



تأثیر ده هفته ورزش هوازی بر عملکرد سیستمیک بطن چپ، سطح کاسپاز-۳ و اندازه ناحیه انفارکتوس موش‌های صحرایی با انفارکتوس قلبی

کمال رنجبر^۱، فرزاد ناظم^{۱*}، افشین نظری^۲، محمدرضا غلامی^۳

۱- دانشگاه بوعلی سینا همدان- دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی- گروه فیزیولوژی ورزش.

۲- دانشگاه علوم پزشکی لرستان- مرکز تحقیقات داروهای گیاهی رازی- استادیار فیزیولوژی.

۳- دانشگاه علوم پزشکی لرستان- گروه علوم تشریح- استادیار.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۶/۲۱، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۷/۲۷

چکیده

مقدمه: هدف این مطالعه، بررسی تأثیر ده هفته تمرین هوازی زیر بیشینه دویدن بر عملکرد سیستمیک بطن چپ، کاسپاز-۳ و اندازه ناحیه انفارکتوس در موش‌های صحرایی با انفارکتوس قلبی می‌باشد.

مواد و روش‌ها: ۲۰ سر موش صحرایی نر ویستار چهار هفته بعد از انفارکتوس قلبی به دو گروه کنترل انفارکتوس شده ($n=10$ SedMI) و گروه تمرینی انفارکتوس شده ($n=10$ ExMI) تقسیم‌بندی شدند. ۱۰ سر موش صحرایی نر ویستار بدون انفارکتوس قلبی نیز به‌عنوان گروه کنترل سالم ($n=10$ Sham) در نظر گرفته شدند. گروه ExMI به مدت ۱۰ هفته تمرین ورزشی دویدن بر روی تردمیل (هر هفته ۵ جلسه و هر جلسه ۵۰ دقیقه با سرعت ۱۷ متر بر دقیقه معادل ۵۵ درصد ظرفیت هوازی) را انجام دادند. از تمامی موش‌ها قبل و بعد از مداخله ورزش، اکوکاردیوگرافی به‌عمل آمد.

نتایج: تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها نشان داد که میزان کسر تخلیه (EF) و کوتاه‌شدگی میوفیبریل‌های عضلانی (FS) در گروه‌های انفارکتوس شده (MI Ex) نسبت به گروه شام طرف ۴ و ۱۴ هفته بعد از انفارکتوس به‌طور معنی‌داری کاهش داشت ($P < 0.05$). میزان EF و FS در پایان هفته چهاردهم در گروه ExMI، بیشتر از گروه SedMI بود. همچنین اندازه ناحیه انفارکتوس و نرخ مرگ و میر جوندگان در پاسخ به فعالیت ورزشی به‌طور معنی‌داری کاهش پیدا کرد ($P < 0.05$)، اما تغییر معنی‌داری در اندازه فعالیت کاسپاز-۳ به‌دست نیامد ($P = 0.07$).

نتیجه‌گیری: به‌نظر می‌رسد که مداخله ده هفته ورزش هوازی متعاقب چهار هفته بعد از انفارکتوس قلبی موش‌ها، اختلالات عملکرد بطن چپ را کاهش می‌دهد و در نتیجه منجر به بهبود کارایی سیستمیک بطن چپ، کاهش اندازه ناحیه انفارکتوس و نرخ مرگ و میر می‌شود.

واژه‌های کلیدی: ورزش هوازی، درصد کسر تخلیه، درصد کوتاه‌شدگی میوفیبریل‌های میوکاردا، انفارکتوس قلبی.

*نویسنده مسئول: همدان، چهار راه پژوهش، دانشگاه بوعلی سینا همدان، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، تلفن: ۰۹۱۸۱۱۱۷۹۱۱، نمابر: ۰۸۱۱۸۲۷۳۳۳۶، Email: Farzadnazem1@yahoo.com

ارجاع: رنجبر کمال، ناظم فرزاد، نظری افشین، غلامی محمدرضا. تأثیر ده هفته ورزش هوازی بر عملکرد سیستمیک بطن چپ، سطح کاسپاز-۳ و اندازه ناحیه انفارکتوس موش‌های صحرایی با انفارکتوس قلبی. مجله دانش و تندرستی ۱۳۹۴؛ ۱۰(۳): ۱۶-۲۴.

مقدمه

بیماری انفارکتوس قلبی رایج‌ترین علت نارسایی قلبی است که منجر به اختلالات سیستولی و دیاستولی بطن چپ می‌شود (۱). در دوره بعد از انفارکتوس قلبی، تغییراتی در بطن چپ به وجود می‌آید که شامل مرگ کاردیومیوسیت، کشیدگی کاردیومیوسیت، نازک شدن دیواره بطن، تجمع کالژن، هایپرتروفی جیرانی ناحیه غیر ایسکمیک و نکروز ناحیه ایسکمیک می‌باشد و در صورت تداوم وضع موجود منجر به کاهش عملکرد انقباضی میوکارد و اختلال در عملکرد سیستولی و دیاستولی بطن چپ می‌شود (۲ و ۳).

تمرینات ورزشی به‌عنوان جزیی از برنامه بازتوانی بیماران با انفارکتوس قلبی می‌باشد (۴) و در طول یک دهه اخیر مطالعات فراوانی مزایای تمرینات ورزشی را در بیماران با نارسایی احتقانی قلب را مورد مطالعه قرار داده‌اند (۱، ۵ و ۶). در همین راستا جوگدات و همکاران، کوبو و همکاران، کاهش عملکرد سیستولیک بطن چپ را در بیماران با انفارکتوس قلبی را متعاقب ۱۲ هفته تمرینات ورزشی نشان دادند (۷ و ۸). در مقابل، مطالعاتی نیز وجود دارد که عدم تأثیرگذاری (۹) و یا کاهش گشادی بطن چپ (Left Ventricular dilation) و افزایش عملکرد بطن چپ را متعاقب تمرینات ورزشی نشان داده‌اند (۱۰). در این زمینه، گرانس و همکاران (۲۰۱۴) نشان دادند، اگر چه اندازه ناحیه انفارکتوس و اختلالات سیستولیک بطن چپ موش‌های انفارکتوس شده در پاسخ به ۳ ماه تمرینات مقاومتی کاهش نمی‌یابد، اما سطح عملکرد دیاستولیک (نسبت موج E بر موج A)، شاخص عملکرد میوکارد و فشار خون سیستولیک را بهبود می‌بخشد (۱۱). همچنین خو و همکاران (۲۰۱۰) آشکار نمودند که انجام ۸ هفته ورزش هوازی متعاقب انفارکتوس قلبی، کسر تخلیه و درصد کوتاه شدن فیبر عضلانی را به ترتیب ۳۰٪ و ۲۴٪ افزایش داده است (۱۲). باتوجه به پیشینه مطالعات موجود در بیماران انفارکتوس قلبی، تأثیر ورزش هوازی با تأکید بر مؤلفه‌های شدت، شیوه اجرا و شدت کار، مشخص نیست. زیرا شواهد علمی ناهمگون خاطر نشان می‌کند که تمرینات ورزشی موجب کاهش (۷ و ۸)، عدم تغییر (۱۳) و یا بهبود (۱۴ و ۱۵) عملکرد بطن چپ می‌شود.

از طرفی آپوتوز نقش مهمی را در عملکرد فیزیولوژیک و پاتولوژیکی قلب پس از انفارکتوس قلبی ایفا می‌کند. اخیراً مطالعات علمی از نقش مؤثر کاسپاز-۳ به‌عنوان یک عامل پیش-آپوتوتیک (Proapoptotic) در کاهش ناپایدار عملکرد قلب و آسیب میوفیبریل حکایت دارد. در همین راستا، سطح کاسپاز-۳ هنگام ایسکمی میوکارد افزایش می‌یابد و این پدیده پاتولوژیک به افزایش اندازه ناحیه انفارکتوس می‌انجامد (۱۶). با این حال، نقش مداخله‌گر تمرینات ورزشی هوازی بر اندازه تغییرات فعالیت کاسپاز-۳ هنوز مشخص نیست (۱۷).

بنابراین با ملاحظه شواهد علمی و پیشینه‌های موجود، در این پژوهش اثر احتمالی ده هفته فعالیت هوازی دوییدن بر عملکرد سیستولیک بطن

چپ، کاسپاز-۳، اندازه ناحیه انفارکتوس و میزان مرگ و میر موش‌های انفارکتوس شده مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی که به‌صورت طرح پیش و پس آزمون گروهی انجام گرفت، از ۳۰ سر موش صحرایی نر ویستار ۶ تا ۸ هفته‌ای با دامنه وزنی ۲۰۰-۱۸۰ گرم که از دانشگاه شهید بهشتی خریداری شده بودند، استفاده شد. حیوانات، در آزمایشگاه استاندارد جوندگان (چرخه ۱۲ ساعت روشنایی- تاریکی و میانگین درجه حرارت 22 ± 2 درجه سلسیوس) با دسترسی آزادانه به آب و غذا جای گرفتند. برای اطمینان از سازگاری موش‌ها با طرز دوییدن روی تردمیل، یک هفته قبل از آغاز جراحی، آزمودنی‌ها در سه جلسه (هر نوبت ۱۰ دقیقه و با سرعت ۱۰ متر بر دقیقه) روی تردمیل به ورزش کردن واداشته شدند. موش‌هایی که قادر به دوییدن روی دستگاه نبودند، از ادامه پژوهش خارج شدند.

ابتدا حیوانات با تزریق داخل صفاقی تیوپتال سدیم (50 mg/kg ip) بیهوش شدند. پس از تراشیدن موهای ناحیه قفسه سینه، روی تخت جراحی قرار می‌گرفتند و به میزان 200 U/kg هپارین به آنها تزریق می‌شد. ناحیه گردن حیوان طوری قرار داده شد تا دست‌یابی به نای برای انتوبه کردن تسهیل شود. بعد از انتوبه کردن، حیوان به دستگاه ونتیلاتور مدل (Small Animal Ventilator, Harvard Model 683-USA) با تواتر ۶۰ تا ۷۰ تنفس در دقیقه و حجم جاری 15 ml/kg متصل گردید. از سوی دیگر، برای کسب اطمینان از ایجاد انفارکتوس، از ثبت لید II الکتروکاردیوگرام دستگاه پاورلب استفاده شد. سپس برشی روی ناحیه قفسه سینه ایجاد کرده تا قلب در معرض دید قرار بگیرد. نگاه پریکارد را به آرامی پاره کرده و نخ سیلک از زیر شریان کرونری قدامی نزولی چپ (LAD: Left anterior descending coronary artery) عبور داده شد. کشیدن و بستن نخ موجب ایسکمی دائمی می‌شد. بعد از اتمام روند جراحی، حیوان زیر دستگاه اکسیژن خالص قرار می‌گرفت تا به‌تدریج بهوش آید. دمای بدن حیوان حین عمل جراحی به‌وسیله پتوی حرارتی در میانگین دمای 37 ± 1 درجه سلسیوس حفظ می‌شد.

چهار هفته پس از گذشت انفارکتوس قلبی، موش‌ها وارد مرحله تمرین می‌شدند. ۲۰ موش انفارکتوس شده به‌طور تصادفی در دو گروه کنترل انفارکتوس شده (SedMI، $n=10$) و گروه تمرینی با انفارکتوس قلبی (ExMI، $n=10$) قرار گرفتند. ۱۰ رأس موش صحرایی دیگر نیز که مبتلابه انفارکتوس قلبی نبودند، به‌عنوان گروه شم (Sham) قرار داده شدند. در گروه شم بعد از توراکتومی، نخ بخیه از زیر LAD بدون ایجاد ایسکمی عبور داده می‌شد. مشخصات دموگرافیک نمونه‌ها در جدول ۱ نشان داده شده است. موش‌هایی که در گروه تمرین هوازی قرار داشتند، چهار هفته پس از انفارکتوس قلبی فعالیت دوییدن را روی تردمیل به مدت ۱۰ هفته مداوم، هر هفته ۵ جلسه و هر نوبت ۵۰ دقیقه با سرعت ۱۷ متر

سفید در می‌آیند. برای افزایش کنتراست ناحیه قرمز تیره و زرد متمایل به سفید، برش‌ها به مدت ۴۸ ساعت در فرمالین ۱۰ درصد تثبیت شدند. پس از این مدت، از بافت‌ها اسکن تهیه شد. آنگاه با کمک نرم‌افزار فتوشاپ، سطوح ناحیه نکروزه یا انفارکت (رنگ پریده) به صورت درصدی از بطن چپ انفارکت شده (IS/LV%) محاسبه گردید (شکل ۱).

همچنین برای سنجش سطح کاسپاز ۳-، نمونه‌های ۵۰ میلی‌گرمی از ناحیه مجاور قلب انفارکت برداشته شد. سپس نمونه‌ها در نیتروژن مایع تا زمان اندازه‌گیری در دمای 80°C - نگهداری شدند.

پس از سانتریفیوژ کردن نمونه‌ها ظرف ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰ rpm در دمای 4°C ، فعالیت آنزیم کاسپاز ۳- به روش کالریتری اندازه‌گیری شد. بعد از بررسی طبیعی بودن داده‌ها با آزمون اسمیرنوف-کولموگروف و برای نشان دادن امکان اختلاف معنی‌داری درون گروهی، از آزمون آماری Paired t-tests و برای مطالعه اختلاف بین گروهی از آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) و آزمون تعقیبی توکی استفاده شد. داده‌ها به صورت $\text{Mean} \pm \text{SD}$ گزارش شد. نرخ مرگ و میر موش‌ها در گروه‌های مختلف به وسیله نمودار کاپلان-مایر نمایش داده شد.

نتایج

متغیرهای وزن بدن، وزن قلب، نسبت وزن قلب به وزن بدن و تواتر ضربان قلب استراحت در گروه‌های مختلف، تفاوت معنی‌داری نداشتند (جدول ۱). اندازه پایان دیاستولی، اندازه پایان سیستولی، حجم پایان دیاستولی و حجم پایان سیستولی بطن چپ در هفته چهارم و چهاردهم پس از انفارکتوس قلبی در گروه‌های SedMI و ExMI به‌طور معنی‌داری بیشتر از گروه شم بود ($P=0/001$). در همین راستا مقدار حجم ضربه‌ای، در چهار هفته پس از انفارکتوس قلبی بین سه گروه تفاوت معنی‌داری نداشت ($P=0/23$). اما پس از ده هفته فعالیت ورزشی (هفته چهاردهم پس از انفارکتوس قلبی) حجم ضربه‌ای در گروه ExMI به‌طور معنی‌داری نسبت به گروه SedMI افزایش یافت ($P=0/048$). این در حالی بود که اندازه حجم ضربه‌ای در گروه SedMI نسبت به گروه شم کاهش معنی‌داری داشت ($P=0/007$). در همین راستا نتایج آماری نشان داد که تفاوت معنی‌داری در چهارده هفته پس از انفارکتوس قلبی بین حجم ضربه‌ای گروه شم و گروه ExMI وجود ندارد ($P=0/9$). این یافته حاکی از بازتوانی کامل حجم ضربه پس از تمرینات ورزشی در موش‌های با انفارکتوس قلبی می‌باشد. در راستای تغییرات حجم ضربه‌ای، نتایج آماری برای برون‌ده قلب نیز نشان داد که اندازه برون ده قلب در چهار هفته پس از انفارکتوس قلبی بین گروه‌های مورد مطالعه تفاوت معنی‌داری وجود ندارد. برون‌ده قلب در چهارده هفته پس از انفارکتوس قلبی در گروه SedMI نسبت به گروه شم کاهش یافت. اما در گروه ExMI تمرینات ورزشی مانع از کاهش برون‌ده قلب در پاسخ به انفارکتوس قلبی شد.

بر دقیقه (معادل ۵۵ تا ۶۰ درصد Vo_2max) (۱۸) شروع کردند. اما گروه‌های شم و کنترل انفارکتوس شده در طول کل دوره آزمایش، از انجام فعالیت ورزشی به‌دور بودند. در هفته اول، موش‌ها برای سازگاری تدریجی با فعالیت ورزشی، به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۰ متر بر دقیقه روی تردمیل ورزش می‌کردند. مدت و شدت تمرین به تدریج افزایش پیدا کرد تا در هفته پنجم به ۵۰ دقیقه و سرعت ۱۷ متر بر دقیقه رسید. این شدت تا هفته دهم ورزش هوازی ثابت باقی ماند (۱۹).

پس از بیهوشی سطحی با تزریق داخل صفاقی تیوپنتال سدیم (mg/kg ۳۰ip)، ابتدا ناحیه قفسه سینه تراشیده شده سپس حیوان به سمت راست و پشت خوابانده شد. اندازه‌گیری اکوکاردیوگرافی روز بعد، روز قبل از شروع تمرین هوازی و یک روز بعد از پایان هفته دهم تمرین با دستگاه اکوکاردیوگرافی M-Mode مدل (GE-VIVID-7, Version 5, USA) مجهز به ترانس دیوسر ۱۰MHz و در نمای محور بلند قلب به‌دست آمد. تصاویر قلب توسط VHS videotapes ثبت شد و نتایج نهایی به‌وسیله میانگین سه سیکل متفاوت عملکرد میوکارد محاسبه شد. تعیین اندازه‌های شاخص‌های مختلف اکوکاردیوگرافی بر پایه پیشنهاد انجمن کاردیوگرافی امریکا انجام گرفت. اندازه پایان دیاستولی (EDD)، اندازه پایان سیستولی (ESD)، حجم پایان دیاستولی (EDV)، حجم پایان سیستولی (ESV)، حجم ضربه‌ای (SV)، درصد کوتاه شدن لیف‌های عضلانی (SF)، کسر تخلیه (EF) بطن چپ و برون‌ده قلب اندازه‌گیری شدند.

بلافاصله پس از اندازه‌گیری اکوکاردیوگرافی متعاقب تمرینات ورزش هوازی (هفته چهاردهم بعد از انفارکتوس قلبی) آزمودنی‌ها با تزریق دوز بیشتر تیوپنتال سدیم به‌صورت داخل صفاقی به‌طور عمیق بیهوش شدند. سپس ۲/۵ میلی‌لیتر از محلول اوانس بلو ۲٪ از ورید فمورال تزریق شد تا ناحیه ایسکمی (قرمز رنگ) از ناحیه سالم (آبی رنگ) متمایز گردد. در نهایت تحت بیهوشی عمیق، قلب حیوان جدا شد. پس از شستشو با آب مقطر و جدا کردن دهلیزها، ریشه عروق و ضمایم اضافی قلب، در داخل فویل آلومینیومی پیچیده و تا روز بعد آنالیز، داخل فریزر قرار گرفت. پس از خارج کردن قلب از دستگاه فریزر با کمک قالب‌های مدرج، اندازه برش‌های ۲ میلی‌متری از بطن چپ (از قاعده به طرف راس) تهیه شد.

ابتدا ظرف محتوی محلول تترازولیوم داخل ظرف بن ماری تحت دمای 37°C درجه سیلیسیوس قرار داده شد. سپس ناحیه ایسکمی به مدت ۲۰-۱۵ دقیقه داخل بن ماری غوطه‌ور گردید. برای رنگ‌آمیزی مناسب و یکنواخت، محلول محتوی بافت قلبی به‌طور متناوب بهم زده شد. تترازولیوم با عبور از دیواره سلولی و واکنش با آنزیم‌های دهیدروژناز درون سلولی در بافت ایسکمی (زنده) سبب می‌شد که این نواحی به رنگ قرمز تیره ایسکمیک متمایل شود. اما نواحی انفارکت به دلیل نکروزه شدن و از دست دادن آنزیم‌های دهیدروژناز درون سلولی نمی‌توانستند با تترازولیوم واکنش نشان دهند و به همین دلیل این نواحی به رنگ زرد متمایل به

تخلیه در گروه ExMI در قبل و بعد از تمرینات ورزشی به ترتیب برابر با 42 ± 6 و 36 ± 4 بود. این نتایج نشان می‌دهد که اگرچه تمرینات ورزشی مانع از کاهش بیشتر درصد کسر تخلیه در پاسخ به انفارکتوس قلبی می‌شود، اما این تمرینات هنوز به طور کامل منجر به بازگشت کسر تخلیه به سطح گروه شم نشده است (نمودار ۱).

همچنین درصد کوتاه‌شدگی میوفیبریل‌های میوکارد در گروه‌های انفارکتوس (ExMI, SedMI) نسبت به گروه شم ظرف مدت‌های ۴ و ۱۴ هفته بعد از انفارکتوس به طور معنی‌داری کاهش پیدا کرد ($P < 0.05$). میزان کوتاه‌شدگی لیف‌های میوکارد در گروه شم در وضعیت قبل و بعد از تمرینات ورزشی به ترتیب برابر با 40 ± 7 ، 36 ± 5 درصد و در گروه SedMI برابر با 20 ± 3 ، 12 ± 3 درصد بود ($P = 0.001$). درصد کوتاه‌شدگی لیف‌های میوکارد در پایان ۱۴ هفته بعد از فعالیت هوازی در گروه تمرینی انفارکتوس شده به طور معنی‌داری نسبت به گروه SedMI بیشتر بود ($P = 0.02$). میزان کسر تخلیه در گروه ExMI در قبل و بعد از تمرینات ورزشی به ترتیب برابر با 22 ± 4 و 18 ± 3 درصد بود. این نتایج نشان می‌دهد که هنوز اختلاف ۱۸٪ بین درصد کوتاه‌شدگی میوفیبریل‌های میوکارد بین گروه شم و گروه ExMI وجود دارد ($P = 0.02$). بنابراین این تغییرات نشان می‌دهند که تمرینات ورزشی به مدت ده هفته پس از انفارکتوس قلبی منجر به بازگشت کامل درصد کوتاه‌شدگی میوفیبریل‌های میوکارد به سطح اولیه (گروه شم) نشده است (نمودار ۲).

از طرفی سطح فعالیت کاسپاز-۳ در چهارده هفته پس از انفارکتوس قلبی بین گروه‌های مورد مطالعه، متفاوت نبود (نمودار ۳). به طور کلی میزان فعالیت کاسپاز-۳ در گروه‌های انفارکتوس شده (ExMI و SedMI) بیشتر از گروه شم بود، اما این اختلاف معنی‌دار نبود ($P = 0.07$). همچنین نتایج آماری نشان داد که اندازه ناحیه انفارکتوس شده گروه SedMI برابر با ۳۳٪ و در گروه ExMI برابر با ۲۰٪ بود. که این نتایج نشان‌دهنده کاهش معنی‌دار اندازه انفارکتوس در پاسخ به فعالیت می‌باشد ($P = 0.001$) (جدول ۲). در بافت قلبی گروه شم باتوجه به عدم انسداد شریان پایین‌رونده قدامی، بافت انفارکتوس شده‌ای مشاهده نشد.

همچنین نمودار کاپلان-مایر نیز نشان داد که مداخله تمرینات ورزشی، نرخ فراوانی بقای حیوان آزمایشگاهی را بعد از ابتلا به انفارکتوس قلبی به طور قابل توجهی افزایش داده است ($P = 0.03$). احتمال زنده ماندن در ۱۴ هفته پس از انفارکتوس قلبی در گروه SedMI به میزان ۸۰٪ بود (۲ موش از ۱۰ موش موجود در این گروه مردند). این در حالی است که این میزان در دو گروه Sham و ExMI به میزان ۱۰۰٪ بود (تمام موش‌های موجود در این گروه در پایان هفته چهاردهم زنده ماندند) (نمودار ۴).

همچنین برون‌ده قلب در چهاردهمین هفته پس از انفارکتوس قلبی در گروه ExMI، اختلاف معنی‌داری با گروه شم نداشت (جدول ۲).

جدول ۱- مشخصات دموگرافیک موش‌های ویستار در گروه‌های مختلف

تعداد	شم	کنترل انفارکتوس شده	تمرینی انفارکتوس شده
۱۰	۱۰	۱۰	۱۰
سن	۸-۶ هفته	۸-۶ هفته	۸-۶ هفته
ضریب قلب	388 ± 45	370 ± 35	364 ± 41
وزن قلب (g)	$1/11 \pm 0/17$	$1/06 \pm 0/14$	$1/28 \pm 0/21$
وزن بدن در هنگام کشتار (g)	337 ± 28	356 ± 41	321 ± 19
نسبت وزن قلب به وزن بدن	$0/03 \pm 0/002$	$0/03 \pm 0/002$	$0/03 \pm 0/001$

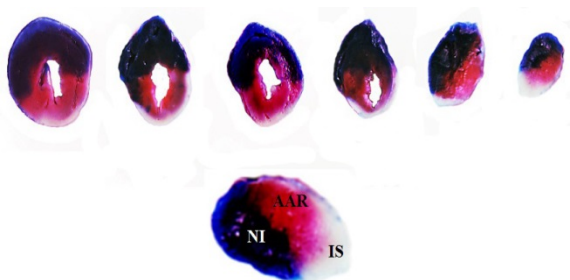
داده‌ها بر حسب Mean \pm SD گزارش شده است

جدول ۲- میانگین شاخص‌های عملکرد بطن چپ ظرف مدت‌های ۴ و ۱۴ هفته بعد از انفارکتوس شدید قلبی موش‌ها

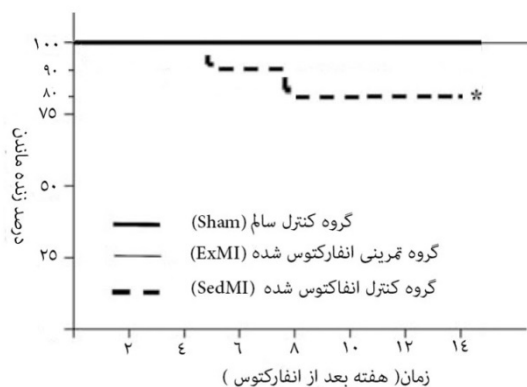
تمرینی انفارکتوس شده	کنترل انفارکتوس شده	شم	
$8/93 \pm 0/61^*$	$9/0 \pm 0/4^*$	$6/83 \pm 0/32$	۴ هفته بعد از انفارکتوس قلبی
$6/95 \pm 0/19^*$	$7/12 \pm 0/67^*$	$4/09 \pm 0/66$	اندازه پایان دیاستولی (میلی‌متر)
$10/08 \pm 0/23^*$	$10/74 \pm 0/18^*$	$7/41 \pm 0/73$	اندازه پایان سیستولی (میلی‌متر)
$8/25 \pm 0/17^*$	$9/35 \pm 0/13^*$	$4/70 \pm 0/49$	اندازه پایان دیاستولی (میلی‌متر)
$442 \pm 49^*$	$447 \pm 54^*$	255 ± 37	حجم پایان دیاستولی (میکرولیتر)
$251 \pm 44^*$	$259 \pm 28^*$	70 ± 16	حجم پایان سیستولی (میکرولیتر)
$564 \pm 48^*$	$650 \pm 68^*$	289 ± 38	حجم پایان دیاستولی (میکرولیتر)
$370 \pm 61^*$	$463 \pm 51^*$	102 ± 22	حجم پایان سیستولی (میکرولیتر)
191 ± 18	188 ± 32	198 ± 26	حجم ضربه‌ای (میکرولیتر)
$194 \pm 41^*$	$178 \pm 24^*$	189 ± 37	حجم ضربه‌ای (میکرولیتر)
72 ± 22	69 ± 16	64 ± 9	برون‌ده قلب (میلی‌لیتر در دقیقه)
$71 \pm 11^*$	$39 \pm 0.9^*$	68 ± 14	برون‌ده قلب (میلی‌لیتر در دقیقه)
۲۰٪	۲۳٪	۰٪	اندازه ناحیه انفارکتوس

*نشانه اختلاف معنی‌دار نسبت به گروه شم، # نشانه اختلاف معنی‌دار نسبت به گروه SedMI، (داده‌ها به صورت Mean \pm SD گزارش شده است)

درصد کسر تخلیه در گروه‌های انفارکتوس (ExMI, SedMI) نسبت به گروه شم در مدت ۴ هفته بعد از انفارکتوس و نیز در پایان ۱۴ هفته بعد از انفارکتوس به طور معنی‌داری کاهش پیدا کرد ($P < 0.05$)، به طوری که نسبت کسر تخلیه در گروه شم در وضعیت قبل و بعد از تمرینات ورزشی به ترتیب برابر با 69 ± 10 و 66 ± 8 درصد و در گروه SedMI به ترتیب برابر با 42 ± 5 و 30 ± 3 درصد بود. اما درصد کسر تخلیه بعد از فعالیت ورزش هوازی در گروه تمرینی انفارکتوس شده به طور معنی‌داری بیشتر از گروه SedMI بود ($P = 0.01$). میزان کسر



شکل ۱- برش‌های ۲ میلی‌متری میوکارد پس از رنگ‌آمیزی با اوانس بلو و تترازیلیوم: نواحی در معرض خطر (AAR، قرمز، ناحیه نکروز (IS، رنگ پریده)، ناحیه سالم (NI، آبی)

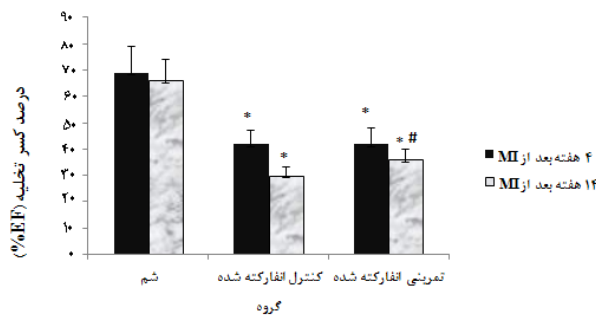


نمودار ۴- درصد زنده ماندن حیوان پس از ۱۴ هفته انفارکتوس شدید قلبی * نشانه اختلاف معنی‌دار بین گروه کنترل انفارکتوس شده با گروه‌های شم و تمرینی انفارکتوس شده

بحث

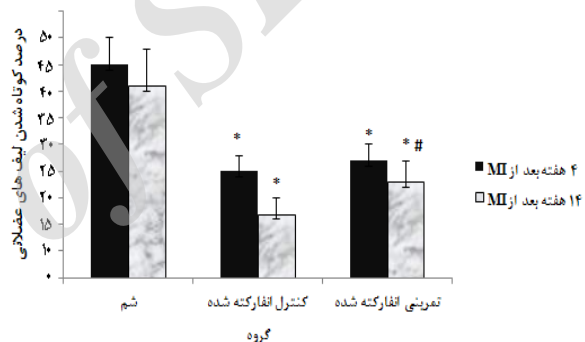
نتایج این مطالعه حاکی از آن بود که تمرینات ورزشی در موش‌های انفارکتوس شده، مانع از کاهش در حجم ضربه‌ای و برون‌ده قلب می‌شود. در گروه SedMI، چهارده هفته پس از انفارکتوس قلبی میزان کسر تخلیه و کوتاه‌شدگی میوفیلامنت‌های به ترتیب ۲۸/۵٪ و ۴۰٪ کاهش یافت. این در حالی است که این مقدار کاهش در دو شاخص عملکرد بطن چپ به مراتب در موش‌های تمرین کرده کمتر بود (به ترتیب ۱۹٪ و ۱۸٪). به نظر می‌رسد که مداخله تمرینات هوازی زیربیشینه، از کاهش بارز عملکرد سیستولیک بطن چپ پس از انفارکتوس قلبی جلوگیری می‌کند.

یافته‌های ما با گزارش‌های کویزومی (۲۰۰۳)، بانسال (۲۰۱۰) و دی وارد (۲۰۰۷) همسویی دارد. آنها در بیماران با انفارکتوس قلبی، بهبود کسر تخلیه بطن چپ و درصد کوتاه شدن لیف‌های عضلانی را در پاسخ به تمرین هوازی نشان دادند (۱۰، ۱۸ و ۲۰). مطالعه دی وارد (۲۰۰۷) نشان داد که در پاسخ به ۸ هفته فعالیت هوازی، میزان



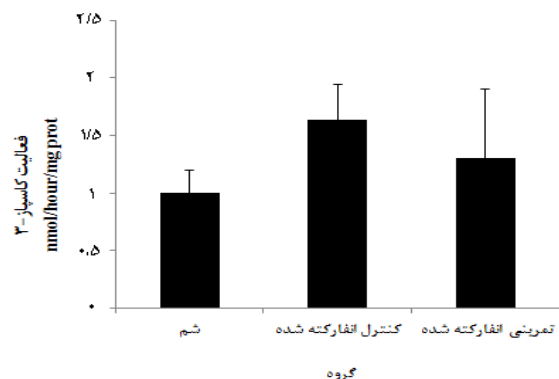
نمودار ۱- تغییرات کسر تخلیه (EF) ظرف ۴ و ۱۴ هفته پس از انفارکتوس قلبی در گروه‌های مختلف. داده‌ها برحسب $Mean \pm SD$ گزارش شده است.

*نشانه اختلاف معنی‌دار نسبت به گروه شم، # نشانه اختلاف معنی‌دار نسبت به گروه SedMI



نمودار ۲- تغییرات کوتاه‌شدگی (FS) میوفیبریل‌های میوکارد ظرف ۴ و ۱۴ هفته پس از انفارکتوس قلبی در گروه‌های مختلف.

*نشانه اختلاف معنی‌دار نسبت به گروه شم، # نشانه اختلاف معنی‌دار نسبت به گروه کنترل انفارکتوس شده، داده‌ها به صورت $Mean \pm SD$ گزارش شده است.



نمودار ۳- تغییرات سطح فعالیت آنزیمی کاسپاز-۳ در حیوانات آزمایشگاهی تحت مطالعه

چروکیده شدن سلول و قطعه قطعه شدن DNA نمودار می‌شود. جزء اصلی آپوپتوز، یک سیستم لیزکننده پروتئینی به نام کاسپازها می‌باشد. کاسپازها در دو دسته جای می‌گیرند. ۱- کاسپازهای آغازگر مانند کاسپاز-۸، ۹ و ۱۲ که عمل اصلی آنها فعال کردن کاسپازهای پایین دست بوده و ۲- کاسپازهایی اجرایی مانند کاسپازهای ۳، ۶ و ۷ که مسئول تخریب پروتئین‌های سلولی می‌باشند. کاسپازها به صورت فرم غیرفعال ساخته می‌شوند، که بعد از دریافت پیام مرگ سلولی به فرم فعال آنزیمی تبدیل می‌شوند. در اینجا باید خاطر نشان کرد که مطالعات مشابهی در زمینه تغییرات کاسپاز-۳ در پاسخ به فعالیت هوازی زیربیشینه پس از انفارکتوس قلبی یافت نشد.

از آنجا که در این مطالعه، اندازه انفارکتوس و میزان کاسپاز-۳ تفاوت معنی‌داری نداشت، لازم به ذکر است که در مراحل اولیه انفارکتوس (کمتر از ۷۲ ساعت و نه در پایان ۱۴ هفته پس از انفارکتوس قلبی) کاسپاز-۳ نقش محوری خود را در مرگ سلولی ایفا می‌کند (۲۹).

البته، سنجش کاسپاز-۳ به تنهایی برای ارزیابی تغییرات اندازه ناحیه آسیب دیده قلب در پاسخ به تمرینات ورزشی کافی نیست و به نظر می‌رسد که نقش سایر پروتئین‌های درگیر در فرآیند آپوپتوز و نکروزه شدن میوسیت قابل توجه باشند. همچنین در زمینه مرگ سلولی، سایر مکانیسم‌ها مانند نکروز و اتوفاجی (Autophagy) نیز دخیل هستند (۳۰) که بررسی سهم هر یک در فرآیند مرگ سلولی ناشی از انفارکتوس قلبی ضروری است.

همچنین نتایج این مطالعه نشان داد که کاهش میزان مرگ و میر موش‌های تمرین کرده در پاسخ به فعالیت هوازی در راستای کاهش غیرمعنی‌دار اندازه ناحیه انفارکتوس قلبی بود. نتایج متناقضی پیرامون تأثیر تمرینات ورزشی بر میزان مرگ و میر موش‌های انفارکتوس شده قلبی گزارش شده است. در این رابطه، نتایج پژوهش حاضر نشان داد که ده هفته تمرینات ورزشی با شدت ۵۵ درصد ظرفیت هوازی میزان مرگ و میر را کاهش می‌دهد. این یافته همسو با نتایج لزی (۳۱) جورج (۱) و مک مولن (۳۲) است. از سویی، یافته‌های گوردون و همکاران (۱۹۹۴) نشان داد که تمرینات استقامتی یک هفته پس از انفارکتوس قلبی، میزان مرگ و میر را افزایش می‌دهد (۳۳).

به‌طور کلی نتایج این مطالعه نشان داد که ۱۰ هفته تمرینات هوازی مداوم دوییدن در چهار هفته پس از انفارکتوس قلبی، مانع از کاهش حجم ضربه‌ای و برون‌ده قلبی شده و میزان کسر تخلیه و درصد کوتاه‌شدگی میوفیبریل‌های میوکارد را افزایش می‌دهد. همچنین اندازه ناحیه انفارکتوس شده را نیز به‌طور غیر معنی‌داری کاهش می‌دهد. این تغییرات منجر به بهبود عملکرد سیستمی بطن چپ پس از انفارکتوس قلبی می‌شود. به‌نظر می‌رسد که نتایج این مطالعه بنیادین می‌تواند

کوتاه‌شدگی لیف‌های عضلانی پس از ابتلا به انفارکتوس قلبی به میزان ۵۰ درصد افزایش یافت (۱۰).

این در حالی است که نتایج این پژوهش با یافته کوبو و همکاران (۲۰۰۴) همسو نبود. کوبو و همکاران نشان دادند که ۱۲ هفته فعالیت ورزشی بر اندازه کسر تخلیه بیماران با انفارکتوس قلبی علیرغم ۳ درصد افزایش (۴۱٪ به ۴۴٪) تأثیر معنی‌داری نداشت (۸). علت این تناقض احتمالاً ناشی از نوع ابزار سنجش تغییرات بطن چپ باشد (در مطالعه کوبو از وسیله Ventriculography Biplanar Left و در مطالعه ما از اکوکاردیوگرافی یک بعدی استفاده شد).

از سوی دیگر، میزان درصد کسر تخلیه و درصد کوتاه‌شدگی لیف‌های عضلانی گروه ExMI به‌طور معنی‌داری بیشتر از گروه SedMI بود. مکانیسم‌های چندگانه‌ای در بهبود عملکرد قلب پس از انفارکتوس متعاقب اجرای تمرینات ورزشی هوازی نقش دارند (۱۰ و ۱۸). در این باره، شواهد علمی نشان داده‌اند که میزان جذب و محتوای Ca^{2+} شبکه سارکوپلاسمی (۲۱)، تبادل Ca^{2+}/Na^{+} (۲۱)، سطح فعالیت ATPase (۲۲)، اندازه SERCA2 (۱) موش‌های انفارکتوس شده کاهش می‌یابد و انفارکتوس قلبی موجب تبدیل ایزوفرم زنجیره سنگین میوزین تند به نوع کند (۲۳) می‌شود. این تغییرات درون سیتوزولی به نارسایی عملکرد انقباض میوسیت بطن چپ، کاهش در حجم ضربه‌ای و برون‌ده قلب می‌انجامد. در حالی که، با مداخله برنامه ورزشی، این تغییرات وارونه می‌شوند (۲۴). بررسی‌ها نشان می‌دهند که تمرینات ورزشی هوازی در موش‌های انفارکتوس شده، میزان جذب و محتوای یونی Ca^{2+} شبکه سارکوپلاسمی، اندازه پروتئین کالمودولین (۲۵)، سطح SERCA2، اندازه تبادل Ca^{2+}/Na^{+} ، سطح فعالیت آنزیمی ATPase، تبدیل ایزوفرم زنجیره سنگین میوزین کند به گونه تند (۲۶)، میزان پروتئین آدرنورسپتور B1 (۱۰) را افزایش داده و میزان فسفولمبان را کاهش می‌دهد (۲۴). مجموعه این تغییرات، عملکرد انقباضی میوسیت را افزایش داده و در نهایت منجر به افزایش کارایی بطن چپ می‌شود (۲۷). از طرفی، شواهد علمی نشان داده‌اند که تمرینات ورزشی در موش‌های انفارکتوس شده، ظرفیت آنتی اکسیدانی (۱۲ و ۱۸) روند متابولیسم اکسیداتیو و پرفیوژن میوکارد (۲۸) را افزایش و فیبروز بطن چپ را کاهش می‌دهد (۳). در نهایت این تغییرات می‌توانند در بهبود عملکرد سیستمی بطن چپ نقش ایفا کنند.

همچنین نتایج این پژوهش نشان داد که اندازه ناحیه آسیب دیده (انفارکتوس) در پاسخ به ده هفته تمرین به میزان ۳٪ کاهش پیدا کرد. همچنین میزان کاسپاز-۳ در گروه‌های تحت بررسی تفاوت معنی‌داری نداشت. آپوپتوز نقش کلیدی را در تعیین اندازه ناحیه انفارکتوس بازی می‌کند. این فرم فعال از مرگ سلولی با تغییرات مورفولوژیک مانند

training in postinfarction patients with left ventricular dysfunction results of the exercise in left ventricular dysfunction (ELVD) trial. *Circulation* 1997;96:1790-7.

16. Condorelli G, Roncarati R, Ross J, Pisani A, Stassi G, Todaro M, et al. Heart-targeted overexpression of caspase3 in mice increases infarct size and depresses cardiac function. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2001;98:9977-82.
17. Golbidi S, Botta A, Gottfred S, Nusrat A, Laher I, Ghosh S. Glutathione administration reduces mitochondrial damage and shifts cell death from necrosis to apoptosis in aging diabetic mice hearts during exercise. *British Journal of Pharmacology* 2014;171:5345-60.
18. Bansal A, Dai Q, Chiao YA, Hakala KW, Zhang JQ, Weintraub ST, et al. Proteomic analysis reveals late exercise effects on cardiac remodeling following myocardial infarction. *Journal of Proteomics* 2010;73:2041-9.
19. Nunes RB, Alves JP, Kessler LP, Lago PD. Aerobic exercise improves the inflammatory profile correlated with cardiac remodeling and function in chronic heart failure rats. *Clinics* 2013;68:876-82.
20. Koizumi T, Miyazaki A, Komiyama N, Sun K, Nakasato T, Masuda Y, et al. Improvement of left ventricular dysfunction during exercise by walking in patients with successful percutaneous coronary intervention for acute myocardial infarction. *Circ J* 2003;67:233-7.
21. Zhang X, Tillotson DL, Moore RL, Zelis R, Cheung JY. Na⁺/Ca²⁺ exchange currents and SR Ca²⁺ contents in postinfarction myocytes. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 1996;271:C1800-C7.
22. Dixon I, Hata T, Dhalla NS. Sarcolemmal Na⁺-K⁺-ATPase activity in congestive heart failure due to myocardial infarction. *Am J Physiol Cell Physiol* 1992;262:C664-C71.
23. Zhang X-Q, Ng Y-C, Musch TI, Moore RL, Zelis R, Cheung JY. Sprint training attenuates myocyte hypertrophy and improves Ca²⁺ homeostasis in postinfarction myocytes. *Journal of Applied Physiology* 1998;84:544-52.
24. Zhang L-Q, Zhang X-Q, Ng Y-C, Rothblum LI, Musch TI, Moore RL, et al. Sprint training normalizes Ca²⁺ transients and SR function in postinfarction rat myocytes. *Journal of Applied Physiology* 2000;89:38-46.
25. Levine SN, Kinasewitz GT. Exercise conditioning increases rat myocardial calcium uptake. *Journal of Applied Physiology* 1986;60:1673-9.
26. Pagani E, Solaro R. Coordination of cardiac myofibrillar and sarcolemmal activities in rats exercised by swimming. *Am J Physiol* 1984;247:H909-15.
27. Moore RL, Musch TI, Yelamarty R, Scaduto R, Semanchick AM, Elensky M, et al. Chronic exercise alters contractility and morphology of isolated rat cardiac myocytes. *Am J Physiol* 1993;264:C1180-9.
28. Chen L, Nohara R, Hirai T, Li X, Kataoka K, Hosokawa R, et al. Effects of exercise training on myocardial fatty acid metabolism in rats with depressed cardiac function induced by transient ischemia. *Jpn Circ J* 2001;65:550-5.
29. Zidar N, Dolenc-Strazar Z, Jeruc J, Stajer D. Immunohistochemical expression of activated caspase-3 in human myocardial infarction. *Virchows Archiv* 2006;448:75-9.
30. Tian XF, Cui MX, Yang SW, Zhou YJ, Hu DY. Cell death, dysglycemia and myocardial infarction (Review). *Biomedical Reports* 2013;1:341-6.
31. Andrews Portes L, Magalhães Saraiva R, Alberta dos Santos A, Tucci PJ. Swimming training attenuates remodeling, contractile dysfunction and congestive heart failure in rats with moderate and large myocardial infarctions. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 2009;36:394-9.

زمینه‌ساز بررسی‌های بعدی برای روشن‌تر شدن موضوع توانبخشی ورزشی در بیماران با انفارکتوس قلبی قرار گیرد.

References

1. Jorge L, Rodrigues B, Rosa KT, Malfitano C, Loureiro TCA, Medeiros A, et al. Cardiac and peripheral adjustments induced by early exercise training intervention were associated with autonomic improvement in infarcted rats: role in functional capacity and mortality. *European Heart Journal* 2011;32:904-12.
2. Hwang H, Reiser PJ, Billman GE. Effects of exercise training on contractile function in myocardial trabeculae after ischemia-reperfusion. *Journal of Applied Physiology* 2005;99:230-6.
3. Xu X, Wan W, Powers AS, Li J, Ji LL, Lao S, et al. Effects of exercise training on cardiac function and myocardial remodeling in post myocardial infarction rats. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 2008;44:114-22.
4. Wisloff U, Loennechen JP, Currie S, Smith GL, Ellingsen Ø. Aerobic exercise reduces cardiomyocyte hypertrophy and increases contractility, Ca²⁺ sensitivity and SERCA-2 in rat after myocardial infarction. *Cardiovascular Research* 2002;54:162-74.
5. Myers J, Wagner D, Schertler T, Beer M, Luchinger R, Klein M, et al. Effects of exercise training on left ventricular volumes and function in patients with nonischemic cardiomyopathy: application of magnetic resonance myocardial tagging. *American Heart Journal* 2002;144:719-25.
6. Boissiere J, Eder V, Mchet M-C, Courteix D, Bonnet P. Moderate exercise training does not worsen left ventricle remodeling and function in untreated severe hypertensive rats. *Journal of Applied Physiology* 2008;104:321-7.
7. Jugdutt BL, Michorowski BL, Kappagoda CT. Exercise training after anterior Q wave myocardial infarction: importance of regional left ventricular function and topography. *Journal of the American College of Cardiology* 1988;12:362-72.
8. Kubo N, Ohmura N, Nakada I, Yasu T, Katsuki Ta, Fujii M, et al. Exercise at ventilatory threshold aggravates left ventricular remodeling in patients with extensive anterior acute myocardial infarction. *American Heart Journal* 2004;147:113-20.
9. Giannuzzi P, Tavazzi L, Temporelli PL, Corrà U, Imparato A, Gattone M, et al. Long-term physical training and left ventricular remodeling after anterior myocardial infarction: Results of the exercise in anterior myocardial infarction (EAMI) trial. *Journal of the American College of Cardiology* 1993;22:1821-9.
10. de Waard MC, van der Velden J, Bito V, Ozdemir S, Biesmans L, Boontje NM, et al. Early exercise training normalizes myofilament function and attenuates left ventricular pump dysfunction in mice with a large myocardial infarction. *Circulation Research* 2007;100:1079-88.
11. Grans CF, Feriani DJ, Absamra MEV, Rocha LY, Carrozi NM, Mostarda C, et al. Resistance training after myocardial infarction in rats: its role on cardiac and autonomic function. *Arq Bras Cardiol* 2014;103:60-8.
12. Xu X, Zhao W, Lao S, Wilson BS, Erikson JM, Zhang JQ. Effects of exercise and L-arginine on ventricular remodeling and oxidative stress. *MedSci Sports Exerc* 2010;42:346-54.
13. Sullivan MJ, Higginbotham MB, Cobb FR. Exercise training in patients with severe left ventricular dysfunction. Hemodynamic and metabolic effects. *Circulation* 1988;78:506-15.
14. Giannuzzi P, Temporelli PL, Corrà U, Tavazzi L. Antiremodeling effect of long-term exercise training in patients with stable chronic heart failure results of the exercise in left ventricular dysfunction and chronic heart failure (ELVD-CHF) trial. *Circulation* 2003;108:554-9.
15. Giannuzzi P, Temporelli PL, Corrà U, Gattone M, Giordano A, Tavazzi L, et al. Attenuation of unfavorable remodeling by exercise

32. McMullen JR, Amirahmadi F, Woodcock EA, Schinke-Braun M, Bouwman RD, Hewitt KA, et al. Protective effects of exercise and phosphoinositide 3-kinase (p110 α) signaling in dilated and hypertrophic cardiomyopathy. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2007;104:612-7.
33. Gaudron P, Hu K, Schamberger R, Budin M, Walter B, Ertl G. Effect of endurance training early or late after coronary artery occlusion on left ventricular remodeling, hemodynamics, and survival in rats with chronic transmural myocardial infarction. *Circulation* 1994;89:402-12.

Archive of SID



Effect of 10 Weeks Aerobic Exercise Training on Left Ventricular Systolic Function, Caspase-3 Level and Infarction Size in Myocardial Infarction Rat

Kamal Ranjbar (M.Sc.)¹, Farzad Nazem (Ph.D.)^{1*}, Afshin Nazari(Ph.D.)², Mohammad Reza Golami(Ph.D.)³

1- Dept. of Sport Physiology, School of Physical Education and Sport Sciences, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran.

2- Dept. of Physiology, Razi Herbal Medicine Research Center, Lorestan University of Medical Sciences, Khoramabad, Iran.

3- Dept. of Anatomy, Lorestan University of Medical Sciences, Khoramabad, Iran.

Received: 12 September 2014, Accepted: 19 October 2014

Abstract:

Introduction: The aim of study was to evaluate the effect of 10 weeks aerobic exercise training on left ventricular systolic function, caspase-3 level and infarction size in myocardial infarction rats.

Methods: Four weeks after the myocardial infarction, 30 male Wistar rats were randomized to the three equally sized groups of Sham-operated control (Sham); Sedentary-MI (SedMI) and Exercise-MI (ExMI). The latest group were subjected to aerobic training in the form of treadmill running (50 min/day, 5 times per week, 17 m/min). Before and after the training program, all subjects went under echocardiography.

Results: Statistical analysis of the data showed that the rate of ejection fraction and the fractional shortening at 4 and 14 weeks after myocardial infarction decreased significantly in SedMI and ExMI compared to the Sham group ($P < 0.05$). But the rate of ejection fraction and fractional shortening at 14 weeks after myocardial infarction in ExMI group was significantly greater than SedMI group ($P < 0.05$). Also, infarction size and mortality rate decreased significantly in response to exercise training but the caspase-3 activity was not different between groups.

Conclusion: 10-weeks aerobic exercise training program, 4 weeks after myocardial infarction, reduced cardiac dysfunctions after myocardial infarction in trained rats. Consequently, these exercise training induced changes resulted in improved left ventricular systolic function and decrease of mortality rate and infarction size after myocardial infarction.

Keywords: Exercise training, Ejection fraction, Fractional shortening, Myocardial infarction.

Conflict of Interest: No

*Corresponding author: F. Nazem, Email: Farzadnazem1@yahoo.com

Citation: Ranjbar K, Nazem F, Nazari A, Golami MR. Effect of 10 weeks aerobic exercise training on left ventricular systolic function, caspase-3 and infarction size in myocardial infarction rat. Journal of Knowledge & Health 2015;10(3):16-24.