

KLAMİDİOZİSLİ İNSANLARDA SERBEST RADİKAL HASARI İLE GEÇİŞ METALLERİNDEN FE VE CU ARASINDAKİ İLİŞKİLER

Fulya BENZER Ayşe KILIÇ

Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü, Elazığ – TÜRKİYE

Geliş Tarihi: 10.08.2004 Kabul Tarihi: 02.09.2005

ÖZET

Zorunlu hücre içi patojenleri olan klamidialar patojenik mekanizmaları tam olarak bilinmeyen pek çok hastalığa sebep olurlar. Bir veya daha fazla ortaklanmamış elektron içeren atom veya moleküller olan serbest radikaller aktive olmuş fagositlerin bakterisidal rollerinin sonucunda üretilirler. Hücre bütünlüğünü tehdit eden en önemli sorunlardan birisi lipid peroksidasyondur ve eser elementlerin lipid peroksidasyon üzerine önemli etkileri vardır. Hidrojen peroksitin demir ve bakır gibi geçiş elementlerinin varlığında indirgenmesi (Fenton reaksiyonu) veya süperoksit radikali ile reaksiyona girmesi sonucunda (Haber-Weiss reaksiyonu) hidroksil radikali oluşur. Hidroksil radikali lipid peroksidasyonu tetikleyici faktördür.

Bu çalışmada, klamidia enfeksiyonu sırasında eser element düzeylerini ve bu eser element düzeylerindeki değişimlerin lipid peroksidasyon ile ilişkisini incelemeyi amaçladık. Çalışmada, komplement fizyasyon testi ile klamidia etkenleri saptanan 15 hasta deneme grubunu oluştururken, 15 sağlıklı birey de kontrol grubu olarak kullanılmış ve alınan kan örneklerinden serumlarda lipid peroksidasyon göstergesi olarak malondialdehid, geçiş periyodu metallere demir ve bakır düzeyleri ölçülmüştür.

Kontrollerle karşılaştırıldığı zaman enfekte insanların kan serumlarında lipid peroksit ($p<0.001$) ve bakır ($p<0.05$) düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlenirken, demir ($p>0.05$) düzeylerinde ise herhangi bir değişiklik saptanamamıştır.

Sonuç olarak klamidial enfeksiyon sırasında reaktif oksijen türlerinin artışına bağlı olarak lipid peroksidasyon düzeyinde artış meydana gelmiştir. Lipid peroksidasyondaki artışa serum bakır düzeyindeki artış eşlik etmiştir. Serum demir konsantrasyonunda ise bir değişiklik gözlenmemiştir. Radikal toksikasyonunu engelleyen süperoksit dismutaz enziminin oksidan olaylar sırasında artması, enzim yıkımındaki artışı da beraberinde getirmektedir. Serumdaki lipid peroksidasyon artışına bakırın eşlik etmesi bakır kaynaklı bu enzimin (Cu-SOD) yıkım ürünü olarak açıklanabilir.

Anahtar Kelimeler: Klamidiozis, Lipid peroksidasyon, Geçiş metalleri, İnsan, Serum.

ABSTRACT

The Association Between Free Radical Damage and Transition Metals Cu and Fe in Humans with Chlamydia

Chlamydiae are obligatory intracellular pathogens that cause many diseases of which the pathogenic mechanism are largely unknown. A free radical is defined as an atom or a molecule that has one or more unpaired electrons in one of its molecular orbital and they are produced by activated phagocytes as their bactericidal function. Lipid peroxidation is a significant threatening factor for cellular integrity and trace elements have significant effects on lipid peroxidation. Hydrogen peroxide is reduced by transition elements such as copper and iron (Fenton reaction) or by reacting with superoxide radicals (Haber-Weiss reaction) and thus hydroxyl radicals are produced. Hydroxyl radicals trigger lipid peroxidation.

This study was carried out to determine lipid peroxidation, the level of copper and iron and its association with lipid peroxidation in humans with chlamydia.

In this study, sera samples of 15 healthy subjects and 15 subjects found to be positive to chlamydia by CFT were used. Malondialdehyde was measured as indicator of lipid peroxidation, and levels of iron and copper were measured as transition metals.

When they were compared with the controls, it was observed that levels of lipid peroxidation ($p<0.001$) and copper ($p<0.05$) in sera of infected humans increased but level of iron ($p>0.05$) remained unchanged.

As a result, levels of lipid peroxidation increased depending on increases reactive oxygen species during chlamydial infections. At the same time, levels of copper increased. There was no significant change at serum iron concentration. Superoxide dismutase (Cu-SOD) prevents toxication of free radicals and an increase in the level of this enzyme accompanies the destruction of the enzyme. Concomitant increase of Cu with increased lipid peroxidation can be explained as destruction of this enzyme.

Key Words: Chlamydia, Lipid peroxidation, Transition metals, Human, Serum.

GİRİŞ

Klamidialar konakçı olarak kanatlılar, memeli hayvanlar (kedi, fare, koyun) ile insanlarda hayatlarını sürdürebilir ve insanlarda trahom (1), kısırılık (2), ektopik gebelik (3), pnemoni (4), atherosklerozis (5) gibi pek çok hastalığa yol açabilirler. Zorunlu hücre içi paraziti olduklarından sadece hücre içinde ürerler. Antijenik olarak kompleks bir yapıda olan klamidialar cins, tür ve alt tür (serotip) spesifik antijenlere sahiptirler. Klamidia cinsindeki tüm etkenlerde bulunan lipopolisakarit yapıda, ısıya dayanıklı (100 °C'de 30 dakika) ortak bir antijen grup antijeni olarak tanımlanmıştır. Hücre duvarında lokalize olan ve klamidiaların tüm gelişme evrelerinde bulunan antijen, komplemanı fizike edebilir (6).

Klamidiozis teşhisi, etken izolasyonuna dayalı direkt yöntemlerle ya da enfekte insanların kan serumlarına uygulanan serolojik testlerle indirekt olarak yapılabilmektedir. Etkenin üretilmesi için hücre kültürü ve embriyolu yumurta gibi canlı ortamlara gereksinim duyulduğundan oldukça zor ve zaman alıcıdır. Bu nedenle hastalığın tanısında çoğunlukla serolojik testler kullanılmaktadır. Bu testler arasında en yaygın olarak kullanılanlar komplemant fizyasyon testi (CFT) ile enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) ve immunofloresans antikor testi (IFAT) (7)'dir. Klamidiozisin serolojik tanısında CFT referans test olarak kabul edilmiştir ve ELISA ile karşılaştırıldığı zaman sensitivitesinin paralellik gösterdiği bildirilmiştir (8, 9).

Serbest radikaller, ortaklanmamış elektron taşıyan kimyasal olarak reaktif bileşiklerdir. Biyolojik sistemlerde en önemli serbest radikaller oksijenden oluşan radikallerdir ve serbest radikallerin birçok kaynağı vardır. Bu kaynaklardan birisini oluşturan aktive edilmiş fagositler görevleri sırasında süperoksit radikalini üretirler.

Metal iyonlarının serbest radikal reaksiyonlarındaki asıl önemleri lipid peroksidasyonundaki etkileridir. Geçiş metalleri lipid peroksidasyonu başlatmaktan ziyade sentezlenmiş olan lipid hidroperoksitlerinin parçalanmalarını ve lipid peroksidasyonunun zincir reaksiyonlarını katalize ederek serbest radikallerin zararlarını artırır (10).

Serbest radikallerin doymamış yağ asitleri ile girdiği kompleks kimyasal reaksiyonlarla toksik aldehytlerin açığa çıkması olayına lipid peroksidasyon adı verilir. Serbest radikaller, savunma sistemlerinin kapasitesini aştıklarında organizmada çeşitli bozukluklara yol açabilirler (10).

Demir (Fe), Fenton reaksiyonu üzerinden güçlü serbest radikallerden biri olan hidroksil radikallerinin oluşmasını sağlarken, stabil lipid hidroperoksitlerinin peroksi ve alkoksi radikallerine dönüşümünü hızlandırır. Çoklu doymamış yağ asitleri membran lipidlerinde bulunur ve peroksidasyona duyarlıdır (11).

Bakırın (Cu) insan vücudunda önemli fonksiyonları vardır. Hücreleri lipid peroksidasyondan koruyan enzimlerden SOD'un yapısında bulunur, mitokondrial sitokrom oksidazların önemli elementidir. Serbest Cu organizmada hücre membranları üzerine prooksidan ajan olarak rol oynamaktadır (11).

Bu çalışmada, klamidia enfeksiyonu sırasında eser element düzeyleri ve bu eser element düzeylerindeki değişimlerin lipid peroksidasyon ile ilişkisinin incelenmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmada, CFT ile klamidia etkenleri saptanan 15 hasta deneme grubunu oluştururken, 15 sağlıklı birey de kontrol grubu olarak kullanılmış ve alınan kan örneklerinden serumlarda lipid peroksidasyon göstergesi olarak malondialdehid (MDA), geçiş periyodu metallerinden Fe ve Cu düzeyleri ölçülmüştür. CFT antijeni Pendik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü'nden temin edilmiştir. µCFT, Virion Serion Enstitüsü'nün bildirdiği yöntemle (12) göre yapılmıştır.

Serumda lipid peroksit ölçümü Satoh (13) ve Yagi (14)'den modifiye edilen yöntemle göre spektrofotometrik olarak yapılmıştır. Bu yöntem üç veya daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonunda son ürün olarak oluşan MDA'nın tiobarbitürik asit ile reaksiyona girerek oluşturduğu kompleksin pembe renginin 532 nm'de okunması esasına dayanır. MDA, yağ asidi oksidasyonunun spesifik ya da kantitatif bir indikatörü olmamasına karşın, lipid peroksidasyonunun derecesiyle iyi bir korelasyon gösterir.

Mineral madde ölçümlerinde standart stok solüsyonlardan her bir element için standart çözeltiler hazırlanmış, kör olarak distile su kullanılmıştır. Alette her elemente ait dalga boyunda ışık veren Hollow Cathod lambaları (HCL) ile yine her elemente uygun hava-asetilen gaz karışımı, slit aralığı HCL ve Back Ground Correction (BGC) modları seçilmiştir. Bu şartlarda kör ve standart çözeltiler alete (Shimadzu AA-660, Flame fotometre)

verilerek kalibrasyon eğrileri çizdirilmiş ve alınan örneklerin ölçümü yapılmıştır.

Bulgular SPSS istatistik programı ile Student-t testi (15) kullanılarak değerlendirilmiştir.

BULGULAR

Çalışmada klamidiozis açısından 15'i pozitif, 15'i negatif (kontrol) olmak üzere 30 adet insan serumu kullanılmış ve bunlarda lipid peroksidasyon düzeyleri ile Fe ve Cu konsantrasyonları ölçülmüştür. Yapılan ölçümler sonucunda serum MDA, Fe ve Cu değerleri sırasıyla kontrollerde 3.44 ± 0.30 nmol/ml, 159 ± 0.08 µg/dl, 84 ± 9 µg/dl olarak, klamidiozli hastalarda ise 7.87 ± 1.14 nmol/ml, 146 ± 0.13 µg/dl ve 159 ± 0.15 µg/dl olarak bulunmuştur (Tablo 1).

İstatistiksel analizler sonucunda kontrollerle karşılaştırıldığı zaman hasta grupta MDA ($p < 0.001$) ve Cu ($p < 0.05$) düzeylerinde artış gözlenirken, Fe düzeyinde herhangi bir değişikliğe rastlanılmamıştır ($p > 0.05$).

Tablo 1: Sağlıklı ve klamidiozli insan serumlarında MDA düzeyleri ile Fe ve Cu konsantrasyonları arasındaki ilişki

	Kontrol (n= 15)	Klamidia (n= 15)	P
MDA (nmol/ml)	3.44 ± 0.30	7.87 ± 1.14	<0.001
Demir (µg/dl)	159 ± 0.08	146 ± 0.13	>0.05
Bakır (µg/dl)	84 ± 9	159 ± 15	<0.05

TARTIŞMA

Hücrelerdeki oksidatif hasarların oluşumunda ilk sırada yer alan serbest radikaller normal hücrel komponentleri bağlarlar, membran lipidlerinin doymamış bağları ile reaksiyona girerler, proteinlerini denatüre ederler ve nükleik asitlerine saldırırlar (16). Reaktif oksijen türlerinin ilk hedefleri hücre zarlarındaki doymamış yağ asitleridir ve zarlarda lipid peroksidasyon sonucu hücre yapı ve fonksiyonunda önemli hasarlara neden olurlar (17).

Serbest radikallerin atherosklerozis, diabetes mellitus, felç, yangısel hastalıklar ve kanser dahil pek çok hastalığın patogeneziinde rol aldıkları da bilinmektedir (18-22).

Bu çalışmada da bakteriyel etkenlerden klamidia spp. türleri tarafından insanlarda oluşturulan klamidiozis enfeksiyonu sırasındaki serbest radikal hasarı ile hasarın serum Cu ve Fe düzeyleri üzerindeki etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır. Çalışma sonucunda lipid peroksidasyon düzeyinde ve

mineral maddelerden Cu konsantrasyonunda anlamlı bir yükseliş gözlenirken, Fe konsantrasyonunda anlamlı bir değişim saptanamamıştır.

Azenabor ve ark. (23)'ünca Chlamydia trachomatis ile enfekte hücrelerde lipid peroksid düzeyinde önemli derecede artış gözlenmiş ve bu artışın klamidial replikasyon sırasında üretilen reaktif oksijen türlerinden kaynaklanabileceği kanısına varılmıştır.

Chlamydia trachomatis ile enfekte infertil erkeklerde seminal parametreler ile sperm membranındaki lipid peroksidasyonunun incelenmesi sonucunda, enfekte infertil erkeklerdeki seminal parametrelerinin enfekte olmayan infertil erkeklere göre önemli değişimler gösterdiği ve spermlerin zar lipidlerindeki peroksidasyonunun oldukça yükseldiği bulunmuştur (24).

Nystrom-Rosander ve ark. (25)'leri Chlamydia pneumoniae ile iz elementler arasındaki etkileşim ve bunların aortik kapak büzüşmesindeki rolünü incelemişler, hastaların kalp kapaklarında mineral maddelerin 10-70 kat artması yanı sıra bakır/çinko oranının da yükseldiğini gözlemişler, özellikle enfeksiyonun gelişimi sırasında ortaya çıkan kapaklardaki demir oranında 20 kata varan artışların aortik sklerozis ile enfeksiyon arasındaki ilişkilerden kaynaklanabileceğini öne sürmüşlerdir. Çalışmamızda enfeksiyona bağlı olarak bulduğumuz lipid peroksidasyon artışı ve Cu konsantrasyonundaki artış yukarıdaki çalışmalarla uyum göstermektedir.

Galley ve ark. (26)'leri tarafından septik şoklu hastaların serumunda lipid peroksidasyonunun ve bleomisin yoluyla Fe konsantrasyonunun ölçümü yapılmış, sonuçta hastalarda bleomisinle ölçülebilen demir konsantrasyonunda artış gözlenmiş ancak, lipid peroksidasyon seviyesindeki artış sadece şoktan ölen hastalarda gözlenmiştir. Yaşamının devam ettiren hastalarda serbest Fe ile lipid peroksidasyon arasında bir ilişki bulunamamıştır. Çalışmamız lipid peroksidasyon ile Fe konsantrasyonu arasında bir ilişki olmaması bakımından bu çalışmayla uyum göstermektedir.

İlhan ve ark. (27)'leri tarafından preeklampsinin patogeneziinde antioksidant enzim ve iz elementlerin rolleri araştırılması sonucunda preeklampsili gebelerde MDA ve Cu seviyelerinde artış ve Zn ile SOD seviyesinde ise düşme gözlenmiştir. SOD enzimidaki düşüşten lipid peroksidasyondaki artış sorumlu bulunmuştur.

Sokol ve ark. (28)'leri tarafından Wilson hastalıklı insanlarda ve bakır toksikozisli terrier cinsi köpeklerde bakırın karaciğerdeki hasar mekanizması

ile ilgili yapılan çalışmada, köpeklerde ve insanlarda lipid peroksidasyon ve Cu içeriği belirgin derecede artmıştır. Mitokondrial Cu konsantrasyonları ile mitokondrial lipid peroksidasyon şiddeti arasında ilişki bulunmuştur. Sonuçta karaciğer mitokondriasının karaciğer Cu toksisitesinde önemli bir hedef olduğu ve oksidant hasarın Cu uyarımlı hasarın patogenezisinde rol alabileceği kanısına varılmıştır.

Eser element düzeyindeki değişikliklerin antioksidan savunma mekanizmasının etkinliğini azaltarak serbest oksijen radikallerinin hücre bütünlüğü üzerine olumsuz etkilerini artırdığı bilinmektedir. Eser elementlerin ve bunlardan özellikle Cu ve Fe'in lipid peroksidasyon üzerine olumsuz etkileri vardır. Cu'nun insan eritrositlerinde lipid peroksidasyonu hızlandırdığı (29, 30), dahası Cu'nun aşırı miktarda hidroksil radikalleri ürettiği (31) bildirilmiştir. Bunların dışında Cu'nun insan

vücudunda önemli fonksiyonları da vardır. Hücreleri lipid peroksidasyondan koruyan SOD enziminin yapısında bulunur.

Çalışmanın sonucunda lipid peroksidasyondaki artış bakteriyel enfeksiyon sırasında fagositlerin bakteriyi yok etmek için ürettiği reaktif oksijen türlerinin aşırı miktarda artışı ve bu artışın antioksidan kapasitenin üstüne çıkması şeklinde yorumlanabilir. Cu ve Fe her ikisi de lipid peroksidasyonu artırıcı özelliğe sahiptir. Yapılan çalışma sonucunda, Fe'in lipid peroksidasyondaki artışa paralellik göstermemesine karşılık Cu'nun artışı oksidan olaylar sırasında Cu-SOD enziminin yıkımı sonucu açığa çıkan Cu şeklinde yorumlanabilir. Lipid peroksidasyondaki artışa eşlik eden Cu enfeksiyonun şiddeti hakkında fikir verebilir ve serum Cu konsantrasyonundaki artış bir yangının habercisi olarak değerlendirilebilir.

KAYNAKLAR

- Holland MJ, Bailey RL, Hayes LJ, Whittle HC, Mabey DCW. Conjunctival scarring in trachoma is associated with depressed cell-mediated immune responses to chlamydial antigens. *J Infect Dis* 1993; 168: 1528-31.
- Marais NF, Wessels PH, Smith MS, Gericke A. The prevalence of Chlamydia trachomatis infection in new patients at the Infertility Clinic, UOFS, Bloemfontein. *S Afr Med J* 1990; 77 (5): 232-233.
- Chow JN, Yenekura NL, Richwald GA, et al. The association between Chlamydia trachomatis and ectopic pregnancy. A matched-pair, case-control study. *JAMA* 1990; 263: 3191-92.
- Hahn DK, Azenabor AA, Beatty W, Byrne GI. Chlamydia pneumoniae as respiratory pathogen. *Front Biosci* 2002; 7: e66-e76.
- Kuo CC, Grayston JT, Campbell LA, et al. Chlamydia pneumoniae (TWAR) in coronary arteries of young adults (15-35 years old). *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 6911-14.
- Arda M. Klamidia ve klamidia enfeksiyonları. Arda M, Minbay A, Leloğlu N, ve ark. *Özel Mikrobiyoloji*. 4. Baskı. Ankara: Medisan 1977: 292-98.
- Puolakkainen M, Saikku P, Leionen M, et al. Comparative sensitivity of different serological tests for detecting chlamydial antibodies in perihepatitis. *J Clin Pathol* 1985 Aug; 38 (8): 929-32.
- Donn A, Ones GE, Ruiu A, et al. Serological diagnosis of chlamydial abortion in sheep and goats: Comparison of the complement fixation test and enzyme-linked immunosorbent assay employing solubilised proteins as antigen. *Vet Microbiol* 1997 Dec; 59 (1): 27-36.
- Griffiths PC, Plater JM, Horgan MW, et al. Serological diagnosis of ovine enzootic abortion by comparative inclusion immunofluorescence assay, recombinant lipopolysaccharide enzyme-linked immunosorbent assay and complement fixation test. *J Clin Microbiol* 1996 Jun; 34 (6): 1512-18.
- Akkuş İ. Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri. Konya: Mimoza Basım, Yayın ve Dağıtım A.Ş, 1995.
- Seymen HO, Mengi M, Özçelik D, ve ark. Effect of iron overloading on the plasma copper and the zinc levels. *Cerrahpaşa J Med* 1999; 30 (2): 155-58.
- Office International Des Epizooties. Manual of recommended diagnostic techniques and requirements for biological products for list A and B diseases. 1990; Volume II. Paris.
- Satoh K. Serum lipid peroxide in cerebrovascular disorders determined by a new colorimetric method. *Clin Chim Acta* 1978; 90: 37-43.
- Yagi K. Assay for blood plasma or serum. *Methods in Enzymol* 1984; 105: 328-31.
- Düzgüneş O, Kesici T ve Gürbüz F. İstatistik Metotları I, Ankara Üniversitesi. Ziraat Fakültesi Yayınları : 861 Ders Kitabı, Ankara: Ankara Üniversitesi Basımevi, 1983.
- Trush MA, Kensler TW. An overview of the relationship between oxidative stress and chemical carcinogenesis. *Free Radic Biol Med* 1991; 10: 201-9.
- Floyd RA. Role of oxygen free radicals in carcinogenesis and brain ischemia. *FASEB J* 1990; 4: 2587-97.

18. Fantone JC, Ward PA. Role of oxygen derived free radicals and metabolites in leukocyte-dependent inflammatory reactions. *Am J Pathol* 1982; 107: 397-418.
19. Hall ED, Braugher JM. Central nervous system trauma and stroke. II. Physiological and pharmacological evidence for involvement of oxygen radicals and lipid peroxidation. *Free Radic Biol Med* 1989; 6: 303-13.
20. Oberley LW. Free radicals and diabetes. *Free Radic Biol Med* 1988; 5: 113-24.
21. Platcha H, Bartnikowska E, Obara A. Lipid peroxides in blood from patients with atherosclerosis of coronary and peripheral arteries. *Clin Chim Acta* 1992; 211: 101-2.
22. Sundstrom H, Korpela H, Viinikka L, Kauppila A. Serum selenium and GP and Plasma lipid peroxides in uterine, ovarian or vulvar cancer and their responses to antioxidant in patients with ovarian cancer. *Cancer Lett* 1984; 24: 1-10.
23. Azenabor AA, Mahony JB. Generation of reactive oxygen species and formation of membrane lipid peroxides in cells infected with *Chlamydia trachomatis*. *Int J Infect Dis* 1999; 4: 46-50.
24. Segnini A, Camejo MI, Proverbio F. *Chlamydia trachomatis* and lipid peroxidation in fertile men. *Asian J Androl* 2003 Mar; 1: 47-49.
25. Nystrom-Rosander C, Lindh U, Ilback NG, et al. Interactions between *Chlamydia pneumoniae* and trace elements: a possible link to aortic valve sclerosis. *Biol Trace Elem Res* 2003 Feb; 91 (2): 97-110.
26. Galley HF, Webster NR. Elevated serum bleomycin-detectable iron concentrations in patients with sepsis syndrome. *Intensive Care Med* 1996 Mar; 22 (3): 226-29.
27. Ilhan N, Ilhan N, Şimşek M. The changes of trace elements, malondialdehyde levels and superoxide dismutase activities in pregnancy with or without preeclampsia. *Clin Biochem* 2002 Jul; 35 (5): 393-97.
28. Sokol RJ, Twedt D, Mckim JM Jr, et al. Oxidant injury to hepatic mitochondria in patients with Wilson's Disease and Bedlington terriers with copper toxicosis. *Gastroenterology* 1994 Dec; 107 (6): 1788-98.
29. Dougherty JJ, Hoekstra WG. Effects of vitamin E and selenium on copper-induced lipid peroxidation in vivo and on acute copper toxicity. *Proc Soc Exp Biol Med* 1982; 169: 201-8.
30. Hochstein P, Kumar KS, Forman SJ. Lipid peroxidation and the cytotoxicity of copper. *Ann N Y Acad Sci* 1980; 355: 240-48.
31. Sideris EG, Charalambous SC, Tsolomyty A, Katsaros N. Mutagenesis, carcinogenesis and the metal elements-DNA interaction. *Prog Clin Biol Res* 1988; 259: 13-25.