

## Systemic transplantation of valproic acid primed human adipose stem cells on amelioration of motor deficits in animal model of cerebellar degeneration

Seyed Kamaladin Yazdanfar<sup>1</sup>, Mohammad Amin Edalatmanesh<sup>2</sup>

1. Assistant Professor of Physiology, Department of Biology, College of Sciences, Shiraz Branch, Islamic Azad University, Shiraz, Iran

2. Ph.D. Candidate in Developmental Biology, Department of Biology, College of Sciences, Shiraz Branch, Islamic Azad University, Shiraz, Iran, Tel:071-36410041, Email:amin.edalatmanesh@gmail.com

### ABSTRACT

**Background and Aim:** Cerebellar degeneration is characterized by disturbance in complex motor functions, balance, muscular strength and motor learning. This study investigated the effect of systemic transplantation of human adipose stem cells (hMSCs) primed with valproic acid (VPA) on amelioration of motor disorders in animal model of cerebellar degeneration.

**Material and Methods:** After inducing unilateral lesion in rat cerebellum (Folia VI) by quinolinic acid, *CM-Dil* labeled hMSCs isolated from adipose tissue by liposuction, were primed with VPA for 48h and transplanted by way of the jugular vein, systemically. Then, we used cylinder, rotarod, hanging wire and beam balance test to assess motor functions in a period of 6 weeks after transplantation.

**Results:** Six weeks after transplantation surviving hMSCs were detectable in the lesion site. The hMSC transplanted group showed markedly improved functional performance in motor learning, locomotor asymmetry, dysmetria, and neuromuscular strength and balance, in the first 6 weeks after transplantation compared to the control group. On the other hand, transplantation of VPA primed hMSCs led to a better amelioration in motor functions compared to non-primed hMSCs transplantation in the rats.

**Conclusion:** According to the results of this study, cell therapy by means of VPA primed hMSCs can result in improved migration and homing capacity which can be regarded as a promising treatment for neurodegenerative disorders such as cerebellar diseases.

**Keywords:** Mesenchymal stem cell, Adipose tissue, Valproic acid, Cerebellum, Motor function

**Received:** Apr 17, 2018

**Accepted:** July 23, 2018

## اثر پیوند سیستمیک سلولهای بنیادی بافت چربی انسانی تیمار شده با والپروئیک اسید بر بهبود اختلالات حرکتی در مدل حیوانی آسیب مخچه

سید کمال الدین یزدانفر<sup>1</sup>، محمد امین عدالت منش<sup>2</sup>

1. دانشجوی دکتری تکوینی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، واحد شیراز، دانشگاه آزاد اسلامی، شیراز، ایران

2. استادیار فیزیولوژی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، واحد شیراز، دانشگاه آزاد اسلامی، شیراز، ایران، تلفن ثابت: 071-36410041

amin.edalatmanesh@gmail.com

### چکیده

**زمینه و هدف:** دژنراسیون مخچه با اختلال در عملکردهای پیچیده حرکتی، تعادل، قدرت عضلانی و یادگیری حرکتی مشخص می گردد. مطالعه حاضر به ارزیابی اثر پیوند سیستمیک سلولهای بنیادی بافت چربی انسان متعاقب تیمار با والپروئیک اسید بر بهبود اختلالات حرکتی در مدل حیوانی دژنراسیون مخچه می پردازد.

**روش بررسی:** به دنبال القاء ضایعه یک طرفه در فولیوم VI مخچه موشهای صحرایی به وسیله کوئینولینیک اسید، سلولهای بنیادی مزانشیمی انسانی نشاندار شده با CM-Dil که از بافت چربی و با روش لیپوساکشن جداسازی و به مدت 48 ساعت با والپروئیک اسید تیمار شدند، از طریق ورید جوگولار پیوند زده شد. سپس، عملکردهای حرکتی با استفاده از آزمون سیلندر، روتارود، راه رفتن شعاعی و آونگ شدن طی 6 هفته پس از پیوند ارزیابی شد.

**یافته ها:** حضور سلولهای نشاندار 6 هفته پس از پیوند در محل ضایعه مشخص گردید. حیوانات دریافت کننده سلولهای بنیادی مزانشیمی بهبود معنی داری را در ارزیابی های عملکردی در یادگیری حرکتی، تقارن و تعادل حرکتی، دیسمتری، توانایی عصبی-عضلانی و تعادل طی 6 هفته پس از پیوند در مقایسه با گروه دریافت کننده حامل سلولی نشان دادند. از طرف دیگر، پیوند سلولهای بنیادی تیمار شده با والپروئیک اسید بهبود قابل توجهی در عملکردهای حرکتی نسبت به حیوانات دریافت کننده سلولهای تیمار نشده از خود نشان دادند.

**نتیجه گیری:** بر اساس نتایج حاصل از این تحقیق، سلول درمانی با استفاده از سلولهای بنیادی بافت چربی تیمار شده با والپروئیک اسید، با افزایش توان مهاجرت و لانه گزینی بهتر سلولی می تواند نویدی برای درمان بیماری های نورودژنراتیو نظیر اختلالات مخچه ای باشد.

**کلید واژه ها:** سلولهای بنیادی مزانشیمی، بافت چربی، والپروئیک اسید، مخچه، فعالیت های حرکتی

وصول مقاله: 97/1/28 اصلاحیه نهایی: 97/4/30 پذیرش: 97/5/1

## مقدمه

آسیب های مخچه ای سبب بروز بسیاری از اختلالات حرکتی نظیر ناتوانی در تعادل، آتاکسی، عدم هماهنگی عضلانی، دیستمری، اختلالات حرکتی بینایی، اختلال در تکلم و لرزش می شوند (1). در مراحل اولیه اختلالات دژنراتیو مخچه ای، قدرت تعادل کاهش می یابد و ناتوانی به هنگام ایستادن پدیدار می گردد. با پیشرفت بیماری، راه رفتن دچار اشکال میشود. سرانجام عدم کنترل تعادل و اسپاسمهای عضلانی دو طرفه و آتاکسی آغاز میگردد. به مرور زمان اختلال در تکلم، بلع و مشکلات تنفسی ظاهر میشوند که نهایتاً منجر به مرگ خواهد شد (2).

علیرغم پیشرفت قابل توجهی که در زمینه های مختلف پزشکی ترمیمی صورت گرفته است، تا کنون درمان قطعی برای اختلالات نورودژنراتیو که علت بیماری را ریشه کن کنند، وجود نداشته است (3). طی سالهای اخیر رویکرد استفاده از سلولهای بنیادی در درمان بیماریهای نورودژنراتیو امیدوار کننده بوده است. به نظر می رسد که سلولهای بنیادی بتوانند با ترمیم یا جایگزین کردن بافتهای صدمه دیده در پزشکی ترمیمی نقطه عطفی را ایجاد کنند (4). سلولهای بنیادی مزانشیمی به عنوان یک کاندید مناسب برای سلول درمانی معرفی شده اند (5). این سلولها از منابع مختلفی قابل جدا سازی و تخلیص هستند. استفاده از بافت چربی به عنوان یکی دیگر از منابع بافتی سلولهای بنیادی قابلیت بیشتری نسبت به سایر منابع از جمله مغز استخوان در پیوندهای سلولی از خود نشان داده است (6). تزریق این سلولها از منبع سهل الوصول بافت چربی، سبب بهبود روند تشکیل عروق جدید در اندامهای ایسکمیک و قابلیت تعدیل ایمنی بهتر در بافت هدف پیوند و جلوگیری از رد پیوند حتی در پیوندهای بین گونه ای می گردد (7).

از دیگر ویژگی های سلول های بنیادی که بر نتیجه درمان تاثیر بسیار مهمی دارد، قابلیت مهاجرت و لانه گزینی مناسب سلولها است (8). هرچند، مکانیسم مهاجرت و لانه گزینی هنوز به درستی مشخص نشده است اما به نظر می رسد که تعاملات بین لیگاندها و رسپتورهای کموکاینی در این امر نقش مهمی داشته باشند (9). یکی از بزرگترین موانع در پیوند سیستمیک سلولهای بنیادی، مهاجرت نامناسب و غیرکافی سلولهای تزریق شده به بافت هدف است (10). به نظر می رسد، هر چه سلولها رسپتورهای کموکاینی بیشتری بیان کنند، قدرت مهاجرت بیشتری نیز دارند. مطالعات قبلی بیان بالاتری از رسپتورهای کموکاینی را در سلولهای بنیادی بافت چربی نسبت به سایر منابع سلولهای بنیادی مزانشیمی نشان داده است (11). با این حال، می توان میزان این گیرنده ها را به کمک برخی مواد شیمیایی افزایش داد (12). از جمله این ترکیبات میتوان به لیتیوم، کبالت، دفروکسامین و مهارکننده های هیستون داستیلازی مانند والپروئیک اسید و تریکوستاتین A اشاره کرد (13).

مهار کننده های هیستون داستیلازی نظیر والپروئیک اسید (VPA) در تنظیم نسخه برداری به کمک روندهای اپی ژنتیک نقش مهمی ایفا می کنند (14). اخیراً نشان داده شده تیمار با VPA مهاجرت سلول های بنیادی مزانشیمی را به بافت هدف پیوند با افزایش بیان گیرنده کموکاینی CXCR4 افزایش داده است (15). همچنین، تیمار سلول های بنیادی مزانشیمی با VPA توانایی لانه گزینی این سلول ها را افزایش داده و عملکرد ترمیمی را در مدل ایسکمی مغزی بهبود بخشیده است (16). افزایش بیان و ترشح فاکتورهای نوروتروفیک توسط سلولهای بنیادی نیز به عنوان راهکار جالبی در بهبود ضایعات مغزی به دنبال سلول درمانی پیشنهاد شده است، به گونه ای که تیمار سلولهای بنیادی عصبی به کمک سلزلیین، سبب تقویت توان تمایزی

صورت نگرفت. گروه Vehicle اعضای این گروه 48 ساعت پس از القاء ضایعه یک طرفه در فولیوم VI نیمکره راست مخچه با کوئینولینیک اسید، حامل سلولهای بنیادی یعنی PBS را به صورت درون وریدی دریافت نمودند. گروه hMSC: به این گروه 48 ساعت پس از القاء دژنراسیون مخچه ای سلولهای بنیادی بافت چربی انسانی تزریق شد. گروه hMSC+VPA: در این گروه پس از القاء ضایعه مخچه ای سلولهای بنیادی بافت چربی تیمار شده با الپروئیک اسید تزریق شد.

استخراج سلول های بنیادی مزانشیمی بافت چربی انسان: نمونه بافت چربی به روش جراحی لاپوساکشن از یک مرد سالم (37 ساله) و توسط جراح در بیمارستان جمع آوری شد. سپس نمونه ها بر روی یخ و در کمترین زمان به آزمایشگاه انتقال داده شدند. نمونه های بافت چربی 4-5 بار با فسفات بافر سالین (PBS, Gibco) محتوی 1 درصد آنتی بیوتیک (پنی سیلین / استرپتومایسین، Biosera) شستشو داده شد. سپس، نمونه ها به مدت 15 دقیقه در محیط آزمایشگاه قرار داده شد تا فاز مایع و چربی به آرامی از یکدیگر جدا شوند. فاز مایع دور ریخته شد و هضم کلاژنازی بافت چربی با استفاده از کلاژناز 0/1 درصد (تیپ 1، Sigma) به مدت 1 ساعت انجام شد. پس از سانتریفیوژ نمونه های بافتی هضم شده با دور 5000 rpm در زمان 5 دقیقه سلولهای باقی مانده در کف لوله آزمایش با محیط کشت (DMEM, Gibco) حاوی 10 درصد سرم جنینی گاو (FBS, Gibco) و 1 درصد آنتی بیوتیک کشت داده شد (16). سلولها پس از رسیدن به تعداد مناسب در پاساژ سوم جهت پیوند آماده سازی شد.

تمایز سلولهای تخلیص شده به سلولهای شبه عصبی: جمعیت های سلولی کاملاً همگن از سلولهای بنیادی مزانشیمی بافت چربی انسانی در پاساژ سوم پس از تریپسینه شدن، شمارش شده و حدود 50 هزار سلول به هر یک از

این سلولها و بیان فاکتورهای نوروتروفیک می گردد (17). همچنین، تیمار سلولهای بنیادی عصبی با VPA توان تمایز این سلولها را به نورون افزایش داده است (18).

احتمالاً تا کنون مطالعه ای درباره اثر تیمار سلولهای بنیادی مزانشیمی با مهار کننده هیستون داستیلازی بر بهبود مهاجرت و لانه گزینی در ضایعات مخچه ای و درمان اختلالات حرکتی ناشی از آن صورت نگرفته است، مطالعه حاضر به ارزیابی اثر پیوند سیستمیک سلولهای بنیادی مزانشیمی بافت چربی انسان با و بدون تیمار با VPA بر بهبود اختلالات حرکتی در مدل حیوانی دژنراسیون مخچه می پردازد.

## روش بررسی

حیوانات و گروهبندی:

در این مطالعه تجربی از 40 سر موش صحرایی نر نژاد ویستار، با میانگین وزنی  $220 \pm 10$  گرم و سن تقریبی  $75 \pm 5$  روز استفاده شد. این حیوانات که در مرکز پرورش و تکثیر حیوانات دانشگاه آزاد اسلامی شیراز پرورش یافتند، تحت شرایط استاندارد دما ( $25 \pm 2$  درجه سانتی گراد) و رطوبت ( $50 \pm 10$  درصد) و چرخه ی روشنایی- تاریکی 12 ساعته (6 صبح تا 6 عصر) نگهداری شدند. در این پژوهش از غذای مخصوص موش آزمایشگاهی تولیدی شرکت 110 فارس استفاده شد و به همراه آب آشامیدنی به صورت نامحدود در اختیار حیوانات قرار گرفت. کلیه مراحل کار با حیوانات، طبق قوانین حمایت از حیوانات آزمایشگاهی و با نظارت کمیته اخلاقی دانشگاه آزاد اسلامی شیراز انجام شد. تمامی اعمال جراحی و نمونه-گیری ها تحت بیهوشی کامل صورت گرفت و حیوانات با رعایت اصول اخلاقی از چرخه حیات خارج شدند.

حیوانات به صورت تصادفی در 4 گروه 10 تایی تقسیم بندی شدند. گروه کنترل: هیچ نوع تیماری بر روی آنها

PBS برای رسیدن به غلظت نهایی استفاده و به فلاسک کشت اضافه شد. سپس، سلولها به مدت 5 دقیقه در انکوباتور 37 درجه سانتیگراد و متعاقباً به مدت 10-15 دقیقه در یخچال 4 درجه سانتیگراد (جهت افزایش نفوذ پذیری سلولها به رنگ) قرار داده شدند. برای مشاهده سلولها از میکروسکپ فلورسنت (Olympus IX71, Japan) استفاده شد (21).

القاء دژنراسیون مخچه ای و پیوند سلول: حیوانات با مخلوطی از دو ماده کتامین هیدروکلراید (70mg/kg) و زایلازین (5mg/kg) بیهوش و پس از آماده سازی ناحیه سر در فریم استریوتاگس تثبیت شدند (22). جراحی استریوتاگسیک به منظور دست یابی به فولیوم VI (نیمکره راست مخچه) صورت گرفت. مختصات فولیوم VI با استفاده از اطلس پاکسینوس و واتسون به دست آمد. مختصات به دست آمده نسبت به نقطه برگما عبارت است از DV:+4mm, ML:+4mm, AP:-11.96mm پس از دستیابی به نقطه تزریق، مقدار 2 میکرولیتر کوئینولینیک اسید با غلظت 0/2 میلی مولار (QA, 0.2mM, Merk, Germany) به آرامی و با استفاده از سرنگ هامپلتون 2 میکرولیتری درون فولیوم VI مخچه در مدت 5 دقیقه تزریق گردید (22). با اتمام تزریق خارج کردن سوزن از موضع تزریق در یک بازه زمانی دو دقیقه ای انجام شد. محل برش بر روی پوست سر بخیه زده شد و بعد از ضد عفونی با بتادین، حیوان به قفس ریکاوری و پتوی گرم کننده منتقل شد. تا زمان به هوش آمدن کامل حیوان و پس از آن علائم حیاتی، وضعیت تنفس، تعداد ضربان قلب و سرعت آن و دمای بدن چک شد. 48 ساعت پس از القای ضایعه، پیوند سلولی در گروههای دریافت کننده سلول انجام شد. در روز پیوند سلولها را تریپسینه و شمارش می شوند و میزان زنده بودن آنها با استفاده از تریپان بلو (Sigma, USA) مشخص گردید. حدود یک میلیون

خانه های ظرف کشت 6 خانه (6-wells plate, SPL, Life Science, Korea) افزوده شد. سه خانه به عنوان کنترل و سه خانه به عنوان تست بررسی شد. میزان  $2^{cc}$  محیط کشت حاوی رتینوئیک اسید ( $10^{-5}$  M, RA, Sigma) به خانه های تست و  $2^{cc}$  محیط کشت بدون رتینوئیک اسید به خانه های کنترل افزوده شد. ظرف کشت به انکوباتور  $CO_2$  (Binder, USA) منتقل شد. به دنبال تکثیر و رشد سلولها و با تغییر رنگ محیط کشت، هر 4 روز محیط کشت تازه و ویژه هر خانه جایگزین گردید. حدود 21 روز پس از افزودن رتینوئیک اسید، سلولهای با مورفولوژی سلولهای عصبی در خانه های تست دیده شد. هر کدام از این سلولها با میکروسکپ دوربین دار (Olympus, Invert, DP12-2, Japan) تصویربرداری شد و سپس مورفولوژی آنها با سلولهای عصبی تطبیق داده شد (19).

تیمار سلولها با والپروئیک اسید و نشاندار کردن سلولهای بنیادی:

48 ساعت قبل از پیوند سلولهای بنیادی بافت چربی، محلول 5 میلی مولار والپروئیک اسید (VPA, Sigma) تهیه و پس از استریل شدن با فیلتر سرسرنگی (Jet Biofil, Canada) با منافذ 0/2 میکرومتری استریل و به فلاسک های کشت سلول (T25, SPL Life Science, Korea) با میزان 70 تا 80 درصد پر شدگی سلولی در پاساژ سوم افزوده شد (20).

در روز پیوند، جهت نشاندار کردن سلولها از رنگ لیبوتروفیک و حیاتی (1,1'-dioctadecyl-) CM-DiI ( $3,3,3',3'$ -tetramethylindocarbocyanine perchlorate, Invitrogen) که سیتوپلاسم سلولها را رنگ می کند، استفاده شد. جهت تهیه یک میلی گرم بر میلی لیتر از رنگ حاصل، حلال دی متیل سولفوکساید (DMSO, Sigma, USA) به میزان 50 میکرولیتر و

روز آزمون، مدت زمان رسیدن حیوانات به انتهای میله در سه تکرار متوالی ثبت شد. برای حیواناتی که قادر نیستند تمام طول میله را طی کنند و از روی آن می افتند، مسافت پیموده شده حرکت محاسبه شد، بدین ترتیب سرعت پیمایش مسیر در این آزمون مورد بررسی قرار گرفت. آزمون سیلندر:

موشهای صحرایی به دنبال القاء دژنراسیون مخچه دچار نقص حرکتی در اندام حرکتی جلویی در یک طرف بدن هستند. با تخریب یک نیمه از مخچه، فلج شدگی، دیستونی و سختی عضلانی و نیز عدم تعادل در یک سمت از بدن، بعد از جراحی دیده شد. در این آزمون درصد استفاده از دست آسیب دیده به دست سالم بعد از پیوند محاسبه شد. در هر آزمون، سه تکرار متوالی و با فاصله‌ی زمانی 1 ساعت صورت گرفت. حیوانات در سیلندر شفاف از جنس پلکسی گلس به قطر  $20\text{cm}$  و ارتفاع  $30\text{cm}$  قرار گرفتند (22). هر بار که حیوان اقدام به خروج از سیلندر می نماید، دست خود را بر روی دیواره‌ی سیلندر قرار می دهد. بسته به این که حیوان دست آسیب دیده، سالم یا هر دو دست را روی دیواره قرار دهد، نتایج ثبت می شود. پس از 20 بار اقدام به فرار و قرار گرفتن دست روی دیواره، رت از سیلندر خارج و در جعبه‌ی خودش قرار می گیرد.

ردیابی سلولهای نشاندار شده:

برای انجام مطالعات بافتی، پس از بیهوش کردن حیوانات با دوز کشنده‌ی کلروفورم در هفته‌ی هفتم پس از پیوند سلول؛ پرفیوژن ترانس کاردیالی انجام شد. سپس، مغز به دقت از مجامه خارج و مخچه از آن جدا شد. برش های 7 میکرومتری از نمونه های مخچه در گروههای مختلف تهیه شد و بدون هر گونه رنگ آمیزی در زیر میکروسکپ فلورسنت جهت اطمینان از حضور سلولها در بافت هدف بررسی شد. برای مشاهده سلولهای نشاندار از فیلتر

سلول به همراه 0/5 سی سی PBS با سرنگ انسولین به صورت درون وریدی از طریق ورید جوگولار و پس از بیهوشی مختصر حیوانات به کمک اتر به آهستگی تزریق شد. گروه hMSC+VPA سلولهای تیمار شده با والپروئیک اسید و گروه hMSC سلولهای تیمار نشده را دریافت نمودند. گروه Vehicle حامل سلولی یعنی 0/5 سی سی PBS دریافت می نمایند.

آزمایشات حرکتی:

در این تحقیق از چهار آزمون استاندارد حرکتی شامل آزمون های روتارود، راه رفتن شعاعی، آونگ شدن و سیلندر استفاده شد. کلیه آزمون ها در هفته های دوم، چهارم و ششم پس از پیوند سلول انجام شد. آزمون ها در ساعاتی از شبانه روز که تحرک موشهای صحرایی بالاست (بین ساعت 17 تا 20)، انجام شد (22).

آزمون روتارود:

دستگاه روتارود (میله چرخان) با قابلیت افزایش خود به خودی تعداد دور در دقیقه برای ارزیابی هماهنگی حرکتی و یادگیری حرکتی طراحی شده است (21). حیوانات به منظور آشنایی با دستگاه، بر روی میله چرخان قرار داده شده و دستگاه با سرعت 5 دور در دقیقه شروع به چرخش کرده و در زمان 300 ثانیه به 45 دور در دقیقه می رسد. در هفته های آزمون، حیوانات سه روز متوالی و با چهار تکرار در هر روز به فواصل یک ساعت آزمون می شوند. مدت زمان باقی ماندن روی میله چرخان در هر بار تکرار ثبت شد.

آزمون راه رفتن شعاعی:

ابزار مورد نیاز برای این آزمون یک میله چوبی به قطر 3 سانتی متر و طول یک متر است که 30 سانتی متر بالاتر از سطح میز قرار دارد و در یک انتها به یک سکوی 40 سانتی متر مربعی ختم می شود (21). حیوانات قبل از انجام آزمایش چند دقیقه بر روی این میله چوبی قرار داده شده و به آنها آموخته می شود که به سمت سکو حرکت کنند. در

Omega XF32 (Omega Optical, Inc.) استفاده

شد.

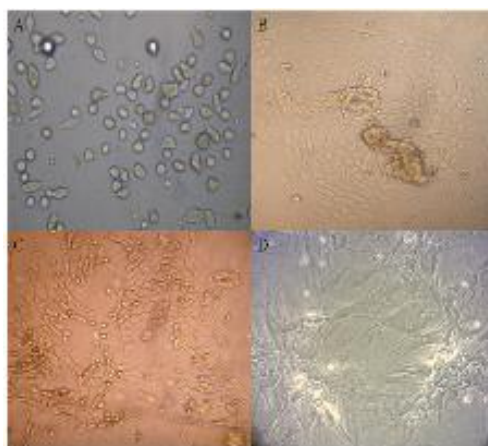
محاسبات آماری:

تجزیه و تحلیل آماری بین گروههای مختلف با استفاده از نرم افزار SPSS ویرایش 22 انجام شد. پس از حصول اطمینان از توزیع نرمال داده ها به کمک آزمون کلموگروف-اسمیرنوف، به منظور تعیین وجود اختلاف معنی دار بین گروههای مورد نظر، از آزمون آنالیز Repeated measures ANOVA و پس آزمون توکی استفاده شد. از نظر آماری مقادیر  $p < 0/05$  معنی دار در نظر گرفته شده است.

### یافته ها

مورفولوژی سلولهای کشت داده شده:

سلول های حاصل از کشت اولیه مورفولوژیهای مختلفی را نشان دادند. در پاساژ اولیه سلولها کروی شکل و اغلب دارای زائده کوتاه هستند. به تدریج این سلول ها کاملاً کشیده بوده و مورفولوژی آنها شبیه به سلول های فیبروبلاستی بود. جمعیت های همگن سلولی در پاساژ 3، آماده نشاندار شدن و تزریق بود (تصویر 1).



تصویر 1. تغییرات مورفولوژیک سلولهای بنیادی استخراج شده از بافت چربی انسانی. از سلولهای کروی شکل در روز اول گرفته (A) تا سلولهای کشیده و فیبروبلاست شکل در روزهای 8 تا 15 (B-D). پس از اولین پاساژ مورفولوژی سلولها نسبتاً همگن هستند. سلولها کلونی های با قدرت تکثیر بالا را ایجاد کرده اند. بزرگنمایی: 40X

همراه تغییر شکل ظاهری سلولهای کشت داده شده و ظاهر شبه عصبی آنها 21 روز پس از تیمار نسبت به قبل از تیمار کاملاً مشخص است (تصویر 2).

تیمار تمایزی با رتینوئیک اسید:

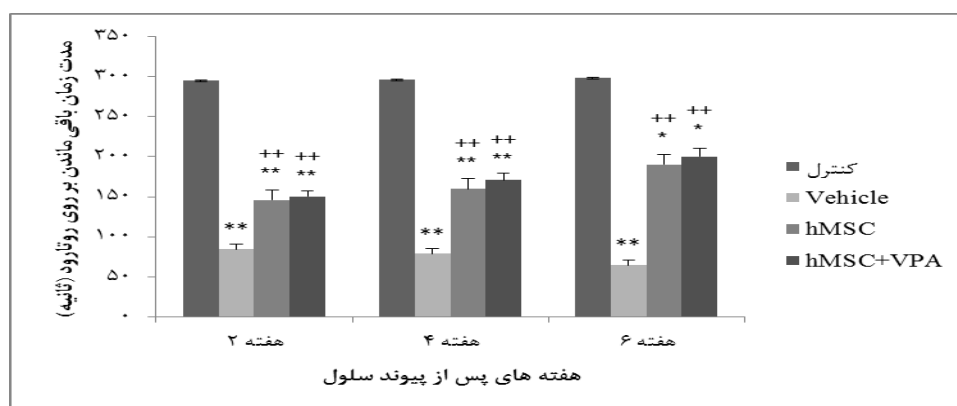
در طی تمایز سلولهای حاصل به سلولهای شبه عصبی با رتینوئیک اسید، کاهش قابل توجه تعداد سلولها به



تصویر 2. مورفولوژی سلولها در پاساژ سوم قبل از تیمار با رتینوئیک اسید (A) و سلولهای شبه عصبی به دست آمده به دنبال تیمار با رتینوئیک اسید با بزرگنمایی 40X (B) و بزرگنمایی 100X (C).

کننده پیوند (hMSC و hMSC+VPA) نسبت به گروه Vehicle طی هفته های دوم، چهارم و هشتم افزایش معنی داری داشت ( $p < 0/001$ ). هر چند، گروه دریافت کننده سلولهای بنیادی مزانشیمی تیمار شده با والپروئیک اسید (hMSC+VPA) نسبت به گروه دریافت کننده سلولهای بنیادی تیمار نشده (hMSC) عملکرد بهتری را در هفته های دوم و چهارم پس از پیوند نشان دادند. اما بین این دو گروه اختلاف معنی داری در مدت زمان باقی مانده بر روی میله چرخان مشاهده نشد ( $p > 0/05$ ).

نتایج حاصل کاهش معنی داری را در مدت زمان باقی ماندن بر روی روتارود در گروه دریافت کننده حامل (Vehicle) نسبت به گروه کنترل در هر سه بازه زمانی 2، 4 و 6 هفته پس از پیوند نشان داد (نمودار 1،  $p < 0/001$ ). همچنین، بین گروه کنترل و گروههای دریافت کننده سلول در هر سه بازه زمانی اختلاف معنی داری دیده شد (در هفته دوم و چهارم:  $p < 0/001$ ، در هفته ششم:  $p < 0/01$ ). مدت زمان باقی ماندن بر روی میله چرخان در گروههای دریافت

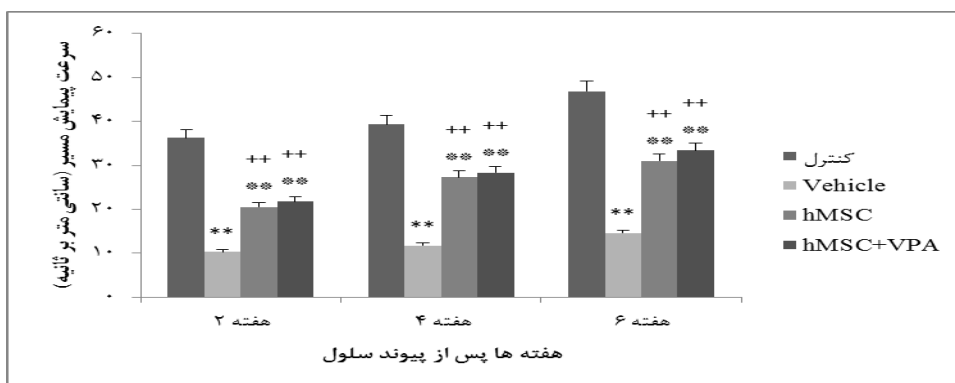


نمودار 1. مقایسه میانگین و انحراف معیار مدت زمان باقی ماندن بر روی روتارود. حیوانات گروههای Vehicle، hMSC و hMSC+VPA زمان کمتری نسبت به گروه کنترل بر روی میله باقی ماندند ( $p < 0/01$  و  $p < 0/001$ ). بین گروههای دریافت کننده سلولهای بنیادی نسبت به گروه Vehicle از دو هفته بعد از دریافت سلول تا هفته ششم پس از پیوند است افزایش معنی داری در مدت زمان باقی ماندن بر روی میله چرخان دیده شد ( $++p < 0/001$ ).

میدهند ( $p < 0/001$ ). بین گروه کنترل و هر دو گروه دریافت کننده سلول در هفته دوم و چهارم و ششم پس از پیوند اختلاف معنی دار دیده شد ( $p < 0/001$ ). مقایسه بین گروه hMSC+VPA و گروه hMSC اختلاف معنی داری را در هیچ یک از بازه های زمانی پس از پیوند سلولی نشان نداد.

آزمون راه رفتن شعاعی:

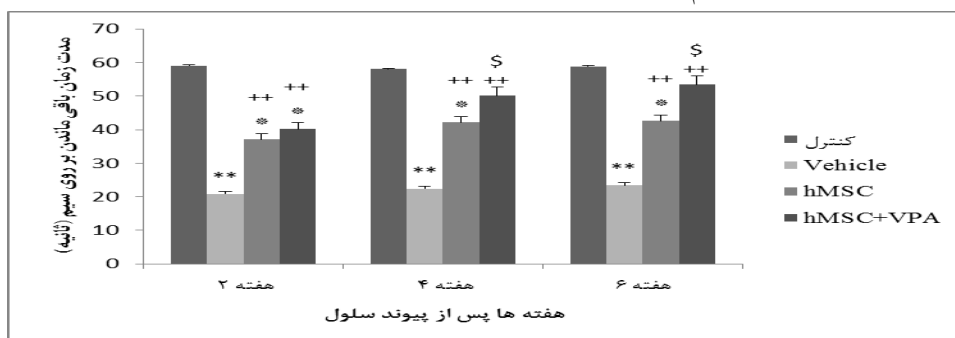
سرعت پیمایش مسیر بر روی میله چوبی در گروه Vehicle نسبت به گروه کنترل کاهش معنی داری از خود نشان داد (نمودار 2،  $p < 0/001$ ). در گروههای hMSC+VPA و hMSC سرعت حرکت به مرور زمان افزایش می یابد و نسبت به گروه دریافت کننده حامل افزایش معنی داری را در هر سه بازه زمانی نشان



نمودار 2. مقایسه میانگین و انحراف معیار سرعت در آزمون راه رفتن شعاعی. بین گروه کنترل و گروههای hMSC, vehicle و hMSC+VPA اختلاف معنی دار است ( $p < 0/001$ ). بین گروههای دریافت کننده سلول با گروه حامل اختلاف معنی داری در هر سه بازه زمانی دیده شد ( $p < 0/001$ ).

اختلاف معنی داری در مدت زمان آویزان ماندن از خود نشان داد ( $p < 0/01$ ). با این حال، در گروههای دریافت کننده سلولهای بنیادی مزانشیمی نسبت به گروه Vehicle افزایش معنی داری در مدت زمان آویزان ماندن طی هفته های مورد بررسی دیده شد ( $p < 0/001$ ). بین گروه hMSC با گروه hMSC+VPA در هفته چهارم و ششم پس از پیوند اختلاف معنی داری دیده شد ( $p < 0/05$ ).

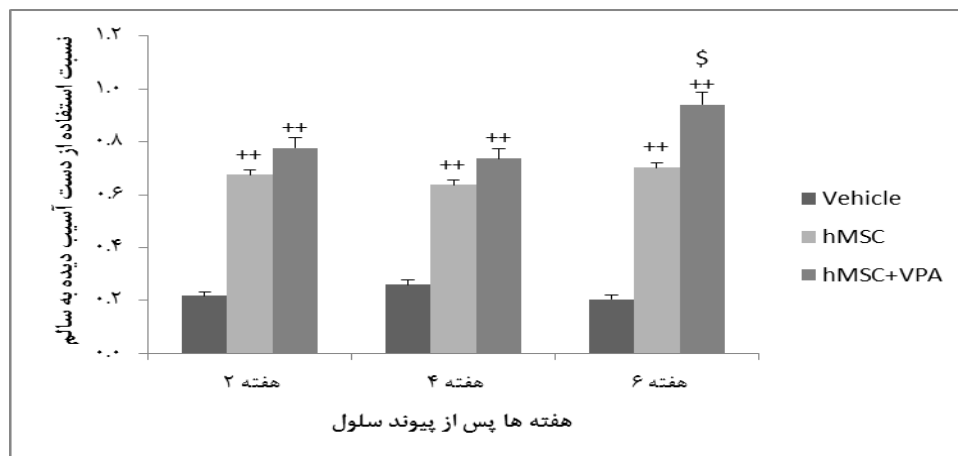
آزمون آونگ شدن: نتایج نشان داد که در گروه Vehicle، میانگین مدت زمان آویزان باقی ماندن نسبت به گروه کنترل کاهش معنی داری در هر سه بازه زمانی وجود دارد (نمودار 3). همچنین، بین گروه hMSC با گروه کنترل در هفته دوم، چهارم و پنجم اختلاف معنی داری در سطح  $p < 0/01$  دیده شد. گروه hMSC+VPA نسبت به گروه کنترل تنها در هفته دوم پس از پیوند



نمودار 3. مقایسه میانگین و انحراف معیار مدت زمان آویزان ماندن از سیم. حیوانات گروه Vehicle کاهش معنی داری را در سقوط از سیمی که از آن آویزان شده اند نسبت به گروه کنترل در هر سه بازه زمانی نشان دادند. در حالی که بین گروه hMSC نیز با گروه کنترل در هر سه بازه زمانی اختلاف معنی دار است در گروه hMSC+VPA تنها در هفته دوم با کنترل اختلاف معنی دار دیده شد ( $p < 0/01$  و  $p < 0/001$ ). گروه دریافت کننده سلولهای بنیادی (hMSC+VPA و hMSC) مدت زمان بیشتری را نسبت به گروه Vehicle از سیم آویزان می مانند ( $p < 0/0001$ ). مقایسه بین گروههای hMSC+VPA و hMSC اختلاف معنی داری در در هفته های چهارم و ششم پس از پیوند نشان داد ( $p < 0/05$ ).

مقایسه با گروه دریافت کننده حامل در استفاده از دست ضایعه دیده دارند ( $p < 0/001$ ). گروه hMSC+VPA نسبت به گروه hMSC در هفته پایانی یعنی هفته ششم پس از پیوند نسبت بالاتری از استفاده از دست آسیب دیده را به دست سالم از خود نشان داد ( $p < 0/05$ ).

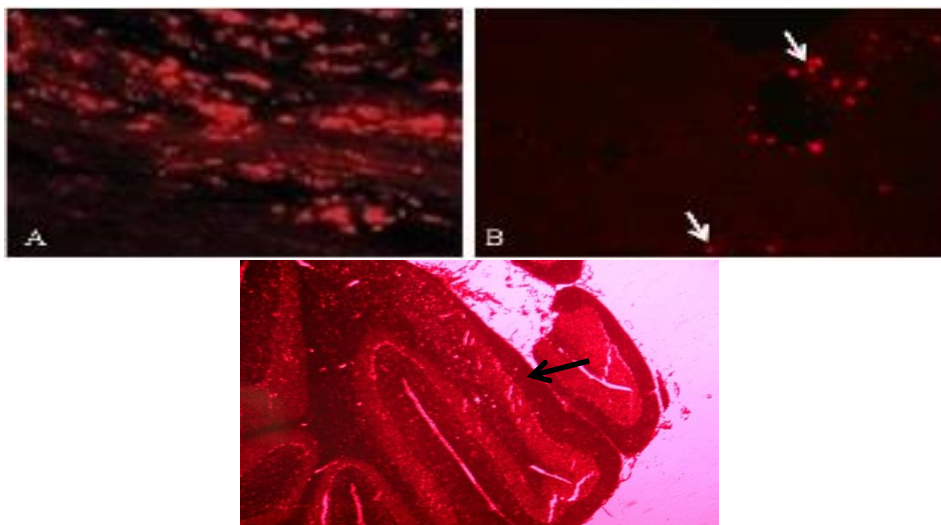
آزمون سیلندر: توانایی استفاده از دست ها در حیوانات آسیب دیده با استفاده از آزمون سیلندر ارزیابی شد (نمودار 4). نتایج نشان داد که حیوانات دریافت کننده سلولهای بنیادی مزانشیمی انسانی بهبود معنی داری را طی 6 هفته پس از پیوند در



نمودار 4. مقایسه مسانگین و انحراف معیار نسبت استفاده از دست آسیب دیده به سالم در آزمون سیلندر. بین گروه Vehicle و گروههای دریافت کننده سلول در هر سه بازه زمانی اختلاف معنی داری دیده شد ( $p < 0/001$ ). نسبت استفاده از دست صدمه دیده به سالم در رتهای گروه hMSC+VPA نسبت به گروه hMSC در هفته ششم معنی دار بود ( $p < 0/05$ ).

برش های فرونتال از مخچه حضور سلولهای نشاندار را در اطراف محل ضایعه حدود 50 روز پس از پیوند سلول در گروه hMSC+VPA می توان مشاهده نمود (تصویر 3B). هر چند در گروه hMSC سلولی در موضع پیوند دیده نشد.

ردیابی سلولهای بنیادی مزانشیمی در موضع پیوند: همانطور که در تصویر 3A دیده می شود، سلولهای نشاندار شده با رنگ Dil قبل از پیوند در زیر میکروسکپ فلورسنت و با فیلتر مخصوص مطالعه شدند و نتایج حاصل از شمارش سلولهای نشاندار مشخص کرد که بیش از 60 درصد این سلولها با رنگ Dil نشاندار می شوند (3A). پس از تهیه



تصویر 3. فتومیکروگراف فلورسنت از سلولهای بنیادی مزانشیمی بافت چربی انسانی نشاندار شده با Dil قبل از پیوند در فلاسک (A)، حضور سلولهای نشاندار شده در مخچه آسیب دیده گروه hMSC+VPA 50 روز پس از پیوند سلول (B) و موقعیت آسیب آسب الفاء شده با QA در فولیوم VI مخچه (C). بزرگنمایی تصاویر A و B: 40 X، تصویر C: 10X.

### بحث

در تحقیق حاضر، نتایج مطالعه نشان داد که آسیب یک طرفه در فولیوم VI مخچه سبب ایجاد اختلالات حرکتی می گردد. از طرفی، بر اساس مطالعات رفتاری مشخص شد که پیوند سیستمیک و درون وریدی سلولهای بنیادی مزانشیمی بافت چربی در مدل آسیب مخچه ای سبب بهبود نواقص حرکتی در موشهای صحرایی می گردد. این بهبودی با استفاده از آزمونهای حرکتی نظیر روتارود، راه رفتن شعاعی، آونگ شدن و سیلندر که به ترتیب به ارزیابی یادگیری حرکتی، تعادل، قدرت عصبی-عضلانی و دیستونی می پردازند، مورد تأیید قرار گرفت. به طوری که تفاوت معنی داری بین گروه ضایعه دیده (دریافت کننده حامل) و گروه دریافت کننده سلولهای بنیادی دیده شد. تیمار سلولهای بنیادی با استفاده از مهار کننده هیستون داستیلازی (والپروئیک اسید) سبب تقویت توان مهاجرت سلولها و بهبود حرکتی در آسیب مخچه ای گردید. در واقع، مشاهدات رفتاری حاکی از بهبودی حرکتی نسبی در گروه دریافت کننده سلولهای بنیادی تیمار شده با

والپروئیک اسید نسبت به گروه دریافت کننده سلولهای تیمار نشده دارد.

پیشرفت های جدید نشان میدهد که جایگزینی نورونی به دنبال پیوند سلولهای بنیادی در ناحیه ضایعه دیده مغز می تواند سبب بهبود عملکردی گردد (23). همچنین، تسریع روند نوروزنر در مغز بالغین و در پاسخ به ضایعات مغزی می تواند هدف سلول درمانی باشد (24). این یافته ها امید استفاده از سلولهای بنیادی را برای درمان بیماریهای نورودژنراتیو انسانی نوید میدهند. مطالعات اخیر نشان داده اند که پیوند سلولهای بنیادی، اختلالات حرکتی را در بیماریهای نورودژنراتیو حرکتی کاهش میدهد (25). هرچند تاکنون، ارتباط بین جنبه های نورولوژیک بیماریهای نورودژنراتیو و بهبود عملکردی آنها پس از پیوند سلولهای بنیادی روشن نشده است، اما تصوراتی وجود دارد که چندین مکانیزم مختلف از جمله، تمایز سلولهای پیوندی به سلولهای عصبی در شرایط *in vivo*، جایگزینی عصبی، آزادسازی فاکتورهای رشد و کموکاین ها توسط سلولهای پیوندی می تواند سبب بهبود ضایعات عصبی گردد (26).

مهاجرت و لانه‌گزینی سلول‌های بنیادی تزریق شده به داخل بدن شود (12).

تیمار سلول‌های بنیادی مزانشیمی با VPA قبل از پیوند مهاجرت این سلول‌ها را به سوی مناطق آسیب دیده مغز در رت‌ها افزایش می‌دهد و لانه‌گزینی را بیشتر می‌کند (15). همچنین، سلول‌های بنیادی مزانشیمی تیمار شده به وسیله VPA حجم بافت آسیب دیده هدف را کاهش می‌دهد و آنژیوژنز و ترمیم عملکردی را در کورتکس و جسم مختلط ارتقاء می‌بخشد (15). نادری مشکین و همکارانش نشان داده‌اند که تیمار سلول‌های بنیادی بافت چربی انسان به کمک عواملی که تقلید کننده شرایط هایپوکسیک هستند، بیان فاکتورهای کموکاینی مانند CXCR4 را افزایش می‌دهند و از این رو سبب افزایش مهاجرت سلول‌های بنیادی در شرایط *in vitro* می‌شوند (13). تیمار 48 ساعته سلول‌های بنیادی با VPA در غلظت 5 میلی‌مولار میزان بیان CXCR4 را چندین برابر افزایش می‌دهد و احتمالاً این امر سبب افزایش قابلیت مهاجرت این سلول‌ها در شرایط *in vivo* می‌گردد (20).

در مطالعه اخیر، گروه دریافت کننده سلول‌های بنیادی تیمار شده با VPA (hMSC+VPA) در سه بازه زمانی دو، چهار و شش هفته پس از پیوند سلول با سایر گروه‌ها مورد مقایسه قرار گرفتند و نتایج نشان داد که تیمار سلول‌ها با VPA سبب افزایش قدرت عضلانی، افزایش زمان معلق ماندن از سیم و افزایش سرعت راه رفتن بر روی میله چوبی می‌گردد. به گونه‌ای که در هفته‌های پایانی پس از پیوند، اختلاف معنی‌داری بین گروه hMSC+VPA با گروه دریافت کننده سلول‌های بنیادی تیمار نشده (hMSC) دیده شد. مشاهده جمعیت قابل توجه سلول بنیادی نشاندار 7 هفته پس از پیوند در نیمکره آسیب دیده مخچه گروه hMSC+VPA نیز نشان‌دهنده نقش VPA در القاء لانه‌گزینی سلولی می‌باشد.

مطالعه قبلی ما نیز نشان داد که پیوند سیستمیک سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان اختلالات حرکتی در مدل حیوانی دژنراسیون استریاتومی بهبود می‌بخشد (27) و پتانسیل درمانی این سلول‌ها را در بهبود اختلالات حرکتی و شناختی ناشی از دژنراسیون مخچه به اثبات رساند (28).

در این مطالعه، ضایعه مخچه‌ای که با کوئینولینیک اسید ایجاد شد به مرور زمان شدت بیشتری در اختلالات رفتاری نشان داد. اما میزان اختلال حرکتی در گروه‌های دریافت کننده سلول‌های بنیادی مزانشیمی کمتر بود. هرچند، در هفته هفتم پس از پیوند، تعداد کمی از سلول‌های بنیادی نشاندار تنها در نیمکره راست مخچه گروه hMSC+VPA قابل ردیابی بود. این یافته‌ها نشان داد که سلول‌های پیوندی احتمالاً از دژنراسیون سلول‌های عصبی جلوگیری به عمل می‌آورند و این احتمال وجود دارد که ترشح فاکتورهای رشد توسط سلول‌های بنیادی مزانشیمی در جایگاه پیوند سبب حفظ سلول‌های مخچه‌ای و بهبود اختلالات حرکتی شده است.

تاکنون مطالعات زیادی در مورد اینکه چه رده‌های سلولی مناسبی سلول درمانی هستند، صورت گرفته است (29). اما معرفی منبع سلولی کارآمدی که بیشترین مهاجرت و لانه‌گزینی را به مناطق آسیب دیده دارد، هنوز مورد تحقیق و بررسی است (29). سلول‌های بنیادی بافت چربی در مهندسی بافت و سلول درمانی به دلیل سرکوب ایمنی و قابلیت تمایز به رده‌های مختلف سلولی کاربرد دارند (30). با توجه به اینکه هر چه سلول‌ها میزان رسپتورهای کموکاینی بیشتری بیان کنند می‌توان انتظار داشت که قدرت مهاجرت بیشتری به مناطق آسیب دیده داشته باشند (31). مطالعات نشان داده‌اند که این سلول‌ها به نسبت سلول‌های بنیادی مغز استخوان بیان بیشتری از رسپتورهای کموکاینی را دارند (31). از طرفی، به نظر می‌رسد که دستکاری این رسپتورها در جهت بیان بیشتر می‌تواند منجر به افزایش توان

## نتیجه گیری

سلولی و برقراری مدارات عصبی تنها با آزمون های رفتاری قابل توجیه نیست این امر نیاز به مطالعات دقیقتر ایمنو هیستوشیمی و تصویربرداری عصبی دارد.

تحقیق حاضر نشانه‌ای از بهبودی عملکردی دژنراسیون مخچه پس از سلول درمانی با استفاده از سلولهای بنیادی مزانشیمی و نشاندهنده نقش لانه گزینی و مهاجرت در افزایش قابلیت درمانی سلولهای بنیادی است. در واقع، پیش تیمار سلولهای بنیادی مزانشیمی بافت چربی با استفاده از یک مهارگر هیستون داستیلازی (والپروئیک اسید) توانست سبب بهبود عملکردی با در نظر گرفتن تقویت لانه گزینی سلولها در ناحیه آسیب دیده داشته باشد. هرچند، جایگزینی

## تشکر و قدردانی

از زحمات معاونت و مدیریت محترم پژوهش دانشگاه آزاد اسلامی شیراز در اعطای تسهیلات لازم جهت اجرای این پروژه صمیمانه قدردانی می شود.

**تاییدیه اخلاقی:** مطابق مجوز شماره 95-4172-3345 و بر اساس قوانین حمایت از حیوانات آزمایشگاهی ملاحظیات اخلاقی با نظارت کمیته اخلاقی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شیراز رعایت گردید.

**تعارض منافع:** هیچگونه تعارض منافی توسط نویسنده بیان نشده است.

**منابع مالی:** بخشی از منابع مالی این پروژه توسط معاونت پژوهش دانشگاه آزاد اسلامی شیراز و در قالب پژوهانه تأمین شده است.

## Reference

1. Benagiano V, Rizzi A, Lorusso L, Flace P, Saccia M, Cagiano R, et al. The functional anatomy of the cerebrocerebellar circuit: A review and new concepts. *J Comp Neurol* 2018; 526:769-89.
2. Vožeh F. Cerebellum-from J. E. purkyně up to contemporary research. *Cerebellum* 2017; 16:691-4.
3. Han C, Chaineau M, Chen CX, Beitel LK, Durcan TM. Open science meets stem cells: A new drug discovery approach for neurodegenerative disorders. *Front Neurosci* 2018; 12: 47.
4. Poulos J. The limited application of stem cells in medicine: a review. *Stem Cell Res Ther* 2018; 9:1.
5. Forostyak S, Sykova E. Neuroprotective Potential of Cell-Based Therapies in ALS: From Bench to Bedside. *Front Neurosci* 2017; 11:591.
6. Gu X, Li C, Yin F, Yang G. Adipose-derived stem cells in articular cartilage regeneration: current concepts and optimization strategies. *Histol Histopathol* 2018; 33: 639-53.
7. Yeh DC, Chan TM, Harn HJ, Chiou TW, Chen HS, Lin ZS, et al. Adipose tissue-derived stem cells in neural regenerative medicine. *Cell Transplant* 2015; 24:487-92.
8. Zhao Y, Zhang H. Update on the mechanisms of homing of adipose tissue-derived stem cells. *Cytotherapy* 2016; 18: 816-27.
9. Chamberlain G, Fox J, Ashton B, Middleton J. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells* 2007; 25: 2739-49.
10. Buck AK, Stolzenburg A, Hänscheid H, Schirbel A, Lückerrath K, Schottelius M, et al. Chemokine receptor - directed imaging and therapy. *Methods* 2017; 130: 63-71.

11. Kariminekoo S, Movassaghpour A, Rahimzadeh A, Talebi M, Shamsasenjan K, Akbarzadeh A. Implications of mesenchymal stem cells in regenerative medicine. *Artif Cells Nanomed Biotechnol* 2016; 44:749-57.
12. Heirani-Tabasi A, Naderi-Meshkin H, Matin MM, Mirahmadi M, Shahriyari M, Ahmadiankia N, et al. Augmented migration of mesenchymal stem cells correlates with the subsidiary CXCR4 variant. *Cell Adh Migr* 2018; 22:1-9.
13. Naderi-Meshkin H, Matin MM, Heirani-Tabasi A, Mirahmadi M, Irfan-Maqsood M, Edalatmanesh MA, et al. Injectable hydrogel delivery plus preconditioning of mesenchymal stem cells: exploitation of SDF-1/CXCR4 axis toward enhancing the efficacy of stem cells' homing. *Cell Biol Int* 2016; 40:730-41.
14. Marquez-Curtis LA, Janowska-Wieczorek A. Enhancing the migration ability of mesenchymal stromal cells by targeting the SDF-1/CXCR4 axis. *Biomed Res Int* 2013; 2013: 561098.
15. Tsai LK, Wang Z, Munasinghe J, Leng Y, Leeds P, Chuang DM. Mesenchymal stem cells primed with valproate and lithium robustly migrate to infarcted regions and facilitate recovery in a stroke model. *Stroke* 2011; 42: 2932-9.
16. Hosseini M, Moghadas M, Edalatmanesh MA, Hashemzadeh MR. Xenotransplantation of human adipose derived mesenchymal stem cells in a rodent model of Huntington's disease: motor and non-motor outcomes. *Neurol Res* 2015; 37:309-19.
17. Hassanzadeh K, Nikzaban M, Moloudi MR, Izadpanah E. Effect of selegiline on neural stem cells differentiation: a possible role for neurotrophic factors. *Iran J Basic Med Sci* 2015; 18: 549-54.
18. Wang L, Liu Y, Li S, Long ZY, Wu YW. Wnt signaling pathway participates in valproic acid-induced neuronal differentiation of neural stem cells. *Int J Clin Exp Pathol* 2015; 8: 578–85.
19. Bagherpoor AJ, Bahrami AR, Matin MM, Mahdavi-Shahri N, Edalatmanesh MA. Investigating the effects of vitreous humour (crude extract) on growth and differentiation of rat mesenchymal stem cells (rMSCs) and human NTERA2 cells. *Tsitol Genet* 2010; 44: 15-21.
20. Hasanzadeh-Moghadam M, Edalatmanesh MA, Haddad Mashhadrizeh A. Comparative analysis of expression of chemokine receptors *cxcr4*, *cxcr6*, *ccr1* and *cx3cr* in human adipose-derived mesenchymal stem cell with valproic acid. *Int J Pediatrics* 2014; 2: 93.
21. Edalatmanesh MA, Bahrami AR, Hosseini E, Hosseini M, Khatamsaz S. Bone marrow derived mesenchymal stem cell transplantation in cerebellar degeneration: a behavioral study. *Behav Brain Res* 2011; 225: 63-70.
22. Edalatmanesh MA, Nikfarjam H, Moghadas M, Haddad-Mashadrizeh A, Robati R, Hashemzadeh MR. Histopathological and behavioral assessment of toxin-produced cerebellar lesion: a potent model for cell transplantation studies in the cerebellum. *Cell J* 2014; 16: 325-34.
23. Lo Furno D, Mannino G, Giuffrida R. Functional role of mesenchymal stem cells in the treatment of chronic neurodegenerative diseases. *J Cell Physiol* 2018; 233: 3982-99.
24. Shohayeb B, Diab M, Ahmed M, Ng DCH. Factors that influence adult neurogenesis as potential therapy. *Transl Neurodegener* 2018; 7: 4.

25. Gashmardi N, Hosseini SE, Mehrabani D, Edalatmanesh MA, Khodabandeh Z. Impacts of Bone Marrow Stem Cells on Caspase-3 Levels after Spinal Cord Injury in Mice. *Iran J Med Sci* 2017; 42: 593-8.
26. Marei HE, Hasan A, Rizzi R, Althani A, Afifi N, Cenciarelli C, et al. Potential of stem cell-based therapy for ischemic stroke. *Front Neurol* 2018; 9: 34.
27. Edalatmanesh MA, Matin MM, Neshati Z, Bahrami AR, Kheirabadi M. Systemic transplantation of mesenchymal stem cells can reduce cognitive and motor deficits in rats with unilateral lesions of the neostriatum. *Neurol Res* 2010; 32: 166-72.
28. Edalatmanesh MA, Bahrami AR, Hosseini E, Hosseini M, Khatamsaz S. Neuroprotective effects of mesenchymal stem cell transplantation in animal model of cerebellar degeneration. *Neurol Res* 2011; 33: 913-20.
29. Naderi-Meshkin H, Bahrami AR, Bidkhorri HR, Mirahmadi M, Ahmadiankia N. Strategies to improve homing of mesenchymal stem cells for greater efficacy in stem cell therapy. *Cell Biol Int* 2015; 39: 23-34.
30. Girdlestone J. Mesenchymal stromal cells with enhanced therapeutic properties. *Immunotherapy* 2016; 8: 1405-16.
31. Ahmadian Kia N, Bahrami AR, Ebrahimi M, Matin MM, Neshati Z, Almohaddesin MR, et al. Comparative analysis of chemokine receptor's expression in mesenchymal stem cells derived from human bone marrow and adipose tissue. *J Mol Neurosci* 2011; 44: 178-85.