

KATP 通道 Kir6.2 亚基 E23K 多态性对阿霉素损伤大鼠心肌细胞结构及自噬的影响

袁文慧 万 军 刘剑芳 王梦龙 叶 晶 徐 瑶 姜慧敏 王 震

摘 要 **目的** 构建携带 KATP 通道 Kir6.2 亚基 E23K 多态性的大鼠模型,给予阿霉素损伤,探讨 KATP 通道 Kir6.2 亚基 E23K 多态性对于阿霉素损伤的心肌,心肌结构、功能及细胞自噬的影响。**方法** 利用定点突变的方法获得含有 Kir6.2 KK 基因型的大鼠并进行基因鉴定。将大鼠随机分为 4 组,即 A 组(WT + Saline 组,SD 大鼠 + 生理盐水)、B 组(E23K + Saline 组,Kir6.2 KK 大鼠 + 生理盐水)、C 组(WT + DOX 组,SD 大鼠 + 阿霉素)、D 组(E23K + DOX 组,Kir6.2 KK 大鼠 + 阿霉素)。采用腹腔注射阿霉素的方法构建阿霉素损伤大鼠模型,对照组腹腔注射等体积的生理盐水。应用心脏彩超进行阿霉素损伤心肌病模型的鉴定及心脏结构和功能的评价(每组 8 只)。分别通过 HE 染色及天狼星红染色心肌组织切片,测量心肌细胞面积及心肌纤维化比例,并通过 PCR 方法检测纤维化相关标志物 CTGF、TGF- β mRNA 的表达。通过 Western blot 法技术测定心肌细胞自噬水平。**结果** 超声结果显示,阿霉素损伤的大鼠相比于盐水组存在明显的心肌重构及功能损伤($P < 0.01$),且 E23K 组变化较 WT 组更明显($P < 0.01$)。病理及纤维化相关标志物 mRNA 表达显示,阿霉素损伤的大鼠心肌纤维化程度明显加重($P < 0.01$),且 E23K 组纤维化程度较 WT 组更严重($P < 0.01$);自噬相关蛋白表达量检测显示,阿霉素损伤的大鼠,自噬相关蛋白表达量显著增加($P < 0.01$),且 E23K 组明显高于 WT 组($P < 0.01$)。**结论** 在阿霉素损伤模型中,Kir6.2 亚基 E23K 多态性对大鼠心脏结构、功能、纤维化程度及自噬表达均有显著影响。

关键词 心肌 E23K 多态性 阿霉素 纤维化 自噬

中图分类号 R3 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2017.06.006

Effect of ATP Sensitive Potassium Channel Kir 6.2 E23K Polymorphism on DOX Myocardial Injury Cardiac Structure and Autophagy in Rats. Yuan Wenhui, Wan Jun, Liu Jianfang, et al. Department of Cardiology, Renmin Hospital of Wuhan University, Hubei 430060, China

Abstract **Objective** To construct a KATP channel Kir6.2 subunit of E23K polymorphism of rat model of DOX injury, and explore the KATP channel Kir6.2 subunit of E23K polymorphism of DOX myocardial injury and cardiac structure, function and influence of Autophagy. **Methods** (1) Using site-directed mutagenesis methods, we got rats containing Kir6.2 KK rat gene identification and genotype. The rats were randomly divided into 4 groups: A: WT + Saline group (SD rat + saline); B: E23K + Saline group (Kir6.2 KK rat + saline); C: WT - DOX group (SD rat + Doxorubicin); D: E23K - DOX group (Kir6.2 KK rat + Doxorubicin). Intraperitoneal injection of DOX in the model for rats spread disease, Intraperitoneal injection of an equal volume of saline control group. (2) Cardiac ultrasound is used to spread disease modeling, identification and evaluation of cardiac structure and function (8 rats in each group). Through HE and Sirius red staining tissue slices, we measured area of myocardial cells and ratio of myocardial fibrosis. And PCR methods for detection of fibrosis index, such as CTGF, TGF- β . Through Western blot technology, we measured levels of Autophagy. **Results** Ultrasound results showed that compared to group DOX rats with heart damage had significant cardiac remodeling and dysfunction ($P < 0.01$), and compared with WT group E23K group, had more obvious changes ($P < 0.01$). Pathology and fibrosis index of PCR results show that myocardial fibrosis was significantly increased in rat DOX injured ($P < 0.01$). Autophagy-related protein expression in testing showed that rats with DOX damage, Autophagy-related protein expression was significantly increased ($P < 0.01$) in E23K group than in the WT group ($P < 0.01$). **Conclusion** In the dilated Cardiomyopathy model which was constructed by DOX, the Kir 6.2 E23K polymorphism has a significant impact on cardiac structure, function, the level of fibrosis, and autophagy.

Key words Cardiology; E23K polymorphism; Doxorubicin; Fibrosis; Autophagy

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81170208)

作者单位:430060 武汉大学人民医院心血管内科

通讯作者:万军,主任医师,电子信箱:wanjun1963@126.com

阿霉素 (doxorubicin, DOX) 是一种蒽环类, 广泛应用于临床的高效、广谱抗肿瘤药物^[1]。然而其对心肌有着特殊的亲和力, 可对心脏产生慢性毒性作用, 其最严重的不良反应是伴有充血性心力衰竭的阿霉素损伤性心肌病, 预后很差, 严重限制了其临床应用, 机制仍不很清楚^[2]。心肌纤维化是多种心血管疾病的共同病理改变, 且自噬与阿霉素对心肌的损伤及功能下降均有一定的关系^[3]。在笔者实验小组的前期研究中, 通过对中国的阿霉素损伤性心肌病人群进行调查, 发现存在 KATP 通道 Kir6.2 E23K 多态性改变的阿霉素损伤性心肌病患者较对照组更容易发生结构及功能的损伤, 心律失常的发生率也更高^[4,5]。

本研究利用定点突变的方法获得含有 Kir6.2 KK 基因型的大鼠, 给予阿霉素干预, 通过对大鼠行心脏彩超检查、心肌纤维化程度的测定、心肌细胞自噬的变化, 探讨 KATP 通道 Kir6.2 亚基 E23K 多态性对于阿霉素损伤的心肌的影响。

材料与方法

1. 实验动物: Kir6.2 E23K 多态性转基因大鼠 (F_0 代) 由赛业 (广州) 生物科技有限公司提供, 10 只 SD 成年大鼠 (5R 雄性 5R 雌性) 由北京华阜康生物科技股份有限公司提供, 于武汉大学心血管病研究所 SPF 级动物房饲养繁殖 (F_1 代)。本实验中大鼠的实验程序均经武汉大学人民医院伦理委员会批准。注射用盐酸多柔比星 (阿霉素) 购自海正辉瑞制药有限公司。0.9% 生理盐水购自广州百特公司。LC3、beclin1 抗体购自美国 Cell Signaling Technology 公司。

2. 动物分组及模型制备: 将 8 ~ 12 周龄的 SD 和转基因大鼠随机分为 4 组: A 组 (WT + Saline 组, SD 大鼠 + 生理盐水)、B 组 (E23K - Saline 组, Kir6.2 KK 大鼠 + 生理盐水)、C 组 (WT - DOX 组, SD 大鼠 + 阿霉素)、D 组 (E23K - DOX 组, Kir6.2 KK 大鼠 + 阿霉素)。利用阿霉素构建阿霉素损伤性心肌病模型: 大鼠经腹腔注射阿霉素 2.5 毫克/(千克·周), 每周 1 次, 生理盐水组于同一时间经腹腔注射等体积的生理盐水, 连续注射 6 周后停药 2 周进行观察^[6,7]。

3. 超声心动图检测: 大鼠腹腔注射完成 2 周后, 用异氟烷进行麻醉, 固定于实验台面。通过心脏彩超仪 (MyLab30CV), 经左心室短轴切面测定 4 组大鼠 (每组 8 只) 左心室舒张末期内径 (LVEDD), 左心室收缩末期内径 (LVESD), 左心室舒张末期容积 (LV-EDV), 左心室收缩末期容积 (LVESV), 左心室射血分数 (EF) 及左心室短轴收缩率 (FS, %)。

4. 心肌组织切片的制备及染色: 超声检查完毕后 24 ~ 48h, 用 10% 水合氯醛 (3.3ml/kg) 经腹腔注射对大鼠进行深度麻醉, 待肢体松软后固定于实验台上。打开胸腔, 暴露心脏, 迅速游离并剪掉大鼠的心脏, 并将其放入 10% KCl 液中清洗掉血液, 在干冰上切取其中心脏组织 (横向切), 部分心肌于 10% 甲醛中固定, 部分心肌迅速置于液氮中冻存备用。经脱水、石蜡包埋后, 分别进行 HE 染色、天狼星红染色, 显微镜下观察并拍片, HE 染色主要观察心腔大小和心室壁厚度, 测定心肌细胞横截面积 (area of myocardial cells)。天狼星红染色主要观察心肌间质纤维化程度。应用 Image-Pro Plus 医学分析软件分析测量。最后用 IPP 6.0 软件进行分析, 计算心肌组织的胶原分数 (collagen volume fraction, CVF), 计算公式: 胶原容积分数 (%) = 胶原面积 / (整个视野的总面积 - 空白面积) × 100%^[8]。

5. RT-PCR 方法观察纤维化相关标志物 mRNA 的表达: 按照 Trizol 试剂说明书提取各组大鼠心肌组织 RNA, 使用 Nanodrop 2000 紫外分光光度计测定 RNA 浓度, 计算 RNA 浓度, 符合要求。将提取的 RNA 反转录为 cDNA, 然后进行实时定量 PCR, 采用在线方法利用 Primer-BLAST 设计引物, 挑选合适的序列后由北京擎科新业生物技术有限公司合成, 测定结缔组织生长因子 (connective tissue growth factor, CTGF) 和转化生长因子- β_1 (transforming growth factor, TGF- β_1) mRNA 的表达量, 选择 GAPDH 作为内参, 使用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法测定指标表达水平。

6. 自噬相关蛋白的检测: 采用 Western blot 法检测, 取大鼠心肌组织, 组织匀浆裂解后, 14000r/min 离心 5min, 4℃, 取上清。提取大鼠心肌总蛋白后采用 BCA 法进行蛋白定量后分装, 置于 -80℃ 保存备用。蛋白样品用 SDS-PAGE 电泳后分离后, 将蛋白转印至 PVDF 膜, 室温下用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 封闭 PVDF 膜 1h, TBST 洗涤 3 次。随后分别加入 LC3-I、LC3-II、Beclin-1 一抗 4℃ 孵育过夜, TBST 洗膜 3 次后, 加入相应的二抗室温孵育 1h, TBST 洗膜 3 次后, 用化学发光法检测蛋白水平, 通过 Bio-Rad 凝胶成像系统成像分析目的蛋白相对灰度值。

7. 统计学方法: 采用 SPSS 18.0 进行统计学分析, 正态分布计量数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 计量资料组间比较采用单因素方差分析, 计数资料采用 χ^2 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 大鼠一般情况: 造模期间, A、B 两组大鼠未见

明显异常, C、D 两组大鼠出现血性腹腔积液及体重增长速度减慢等情况, 造模结束时 C 组和 D 组大鼠平均体重小于 A 组和 B 组 ($P < 0.01$, 图 1)。

2. Kir 6.2 E23K 多态性对大鼠心脏结构及功能的影响: 在盐水组中, A、B 两组之间心脏的结构及功能均无明显差异。与 A、B 组比较, C、D 大鼠的心脏功能明显受损, LVEDD、LVESD、LVEDV、LVESV 明显增大 ($P < 0.01$), LVEF、FS% 明显降低 ($P < 0.01$), 且 D 组与 C 组比较, D 组 LVEDV 明显增大 ($P < 0.01$), LVEF、FS% 明显降低 ($P < 0.01$, 表 1)。

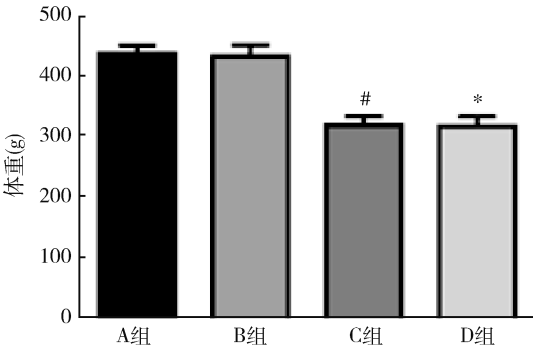


图 1 各组大鼠造模完成时体重
与 A 组比较, [#] $P < 0.01$; 与 B 组比较, ^{*} $P < 0.01$

表 1 各组心脏超声心动图指标的比较

组别	n	LVEDD (mm)	LVESD (mm)	LVEDV (ml)	LVESV (ml)	LVEF	FS (%)
A 组	8	5.82 ± 0.41	2.16 ± 0.50	0.34 ± 0.61	0.03 ± 0.007	90.15 ± 3.75	69.59 ± 5.59
B 组	8	5.81 ± 0.40	2.13 ± 0.36	0.28 ± 0.59	0.02 ± 0.007	91.77 ± 3.15	67.28 ± 5.70
C 组	8	8.78 ± 0.68 [#]	4.11 ± 0.49 [#]	1.29 ± 0.38 [#]	0.34 ± 0.16 [#]	77.50 ± 8.08 [#]	49.13 ± 3.47 [#]
D 组	8	8.92 ± 0.52 ^Δ	5.39 ± 0.50 ^Δ	1.33 ± 0.19 ^{Δ*}	0.39 ± 0.97 ^Δ	68.18 ± 5.27 ^{Δ*}	39.17 ± 5.02 ^{Δ*}

与 A 组比较, [#] $P < 0.05$; 与 C 组比较, ^{*} $P < 0.05$; 与 B 组比较, ^Δ $P < 0.05$

3. Kir 6.2 E23K 多态性对大鼠心肌细胞面积及胶原分数的影响: 在 400 倍光学显微镜下观察发现, HE 染色 (图 2A): 对照组大鼠心肌细胞排列整齐, 胞质染色均匀。WT 组与 E23K 组间细胞横截面积无明显差异 ($208.56 \pm 27.35 \mu\text{m}^2$ vs $246.48 \pm 13.67 \mu\text{m}^2$)。DOX 组大鼠部分区域心肌细胞水肿变形, 纤维横纹不齐或消失, 间隙增宽, 排列紊乱; 细胞横截面积明显

大于盐水组 ($P < 0.01$), 且 E23K 组较 WT 组更明显 ($P < 0.01$, 图 2C)。Masson 染色 (图 2B): 盐水处理的 A、B 两组, 胶原组织分布均匀, 相邻细胞的胶原纤维网完好, 两组间心肌 CVF 比较差异无统计学意义。而阿霉素处理后的 C、D 两组, 相比于 A、B 组, 其 CVF 显著增高 ($P < 0.01$), 且 E23K 组与 WT 组比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$, 图 2D)。

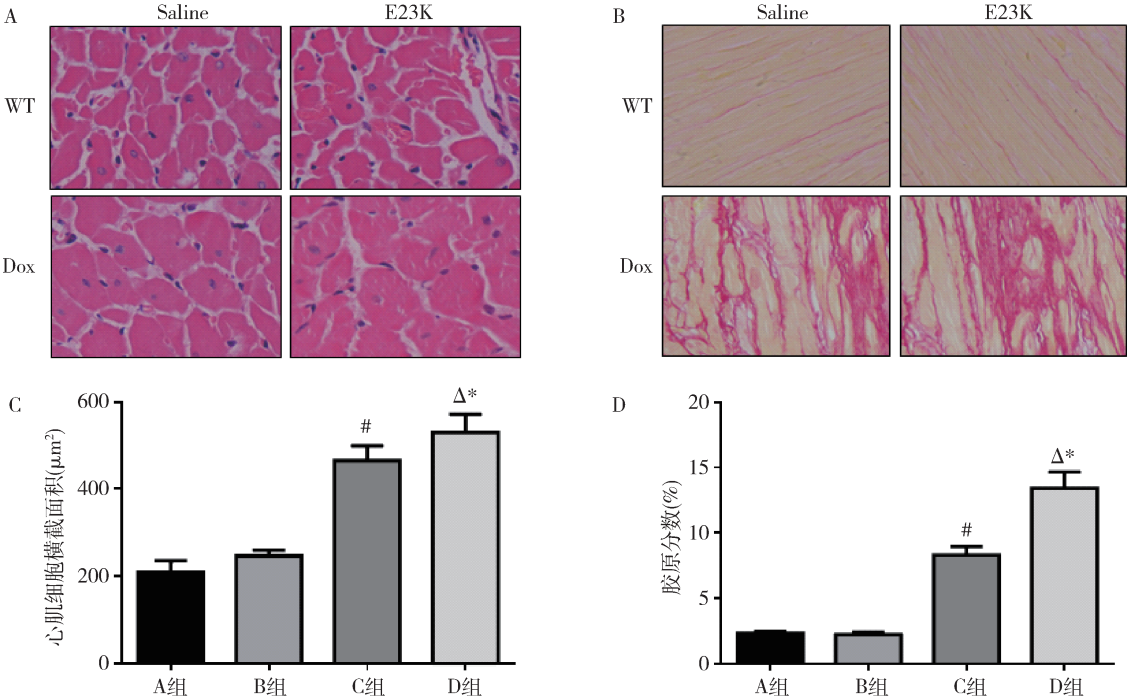


图 2 各组大鼠心肌病理标本中心肌细胞横截面积、胶原分数 (×400)

A. 心肌细胞横截面积; B. 胶原分数; 与 A 组比较, [#] $P < 0.01$; 与 C 组比较, ^{*} $P < 0.01$; 与 B 组比较, ^Δ $P < 0.01$

4. Kir 6.2 E23K 多态性对大鼠心肌细胞纤维化相关蛋白表达量的影响:CTGF 和 TGF-β₁ 是两种重要的促成纤维分裂和胶原沉积的细胞因子,与多种器官的纤维化密切相关。实验结果显示,盐水处理的

A、B 两组间,心肌细胞 CTGF 及 TGF-β₁ 表达量均无明显差异。而阿霉素处理后的 C、D 两组,其心肌细胞 CTGF 及 TGF-β₁ 表达量明显增高($P < 0.01$),且 E23K 组表达量高于 WT 组($P < 0.01$,图 3)。

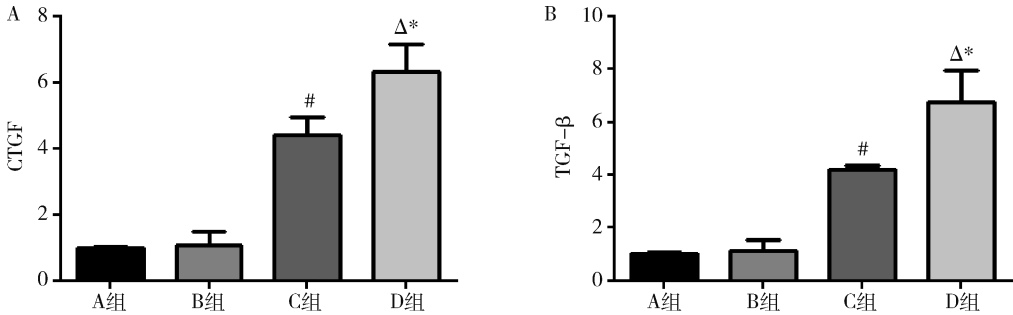


图 3 各组大鼠心脏标本 CTGF、TGF-β mRNA 表达量
A. CTGF mRNA 表达;B. TGF-β mRNA 表达;与 A 组比较,[#] $P < 0.01$;C 组比较,^{*} $P < 0.01$;与 B 组比较,^Δ $P < 0.01$

5. Kir 6.2 E23K 多态性对大鼠心肌细胞自噬的影响:微管相关蛋白 1 轻链 3 (LC3)是主要调控微管蛋白的组装和去组装,参与自噬泡形成,是自噬泡形成的特征性标志^[9]。在细胞自噬发生过程中,LC3 发生转换的程度通常用以反映细胞发生自噬的水平,当 LC3-II 或 LC3-II/LC3-I 比值升高,说明细胞自噬增加^[10]。Beclin-1 是自噬体形成过程中的必需

分子,而且参与自噬体的成熟过程。实验结果显示无论 LC3-II/LC3-I (图 4A) 还是 Beclin-1 (图 4B),在盐水组中,A、B 两组之间均无明显差异。与 A、B 组比较,C、D 组大鼠的心肌细胞的 LC3-II/LC3-I、Beclin-1 的表达量均显著增加($P < 0.01$),且阿霉素处理后,E23K 组自噬相关蛋白表达量明显高于 WT 组($P < 0.01$,图 4)。

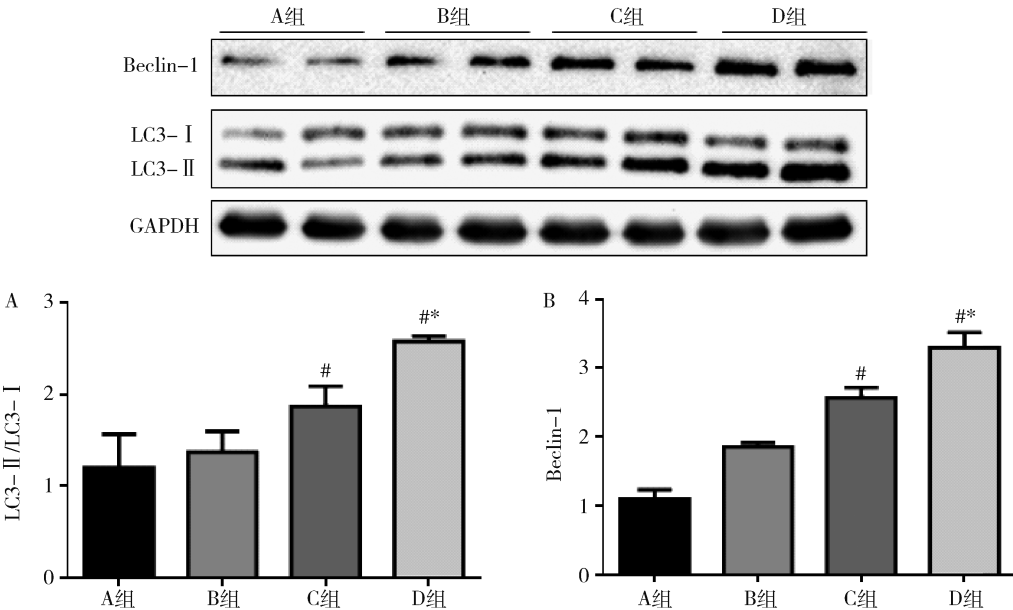


图 4 各组大鼠心脏标本自噬标志蛋白表达量
A. LC3-II/LC3-I 表达;B. Baclin-1 表达;与 A 组比较,[#] $P < 0.01$;与 D 组比较,^{*} $P < 0.01$

讨 论
KATP 是一种微调的分子生物传感器,对维持能量平衡起着重要的作用。Kir 6.2 E23K 多态性对导致了通道的异常变化,这种变化在生理情况下并无明

显的表现,因为在生理状态下,当心肌细胞内 ATP 浓度维持较高水平时,KATP 通道会关闭;而当出现缺血、再灌注损伤、细胞应激和细胞凋亡等病理刺激时,通道则会将激活^[11,12]。而 KATP 通道激活以后,心

肌细胞膜上的离子流,包括 K^+ 、 Ca^{2+} 会发生改变,细胞膜电位的稳定性随之被破坏^[13]。另一方面,线粒体膜电位也发生改变,线粒体功能出现紊乱,由此,细胞的自噬、凋亡、坏死等均可能会被激活。而这一改变,可能与心肌纤维化程度加重有关。心肌纤维化是多种心脏疾病进展过程中的一种病理变化,主要以细胞外胶原过量沉积、胶原容积分数显著升高以及胶原比例失调为特征,可由缺血、缺氧、再灌注损伤等多种因素诱发,最终导致心肌功能下降及代谢、传导障碍。自噬是一种由溶酶体介导的高度保守的细胞机制,通过对细胞内一些生物高分子的降解,从而为细胞重建、再生及修复提供原料,实现了细胞内蛋白质和细胞器再循环^[14]。

本实验通过构建阿霉素损伤心肌病模型,发现 Kir 6.2 E23K 多态性加重阿霉素对心肌的损伤,包括结构重构、功能下降及心肌纤维化程度的加重,此外还发现了自噬水平的增加。有研究表明,在阿霉素损伤心肌病中,心肌细胞自噬与心肌纤维化程度有一定的相关性^[15]。在本研究中,二者呈同向变化,可进一步深入研究以了解二者之间的联系机制。综上所述,在阿霉素损伤所构建的心肌病模型中,Kir 6.2 E23K 多态性加重了心肌结构及功能的损伤,纤维化及自噬程度亦有所加重。

参考文献

- Carvalho C, Santos R X, Cardoso S, *et al.* Doxorubicin: the good, the bad and the ugly effect[J]. *Curr Med Chem*, 2009, 16(25): 3267 - 3285
- Fujisaki G, Inokuchi C, Murashige N. Doxorubicin - induced myocardial injury[J]. *N Engl J Med*, 2004, 351(18): 1908 - 1909
- Shimomura H, Terasaki F, Hayashi T, *et al.* Autophagic degeneration as a possible mechanism of myocardial cell death in dilated car-

diomyopathy[J]. *Jpn Circ J*, 2001, 65(11): 965 - 968

- 席红玲, 万军, 李丽, 等. 扩张型心肌病患者 Kir6.2 基因中 E23K 和 I337V 多态性与室性心律失常的关系[J]. *中国心脏起搏与心电生理杂志*, 2010, 24(6): 500 - 503
- Xi HL, Liu JF, Li L, *et al.* Relationship between dilated cardiomyopathy and the E23K and I337V polymorphisms in the Kir6.2 subunit of the KATP channel[J]. *Genet Mol Res*, 2013, 12(4): 4383 - 4392
- 周岩, 赵丽蓉, 杨思睿. 阿霉素诱导大鼠扩张型心肌病模型的建立[J]. *中国实验诊断学*, 2010, 14(3): 331 - 334
- 秦保锋, 严世芸. 腹腔注射阿霉素诱导实验扩张型心肌病大鼠模型的建立[J]. *中国实验诊断学*, 2012, 16(12): 2185 - 2187
- Ding WY, Liu L, Wang ZH, *et al.* FP - receptor gene silencing ameliorates myocardial fibrosis and protects from diabetic cardiomyopathy[J]. *J Mol Med (Berl)*, 2014, 92(6): 629 - 640
- Martinez J, Malireddi RK, Lu Q, *et al.* Molecular characterization of LC3 - associated phagocytosis reveals distinct roles for Rubicon, NOX2 and autophagy proteins[J]. *Nat Cell Biol*, 2015, 17(7): 893 - 906
- Hermann R, Velez DE, Rusiecki TM, *et al.* Effects of 3 - methyladenine on isolated left atria subjected to simulated ischaemia - reperfusion[J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2015, 42(1): 41 - 51
- Lederer WJ, Nichols CG. Nucleotide modulation of the activity of rat heart ATP - sensitive K^+ channels in isolated membrane patches[J]. *J Physiol*, 1989, 419: 193 - 211
- Samaha FF, Heineman FW, Ince C, *et al.* ATP - sensitive potassium channel is essential to maintain basal coronary vascular tone in vivo[J]. *Am J Physiol*, 1992, 262(5 Pt 1): C1220 - C1227
- Terziev A, Alekseev AE, Yamada S, *et al.* Advances in cardiac ATP - sensitive K^+ channelopathies from molecules to populations[J]. *Circ Arrhythm Electrophysiol*, 2011, 4(4): 577 - 585
- Sandoval H, Thiagarajan P, Dasgupta SK, *et al.* Essential role for Nix in autophagic maturation of erythroid cells[J]. *Nature*, 2008, 454(7201): 232 - 235
- Valentin L, Laurence KM, Townsend PA, *et al.* Urocortin inhibits Beclin1 - mediated autophagic cell death in cardiac myocytes exposed to ischaemia/reperfusion injury[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2006, 40(6): 846 - 852

(收稿日期: 2016 - 12 - 07)

(修回日期: 2016 - 12 - 19)

(接第 32 页)

- Zhu XL, Cai X, Zhang L, *et al.* KRAS and BRAF gene mutations in correlation with clinicopathologic features of colorectal carcinoma in Chinese[J]. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi*, 2012, 41(9): 584 - 589
- Gibbs JB, Sigal IS, Poe M, *et al.* Intrinsic GTPase activity distinguishes normal and oncogenic ras p21 molecules[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1984, 81(18): 5704 - 5708
- 徐新民. 肿瘤相关基因的变异与散发性结直肠癌的相关性研究[D]. 北京: 北京协和医学院/中国医学科学院. 2012: 71 - 86
- de Rooij J, Bos JL. Minimal Ras - binding domain of Raf1 can be used as an activation - specific probe for Ras[J]. *Oncogene*, 1997, 14(5): 623 - 625
- Pylayeva - Gupta Y, Grabocka E, Bar - Sagi D. RAS oncogenes: weaving a tumorigenic web[J]. *Nat Rev Cancer*, 2011, 11(11): 761 - 774
- Buhrman G, Kumar VS, Cirit M, *et al.* Allosteric modulation of Ras - GTP is linked to signal transduction through RAF kinase[J]. *J*

Biol Chem, 2011, 286(5): 3323 - 3331

- Scheffzek K, Ahmadian MR, Kabsch W, *et al.* The Ras - RasGAP complex: structural basis for GTPase activation and its loss in oncogenic Ras mutants[J]. *Science*, 1997, 277(5324): 333 - 338
- Downward J. Control of ras activation[J]. *Cancer Surv*, 1996, 27: 87 - 100
- Stolze B, Reinhart S, Bullinger L, *et al.* Comparative analysis of KRAS codon 12, 13, 18, 61, and 117 mutations using human MCF10A isogenic cell lines[J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 8535
- Mccormick F. K - Ras protein as a drug target[J]. *J Mol Med (Berl)*, 2016, 94(3): 253 - 258
- Gire V, Wynford - Thomas D. RAS oncogene activation induces proliferation in normal human thyroid epithelial cells without loss of differentiation[J]. *Oncogene*, 2000, 19(6): 737 - 744

(收稿日期: 2016 - 12 - 20)

(修回日期: 2016 - 12 - 29)