QD1 و QD2 در شکل ۴ نشان داده شده است. همانطور که در این شکل دیده می شود لیگاند QD1 از طریق ۴ پیوند هیدروژنی با ساختار G-quadruplex برهمکنش می دهد. به طوریکه اتم هیدروژن متصل به نیتروژن حلقه های زنجیره جانبی (N22 و N40) به ترتیب از طریق پیوندهای هیدروژنی با اکسیژن گروه قند گوانین ۲۰ (O4') و اکسیژن گروه فسفات (O1P) گوانین ۱۷ برهمکنش دارند. همچنین اتم

<sup>1</sup> Root mean square deviation

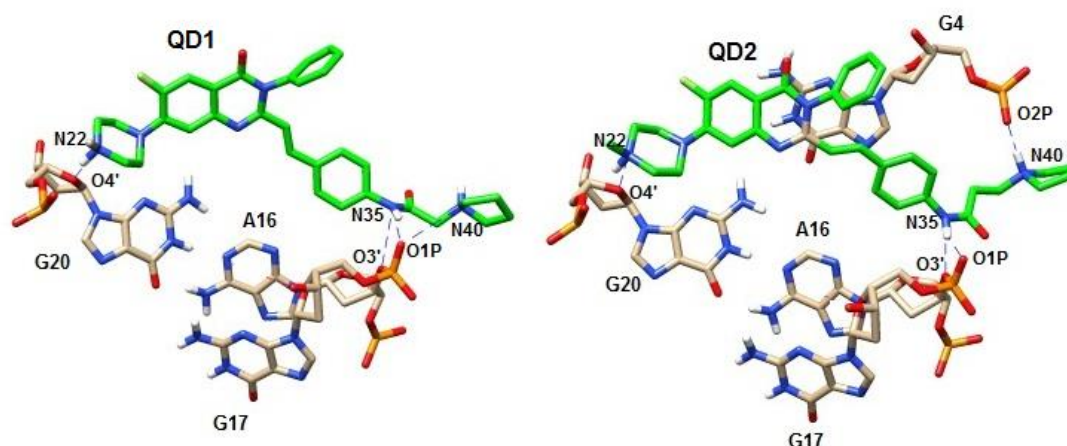
هیدروژن گروه -NH-CO- (N35) متصل شده به گروه بنزیلیدن نیز با اکسیژن های گروه فسفات گوانین ۱۷ و آدنین ۱۶ پیوندهای هیدروژنی تشکیل می دهد.

در مورد لیگاند QD2 همانند لیگاند QD1 اتم هیدروژن متصل به نیتروژن شماره ۲۲ (N22) با اکسیژن ۴' گروه قند گوانین ۲۰ برهمکنش دارد. علاوه بر این، جهت گیری گروه -NH-CO- به گونه ای است که اتم هیدروژن گروه آمیدی می تواند با یکی از اکسیژن های گروه فسفات (O1P) گوانین ۱۷ و اکسیژن ۳' گروه فسفات آدنین ۱۶ پیوند هیدروژنی تشکیل دهد. همچنین اتم هیدروژن متصل به نیتروژن شماره ۴۰ (N40) گروه پیرولیدین در انتهای زنجیره جانبی این لیگاند بدلیل نزدیک شدن به گوانین ۴ می تواند برهمکنش های هیدروژنی با یکی از اکسیژن های گروه فسفات (O2P) داشته باشد.

این مطالعات نشان دادند که پیوندهای هیدروژنی تشکیل شده بین این لیگاندها و ساختار G-quadruplex نقش بسیار مهمی در افزایش تمایل اتصال لیگاندها به این ساختار دارند.

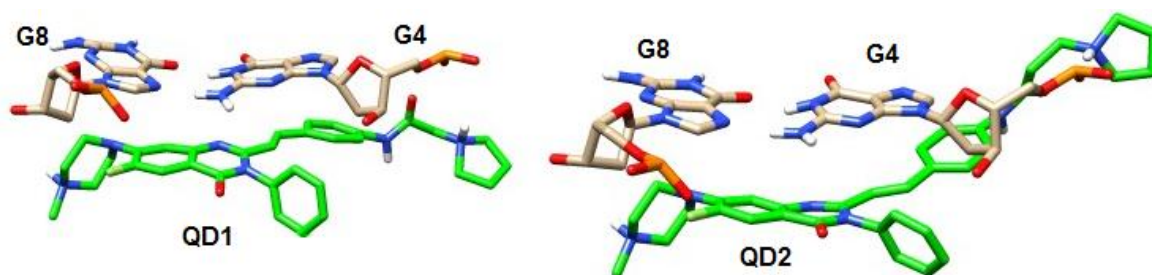
جدول ۲- پیوندهای هیدروژنی تشکیل شده در طی ۵۰ نانو ثانیه شبیه سازی دینامیک مولکولی

کمپلکس	گیرنده	دهنده	میزان اشغال
QD1	Lig(H45)N40	17DG(O1P)	۵۱/۷
	Lig(H36)N35	17DG(O1P)	۵۰/۴
	Lig(H36)N35	16DA(O3')	۵۱/۰
	Lig(H25)N22	20DG(O4')	۸۱/۵
QD2	Lig(H45)N40	4DG(O2P)	۹۶/۸
	Lig(H36)N35	17DG(O1P)	۵۲/۴
	Lig(H36)N35	16DA(O3')	۷۷/۸
	Lig(H25)N22	20DG(O4')	۸۷/۶



شکل ۴. موقعیت پیوندهای هیدروژنی تشکیل شده بین لیگاندهای QD1 و QD2 و ساختار G-quadruplex

مهمترین آنالیز انجام شده جهت تعیین میزان پایداری کمپلکس های تشکیل شده و مقایسه آنها، آنالیز MMPBSA<sup>۱</sup> در بدست آوردن انرژی آزاد اتصال<sup>۲</sup> است. نتایج این آنالیز نشان می دهد که لیگاند QD1 با انرژی اتصال ۷۸/۴۰۵- کیلوکالری بر مول نسبت به QD2 با انرژی ۶۳/۸۲۹- کیلوکالری بر مول پایداری بیشتری ایجاد می نماید که با نتایج بدست آمده از مطالعات تجربی تطابق دارد. همچنین به کمک این آنالیز می توان میزان سهم و ماهیت هر کدام از برهمکنش ها را تخمین زد. با توجه به جدول ۳ مقایسه انرژی های بدست آمده در فاز گاز با انرژی های حلالپوشی نشان می دهد که انرژی الکترواستاتیک، نیروی غالب جهت اتصال لیگاندها به ساختار G-quadruplex محسوب می شود. مقادیر بسیار منفی انرژی الکترواستاتیک بیانگر این موضوع است که گروه های آمینی قابل پروتونه شدن در زنجیره جانبی این لیگاندها می توانند به طور قوی با بار منفی چارچوب G-quadruplex برهمکنش داشته باشند. علاوه بر این، بدلیل برهمکنش های واندروالس بین فارماکوفور بنزیلیدین و کوئینازولون و سطح G-quartet (شکل ۵)، انرژی واندروالس جهت تشکیل این کمپلکس ها نیز مطلوب می باشد. از طرفی دیگر از مقایسه انرژی های بدست آمده برای لیگاندهای QD1 و QD2 می توان به این نتیجه رسید که لیگاند QD1 با زنجیره آلکیلی کوتاهتر می تواند برهمکنش های الکترواستاتیک و واندروالس قویتری با ساختار G-quadruplex تشکیل دهد که در نتیجه آن باعث پایداری بیشتر این ساختار شود. بنابراین آنالیز انرژی یک تکنیک قوی می باشد که می توان جهت پیش بینی تمایل اتصال لیگاند یا دارو به مولکول های زیستی مورد استفاده قرار گیرد. در واقع با کمک این آنالیز می توان اطلاعاتی راجع به سهم و نوع برهمکنش ایجاد شده بین مولکول ها بدست آورد که به طور تجربی حصول این امر دشوار می باشد.



شکل ۵. برهمکنش های  $\pi$ - $\pi$  تشکیل شده بین لیگاندها و G-quartets

<sup>1</sup> Molecular Mechanics, Poisson-Boltzmann, Surface Area

<sup>2</sup> Binding free energy

جدول ۳- انرژی آزاد اتصال بدست آمده از آنالیز MMPBSA بر حسب کیلوکالری برمول

انرژی آزاد اتصال (۴+۳+۲+۱)	انرژی حلالپوشی غیر قطبی (۴)	انرژی حلالپوشی قطبی (۳)	انرژی واندروالس در فاز گازی (۲)	انرژی الکترواستاتیک در فاز گازی (۱)	کمپلکس
-۷۸/۴۰۵	-۲۰/۲۹۲	۴۴۶۴/۹۸۲	-۲۴۴/۸۲۷	-۴۲۷۸/۲۶۸	QD1
-۶۳/۸۲۹	-۲۰/۶۷۱	۴۴۵۵/۱۱۳	-۲۳۸/۰۲۳	-۴۲۶۰/۲۴۹	QD2

#### ۴- نتیجه گیری

برهمکنش های بین دو مشتق کوئینازولون و ساختار c-kit G-quadruplex جهت بررسی اثر تغییر ساختار لیگاند بر روی ماهیت برهمکنش و انرژی اتصال با استفاده از روش های محاسباتی مورد مطالعه قرار گرفتند. محاسبات پیوندهای هیدروژنی نشان داد که این پیوندها در پایدارسازی ساختار G-quadruplex نقش مهمی دارد. همچنین آنالیز انرژی مشخص نمود که لیگاند QD1 نسبت به QD2 انرژی اتصال قویتری با ساختار G-quadruplex دارد. نتایج به این نکته اشاره می کند که نیروی محرکه جهت تشکیل کمپلکس بین لیگاندها و G-quadruplex، برهمکنش های الکترواستاتیک است. این برهمکنش بدلیل جهت گیری لیگاند QD1 با زنجیره جانبی کوتاهتر درمقابل ساختار G-quadruplex نسبت به لیگاند QD2 سهم بیشتری دارد. این مطالعات نشان داد که کلی با کمک روش های شبیه سازی دینامیک مولکولی می توان اطلاعاتی راجع به ماهیت و سهم برهمکنش های بین لیگاند و G-quadruplex بدست آورد که گامی در جهت طراحی لیگاندهایی با خاصیت پایدار کنندگی بیشتر پیش روی ما قرار می دهد.

#### ۵- منابع

- [1] S. urge, G. N. Parkinson, P. Hazel, A. K. Todd and S. Neidle, *Nucleic Acids Res.*, **34** (2006) 5402.
- [2] J. L. Huppert and S. Balasubramanian, *Nucleic Acids Res.* **33** (2005) 2908.
- [3] A. K. Todd, M. Johnston and S. Neidle, *Nucleic Acids Res.*, **33** (2005) 2901.
- [4] H. J. Lipps and D. Rhodes, *Trends Cell Biol.*, **19** (2009) 414.
- [5] H. Fernando, A. P. Reszka, J. Huppert, S. Ladame, S. Rankin, A. R. Venkitaraman, S. Neidle and S. Balasubramanian, *Biochemistry*, **45** (2006) 7854.
- [6] S. Rankin, A. P. Reszka, J. Huppert, M. Zloh, G. N. Parkinson, A. K. Todd, S. Ladame, S. Balasubramanian and S. Neidle, *J. Am. Chem. Soc.*, **127** (2005) 10584.
- [7] A. Siddiqui-Jain, C. L. Grand, D. J. Bearss and L. H. Hurley, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **99** (2002) 11593.



- [8] J. Dai, T. S. Dexheimer, D. Chen, M. Carver, A. Ambrus, R. A. Jones and D. Yang, *J. Am. Chem. Soc.*, **128** (2006) 1096.
- [9] S. Cogoi and L. E. Xodo, *Nucleic Acids Res*, **34** (2006) 2536.
- [10] Z. A. Waller, S. A. Sewitz, S. T. D. Hsu and S. Balasubramanian, *J. Am. Chem. Soc.*, **131** (2009) 12628.
- [11] J. Dash, P. S. Shirude, S. T. D. Hsu and S. Balasubramanian, *J. Am. Chem. Soc.*, **130** (2008) 15950.
- [12] K. Jantos, R. Rodriguez, S. Ladame, P. S. Shirude and S. Balasubramanian, *J. Am. Chem. Soc.*, **128** (2006) 13662.
- [13] M. Bejugam, S. Sewitz, P. S. Shirude, R. Rodriguez, R. Shahid and S. Balasubramanian, *J. Am. Chem. Soc.*, **129** (2007) 12926.
- [14] M. Pierre, Y. Singh, and E. Defrancq. *Chem. Soc. Rev.*, **40** (2011) 5293.
- [15] S. Sakurai, T. Fukasawa, J. M. Chong, A. Tanaka and M. Fukayama, *Cancer Sci.*, **90** (1999) 1321.
- [16] A. Yasuda, H. Sawai, H. Takahashi, N. Ochi, Y. Matsuo, H. Funahashi, M. Sato, Y. Okada, H. Takeyama and T. Manabe, *Mol. Cancer*, **5** (2006) 46.
- [17] A. McIntyre, B. Summersgill, B. Grygalewicz, A. J. Gillis, J. Stoop, R. J. van Gurp, N. Dennis, C. Fisher, R. Huddart and C. Cooper, et al. *Cancer Res.*, **65** (2005) 8085.
- [18] M. Miettinen and J. Lasota, *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.*, **13** (2005) 205.
- [19] K. S. Smalley, K. L. Nathanson and K. T. Flaherty, *Cancer Res.*, **69** (2009) 3241.
- [20] C. W. Ong, M. C. Liu, K. D. Lee, K. W. Chang, Y. T. Yang, H. W. Tung and K. R. Fox, *Tetrahedron*, **68** (2012) 5453.
- [21] S. Manaye, R. Eritja, A. Aviñó, J. Jaumot and R. Gargallo, *BBA-Gen Subjects*, **1820** (2012) 1987.
- [22] M. Bejugam, M. Gunaratnam, S. Müller, D. A. Sanders, S. Sewitz, J. A. Fletcher, S. Neidle and S. Balasubramanian, *ACS Med. Chem. Lett.*, **1** (2010) 306.
- [23] K. I. McLuckie, Z. A. Waller, D. A. Sanders, D. Alves, R. Rodriguez, J. Dash, G. J. McKenzie, A. R. Venkitaraman and S. Balasubramanian, *J. Am. Chem. Soc.*, **133** (2011) 2658.
- [24] J. Dash, R. Nath Das, N. Hegde, G. D. Pantoş, P. S. Shirude and S. Balasubramanian, *Chem. Eur. J.*, **18** (2012) 55.
- [25] K. M. Rahman, A. P. Reszka, M. Gunaratnam, S. M. Haider, P. W. Howard, K. R. Fox, S. Neidle and D. E. Thurston, *Chem. Commun.*, **27** (2009) 4097.
- [26] M. C. Nielsen, A. F. Larsen, F. H. Abdikadir and T. Ulven, *Eur. J. Med. Chem.*, **72** (2014) 119.
- [27] X. Wang, C. X. Zhou, J. W. Yan, J. Q. Hou, S. B. Chen, T. M. Ou, L. Q. Gu, Z. S. Huang and J. H. Tan, *ACS Med. Chem. Lett.*, **4** (2013) 909.

[28] عرب چم جنگلی منصور، باقریان قدمعلی، اشرفی مطهره، امین امیرحسین، مجله علمی پژوهشی شیمی کاربردی سمنان، شماره ۳۲

(۱۳۹۳) ۲۳.