

• 论 著 • DOI:10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2022. 06. 002

sST2 与 CD4⁺T 细胞在心力衰竭和肾衰竭中的相关性研究*

徐 勇,吕宏祥[△]

南京医科大学附属江宁医院检验科,江苏南京 211100

摘 要:**目的** 探讨可溶性生长刺激表达基因 2 蛋白(sST2)与 CD4⁺T 细胞在器官衰竭患者疾病发展进程中的作用。**方法** 选取 2020 年 9 月至 2021 年 3 月在该院住院治疗的 60 例心力衰竭患者作为心衰组,40 例肾衰竭患者作为肾衰组,另选取同期该院 30 例健康体检者作为对照组。采用免疫荧光干式定量法检测所有研究对象血清 sST2 表达水平,并对心衰组和肾衰组与对照组进行比较;采用流式细胞术检测 CD4⁺T 细胞数量;采用酶联免疫吸附试验检测外周血炎症因子白细胞介素(IL)-1 和 IL-6 表达水平;分析血清 sST2 表达水平与 CD4⁺T 细胞在器官衰竭患者疾病发展进程中的相关性。**结果** 心衰组和肾衰组患者外周血血清 sST2 表达水平高于对照组,CD4⁺T 细胞比例及数量均明显低于对照组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。器官衰竭患者外周血血清 sST2 表达水平与 CD4⁺T 细胞数量呈负相关($r=-0.596, P<0.05$)。**结论** sST2 表达水平与 CD4⁺T 细胞数量呈负相关,可能提示器官发生衰竭。

关键词:可溶性生长刺激表达基因 2 蛋白; CD4⁺T 细胞; 器官衰竭
中图法分类号:R541.6;R692.5 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-9455(2022)06-0726-05

Correlation between sST2 and CD4⁺T cell in heart failure and renal failure*

XU Yong,LYU Hongxiang[△]

Department of Clinical Laboratory, Jiangning Hospital Affiliated to Nanjing Medical University, Nanjing, Jiangsu 211100, China

Abstract:**Objective** To investigate the role of soluble growth-stimulating gene 2 protein (sST2) and CD4⁺T cell in the development of disease in patients with organ failure. **Methods** A total of 60 patients with heart failure who were hospitalized in the hospital from September 2020 to March 2021 were selected as heart failure group, 40 patients with renal failure were selected as the renal failure group, and 30 healthy subjects underwent physical examination in the hospital during the same period were selected as the control group. The expression levels of serum sST2 in all subjects were detected by immunofluorescence dry quantitative method, and the heart failure group, renal failure group were compared with the control group. The number of CD4⁺T cells was detected by flow cytometry. The expression levels of inflammatory factors interleukin (IL)-1 and IL-6 in peripheral blood were detected by enzyme-linked immunosorbent assay. The correlation between the expression levels of serum sST2 and CD4⁺T cell in the development of patients with organ failure was analyzed. **Results** The expression level of peripheral blood sST2 in the heart failure group and renal failure group was higher than that in the control group, the proportion and number of CD4⁺T cell were significantly lower than those in the control group, and the differences were statistically significant ($P<0.05$). The expression level of peripheral blood sST2 in patients with organ failure was negatively correlated with the number of CD4⁺T cell ($r=-0.596, P<0.05$). **Conclusion** The expression level of sST2 was negatively correlated with the number of CD4⁺T cell, which might indicate organ failure.

Key words:soluble growth-stimulating gene 2 protein; CD4⁺T cell; organ failure

生长刺激表达基因 2 蛋白(ST2)也称为白细胞介素(IL)-1 受体样 1(ILR1-L1),属于 ILR1-L1 家族^[1],该基因位于 2 号染色体,该蛋白有 4 种亚型,其中有两种最为明显,分别为跨膜受体(ST2L)和可溶性 ST2 (sST2)^[2]。sST2 的表达和分泌主要来源于全身内皮细胞^[3],其在肺、心脏、肾脏和小肠及 CD8⁺T、CD4⁺T 细胞和肥大细胞中均有表达^[4],在机体局部炎症损伤时同样刺激细胞分泌。近年来有研究表明,

* 基金项目:江苏大学临床医学科技发展基金项目(JLY2021154)。
作者简介:徐勇,男,副主任技师,主要从事炎症相关疾病方面的研究。 [△] 通信作者,E-mail:hero_0620@163.com。
本文引用格式:徐勇,吕宏祥. sST2 与 CD4⁺T 细胞在心力衰竭和肾衰竭中的相关性研究[J]. 检验医学与临床,2022,19(6):726-729.

sST2 表达水平增加与心血管疾病密切相关^[5],sST2 被认为是一种评判组织器官衰竭的特异性指标。CD4⁺T 细胞是白细胞的一种,是机体免疫系统的指挥中枢,根据其特定的激活方式能够分化为不同的辅助性 T 细胞亚群,在肿瘤^[6]、自身免疫性疾病^[7]及心血管疾病^[8]中均发挥重要作用。sST2 与 CD4⁺T 细胞在组织器官衰竭发展进程中的关系尚少见报道。本研究以器官衰竭患者外周血血清作为研究标本,探讨 sST2 与 CD4⁺T 细胞在器官衰竭发展进程中的作用,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2020 年 9 月至 2021 年 3 月在本院住院治疗的 60 例心力衰竭患者作为心衰组,其中男 35 例,女 25 例,平均年龄(65.06±12.32)岁;40 例肾衰竭患者作为肾衰组,其中男 27 例,女 13 例,平均年龄(61.22±9.38)岁;另选取同期本院 30 例健康体检者(血常规、尿常规、肝肾功能、心脏彩超、血糖等检查均无异常)作为对照组,其中男 14 例,女 16 例,平均年龄(60.23±13.99)岁。心衰组、肾衰组和对照组性别、年龄比较,差异均无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。本研究经本院伦理委员会批准。

1.2 仪器与试剂 Jet-iStar 3000 免疫分析仪(中翰盛泰医疗器械有限公司)、贝克曼 FC500 流式细胞仪和自动酶联免疫分析仪均购自伯乐生命医学产品(上海)有限公司;sST2 测定试剂盒(中翰盛泰医疗器械有限公司)、CYTO-STAT tetra CHROME CD45/CD4/CD8/CD3 T 细胞(美国贝克曼库尔特有限公司)、酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒(杭州联科生物科技股份有限公司)。

1.3 标本收集 采集所有研究对象外周静脉血 2 mL,静置 10~20 min 后,以 3 000 r/min 离心 15 min,收集上层血清置于一 80 ℃冰箱保存待测,避免反复冻融。

1.4 方法

1.4.1 收集资料 收集心衰组 and 对照组肌酸激酶同工酶(CK-MB)、肌红蛋白(Myo)、心肌肌钙蛋白 I(cT-nI)、B 型脑钠肽(BNP)及肾衰组 and 对照组尿素氮(BUN)、肌酐(Cr)、胱抑素 C(Cys C)、β₂-微球蛋白(β₂-MG)数据。

1.4.2 免疫荧光干式定量法 采用免疫荧光干式定量法检测外周血血清 sST2 表达水平,分别取血清标本 50 μL 加入检测缓冲液管中,充分混匀。再取混匀液 100 μL 垂直滴加至反应板的加样孔中,反应 10 min 后进行仪器快速检测(sST2 正常范围 0~35 ng/mL)。

1.4.3 流式细胞术(FCM) 采用 FCM 检测外周血 CD4⁺T 细胞数量,采集外周血标本并取 100 μL 加入流式管后,再加入 10 μL CD45/CD4/CD8/CD3 流式抗体,漩涡振荡后常温避光孵育 15~20 min;孵育结束后加入 500 μL 溶血素 OptiLyse-C,漩涡振荡混匀,室温避光孵育 10 min;加入 100 μL 生理盐水,漩涡振荡混匀,室温避光静置 10 min;将 Flow-Count 漩涡振荡混匀 10 s,取 100 μL 混匀液上机检测(CD4⁺T 细胞数量正常范围 550~1 440/μL)。

1.4.4 ELISA 采用 ELISA 检测外周血血清 IL-1 和 IL-6 表达水平,100 μL 血清标本加入包被好抗原的反应孔中,加入辣根过氧化物酶标记的抗体,37 ℃水浴 1 h,用洗涤液反复洗 5 遍,分别加上底物显色,15 min 后加入终止液,采用酶标仪进行检测。

1.5 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计软件进行数据分析处理。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用独立样本 t 检验;以 Pearson 相关进行相关性分析。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 各组各项指标水平比较 心衰组患者 CK-MB、Myo、cTnI 和 BNP 水平均高于对照组,差异均有统计学意义($P<0.05$),见表 1;肾衰组患者 BUN、Cr、Cys C 和 β₂-MG 水平均高于对照组,差异均有统计学意义($P<0.05$),见表 2。

表 1 对照组和心衰组各项指标水平比较($\bar{x} \pm s$)

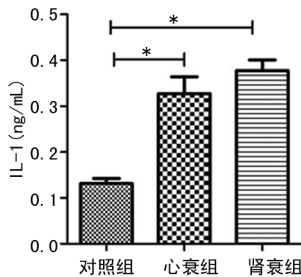
组别	<i>n</i>	CK-MB(μg/L)	Myo(μg/L)	cTnI(μg/L)	BNP(ng/L)
对照组	30	0.96±0.11	42.41±4.94	0.02±0.01	67.93±20.79
心衰组	60	20.53±10.45	924.40±201.30	1.12±0.35	2 753.00±576.10
<i>P</i>		<0.05	<0.001	<0.05	<0.001

表 2 对照组和肾衰组各项指标水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	BUN(mmol/L)	Cr(μmol/L)	Cys C(mg/L)	β ₂ -MG(mg/L)
对照组	30	5.58±0.33	72.62±5.73	1.08±0.06	1.94±0.18
肾衰组	40	21.06±2.13	282.50±56.56	3.20±0.36	9.74±1.48
<i>P</i>		<0.001	<0.01	<0.01	<0.001

2.2 各组外周血血清炎症介质表达水平比较 心衰 组患者外周血血清炎症介质 IL-1 水平为(0.33±

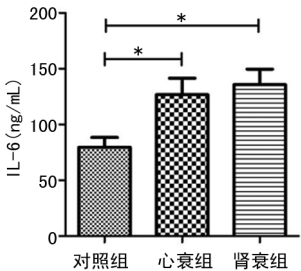
0.04)ng/mL,肾衰组患者为(0.38±0.02)ng/mL,均明显高于对照组的(0.13±0.02)ng/mL,差异均有统计学意义($P<0.05$),见图 1;心衰组患者外周血血清炎症介质 IL-6 水平为(126.70±14.76)ng/mL,肾衰组患者为(135.70±13.78)ng/mL,均明显高于对照组的(79.59±8.78)ng/mL,差异均有统计学意义($P<0.05$),见图 2。



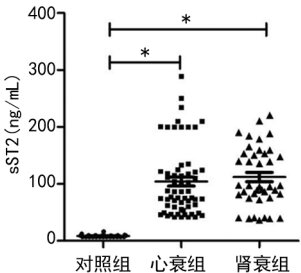
注:与对照组比较, * $P<0.05$ 。
图 1 各组外周血血清炎症因子 IL-1 表达水平比较

2.3 各组 sST2 表达水平比较 心衰组患者外周血血清 sST2 表达水平为(104.20±7.94)ng/mL,肾衰组患者为(112.00±8.30)ng/mL,均明显高于对照组的(8.57±0.35)ng/mL,差异均有统计学意义($P<0.05$),见图 3。

2.4 各组外周血 CD4⁺T 细胞比例及数量比较 心衰组与肾衰组患者外周血 CD4⁺T 细胞比例(图 4A)及数量(图 4B)均低于对照组,差异均有统计学意义

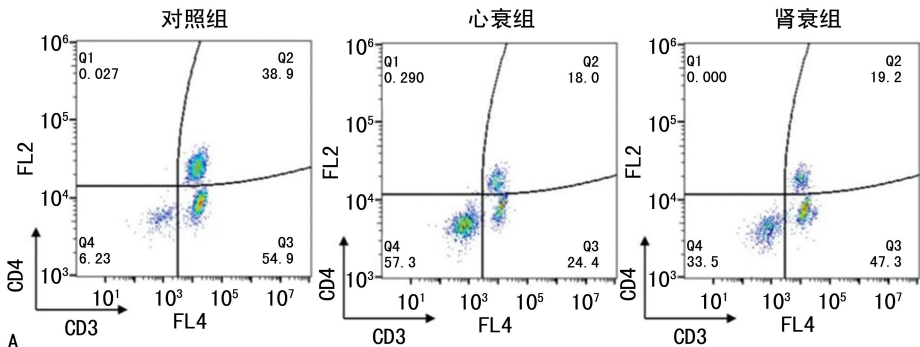


注:与对照组比较, * $P<0.05$ 。
图 2 各组外周血血清炎症因子 IL-6 表达水平比较

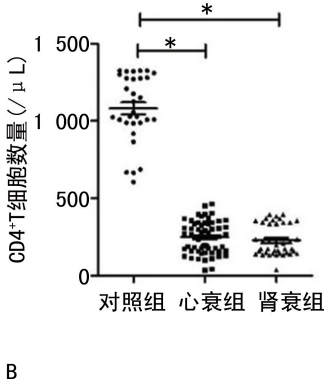


注:与对照组比较, * $P<0.05$ 。
图 3 各组血清 sST2 表达水平比较

2.5 器官衰竭患者外周血血清 sST2 表达水平与 CD4⁺T 细胞数量的相关性分析 Pearson 相关分析结果显示,器官衰竭患者外周血血清 sST2 表达水平与外周血 CD4⁺T 细胞数量呈负相关($r=-0.596$, $P<0.05$)。见图 5。



注:A 为 CD4⁺T 细胞比例,B 为 CD4⁺T 细胞数量;与对照组比较, * $P<0.05$ 。
图 4 各组外周血 CD4⁺T 细胞比例及数量比较



3 讨论

器官衰竭又称多器官功能衰竭,可定义为维持生命至关重要的器官系统的重大功能损伤。器官功能障碍的严重程度可以根据最能确定该特定器官主要功能的参数来量化(例如肺动脉氧分压测定肺功能或血清肌酐测定肾功能)。在重症急性胰腺炎情况下,3 个器官系统(呼吸、肾脏和心血管)被认为是最重要的,也是最常累及的^[9]。但到目前为止,临床上并无某一特定的指标能够反映特定的器官衰竭。

人和小鼠的 ST2 基因包含 2 个启动子,1 个远端启动子和 1 个近端启动子,sST2 和 ST2L 均可从任一

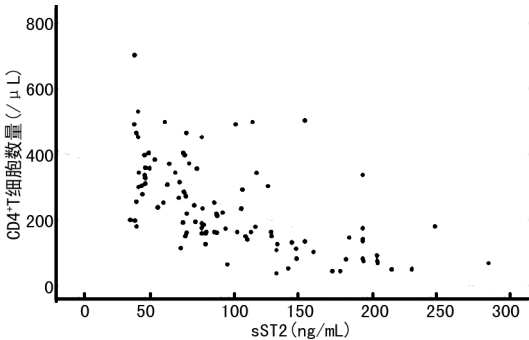


图 5 器官衰竭患者外周血血清 sST2 表达水平与 CD4⁺T 细胞数量的相关性

启动子转录,而启动子的使用受细胞类型控制^[3]。肾脏、肺、胎盘和胃表达高水平的 sST2 和 ST2L;此外,在人体脾脏、心脏、睾丸和结肠中 ST2L 表达水平高于 sST2,而大脑和肝脏 sST2 水平则高于 ST2L^[10]。ST2 在成纤维细胞和造血细胞[例如 T 型辅助 2 型(Th2)淋巴细胞和肥大细胞]表面呈高表达^[11];ST2 未在 Th1 细胞和其他几种免疫种群上组成性表达,但最近有报道显示,ST2 可以在 Th1 和 CD8⁺ T 细胞中诱导 ST2 表达^[12]。既往有研究证实,ST2 参与肺纤维化^[13]、肾衰竭^[14]及自身免疫性疾病^[15]等的病理生理过程。最近有研究表明,在心肌受损过程中,由于产生 sST2 过多,致使发挥心脏保护作用的 IL-33 缺乏;而作为 IL-33 的诱骗受体,sST2 可优先与其结合,并阻断 IL-33 与 ST2L 结合后发挥的保护心脏作用,最终导致死亡风险增加。随着研究的深入,sST2 在器官衰竭患者外周血中表达水平均有不同程度增加,提示 sST2 可作为评判器官衰竭的特异性指标。

CD4⁺ T 细胞又称为辅助性 T 细胞,作为细胞免疫反应的重要组成部分,它们通过产生细胞因子招募其他免疫细胞至感染部位,以帮助应对入侵的病原菌,在控制和清除病原菌过程中发挥重要作用。CD4⁺ T 细胞具有高度异质性,一方面,树突状细胞协助激活 CD8⁺ T 细胞发挥抗病毒作用;另一方面,促进 B 细胞产生抗体^[16]。此外,共刺激分子的存在与否,以及 CD4⁺ T 细胞活化过程中的细胞因子环境、驱动谱系特异性转录因子的表达,有助于 CD4⁺ T 细胞分化为不同亚群(Th1、Th2、Th17、Th22 等)^[17]。本课题组已发表数据表明,在心肌炎性损伤阶段,血管紧张素Ⅱ能够促进 CD11b⁺ Lybc⁺ 单核细胞向炎性 M1 样巨噬细胞重新编程并促进 CD4⁺ T 细胞向 Th17 细胞分化,参与心肌炎的发生和发展^[18];肿瘤来源的外泌体促进 Th17 分化,加速结直肠癌进展^[19];Th17 通过产生 IL-17 及其他促炎介质参与自身免疫性疾病等。

本研究发现,器官衰竭患者外周血血清 sST2 表达水平上调且 CD4⁺ T 细胞数量减少,揭示器官衰竭发展进程中 sST2 表达水平与 CD4⁺ T 细胞数量具有相关性,但是具体调控机制尚有待进一步研究。在接下来的研究中将进一步探讨器官衰竭发展进程中 sST2 与 CD4⁺ T 细胞之间的相互调控机制,为器官衰竭患者的诊断与治疗提供新的思路。

参考文献

[1] AIMO A, JANUZZI J L, VERGARO G, et al. Circulating levels and prognostic value of soluble ST2 in heart failure are less influenced by age than N-terminal pro-B-type na-

triuretic peptide and high-sensitivity troponin T[J]. Eur J Heart Fail, 2020, 22(11): 2078-2088.

[2] MARTA B, PIETRASIK A, MICHAL F, et al. Soluble ST2 as a biomarker for early complications in PATIENTS with chronic thromboembolic pulmonary hypertension treated with balloon pulmonary angioplasty[J]. Diagnostics (Basel), 2021, 11(1): 133-139.

[3] HO J E, LARSON M G, GHORBANI A, et al. Soluble ST2 predicts elevated SBP in the community[J]. J Hypertens, 2013, 31(7): 1431-1436.

[4] DEMYANETS S, KAUN C, PENTZ R, et al. Components of the interleukin-33/ST2 system are differentially expressed and regulated in human cardiac cells and in cells of the cardiac vasculature[J]. J Mol Cell Cardiol, 2013, 60: 16-26.

[5] DEMIRBAKAN B, KEMAL S M. An impedimetric biosensor system based on disposable graphite paper electrodes; detection of ST2 as a potential biomarker for cardiovascular disease in human serum[J]. Anal Chim Acta, 2021, 1144: 43-52.

[6] 张维红, 于津浦, 曹水, 等. CD40/CD40L 交联在 CD4⁺ T 细胞诱导肿瘤细胞凋亡中的机制研究[J]. 中国免疫学杂志, 2007, 23(10): 890-894.

[7] CAI Y Y, SHEN H, QIN C Y, et al. The spatio-temporal expression profiles of CD4⁺ T cell differentiation and function-related genes during EAE pathogenesis[J]. Inflammation, 2017, 40(1): 195-204.

[8] WISITSAK P, AMONRAT J, KANDA S, et al. IL-17 and IFN- γ productions by CD4⁺ T cells and T cell subsets expressing NKG2D associated with the number of risk factors for cardiovascular diseases[J]. Mol Immunol, 2020, 122: 193-199.

[9] SCHNEIDE H, BOYLE N, MCCLUCKIE A, et al. Acute severe pancreatitis and multiple organ failure: total parenteral nutrition is still required in a proportion of patients [J]. Br J Surg, 2000, 87(3): 362-373.

[10] YAO H, HE C, DENG L, et al. Enteral versus parenteral nutrition in critically ill patients with severe pancreatitis: a meta-analysis[J]. Eur J Clin Nutr, 2018, 72(1): 66-68.

[11] SALIMI M, BARLOW J L, SAUNDERS S P, et al. A role for IL-25 and IL-33-driven type-2 innate lymphoid cells in atopic dermatitis[J]. J Exp Med, 2013, 210(13): 2939-2950.

[12] BAUMANN C, BONILLA W V, FRÖHLICH A, et al. Tbet-and STAT4-dependent IL-33 receptor expression directly promotes antiviral Th1 cell responses[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2015, 112(13): 4056-4061.

[13] 郑金旭, 许姣, 鲁蕾, 等. ST2 在博来霉素诱导的肺纤维化小鼠体内的动态表达[J]. 中国免疫学杂志, 2013, 29(4): 382-385.

径所致神经功能缺损有关^[11]。临床研究和动物实验已证实,改善血氨水平可有效改善肝性脑病大鼠认知功能下降情况^[12-13]。有研究证实,轻微型老年肝性脑患者血氨水平升高可改变多种大脑皮质层蛋白表达,如大脑中突触蛋白异常会导致记忆力下降^[14]。同时,血流动力学指标改变也导致大脑皮层线粒体功能障碍和能量损失,尤其是门静脉血流动力学状态的不稳定性,可导致脑水肿和颅内环境失衡,导致水、电解质代谢紊乱,影响脑组织血氨清除能力^[15]。本研究发现,血氨水平与 WAIS 评分呈负相关($P<0.05$),脑血流动力学指标(VP、VD、PI)水平与 WAIS 评分均呈正相关($P<0.05$),RI 水平与 WAIS 评分呈负相关($P<0.05$),由此表明,轻微型老年肝性脑病人群的认知功能障碍与血氨水平升高、脑血流速度减慢、脑血流阻力增大等密切相关,这不仅可以解释轻微型老年肝性脑病存在认知功能障碍的原因,也可对轻微型老年肝性脑病的临床治疗起指导作用。

综上所述,轻微型老年肝性脑病存在血氨水平升高、脑血流速度减慢、脑血流阻力提升、认知功能障碍等,且血氨、脑血流动力学指标水平异常与认知功能障碍之间均密切相关,对轻微型老年肝性脑病的临床防治起指导作用。

参考文献

[1] 万敏婕,高普均.肝硬化患者的肌肉改变与轻微和显性肝性脑病相关[J].临床肝胆病杂志,2019,35(7):1513-1514.

[2] 覃秀容,陈月桥,石清兰,等.轻微肝性脑病的中西医研究进展[J].中医药导报,2020,26(12):152-156.

[3] 罗莎,周治明,郭大静,等.轻微型肝性脑病患者静息态下双侧楔前叶与全脑其他区域功能连接变化[J].中国医学影像技术,2019,35(3):321-325.

[4] 程媛,叶永安.肝硬化轻微型肝性脑病纳入与排除标准制定之我见[J].肝脏,2019,24(6):711-712.

[5] 姜婷婷,杨志云,江宇泳,等.轻微型肝性脑病的发病危险因素及中医证型分布规律[J].北京中医药,2019,38(3):211-215.

[6] 中华医学会消化病学分会,中华医学会肝病学分会.中国肝性脑病诊治共识意见[J].中国医学前沿杂志,2014,6(2):81-93.

[7] 马玉珍,毛德文,陈月桥,等.轻微型肝性脑病发病机制的研究进展[J].大众科技,2019,21(4):72-74.

[8] 王磊.益生菌治疗慢性乙型肝炎肝硬化亚临床肝性脑病患者的临床疗效及对血氨和肠道菌群的影响[J].检验医学与临床,2019,16(9):1211-1214.

[9] 尹智,朱勇,张中伟,等.超声检测 ICU 肝性脑病患者门静脉血流动力学的临床价值[J].西部医学,2017,29(8):1137-1140.

[10] 袁洁,蔡时青.衰老过程中行为和认知功能退化的调控机制研究[J].遗传,2021,14(6):14-16.

[11] LABENZ C R, TOENGES G T, SCHATTEBERG J M, et al. Clinical predictors for poor quality of life in patients with covert hepatic encephalopathy[J]. J Clin Gastroenterol, 2019, 53(7):1081-1091.

[12] 王林昌.大黄煎剂保留灌肠对轻微型肝性脑病患者内毒素、血氨水平的影响[J].中医临床研究,2017,9(7):21-23.

[13] ALTAEE A M, KHNEIZER G W, MOHAMMED K H, et al. Alarming trends in hepatic encephalopathy in the USA[J]. Eur J Gastroenterol Hepatol, 2019, 31(9):549-561.

[14] MANGAS L B, ALBA G R, LEONE P S, et al. Selective improvement by rifaximin of changes in the immunophenotype in patients who improve minimal hepatic encephalopathy[J]. J Transl Med, 2019, 17(1):1789-1794.

[15] 周雨晴.肝硬化合并肝性脑病患者的脑血流动力学及认知功能研究[D].苏州:苏州大学,2017.

(收稿日期:2021-06-30 修回日期:2021-10-25)

(上接第 729 页)

[14] 张永敏.血清 sST2、IL-33 水平在 CRF 患者心功能不全诊断中的临床价值[J].承德医学院学报,2019,147(6):63-65.

[15] SOYFOO M S, NICAISE C. Pathophysiologic role of Interleukin-33/ST2 in Sjögren's syndrome[J]. Autoimmun Rev, 2021, 20(3):102756.

[16] CHANDRASEKHAR J L, COX K M, WILLIAM L M, et al. Cutaneous exposure to clinically relevant lone star ticks promotes IgE production and hypersensitivity through CD4⁺ T cell- and MyD88-dependent pathways in mice[J]. J Immunol, 2019, 203(4):813-824.

[17] CHATZILEONTIADOU D S, SLOANE H, NGUYEN A T, et al. The many faces of CD4 T cells; immunological

and structural characteristics[J]. Int J Mol Sci, 2020, 22(1):73-76.

[18] LU H X, WU Y, SHAO X Y, et al. ANG II facilitated CD11b+Ly6Chi cells reprogramming into M1-like macrophage through Erk1/2 or p38-Stat3 pathway and involved in EAM[J]. J Leukoc Biol, 2018, 103(4):719-730.

[19] SUN J F, JIA H W, BAO X Q, et al. Tumor exosome promotes Th17 cell differentiation by transmitting the lncRNA CRNDE-h in colorectal cancer[J]. Cell Death Dis, 2021, 12(1):123-129.

(收稿日期:2021-07-14 修回日期:2021-10-29)