

흰쥐에서 하치조신경 절단에 따른 삼차신경절 위성세포에서 GFAP-IR의 변화

조선대학교 치과대학 소아치과학교실, 구강해부학교실*

이창섭 · 이상호 · 김흥중*

Abstract

GFAP IMMUNOREACTIVITY IN SATELLITE CELLS OF TRIGEMINAL GANGLION FOLLOWING AXOTOMY OF INFERIOR ALVEOLAR NERVE IN RAT

Chang-Seop Lee, Sang-Ho Lee, Heung-Jung Kim*

Dept. of Pediatric Dentistry, Dept. of Oral Anatomy
College of Dentistry, Chosun University*

Glial fibrillary acidic proteins(GFAP) are a group of intermediate filaments that are distributed in the cytoplasm of glial cells. GFAP immunoreactivity(GFAP-IR) increase after central and peripheral nerve injuries. The purpose of this study was to determine change of GFAP-IR in rat trigeminal ganglion satellite cells following the axotomy of inferior alveolar nerve(IAN). The immunohistochemistry was carried out using the avidin-biotin-peroxidase complex(ABC) method.

1. Control group : Astrocytes in central root of trigeminal ganglion had strong GFAP-IR, but satellite cells of trigeminal ganglion occasionally had GFAP-IR. The patterns of reactivity in satellite cells of trigeminal ganglion were not concentrated in any specific region of trigeminal ganglion.
2. Three day group after IAN axotomy : There were highly GFAP-IR in satellite cells of trigeminal ganglion in mandibular region. GFAP-IR in maxillary and ophthalmic regions were less intense compared to mandibular region.
3. Seven day group after IAN axotomy : GFAP-IR that were increased compared to con-

* 이 논문은 1995년도 조선대학교 학술연구비의 지원을 받아 연구되었음.

trol group were seen in the mandibular region. But GFAP-IR were less intense compared to three day group.

These results suggest that GFAP-IR increase in specific region of trigeminal ganglion following peripheral axotomy, therefore we suppose that GFAP study offer research tool in trigeminal neuralgia.

I. 서 론

Glial fibrillary acidic protein(GFAP)은 아교세포(glia cell)의 세포질에 분포하는 중간세사(intermediate filament)의 한 종류로 신경 손상 후, 중추 및 말초신경계의 아교세포에서 면역반응성이 증가된다¹⁻⁶⁾. 중추신경계에서의 GFAP의 변화를 살펴보면, Murray등³⁾과 Rubel과 MacDonald⁴⁾는 완전한 감각신경 절단 후에 척수내의 별아교세포내의 GFAP의 변화를 보고하였고, Hozumi등⁵⁾은 대뇌에 stab wound를 가한 후에 GFAP의 변화를 관찰하였다. 또한 말초신경계에서의 변화를 살펴보면, Woodham등⁶⁾이 흰쥐의 좌골신경을 완전히 절단한 후에 등뿌리신경절(dorsal root ganglion)에서 GFAP의 변화를 관찰하였고, 최근에 Stephenson과 Byers⁷⁾는 흰쥐에서 치아에 손상을 가한 후에 삼차신경절에서 GFAP의 변화를 보고하였다.

삼차신경절(trigeminal ganglion)은 악안면영역으로부터 전달되는 감각섬유의 일차감각신경원이 위치하는 신경절로 신경절세포의 말초가지는 안신경(ophthalmic nerve), 상악신경(maxillary nerve), 하악신경(mandibular nerve)으로 구성된다. 또한 이들 감각신경의 세포체는 신경절 내에서 해부학적으로 분리되어 위치하고 있다⁷⁻⁹⁾.

위성세포(satellite cell)는 말초감각신경절에서 신경세포를 둘러싸는 지지세포(supporting cell)로 Valentin에 의해 1839년에 처음 발견되었으며 Cajal에 의해 1909년에 위성세포로 이름지워진 아교세포의 한 종류이다. 위성세포는 동일한 신경세포를 둘러싸고 있는 인접한 위성세포 및 그들이 둘러싸는 신경세포체와 긴밀한 구조적 관계를 나타낸다. Byers등¹⁰⁾은 위성세포들 사이에서는 교통반(gap junction)이, 신경세포와 위성세포 사이에서는 부착반(adherens junction)이 발견된다고 하였고,

또한 위성세포는 바닥판(basal lamina)에 의해서 주위의 결합조직과 분리되어 있다고 하였다.

위성세포와 신경세포체 사이의 기능적 상호관계를 살펴보면, Dekoninck등¹¹⁾은 신생 질지류의 신경절을 이용한 조직배양실험에서 위성세포를 제거하면 신경세포는 위단극의 형태(pseudounipolar morphology)를 상실하며, 신경성장인자(nerve growth factor)를 첨가하면 신경세포는 가지돌기(dendrite)를 새로 형성하여 서로 연결을 형성한다고 하였다. Morris등¹²⁾은 nitric oxide가 등뿌리신경절의 신경세포와 위성세포 사이에 신호전달자로 작용한다고 보고하였다. 그러므로 위의 보고들을 종합하여 볼 때, 감각신경절의 신경세포 형태 및 기능은 주위의 위성세포와의 상호작용에 의해 영향을 받는다고 할 수 있다.

삼차신경의 말초가지를 손상시킨 후, 삼차신경절에서 일어나는 변화에 대한 연구는 지금까지 대부분이 신경세포나 축삭의 신경전달물질에 대한 연구¹³⁻¹⁵⁾였고, 말초신경 손상에 의한 삼차신경절의 신경세포와 위성세포 사이의 변화에 대한 연구는 이제 시작에 있다고 할 수 있다.

이에 저자들은 치의학에서 신경손상에 의한 동통 연구의 모델로 흰쥐에서 하치조신경을 절단한 후에 시간 경과에 따른 GFAP-IR의 변화 및 삼차신경절내의 반응 부위를 알아보고자 본 연구를 시행하였다.

II. 실험재료 및 방법

1. 재료

무게 200g 정도의 Sprague-Dawley계 흰쥐 12마리를 암, 수 구분 없이 사용하였다. Ketamine(0.6ml/200g)으로 복강내 마취 후, 좌측 하악지 부위의 털을 제거한 다음, 교근 부위를 수직절개 하였다. 노

출된 하악지에서 용선을 확인한 다음, 용선 전방의 하악지를 고속핸드피스(high speed handpiece)를 이용하여 제거하였다. 노출된 하치조신경을 탐침자를 이용하여 격리시킨 후, 가위로 탐침자의 근위 및 원위 부위를 절단하였다. 시술 부위의 교근과 피부를 봉합 한 다음 소독하고 항생제를 주사한 후, 조직처리 때까지 사육하였다.

2. 조직처리

좌측 삼차신경절을 실험군으로, 우측 삼차신경절을 대조군으로하여 시술 후 3일, 7일 경과 후에 각 6마리씩 희생시켰다. Ketamine(0.6ml/200g)으로 마취 후, 흉강을 열고 좌심실에 삽관을 삽입한 다음 heparin이 함유된 식염수로 관류한 다음, 4% paraformaldehyde in 0.1M phosphate buffer를 300ml 정도 사용하여 관류고정을 시행하였다. 삼차신경절을 적출하여 4°C의 동일 고정액에 24시간 동안 후고정하였다. 냉동절편을 얻기 위하여 4°C의 30% sucrose에 12시간 방치하였다. O.C.T compound에 포매하여 -20°C의 Cryostat에서 40~50um의 두께로 박절하여 HistoGrip[®](Zymed사)으로 처리한 slide에 부착시켜 염색시까지 -20°C의 냉동고에 보관하였다.

3. 면역조직화학적 염색

1차항체는 Rabbit anti-human GFAP(Zymed사)를 사용하였고 HISTOSTAIN[™]SP KIT를 사용하여 면역조직화학적 염색을 시행하였다. 염색과정은 다음과 같다.

- 1) Endogenous peroxidase block을 위해 0.3% H₂O₂ in methanol에 10분간 처리
- 2) 0.01M PBS로 2분씩 3회 수세
- 3) Serum blocking solution(Reagent 1A, 10% non-immune serum)에 10분간 처리
- 4) Blocking solution 제거
- 5) Primary antibody(Rabbit anti-GFAP, 1:50)를 60분간 37°C에서 처리
- 6) PBS로 2분씩 3회 수세
- 7) Biotinylated secondary antibody(Reagent 1B)를 20분간 37°C에서 처리
- 8) PBS로 2분씩 3회 수세
- 9) Streptavidin-peroxidase conjugate(Reagent 2)

를 20분간 37°C에서 처리

- 10) PBS로 2분씩 3회 수세
- 11) Substrate-chromogen mixture(Reagent 3, AEC)를 5~10분간 처리
- 12) DW로 수세
- 13) Hematoxylin으로 1~3분간 대조염색
- 14) Tap water에 수세
- 15) PBS에 약 30초간 처리
- 16) DW로 수세
- 17) Mounting 및 coverslip(GVAMOUNT[®])

4. 관 찰

광학현미경을 이용하여 면역염색된 조직절편에서 GFAP-IR를 나타내는 위성세포의 염색정도와 분포부위를 관찰하였다.

III. 실험성적

1. 대조군(control group)

삼차신경절 중심뿌리(central root)의 별아교세포(astrocytes)에서는 매우 강한 GFAP-IR를 보였다(Fig. 1). 반면에 삼차신경절의 위성세포(satellite cells)에서는 약하고 산재된 GFAP-IR를 보였다. 또한 삼차신경절내의 위성세포에서의 이러한 반응양상은 삼차신경절의 특정 부위에 제한되지 않고 산재되어 반응한 양상을 보였다(Fig. 2).

2. 하치조신경 절단 후 3일 경과군

(Three day group after IAN axotomy)

하치조신경 절단과 관련이 있는 삼차신경절 하악신경부위(mandibular region)의 위성세포에서 강한 GFAP-IR가 관찰되었다(Fig. 3). 반면에 인접한 안신경부위(ophthalmic region)와 상악신경부위(maxillary region)의 위성세포에서는 하악신경부위에 비하여 약한 GFAP-IR를 보였다(Fig. 4). 인접 부위의 반응정도는 대조군에서 보다는 강하였다.

3. 하치조신경 절단 후 7일 경과군

(Seven day group after IAN axotomy)

삼차신경절 하악신경부위의 위성세포에서 GFAP-IR는 대조군보다는 증가된 소견이 관찰되

었으나 3일 경과군과 비교해서는 약하게 관찰되었다(Fig. 5). 인접한 안신경부위와 상악신경부위의 위성세포의 GFAP-IR 또한 대조군보다 약간 증가하였거나 비슷하게 관찰되었다(Fig. 6). 삼차신경절 전체적으로는 3일 경과군과 비교하여 감소된 반응이 관찰되었다.

IV. 총괄 및 고안

Stephenson과 Byers⁵⁾는 1995년에 흰쥐의 상악치아에 손상을 가한 다음 삼차신경절의 상악신경부위의 위성세포에서 강한 GFAP-IR를 관찰하였다고 보고하였다. 본 연구에서는 흰쥐의 하치조신경을 절단하였을 때, 손상과 관련이 있는 하악신경부위의 위성세포에서 강한 GFAP-IR를 관찰하였다. 또한 Stephenson과 Byers⁵⁾는 GFAP의 반응 양상이 손상과 직접 관련이 없는 인접 부위에도 약하게 나타난다고 하였다. 본 실험에서도 3일, 7일 경과군에서 인접 부위까지 반응이 나타났으며 그 정도는 미약하였다. Woodham등⁶⁾은 GFAP-IR의 비슷한 반응양상을 흰쥐 좌골신경(sciatic nerve) 절단한 다음 등뿌리신경절(dorsal root ganglion)의 위성세포에서 관찰하였다. 그들은 연구에서 L4와 L5의 등뿌리신경절의 모든 신경세포가 좌골신경에 축삭을 투사하지는 않지만 이들 등뿌리신경절의 대부분의 위성세포에서 GFAP가 반응한다고 하였다. Hozumi등²⁾은 대뇌에 stab wound를 가한 실험에서 손상받은 인접부위의 별아교세포까지 GFAP가 퍼져서 반응한다고 보고하였다.

중추와 말초에서의 GFAP-IR 및 아교세포의 차이를 살펴보자. 말초신경계의 위성세포와 중추신경계의 별아교세포에서 일어나는 반응성 아교세포증(reactive gliosis)에 어떠한 차이가 있는지는 명확하지 않다. 단지 위성세포가 별아교세포와 비교하여 다른 점은 별아교세포는 정상 상태에서도 GFAP-IR를 나타내며 손상에 대응하여 GFAP-IR가 증가하는 반면, 삼차신경절의 위성세포는 정상 상태에서는 거의 GFAP-IR를 보이지 않고 말초 손상에 의해 GFAP-IR의 증가를 보인다. 그러므로 삼차신경절의 위성세포내에서의 GFAP와 같은 중간세포의 증가는 병적상태나 변화된 환경에 대한 반응으로 사료된다.

Hozumi등²⁾과 Rubel과 Macdonald⁴⁾는 중추신경계에서 나타나는 GFAP 반응을 2시기로 구분하였다. 그들은 손상 후, 3분에서 3시간 사이에서 GFAP-IR의 빠른 증가가 관찰되고, 약 3일 경과 후에 두 번째의 증가를 보인다고 하였다. Stephen-son과 Byers⁵⁾와 Woodham등⁶⁾은 말초신경계에서 GFAP의 반응이 손상 후, 3일 후에 나타나서 7일 경에 최고조에 이른다고 하였다. 그러나 본 연구에서는 3일 경과 후에 가장 강한 반응을 보였으며, 7일 경과 후에는 감소하는 양상을 보였다. 흥미로운 점은 신경 손상 후, GFAP-IR의 증가가 삼차신경절의 신경세포에서 vasoactive intestinal peptide와 neuropeptide-Y 같은 여러 neuropeptides가 발현되는 시기인 3일이 경과된 시기와 일치한다는 것이다. GFAP의 시간에 따른 차이 및 neuropeptides와의 관계는 앞으로 깊이 있는 연구를 요하는 분야로 생각된다.

최근에 Rappaport와 Devor¹⁶⁾는 삼차신경절에서의 neural discharge의 변화에 따른 지지세포의 역할을 제한하였다. 그들은 neural discharge의 변화가 삼차신경통(trigeminal neuralgia)의 임상증상에 관여한다고 주장하였다. 그들은 다른 형태의 신경 손상 실험¹⁷⁻¹⁹⁾에서와 같이 삼차신경절내의 신경세포에서의 활성은 병적상태에서의 신경세포-지지세포 상호반응과 관련이 있다고 하였다.

Stephenson과 byers⁵⁾는 신경세포와 위성세포 사이의 임시 또는 장기적인 교통에 대한 가능한 신호들(signals)로 다음을 예로 들었다. 1) extracellular potassium의 변화, 2) 다른 extracellular ion 농도의 변화, 3) 신경세포로부터 손상관련 인자들(injury-related factors)의 유리, 4) 성장인자들(growth factors)의 이용도의 변화, 5) nitric oxide와 CGRP와 같은 정상 상태에서 존재하는 전달물질의 변화 등을 제안하였다. 하치조신경을 절단한 실험은 말초가지에서 일어나는 일련의 과정을 연구하는데 유용하게 이용된다. 이들 과정에 대한 연구를 종합하여 보면, 1) 손상에 따른 위성세포에서의 GFAP 등의 유리⁵⁾, 2) 초기의 축삭 손상과 neuropeptides의 유리^{20,21)}, 3) 치수세포에서 신경성장인자들(nerve growth factors)의 유리²²⁾, 4) 1~2일 경과 후에 말단신경 발아(sprouting)²³⁻²⁶⁾ 등이 있다.

삼차신경절은 부위별로 감각지배영역이 따로 존

재하고 있으나, 동일 감각지배영역내에서 특정 부위에 축삭을 투사하는 신경세포는 해당 감각지배 영역내에서 산재하여 분포한다^{7,9,27,28)}. 직접적인 손상을 받지않는 축삭의 신경세포를 둘러싸는 위성세포에서도 GFAP-IR를 보이는 것은 삼차신경통 등 말초신경장애와 관련하여 매우 흥미롭다. 삼차신경절의 위성세포에서 GFAP의 반응 변화를 연구하는 것은 앞으로 치수치료, 수술시 신경절단과 같은 여러 요인의 말초신경손상에 의한 신경세포와 위성세포 사이의 상호작용을 연구하는데 중요하리라 생각한다.

V. 결 론

GFAP는 아교세포의 세포질에 분포하는 중간세포의 한 종류로 신경 손상 후에 면역반응성이 증가된다. 이에 저자들은 말초신경손상의 한 모델로 흰쥐에서 하치조신경을 절단한 후, 시간 경과에 따른 GFAP-IR의 변화 및 신경절내의 반응 부위를 관찰하고자 본 실험을 시행하였다. Sprague-Dawley계 흰쥐 12마리를 암, 수 구분 없이 사용하였다. 좌측 하악지를 천공한 다음 하치조신경을 절단하여 각 3일, 7일 경과 후에 삼차신경절을 적출하여 조직처리하여 ABC 방법을 이용하여 면역조직화학 염색을 시행하였다.

1. 대조군:삼차신경절 중심뿌리의 별아교세포에서 강한 GFAP-IR를 보였다. 그러나 삼차신경절내의 위성세포에서는 약한 GFAP-IR를 보였다. 신경절내의 위성세포에서의 반응양상은 삼차신경절의 특정한 부위에 국한되지 않고 퍼져 있는 양상을 보였다.
2. 하치조신경 절단 후 3일 경과군:삼차신경절의 하악신경부위의 위성세포에서 매우 강한 GFAP-IR를 보였다. 인접한 상악신경부위 및 안신경부위의 위성세포의 GFAP-IR는 하악신경부위에 비하여 미약하였다.
3. 하치조신경 절단 후 7일 경과군:대조군에서보다 증가된 GFAP-IR가 신경절의 하악신경부위에서 관찰되었으나, 그 정도는 3일 경과군과 비교하여 약하게 관찰되었다. 이들 결과를 종합하여 보면, 하치조신경 절단 후

에 삼차신경절 위성세포의 GFAP는 삼차신경절내의 손상과 관련된 특정 부위에서 증가를 나타내며, 이러한 변화는 삼차신경통 연구에 유용한 자료를 제공하리라 사료된다.

참고문헌

1. Eddleston M, Mucke L: Molecular profile of reactive astrocytes-implications for their role in neurologic disease, *Neuroscience* 54: 15-36, 1993.
2. Hozumi I, Chin FC, Norton WT: Biochemical and immunocytochemical changes in GFAP after stab wounds, *Brain Res* 524:64-71, 1990.
3. Murray M, Shwun-De W, Goldberger ME, Levitt P: Modification of astrocytes in the spinal cord following dorsal root or peripheral nerve lesions, *Exp Neurol* 110:248-257, 1990.
4. Rubel EW, MacDonald GH: Rapid growth of astrocytic processes in N. magnocellularis following cochlea removal, *J Comp Neurol* 318: 415-425, 1992.
5. Stephenson JL, Byers MR: GFAP immunoreactivity in trigeminal ganglion satellite cells after tooth injury in rats, *Exp Neurol* 131:11-22, 1995.
6. Woodham P, Anderson PN, Nadim W, Turmaine M: Satellite cells surrounding axotomized rat dorsal root ganglion cells increase expression of a GFAP-like protein, *Neurosci Lett* 98:8-12, 1989.
7. Fried K, Arvidsson J, Robertson B, Pfaller K: Anterograde horseradish peroxidase tracing and immunohistochemistry of trigeminal ganglion tooth pulp neurons after dental nerve lesions in the rat, *Neuroscience* 43:269-278, 1991.
8. Marfurt CF, Turner F: The central projections of tooth pulp afferent neurons in the rat as determined by the transganglionic transport of horseradish peroxidase, *J Comp Neurol* 223:535-547, 1984.
9. Marfurt CF: The somatotopic organization of the

- cat trigeminal ganglion as determined by the horseradish peroxidase technique, *Anat Rec* 201:105-118, 1981.
10. Byers MR, Narhi MV, Mecifi KB: Acute and chronic reactions of dental sensory nerve fibers to cavities and desiccation in rat molars, *Anat Rec* 221:872-883, 1988.
 11. Dekoninck P, Carbonetto S, Cooper E: NGF induces neonatal rat sensory neurons to extend dendrites in culture after removal of satellite cells, *J Neurosci* 13:577-588, 1993.
 12. Morris R, Southam E, Braid DJ, Garthwaite J: Nitric oxide may act as a messenger between dorsal root ganglion neurones and their satellite cells, *Neurosci Lett* 137:29-32, 1992.
 13. Sasaki Y, Wakisaka S, Kurisu K: Effect of peripheral axotomy of the inferior alveolar nerve on the levels of neuropeptide Y in rat trigeminal primary afferent neurons, *Brain Res* 664:108-114, 1994.
 14. Wakisaka S, Sasaki Y, Kurisu K: Temporal analysis of neuropeptide Y expression in the rat trigeminal ganglion following peripheral axotomy of the inferior alveolar nerve, *Neurosci Lett* 188:49-52, 1995.
 15. Wakisaka S, Takikita S, Sasaki Y, Kato J, Tabata MJ, Kurisu K: Cell size-specific appearance of neuropeptide Y in the trigeminal ganglion following peripheral axotomy of different branches of the mandibular nerve of the rat, *Brain Res* 620:347-350, 1993.
 16. Rappaport HZ, Devor M: Trigeminal neuralgia: the role of self sustaining discharge in the trigeminal ganglion, *Pain* 56: 127-138, 1994.
 17. Devor M, Wall PD: Cross-excitation in dorsal root ganglia of nerve-injured and intact rats, *J Neurophysiol* 64: 1733-1746, 1990.
 18. Utschneider D, Kocsis J, Devor M: Mutual excitation among dorsal root ganglion neurons in the rat, *Neurosci Lett* 146:53-56, 1992.
 19. Wall PD, Devor M: Sensory afferent impulses originate from dorsal root ganglia as well as from the periphery in normal and nerve injured rats, *Pain* 17:321-339, 1983.
 20. Byers MR, Costello RJ: Cation-binding sites in trigeminal ganglia and maxillary nerve: unusual reactivity of perikarya, stem axons, and satellite cells, *Brain Res* 443:125-136, 1988.
 21. Gazelius B, Edwall B, Olgart LM, Lundberg JM, Hokfelt T, Fischer JA: Vasodilatory effects and coexistence of CGRP and substance P in sensory nerves of cat dental pulp, *Physiol Scand* 130:33-40, 1987.
 22. Byers MR, Taylor PE, Khayat BG, Kimberly CL: Effects of injury and inflammation on pulpal and periapical nerves, *J Endod* 16: 78-84, 1990.
 23. Khayat BG, Byers MR, Taylor PE, Mecifi KB, Kimberly CL: Responses of nerve fibers to pulpal inflammation and periapical lesions in rat molars demonstrated by calcitonin gene-related peptide immunocytochemistry, *J Endod* 14: 577-587, 1988.
 24. Kimberly CL, Byers MR: Inflammation of rat molar pulp and periodontium causes increased calcitonin gene-related peptide and axonal sprouting, *Anat Rec* 222:289-300, 1988.
 25. Taylor PE, Byers MR, Redd PE: Sprouting of CGRP nerve fibers in response to dentin injury in rat molars, *Brain Res* 461:371-376, 1988.
 26. Taylor PE, Byers MR: Immunocytochemical study of the response of nerves containing CGRP to microabscess formation and healing of rat molars, *Arch Oral Biol* 35:629-638, 1990.
 27. Mazza JP, Dixon AD: A histologic study of chromatolytic cell groups in the trigeminal ganglion of the rat, *Arch Oral Biol* 17:377-387, 1972.
 28. Sugaya A, Chudler EH, Byers MR: Uptake of exogenous fluorescent Dil by intact junctional epithelium of adult rats allows retrograde labelling of trigeminal sensory neurons, *Brain Res* 653: 330-334, 1994.

사진부도 설명

Fig. 1. GFAP-IR in the central root astrocyte in control group. (X100)

Fig. 2. GFAP-IR in the satellite cells of the trigeminal ganglion in control group. (X40)

Fig. 3. GFAP-IR in the satellite cells of the mandibular region in three day group after IAN axotomy. (X200)

Fig. 4. GFAP-IR in the satellite cells of the ophthalmic region in three day group after IAN axotomy. (X100)

Fig. 5. GFAP-IR in the satellite cells of the mandibular region in seven day group after IAN axotomy. (X200)

Fig. 6. GFAP-IR in the satellite cells of the maxillary region in seven day group after IAN axotomy. (X200)

사진부도

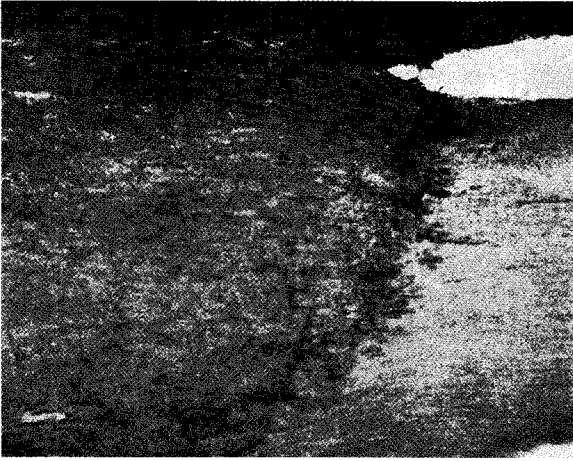


Fig. 1

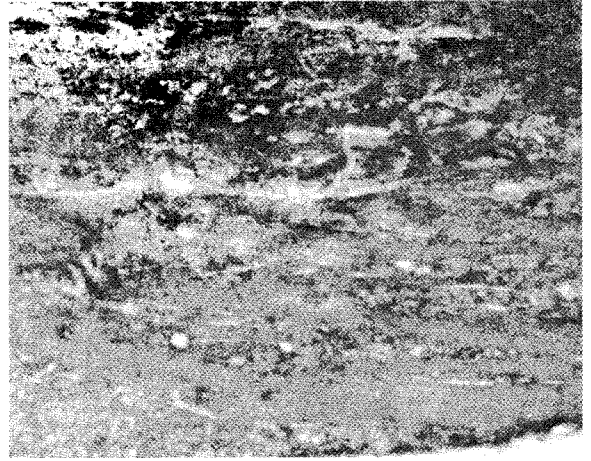


Fig. 2

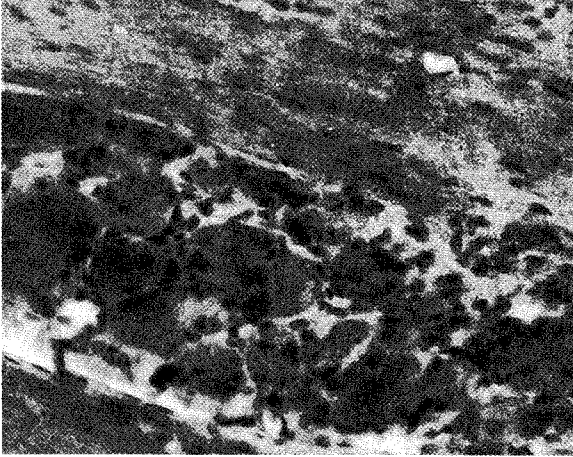


Fig. 3

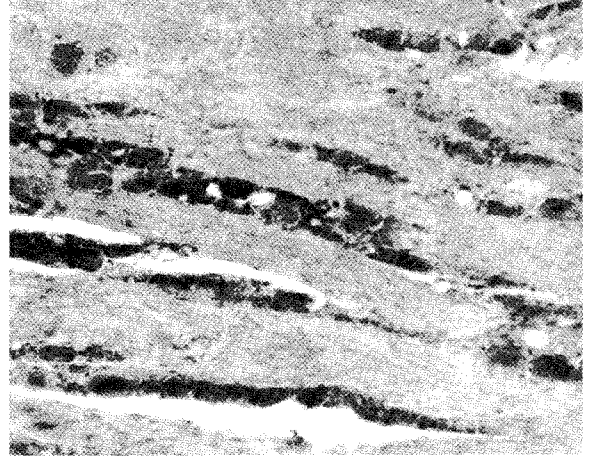


Fig. 4

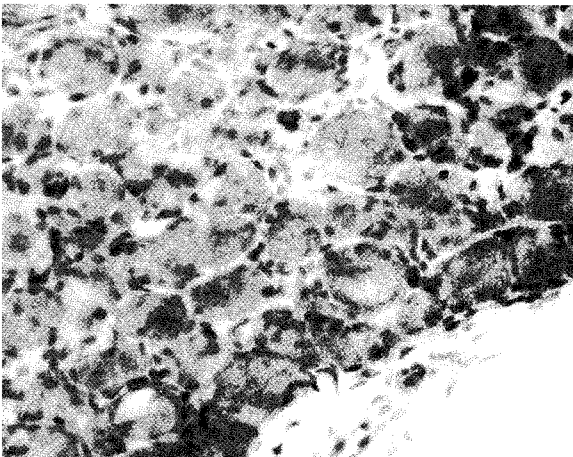


Fig. 5

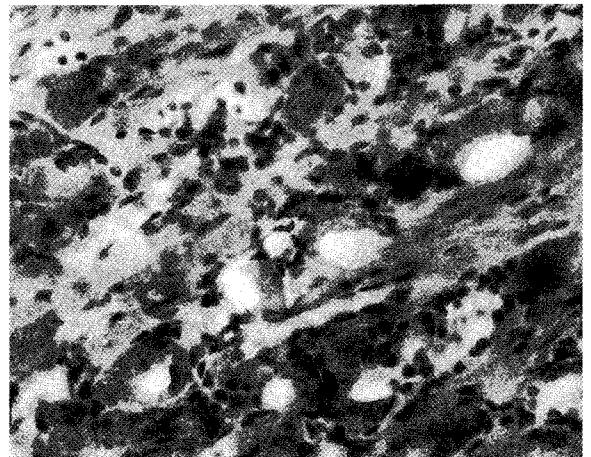


Fig. 6