

· 论 著 ·

异烟肼、利福平联合应用对体外培养成骨细胞生物活性的影响

马永海¹ 巩栋² 王伟¹ 邵陇龙² 甄平^{3*}

1.宁夏医科大学,宁夏 银川 750000

2.甘肃中医药大学,甘肃 兰州 730000

3.解放军兰州军区兰州总医院骨科,甘肃 兰州 730050

中图分类号: R965.2 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2019) 02-0141-06

摘要: **目的** 研究不同浓度的异烟肼(isoniazid,INH)、利福平(rifampin,RFP)联合应用对大鼠成骨细胞(osteoblast,OB)增殖、碱性磷酸酶(alkaline phosphatase,ALP)活性、I型胶原蛋白表达和成骨细胞成熟与矿化能力的影响。**方法** 分离、培养新生SD大鼠乳鼠颅骨OB,分别采用CCK-8法、碱性磷酸酶试剂盒检测ALP活性、免疫荧光染色法和茜素红染色法检测,观察不同浓度INH+RFP[(10+3) μg/mL、(20+6) μg/mL、(30+12) μg/mL、(40+24) μg/mL、(50+48) μg/mL]对成骨细胞增殖、ALP活性、I型胶原蛋白表达以及矿化能力的影响。**结果** 与对照组相比,当INH+RFP的浓度在(20+6) μg/mL及以上时,抑制大鼠OB增殖、I型胶原合成、使ALP活性及矿化能力显著下降($P<0.05$),且均随着浓度增加而加强抑制作用。**结论** INH、RFP联合用药较低浓度对成骨细胞有抑制作用,因此,骨关节结核病灶清除术后,局部用药应该严格控制药物浓度。

关键词: 异烟肼;利福平;成骨细胞;碱性磷酸酶;I型胶原

Effects of different concentrations of Isoniazide and Rifampin on the bioactivity of cultured osteoblasts in vitro

MA Yonghai¹, GONG Dong², WANG Wei¹, SHAO Longlong², ZHEN Ping^{3*}

1. Ningxia Medical University, Yinchuan 750000

2. Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000

3. Department of Orthopedics, Lanzhou General Hospital of Lanzhou Military Region of PLA, Lanzhou 730050, China

* Corresponding author: Zhen P, Email: zhenpingok@163.com

Abstract: **Objective** To investigate the effect of different concentrations of isoniazid (INH) and rifampicin (RFP) on cell proliferation, alkaline phosphatase (ALP) activity, expression of type I collagen and mineralization of osteoblasts derived from newly born SD rat in vitro. **Methods** Osteoblasts derived from newly born (<24 h) SD rats' calvarias were cultured with INH and rifampicin at different concentrations of 10+3 μg/mL, 20+6 μg/mL, 30+12 μg/mL, 40+24 μg/mL, 50+48 μg/mL for some days, then evaluated for cell proliferation, ALP activity, expression of type I collagen and mineralization using CCK-8, ALP activity assay, immunofluorescence staining and alizarin red staining assay. **Results** When the concentration of INH and RFP reached 20+6 μg/mL and above, CCK-8 values, ALP activity, type I collagen synthesis and mineralization of OB were significantly decreased compared with those of the control group ($P<0.05$). With the increase in the concentration of INH and RFP, the inhibition increased gradually. **Conclusion** Our study shows that INH and RFP at lower concentration could inhibit osteoblasts. After the removal of bone and joint tuberculosis, it is necessary to strictly control the concentration of INH and RFP.

Key words: Isoniazid; Rifampin; osteoblasts; alkaline phosphatase; type I collagen

在过去 20 年中,特别是发展中国家,随着多药耐药结核菌株的出现及艾滋病患者的增加,骨关节

结核发病率呈上升趋势。骨结核病灶手术清除后给予抗结核治疗是治疗骨结核的基本方法。目前病灶清除术后通过口服或局部用药方式抗结核。由于病灶区慢性炎症导致纤维结缔组织形成,局部血运差,口服用药难以在病灶区内达到有效的杀菌浓度,当

基金项目: 国家自然科学基金(81371983)

* 通信作者: 甄平,Email: zhenpingok@163.com

机体免疫功能下降时容易导致结核复发,同时抗结核药物治疗的周期长,毒副作用较为明显,患者很难坚持每天服药^[1,2]。近十年来,许多研究人员和临床医师尝试局部用药,提高抗痨疗效^[1,3]。但是清创术后采用缓释体治疗骨结核是否影响骨愈合,以及将缓释的浓度控制在什么范围,既能达到有效杀菌浓度又不影响病灶骨愈合等问题,值得探讨和研究。异烟肼(isoniazid, INH)和利福平(rifampin, RFP)均有较强抗菌作用,且两药联用有协同作用。本研究将针对不同浓度抗结核药物 INH 和 RFP 联合应用对大鼠成骨细胞(osteoblasts, OB)的增殖、碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)活性、I 型胶原蛋白表达和 OB 成熟与矿化能力的影响进行探讨。

1 材料与方法

1.1 实验动物

新生(出生 24 h 内)清洁级 SD 乳鼠 5 只,雌雄不限,由兰州军区总医院动物中心提供。

1.2 实验试剂

异烟肼原药(Sigma 公司,纯度>99%);利福平原药(Sigma 公司,纯度>99%);胎牛血清(兰州荣晔生物公司); α -MEM 培养基(Gibco 公司);胰蛋白酶(Sigma 公司);II 型胶原酶(Sigma 公司);免疫荧光二抗羊抗兔(KPL)、一抗兔抗鼠(Abcam 公司);4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)(北京索莱宝);牛血清蛋白、磷酸盐缓冲液、CellCountingKit-8(日本同仁)、TritonX-100(上海碧云天公司)、PBS(上海碧云天公司);碱性磷酸酶活性测试盒(南京建成公司)。

1.3 方法

1.3.1 成骨细胞分离培养:取 5 只新生 SD 大鼠处死后浸泡于 75% 的乙醇中 15 min,在无菌条件下取其颅骨并去除结缔组织,PBS 漂洗 3 次。将颅骨剪成约 1 mm $\times$ 1 mm 大小的碎片,转移至培养瓶中,加入 0.25% 胰蛋白酶 2~3 mL,37 $^{\circ}$ C 预消化 10 min,弃消化液后重复 1 次。换 0.1% II 型胶原酶消化 10 min,弃上清;再用 0.1% II 型胶原酶消化 3 次,37 $^{\circ}$ C 每次消化 20 min,收集并合并消化液,200 目细胞筛过滤 3 次,滤液 1 000 r/min,离心 5 min,弃上清,加入含 10% 胎牛血清的 α -MEM 培养液悬浮,吹打均匀并计数,调整细胞浓度至 3 $\times$ 10⁴ 个细胞/mL,在饱和湿度、5% CO₂、37 $^{\circ}$ C 的条件下培养,每隔 3 d 换液 1 次,镜下观察当细胞铺满皿底 80% 后,用胰蛋白酶消化传代。

1.3.2 药物处理:成骨细胞采用含 10% 胎牛血清

(FBS)的 α -MEM 培养液培养,37 $^{\circ}$ C、5% CO₂。实验开始 24 h 前将细胞用 PBS 洗涤后换用无血清 α -MEM 培养基饥饿处理。分为对照组和实验组,实验组分别加入不同浓度的 INH+RFP [(10+3) μ g/mL、(20+6) μ g/mL、(30+12) μ g/mL、(40+24) μ g/mL、(50+48) μ g/mL]。INH 和 RFP 用二甲基甲酰胺(EDMF)溶解后,用培养液稀释成所需浓度。(1)不同浓度 INH、RFP 对成骨细胞细胞增殖的影响。取第 3 代成骨细胞,用含 0.02% 四乙酸乙二胺(EDTA)的 0.25% 胰酶消化,制成 DMEM 细胞悬液,以 5 $\times$ 10⁴/孔接种于 48 孔板中。48 孔板随机设对照组和实验组,每组设 5 个重复孔,培养 24 h 后待细胞贴壁后去除培养液,对照组加入不含药物的含 20% 胎牛血清的 H-DMEM 培养液 1 000 μ L,实验组分别加入不同浓度 INH+RFP 的含 20% 胎牛血清的 H-DMEM 培养液 1 000 μ L 置于 5% CO₂ 的培养箱中,分别培养 24 h 后取出 48 孔板,每孔加入 CCK-8 10 μ L 继续培养,培养 0.5 h 后分别用酶标仪在 450 nm 波长下测定吸光度,然后选取吸光度比较适宜的时间点作为后续试验时间点。(2)不同浓度 INH+RFP 对成骨细胞 ALP 活性的影响。将 P1 代细胞以 5 $\times$ 10⁴/孔接种于 48 孔板中,共 2 板,48 孔板随机设对照组和实验组。对照组加入不含药物的含 20% 胎牛血清的 H-DMEM 培养液 1 000 μ L,实验组分别加入不同浓度 INH+RFP 的含 20% 胎牛血清的 H-DMEM 培养液 1 000 μ L,置于 5% CO₂ 培养箱中,每组设 5 个重复孔,培养 3 d 和 6 d 后检测细胞内 ALP 活性,采用 ALP 活性测定试剂盒检测。实验步骤如下:弃培养液,PBS 漂洗 3 次,每孔加入缓冲液和基质液各 0.25 mL,混匀,37 $^{\circ}$ C 水浴 15 min 后,加入 0.75 mL 显色液,在 520 nm 波长下测定酚标准及样本的吸光值。(3)不同浓度 INH、RFP 对成骨细胞 I 型胶原的表达。将 P1 代细胞以 1 $\times$ 10⁵ 进行爬片培养,12 h 后随机设对照组和实验组。对照组加入不含药物的含 20% 胎牛血清的 H-DMEM 培养液 1 000 μ L,实验组分别加入不同浓度 INH+RFP 的含 20% 胎牛血清的 H-DMEM 培养液 1 000 μ L,置于 5% CO₂ 培养箱中,24 h 后取出爬片并用 PBS 漂洗 2 次,4% 的多聚甲醛固定 10 min,PBS 漂洗 3 次后用 0.5% Triton-X100 透膜 20 min。PBS 漂洗 3 次后滴加免疫荧光封闭液室温封闭 1 h,勿洗,滴加 I 型胶原抗体(1:500)并 4 $^{\circ}$ C 过夜,次日 PBS 漂洗 3 次,每次 3 min,之后滴加免疫荧光二抗(1:1000),37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h,PBS 漂洗 3 次,每次 3 min,抗荧光封片液封

片,荧光显微镜观察不同组间细胞中 I 型胶原表达的情况。Image-Pro Plus 6.0 软件扫描测定灰度值。
(4) 茜素红钙化结节染色。将传代后的细胞接种在 35 mm 培养皿中,将培养皿随机设对照组和实验组,对照组加入不含药物的含 20% 胎牛血清的 H-DMEM 培养液 1 000 μ L,实验组分别加入不同浓度 INH+RFP 的含 20% 胎牛血清的 H-DMEM 培养液 1 000 μ L,置于 5% CO₂ 培养箱中培养 14 d,对其进行染色。具体方法如下:弃培养液,PBS 漂洗 2 遍,加入 4% 多聚甲醛溶液固定 10 min,弃固定液,加入 pH 值为 8.9、0.1% 的茜素红染色液,37 $^{\circ}$ C 水浴 45 min,蒸馏水清洗,换固定液照相记录结果。同时采用 Image-Pro Plus 6.0 软件扫描钙化结节的面积、数量和灰度,并进行统计学分析。

1.4 统计学处理

采用统计软件 SPSS 22.0 对数据进行分析,实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 的形式表示,两组之间比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同浓度 INH+RFP 对成骨细胞细胞增殖的影响

如图 1 所示,INH、RFP 联合作用于大鼠成骨细胞 24 h 后,(10+3) μ g/mL 组与对照组差异无统计学意义($P > 0.05$),其他实验组细胞活性显著低于对

照组($P < 0.05$)。结果表明,INH、RFP 联合浓度为 (20+6) μ g/mL 即可抑制成骨细胞增殖,抑制作用随着浓度的增加而增强。

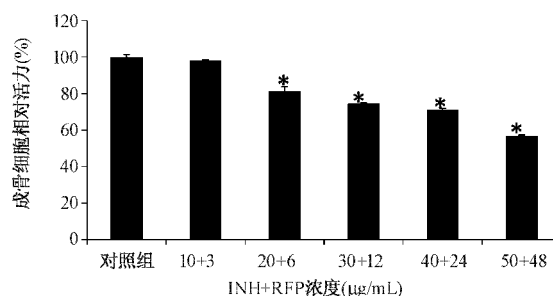


图 1 各组大鼠成骨细胞 CCK8 定量结果 (与对照组比较, * $P < 0.05$)

Fig.1 CCK8 quantitative results of rat osteoblasts in each group (compared with the control group, * $P < 0.05$)

2.2 不同浓度 INH、RFP 对成骨细胞 ALP 活性的影响

INH、RFP 联合作用于成骨细胞 3 d、6 d 后检测细胞的 ALP 活性,如图 2 所示。3 d 和 6 d (10+3) μ g/mL 组的 ALP 活性与对照组差异无统计学意义($P < 0.05$),其余各实验组都显著低于对照组($P < 0.05$)。实验结果表明,INH、RFP 联合浓度为 (20+6) μ g/mL 即可降低 ALP 活性,且随着浓度增加 ALP 活性会降低更多。

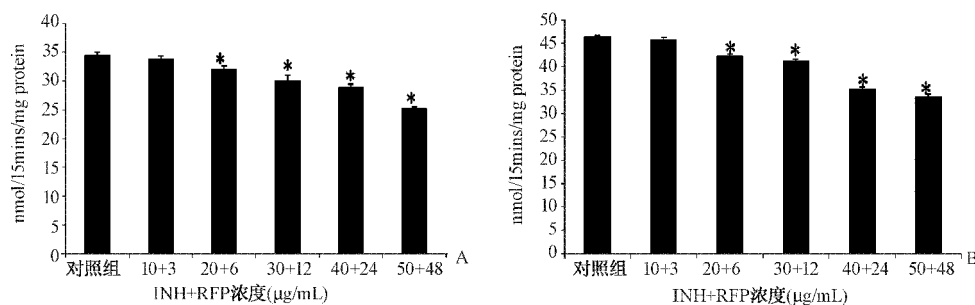


图 2 A: 药物处理 3 d 时的 ALP 活性定量结果; B: 药物处理 6 d 时的 ALP 活性定量结果

Fig.2 A: ALP activity quantitative results at 3 days of drug treatment; B: ALP activity quantitative results at 6 days of drug treatment

注:与对照组比较, * $P < 0.05$ 。

2.3 不同浓度 INH、RFP 对成骨细胞 I 型胶原表达的影响

如图 3 所示,细胞浆中红色荧光随着药物浓度的增加,荧光越来越弱。(10+3) μ g/mL 组与对照组差异无统计学意义($P > 0.05$),其他实验组成骨细

胞 I 型胶原相对表达量显著低于对照组($P < 0.05$)。结果表明,INH、RFP 联合浓度为 (20+6) μ g/mL 即可抑制成骨细胞增殖,抑制作用随着浓度的增加而增强。

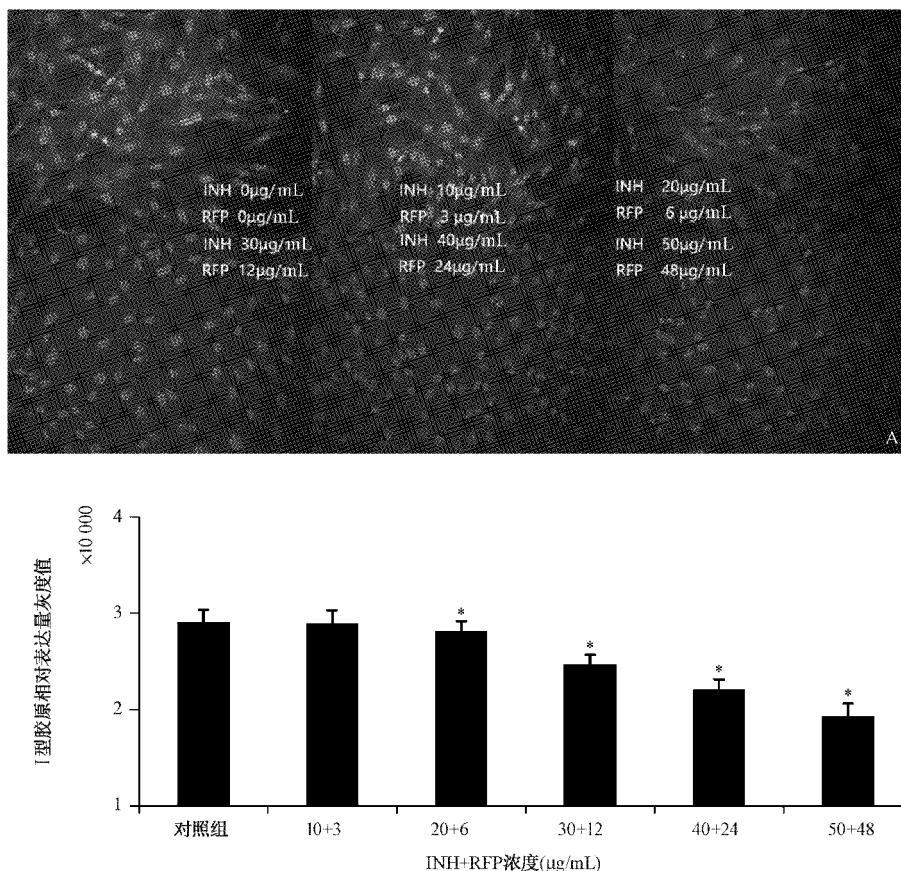


图3 不同浓度 INH+RFP 对成骨细胞 I 型胶原表达结果。A:显微镜下观(100×);B:定量结果
Fig.3 Effect of different concentrations of INH+RFP on the expression of type I collagen of osteoblast. A: Microscopes (100×), B: Quantitative results

注:与对照组比较, * $P < 0.05$ 。

2.4 茜素红钙化结节染色

如图4及表1所示,随着药物浓度的增加,钙化结节的面积、数量和灰度越来越小。(10+3) μg/mL 组与对照组差异无统计学意义($P > 0.05$),其他实验

组钙化结节的面积、数量和灰度显著低于对照组($P < 0.05$)。结果表明,INH、RFP 联合浓度为(20+6) μg/mL 即可抑制成骨细胞增殖,抑制作用随着浓度的增加而增强。

表1 不同浓度 INH+RFP 对成骨细胞钙化结节形成能力的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 1 Effects of different concentrations of INH+RFP on the formation of calcified nodules in osteoblasts ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	钙化结节总面积/(mm ² /孔)	钙化结节数量/(个/孔)	灰度值/IOD
对照组	27.809±3.629	742.330±28.431	29153.165±1704.616
(10+3) μg/mL	26.263±2.855	739.330±41.501	29269.169±2294.460
(20+6) μg/mL	12.315±2.220 *	249.000±24.556 *	1225.223±110.699 *
(30+12) μg/mL	5.269±0.282 *	159.000±16.643 *	560.540±35.900 *
(40+24) μg/mL	1.828±0.282 *	107.000±12.530 *	197.019±8.770 *
(50+48) μg/mL	0.339±0.032 *	32.670±5.033 *	35.804±2.725 *

注:与对照组比较, * $P < 0.05$ 。

3 讨论

骨关节结核是一种古老的疾病,在埃及木乃伊^[4]和亚洲铁器时代的遗骸^[5]中通过组织学和聚合酶链反应^[6]发现骨关节结核的证据。骨关节结

核是一种严重的传染病。由于结核菌在局部病灶内繁殖可造成骨质明显的破坏并产生大量的坏死组织,未及时治疗或治疗不规范,随着病情的进展常引起骨与关节结构和功能严重受损。骨关节结核治疗日的是清除结核病灶并阻止病灶扩散,预防因骨质

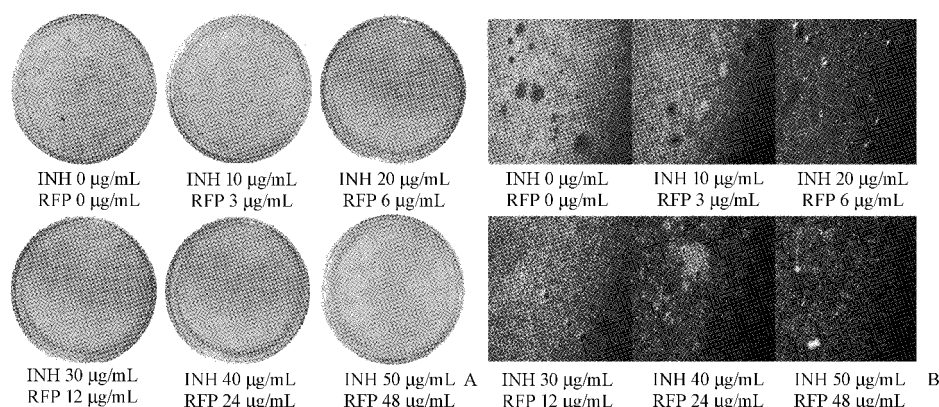


图 4 A:14 d 时成骨细胞钙化结节染色结果;B:显微镜下观(40×)

Fig.4 A: Colonization results of calcified nodules in osteoblast at 14 days; B: Microscopes (40×)

破坏而出现的畸形及神经功能障碍,提高患者的生活质量。由于局部结核病灶区周围因长期慢性炎症刺激而产生大量纤维结缔组织,血液循环较差,全身用药的情况下,局部病灶很难达到有效的抗菌浓度^[7]。随着对疾病研究的不断深入及内固定材料的迅速发展,对局部病灶已有大量坏死组织及死骨形成的较严重患者,普遍认可应尽早行病灶清除+植骨重建内固定术^[8-9]。即使进行较为彻底的病灶清除术,结核分枝杆菌也难以完全去除,故术后仍要联合、长程、大剂量的口服抗痨药,容易出现各种不良反应,因需坚持每天服药,病人依从性差。

近十年来,许多研究人员和临床医师尝试局部用药,以减轻全身用药的不良发应、提高骨关节结核的治愈率。但是目前临床上局部用药的方式较为简单,即病灶清除术后将抗结核药物直接喷洒于残腔中或喷洒于植骨表面再植入残腔。因病灶清除术后,局部组织有大量的渗液,喷洒在病灶的抗痨药物很快被渗液和积血所稀释,并随渗液引流出体外,药物在局部病灶维持时间短,治疗效果有限。为了提高局部抗痨疗效,研究人员们开始关注结核药物缓释制剂的研究。马学铭等^[10]将利福平载药微球与硫酸钙/ β -磷酸三钙复合骨水泥结合制备成一种新型的复合抗结核支架材料,植入 SD 大鼠的肌袋模型中观察不同时间点的局部药物浓度以及血药浓度,缓释效果令人满意,在术后第 28 天局部药物浓度仍可达到杀菌浓度。Li 等^[11]采用 3D 打印技术制作圆柱型载药(异烟肼+利福平)复合支架,将其植入新西兰兔股骨缺损模型,观察其体内释药性能和成骨能力,异烟肼和利福平在体内局部释放可持续 12 周。骨愈合的关键在于成骨细胞连续不断的增殖、分化和破骨细胞的骨吸收及胞外基质的合成、

钙化。维持较高浓度的局部用药可以提高抗痨疗效,但是局部高浓度的药物是否会影响骨愈合,是值得研究和探讨的。INH 和 RFP 作为一线抗结核药物,抗菌作用强,0.025~0.05 μg/mL 的 INH 即可抑菌,10 μg/mL 有杀菌作用,而 RFP 对结核杆菌的最低抑菌浓度为 0.005~0.5 μg/mL,最低杀菌浓度为 5 μg/mL。刘江涛等^[12]用异烟肼对体外大鼠成骨细胞的毒性作用进行研究,发现异烟肼浓度在 60 μg/mL 即可抑制大鼠 OB 增殖,40 μg/mL 时 ALP 活性明显下降,20 μg/mL 时 I 型胶原合成明显减小。Isefuku 等^[13]用利福平对体外培养的人成骨细胞的毒性作用进行了研究,发现利福平浓度在 10 μg/mL 以上时显著抑制了 OB 的生长增殖。

本研究发现,与对照组相比,INH 联合 RFP 在 (20+6) μg/mL 时抑制大鼠 OB 增殖及 I 型胶原合成,使 ALP 活性及矿化能力显著下降。因此,骨关节结核病灶清除术后,局部应用 INH+RFP 缓释制剂的释放浓度应该控制在 (10+3)~(20+6) μg/mL。当 INH 浓度达到 10~20 μg/mL, RFP 浓度达到 3~6 μg/mL,两药联合应用即可协同杀灭结核菌而不影响成骨细胞活性,对细胞无毒性作用,不影响骨愈合。当 INH+RFP 浓度达到 (20+6) μg/mL 及以上时,虽然也可以杀灭结核菌,但是对成骨细胞具有抑制作用,影响骨愈合。本研究应用的药物浓度与体内持续局部抗结核治疗有一定的可比性,因为病灶清除术后局部持续灌注、注射和缓释制剂的应用,可以维持局部药物浓度在一个相对稳定的范围内。局部药物浓度过高,不利于病灶清除术后骨的愈合。体外实验为进一步体内实验提供理论基础,应进一步研究异烟肼联合利福平局部用药是否对体内的骨修复过程有害。

(下转第 151 页)

- 1 α ,25-dihydroxy vitamin D3 signaling in musculoskeletal cells [J]. *Steroids*, 2012, 77(10):892-896.
- [20] Mehmood ZTNH, Papandreou D. An updated mini review of Vitamin D and obesity: Adipogenesis and inflammation state[J]. *Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences*, 2016, 4(3):526-532.
- [21] Saneei P, Sal ehi-Abargouei A, Esmaili zadeh A. Serum 25-hydroxy vitamin D levels in relation to body mass index: a systematic review and meta-analysis [J]. *Obes Rev*, 2013, 14(5):393-404.
- [22] Han B, Li Q, Wang N, et al. Sexual dimorphism for the association between Vitamin D and insulin resistance in Chinese people[J]. *Int J Endocrinol*, 2018, 2018:1216370.
- [23] Wen J, Hong Q, Wang X, et al. The effect of maternal vitamin D deficiency during pregnancy on body fat and adipogenesis in rat offspring[J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1):365.
- (收稿日期: 2018-05-03;修回日期: 2018-06-03)

(上接第 145 页)

【参 考 文 献】

- [1] Jalil R, Nixon JR. Biodegradable poly(lactic acid) and poly(lactide-co-glycolide) microcapsules: problems associated with preparative techniques and release properties [J]. *Journal of Microencapsulation*, 1990, 7(3):297-325.
- [2] Trecarichi EM, Di ME, Mazzotta V, et al. Tuberculous spondylodiscitis: epidemiology, clinical features, treatment, and outcome[J]. *European Review for Medical & Pharmacological Sciences*, 2012, 16(Suppl 2):58-72.
- [3] Li L, Zhang Z, Luo F, et al. Management of drug-resistant spinal tuberculosis with a combination of surgery and individualised chemotherapy: a retrospective analysis of thirty-five patients[J]. *International Orthopaedics*, 2012, 36(2):277-283.
- [4] Chastel C. When the Egyptian mummies are speaking about the infections that have made them ill[J]. *Histoire Des Sciences Médicales*, 2004, 38(2):147-155.
- [5] Tayles N, Buckley HR. Leprosy and tuberculosis in Iron Age Southeast Asia? [J]. *American Journal of Physical Anthropology*, 2004, 125(3):239-256.
- [6] Zink AR, Grabner W, Nerlich AG. Molecular identification of human tuberculosis in recent and historic bone tissue samples: The role of molecular techniques for the study of historic tuberculosis [J]. *American Journal of Physical Anthropology*, 2005, 126(1):32-47.
- [7] Saifullah B, Hussein MZB, Ali SHHA. Controlled-release approaches towards the chemotherapy of tuberculosis [J]. *International Journal of Nanomedicine*, 2012, 7:5451-5463.
- [8] Kumar MN, Joseph B, Manur R. Isolated posterior instrumentation for selected cases of thoraco-lumbar spinal tuberculosis without anterior instrumentation and without anterior or posterior bone grafting[J]. *European Spine Journal*, 2013, 22(3):624-632.
- [9] Wang Z, Yuan H, Geng G, et al. Posterior mono-segmental fixation, combined with anterior debridement and strut graft, for treatment of the mono-segmental lumbar spine tuberculosis [J]. *International Orthopaedics*, 2012, 36(2):325-329.
- [10] 马学铭, 林振, 张嘉伟, 等. 新型利福平缓释植入支架材料的制备及体内缓释分析[J]. *南方医科大学学报*, 2016, 36(3):309-315.
- [11] Li K, Zhu M, Xu P, et al. Three-dimensionally plotted MBG/PHBHHx composite scaffold for antitubercular drug delivery and tissue regeneration[J]. *Journal of Materials Science Materials in Medicine*, 2015, 26(2):1-8.
- [12] 刘江涛, 王永清, 张卫国, 等. 异烟肼对大鼠成骨细胞影响的观察[J]. *中国脊柱脊髓杂志*, 2006, 16(12):924-926.
- [13] Isefuku S, Joyner CJ, Simpson AH. Toxic effect of rifampicin on human osteoblast-like cells[J]. *Journal of Orthopaedic Research*, 2001, 19(5):950-954.
- (收稿日期: 2018-02-06;修回日期: 2018-06-10)