بیست و هفتمین
کنفرانس هسته‌ای ایران
۱۱ الی ۱۴ اسفند ۱۳۹۹ - دانشگاه فردوسی مشهد (مجازی)

بررسی اثر عصاره الکلی بره موم (*Propolis*) پرتوتابی شده با پرتو گاما بر میزان فعالیت برخی شاخص‌های آنتی‌اکسیدانی در ماهی قرمز (*Carassius auratus*)

مرضیه حیدریه[۱]، شلاله موسوی*[۲]، سمیرا شهبازی[۱]، حامد عسکری[۱]

۱- پژوهشکده کشاورزی هسته‌ای، پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای، کرج، ایران

۲- دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

چکیده

بره‌موم (*Propolis*) ماده‌ای رزینی که توسط زنبورعسل تولید می‌شود و سرشار از آنتی اکسیدان می‌باشد. بنابراین هدف از این مطالعه بررسی اثر عصاره الکلی بره‌موم پرتوتابی شده با پرتو گاما بر عملکرد برخی فراسنجه‌های آنتی‌اکسیدانی در ماهی قرمز (*Carassius auratus*) به عنوان مدل آزمایشی ماهیان گرمابی مد نظر قرار گرفت. ماهی‌ها با میانگین وزنی g ۰/۲۱ ± ۸/۶۰ به دو تیمار و یک گروه شاهد تقسیم شدند و دو تیمار با غلظت‌های ۲ و ۵ گرم در کیلوگرم عصاره بره موم به مدت ۴۰ روز تغذیه شدند. در پایان آزمایش نتایج نشان داد که پراکسیداسیون لیپیدی در هر دو تیمار در مقایسه با گروه شاهد کاهش یافت (P< ۰/۰۵). بررسی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان نیز نشان‌دهنده افزایش میزان فعالیت سوپراکسید دیسموتاز، گلوتاتیون اس-ترانسفراز و گلوتاتیون پراکسیداز در غلظت $g\ kg^{-1}$ ۲ و کاتالاز در هر دو تیمار در مقایسه با گروه شاهد بود (P< ۰/۰۵). بنابراین نتایج مطالعه حاضر بیانگر این مهم است که مصرف خوراکی عصاره الکلی بره‌موم پرتوتابی شده با پرتو گاما با دز ۱۰ کیلوگری در سطح به کارگیری ۲ گرم در کیلوگرم می‌تواند در بهبود عملکرد برخی شاخص‌های آنتی-اکسیدانی در ماهی قرمز نقش مؤثری ایفا کند.

واژه‌های کلیدی: بره‌موم پرتوتابی شده، عصاره الکلی، ماهی قرمز، فراسنجه‌های آنتی‌اکسیدان، پراکسیداسیون لیپیدی

Effects of gamma irradiated *propolis* ethanol extract on some antioxidant indices in gold fish (*Carassius auratus*)

Marzieh Heidarieh[1], Shalaleh Mousavi[2], Samira Shahbazi[1], Hamed Askari[1]

1. Nuclear Agriculture Research School, Nuclear Science and Technology Research Institute, Karaj, Iran.
2. Faculty of Veterinary Medicine, University of Tabriz, Tabriz, Iran.

Abstract

Propolis a resinous material produced by honey bees and has powerful antioxidant properties. The aim of this study was to investigate the effects of gamma irradiated (at 10 KGy) propolis ethanol extract on some antioxidant parameters in gold fish (*Carassius auratus*). Fish with mean weight 8.60 ± 0.21 g were divided into three groups and fed with 0 (as control group), 2 and 5 g kg^{-} gamma irradiated propolis ethanol extract for 40 days. Based on the results, lower lipid peroxidation product was observed in the treatment groups (P<0.05). Meanwhile, activities of some antioxidant enzymes, including superoxide dismutase, glutathione s-transferase and glutathione peroxidase were higher in the treatment groups that fed with 2 g kg^{-} gamma irradiated ethanol extract propolis and catalase in both of treatment compared to the control group (P<0.05). Therefore, the results of this study show that the administration of 2 g kg^{-} gamma irradiated propolis ethanol extract had the potential to improve some antioxidant indices, as well as protecting the liver in gold fish and better results require more research.

Keywords: Irradiated propolis, Ethanolic extract, gold fish, antioxidant indices, lipid peroxidation.

Email: Shalaleh.mousavi@ut.ac.ir

۱. مقدمه

پرورش و نگهداری ماهیان زینتی همواره به عنوان یکی از صنایع سودآور مطرح بوده است. ماهی قرمز از محبوب‌ترین ماهیان زینتی محسوب می‌شود و مکرراً برای اهداف مختلف آزمایشی به عنوان مدل مورد مطالعه قرار می‌گیرد [۱]. تکثیر و پرورش متراکم ماهیان، زمینه‌ساز استرس و بروز انواع بیماری‌های ویروسی، باکتریایی، قارچی و انگلی در ماهی است. استفاده از مواد طبیعی به خاطر خصوصیات خاص از جمله خطر کمتر برای محیط زیست، در دسترس و ارزان قیمت بودن به عنوان آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی افزایش یافته است [۲].

بره‌موم یا propolis ماده‌ای رزینی و به رنگ سبز یا قهوه‌ای است. بره‌موم از قسمت‌های مختلف گیاه مانند جوانه، برگ و سایر مواد مترشحه از گیاهان توسط زنبور عسل جمع‌آوری و با آنزیم‌های زنبور تغییر شکل می‌یابد [۳]. بره‌موم در کلنی زنبور عسل به منظور ضدعفونی کردن، پرکردن شیارها و عایق‌بندی استفاده می‌شود [۳]. در دهه‌های اخیر بره-موم علاقه محققان را به خاطر داشتن چندین ویژگی زیستی و دارویی مثل ویژگی‌های محرک و بهبود دهنده پاسخ سیستم ایمنی، ضدتوموری، ضد میکروبی، ضد التهابی و آنتی‌اکسیدان به خود جلب کرده است [۴]. از نظر ترکیبات شیمیایی بره موم به طور متوسط از ۵۵-۴۵ درصد صمغ یا رزین، ۳۵-۲۳ درصد موم، ۱۰ درصد روغن‌های فرار، ۵ درصد گرده، ۵ درصد مواد آلی و معدنی می‌باشد [۵]. براساس برخی مطالعات انجام گرفته دادن بره موم به موش یا انسان، به نظر نمی‌رسد که اثرات جانبی داشته باشد. بره موم غیرسمی است و محدوده DL 50 آن بین ۲ تا ۳/۷ گرم بر کیلوگرم در موش است [۶]. در مطالعه‌ای به ارزیابی تأثیر غلظت‌های مختلف بره موم بر ترمیم زخم پوستی و پاسخ سیستم ایمنی در ماهی کپور معمولی پرداخته شد. نتایج تحقیق بیانگر این موضوع بود که استفاده از بره موم زنبور عسل به شکل افزودنی در آب با غلظت‌های ۲ و ۵ درصد سبب تحریک سیستم ایمنی در ماهی کپور پس از ۲۱ روز می‌گردد [۷].

استرس اکسیداتیو، ناشی از عدم تعادل بین سیستم‌های تولیدکننده و به‌دام اندازنده رادیکال آزاد و ترکیبات اکسیدان بوده که با افزایش تولید رادیکال آزاد یا کاهش فعالیت سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی و یا هر دو همراه است. سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی آنزیمی سلول شامل آنزیم‌هایی مانند سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، گلوتاتیون پراکسیداز و گلوتاتیون اس‌ترانسفراز است [۸]. استرس اکسیداتیو در محیط سلولی منجر به تشکیل لیپید پراکسیدهای ناپایدار و واکنش‌گر می‌شود. تجزیه پراکسیدهای ناپایدار و مشتق شده از اسیدهای چرب غیراشباع منجر به تشکیل مالون‌دی‌آلدئید (MDA) می‌شود که سنجش آن، شاخص مناسبی جهت بررسی پراکسیداسیون لیپیدها محسوب می‌شود [۹]. علیرغم مطالعات فراوان اثرات عصاره الکلی بره‌موم در موجودات خونگرم و حتی ماهیان پرورشی، گزارشی در ارتباط با اثرات آنتی‌اکسیدانی این عصاره الکلی بره‌موم به صورت پرتوتابی شده در ماهیان زینتی وجود ندارد. مطالعه حاضر جهت بررسی تأثیر خوراکی عصاره الکلی بره‌موم پرتوتابی شده با پرتو گاما دز ۱۰ کیلوگری بر تقویت عملکرد سیستم آنتی-اکسیدانی در ماهی قرمز به عنوان مدل آزمایشی ماهیان گرمابی به خصوص کپور ماهیان انجام گرفته است.

۲. مواد و روش کار

این مطالعه در مزرعه پرورش ماهیان آکواریومی در تبریز انجام گرفت. در مجموع ۲۷۰ قطعه ماهی با میانگین وزنی ۰/۲۱ ±۸/۶۰ گرم به صورت تصادفی و مساوی در ۹ تانک شیشه‌ای (۳ تکرار برای هر گروه) با ابعاد ۲۰ ×۳۰ ×۶۰ سانتی‌متر قرارگرفتند. هوادهی در تانک‌ها با استفاده از سنگ هوا و تعویض روزانه آب تانک‌ها با آب تازه (۵۰ درصد) انجام گرفت. دمای آب و اکسیژن محلول در آب و pH در طول دوره ۴۰ روزه به ترتیب ۲۵-۲۴/۵ درجه سانتی‌گراد، ۷/۵-۷ میلی‌گرم بر لیتر بود.

جیره مورد استفاده با افزودن ۲ و ۵ گرم در کیلوگرم عصاره الکلی بره‌موم (تهیه شده از زنبورداری واقع در منطقه سبلان- استان اردبیل) پرتوتابی شده با دز ۱۰ کیلوگری پرتو گاما (توسط چشمه کبالت-۶۰ (PX-30 IssIedovapel، روسیه) در یک محدوده دوز ۰/۰۲ گری در ثانیه-پژوهشکده کشاورزی هسته‌ای) به خوراک تجاری پایه به دست آمد. غلظت‌های انتخاب شده براساس اثرات مثبت ایجاد شده با این مقدار در مطالعه‌ای دیگر در ماهی کپور معمولی بود [۷]. به منظور تهیه عصاره الکلی بره‌موم، ابتدا قطعات بزرگ بره‌موم توسط ازت مایع به قطعات ریز خرد شده سپس ۲۵ گرم از آن با ۲۵۰ میلی‌لیتر محلول اتانل ۸۰ درصد مخلوط و به مدت ۴۸ ساعت در دمای اتاق در سطح افق تکان داده شد (۱۵۰ دور در دقیقه). سپس عصاره الکلی حاصل توسط کاغذ صافی نمره ۴ واتمن دو بار صاف شده و به کمک دستگاه روتاری الکل آن تبخیر و عصاره الکلی خالص به دست آمد. سپس عصاره خالص بدست آمده توزین و محلول ۱۰درصد (وزن به حجم) آن در الکل ۸۰ درجه تهیه و تا زمان استفاده در ظرف شیشه‌ای تیره و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد [۱۰]. عصاره الکلی بره موم پرتوتابی شده با اسپری کردن۲۰ میلی‌لیتر روغن ماهی به ازای هر کیلوگرم خوراک افزوده شد. در گروه شاهد نیز خوراک پایه فاقد عصاره عصاره الکلی بره‌موم مورد مصرف قرار گرفت. جهت یکسان‌سازی، به خوراک گروه شاهد تنها۲۰ میلی‌لیتر روغن ماهی به ازای هر کیلوگرم جیره پایه اسپری گردید [۱۱]. غذادهی در ۲ نوبت در ساعات ۱۰ و ۱۷ انجام گرفت.

۲. ۱. نحوه نمونه‌برداری از موکوس

در پایان دوره (روز ۴۰ام آزمایش) تغذیه با عصاره الکلی بره‌موم پرتوتابی شده، ۵ ماهی به صورت تصادفی از هر تانک شیشه‌ای به صورت جداگانه با عصاره گل میخک (۵۰ میکرولیتر بر لیتر) بی‌هوش شده و سپس موکوس جلدی ماهی‌ها به آرامی با استفاده از کاردک پلاستیکی نرم جمع‌آوری گردید. نمونه‌ها با ۴ برابر حجم موکوس جمع‌آوری شده بافر تریس هموژن شده، با دور ۴۰۰۰ به مدت ۳۰ دقیقه و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شده و مایع رویی لیوفیلیزه گردید. مایع رویی با استفاده از جریان ملایم گاز ازت تغلیظ شده و پس از عبور از فیلتر میلی‌پور به عنوان عصاره موکوسی تا زمان استفاده در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد فریز گردید [۱۲].

۲. ۲. سنجش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی

اندازه‌گیری میزان پراکسیداسیون لیپیدی با روش تیوباربیتوریک اسید انجام گرفت که به‌طور خلاصه به نمونه ۲/۵ میلی‌لیتر TCA ۲۰ درصد اضافه و در دور g × ۱۵۰۰به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. میزان ۲/۵ میلی‌لیتر اسیدسولفوریک ۰/۰۵ مولار و ۲ میلی‌لیتر تیوباربیتوریک اسید ۰/۲ درصد به رسوب حاصل از سانتریفیوژ اضافه شد و به مدت۳۰ دقیقه در بن‌ماری قرار گرفت؛ سپس ۴ میلی‌لیتر n بوتانول به محلول اضافه و سانتریفیوژ گردید و پس از خنک شدن، میزان جذب نوری محلول رویی در طول موج ۵۳۲ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شد [۱۳]. اندازه‌گیری آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز در طول موج۳۴۰ نانومتر و توسط کیت پارس آزمون انجام گرفت. فعالیت آنزیم کاتالاز براساس فرایند تجزیه پراکسید هیدروژن و تشکیل کمپلکس با ثبات با مولیبدات آمونیوم اندازه‌گیری شد. تغییرات رنگی مولیبدات و پراکسید هیدروژن در طول موج ۴۰۵ نانومتر خوانده شد. از کیت پارس آزمون به منظور اندازه‌گیری آنزیم سوپراکسید دیسموتاز بر اثر فعالیت آنزیمی گزانتین‌اکسیداز استفاده شد و تولید رنگ فورمازین در طول موج ۵۰۵ نانومتر قرائت شد. میزان آنزیم گلوتاتیون اس-ترانسفراز به روش اسپکتروفتومتری و با استفاده از دی-تیو – بیس نیتروبنزوئیک اسید (DTNB) براساس روش المان انجام گرفت و در طول موج۳۵۰ نانومتر قرائت شد [۱۴].

۲. ۳. تحلیل آماری

داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۱۹ مورد سنجش قرار گرفت. در این تحقیق برای تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها از واریانس یک راهه آنوا One way ANOVA استفاده گردید. مقایسه تیمارها نیز با آزمون Tukey انجام و سطح معنی‌داری آزمون‌ها کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

۳. نتایج و بحث

میزان پراکسیداسیون لیپیدی در هر دو تیمار در مقایسه با گروه شاهد کاهش معنی‌داری داشت (P< ۰/۰۵). بررسی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان نیز نشان‌دهنده افزایش میزان فعالیت سوپراکسید دیسموتاز، گلوتاتیون اس-ترانسفراز و گلوتاتیون پراکسیداز در غلظت $۲\ g\ kg^{-1}$، کاتالاز در هر دو تیمار در مقایسه با گروه شاهد بود (P< ۰/۰۵).

جدول۱- میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی در ماهی قرمز تغذیه شده با عصاره الکلی بره موم پرتوتابی شده با پرتو گاما و خوراک پایه

فاکتورهای بررسی شده	شاهد	($۲\ g\ kg^{-}$)	($۵\ g\ kg^{-}$)
میزان پراکسیداسیون لیپیدی ($\mu mol\ mgpr^{-1}$)	۱۶/۴۵ ± ۰/۱۱^{a}	۱۱/۱۳ ± ۰/۱۳^{b}	۱۱/۹۸ ± ۰/۱۱^{b}
سوپراکسید دیسموتاز ($U\ mgpr^{-1}$)	۶/۸۵ ± ۰/۰۹^{b}	۸/۲۴ ± ۰/۱۲^{a}	۷/۰۳ ± ۰/۱۳^{b}
کاتالاز ($U\ mgpr^{-1}$)	۱۱/۳۳± ۰/۲۰^{b}	۱۶/۳۱ ± ۰/۲۲^{a}	۱۵/۶۸ ± ۰/۱۹^{a}
گلوتاتیون اس-ترانسفراز ($U\ mgpr^{-1}$)	۹/۱۳± ۰/۰۵^{c}	۱۵/۲۳± ۰/۰۷^{a}	۱۲/۴۵ ± ۰/۱۰^{b}
گلوتاتیون پراکسیداز ($U\ mgpr^{-1}$)	۱۵/۳۳ ± ۰/۱۹^{c}	۲۲/۳۷ ± ۰/۱۱^{a}	۱۹/۲۰ ± ۰/۲۱^{b}

مقادیر به صورت (میانگین ± انحراف معیار) ارائه شده است.

*اعداد با حروف متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین تیمارها می‌باشد (P< ۰/۰۵).

امروزه استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی به عنوان یک مکمل غذایی که قادر به بهبود و ایجاد مقاومت در برابر عوامل استرس‌زا در زمان بروز استرس‌های فراوان حین دوره پرورش ماهی باشند، مورد توجه هستند. در سال‌های اخیر به دلیل توجه به حفظ محیط زیست و بهره‌گیری از مواد فاقد باقی‌ماندگی در محیط زیست، استفاده از مواد طبیعی در حال افزایش است.

استرس اکسیداتیو در بدن نشان‌دهنده عدم تعادل بین تولید گونه‌های فعال اکسیژن و توان دفاع آنتی‌اکسیدانی برای سم‌زدائی این واسطه‌های فعال است. مالون‌دی‌آلدئید محصول کوچک اما پایدار پراکسیداسیون لیپیدی است که از تجزیه پراکسیدهای ناپایدار اسیدهای چرب غیراشباع که در ماهی فراوانند ایجاد می‌شود [۱۵]

در مطالعه حاضر تغذیه با عصاره الکلی بره‌موم پرتوتابی شده موجب کاهش پراکسیداسیون لیپیدی در هر دو تیمار در مقایسه با گروه شاهد و همچنین افزایش معنی‌دار فعالیت برخی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان گردید. مطالعات دیگر نیز اثرات آنتی‌اکسیدانی بره‌موم را بررسی و نتایج مطالعه حاضر را تائید می‌کنند [۷].

بنابراین نتایج این مطالعه نشان دهنده پتانسیل اثربخشی عصاره الکلی بره‌موم پرتوتابی شده با دز ۱۰ کیلوگری در هر دو غلظت ۲ و ۵ گرم در کیلوگرم به خوراک در کاهش استرس اکسیداتیو به واسطه افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی-اکسیدانی در ماهی قرمز است. این اثرات مثبت در نهایت باعث افزایش تولید و کاهش هزینه پرورش ماهی خواهد شد. بنابراین افزودن به خصوص میزان ۲ گرم عصاره الکلی بره‌موم پرتوتابی شده با دز ۱۰ کیلوگری در کیلوگرم خوراک

ماهی قرمز توصیه می‌شود. اما انجام مطالعات تکمیلی در زمینه بررسی مکانیسم دقیق اثر این ماده به عنوان یک آنتی-اکسیدان طبیعی و انجام آزمون‌های چالشی در گونه‌های مختلف ماهی ضروری به نظر می‌رسد.

۴. منابع

1. Y.K. Kuang, X.H. Zheng, C.Y. Li, X.M. Li, D.C. Cao, G.H. Tong, W.H. LV, W. Xu, Y. Zhou, X.F. Zhang, Z.P. Sun, S. Mahboob, K.A. Al-Ghanim, J.T. Li and X.W. Sun, *The genetic map of goldfish (Carassius auratus) provided insights to the divergent genome evolutions in the Cyprinidae family*, Sci. Rep. 6, 34849 (2016).
2. T. Karatas, F. Korkmaz, A. Karatas and S. Yildirim, *Effects of Rosemary (Rosmarinus officinalis) extract on growth, blood biochemistry, immunity, antioxidant, digestive enzymes and liver histopathology of rainbow trout, Oncorhynchus mykiss*, Aquac. Nutr. https://doi.org/10.1111/anu.13100 (2020).
3. Syamsudin and R.M. Dewi kusmardi, *Immunomoduatory and in vivo antiplasmodial activities of propolis extracts*, Am. J. Pharmacol. Toxicol. 4 (3), 75-79 (2009).
4. W.C. Uicker, H.A. Doyle, J.P. Mccracken, M. Lanlois and k.L. Buchanan, *Cytokine and chemokine expression in the central nervous system associated with protective cell mediated immunity against Cryptococcus neoformans*, Med. Mycol. 43 (1), 27-38 (2005).
5. K.F.D. Dota and M.E.L. consolaro, *antifungal activity of Brazilian propolis micropartiles against Yeast Isolated from vulvo vaginal candidiasis*, Evid. Based Complementary Altern. Med. 2011:201953 (2010).
6. G.A. Burdock, *Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis)*, Food Chem. Toxicol. 36, 347–363 (1998).
7. N. Choobkar, A. Sari, A.R. Bolandnazar, H. Heshmati, F. Mohammadi, N. Shahbazian, A.M. Emami-Rad and P. Yari, *The effect of different concentrations of bee propolis on skin wound healing and immune response and survival of Common carp (Cyprinus carpio)*, Vet. Clin. Pathol. 7, (28), 300-312 (2014).
8. K. Birnie-Gauyin, D. Costantini, S.J. Cooke and W.G. Willmore, *A comparative and evolutionary approach to oxidative stress in fish: A review*, Fish Fish. 18(5), 928-942 (2017).
9. M.S. Ural, F. Karatas, M. Calta, *Some Antioxidants and Malondialdehyde Levels in the Flesh of Rainbow Trout, (Oncorhynchus mykiss W., 1792) from Various Feeding Habitats*, Cell. Mol. Biol. 61(7), 23-26 (2015).
10. K. Bosio, C. Avanzini, A.D. Avolio, O. Ozino and D. Savoia, *In vitro activity of propolis against Streptococcus pyogenes*, Lett. Appl. Microbiol. 31, 174-7(2000).
11. N. Sheikhzadeh, Sh. Nootash, A. Khani Oushani, S. Mousavi and K. Tahapour, *Expression analysis of IFN-γ, MX1, MX2, MX3 and HSP70 genes in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) administrated with green tea (Camellia sinensis).* Iran. J. Vet. Res. 15(3), 32-40 (2019).
12. N. Sheikhzadeh and M. Heidarieh, *Effects of commercial synbiotic Biomin®IMBO on growth performance, some biochemical parameters and skin mucosal immunity in crucian carp (Carassius carassius)*, J. Aquac. Res. Dev. 14 (2) :55-65 (2020).
13. L. Bordoni, D. Fedeli, C. Nasuti, F. Maggi, F. Papa, M. Wabitsch, R. De Caterina and R. Gabbianelli, 2019. *Antioxidant and Anti-Inflammatory Properties of Nigella sativa Oil in Human Pre-Adipocytes*, Antioxidants (Basel), 8(2), 51 (2019).
14. H. Aebi, *Methds of enzymatic analysis*, In Bergmeyer, H.U., Ed., Verlag Chemie/Academic Press. Weinheim/NewYork. Pp. 673-690 (1974).
15. C. Vinagre, D. Madeira, L. Narciso, H.N. Cabra and M. Diniz, *Effect of temperature on oxidative stress in fish: Lipid peroxidation and catalase activity in the muscle of juvenile seabass, Dicentrarchus labrax*, Ecol. Indic. 23, 274-279 (2012).