

Japon Bildircinlarında Deneysel Aflatoksikozis'te Esterifiye Glukomannan'ın Lipid Peroksidasyonu ve Bazı Antioksidan Sistem Parametreleri Üzerine Etkileri

Banu ATALAY *

* Batman Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Batman - TÜRKİYE

Özet

Bu araştırma Japon bildircinlarında (*Coturnix coturnix japonica*) deneysel olarak oluşturulan kronik aflatoksikozise karşı, adsorban olarak kullanılan esterifiye glukomannan (GM)'in lipid peroksidasyonu ve antioksidan sisteme ait bazı parametre düzeyleri üzerine etkisinin belirlenmesi amacıyla yapılmıştır. Araştırmada 10 günlük sağlıklı, 240 adet erkek Japon bildircini kullanıldı. Hayvanlar 6 eşit gruba ayrılarak, her bir grup normal bildircin yemi (kontrol (K) grubu), 2 mg/kg aflatoksin (aflatoksin (AF) grubu), 1 g/kg GM (1. glukomannan (GM1) grubu), 2 g/kg GM (2. glukomannan (GM2) grubu), 2 mg/kg aflatoksin+1 g/kg GM (1. glukomannan+aflatoksin (AF+GM1) grubu) veya 2 mg/kg aflatoksin + 2 g/kg GM (2. glukomannan+aflatoksin (AF+GM2) grubu) içeren yemlerden biri ile 42 gün boyunca beslendi. 21. ve 42. günlerde alınan kan örnekleri incelendiğinde tek başına aflatoksin uygulanan grupta (AF) antioksidan sisteme ait parametrelerden indirgenmiş glutatyon (GSH), glutatyon peroksidaz (GPx) ve süperoksit dismutaz (SOD) düzeylerinde düşüş kaydedilirken, MDA düzeyinde artış saptandı (P<0.05). Tek başına GM uygulanan her iki grupta da bahsedilen parametrelerde herhangi bir değişiklik meydana gelmedi. AF+GM1 grubunda belirlenen parametrelere ait değerlerin, AF grubundan farklı olmadığı gözlemlendi. AF+GM2 grubunda GSH, GPx ve MDA düzeyleri kontrol grubu değerlerine benzer, AF ve AF+GM1 gruplarına ait değerlerden ise istatistiki olarak farklı olduğu belirlendi (P<0.05). Sonuç olarak; Japon bildircinlarında 2 mg/kg dozunda aflatoksine karşı adsorban olarak kullanılan 1 g/kg GM uygulamasının oksidatif stres yönünden olumlu etki oluşturmadığı, buna karşın 2 g/kg GM uygulamasının söz konusu parametrelere olumlu etkiye sahip olduğu tespit edildi.

Anahtar Kelimeler: Aflatoksikozis, Glukomannan, Glutatyon peroksidaz, İndirgenmiş Glutatyon, Malondialdehit, Süperoksit dismutaz

The Effects of Dietary Esterified Glucomannan on Lipid Peroxidation and Some Antioxidant System Parameters During Experimental Aflatoxicosis in Japanese Quails

Abstract

The aim of study was to evaluate the protective effects of esterified glucomannan (GM) as an adsorbent on lipid peroxidation and some antioxidant parameters in Japanese quails (*Coturnix coturnix japonica*), which have experimentally chronic aflatoxicosis. In this study, 240 male Japanese quails, which are 10 day old and healthy were used. These animals were separated equally into six groups. These groups were fed with either of normal diet (K), the same diet containing 2 mg/kg aflatoxin (AF), 1 g/kg GM (GM1), 2 g/kg GM (GM2), 2 mg/kg aflatoxin + 1 g/kg GM (AF+GM1) and 2 mg/kg aflatoxin + 2 g/kg GM (AF+GM2) for 42 days. In the blood samples which were taken on the 21st and 42nd days, it was determined increase in malondialdehyde (MDA) levels and decrease in reduced glutathione (GSH), glutathione peroxidase (GPx) and superoxide dismutase (SOD) activities from antioxidant system parameters of alone AF treatment group (P<0.05). There was no differences in any parameters between groups which were applied alone GM. In the AF+GM2 group, GSH, GPx, MDA levels were similar to that of control group while they were significantly different than in AF and AF+GM1 groups (P<0.05). In the study, it wasn't determined any beneficial effects of 1 g/kg GM as adsorbent against observed negative effects of 2 mg/kg aflatoxin treatment on many parameters were as 2 g/kg GM treatment has counteract in respect of the same parameters.

Key Words: Aflatoxicosis, Glucomannan, Glutathione peroxidase, Malondialdehyde, Reduced Glutathione, Superoxide dismutase

Giriş

Aflatoksin (AF)'ler insan ve hayvanlarda yüksek toksisiteye sahip bilinen en tehlikeli mikotoksinlerdir. AFB₁ *Aspergillus flavus*'ün bir metaboliti olup kuvvetli hepatokarsinojenik ve hepatotoksik bir mikotoksindir (1). Dolaşıma geçen toksinler kısa sürede plazmadan ayrılıp, yoğun olarak karaciğer ve kaslarda birikme eğilimi gösterirler. Kanatlı yemlerindeki toksinin yaklaşık % 0.5'i yumurtaya geçebilmektedir (2). AF'nin biyolojik etkilerini, hayvanın türü, cinsiyeti, yaşı ve beslenme

durumu ile toksinin dozu ve maruz kalma süresi değiştirebilmektedir (3).

AFB₁ vücutta mikrozomal olarak oksidasyon, redüksiyon ve hidrosilasyon yollarıyla reaktif formuna metabolize olmaktadır. Bu safha AF'lerin hızlı metabolizmasını ve enzim düzeylerindeki artışını kapsamaktadır. Aynı zamanda bir yandan da reaktif ara ürünler daha az toksik bir metabolite detoksifiye edilerek vücuttan atılmaktadır. Bu yol ise glukuronidasyon, sülfasyon, asetilasyon mekanizmalarından biri veya glutatyonla reaksiyon şeklinde işlemekte olup, bu safha diğer safhadan

daha yavaştır (3). Karaciğerde mikrozomal oksidaz sistemi ile AFB₁, AFB₁-8,9-epoksite biyotransforme olur. Bu ara molekül de redükte glutatyon (GSH) ile konjugasyonla veya epoksi hidratazla inaktive edilmektedir. Bu reaksiyonla AFB₁-8,9-epoksit, Glutatyon S-transferaz (GST) tarafından merkaptürük asit- AFB₁ ya da AFB₁'e bağlı N-asetilsistein (NAC) olarak elimine edilen bir molekül şekline dönüşmektedir (4).

AFB₁ etkili hücrel hasarın mekanizması tam olarak açık olmamakla birlikte AF'lerin karaciğerde sitokrom p450 aracılığı ile uğradıkları metabolik değişiklikler sonucu oluşan epoksit türevleriyle (AFB₁-8,9-epoksit gibi) etkili oldukları, klinik olarak toksik ve karsinogenik etkilerinin çoğunlukla bu metabolitiyle ilgili olduğu bildirilmektedir. Şekillenen epoksit-türevleri özellikle karaciğerde DNA, enzimler ve sitoplazmadaki steroid hormon reseptörleri gibi bir çok büyük molekülle kovalent olarak bağlanmaktadır (5).

Son zamanlardaki biyoteknolojik ilerlemeler aflatoksinlerle mücadelede yeni bir yol açmıştır (6).

Materyal ve Metot

Araştırmada Selçuk Üniversitesi Ziraat Fakültesi'nden temin edilen 240 adet 1 günlük erkek Japon bildircini (*Coturnix coturnix japonica*) kullanıldı. Çalışma için Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Etik Kurul onayı alındıktan sonra, hayvanların 10 gün ortama adapte olmaları sağlandıktan sonra, canlı ağırlıkları birbirine yakın olacak şekilde 6 eşit gruba ayrıldı. Hayvanlar, Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Deney Hayvanları Ünitesi'ndeki bildircin kafeslerine yerleştirildi. Çalışmada 1.grup (Kontrol, K) 42 günlük deneme süresi boyunca NRC (9) tarafından bildircinler için öngörülen yem ile beslenirken, 2.grup (AF) 2mg/kg aflatoksin, 3.grup (GM1) 1g/kg glukomannan, 4.grup (GM2) 2g/kg glukomannan, 5.grup (AF+GM1) 2mg/kg aflatoksin+1g/kg glukomannan, 6.grup

Canlı maya (*Saccharomyces cerevisiae*, SCE)'nin hücre duvarından ekstrakte edilen glukomannan (GM), mikotoksinlerin adsorbsiyonunu önlemek amacıyla kullanılmaya başlanmıştır (7). GM'in her kg'ında 22,000 m²'lik geniş bir yüzey alanına sahip olduğu ve çok sayıda kimyasala tuzak olan farklı ölçülerde porlar içerdiği bildirilmektedir (8).

Bu çalışmada Japon bildircinlarında yeme AF katılarak oluşturulan kronik aflatoksikozis ve buna karşı koruyucu etkisinden dolayı esterifiye glukomannan uygulamasının antioksidan sisteme ait bazı parametreler üzerine etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

(AF+GM2) 2mg/kg aflatoksin+1g/kg glukomannan katılan kontrol rasyonuyla beslendi. Kan örnekleri, çalışmanın 21. ve 42. günlerinde her gruptan 20'şer hayvandan intrakardiyak punktur ile amacına uygun olarak (EDTA'lı ve heparinli tüplere) alındı. Bu örneklerden hazırlanan eritrosit paketinde malondialdehit (MDA) (spektrofotometrik yöntemle), tam kanda redükte glutatyon (GSH) (spektrofotometrik yöntemle), plazmada süperoksit dismutaz (SOD) (kolorimetrik yöntemle, Cayman Chemical SOD ölçüm kiti) ve glutatyon peroksidaz (GPx) (kolorimetrik yöntemle, Cayman Chemical GPx ölçüm kiti) düzeyleri belirlendi.

Çalışmada, aynı gruba ait örnekleme zamanları arasındaki farklılıkların belirlenmesinde Student t-testi, aynı örnekleme zamanlarında gruplar arası farklılıkların belirlenmesinde ise Varyans Analizi yapılarak Duncan'ın Multiple Range testi kullanıldı (10).

Bulgular

Çalışmadan elde edilen bulgular Tablo1'de sunulmuştur.

Tablo 1. Aflatoksin uygulamasından sonra belirlenen antioksidan sistem parametrelerine ait düzeyler (X±SEM, n=20)

Gruplar	MDA (nmol/ml eritrosit)		GSH (mg/dl)		GPx (nmol/dak/ml)		SOD (U/ml)	
	21.gün	42. gün	21. gün	42. gün	21. gün	42. gün	21. gün	42. gün
K	1,13± 0,05 ^b	1,11± 0,03 ^b	159,56± 8,28 ^a	176,31± 4,76 ^a	223,11± 7,11 ^a	226,82± 5,02 ^a	6,36± 0,16 ^a	6,45± 0,17 ^a
AF	1,70± 0,03 ^a	1,77± 0,04 ^a	100,06± 7,71 ^b	115,38± 7,03 ^b	177,38± 6,47 ^b	179,06± 8,48 ^b	5,46± 0,082 ^b	5,50± 0,10 ^b
GM1	1,18± 0,04 ^b	1,15± 0,04 ^b	142,81± 5,09 ^a	169,90± 5,82 ^a	212,05± 3,69 ^a	210,80± 3,44 ^a	6,31± 0,14 ^a	6,28± 0,099 ^a
GM2	1,24± 0,07 ^b	1,22± 0,04 ^b	145,12± 4,02 ^a	174,40± 3,72 ^a	214,49± 6,99 ^a	218,56± 5,79 ^a	6,36± 0,14 ^a	6,52± 0,19 ^a
AF+GM1	1,68± 0,04 ^a	1,67± 0,04 ^a	116,90± 6,52 ^b	125,93± 4,74 ^b	187,50± 3,79 ^b	188,75± 5,21 ^b	5,63± 0,084 ^b	5,86± 0,14 ^b
AF+GM2	1,22± 0,005 ^b	1,19± 0,03 ^b	142,51± 3,90 ^a	162,71± 3,24 ^a	208,79± 3,94 ^a	211,30± 4,13 ^a	5,82± 0,13 ^b	5,72± 0,14 ^b

K: Kontrol grubu, **AF:** 2 mg/kg aflatoksin grubu, **GM1:** 1 g/kg GM grubu, **GM2:** 2 g/kg GM grubu, **AF+GM1:** 2 mg/kg aflatoksin + 1g/kg GM grubu, **AF+GM2:** 2 mg/kg aflatoksin + 2g/kg GM grubu

ab: Aynı sütunda farklı harf taşıyan gruplar arası farklılık önemlidir (P<0.05)

NOT: Tüm parametreler için örnekleme zamanları arasında istatistiki olarak önemli farklılık belirlenmemiştir (P<0.05).

Tartışma ve Sonuç

Çalışmada aflatoksin uygulamasıyla AF ve AF+GM1 gruplarında 21. ve 42. günlerde GSH, GPx ve SOD değerlerinde düşüş, MDA konsantrasyonunda ise artış gözlenmiştir. AF grubunda MDA düzeyindeki artış aflatoksin uygulamasına bağlı olarak antioksidan savunma sisteminin yetersizliği ya da serbest radikal (OH⁻, H₂O₂ gibi) artışından kaynaklanan membran lipid peroksidasyonunun bir kanıtı sayılmakta olup (11-12) birçok araştırmacı (13-17) tarafından bildirildiği gibi beklenen bir sonuçtu. Nitekim aflatoksin verilen ratlarda (1, 18-19) ve farelerde (20-21) karaciğer ile doku homojenatlarında da lipid peroksidasyon ürünü olan MDA'nın arttığı çeşitli araştırmacılar tarafından bildirilmektedir. GSH miktarındaki azalma ise karaciğerde AFB₁'in epoksit türevlerinin (AFB₁-8,9-epoksit gibi) GSH ile konjugat oluşturup vücuttan

atılımını kolaylaştırması esnasındaki kullanımına bağlanmakta olup, (4) bu çalışmada aflatoksin uygulamasıyla GSH düzeyinde meydana gelen azalma Farombi ve ark (2005) (22) ile El-Gibaly ve ark.'nın (18) ratlardaki bulgularıyla benzerlik göstermektedir. GPx düzeyindeki azalma, redükte glutatyonla birlikte hidrojen peroksidin detoksifikasyonu için etkin kullanımına bağlanabilir (23). Nitekim çeşitli araştırmacılar (14, 20, 24, 19) bu çalışmadaki bulgulara benzer şekilde aflatoksikoziste GSH'ye paralel olarak GPx düzeyinde azalma olduğunu ifade etmektedirler. AF+GM1 grubundan elde edilen değerlerin AF grubundan farksız oluşu bu düzeyde GM'nin etkili olmadığını göstermektedir.

Çeşitli çalışmalarda (24, 5) aflatoksin uygulamasıyla SOD değerinde gözlenen düşüş toksikasyona bağlı serbest radikal oluşumundaki artış ile benzeri enzimlerde olduğu gibi bu enzimin de

kullanımındaki artış ve üretimindeki düşüş çerçevesinde değerlendirmek mümkündür. Çalışmada aflatoksinle GM uygulanan her iki grupta da SOD değerleri AF grubundan yüksek olmakla birlikte farklılığın önemli olmaması AF+GM2 grubundaki GM'nin diğer parametrelerde görülen olumlu etkisinin bu enzimin plazma seviyesine yansımadağı yönünde değerlendirilebilir.

Aflatoksinle birlikte bağlayıcı uygulanan gruplardan sadece AF+GM2 grubunda MDA ve GSH konsantrasyonu ile GPx aktivitesinin K grubundan farksız oluşu, bu dozda GM'nin aflatoksinin bağlayıcı özelliğinden dolayı koruyucu etkisinden kaynaklandığı söylenebilir. Sadece GM uygulanan gruplarda MDA düzeylerinde K grubuna göre değişiklik olmaması GM'nin yalnız kullanımında doku MDA düzeyini düşürdüğü yönündeki bildirimleri (25) destekler nitelikte değildir. Bizim çalışmamızdaki bulgulara benzer olarak Dvorska ve Surai (2001) (13) bildiricilerde GM uygulamasının mikotoksikozise bağlı MDA seviyesindeki artışı baskıladığını ifade etmektedirler. Yine Zaghini ve ark (26) tavuklarda AFB₁ toksisitesine karşı mannan-oligosakkarit kullanımının gastrointestinal kanaldan toksin emilimini ve dokularda AFB₁ düzeyini azalttığını bildirmektedirler.

Dvorska ve Surai (13) bildiricilerde T-2 toksinine karşı adsorban olarak GM kullanılmasının ne derece koruyucu olduğunu, oksidan ve antioksidan sistem parametre düzeylerini inceleyerek değerlendirdikleri çalışmalarında, yeme % 0.1 oranında GM katılmasının karaciğerde lipid peroksidasyonunu azalttığını ve antioksidan tüketimini engellediğini bildirmektedirler.

Zhang ve ark (25) tüm maya, maya ekstraktı ve maya hücre duvarı verilmesinin kanatlı etinde lipid peroksidasyonu üzerine etkilerini inceledikleri çalışmalarında her üç komponentin de MDA seviyesini kontrol grubuna göre önemli (P<0.05) oranda düşürdüğünü ve bu etkinin maya hücre duvarı açısından içermiş olduğu α -glukan, karboksimetilglukan, mannanlar ve bazı protein substansların nispeten iyi antioksidan özelliklere sahip olması ile açıklanabileceğini bildirmektedirler. Fakat bizim çalışmamızda sadece GM uygulanan gruplarda MDA, GSH, GPx ve SOD düzeylerinin kontrol grubu ile benzer oluşu bu etkiden glukomannanın sorumlu olmadığını akla getirmektedir.

Sonuç olarak; çalışmada elde edilen bulgular, 2 mg/kg düzeyinde aflatoksin uygulamasına karşı adsorban olarak kullanılan 1 g/kg GM uygulamasının oksidatif stres parametreleri üzerine olumlu etki göstermezken, 2 g/kg düzeyinde GM uygulaması söz

konusu parametreler üzerine olumlu etkiye neden olduğunu ve Japon bildiricilerini bu dozda aflatoksikoza karşı koruduğunu gösterdi. Ayrıca bildiricilerde belirlenen antioksidan sistem parametreleri ile ilgili literatüre katkı sağlayacağı kanaatine varıldı.

Referanslar

1. Souza MF, Tome AR, Rao VS. (1999). Inhibition by the bioflavonoid ternetin of aflatoxin B₁-induced lipid peroxidation in rat liver. *J. Pharm. Pharmacol.* 51: 2, 125-129.
2. Kaya S, Pirinççi İ, Traş B, Ünsal A, Bilgili A, Akar F. (2002). Mikotoksinler. In "Veteriner Hekimliğinde Toksikoloji", Medisan Yayın Serisi: 53, Medisan Yayınevi, Ankara, 2. Baskı, 537-637.
3. Ellis WO, Smith JP, Simpson BK. (1991). Aflatoxins in food: Occurance, biosynthesis, effects on organisms, detection, and methods of control. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 30; 3, 403-439.
4. Valdivia AG, Martinez A, Damian FJ et al. (2001). Efficacy of N-acetylcysteine to reduce the effects of aflatoxin B₁ intoxication in broiler chickens. *Poultry Science*, 80, 727-734.
5. Abdel-Wahhab MA, Aly SE. (2005). Antioxidant property of *Nigella sativa* (black cumin) and *Syzygium aromaticum* (clove) in rats during aflatoxicosis. *Journal of Applied Toxicology*, 25, 218-223.
6. Raju MV, Devegowda G. (2000). Influence of esterified-glucomannan on performance and organ morphology, serum biochemistry and haematology in broilers exposed to individual and combined mycotoxicosis (aflatoxin, ochratoxin and T-2 toxin). *Br. Poult. Sci.* 41; 5, 640-650.
7. Aravind KL, Patil VS, Devegowda G, Umakantha B, Ganpule P. (2003). Efficacy of esterified glucomannan to counteract mycotoxicosis in naturally contaminated feed on performance and serum biochemical and hematological parameters in broilers. *Poultry Science*, 82, 571-576.
8. Devegowda G, Harvey J, Catunda F, Khajarene J, Mhosatanun B. (2000). Mycotoxins: a universal problem meets in match. *Special Seminar of Alltech*, June, 20, 1-8.
9. National Research Council (NRC). (1994). *Nutrient Requirements of Poultry*. National Academy Press, Washington DC. 9th Revised Edition.

10. SPSS 10.0 software programme.
11. Madhusudhanan N, KavithaLakshmi SN, Radha Shanmugasundaram K, Shanmugasundaram E.R.B. (2004). Oxidative damage to lipids and proteins induced bu aflatoxin B₁ in fish (*Labeo rohita*)-protective role of Amrita Bindu. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 17, 73-77.
12. Çitil M, Güneş V, Atakisi O, Özcan A, Tuzcu M, Doğan A. (2005). Protective effect of L-carnitine against oxidative damage caused by experimental chronic aflatoxicosis in quail (*Coturnix coturnix*). *Acta Veterinaria Hungarica*, 53; 3, 319-324.
13. Dvorska JE, Surai PF (2001). Effects of T-2 toxin, zeolite and mycosorb on antioxidant system of growing quail. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 14; 12, 1752-1757.
14. Meki AMA, Esmail EEF, Hussein AA, Hassanein HM. (2004). Caspase-3 and heat shock protein-70 in rat liver treated with aflatoxin B₁: effect of melatonin. *Toxicol*, 43, 93-100.
15. Karaman M, Özen H, Tuzcu M, Çiğnemiş Y, Önder F, Özcan K. (2010). Pathological, biochemical and haematological investigations on the protective effect of alpha-lipoic acid in experimental aflatoxin toxicosis in chicks. *Br Poult Sci.* 51;1, 132-41.
16. Özen H, Karaman M, Çiğnemiş Y, Tuzcu M, Özcan K, Erdağ D. (2009). Effectiveness of melatonin on aflatoxicosis in chicks. *Res Vet Sci*, 86; 3, 485-9.
17. Turkez H, Geyikoğlu F. (2010). Boric acid: a potantial chemoprotective agent against aflatoxin b(1) toxicity in human blood. *Cytotechnology*, 62; 2, 157-65.
18. El-Gibaly I, Meki AMA, Abdel-Ghaffar SK. (2003). Novel B melatonin-loaded chitosan microcapsules: in vitro characterization and antiapoptosis efficacy for aflatoxin B₁-induced apoptosis in rat liver. *International Journal of Pharmaceutics*, 260; 1, 5-22.
19. El-Agamy DS. (2010). Comparative effects of curcumin and resveratrol on aflatoxin B(1)-induced liver injury in rats. *Arch Toxicol*, 84; 5, 389-96.
20. Choudhary A, Verma RJ (2005). Ameliorative effects of black tea extract on aflatoxin- induced lipid peroxidation in the liver of mice. *Food and Chemical Toxicology*, 43; 1, 99-104.
21. Verma RJ, Mathuria N. (2010). Curcumin ameliorates aflatoxin-induced lipid-peroxidation in liver and kidney of mice. *Acta Pol Pharm*, 65;2, 195-202.
22. Farombi EO, Nwankwo JO, Emerole GO. (2005). The effect of modulation of glutathione levels on markers for aflatoxin B₁-induced cell damage. *Afr. J. Med. Sci.* 34; 1, 37-43.
23. Cnubben NHP, Rietjens IMCM, Wortelboer H, van Zanden J, Van Bladeren PJ. (2001). The interplay of glutathione-related processes in antioxidant defense. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 10, 141-152.
24. Shi YH, Xu ZR, Feng JL, Wang CZ. (2006). Efficacy of modified montmorillonite nanocomposite tu reduce the toxicity of aflatoxin in broiler chicks. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 129, 138-148.
25. Zhang AW, Lee BD, Lee SK, Lee KW, An GH, Song KB, Lee CH (2005). Effects of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) cell components on growth performance, meat quality, and ileal mucosa development of broiler chicks. *Poultry Science*, 84, 1015-1021.
26. Zaghini A, Martelli G, Roncada P, Simioli M, Rizzi L. (2005). Mannanligosaccharide and aflatoxin B1 in feed for laying hens: effects on egg quaility, aflatoxins B1 and M1 residues in eggs, and aflatoxin B1 levels in liver. *Poult. Sci.*, 84; 6, 825-832 .