

DOI:10.3969/j.issn.1000-1565.2022.02.007

新型肝动脉栓塞微球制剂的制备

宋鹏锦¹, 韩啸¹, 孙彩凤¹, 孙海川², 曹晓亮³, 胡连栋¹

(1. 河北大学 河北省药物质量分析控制重点实验室, 药学院, 河北 保定 071002; 2. 保定市第一中心医院 医务处, 河北 保定 071000; 3. 保定市第一医院 介入医学科, 河北 保定 071000)

摘要:开发了一种适合肝动脉灌注化疗栓塞(TACE)用的姜黄素载药微球,并探究其对肝癌的治疗效果。以聚乙烯醇(PVA)为载体,采用乳液交联法制备微球,观察微球的外观和粒度,证明微球对癌细胞的抑制作用,在 VX2 兔模型中评估肝动脉栓塞微球治疗肝癌的功效。扫描电镜和粒度分析显示制备的微球球形完整;生物安全性证明微球材料安全指数较高;药效学研究表明姜黄素栓塞微球可在栓塞给药后有效发挥动脉栓塞作用,提高肝癌的治疗效果。本研究成功地制备了姜黄素栓塞微球,有望将其用于栓塞以提高 TACE 在肝癌中的治疗效果。

关键词:肝细胞癌;姜黄素;微球;肝动脉化疗栓塞

中图分类号:R944

文献标志码:A

文章编号:1000-1565(2022)02-0150-08

Preparation of novel microsphere for hepatic arterial embolism

SONG Pengjin¹, HAN Xiao¹, SUN Caifeng¹, SUN Haichuan²,
CAO Xiaoliang³, HU Liandong¹

(1. College of Pharmacy, Key Laboratory of Pharmaceutical Quality Control of Hebei Province, Hebei University, Baoding 071002, China; 2. Medical Affair Department, Baoding First Central Hospital, Baoding 071000, China; 3. Intervention Therapy Department, Baoding No. 1 Hospital, Baoding 071000, China)

Abstract: To develop curcumin loaded microspheres suitable for transcatheter arterial chemoembolization (TACE) and to explore its therapeutic effect on liver cancer, microspheres were prepared with polyvinyl alcohol (PVA) as a carrier material by emulsification cross-linking method. The morphology and particle size distribution of the drug-loaded microspheres were evaluated. The inhibitory effects of microspheres on cancer cells were observed. We used VX2 liver cancer rabbit models to discuss the effectiveness of curcumin-loaded microspheres for hepatic artery embolization. Scanning electron microscope and particle size analysis showed that the microspheres had good sphericity. Safety testing determined that the safety index of microspheres was higher. The pharmacodynamic study showed that curcumin embolic microspheres could effectively play the role of arterial embolization after embolization administration and improve the therapeutic effect of liver cancer. Curcumin embolic microspheres had been successfully prepared in this study, which were expected to be used for embolization to improve the therapeutic efficiency

收稿日期:2021-06-20

基金项目:河北省重点研发计划(19272701D);河北省自然科学基金资助项目(H2020201036);河北省研究生创新资助项目(CXZZSS2020002);河北省创新能力提升计划(20567605H)

第一作者:宋鹏锦(1998—),女,河北邢台人,河北大学在读硕士研究生. E-mail: 1943006472@qq.com

通信作者:胡连栋(1978—),男,河北石家庄人,河北大学教授,博士,主要从事药物新制剂研究. E-mail: hbupharm@126.com

of TACE in liver cancer.

Key words: hepatocellular carcinoma; curcumin; microspheres; TACE

据2020年全球癌症统计数据显示^[1],原发性肝癌是第三大癌症死亡原因,约有 8.3×10^5 例死亡.肝移植和手术切除是肝癌患者治疗的主要选择^[2-3].大于3 cm肿瘤切除难度大,同时考虑到肿瘤的大小、数量和分布,手术切除并非适用所有患者^[4].然而,接受了手术切除的患者中,术后5年复发率仍高达60%^[5-6].

肝动脉灌注化疗栓塞(TACE)是一种临床上可接受的技术^[7],其主要原理是依次将化疗药物和栓塞材料注入肿瘤供血动脉内,进行化疗栓塞.TACE优势如下:1)通过一次性大剂量灌注化疗药物,局部靶向肿瘤药物浓度得到提高,靶向化疗药物接触肿瘤组织的时间延长,患者的生存质量显著改善;2)选择性闭塞病变血管,造成肿瘤组织供血不足和缺氧,达到治疗目的^[8].TACE已成为治疗中晚期肝癌的首选方法^[9].

现阶段常见的栓塞材料有明胶海绵、碘化油乳剂、载药微球、聚乙烯醇(PVA)颗粒等^[10].随着技术手段及栓塞材料的革新,相较于传统的灌注化疗和碘化油栓塞,载药栓塞微球治疗肝癌已成为近年来临床研究的热点.载药栓塞微球技术具有药物灌注化疗和栓塞的双重效果,能保证肿瘤区域足够药物浓度,降低全身血药浓度水平,将原本每月1次的治疗周期延长至3个月,比传统TACE安全性更高^[11].新型载药微球产品能够大幅度降低治疗成本,拓宽治疗范围,受到专家的广为期待.

姜黄素是一种天然的酚类色素^[12].已有临床数据和大量研究表明,姜黄素可通过多种机制影响癌细胞生长和凋亡,在多种恶性肿瘤治疗方面发挥作用^[13-15],包括肺癌、胰腺癌、前列腺癌、乳腺癌、结直肠癌和卵巢癌等.

本文以PVA为载体,采用反相乳化交联法制备了姜黄素载药微球.确定最佳制备条件后,对微球的结构和理化性质进行了研究.建立了兔VX2肝癌模型^[16],同时对比分析了姜黄素栓塞微球对肝脏肿瘤的治疗效果和安全性.

1 仪器与试剂

聚乙烯醇(PVA 1788)购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司;失水山梨醇单油酸酯(span 80)购自国药集团化学试剂有限公司;聚氧乙烯失水山梨醇单油酸酯(Tween 80)购自天津市天大化工实验厂;姜黄素购自国药集团化学试剂有限公司;液体石蜡购自天津市大茂化学试剂厂;盐酸购自天津市科密欧化学试剂有限公司;T6紫外可见分光光度计购自北京普析通用仪器有限责任公司;BT-9300ST激光粒度分布仪购自丹东百特仪器有限公司;JSM-7500冷场发射扫描电子显微镜购自日本电子株式会社;FJ-200高速剪切匀质机购自上海标本模型厂;UNIQFD20C DSA血管造影介入治疗系统购自荷兰飞利浦公司;FV3000激光共聚焦扫描显微镜购自奥林巴斯(中国)有限公司.

2 方法

2.1 PVA 栓塞微球的制备

称取PVA溶解在去离子水中,制得PVA溶液,冷却至室温.将表面活性剂Span 80加入100 mL液体石蜡中搅拌,形成油相.取PVA溶液和盐酸溶液混合,加热并快速搅拌,形成水相.将水相加入油相中,搅拌(300 r/min)20 min,得到均匀的W/O型乳液.随后加入交联剂戊二醛,使其与PVA发生交联反应.持续搅拌1 h,过滤,清洗,干燥,得白色粉末状微球.

2.2 微球的形貌和粒度

使用碳导电双面胶带将微球固定在金属桩上,真空下喷金,10 kV激发电压下使用扫描电子显微镜观察微球表面形态的变化.

将适量栓塞微球放入投料池中,启动超声循环,直至遮光率达到10%~15%时停止,接着超声循环约

3 min,用激光粒度分布仪测量载药微球粒度分布范围,对实验数据进行整理记录和计算,用跨距(Span)评估栓塞微球粒径的均匀性.

$$\text{Span}=\frac{D90-D10}{D50},$$

式中, $D90$ 、 $D50$ 和 $D10$ 分别代表 90%、50%和 10%栓塞微球最大粒径小于该值所示粒径.

2.3 生物安全性测试

取最优化微球进行急性溶血、细胞凋亡和体外细胞毒性实验以证明微球的安全性.

2.3.1 急性溶血实验

取 10 mL 玻璃试管 7 支,每支试管中加入 2.5 mL 体积分数 2%红细胞混悬液,进行编号:1 号管加 2.5 mL 水作阳性对照组,2 号管加 2.5 mL 生理盐水作阴性对照组,将 0.5 mL 质量浓度为 12.5、25、50、100、150 mg/mL 的微球分别加入到含 2 mL 生理盐水的 3 至 7 号管中.

2.3.2 细胞凋亡

采用激光共聚焦扫描显微镜观测 MGC-803 细胞在姜黄素药物诱导下的凋亡过程.通过荧光双染法,对处于各个凋亡时期的肿瘤细胞进行考察.荧光双染中用到的 DAPI(4',6-二脒基-2-苯基吡啶二盐酸盐)属于一种荧光染料,将癌细胞细胞核染成蓝色;Alexa Fluro® 488 是一种荧光探针,将细胞膜和细胞质染成绿色^[17].

2.3.3 体外细胞毒性实验

选取小鼠 L929 纤维细胞,设置微球组、阴性对照组和阳性对照组.将小鼠 L929 细胞稀释至 5×10^4 /mL,在无菌孔板中以 90 μ L/孔加入细胞悬液,培养 12 h.微球组分别加入 1、3、6、25、12.5、25、50、100、150 mg/mL 栓塞微球;阴性对照组加入 100 μ L 细胞培养基;阳性对照组加入 100 mL 体积分数 5% DMSO 溶液,培养 48 h,置显微镜下观察不同组的细胞形态.每孔加入 10 μ L 噻唑蓝(MTT) 溶液,继续培养 4 h,490 nm 处测定吸光值,计算细胞相对增殖率(RGR),将 RGR 值转化成 6 级,评定材料毒性,见表 1.

以空白对照孔调零,按照公式计算各培养孔 RGR.

$$\text{RGR}=\frac{X_1-X_0}{X_2-X_0}\times100\%.$$

式中,RGR 为相对增殖率,%; X_1 为实验样品组的吸光度; X_2 为阴性对照组吸光度; X_0 为空白对照组吸光度.

表 1 细胞毒性反应分级
Tab. 1 Classification of cytotoxic response

级别	RGR/%	级别	RGR/%
0	≥100	3	25~49
1	75~99	4	1~24
2	50~74	5	0

0 或 1 级为合格; 2 级应结合细胞的形态分析进行综合评价; 3~5 级为不合格.

2.4 药效学研究

2.4.1 VX2 肝癌动物模型的建立

家兔术前禁食 12 h,禁水 4 h,操作见图 1.1)将 VX2 肿瘤细胞移植于兔后腿肌肉外侧,植入 1 个月后可见实质性肿块,即荷瘤兔;2)处死荷瘤兔,在无菌条件下分离出 VX2 肿瘤,制成 2 mm \times 2 mm \times 3 mm 的肿瘤组织,然后将碎片储存在生理盐水中;3)进行兔腹部正中切口手术,将 VX2 肿瘤接种于肝左叶候选肝区,用明胶覆盖穿刺部位,左肝叶置换入腹腔,缝合切口,表面涂抹红霉素软膏;4)所有兔在 VX2 肿瘤植入后肌注硫酸庆大霉素(8×10^4 U/d,2 mL)3 d.肿瘤在兔子的肝脏中生长 14 d.

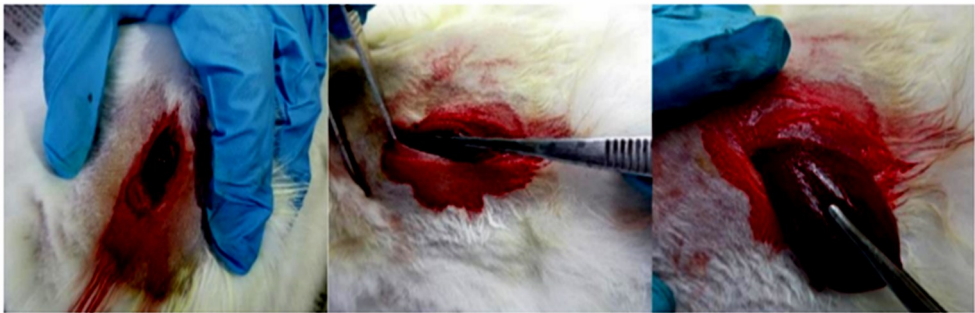


图 1 包埋法建立肝癌模型

Fig. 1 Establishment of hepatocellular carcinoma model

2. 4. 2 TACE 治疗

对植入 VX2 肝肿瘤的兔进行 TACE 治疗, 将 15 只实验兔随机分为 3 组(姜黄素载药微球栓塞组、空白微球栓塞组和单纯造影组), 每组 5 只. 载药组和空白组做全麻处理, 对每只家兔的下肢动脉进行解剖, 在 DSA 血管造影介入治疗系统引导下, 将导管导丝从股动脉移至肝肿瘤供血动脉, 然后将栓塞微球分别注入家兔的供血动脉. 缝合兔腿动脉, 肌注硫酸庆大霉素(8×10^4 U/d) 3 d, 常规标准饲料喂养. 单纯造影组在完成造影后直接撤出导管, 缝合后采用与栓塞组相同的术后管理方式.

2. 4. 3 CT 灌注扫描

所有接受 TACE 治疗的实验兔分别于术后 14、21 d 进行 CT 扫描, 与术前 1 周的 CT 影像数据对比, 确认成瘤情况, 操作见图 2. 依据 CT 影像测量肿瘤长宽高, 计算体积: $V=1/2\times ab^2$, 其中, a 为肿瘤最长直径, b 为肿瘤最短直径.

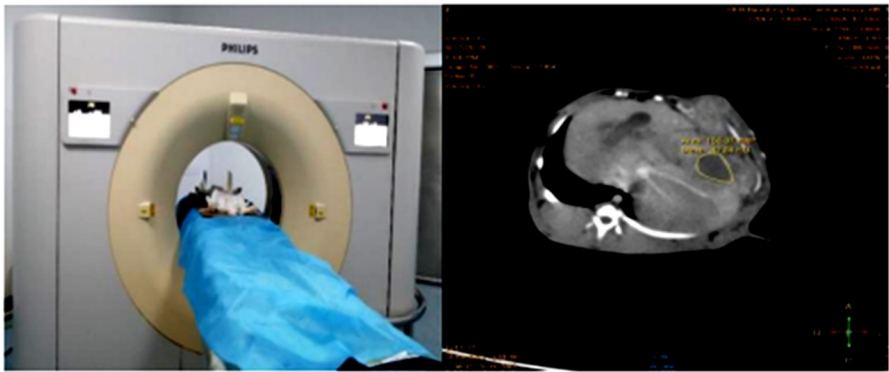


图 2 实验兔 CT 检查

Fig. 2 CT examination of experimental rabbits

2. 4. 4 生存期观察

为了评估姜黄素载药微球对肿瘤组织影响, 动脉栓塞给药后, 观察各组动物生长情况, 记录动物死亡数和平均生存时间, 计算生命延长率(ILS).

$$ILS=\frac{(\text{实验组平均生存时间}-\text{对照组平均生存时间})}{\text{对照组平均生存时间}}\times 100\%.$$

对比各组实验动物平均生存时间并做出生存曲线, 用生存曲线分析动物存活率.

2. 4. 5 组织学评估

将 TACE 术后的 3 组肝癌兔解剖, 取出肝癌组织后进行 H&E 染色, 置荧光显微镜下进行观察, 评价栓塞术后肝组织是否发生病理学改变. 实验过程中均按照动物伦理学标准对动物进行处置.

2.5 统计学方法

数据结果采用 SPSS 10.0 软件进行统计分析和处理,组间比较采用 t 检验, $P<0.05$ 为差异有显著性意义.

3 结果

3.1 微观形态

制备的微球外观圆整、光滑,实验结果见图 3a. 激光粒度分布仪测得 PVA 载药微球的平均粒径为 $94.19\ \mu\text{m}$, 粒径分布在 $45\sim 200\ \mu\text{m}$ 的微球为 84.67% . D_{10} 为 $39.22\ \mu\text{m}$ 、 D_{50} 为 $89.85\ \mu\text{m}$ 、 D_{90} 为 $158.3\ \mu\text{m}$, 计算得跨距为 1.325 , 实验结果见图 3b.

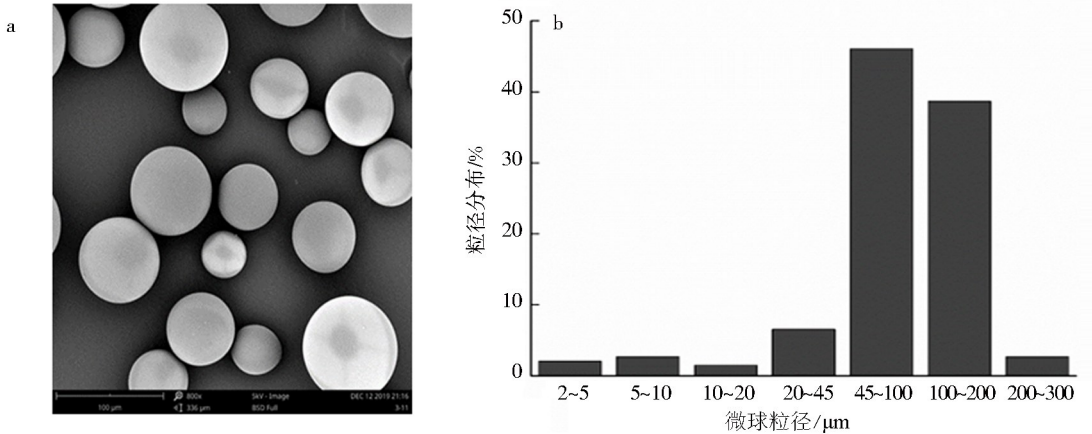


图 3 PVA 微球的扫描电镜照片(a)和粒径分布(b)

Fig. 3 Scanning electron microscope of PVA microspheres(a) and size distribution of PVA microspheres(b)

3.2 载药栓塞微球的安全性评价结果

3.2.1 急性溶血实验结果

实验结果见图 4(从左至右分别为 1~7 号管). 1 号管(阳性对照组)中红细胞破裂(4 h), 溶液呈现红色. 2 号管(阴性对照组)与含有微球样品的 3~7 号管中上清液均为无色透明, 底部有红细胞沉降.

取微球样品($150\ \text{mg/mL}$)及阴性和阳性对照组样品分别置于显微镜下观察. 实验结果见图 5. 微球组与阴性对照组中的红细胞形态完整, 分散性良好, 无聚集现象, 而阳性对照组中的细胞破碎. 实验表明微球安全性较好, 不会引起溶血现象.

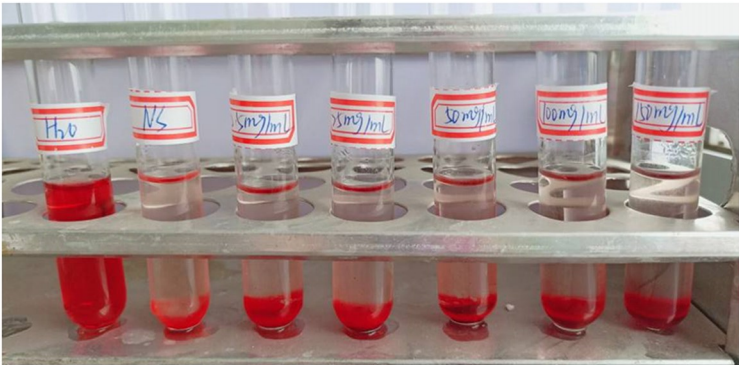


图 4 溶血实验结果(室温放置 4 h, 从左至右 1~7 号管)

Fig. 4 Result of hemolysis test(for 4 h, tube 1—7 from left to right)

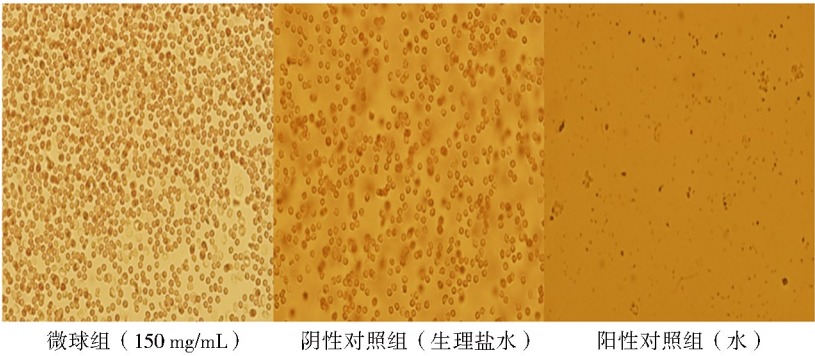


图 5 溶血实验结果的光学显微镜照片

Fig. 5 Optical microscope images of hemolysis test

3. 2. 2 细胞凋亡结果

荧光双染后,激光共聚焦扫描显微镜下的观察结果见图 6. DAPI 细胞核染色显示,实验组活细胞数量减少,微球粒径大于细胞粒径,难以被细胞摄取,载药微球可释放姜黄素将细胞杀死;香豆素 6 细胞膜和细胞质染色显示,载药微球浓度增大,癌细胞数量减少,可通过调整给药浓度杀死癌细胞.

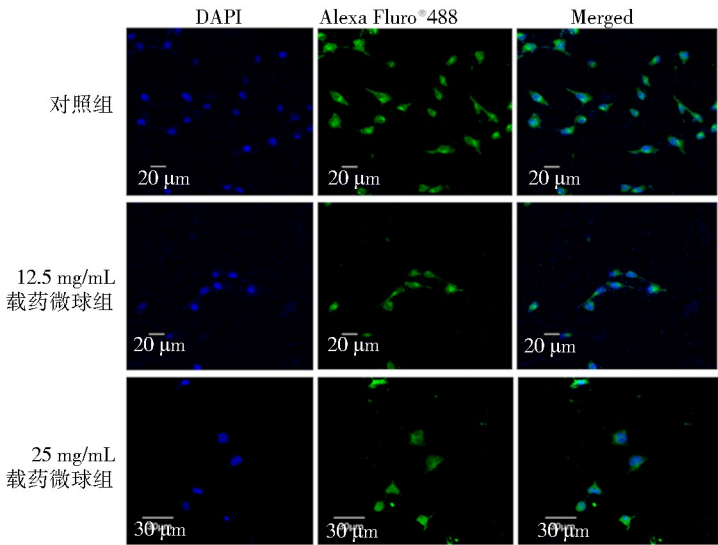


图 6 激光共聚焦扫描显微镜观察

Fig. 6 Fluorescence images under laser scanning confocal microscope

3. 2. 3 细胞毒性结果

体外细胞毒性实验显示,1、3、6、25、12.5、25、50 mg/mL 质量浓度组计算所得 RGR 均大于等于 100%,空白微球和载药微球的细胞毒性反应分级均为 0 级,未对正常鼠 L929 纤维细胞造成明显的毒性反应.

3. 3 栓塞微球在 VX2 荷瘤兔体内的栓塞效果

3. 3. 1 CT 扫描结果

VX2 荷瘤兔接受栓塞微球治疗后,肿瘤体积出现不同程度的增长. 栓塞治疗 21 d 后,姜黄素微球栓塞组、空白微球栓塞组和造影剂组肿瘤体积分别为 (4.32 ± 1.46) 、 (5.96 ± 1.07) 和 $(9.30 \pm 1.38) \text{cm}^3$. 姜黄素载药微球组、空白微球栓塞组肿瘤体积明显小于单纯造影组($P < 0.05$).

3. 3. 2 存活结果

VX2 荷瘤兔动脉栓塞后的存活曲线,实验结果见图 7. 平均生存时间分别为单纯造影组 32.40 d、空白

微球栓塞组 37.60 d、姜黄素载药微球栓塞组 47.80 d. 计算可得,姜黄素载药微球和空白微球治疗组的 ILS 分别为 46.80%和 36.60%. 由此可以看出栓塞给药具有明显的治疗效果,且姜黄素载药微球栓塞组优于空白微球组.

3.3.3 H&E 染色结果

肝脏组织病理学切片 H&E 染色结果见图 8. 单纯造影组肿瘤细胞形态多样,病变周围发现肿瘤巢,在肿瘤组织周围见到厚厚的纤维间隔,几乎没有血管. 与空白微球组相比,姜黄素微球组可见血管内微球,周围肿瘤组织不同程度减少,并可见肿瘤边缘的凝血坏死区域.

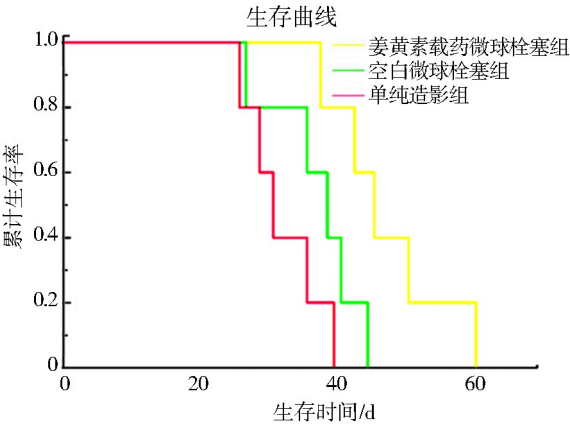
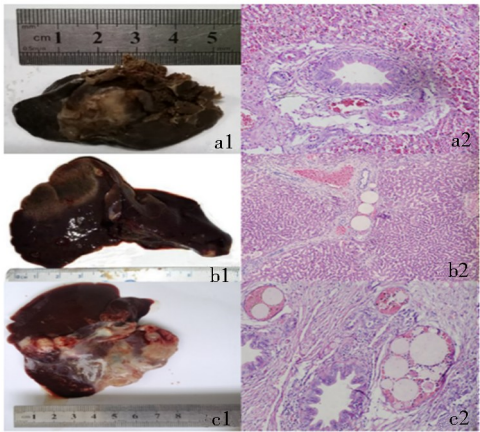


图 7 各实验组荷瘤兔 K-M 生存曲线
Fig. 7 K-M survival curves of tumor-bearing rabbits in each experimental group



a1、a2. 单纯造影组;b1、b2. 姜黄素微球组;c1、c2. 空白微球组.
图 8 每组肝脏的组织病理学图像(H&E 染色)
Fig. 8 Histopathological images of liver in each group (H&E stain)

4 结论

目前广泛的研究和临床实验证实,载药微球可选择性地将大部分药物递送至肿瘤部位,降低全身药物浓度,但载药微球的临床使用受限于其单一的载药模式和高昂的价格. 本文以 PVA 为原料制备姜黄素栓塞微球. 确定的最佳工艺参数为:质量分数 5% PVA 水溶液,含有质量分数 0.5% span 80 的液体石蜡溶液,1 mol/L 盐酸作催化剂,乳化温度为 60 ℃. 扫描电子显微镜显示载药微球球形好,平均粒径为 94.19 μm. 生物安全性测试证明载药微球安全指数较高,对癌细胞有抑制作用. 药效学实验发现姜黄素微球对兔肝癌有治疗作用. 综上,本实验研制的姜黄素栓塞微球安全性高,对肝癌的治疗效果良好,有望用于临床肝癌的治疗.

5 讨论

肝动脉化疗栓塞能够在降低化疗药物毒性的同时提高疗效,应用范围广,发展前景优越. 微球递药系统一直是药剂学领域的研究热点之一,姜黄素栓塞微球能够缓慢释放药物,载药量高,副作用少. 国内外研究均表明,载药栓塞微球对于多种类型肿瘤的临床效果比常规栓塞和化疗好. 国内外已上市销售的有 DC Bead® 栓塞微球(英国)、Hepasphere® 栓塞微球(美国)以及 CalliSphere® 栓塞微球(中国). 当前上市栓塞微球主要通过机械吸附或正负电荷结合方式载药,载药模式单一,同时载药种类有限(临床限于阿霉素、吡柔比星、伊立替康等),价格昂贵. 本研究将姜黄素包埋于载体内制备微球,扩大了栓塞载药微球药物的选择范围. 今后实验将进一步优化制剂工艺,加速栓塞微球向临床应用阶段转化,早日实现微球的生产上市.

参 考 文 献:

- [1] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA-A Cancer Journal for Clinicians*, 2021,71: 209-249. DOI:10.3322/caac.21660.
- [2] 曾倩,崔芳芳,宇传华,等. 中国癌症发病、死亡现状与趋势分析[J]. *中国卫生统计*, 2016,33(2): 321-323.
- [3] 杨家进,吴建兵. 原发性肝癌综合介入治疗进展[J]. *实用肝脏病杂志*, 2015,18(2): 118-119. DOI:10.3969/j.issn.1672-5069.2015.02.003.
- [4] RODOLFO S, GHERARDO T, NATALIA S, et al. Transarterial chemoembolization for the treatment of hepatocellular carcinoma: a review[J]. *Journal of Hepatocellular Carcinoma*, 2017,4: 105-110. DOI:10.2147/JHC.S103661.
- [5] BROWN D B, GESCHWIND J F H, SOULEN M C, et al. Society of interventional radiology position statement on chemoembolization of hepatic malignancies[J]. *Journal of Vascular & Interventional Radiology*, 2009,20(7): 317-323. DOI:10.1097/01.RVI.0000196277.76812.A3.
- [6] 王波,钱叶本,罗雪莲,等. 肝癌复发的诊断与治疗进展[J]. *肝胆外科杂志*, 2016,24(4): 307-312.
- [7] RODRIGUES J, MENEZES J L D. Modified technique of mesh hepatorrhaphy for management of juxtahepatic venous injury in a case of blunt liver trauma: a case report[J]. *European Journal of Trauma & Emergency Surgery*, 2010,36(1): 70-72. DOI:10.1007/s00068-009-8183-4.
- [8] LIU X, HENG W S, PAUL, et al. Novel polymeric microspheres containing norcantharidin for chemoembolization[J]. *Journal of Controlled Release*, 2006,116(1): 35-41. DOI:10.1016/j.jconrel.2006.08.022.
- [9] HAN S, ZHANG X, ZOU L, et al. Does Drug-eluting bead transcatheter arterial chemoembolization improve the management of patients with hepatocellular carcinoma A meta-analysis[J]. *Plos One*, 2014,9(8): 102686-102692. DOI:10.1371/journal.pone.0102686.
- [10] LAMMER J, MALAGARI K, VOGL T, et al. Prospective randomized study of doxorubicin-eluting-bead embolization in the treatment of hepatocellular carcinoma: results of the precision V study[J]. *Cardiovascular & Interventional Radiology*, 2010,33(1): 41-52. DOI:10.1007/s00270-009-9711-7.
- [11] JORDAN O, DENYS A, DE BAERE T, et al. Comparative study of chemoembolization loadable beads: in vitro drug release and physical properties of DC bead and hepasphere loaded with doxorubicin and irinotecan[J]. *Journal of Vascular & Interventional Radiology*, 2010,21(7): 1084-1090. DOI:10.1016/j.jvir.2010.02.042.
- [12] TUBA, ESATBEYOGLU, PATRICIA, et al. Curcumin-from molecule to biological function[J]. *Angewandtee Chemie-International Edition*, 2012,51: 5308-5332. DOI:10.1002/anie.201107724.
- [13] BISHT S, SCHLESINGER M, RUPP A, et al. A liposomal formulation of the synthetic curcumin analog EF24 (Lipo-EF24) inhibits pancreatic cancer progression: towards future combination therapies[J]. *Journal of Nanobiotechnology*, 2016,14(1): 1-15. DOI:10.1186/s12951-016-0209-6.
- [14] ZHAO G, HAN X, ZHENG S, et al. Curcumin induces autophagy, inhibits proliferation and invasion by downregulating AKT/mTOR signaling pathway in human melanoma cells[J]. *Oncology Reports*, 2016,35: 1065-1074. DOI:10.3892/or.2015.4413.
- [15] JORDAN B C, MOCK C D, THILAGAVATHI R, et al. Molecular mechanisms of curcumin and its semisynthetic analogues in prostate cancer prevention and treatment[J]. *Life Sciences*, 2016,152: 135-144. DOI:10.1016/j.lfs.2016.03.036.
- [16] GESCHWIND J F H, ARTEMOV D, ABRAHAM S, et al. Chemoembolization of liver tumor in a rabbit model: assessment of tumor cell death with diffusion-weighted MR imaging and histologic analysis[J]. *Journal of Vascular & Interventional Radiology*, 2000,11(10): 1245-1255. DOI:10.1016/S1051-0443(07)61299-8.
- [17] 王晓菊,周思荣,王云侠. 含有喹啉和香豆素的蓝色发光材料的合成及性能[J]. *河北大学学报(自然科学版)*, 2021,41(4): 384-389. DOI:10.3969/j.issn.1000-1565.2021.04.007.