پژوهنده (مجله پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی)
سال چهاردهم، شماره ۳، پی در پی ۶۹، صفحات ۱۳۷ تا ۱۴۱
مرداد و شهریور ۱۳۸۸

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۷/۳/۱
تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۸۸/۳/۱۱

بررسی بیومارکرهای کارسینومای سلول‌های بازال با استفاده از آنالیزهای پروتئومیکی

دکتر حمیده مروج‌فرشی[۱]، دکتر علیرضا زالی[۲]، حکیمه زالی[۳]، دکتر مصطفی رضایی‌طاویرانی[۴*]، دکتر مجید رضایی‌طاویرانی[۵]، دکتر فردوس رستگارجزی[۶]، مینو شاهانی[۷]، امین رستمی[۸]، شیوا کلانتری[۳]

۱. دانشیار، مرکز تحقیقات پوست، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
۲. دانشیار، بخش جراحی مغز و اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
۳. دانشجوی دکتری پروتئومیکس کاربردی، مرکز تحقیقات پروتئومیکس، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
۴. استادیار، مرکز تحقیقات پروتئومیکس، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
۵. دستیار جراحی، دانشگاه علوم پزشکی همدان
۶. استادیار، انستیتو بین المللی مهندسی ژنتیک و بیوتکنولوژی
۷. دانشجوی دکتری بیوفیزیک، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم تحقیقات
۸. کارشناس ارشد بیولوژی سلولی و مولکولی، مرکز تحقیقات پروتئومیکس، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

چکیده

سابقه و هدف: کارسینومای سلول‌های بازال، یکی از شایع‌ترین نوع سرطان‌های پوست غیر ملانومایی انسانی محسوب می‌شود. با مطالعه فاکتورهای پروتئینی آن و شناسایی بیشتر تغییراتی که در روند سرطانی‌شدن پوست رخ می‌دهند، می‌توان در روند پیشگیری و درمان، به بیماران کمک مؤثری نمود. هدف از انجام این پژوهش، دستیابی به بیومارکرهای پروتئینی است که در تشخیص و درمان کارسینومای سلول‌های بازال مؤثر باشند.

مواد و روش‌ها: تحقیق به روش توصیفی انجام گرفت. نمونه‌های بافت سرطانی و سالم از ۳ بیمار مبتلا به سرطان پوست از نوع کارسینومای سلول‌های بازال گرفته شد و با روش‌های جداسازی استاندارد، کل پروتئین‌های بافت تخلیص و با استفاده از الکتروفورز دوبعدی پروتئین‌ها جدا گشتند. پروتئوم‌های بافت سالم و توموری با همدیگر مقایسه و میزان بیان پروتئین‌های مورد نظر با استفاده از آنالیزهای لازم بررسی شد.

یافته‌ها: تعداد ۸۷ پروتئین در ژل‌های حاصل از الکتروفورز دوبعدی، تعیین شد که ۷۶ عدد از آنها، دارای تفاوت آشکاری در بیان بودند. تعداد ۷ پروتئین، از طریق بانک‌های اطلاعاتی شناسایی شدند.

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد در بیماری مورد مطالعه، بیان جمع کثیری از پروتئین‌های بافتی در بافت سرطانی، تغییر یافته و بیشتر آنها کاهش یافته یا اصلاً بیان نشده‌اند. این پروتئین‌های تغییر بیان‌یافته، می‌توانند به عنوان بیومارکر در مراحل شناسایی و درمان این بیماری مؤثر واقع شوند.

واژگان کلیدی: سلول‌های کارسینومای بازال، الکتروفورز دوبعدی، پروتئومیک

مقدمه

کارسینومای سلول‌های بازال (Basal Cell Carcinoma; BCC)، یکی از شایع‌ترین سرطان‌ها در انسان می‌باشد که از گروه سرطان‌های پوست غیر ملانومایی است (۱) و اولین بار در سال ۱۸۲۷ توسط ژاکوب تشریح شد (۲). به نظر می‌رسد نور آفتاب و جایگاه آناتومی، مهمترین دلایل آسیب‌شناسی پیشرفت BCC باشند. در واقع، نور خورشید عمده‌ترین عامل گسترش BCC است. پیشرفت BCC به نواحی از پوست محدود می‌گردد که دارای فولیکول‌های مو است.در مورد جایگاه آناتومی، خصوصاً آن نواحی از پوست که دارای بیشترین تعداد سلول‌ها با پیری زودرس می‌باشند، هدف این بیماری است. یکی از مهمترین جنبه‌های BCC این است که

*نویسنده مسئول مکاتبات: دکتر مصطفی رضایی‌طاویرانی؛ تهران، میدان قدس، ابتدای خیابان دربند، دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، مرکز تحقیقات پروتئومیکس؛ پست الکترونیک: tavirany@yahoo.com

[Downloaded from pajoohande.sbmu.ac.ir on 2024-04-24]

تومورها تقریباً هیچوقت متاستاز نمی‌دهند. به نظر می‌آید این نوع سرطان به رشد تومور در جایگاه خود محدود می‌گردد و هیچ متاستازی دیده نشده است (۲). طبیعت تهاجمی BCC می‌تواند توسط خاصیت پروتئولیتیکی تومور، توصیف شود. افزایش بیان آنزیم‌هایی مانند متالوپروتئینازها و کلاژنازها که بافت پوستی قبلی را از بین می‌برند و باعث گسترش آسان سلول‌های تومور می‌گردند، در سلول‌های BCC و سلول‌های بافت محافظ دیده شده است (۲و۳).

اختلال در مسیر سیگنالی Hedgehog-Patched، با پیشرفت BCC کاملاً مرتبط است و ژن p53 معمولاً در BCC موتاسیون یافته است (۱). ژنی که بیشتر در BCC تغییر می‌کند، ژن PTCH است که روی کروموزوم 9q قرار دارد. در تومورهایی که ژن PTCH آنها سالم است، سایر موتاسیون‌ها مثل موتاسیون‌های فعال‌کننده smoothened در ۲۰٪ موارد مشاهده شده است (۴). موتاسیون در لوکوس CDKN2A که p16 و p14ARF را کد می‌کند، نیز در نمونه‌هایی از BCC مشاهده شده است (۵). برخلاف ژن‌های سرکوب‌کننده تومور مانند p53 و PTCH، به نظر می‌رسد انکوژن‌ها نقش کمرنگ‌تری در پیشرفت BCC داشته باشند. ژن‌های ras، از بیشترین انکوژن‌های مورد مطالعه هستند و درصد موتاسیون‌های ras در BCC بین صفر الی ۳۰ درصد بر اساس نوع مطالعه است. تغییر در سایر انکوژن‌ها و ژن‌های سرکوب‌کننده تومور فقط در موارد نادری ثبت گردیده است. تقسیم بالقوه نامحدود برای ایجاد فنوتیپ سرطانی و پایداری تلومر به واسطه فعالیت زیاد تلومراز، نیز لازم و ضروری است. مسأله مورد توجه این است که سطح بیان تلومراز در مقایسه با سایر سرطان‌ها در BCC بیشتر است (۵و۶). پروتئین Bcl-2 نیز یک مهارکننده شناخته‌شده آپوپتوز است و به صورت دایمی در BCC بیان می‌شود. سلول‌های سرطانی BCC، لیگاند Fas را با میزان بالایی تولید و ترشح می‌کنند. این پروتئین که از خانواده فاکتور نکروزدهنده تومور می‌باشد، موجب آپوپتوز در سلول‌هایی می‌شود که رسپتور Fas را دارا می‌باشند. بر اساس فرضیه‌ای، سلول‌های BCC با تولید لیگاند Fas، از حمله سلول‌های اجرایی ایمنی بیان‌کننده Fas در امان می‌مانند و تومور بدین گونه رشد می‌کند. مهار تولید لیگاند Fas، سلول‌های BCC را مستعد حمله سلول‌های اجرایی ایمنی می‌کند (۷).

مطالعات بسیاری نشان داده‌اند که الکتروفورز دوبعدی می‌تواند تفاوت‌های بین پروتئوم سلول نرمال و سرطانی را مشخص کند که وسعت این تغییرات به نظر ارزشمند می‌آیند (۸). در این تحقیق برای اولین بار، با کمک تکنیک‌های پروتئومیکی، به مطالعه و آنالیز فاکتورهای پروتئینی BCC پرداخته شد و میزان تفاوت بیان ژنی آن با سلول‌های نرمال پوست مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه توصیفی، نمونه‌گیری از فرد بیمار حین جراحی انجام شد و بخش سالم نمونه، پس از تأیید آزمایشگاه پاتولوژی، به عنوان کنترل استفاده گردید. به منظور حذف پارامترهای مداخله‌گر، بافت سالم و سرطانی در هر نمونه‌گیری از یک بیمار گرفته شد. به منظور تکرارپذیری، از سه نفر بیمار نمونه برداری شد. ابتلا به این بیماری توسط متخصص پاتولوژی و متخصص بیماری‌های پوست تایید شد.

به منظور استخراج پروتئین، بافت‌های یخ‌زده سالم و تومور بیماران، تحت شرایط نیتروژن مایع، کاملاً پودر شدند. پودر حاصله را با بافر لیزکننده شامل Tris-Hcl، کلرید منیزیم، EDTA و فنیل متیل سولفونیل فلوراید (PMSF) ، ۵ میلی‌مولار بتا مرکاپتواتانول، ۰/۵٪ چپس (CHAPS) و ۱۰٪ گلیسرول برای ۳۰ دقیقه در یخ نگه داشته شد. در ادامه، محلول فوق در دور ۱۶۰۰۰G در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه، سانتریفوژ شده و به منظور سنجش پروتئین به روش برادفورد مورد استفاده قرار گرفت (۹و۱۰).

به منظور الکتروفورز دوبعدی، نمونه را سه بار با بافر PBS شستشو داده و در ۳۰۰ میکرولیتر از بافر لیزکننده (۷ مولار اوره، ۲ مولار تیواوره ، ۴٪ چپس (CHAPS)، ۰/۲-۰/۳٪ DTT، و ۱ الی ۲٪ آمفولین با محدوده pH ۳ الی ۱۰) قرار داده و برای مدت یک ساعت در دمای اتاق آن را تکان داده، سپس محلول لیزشده با دور ۱۰۰۰۰G در دمای اتاق برای مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد. محلول تا زمان استفاده، در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. استریپ خشک برای یک شب در بافر جهت آبگیری، قرار داده شد. نمونه نیز در حین آبگیری به کار گرفته شد. سپس، ابتدا الکتروفورز دوبعدی بر اساس سیستم (Bio-Rad) IEF-IPG انجام شد. سپس ژل‌ها در بافر متعادل‌کننده برای بعد دوم الکتروفورز دوبعدی قرار داده شدند. استریپ روی سطح ژل دوم گذاشته شد و با آگاروز ۰/۵٪ در بافر الکتروفورز حاوی SDS (۲۵ میلی‌مولار تریس، ۱۹۲ میلی‌مولار گلایسین و ۰/۱ ٪ SDS) ثابت می‌شد و سپس به صورت عمودی شروع به کار می‌کرد (۱۱).

[Downloaded from pajoohande.sbmu.ac.ir on 2024-04-24]

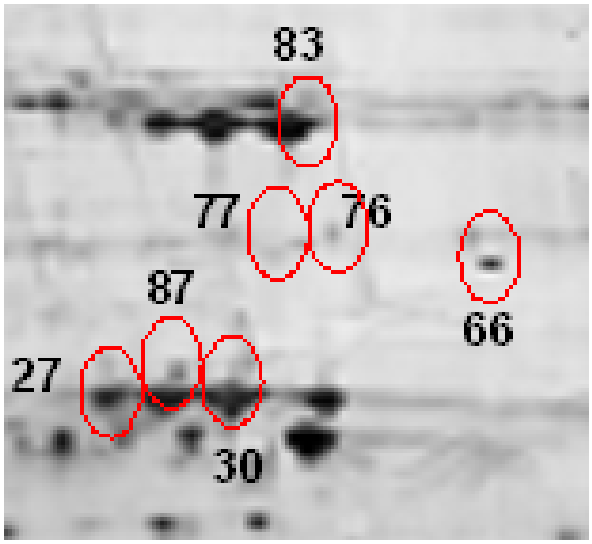
برای رنگ‌آمیزی پروتئین‌ها به روش رنگ‌آمیزی کوماسی بلو، ژل به دنبال انجام الکتروفورز، در محلول متانول ۴۰٪، اسید استیک ۱۰٪ و رنگ کوماسی ۰/۰۲۵٪ که با استفاده از فیلتر کاغذی واتمن فیلتر شده است، برای مدت ۶ ساعت قرار داده شد. ژل، تا زمانی که کل زمینه ژل بی‌رنگ شود، به صورت پی‌درپی، در محلول بی‌رنگ‌کننده نگهداری شد.

الکتروفورز دوبعدی قادر است صدها پلی‌پپتید را از یک محلول پروتئینی بر اساس بار الکتریکی و وزن مولکولی آنها جدا کند. پس از طی مراحل رنگ‌آمیزی، پروتئین‌ها بصورت لکه‌هایی با صفات و ویژگی‌های ظاهری متفاوت مانند شکل، اندازه و شدت رنگ نمایان می‌گردند. آنالیز این تصویر به طور معمول مراحل زیر را در برمی‌گیرد: اسکن تصویر ژل و استخراج داده‌ها، پردازش تصویر، شناسایی لکه‌های پروتئینی و کمی‌سازی (اندازه‌گیری شدت رنگ لکه)، تطابق ژل‌ها، آنالیز داده‌ها، تفسیر داده‌ها و در نهایت به وجود آوردن پایگاه‌های داده الکتروفورز دوبعدی.

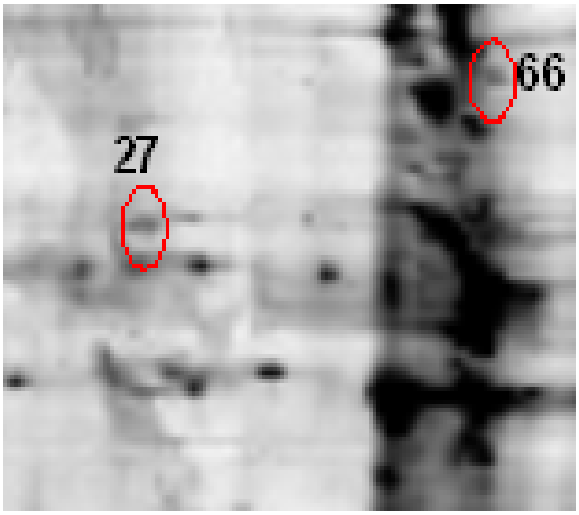
همه نتایج به دست آمده در این مطالعه بر اساس مقایسه ژل‌های به دست آمده از دو بافت سالم و سرطانی سه بیمار استوار می‌باشد که با تعیین میانگین و محاسبه انحراف معیار، میزان تغییرات محاسبه شد.

یافته‌ها

در شکل ۱، ژل الکتروفورز دوبعدی بافت نرمال و در شکل ۲، ژل الکتروفورز دوبعدی بافت توموری پوست انسان پس از شناسایی لکه‌ها نشان داده شده است. نقاطی که توسط اعداد بر روی ژل‌ها نشان داده شده‌اند، بیانگر پروتئین‌هایی هستند که از طریق آنالیز ژل‌ها و تطابق آنها با بانک‌های اطلاعاتی به دست آمده است. نقطه شماره ۲۷ پروتئین (Apolipoprotein poss, Apo poss) می‌باشد که میزان آن در بافت توموری نسبت به بافت نرمال کاهش نشان می‌دهد. نقطه شماره ۳۰ پروتئین (Fibrinogen Gamma Chain, FGG) را در بافت نرمال نشان می‌دهد که این پروتئین در بافت توموری بیان نشده است. نقطه شماره ۶۶ پروتئین سرالوپلاسمین (Ceruloplasmin) می‌باشد که میزان آن در بافت توموری نسبت به بافت نرمال کاهش نشان می‌دهد. نقطه شماره ۷۶ پروتئین سیس پرکسی‌ردوکتاز (Prx-cis) می‌باشد که در بافت توموری بیان نگردیده است. نقطه شماره ۷۷ نیز، پروتئین پروترومبین (Prothrombin) است که در بافت توموری بیان نشده است. نقطه شماره ۸۳ پروتئین کانال آنیونی وابسته به ولتاژ (Voltage-Dependent Anion Channel, VDAC) می‌باشد که در بافت توموری بیان نشده است. نقطه شماره ۸۷ پروتئین لوسین ریچ آلفا ۲ گلیکوپروتئین (Leucine Rich Glycoprotein, LRG) می‌باشد که در بافت توموری بیان نشده است.



شکل ۱- نمایش نقاط پروتئینی به دست آمده از ژل بافت نرمال پوست انسان (۲۷- آپوپوس، ۳۰- FGG، ۶۶- سروپلاسمین، ۷۶- سیس پروکسی‌ردوکتاز، ۷۷- پروترومبین، ۸۳- کانال آنیونی وابسته به ولتاژ، ۸۷ - لوسین ریچ آلفا ۲ گلیکوپروتئین)



شکل ۲- نمایش نقاط پروتئینی به دست آمده از ژل بافت سرطانی پوست انسان (۲۷- آپوپوس، ۶۶- سروپلاسمین)

بحث

پیشرفت تشخیص بر مبنای پروتئومیک، انقلابی در زمینه پزشکی مولکولی است که نه تنها می‌تواند برای تشخیص بیماری‌ها استفاده شود، بلکه از نظر بالینی نیز مورد استفاده می‌باشد (۸و۱۲). محققین بسیاری با استفاده از فناوری پروتئومیکس در مطالعه بر روی اغلب سرطان‌ها و مقایسه و شناسایی پلی‌پپتیدها در بافت سالم و سرطانی، به مارکرهای بیوشیمیایی مناسب جهت تشخیص درجه، نوع و میزان آسیب وارده، دست یافته‌اند. با توجه به اینکه تاکنون مطالعات

[Downloaded from pajoohande.sbmu.ac.ir on 2024-04-24]

پروتئومیکی در زمینه کارسینومای سلول‌های بازال انسانی صورت نگرفته است، اکنون با در اختیار داشتن روش‌های مؤثری نظیر الکتروفورز دوبعدی، می‌توان در جهت شناسایی مارکرها در این نوع سرطان، اقدام نمود تا بهترین و مؤثرترین روش‌های درمانی مناسب را قبل از وخیم شدن بیماری اتخاذ کرد، همانطوری که در درمان سرطان ریه با شناسایی مارکرها و تشخیص به طریق الکتروفورز دوبعدی، اقدام به درمان می‌نمایند (۱۳و۱۴).

BCC یک تومور غیرتهاجمی پوستی است که یکی از علت‌های آن اشعه ماورای بنفش است و تغییر در ژن PTCH، p53، p14 و p16 (۱و۲) و همچنین افزایش بیان تلومراز، TGFβ، BCL2 و لیگاند Fas از نشانه‌های آسیب‌شناسی مهم این بیماری است (۳-۱).

با توجه به مطالعاتی که در سال‌های گذشته بر روی این نوع سرطان پوست انجام گرفته است، در این تحقیق نیز با مقایسه پروتئوم بافت پوست سالم و سرطانی چندین بیمار به نتایج قابل‌توجهی دست یافته‌ایم.

شکل ۱، پروتئین‌های تفکیک‌شده به روش الکتروفورز دوبعدی را نشان می‌دهد و نمونه مورد آزمایش مربوط به بافت نرمال پوست است، .شکل ۲، نمونه مورد آزمایش مربوط به بافت توموری پوست را نشان می‌دهد. ژل‌های نشان داده شده در شکل‌های مورد اشاره، قابلیت مقایسه و آنالیز بیوانفورماتیکی را دارند، به همین دلیل نقاط واقع بر روی دو ژل توسط نرم‌افزار فلیکر با یکدیگر مقایسه شده‌اند. با کمک این نرم‌افزار ۸۷ نقطه در بافت نرمال و بافت توموری پوست مورد ردیابی قرار گرفتند، که از این تعداد ۷۶ نقطه تفاوت بیان معنی‌داری را نشان می‌دهند. بنابراین وجود ۷۶ نقطه متفاوت، حاصل از مقایسه بافت‌های توموری و نرمال پوست نشان دهنده دگرگونی عظیمی است که متعاقب توموری شدن بافت، در بدن رخ می‌دهد. به عبارت دیگر، وجود اختلاف در بیان پروتئین‌ها، هنگام ابتلای به تومور نشان می‌دهد که تنظیم تعداد کثیری از ژن‌ها دستخوش تغییر شده است. اختلاف در بیان ژن در دو ژل می‌تواند در جهت دست‌یابی به مارکرهای پروتئینی برای شناسایی و درمان بیماران مبتلا به این نوع تومور مفید باشد. آنالیز نقاط با توجه به بانک‌های اطلاعاتی موجود، نیز سبب شناسایی تعدادی از لکه‌ها به نام‌های آپوپوس، FGG، سروپلاسمین، سیس پروکسی‌ردوکتاز، پروترومبین، کانال آنیونی وابسته به ولتاژ، لوسین ریچ آلفا ۲ گلیکوپروتئین به وسیله نرم‌افزار فلیکر شده است. پروتئین‌های FGG، LRG، پروترومبین، سیس پرکسی‌ردوکتاز و VDAC در بافت توموری بیان نشده است. مطالعات گذشته همراهی بین پروتئین‌های آپوپوس، FGG، سیس پروکسی‌ردوکتاز، پروترومبین،کانال آنیونی وابسته به ولتاژ، لوسین ریچ آلفا ۲ گلیکوپروتئین و سرطان BCC را نشان ندادند، اما ارتباط پروتئین سرالوپلاسمین و BCC در یک مطالعه نشان می‌دهد که میزان سرالوپلاسمین در بیماری کاهش یافته است و علت آن، شاید قرار گرفتن در معرض اشعه ماورای بنفش باشد (۱۵). سرالوپلاسمین به عنوان یک آنتی‌اکسیدان پلاسمایی در فرآیندهای اکسیداسیون در بدن انسان دخالت دارد (۱۶). نتایج این تحقیق، یافته‌های مطالعه ما را تایید می‌کند. از آنجا که امروزه بیشتر تشخیص‌ها، بر مبنای ردیابی پروتئین می‌باشند و تغییر در بیان ژن‌ها، در سطح پروتئین می‌تواند راهنمای مؤثری جهت شناسایی بیومارکرهای بیماری باشد، در این مطالعه پروتئین‌های تغییر یافته در هر دو گروه بیمار و کنترل می‌توانند به عنوان بیومارکر این بیماری محسوب شوند.

نتیجه‌گیری

تغییر همزمان سطح وسیعی از پروتئین‌ها در این بیماری می‌تواند مسیرهای بیوشیمیایی و مکانیزم‌های دخیل در ایجاد بیماری را نشان دهد که جهت اهداف دارویی در فرآیند درمان می‌تواند مؤثر واقع شود. از طرفی، با به کارگیری روش‌های پروتئومیک، می‌توان با ساخت کیت‌های بیولوژیک، در تشخیص و شناسایی بیماری کمک بسیاری کرد.

REFERENCES

1. Gawkrodger DJ. Dermatology: An Illustrated Colour Text, 2nd ed. USA, Edinburgh: Churchill Livingstone, 1997.

2. Crowson AN, Basal cell carcinoma: biology, morphology and clinical implications. Mod pathol 2006;19 suppl 2:S127-47.

3. Silverman MK, Kopf AW, Bart RS, Grin CM, Levenstein MS .Recurrence rates of treated basal cell carcinomas .Part 3: Surgical excision. J Dermatol Surg Oncol 1992;18(6):471–6.

4. Kinzler KW, Bigner SH, Bigner DD, Trent JM, Law ML, O'Brien SJ, et al. Identification of an amplified, highly expressed gene in a human glioma. Science 1987;236(4797): 70-3.

[Downloaded from pajoohande.sbmu.ac.ir on 2024-04-24]

5. Backvall H, Asplund A, Gustafsson A, Sivertsson A, Lundeberg J, Ponten F, Genetic tumor archeology: microdissection and genetic hwtrogeneity in squamous anb basal cell carcinoma, Mutation Research 2005;571: 65-79.

6. Ruiz i Altaba A. Gli proteins encode context-dependent positive and negative functions: implications for development and disease. Development 1999;126 (14):3205-16.

7. Ji J, Wernli M, Mielgo A, Buechner SA, Erb P. Fas-ligand gene silencing in basal cell carcinoma tissue with small interfering RNA. Gene Ther 2005; 12(8):678-84.

8. Wulfkuhle JD, Liotta LA, Petricoin EF. Proteomic applications for the early detection of cancer. Nat Rev Cancer 2003;3(4):267-75.

9. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of protein utilizating the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 1976;72:248-54.

10. Hirano H, Kawasaki H, Sassa H. Two-dimensional gel electrophoresis using immobilized pH gradient tube gels. Electrophoresis 2000;21(2):440-5.

11. Zhou G, Li H, DeCamp D, Chen S, Shu H, Gong Y. 2D differential in-gel electrophoresis for the identification of esophageal scans cell cancer-specific protein markers, Mol Cell Proteomics. 2002;1(2):117-24.

12. Kolch W, Mischak H, Pitt AR. The molecular make-up of a tumour: proteomics in cancer research. Clin Sci (Lond) 2005;108(5):369-83.

13. Patterson SD , Aebersold RH. Proteomics: the first decade and beyond. Nat Genet 2003;33 Suppl:311-23.

14. Reif DM, White BC, Moore JH. Integrated analysis of genetic, genomic and proteomic data. Expert Rev. Proteomics 2004;1(1):67-75.

15. Vural P, Canbaz M, Selçuki D. Plasma antioxidant defense in actinic keratosis and basal cell carcinoma. J Eur Acad Dermatol Venereol. 1999;13(2):96-101.

16. Healy J, Tipton K. Ceruloplasmin and what it might do. J Neural Transm. 2007;114(6):777-81.

[Downloaded from pajoohande.sbmu.ac.ir on 2024-04-24]