

Cytosine Arabinoside 전처리가 척수후근절 외식편 배양에 미치는 영향

정호영^{1,2} · 한성민^{1,3} · 박종웅³ · 윤인찬^{1,2}

¹한국과학기술연구원 의공학연구소, ²과학기술연합대학원 의공학과, ³고려대학교 의과대학 의과학과

Effect of Cytosine Arabinoside Pre-treatment in Dorsal Root Ganglion Explant Culture

H.Y. Jung^{1,2}, S. Han^{1,3}, J.W. Park³ and I. Youn^{1,2}

¹Department of Biomedical Engineering, Korea Institute of Science and Technology

²Department of Biomedical Engineering, Korea University of Science and Technology

³Department of Biomedical Sciences, Korea University College of Medicine

(Manuscript received 11 December 2015; revised 14 December 2015; accepted 19 December 2015)

Abstract: Explant culture condition of dorsal root ganglion have been used to investigate the pathophysiology of peripheral nerve injury, while applying for the various clinical symptom such as trauma, pressure, and stretch. However, explant culture is usually contaminated by mitotic cells, which may observed as a newly divided cells including fibroblast or glia. The mitotic cells could be able to interrupt and change the cell signaling that make it difficult to avoid detrimental effects during the experiments. To eliminate mitotic cells, anti-mitotic reagents like mixture of uridine and 5-fluorodeoxyuridine or cytosine arabinoside were added to the cultures on the following day, but there is no research that investigate viability of anti-mitotic reagent in dorsal root ganglion explant culture. In this study, we investigate inhibition effect of cytosine arabinoside to mitotic cells in dorsal root ganglion explant culture. Also we visualized and analyzed anti-mitotic effect and toxicity of cytosine arabinoside in various concentration condition. This dorsal root ganglion explant culture condition can be applied to research that effect and mechanism of various stimulation and chemical application which affect peripheral nerve regeneration.

Key words: Dorsal root ganglion explant culture, Cytosine arabinoside, Antimitotic effect, Neurite regeneration

I. 서 론

말초신경 손상은 사고 이후의 트라우마, 압박, 스트레치 및 저산소증에 의해 일반적으로 나타나는 증상이다[1]. 선천

적으로 말초신경계는 신경 손상 후 24시간 동안 최대 1 mm의 신경 돌기를 재생시킬 수 있는 재생능력을 가지고 있으나[2,3], 임상적으로는 재생 속도의 부족, 방향성을 지니지 않는 재생 능력으로 기능적 재생이 어렵다[4]. 이러한 말초신경 재생능력의 한계로 인해 말초신경 손상 환자들의 재활과 일상생활로의 복귀를 위해 개인적, 사회적 비용이 발생하게 된다[5,6].

현재 전기 자극, 생물학적, 생화학적 약물 치료 등 다양한 방법으로 말초신경을 재생시키는 기술들이 연구되고 있으며, 이러한 연구를 위해 다양한 신경 연구모델이 제작되고 있다. 대표적으로 생체 외 환경에서 신경세포를 분리배양하여 신

Corresponding Author : I. Youn

5. Hwarang-ro 14-gil, Seongbuk-gu, Seoul 02792, Republic of Korea. Department of Biomedical Engineering, Korea Institute of Science and Technology L7422.

Tel: +82-2-958-5928 (+82-10-2464-2510)

E-mail: iyoun@kist.re.kr

이 연구는 한국과학기술연합대학원 연구과제(2E25505)의 지원을 받아 수행하였음.

II. 연구 방법

1. 신생 생쥐의 척수후근절 외식편 배양

모든 동물 실험의 과정은 한국과학기술연구원의 동물실험 윤리위원회의 승인을 받아 수행되었다. 생후 48시간이 지난 수컷 ICR생쥐(SAMTAKO, Osan, Korea)는 얼음을 통해 절제된 후 참수법을 시행하였고, 해부현미경(CK40, Olympus, Tokyo, Japan)을 이용하여 척수후근절을 Hank's Balanced Salt Solution (HBSS, Gibco, NY, USA)내에서 획득한 뒤 즉시 차가운 HBSS에 보관하였다. 이때 채취한 척수후근절은 다른 척수후근절 보다 크기가 큰 요추부분에서 분리하였고, 주변의 다른 조직들은 날카로운 포셉과 가위를 이용하여 제거하였다. 분리된 척수후근절의 배양은 커버 글라스(Cover Glass, Thermo-fisher scientific, Waltham, MA, USA) 위에서 진행하였고, 세포 흡착을 높이기 위해서 커버 글라스 표면은 친수성(hydrophilic)이 되도록 산소 플라즈마(oxygen plasma) 코팅기(CUTE, FEMTO SCIENCE, Seoul, Korea)를 이용하여 80초간 코팅하였다. 이후 phosphate buffered saline (PBS, Lonza, Walkersville, USA)에 희석된 10 µg/ml poly-D-lysine (PDL, Millipore, MA, USA)으로 상온에서 3시간 코팅하고, 3차 증류수로 씻어낸 뒤 100 µg/ml laminin (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)으로 37°C 에서 하루 동안 코팅하였다[9]. 수술적 기법을 통해 분리된 척수후근절은 코팅된 커버 글라스위에 올려진 뒤, 이후 37°C로 데워진 배양액을 첨가하였다. 척수후근절 배양을 위해 사용한 배양액은 Neurobasal medium (Gibco, NY, USA)에 2% B-27 supplement (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 1% penicillin-streptomycin and L-glutamine (Thermo-fisher scientific, Rochester, USA)을 첨가하였다.

배양 시작 후 24시간 동안 nerve growth factor (NGF, R&D Systems, Minneapolis, USA)를 100 ng/ml 농도로 첨가하였고, 이 후 72시간 동안 서로 다른 농도의 Ara-C를 처리한 기본 배양액으로 배양하였으며, 다음 24시간 동안 기본 배양액에 배양하여 안정기를 주었다. 안정화 기간 이

경세포의 손상 및 재생을 검증하는 방법과 생체 내에서 말초 신경을 손상시키고 일정 시간 후 신경의 재생정도를 행동 실험 및 조직학적으로 검증하는 방법 등이 사용되고 있다[7,8].

최근 말초신경 연구를 위해 신경 외식편 배양법이 주목을 받고 있다[9]. 신경 외식편 배양법은 신경돌기의 관찰이 용이하고, 신경돌기 절단(axotomy)과 같은 연구 기법을 적용할 수 있다. 또한, 신경돌기 관찰을 위해 미세관을 포함한 배양용기를 제작하지 않아도 되는 장점을 가지고 있다[10,11]. 추가적으로 신경 외식편 배양법은 살아있는 조직을 떼어내 배양하기 때문에 기존의 생체 외 배양 방법보다 생체 내 연구 환경과 유사한 조건을 만들 수 있다.

그러나 신경 외식편 배양 방법은 배양기간이 길어질수록 외식편 주변부에 분열세포들이 발생하여 신경세포체와 신경돌기를 구분하여 관찰하기 어렵고, 주변의 섬유아세포(fibroblast)와 같은 다양한 세포들이 증식하여, 이때 증식한 세포들이 신경세포에 영향을 미칠 수 있다. 그림 1은 척수후근절 외식편을 배양함에 있어서 분열억제제를 사용하지 않았을 때 배양 시간에 따라 나타나는 분열세포를 나타낸다. 배양 시간이 증가함에 따라 척수후근절 외식편 주변부에 분열세포들이 증식하는 것을 확인할 수 있다. 분열세포의 증식을 억제하기 위해 Uridine, 5-fluorodeoxyuridine의 혼합물 및 cytosine arabinoside (Ara-C)와 같은 세포 분열억제제들이 신경세포 배양에 적용되고 있지만, 분열억제제는 자체적으로 독성을 가지고 있어서 고농도로 처리할 경우 연구하고자 하는 신경세포까지 사멸시킬 수 있다[11,12].

본 연구에서는 척수후근절을 외식편 배양함에 있어서 분열억제제인 Ara-C의 농도를 다양하게 처리하고, 이때 나타나는 분열세포의 변화와 신경세포에 미치는 독성을 분석하였다. 이를 통해 분열세포를 제외하고 신경 돌기에 나타나는 변화를 연구할 수 있는 Ara-C의 최적 농도 조건을 확립하고자 하였다. 이를 위해 척수후근절 외식편 배양에 있어서 다양한 농도의 Ara-C를 72시간 동안 처리하고 이 후 나타나는 분열 세포수의 변화와 사멸되는 신경세포의 변화를 확인하고 그 결과를 비교하였다.

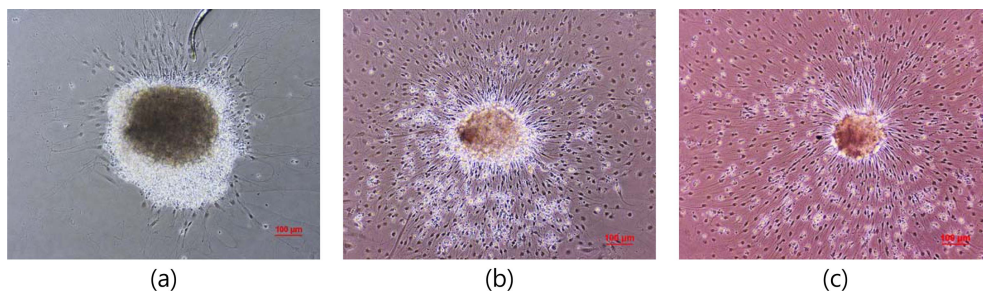


그림 1. 척수후근절 외식편 배양 중 발생하는 분열세포의 모습: (a) 배양 24시간 후, (b) 배양 72시간 후, (c) 배양 120시간 후.

Fig. 1. Mitotic cells were generated in dorsal root ganglion explant culture: Dorsal root ganglion explant culture after (a) 24hrs, (b) 72hrs, (c) 120hrs.

후 120시간 동안 기본 배양액으로 배양 하였으며, 모든 배양은 습도, 37°C의 온도 조건 및 5% 이산화탄소의 환경을 유지하는 배양기(Sanyo, Tokyo, Japan)를 이용하였다.

2. 세포 분열능 측정

Ara-C 전처리 농도가 세포 분열능에 미치는 영향을 확인하기 위해서 48시간 간격으로 광학현미경(eclipse TS 100, Nikon, Tokyo, Japan)을 통해 배양된 척수후근절 외식편을 관찰 및 촬영하였다. 이후 영상분석 프로그램(NIS-Elements BR, Nikon, Tokyo, Japan)을 이용하여 각 농도별 3개의 척수후근절 샘플에서 척수후근절 외식편을 중앙에 위치시킨 후 4 mm × 4 mm 범위의 분열된 세포의 수를 확인하여 각 조건별 평균값을 구하였다.

3. 세포생사판별시험

Ara-C 전처리 농도가 신경세포에 미치는 독성을 확인하기 위해서 live&dead kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 이용하여 신경세포 사멸 정도를 확인하였고, 실험은 제품 사용방법에 맞추어 진행하였다. 먼저 배양액을 제거하고 PBS로 씻어준 뒤 2 μM calcein AM과 4 μM ethidium homodimer (EthD-1)을 빛이 없는 상온의 환경에서 45분 동안 척수후근절 외식편 샘플에 처리하였다. 이후 염색 용액을 제거하고 PBS로 용액을 바꾼 뒤 공초점 현미경(Leica TCS SPE, Leica microsystems, USA)을 통해 488 nm 녹색파장의 빛을 통해 살아있는 세포를 확인하고 594 nm의 적색파장의 빛을 통해 죽은 세포를 확인하였다. 이후 영상 분석 프로그램(Image J, NIH, USA)을 이용하여 척수후근절 외식편에서 나타나는 녹색 빛의 강도와 적색 빛의 강도를 측정하였다. 이후 녹색 빛의 강도를 적색 빛의 강도로 나누어 척수후근절 외식편의 생존 능력을 확인하였으며, 이때 분열억제제를 사용하지 않은 실험군(CTRL)의 값을 100%로 설정하여 다른 조건을 가진 그룹 간의 차이를 백분율로 비교, 분석하였다.

4. 통계 처리

척수후근절 외식편 배양에서 얻어진 모든 정량적인 결과는 각 그룹별 차이의 유의성을 검증하기 위해 일원배치 분산분석(One-way ANOVA)를 적용하였다. 유의 수준은 95%로 p-value가 0.05 보다 작을 때 값이 유의성을 확보한 것으로 택하였다.

III. 연구 결과 및 고찰

1. Ara-C 전처리 농도에 따른 분열세포 수

신경돌기를 이용하는 다양한 연구를 진행하기 위해서는

신경돌기의 주변에 나타나는 분열된 세포들을 최대한 억제하여 신경돌기를 직접 관찰할 수 있어야 한다. 본 연구에서는 분열억제제인 Ara-C를 다양한 농도로 72시간동안 적용한 뒤 24시간의 안정 기간을 두고 이후 기본배양액으로 배양하며 분열된 세포의 수를 확인하였다. 그림 2는 Ara-C 전처리 후 120시간 동안 기본 배양액으로 배양한 후 척수후근절 외식편 주변에 나타나는 분열세포의 수를 나타낸 것이다. 서로 다른 농도의 Ara-C를 전처리 했을 때, 그 영향으로 이후 나타나는 분열된 세포의 숫자가 각 그룹간 유의미한 차이를 보였다. 그림 3의 경우, 각 시간 별, Ara-C 농도에 따라 나타나는 분열 세포의 수를 나타낸 것이다. 이때 각 시간별 Ara-C를 처리한 그룹에서 발생한 분열세포의 수는 컨트롤 그룹의 분열세포의 수를 100%로 설정한 후 그에 따라 % 값을 나타내었다. 각 그룹 결과값의 유의성은 일원배치분산분석(One-way ANOVA)을 이용하여 통계적 분석을 진행하였다. 이때 p-value는 모두 0.001 보다 작은 값을 나타내어 척수후근절 외식편 배양에서 Ara-C의 농도와 분열세포 억제효과는 상관관계를 가짐을 확인하였다.

연구결과 10 μM Ara-C 전처리 그룹은 분열 세포의 수가 약 5개에 수렴하는 것으로 나타났으며, 10 μM 농도의 Ara-C를 72시간 동안 전처리한 그룹은 Ara-C를 처리하지 않은 그룹에 비해 최대 664.3배, 1 μM Ara-C를 처리한 그룹에 비해 33.0배, 3 μM Ara-C를 처리한 그룹에 비해 8.7배의 분열억제효과를 보였다(표 1).

2. Ara-C 전처리 농도에 따른 신경세포 독성 분석

본 연구에서 사용된 분열억제제 Ara-C는 고농도로 처리 시 신경세포에 손상을 준다[11]. 따라서 최적의 Ara-C 전처리 농도는 분열억제효과를 보이며 신경세포에 손상을 입히지 않아야 한다.

Ara-C 전처리의 독성을 확인하기 위해 live and dead cell viability assay kit를 사용하였으며, 그 결과를 바탕으로 신생 생쥐 척수후근절 외식편 배양 시 Ara-C를 3일간 전처리했을 때 세포사멸에 미치는 영향을 분석하였다. 10 μM 이하의 농도를 가지는 Ara-C를 전처리한 그룹을 기본배양액 그룹과 비교했을 때 살아있는 세포와 죽은 세포의 비율이 차이가 나타나지 않는 것을 확인하였다. 그림 4는 컨트롤 그룹과 서로 다른 농도의 Ara-C를 전처리한 그룹에서 120시간 배양한 뒤 live&dead kit를 통해 척수후근절 외식편의 살아있는 세포와 죽은 세포를 나타낸 것이다. 여기서 살아있는 세포는 녹색 빛으로, 죽은 세포는 적색 빛으로 나타난다. 그림 5는 그림 4에서 나타난 살아있는 세포와 죽은 세포의 비율을 구한 것으로, 이때 컨트롤 그룹의 값을 100%로 설정하여 서로 다른 농도의 Ara-C 전처리 그룹들의 생존능력을 비교 분석한 것이다. 그림 5를 통해 본 연구

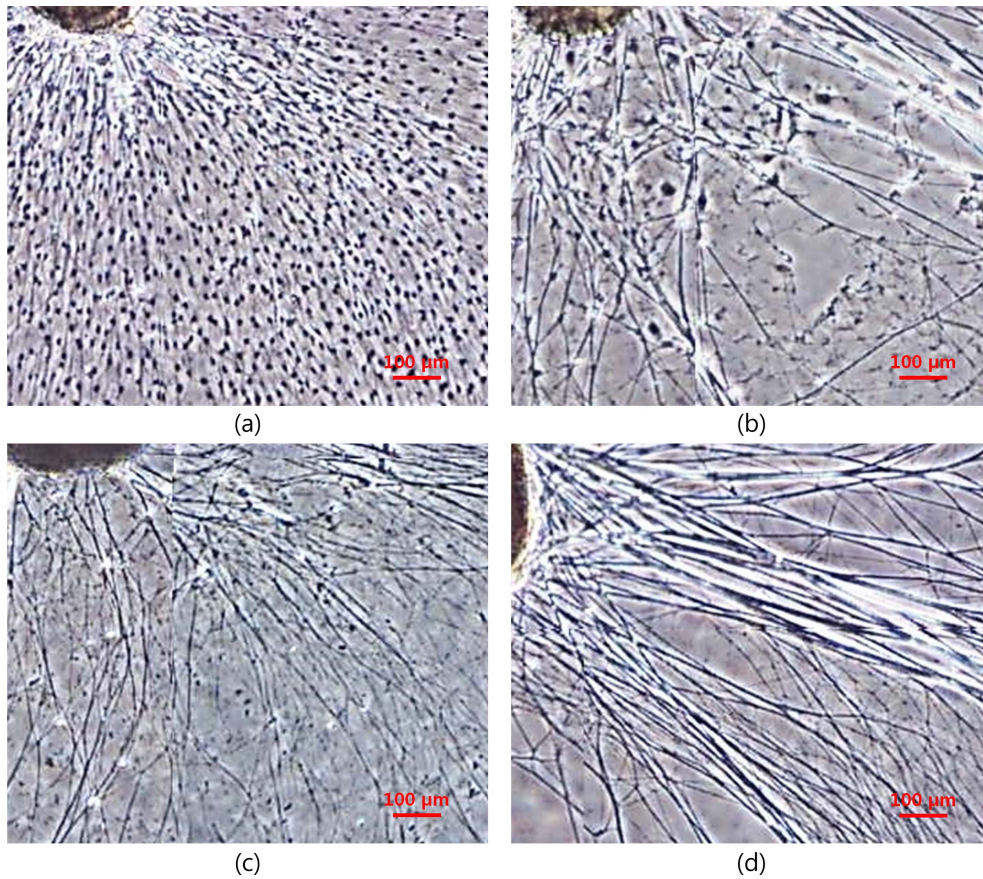


그림 2. Ara-C 전처리 농도에 따른 분열된 세포의 수: (a) CTRL, (b) Ara-C 1 μM, (c) Ara-C 3 μM, (d) Ara-C 10 μM.

Fig. 2. Divided cells of dorsal root ganglion explant culture after Ara-C pre-treatment: (a) CTRL, (b) Ara-C 1 μM, (c) Ara-C 3 μM, (d) Ara-C 10 μM.

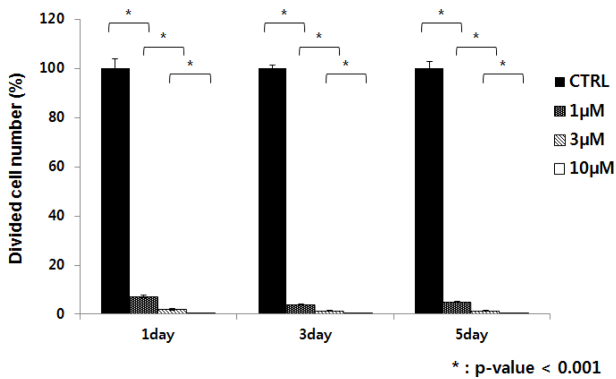


그림 3. Ara-C 전처리 농도에 따른 각 그룹별 분열된 세포의 수: (CTRL = 100%) 오차막대 (error bar) 는 표준 오차를 의미함.

Fig. 3. Divided cells in dorsal root ganglion explant culture after Ara-C pre-treatment: The number of divided cells in each samples, (CTRL = 100%) and error bar means standard error in this graph.

에서 적용한 Ara-C 전처리는 척수후근절 외식편의 생존능력에 악영향을 미치지 않음을 알 수 있다. 따라서 Ara-C 전처리 농도에 따른 분열세포 수의 결과를 참고하였을 때, 실

표 1. Ara-C 농도에 따른 분열세포의 수 비교.

Table 1. Comparison of the number of divided cells with different Ara-C concentration.

Ara-C 농도 (μM)	24 시간	72 시간	120 시간
0	708.3 ± 28.4	1924.3 ± 51.9	3414.7 ± 103.1
1	51.0 ± 4.0	76.0 ± 1.5	175.3 ± 4.8
3	16.7 ± 2.0	30.0 ± 2.6	46.3 ± 3.0
10	2.0 ± 1.0	3.7 ± 1.8	5.3 ± 2.2

험 그룹 중 신경돌기 관찰을 방해하는 분열세포를 억제하며 신경세포의 손상을 최소화하는 가장 효율적인 배양그룹은 Ara-C 10 μM을 전처리 한 그룹임을 알 수 있다.

3. 척수후근절 외식편 배양 시 분열억제제 Ara-C 최적 조건의 의미

본 연구에서는 척수후근절 외식편 최적 배양 조건을 제안하고 이때 사용된 분열억제제인 Ara-C가 배양에 미치는 영향을 확인하였다. 기존의 연구를 통해 Ara-C는 고농도로 적

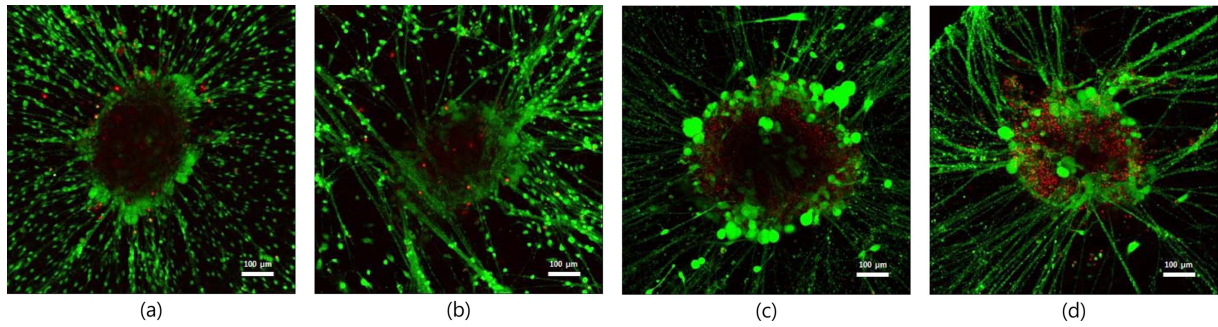


그림 4. Ara-C 전처리 농도에 따른 신경세포 생존 능력 평가: (a) CTRL, (b) Ara-C 1 μM, (c) Ara-C 3 μM, (d) Ara-C 10 μM.
 Fig. 4. Assessment of the viability of various Ara-C concentration pre-treatment in dorsal root ganglion explant culture: Live cells (green) and dead cells (red) were stained: (a) CTRL, (b) Ara-C 1 μM, (c) Ara-C 3 μM, (d) Ara-C 10 μM.

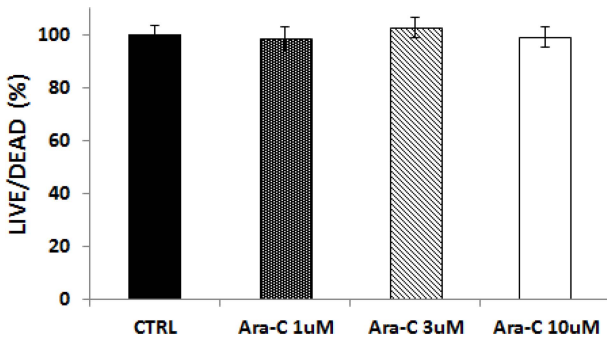


그림 5. Ara-C 전처리 농도에 따른 척수후근절 외식편 생존능력 비교: CTRL값을 100%로 설정하여 비교함. 오차막대(error bar)는 표준 오차를 의미함.
 Fig. 5. Comparison of the viability of various Ara-C concentration pre-treatment in dorsal root ganglion explant culture. Live/dead intensity ratio is similar to each Ara-C treatment group and CTRL group: CTRL group is considered as 100%, and error bar means standard error in this graph.

용하였을 때 신경세포의 자가사멸을 유발할 수 있는 약물로 알려져 있다[11]. 그러나 본 연구에서는 척수후근절 외식편 배양을 함에 있어서 Ara-C가 본 배양이 아닌 전처리로 사용될 경우, 분열억제효과를 나타내며, 또한 생존 능력에도 악영향을 미치지 않음을 확인하였다. 이러한 결과의 차이는 신경세포를 세포단위로 효소처리하여 배양한 것이 아니라, 척수후근절 외식편 배양을 통해 조직 그대로 배양하는 배양법의 차이가 존재하기 때문이다. 또한, Ara-C는 수반세포를 보다 순수하게 배양하기 위해 적용될 수 있으며[13], 본 연구에서는 척수후근절 외식편 배양에서 주변부에 나타나는 분열세포들을 억제하기 위해 Ara-C를 척수후근절 외식편 배양법에 적용하였다. 본 연구에서는 척수후근절 외식편 배양에서 분열세포를 억제하며 척수후근절 외식편의 생존능력을 저하시키지 않는 최적의 조건으로 10 μM Ara-C의 적용을 제안하였다. 본 논문에서 제시한 분열억제제 Ara-C를 적용한 최적의 척수후근절 외식편 배양조건은 다른 생체 외

배양법과 비교했을 때 생체 내 환경과 유사하고, 동시에 배양 환경을 생체 외 환경과 같이 조절할 수 있는 외식편 배양의 특성을 유지하며 척수후근절 외식편 배양 시 주변부에 나타나는 분열세포들을 효과적으로 억제할 수 있다. 이를 통해 척수후근절 외식편을 이용한 신경 관련 연구에서 분열 세포를 제외하여 자극 및 약물에 의해 나타나는 변화의 원인 및 기전을 보다 정확하고 직접적으로 연구할 수 있다.

IV. 결 론

본 연구에서는 척수후근절 외식편 배양함에 있어서 분열 세포를 억제하기 위한 분열 억제제인 Ara-C의 전처리 농도에 따른 영향을 확인하였다. 이를 위하여 72시간의 Ara-C 전처리 후 본 배양에서 나타나는 분열세포의 정도를 측정하였고, 10 μM Ara-C를 전처리 했을 때 척수후근절 외식편 주변에 나타나는 분열세포가 가장 적게 나타났다. 분열억제제를 고농도로 적용하였을 때 나타날 수 있는 독성을 확인하기 위해 생존능력 분석을 진행하였으며, 그 결과 10 μM 이하의 Ara-C 농도에서는 전처리에 따른 생존능력 변화가 없음을 확인하였다. Ara-C 분열억제제와 척수후근절 외식편 배양 방법을 이용한 신경돌기 배양법은 임상 및 동물 실험과 비교했을 때 실험 조건을 세밀하게 조절할 수 있으며, 일반적인 생체 외 배양 모델에 비해 임상 및 동물 실험과 유사한 조건을 만들어 줄 수 있다. 본 연구에서 제안한 척수후근절 외식편 배양 조건은 향후말초신경 재생을 이용하는 다양한 신경 연구에 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

Reference

[1] M.G. Burnett and E.L. Zager, "Pathophysiology of peripheral nerve injury: a brief review," *Neurosurg. Focus*, vol. 16, no. E1, 2004.
 [2] E. Gutmann, L. Guttman, P.B. Medawar and J.Z. Young, "The rate of regeneration of nerve," *J. Exp. Biol.*, vol. 19, pp.

- 14-44, 1942.
- [3] S. Sunderland, "Rate of regeneration in human peripheral nerves," *Arch. Neurol. Psychiatry*, vol. 58, pp. 1-6, 1947.
- [4] K.M. Chan, T. Gordon, D.W. Zochodne and H.A. Power, "Improving peripheral nerve regeneration: From molecular mechanisms to potential therapeutic targets," *Exp. Neurol.*, vol. 261, pp. 826-835, 2014.
- [5] G. Evans-Jones, S.P. Kay, A.M. Weindling, G. Cranny, A. Ward, A. Bradshaw and C. Hernon, "Congenital brachial palsy: incidence, causes, and outcome in the United Kingdom and Republic of Ireland," *Arch. Dis. Child. Fetal Neonatal ED.*, vol. 88, pp. F185-F189, 2003.
- [6] J. Noble, C.A. Munro, V.S. Prasad and R. Midha, "Analysis of upper and lower extremity peripheral nerve injuries in a population of patients with multiple injuries," *J. Trauma*, vol. 45, pp. 116-122, 1998.
- [7] S. Pieraut, V. Laurent-Matha, C. Sar, T. Hubert, I. Mechaly, C. Hilaire, M. Mersel, E. Delpire, J. Valmier and F. Scamps, "NKCC1 phosphorylation stimulates neurite growth of injured adult sensory neurons," *J. Neuroscience*, vol. 27, no. 25, pp. 6751-6759, 2007.
- [8] A.M. Kenney and J.D. Kocsis, "Peripheral axotomy induces long-term c-Jun amino-terminal kinase-1 activation and activator protein-1 binding activity by c-Jun and junD in adult rat dorsal root ganglia in vivo," *J. Neuroscience*, vol. 18, no. 4, pp. 1318-1328, 1998.
- [9] L. Wang and T. Marquardt, "Direct live monitoring of heterotypic axon-axon interactions in vitro," *Nature Protocol*, vol. 7, no. 2, pp. 351-363, 2012.
- [10] I.H. Yang, R. Siddique, S. Hosmane, N. Thakor and A. Hoke, "Compartmentalized microfluidic culture platform to study mechanism of paclitaxel-induced axonal degeneration" *Exp. Neurol.*, vol. 218, pp. 124-128, 2009.
- [11] C.G. Besirli, T.L. Deckwerth, R.J. Crowder, R.S. Freeman and E.M. Johnson Jr., "Cytosine arabinoside rapidly activates Bax-independent death pathway in sympathetic neurons," *Cell Death Differ.*, vol. 10, pp. 1045-1058, 2003.
- [12] D.S. Park, S.E. Farinelli and L.A. Greene, "Inhibitors of cyclin-dependent kinases promote survival of post-mitotic neuronally differentiated PC12 cells and sympathetic neurons," *J. Biol. Chem.*, vol. 271, no. 14, pp. 8161-8169, 1996.
- [13] S.M. Kim, J. Jahng and J.H. Lee, "The most appropriate anti-mitotic treatment of Ara-C in Schwann cell-enriched culture from dorsal root ganglia of new born rat," *J. Kor. Oral Maxillofac. Surg.*, vol. 32 no. 1, pp. 42-51, 2006.