

بررسی اثر آب انار بر میزان آنزیم‌های ALP، ALT و AST در موش‌های صحرایی نر بالغ دیابتی و غیر دیابتی

سیدابراهیم حسینی^۱، داود مهربانی^۲، الهام رضایی^۱

۱- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، گروه زیست‌شناسی، فارس، ایران. ebrahim.hossini@yahoo.com

۲- بخش پاتولوژی، مرکز تحقیقات سلول‌های بنیادی و فن آوری ترانس ژنیک، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۲/۹/۲۹ تاریخ پذیرش: ۹۲/۱۱/۱۵

چکیده

زمینه و هدف: دیابت ناهنجاری متابولیکی است که با آسیب‌های بافتی فراوانی از جمله آسیب به کبد همراه می‌باشد. آب انار ماده مغذی است که در طب سنتی نیز از آن استفاده می‌گردد. مطالعه حاضر با هدف بررسی اثر آب انار بر فعالیت آنزیم‌های ALP، ALT و AST در موش‌های صحرایی نر بالغ دیابتی شده و غیر دیابتی انجام گرفت.

روش کار: در این پژوهش ۹۰ سر موش صحرایی نر بالغ با وزن ۲۲۰-۲۰۰ گرم در گروه‌های کنترل، شاهد، تجربی دیابتی و غیر دیابتی مورد مطالعه قرار گرفتند. هر گروه شامل ۹ سر موش بود. گروه‌های تجربی به ترتیب دوزهای ۱، ۲ و ۴ میلی‌لیتر آب انار را به ازای وزن هر موش و به مدت ۲۱ روز به صورت گاواژ دریافت کردند. برای ایجاد دیابت از تزریق درون صفاقی ۶۰ mg/kg استرپتوزوسین استفاده شد. در پایان روز بیست و یکم از قلب حیوانات خون گیری به عمل آمد و سپس میزان سرمی آنزیم‌های ALP، ALT و AST اندازه‌گیری گردید. داده‌ها به کمک آزمون ANOVA و تست پیگیری LSD مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها: یافته‌ها نشان داد که آب انار باعث کاهش معنی‌دار آنزیم‌های ALP، ALT و AST در گروه‌های دیابتی شده نسبت به گروه کنترل می‌شود و در گروه‌های سالم تاثیر معنی‌داری نداشت.

نتیجه‌گیری: آب انار با داشتن مواد فلاونوئیدی و آنتی‌اکسیدانی و همچنین از طریق کاهش قندخون باعث کاهش آنزیم‌های ALP، ALT و AST در موش‌های دیابتی شده می‌گردد.

واژه‌های کلیدی: آب انار، دیابت، آنزیم‌های ALP، ALT و AST، موش صحرایی.

مقدمه

کبد از بزرگ‌ترین غدد بدن و بعد از پوست بزرگ‌ترین عضو بدن نیز می‌باشد. در کبد انواع گوناگونی از مواد خارجی و ترکیبات حاصل از متابولیسم بدن مانند آمونیاک و هورمون‌های مختلف دستخوش تغییرات می‌شوند و محل ذخیره سازی مواد مختلفی نظیر تری گلیسیریدها، ویتامین‌ها و مواد قندی و محل اصلی گلوکونئوز است (۱۶). کبد طی روندهای بیوترانسفورماسیون با دخالت آنزیم‌های مختلف مواد را سم‌زدایی و غیر فعال می‌سازد. یکی از آزمایشاتی که می‌تواند نشان دهنده وضعیت کبد باشد اندازه‌گیری ترانس

آمینازها است که وظیفه انتقال گروه آمین را از آسپاراتات و یا آلانین به آلفا-کتوگلوکوتارات بر عهده دارند و به همین دلیل تغییرات کمی و کیفی در آنزیم‌های مختلف، منعکس کننده سلامتی و یا بیماری و بازتابی از شدت نکرروز در کبد می‌باشد (۲۰). حساس‌ترین و پرمصرف‌ترین آنزیم‌های کبدی آمینوترانسفرازها هستند که از جمله آن‌ها می‌توان به آسپاراتات آمینوترانس فراز AST یا SGOT و آلانین آمینوترانسفراز ALT یا SGPT اشاره نمود (۹). ALT از گروه آنزیم‌های آمینوترانسفرازها می‌باشد که انتقال واحدهای آمین، آلفا کتواسید را به آمینواسیدها کاتالیز می‌کند (۹).

ترکیب شدن اگزوالو استات و آلانین و تولید گلو تامات و پيروات که یک واکنش دوطرفه می‌باشد و توسط آنزیم ALT کاتالیز می‌گردد که در ارزیابی عملکرد سلول‌های کبدی اختصاصی تر و حساس تر از آنزیم AST می‌باشد (۱۶). بالاترین میزان ALT و AST به علت مرگ گسترده سلول‌های کبدی در شرایطی مانند هپاتیت و A، B، استفاده از داروهای مختلف، کبد چرب، مصرف الکل، چاقی و دیابت مشاهده می‌شود (۲۳، ۹). آسیب‌های کبدی منجر به افزایش نشت آنزیم‌های ALT و AST از داخل هپاتوسیت‌ها به داخل جریان خون می‌شود که در نتیجه آن میزان آنزیم‌های مذکور در خون افزایش می‌یابد (۷). اختلالات خواب نیز از طریق آسیب‌های کبدی مزمن باعث افزایش میزان ALT، ALP و AST می‌گردد (۱۲، ۶). بیماری دیابت نیز از طریق تخریب سلول‌های کبدی باعث افزایش آنزیم‌های ALT، ALP و AST می‌شود (۲۲). انار (*Punica granatum*) درختچه‌ای است که در بسیاری از نقاط دنیا از جمله ایران کاشته می‌شود. آب میوه انار حاوی ترکیبات فنولیک مختلفی نظیر گالیک اسید، کوماریک اسید، کوئرستین، کافئیک اسید است (۱۶). آب انار حاوی مقادیر بالایی از کلسیم، پتاسیم، سدیم، فسفر، منیزیم و ویتامین C می‌باشد (۸، ۳). در آب انار آنتوسیانین‌هایی نظیر مشتقات سیانیدین، پلارگونیدین دیده می‌شود (۱۵). آب انار دارای مقادیر بالایی از استروژن و فیتواستروژن‌هایی نظیر کونتوتین و کوئرستین می‌باشد (۱۹). آب انار حاوی پلی فنل‌های الازیتانین می‌باشد که برای جذب از روده به الازیک اسید تبدیل می‌گردند (۱۰). آب انار در پیش گیری از سرطان‌های مختلف، بیماری‌های قلبی عروقی، دیابت، عفونت‌های باکتریایی و پرکاری‌های تیروئیدی کاربرد دارد (۱۳). با توجه به افزایش روزافزون بیماران دیابتی در ایران و سراسر دنیا و عوارض ناشی از این بیماری از جمله ضایعات کبدی و هم‌چنین با عنایت به هزینه‌های

سنگین و عوارض ناشی از مصرف داروهای شیمیایی مورد استفاده در درمان اختلالات کبدی، این مطالعه با هدف بررسی اثرات آب انار بر میزان سرمی آنزیم‌های کبدی ALT، ALP و AST در موش‌های صحرایی نر بالغ دیابتی شده و غیردیابتی انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

این یک مطالعه تجربی است که در سال ۱۳۹۱ در دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات فارس انجام گردید. در این پژوهش از ۹۰ سر موش صحرایی نر بالغ از نژاد ویستار با وزن تقریبی ۲۲۰-۲۰۰ گرم استفاده شد که از خانه پرورش حیوانات دانشگاه علوم پزشکی شیراز تهیه گردیدند. میانگین سن حیوانات در زمان انجام آزمایشات حدود ۹۰ روز بود و حیوانات در شرایط دمایی 22 ± 2 درجه سانتی‌گراد و شرایط نوری ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی قرار گرفتند. حیوانات در طول دوره آزمایش به آب و مواد غذایی به مقدار کافی دسترسی داشتند. پروتکل انجام این پروژه تحقیقاتی در مورد کار با حیوانات آزمایشگاهی تنظیم و در کمیته اخلاق دانشگاه به تصویب رسید. در این مطالعه نمونه‌ها به ۱۰ گروه ۹-تایی شامل گروه‌های کنترل سالم و دیابتی، شاهد سالم و دیابتی و ۳ گروه تجربی دیابتی و ۳ گروه تجربی سالم تقسیم شدند. در این پژوهش برای دیابتی کردن موش‌ها از تزریق درون صفاقی ۶۰ mg/kg داروی استرپتوزوسین تهیه شده از شرکت up John آمریکا استفاده شد (۱۳). پس از گذشت ۷۲ ساعت، ضمن خون گیری از ناحیه دم موش-ها، با استفاده از نوار گلوکز یاب و دستگاه GLUCODR مدل SUPER SENSOR ساخت کره جنوبی، میزان قندخون نمونه‌ها اندازه‌گیری و جهت اطمینان بیشتر مبنی بر دیابتی بودن موش‌ها، یک هفته بعد از تزریق، خونگیری تکرار و موش‌هایی با قندخون 300 mg/dl در سرم خون به عنوان موش‌های دیابتی در نظر گرفته شدند. در این مطالعه گروه‌های کنترل تحت هیچ تیماری قرار

افزار SPSS-۱۸ تجزیه و تحلیل شدند. هم‌چنین مرز استنتاج آماری در سطح $P \leq 0/05$ در نظر گرفته شد.

نتایج

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که در موش‌های دیابتی شده با استرپتوزوسین، میزان آنزیم‌های ALP، ALT و AST در سرم خون نسبت به گروه‌های غیردیابتی افزایش می‌یابد و تجویز خوراکی آب انار با دوزهای ۱، ۲ و ۴ میلی‌لیتر به ازای هر موش باعث کاهش معنی‌دار میزان سرمی آنزیم ALP به ترتیب در سطح $P \leq 0/05$ ، $P \leq 0/05$ و $P \leq 0/0005$ می‌گردد (جدول ۱). هم‌چنین نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که آب انار با دوزهای ۱، ۲ و ۴ میلی‌لیتر به ازای هر موش باعث کاهش معنی‌دار میزان آنزیم‌های ALT و AST در سطح $P \leq 0/05$ می‌شود (جدول ۱).

نگرفتند و گروه‌های شاهد نیز تحت تجویز ۱ میلی‌لیتر آب مقطر به صورت گاوآژ قرار گرفتند. گروه‌های تجربی دریافت‌کننده آب انار نیز به ترتیب ۱، ۲ و ۴ میلی‌لیتر آب انار را به ازای هر موش و به صورت گاوآژ در هر روز و به مدت ۲۱ روز دریافت داشتند. کلیه تجویزها در ساعت ۹ تا ۱۰ صبح انجام و در آخرین روز انجام آزمایشات، بعد از بی‌هوش نمودن موش‌ها به کمک کتامین، با شکافتن قفسه سینه آن‌ها و با کمک سرنگ از درون قلب آن‌ها خونگیری به عمل آمد. پس از سانتریفیوژ نمودن نمونه‌های خونی با استفاده از روش‌های آزمایشگاهی معمول، میزان آنزیم‌های ALP، ALT و AST اندازه‌گیری گردید. در نهایت داده‌ها با استفاده از آزمون آماری ANOVA و تست پیگیری LSD توسط نرم‌

جدول ۱- مقایسه میانگین و انحراف از معیار میزان آنزیم‌های ALP، ALT و AST در گروه‌های دیابتی و سالم تیمار شده با آب انار

ALT		AST		ALP		گروه‌های پژوهش
غیردیابتی	دیابتی	غیردیابتی	دیابتی	غیردیابتی	دیابتی	
۵۶/۴±۲/۱	۱۱۶/۲±۲/۴	۱۳۶/۱±۶/۴	۱۶۸/۸±۱۳/۶	۳۵۷/۸±۷/۹	۴۷۰/۲±۷/۱	کنترل
۶۰/۱±۴/۱	۱۱۷/۳±۳/۴	۱۳۶/۹±۳/۸	۱۷۳/۱±۷/۵	۳۵۵/۹±۷/۲	۴۶۱/۱±۷/۹	شاهد
۵۴/۸±۵/۳	۱۰۹/۴±۳/۶	۱۴۱/۶±۹/۱	۱۴۶/۶±۸/۱	۳۳۰/۲±۸/۹	۴۲۸/۶±۱۴/۱*	تجربی ۱ (۱mm آب انار)
۵۸/۶±۴/۰	۱۰۶/۷±۳/۶	۱۳۹/۲±۸/۹	۱۴۵/۸±۲/۵	۳۵۶/۵±۲۲/۲	۴۲۳/۷±۵/۶*	تجربی ۲ (۲mm آب انار)
۶۱/۴±۴/۰	۱۰۵/۱±۲/۸*	۱۳۶/۴±۱۱/۸	۱۳۹/۱±۵/۸*	۳۳۸/۹±۱۳/۲	۳۸۸/۶±۱۸/۶**	تجربی ۳ (۴mm آب انار)

* و ** به ترتیب نشان دهنده تفاوت معنادار در سطح $P \leq 0/05$ و $P \leq 0/0005$ بین گروه مورد نظر با گروه کنترل است.

که عوارض ناشی از دیابت در کبد به علت اثر تخریبی استرپتوزوسین و غیره باعث افزایش میزان سرمی آنزیم‌های فوق شده باشد (۲۲). دیابت ناشی از مصرف استرپتوزوسین باعث تغییرات عملکردی و ساختاری در سلول‌های کبدی می‌گردد (۱۸) و احتمالاً افزایش سرمی آنزیم‌های ALP، ALT و AST ناشی از تغییرات عملکردی و ساختاری کبد در گروه‌های دیابتی شده می‌باشد. دیابت باعث بروز اختلالات خاص در برخی از

بحث و نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از این تحقیق بیان‌گر آن است که دیابت ناشی از تزریق استرپتوزوسین باعث افزایش آنزیم‌های کبدی ALP، ALT و AST و مصرف خوراکی آب انار باعث کاهش معنی‌دار میزان سرمی این آنزیم‌ها در موش‌های دیابتی شده می‌گردد. روشن شده است که آنزیم‌های ALP، ALT و AST زمانی به گردش خون می‌ریزند و میزان آن‌ها افزایش می‌یابد که غشاء سلول‌های کبدی دچار آسیب شده باشند (۱۶). به نظر می‌رسد

بافت‌های بدن از قبیل نفروپاتی، نوروپاتی و رتینوپاتی و آسیب‌های کبدی می‌گردد (۲). در بیماری دیابت به دلیل نکرور شدن بافت کبدی و احتمالاً به دلیل نشت آنزیم‌های ALP، ALT و AST از سیتوزول سلول‌های کبدی به داخل جریان خون میزان آن‌ها در سرم افزایش می‌یابد (۲۰) و علاوه بر آن به دلیل افزایش کاتابولیسم پروتئین‌های مختلف و تشکیل اوره که در بیماری دیابت دیده می‌شود این ترانس آمینازها در خون افزایش می‌یابد (۱). روشن شده است که افزایش فعالیت آنزیم‌های آمینوترانسفرازها نشانه‌ای از بیماری‌های کبدی است و غالباً در میان افراد دیابتی نسبت به جمعیت سالم بیشتر مشاهده می‌گردد (۲۱). در بیماری دیابت به علت اختلال در مصرف گلوکز و کاهش توان ساخت پروتئین‌های جدید و همچنین مصرف بیشتر پروتئین‌های بدن فرد به اختلال در عملکرد و ساختار سلول‌های مختلف بدن و به ویژه در کبد دچار می‌گردد (۴). بنابر این احتمالاً در موش‌های دیابتی شده با استرپتوزوسین افزایش فعالیت آنزیم‌های ALP، ALT و AST به دلیل تخریب ساختار و عملکرد سلول‌های کبدی می‌باشد. نتایج حاصل از برخی مطالعات هم سو با نتایج حاصل از مطالعه ما نشان داده‌اند که القاء دیابت با استرپتوزوسین در موش‌های صحرایی باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های ALP، ALT و AST می‌گردد (۲۰). یافته‌های تحقیقات دانشمندان نشان داده است که در شرایط هیپرگلیسمی ناشی از دیابت و از طریق افزایش میزان گلاایک شدن آنزیم‌های آنتی اکسیدان، سوپراکسید دیسموتاز، گلوتاتیون، پراکسیداز و کاتالاز، فعالیت آن‌ها در جهت پاک‌سازی ROS کاهش می‌یابد و افزایش ROS مهم‌ترین عامل ایجاد اختلالات ثانویه دیابت از جمله تخریب ساختار سلول‌های کبدی و افزایش فعالیت آنزیم‌های ALP، ALT و AST به حساب می‌آید (۵)، لذا با توجه به آن که در مطالعه دیگر ما نشان داد ه شد که آب انار باعث افزایش انسولین و کاهش

گلوکز خون در موش‌های دیابتی شده می‌شود (۱۷). بنابر این احتمالاً آب انار از طریق کاهش گلوکز و انسولین خون باعث کاهش آنزیم‌های کبدی شده است. آب انار باعث کاهش قندخون و عوارض ناشی از آسیب‌های بافتی در موش‌های صحرایی دیابتی می‌گردد (۱۱). بنابر این در این مطالعه احتمالاً آب انار از طریق کاهش قندخون و کاهش میزان گلاایک شدن آنزیم‌های آنتی اکسیدانی و افزایش پاک‌سازی ROS باعث کاهش فعالیت آنزیم‌های ALP، ALT و AST شده به علاوه بر اساس نتایج حاصل از پژوهش‌های مختلف روشن شده است، استفاده از ترکیبات آنتی اکسیدان گیاهی بر بازسازی و ترمیم سلول‌های بتای پانکراس تاثیرات مثبت فراوانی دارند (۱۱)، بنابر این به نظر می‌رسد که تقویت سیستم آنتی اکسیدانی بیماران دیابتی می‌تواند به عنوان یک عامل مهم و موثر در کاهش ابتلا به دیابت و هم‌چنین پیشگیری از بروز عوارض ناشی از آن باشد (۶) و از آنجا که آب انار حاوی ترکیبات پلی فنلی و فلاونوئیدی فراوانی است که دارای خاصیت آنتی اکسیدانی قوی می‌باشند و از استرس‌های اکسیداتیو در بدن جلوگیری می‌کند (۱۴). لذا احتمالاً آب انار با داشتن خاصیت ضد اکسیدانی و با کاهش میزان ROS در موش‌های دیابتی شده باعث کاهش آنزیم‌های ALP، ALT و AST شده است. آب انار به دلیل داشتن ترکیبات آنتی اکسیدان‌هایی نظیر فلاونوئیدها و پلی فنول‌هایی مانند کوئرستین، اسید کلروژنیک و الازیک اسید باعث کاهش فعالیت آنزیم‌های کبدی ALP، ALT و AST در موش‌های صحرایی می‌شود. از این رو با انجام تحقیقات بیشتر از آب انار می‌توان در جهت کاهش آسیب‌های کبدی در بیماری‌های مختلف استفاده نمود.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله نویسنده مقاله از معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات فارس و مدیریت

بیمارستان مادر و کودک شیراز که در این پژوهش همکاری داشتند کمال تشکر و قدردانی را دارند.

منابع

1. Afaq, F., Saleem, M., Krueger, CG., Reed, JD., Mukhtar, H. (2005). Anthocyanin and hydrolysable tannin-rich pomegranate fruit extract modulates MAPK and NF-KappaB pathways and inhibits skin tumorigenesis in CD-1 mice. *Int J Cancer*, 113; 423-433.
2. Arkkila, P. E., Koskinen, P. J., Kantola, I. M., Ronnema, T., Seppanen, E., Viikari, J. S. (2001). Diabetic complications are associated with liver enzyme activities in people with type-1 diabetes. *Diabetes Res. Clin. Pract.*, 52(2); 113-8.
3. Basu, A., Penugonda, K. (2009). Pomegranate juice: a heart-healthy fruit juice. *Nutr Rev*, 67(1); 49-56.
4. Banard, N., Cohen, J., Jenkins, Da. (2009). Low fat vegan diet and a conventional diabetes diet in the treatment of type 2 diabetes: a randomized controlled 74-wk clinical trial. *Am J Clin Nutr*, 89; 1588-96.
5. Brownlee, M. (2005). The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes*, 54(6); 1615-25.
6. Ceriella, A., Colagiuri, S., Gerich, J., Tuomilehto, J. (2008). Guideline for management of postmeal glucose. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Disease*, 18(4); 17-33.
7. Chin, JH., Abas, HH., Sabariah, I. (2008). Toxicity study of *Orthosiphon stamineus* Benth (Misai Kucing) on Sprague dawley rats. *Trop Biomed*, 25(1); 9-16.
8. Dumlu, MU., Gurkan, E. (2007). Elemental and nutritional analysis of *Punica granatum* from Turkey. *J Med Food*, 10(2); 392-5.
9. Giannini, E., Testa, R., Savarino, V. (2005). Liver enzyme alteration: A guide for clinicians. *CMAJ*, 172; 367-79.
10. Heber, D. (2008). Multitargeted therapy of cancer by ellagitannins. *Cancer Lett*, 269(2); 262-8.
11. Jelodar, G., Mohsen, M., Shahram, S. (2007). Effect of walnut leaf, coriander and pomegranate on blood glucose and histopathology of pancreas of alloxan induced diabetic rats. *Afr J Tradit Complement Altern Med*, 4(3); 299-305.
12. Kallwitz, ER., Herdegen, J., Madura, J., Jakate, S., Cotler, SJ. (2007). Liver enzymes and histology in obese patients with obstructive sleep apnea. *J Clin Gastroenterol*, 41(10); 918-21.
13. Lenzen, S. (2008). The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia*, 51(2); 216-26.
14. Mahalaxmi, M., Harshal Sanjay, K., Balaraman, R. (2010). *Punica granatum* attenuates angiotensin-II induced hypertension in Wistar rats. *Int. J. PharmTech, Res*, 2(1).
15. Miguel, G., Fontes, C., Antunes, D., Neves, A., Martins, D. (2004). Anthocyanin concentration of assaria pomegranate fruits during different cold storage conditions. *J Biomed Biotechnol*, 2004(5); 338-342.
16. Pratt, D.S., Kaplan, M.M. (2000). Evaluation of abnormal liver-enzyme results in asymptomatic patients. *N Engl J Med*, 342(17); 1266-71.
17. Poyrazoglu, E., Gokmen, V., Artik, N. (2002). Organic acids and phenolic compound in Pomegranate (*Punica granatum* L.) grown in Turkey. *J of Food Composition and Analysis*, 15; 567-575.
18. Rezaei, E., Hosseini, SE., Mehrabani, D. (2013). Effect of pomegranate juice on insulin and glucose in diabetic and non-diabetic male rats. *Journal of Birjand University of Medical Sciences*, 20(3); 244-251.
19. Salimuddin; Upadhyaya, K. C.; Baquer, N. Z. (2008). Effects of vanadate on expression of liver araginase in experimental diabetic rats. *IUBMB Life* 48(2); 237-40.
20. van Elswijk, DA., Schobel, UP., Lansky, EP., Irth, H., van der Greef, J. (2004). Rapid dereplication of estrogenic compounds in pomegranate (*Punica granatum*) using on-line biochemical detection coupled to mass spectrometry. *Phytochemistry*, 65(2); 233-41.
21. Vozarova, B., Stefan, N., Lindsay, R.S., Saremi, A., Pratley, R.E., Bogardus C. (2002). High alanine aminotransferase is associated with decreased hepatic insulin sensitivity and predicts the

development of type 2 diabetes. *Diabetes*, 51(6); 1889-95.

22. Woods, S., Lutz, T., Nori, G., Langhans, W. (2006). Pancreatic signals controlling food intake; insulin, glucagon and amylin *Phil. Trans.R. Soc*, 361; 1219-1235.

23. Zafar, M.; Naeem-UL-Hassannaqvi, S.; Ahmad, M., Kaimkhani, Z. A. (2009). Altered liver morphology and enzymes in streptozotocin induced diabetic rats. *Int. J. Morphol*, 27(3); 719-725.

