

요실금 모델 쥐에서 근육줄기세포/Alginate/Polycaprolactone 복합체의 주사요법

Muscle Derived Stem Cell/Alginate/Polycaprolactone/ Injection Therapy in Rats with Denervated Urethral Sphincter

Haet Nim Lee, Ji Young Lee, Jun Sung Koh, Hyun Woo Kim, Seok Soo Byun¹, Sang Seob Lee², Ji Youl Lee

From the Department of Urology, College of Medicine, The Catholic University of Korea, ¹Seoul National University, Seoul, ²Department of Biology, Kyonggi University, Suwon, Korea

Purpose: In this study, we tested whether injections of muscle-derived stem cells and alginate (Alg)/polycaprolactone (PCL) after denervation of the pudendal nerve could increase the leak point pressure (LPP) and closing pressure (CP) over the long term in a rat model of urinary incontinence.

Materials and Methods: Muscle derived stem cells (MDSC) were isolated from the gastrocnemius muscle of normal female rats, and these cells were purified for creating a myogenic population by the preplate technique. In the denervated (D) group, the pudendal nerve was transected bilaterally via a dorsal incision in order to denervate the external urethral sphincter. The denervated external urethral sphincter was injected with Alg/PCL (AP group), or MDSC/Alg/PCL (M group) into the proximal urethra after pudendal nerve transection. At 1 and 3 months, the LPP and CP measurements were visually identified by using the vertical tilt/intravesical pressure clamp model of stress urinary incontinence. The rats were then sacrificed and their urethras were harvested for histology.

Results: Both the LPP and CP were significantly lower in the denervated group at each time compared with the normal (N group), AP and M groups, and both the LPP and CP in the N, AP and M groups were significantly higher than those in the D group at both 1 and 3 months. The persistence of MDSC over the period of the study was verified by histology. Thus, pudendal nerve denervation led to a progressive decline in the LPP and CP that was evident at 1 month and this persisted to 3 months, and injection of MDSC/Alg/PCL into the denervated rats led to a long term increase in the LPP and CP.

Conclusions: The N, AP and M groups all had significantly higher LPPs than the D group, and MDSC/Alg/PCL injection into the denervated external urethral sphincter in female rats increased the LPP and CP in both the short and long term. We also observed a long term bulking effect of MDSC/Alg/PCL injection in the stress incontinence animal model. (Korean J Urol 2007;48:1296-1301)

Key Words: Muscle derived stem cell, Alginate, Polycaprolactone, Urinary incontinence

대한비뇨기과학회지
제 48 권 제 12 호 2007

가톨릭대학교 의과대학
비뇨기과학교실, ¹서울대학교
의과대학 비뇨기과학교실,
²경기대학교 생물학과

이햇님 · 이지영 · 고준성 · 김현우
변석수¹ · 이상섭² · 이지열

접수일자 : 2006년 10월 10일
채택일자 : 2007년 10월 8일

교신저자 : 이지열
가톨릭대학교 성기병원
비뇨기과
경기도 부천시 원미구 소사동 2
☎ 420-717
TEL: 032-340-2120
FAX: 032-340-2124
E-mail: uroljy@catholic.
ac.kr

본 연구는 2004년 한국과학재단 연구지원
을 받아 이루어졌음 (과제번호 R01-
2004-000-10622-0).

서 론

요실금 환자에 있어서의 요도내 주사요법은 오랜 기간

동안 사용되어 왔고, 현재도 새로운 물질이 개발되고 있
다.^{1,2} 요실금 환자에 있어서 요도내 주사요법은 현재 주된
치료는 아니나 비침습적이고, 간단하게 시술할 수 있어 좋
은 재료와 방법이 개발된다면 요실금 제3형 타입인 내요도

괄약근부조 (internal sphincter deficiency) 환자의 일차적인 치료로 사용될 수도 있을 것으로 생각한다.

근육줄기세포 단독주사실험에서 주입된 요도부위에서 근육조직을 형성함으로써 부피유지 효과를 나타내었지만, 주사한 부위에서 인접한 부위로 줄기세포가 쉽게 이동하는 퍼짐현상 (spread-out)이 일어나 전체적으로 부피유지효과는 편차가 크게 나타났다.³

본 연구에서는 생체적합성과 세포친화성을 갖는 alginate (Alg)/polycaprolactone (PCL) 복합 생체재료를^{4,5} 근육줄기세포와 같이 사용하면, 근육줄기세포의 장기 생존율을 높이고 이러한 spread-out 현상을 방지하여 부피유지 (bulking)에 효과적인지 알아보려고 하였다.

대상 및 방법

1. Muscle derived stem cell (MDSC) 분리

흰쥐의 가자미근에서 생검한 조직을 잘게 썰어 Triple Enzyme를 처리해 근육세포를 분리한 후, 세포들이 플라스크에 달라붙는 접착 정도의 차이를 이용하여 일정 시간 간격으로 콜라젠을 코팅한 플라스크 (Nalge Nunc International, Rochester, USA)를 사용하는 전플라스크방법으로 1주일간 분리 및 배양 후, 이 근육 줄기세포의 성격을 확인하였다.^{6,7} 근육줄기세포 배양 시 배지에 PKH26 (Sigma, Saint Louis, USA)을 첨가하여, 현광현미경 관찰 시 요도 내 주입된 근육 줄기세포는 빨간 형광색을 발현하도록 하였다.

2. Alg/PCL 복합체 제조

Alg/PCL 복합체는 먼저 Alg는 phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4)를 용매로 Alg와 CaSO₄가 각각 1.5와 0.4wt%로 혼합된 재료로써 PBS 내에 존재하는 Na₂HPO₄와 CaSO₄의 상호작용에 의해 Alg의 가교시간 조절이 가능하도록 제작되었으며, PCL 구형입자 (100 < d < 200 μm)를 Alg와 혼합하여 사용하였다.

3. 대상 및 방법

1) 대조군 및 실험군: 쥐는 대조군인 정상군 (N group, n=5)과 실험군인 음부신경절단 (pudendal nerve denervation) 군 (D group, n=5), 음부신경절단 후 Alg/PCL 주사군 (AP group, n=5) 및 음부신경절단 후 MDSC/Alg/PCL 주사군 (M group, n=5)의 4군으로 나누었다.

2) 수술방법: 실험군은 ketamine을 근육주사 (50mg/kg)하여 마취를 유도한 후 D군은 양측 음부 신경을 2cm 절단하였고, 쥐의 하복부를 절개한 후에 요도를 노출시킨 후에 생리식염수 주사한 후에 다시 봉합하였다 (sham operation).

AP군과 M군은 양측 음부 신경을 2cm 절단한 후에, 쥐의 하복부에 정중 절개를 시행하여 요도를 노출시킨 후에 AP군은 Alg/PCL 복합체만을 50 μl를 주사하였고, M군은 PKH와 함께 배양한 근육줄기세포를 Alg/PCL 복합체와 혼합하여 26G 주사기를 사용하여 요도괄약근에 10⁵/50 μl를 주사하였다.

4. 요실금 치료용 요도괄약근 주사제 효과 확인

1) 요누출압의 측정: 실험 1, 3개월 후에 모든 군에서 ketamine hydrochloride (15mg/kg)와 2% xylazine hydrochloride (5mg/kg)를 2:1로 혼합한 후 0.2ml씩 근육주사하여 마취를 시킨 후 척추 T10 level에서 spinal cord를 절단하였다. 마취된 요실금 모델 쥐의 하복부에 정중 절개를 시행하여 결장의 배설물을 제거하고 방광을 노출시킨 후 tube (PE-90)를 방광 돔을 통해 삽입하였다. Tube가 안전하게 삽입된 것을 확인한 후 복부를 봉합하고 tube에 saline bottle을 연결하였다. 요실금 모델 쥐를 테이블에 붙이고 수직으로 위치를 고정 시킨 후 3-4시간 후 saline bottle의 높이를 1-3cm씩 올리면서 소변이 흘러나오기 시작하는 높이를 leak point pressure (LPP)로 판정하고, 다시 1-3cm씩 내리면서 소변이 멈춘 높이를 closing pressure (CP)로 판정하였다 (Fig. 1).⁸

5. 요실금 치료용 요도괄약근 주사제의 주입 후 조직학적 성상 확인

요누출압 측정 후에 모든 군에서 경추탈골로 도살 후 하복부를 열어 요도 괄약근을 채취 후 10% 중성 포르말린 용액에 담아 1일간 고정하였다. 고정된 요도의 광학현미경 표본제작을 위하여 알코올로 탈수하여 (+)-Limonene 및 paraffin 포매를 거쳐 5 μm로 박절하여 hematoxylin-eosin (H&E) 염색 후 광학현미경으로 관찰하였다. 요도에 주입된 고분자가 포매시 용해되는 것을 막기 위해 (+)-Limonene을 사용하였다. 자가 근육줄기세포의 형태학적 특성을 규명하기 위해 vector shield with DAPI (Vector, Burlingame, USA), myosin heavy chain (MyHC, Chemicon, Temecula, USA), α-smooth muscle actin (SMA) (Chemicon, Temecula, USA) 항체를 이용한 면역형광염색을 시행하였으며 방법은 다음과 같다. 염색 시 비특이적 반응을 억제하기 위하여 blocking solution (1.5% normal goat serum, 1.5% normal horse serum, 1% BSA, 0.1% Triton X-100 in PBS)으로 상온에서 1시간 반응시킨 후, MyHC와 α-SMA 항체를 사용하여 상온에서 2시간 반응시켰다. PBS로 3회 수세한 후, 이차항체인 Alexa Fluor 568 goat anti-mouse IgG와 Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG를 각각 1:500으로 희석하여 상온에서 1시간 반응시켰다. PBS로 3회 수세한 후, DAPI로 mounting하고

Olympus BX50 형광현미경으로 관찰하여 Olympus DP70 디지털카메라로 이미지를 얻었다.

6. 통계

통계는 4군 간에 평균을 비교하는 통계법으로 One-way ANOVA를 사용하였고 사후검정법으로는 Tukey's method를 사용하였다. 각 군의 1개월과 3개월간의 비교는 Wilcoxon rank-sum test를 이용하여 검정하였다.

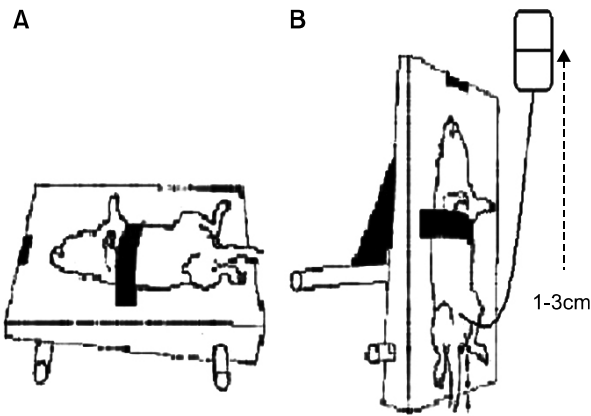


Fig. 1. Vertical tilt/intravesical pressure clamp model of stress urinary incontinence. (A) Acute spinal cord transection at the T9-T10 level was performed with the rat in a supine position and a transvesical catheter with a fire-flared tip (PE-90) was inserted into the dome of the bladder for bladder filling and pressure recording. (B) The intravesical pressure was varied in 1-3cm H₂O steps from zero upward until we visually identified the leak point. The height was then adjusted downward until the leaking stopped.

결 과

1. 요누출압 측정

요도내 근육줄기세포 주입 1개월 후의 LPP 측정값은 N군, D군, AP군 및 M군에서 각각 41.95±1.08, 32.29±3.15, 45.01±1.99 및 48.21±5.38cmH₂O이었고, CP는 N군, D군, AP군 및 M군에서 각각 21.17±1.43, 16.81±3.01, 28.75±3.84 및 29.74±1.70cmH₂O로 측정되었다. D군에서 N군에 비하여 LPP 및 CP가 통계학적으로 의미있게 감소하였고, AP 및 M군은 N군과 유의한 차이를 보이지 않았으나, D군에 비해서는 유의하게 높게 나타났다 (Fig. 2).

요도내 근육줄기세포 주입 3개월 후의 LPP 측정값은 N군, D군, AP군 및 M군에서 각각 41.29±1.62, 29.04±4.17, 44.18±1.44 및 49.66±1.62cmH₂O이었고, CP는 N군, D군, AP군 및 M군에서 각각 22.38±1.90, 15.62±2.98, 30.43±3.88 및 31.60±5.05cmH₂O로 측정되었다. D군에서 N군에 비하여 LPP 및 CP가 통계학적으로 의미있게 감소하였고, AP 및 M군은 N군과 유의한 차이를 보이지 않았으나, D군에 비해서는 유의하게 높게 나타났다 (Fig. 2).

1개월과 3개월간의 비교에서는 LPP와 CP는 D군에서만 3개월째 의미있는 감소를 나타냈으며, N군, D군, AP군 및 M군에서는 LPP와 CP의 변화는 없었다.

2. 조직학적 검사

N군은 H/E 염색에서 골격근이 외부에 존재하고 평활근이 내부에 존재하였다 (Fig. 3A). 면역화학 염색에서도 골격

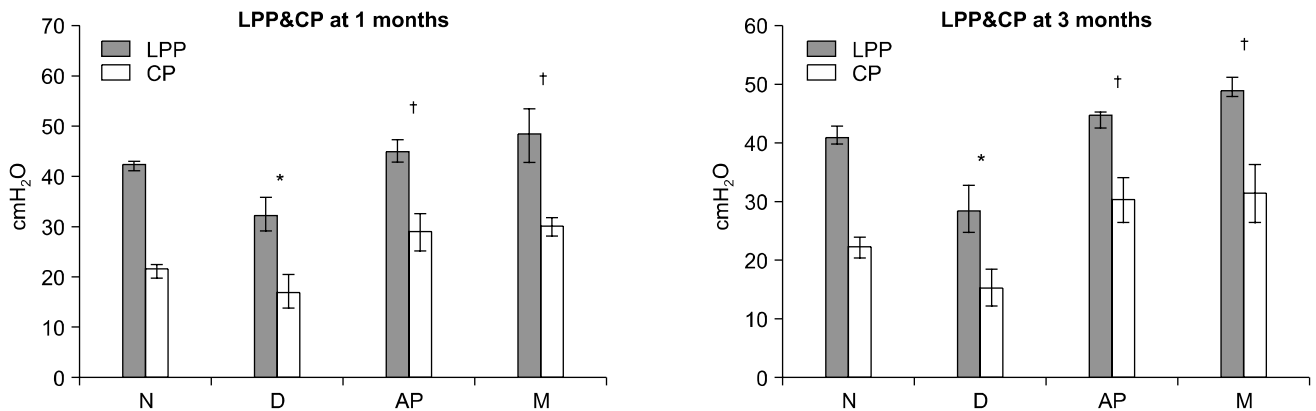


Fig. 2. Leak point pressure (LPP) and closing pressure (CP) at 1 & 3 months. The LPP and CP in the D group were significantly lower at 1 & 3 month than the LPP and CP in the N, AP, and M groups. The LPP and CP in the AP and M groups were significantly higher than that in the denervation group at 1 & 3 months. N: normal, D: denervation, AP: alginate (Alg)/polycaprolactone (PCL), M: muscle derived stem cell. *: p<0.01 compared to N group, †: p<0.01 compared to D group.

근(MyHC)이 외부에 위치하였고(Fig. 3B), 내부에 평활근(α -SMA)이 발현되는 것을 볼 수 있었다(Fig. 3C).

D 군에서 요도는 신경절단후 골격근의 두께가 줄어든 것을 확인할 수 있었다(Fig. 4A). 면역화학 염색에서도 골격근(MyHC)의 발현은 감소하였고(Fig. 4B), 평활근(α -SMA)은 잘 발현되었다(Fig. 4C).

AP 군에서는 H/E 염색에서는 요도의 평활근 사이에 고분자가 주입된 모양을 관찰할 수 있었다(Fig. 5A). 면역화학 적 염색에서는 골격근(MyHC)은 적게 발현되었고(Fig. 5B) α -SMA는 요도의 평활근(α -SMA)이 녹색으로 발현되었지만, 고분자 사이에서는 발현되지 않았다(Fig. 5C). 주입된

고분자 주변 조직에 염증반응은 심하지 않아 생체적합성이 뛰어난을 알 수 있다.

M 군에서는 H/E 염색에서 확인된 요도에 주입된 근육 줄기세포가 현광현미경에서 PKH26이 발현되는 것을 확인하였고(Fig. 6A, B), 같은 위치에서 평활근(α -SMA)이 염색되는 특성으로 보아(Fig. 6C) 주입된 근육줄기세포가 평활근으로 분화되었음을 관찰할 수 있었다(Fig. 6D).

각 군에서 1개월과 3개월 사이에 조직학적으로 차이는 없었다.

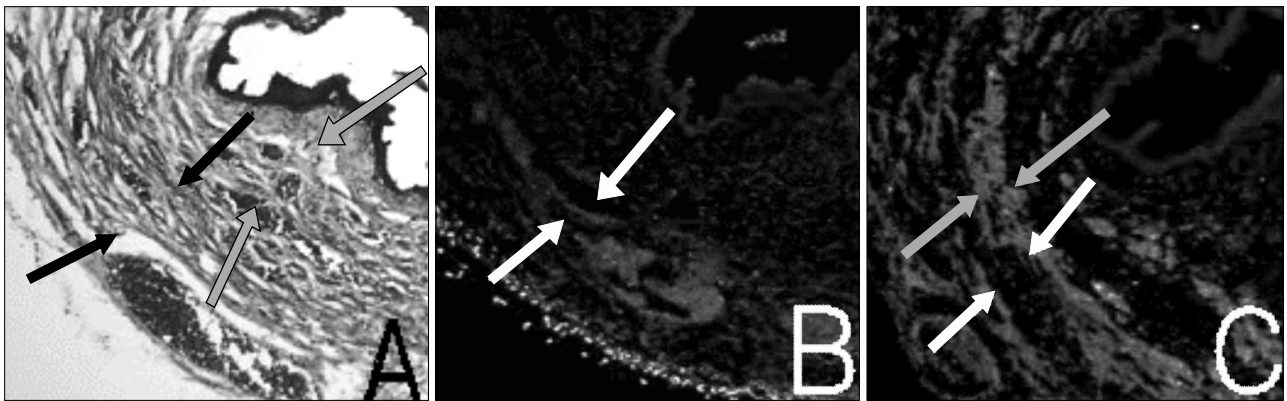


Fig. 3. Histology of the normal urethral sphincter of female rats. (A) Hematoxylin/eosin staining at 3 months. In the normal female rat urethral sphincter, a layer of striated muscle fibers (black arrow) encircles the smooth muscle layers (gray arrow). (B) MyHC immunostaining of the 3 months specimen. In the normal female rat urethral sphincter, the skeletal muscle (white arrow) shows positive DAPI and MyHC staining. (C) α -SMA immunostaining of the 3 months specimen. Smooth muscle (gray arrow) shows positive α -SMA staining, and the skeletal muscle (white arrow) shows blanks (A, B, C x100).

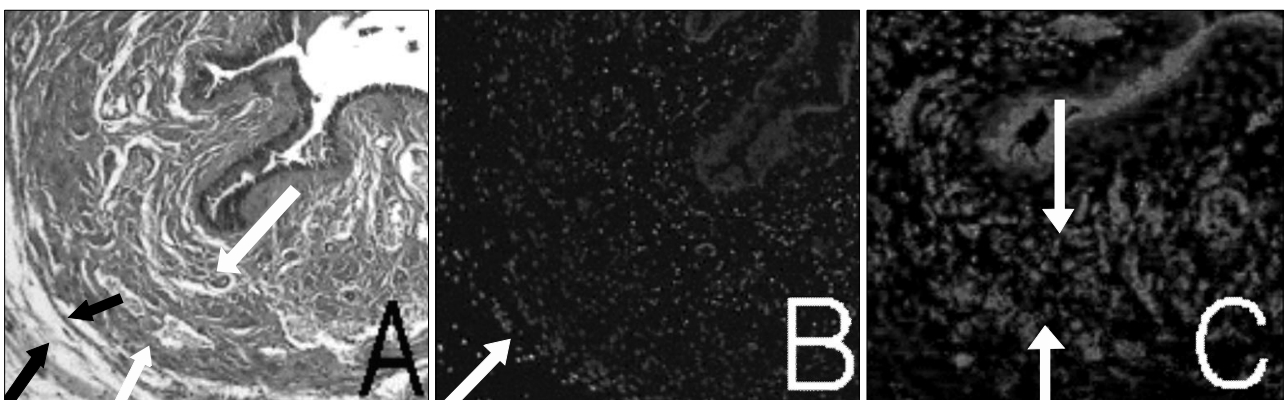


Fig. 4. Histology of the denervated urethral sphincter of female rat. (A) Hematoxylin/eosin staining at 3 months. The denervated proximal urethral sphincter also showed atrophic and thin circular skeletal fibers (black arrow). The smooth muscle is well preserved (white arrow). (B) MyHC immunostaining of the 3 months specimen. The denervated proximal urethral sphincter skeletal muscle (white arrow) shows negative MyHC staining. (C) α -SMA immunostaining of the 3 months specimen. Smooth muscle (white arrow) shows positive DAPI and α -SMA staining (A, B, C x100).

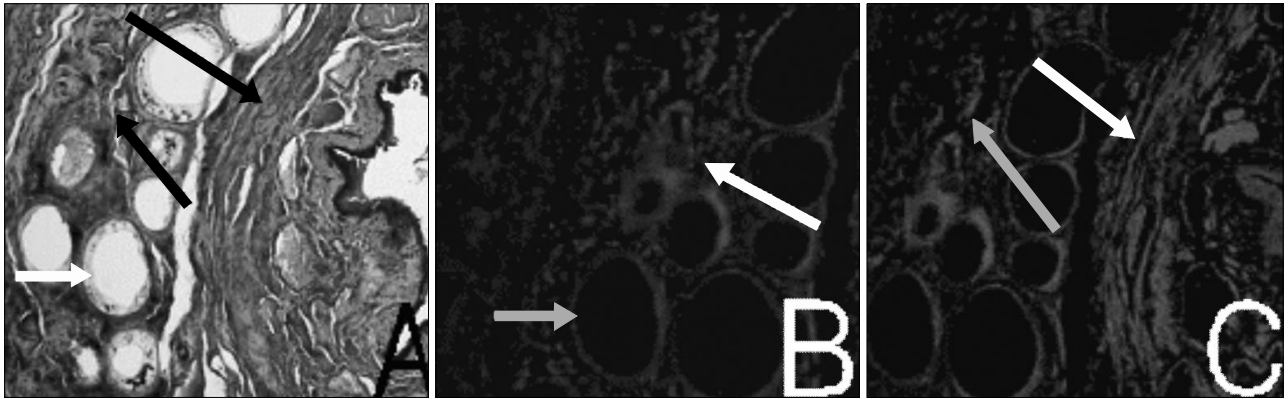


Fig. 5. Histology of the Alg/PCL injected urethral sphincter of female rat. (A) Hematoxylin/eosin staining at 3 months. The Alg/PCL injection area (Alg: white arrow, PCL: black arrow) is well preserved. (B) MyHC immunostaining of the 3 months specimen. Ingrowing muscular bundles (white arrow) are observed on the periphery of the polymer. (C) a-SMA immunostaining of the 3 months specimen. The organized smooth muscle layers (white arrow) shows positive DAPI and a-SMA staining, but ingrowing muscular bundles on the periphery of the polymer (gray arrow) are observed as negative a-SMA staining (A, B, C x100).

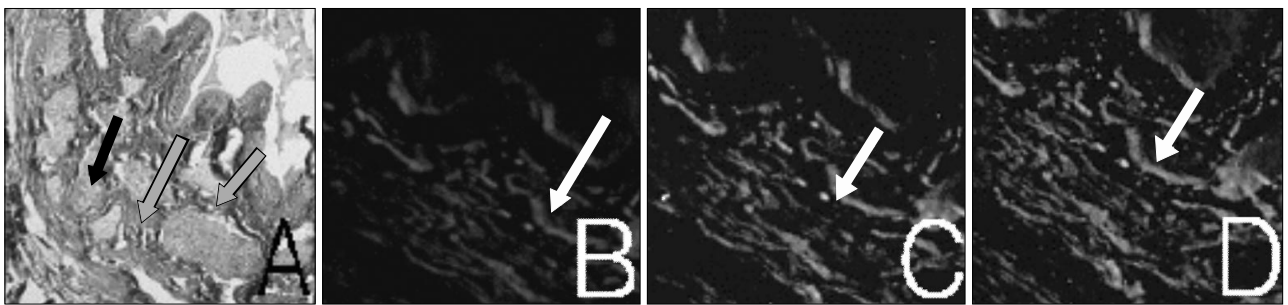


Fig. 6. Histology of the MDSC/Alg/PCL injected urethral sphincter of female rat. (A) Hematoxylin/eosin staining at 3 months. The MDSC/Alg/PCL injection area (Alg: gray arrow, PCL: black arrow) is well preserved. (B) Expression of PKH26 at the 3 months specimen. The MDSC injection area was PKH26 positive. (C) a-SMA immunostaining of the 3 months specimen. Muscular bundles (white arrow) are observed to be positive for a-SMA staining on the periphery of the polymer. (D) Merging of DAPI and, PKH26 (A, B, C, D x100).

고 찰

요실금 연구에 있어서 요실금 동물 모델의 개발은 중요한 일이다. 요실금 동물모델을 만드는 것으로는 회음신경 절단방법 (pudendal nerve transection),⁹ 질내 풍선 확장술,¹⁰ 전기 소작술¹¹ 등이 사용되고 있다. 질내 풍선 확장술은 가장 사람의 요실금 모델과 유사하다고 할 수 있으나, 요실금이 생기는 정도가 개체마다 일정하지 않은 문제점이 있으며, 회음신경 절단방법은 인위적이기는 하나 요누출압이 시간이 지남에 따라 일정하게 감소되어 실험적인 동물모델에 사용하기에 적합하다. 또한, 요도내 전기소작술을 이용하여 내요도괄약근부족 (intrinsic sphincter deficiency; ISD)의 동물모델도 만들었다.

요실금에서의 세포치료의 효과는 최근 활발히 연구되고 있으며, Cannon 등¹²의 보고에 의하면 쥐에서 분리한 근육

줄기세포를 회음신경을 절단한 요실금 모델 쥐의 요도내에 자가이식 (autologous injection)하여 요도의 수축력이 개선된 효과를 보고하였다. Lee 등¹³의 보고에 의하면 회음신경절단 군에서 LPP와 CP는 1개월에서 3개월로 시간이 지남에 따라 계속 감소함을 알 수 있었고, 콜라겐을 요도에 주입한 경우에도 처음에는 LPP와 CP의 증가를 확인되었으나 시간이 지남에 따라 감소함을 알 수 있었다. 그러나 근육줄기세포를 주입한 군에서는 시간이 지나도 LPP와 CP의 변화는 없었다.

본 실험에서는 회음신경절단시 LPP와 CP는 1개월에서 3개월로 시간이 지남에 따라 계속 감소함을 알 수 있었으나, Alg/PCL을 주입한 군과 근육줄기세포/Alg/PCL을 주입한 군에서는 시간이 지나도 LPP와 CP의 변화는 없었다. 이는 PCL particle은 콜라겐과는 달리 1년에 걸쳐 서서히 흡수되기 때문에 LPP와 CP의 변화가 없으며, 이렇게 서서히 흡수

될 때에는 주위조직이 자라 들어와 흡수된 공간을 채울 수 있기 때문이다.

요실금 모델쥐에서 세포치료는 주입된 부위에서 근육조직을 형성함으로써 부피유지 효과를 나타내지만, 주사한 부위에서 세포가 퍼지는 현상 (spread-out) 때문에 원하는 만큼의 세포의 양을 측정하기가 어렵다. 근육줄기세포만을 주입한 실험에서는 LPP 및 CP를 향상시키기 위하여 3×10^7 개의 많은 근육줄기세포를 주입하여야 하였으나,¹³ 본 실험에서는 이러한 단점을 보완하기 위하여 세포와 친화성이 좋으며 가교시간이 조절되는 성질을 가지고 있는 Alg/PCL 과 함께 10^5 개의 세포를 주입하여 좋은 효과를 얻을 수 있었다.

Alg는 졸-겔 상전이 (sol-gel transition)가 용이한 물질로서 체내 주입 시 졸 (sol) 상태로써 주입이 용이하고, 주입 후에는 가교가 일어나 겔 (gel)을 형성하여 부피를 유지할 수 있다. 특히 졸 상태에서는 근육줄기세포와 쉽게 혼합되고, 체내에서 겔 상태로 변하여 근육줄기세포의 세포외 기질 (extracellular matrix)의 역할을 담당해 세포 성장에 유리한 환경을 제공한다. Alg는 대부분 2개월 이내에 생분해되어 흡수된다.

Alg는 세포가 분화하고 증식할 수 있는 환경을 만들어 준다면, PCL은 지지체 역할을 하여 부피유지의 역할을 한다.¹⁴ 본 실험에 사용된 PCL 구형입자는 직경이 $100 < d < 200 \mu\text{m}$ 로서, 1년에 걸쳐서 서서히 흡수되는 물질로, 이 실험에서는 서서히 분해되는 PCL고분자의 공간으로 주위 조직이 자라 들어와 PCL이 생분해된 후에도 요도내강의 부피유지하는 효과가 있을 것으로 생각한다. 본 실험에서도 1개월과 3개월에 AP와 M군 사이에는 LPP와 CP의 차이가 없었다. 이는 PCL particle이 1년 동안 서서히 흡수되기 때문으로 생각하며 1년 이상의 장기적인 추적관찰이 필요할 것으로 생각한다.

결 론

요실금 모델 쥐에서 Alg와 PCL을 이용한 복합생체고분자와 근육줄기세포의 혼합체의 주사요법은 근육줄기세포의 요도괄약근의 기능적 향상과 생체재료의 부피유지 효과가 함께 나타나 요실금 치료에 효과적일 것으로 생각한다.

REFERENCES

1. Appell RA, Dmochowski RR, Herschorn S. Urethral injections for female stress incontinence. *BJU Int* 2006;98(Suppl 1):

27-30

2. Chapple CR, Brubaker L, Haab F, van Kerrebroeck P, Robinson D. Patient-perceived outcomes in the treatment of stress urinary incontinence: focus on urethral injection therapy. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct* 2007;18:199-205

3. Lee JY, Cannon TW, Pruchnic R, Fraser MO, Huard J, Chancellor MB. The effects of periurethral muscle-derived stem cell injection on leak point pressure in a rat model of stress urinary incontinence. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct* 2003;14:31-7

4. Cho SH, Oh SH, Lee JH. Fabrication and characterization of porous alginate/polyvinyl alcohol hybrid scaffolds for 3D cell culture. *J Biomater Sci Polym Ed* 2005;16:933-47

5. Oh SH, Kang SG, Kim ES, Cho SH, Lee JH. Fabrication and characterization of hydrophilic poly (lactic-co-glycolic acid)/poly (vinyl alcohol) blend cell scaffolds by melt-molding particulate-leaching method. *Biomaterials* 2003;24:4011-21

6. Qu-Petersen Z, Deasy B, Jankowski R, Ikezawa M, Cummins J, Pruchnic R, et al. Identification of a novel population of muscle stem cells in mice: potential for muscle regeneration. *J Cell Biol* 2002;157:851-64

7. Lee JY, Paik SY, Yuk SH, Lee JH, Ghil SH. The isolation and characterization of muscle derived stem cells from gastrocnemius muscle of rats using the modified preplate method. *Korean J Urol* 2004;45:1279-84

8. Phelan M, Fraser MO, Yokoyama T. The vertical tilt table and intravesical pressure clamp: new animal models for the study of continence mechanisms and detrusor hyperreflexia. *J Urol* 2001;165(Suppl):416A

9. Conway DA, Kamo I, Yoshimura N, Chancellor MB, Cannon TW. Comparison of leak point pressure methods in an animal model of stress urinary incontinence. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct* 2005;16:359-63

10. Cannon TW, Wojcik EM, Ferguson CL, Saraga S, Thomas C, Damaser MS. Effects of vaginal distension on urethral anatomy and function. *BJU Int* 2002;90:403-7

11. Chermansky CJ, Cannon TW, Torimoto K, Fraser MO, Yoshimura N, de Groat WC, et al. A model of intrinsic sphincteric deficiency in the rat: electrocauterization. *Neurourol Urodyn* 2004;23:166-71

12. Cannon TW, Lee JY, Somogyi G, Pruchnic R, Smith CP, Huard J, et al. Improved sphincter contractility after allogenic muscle-derived progenitor cell injection into the denervated rat urethra. *Urology* 2003;62:958-63

13. Lee JY, Paik SY, Yuk SH, Lee JH, Ghil SH, Lee SS. Long term effects of muscle-derived stem cells on leak point pressure and closing pressure in rats with transected pudendal nerves. *Mol Cells* 2004;18:309-13

14. Oh SH, Lee JY, Ghil SH, Lee SS, Yuk SH, Lee JH. PCL microparticle-dispersed PLGA solution as a potential injectable urethral bulking agent. *Biomaterials* 2006;27:1936-44