NIVELE SERICE ALE INTERLEUKINEI-10 LA PACIENȚII CU SCLEROZĂ MULTIPLĂ TRATAȚI CU IFN-B 1A

RODICA BĂLAŞA[1], ADINA HUŢANU[2], SMARANDA MAIER[3]

[1,3]Clinica de Neurologie I, Centrul Regional de Scleroză Multiplă, Spitalul Clinic Judeţean de Urgenţă, Universitatea de Medicină şi Farmacie din Tîrgu-Mureş, [2]Departamentul de Biochimie şi Imunologie, Spitalul Clinic Judeţean de Urgenţă, Universitatea de Medicină şi Farmacie din Tîrgu-Mureş

Cuvinte cheie: *scleroza multiplă, interleukina-10, interferon- β*

Rezumat: *Scleroza multiplă (SM) este o boală cronică, autoimună, demielinizantă care afectează adulții tineri. Beta interferonul (IFN - β) este principalul tratament imunomodulator în SM, utilizat de peste două decenii, dar cu mecanismul de acțiune insuficient înțeles. Evaluarea producției de citokine ale pacienților cu SM tratați cu IFN - β este importantă, atât pentru clarificarea mecanismelor patologice ale SM, cât și modul de acțiune al IFN - β. Obiective: Determinarea titrului seric de IL - 10 la pacienții cu SM tratați cu IFN - β1a im și găsirea vreunei corelații între nivelul seric al IL - 10 și datele demografice, handicapul neurologic, durata SM și durata tratamentului cu IFN - β1a. Material și metodă. Am inclus un număr de 17 pacienți cu SM tratați timp de cel puțin 12 luni cu IFN - β1a . Pentru detectarea cantitativă a IL – 10 a fost utilizată metoda ELISA, iar valorile au fost comparate cu cele ale 17 martori sănătoși. Rezultate. Am găsit un titru seric al IL - 10 mai mare la pacienții cu afectare neurologică mai redusă, durată de SM de maximum 5 ani și la pacienți care au avut cel puțin 3 ani de tratament cu IFN - β 1a. Nici una dintre aceste diferențe nu are o semnificație statistică. Concluzii. Sunt necesare mai multe cercetări pentru a stabili rolul secreției de IL - 10 la pacienții cu SM tratați cu IFN – β1a.*

Keywords: *multiple sclerosis, interleukine-10, interferon- β treatment*

Abstract: *Multiple sclerosis (MS) is an autoimmune chronic, manly demyelinating disease that affects young adults. Interferon β (IFN-β) is the main immunomodulatory treatment in MS, used for more than two decades but the exact mechanism of action is not totally understood. Evaluation of cytokine production in IFN-β MS treated patients is important in clarifying both the pathological mechanisms of MS and the IFN-β mode of action. Objective. To determine the serum IL-10 titre in MS patients treated with IFN-β 1a im and to establish whether there is a correlation between IL-10 and demographic data, neurological handicap, MS duration and treatment duration. Material and methods. A number of 17 MS patients treated for at least 12 months with IFN-β 1a was included. For the quantitative detection of human IL-10, the ELISA was used and the values were compared with those of 17 healthy controls. Results. We found higher IL-10 titre in patients having a reduced EDSS, MS duration of maximum 5 years and in patients who had at least 3 years of IFN-β 1a treatment. None of these differences has a significant difference. Conclusions. More research is needed to establish the role of IL-10 secretion in MS patients treated with IFN-β.*

INTRODUCERE

Interleukina 10 (IL-10) este o citokină antiinflamatorie cunoscută ca şi factor inhibitor al sintezei de citokine. IL-10 este un homodimer având, pe baza structurii proteice alfa helicoidale, caracteristici similare cu cinci alte molecule umane: IL-19, IL-20, IL-22, IL-24, IL-26. La oameni, IL-10 se află sub control genetic al genei localizate pe cromozomul 1 şi este codificată de cinci exoni. IL-10 este secretată de monocite, limfocite T2 helper (Th2), limfocite T reglatoare (Treg), mastocite şi eozinofile. Expresia IL-10 este minimă în ţesuturile nestimulate şi se pare că necesită stimularea prin exo şi endotoxine. Secreţia IL-10 este reglată de mulţi factori responsabili de transcripţie, precum factorul de necroză tumorală, endotoxine, catecolamine, vitamina D3, glucocorticoizi. Funcţia ei este esenţială în reglarea răspunsului imun, având mai ales un mecanism reglator protector al celulelor T împotriva proceselor autoimune: scade producţia de citokine proinflamatorii (IL-17 şi IL-6), chemokine, molecule de adeziune, neutrofile, limfocite T şi scade expresia complexului major de histocompatibilitate (CMH) de clasa II, având un rol imunosupresiv.(1,2,3) Funcţia IL-10 este mediată prin complexul specific de receptori de suprafaţă, complex care aparţine familiei de receptori de citokine tip 2. Receptorii sunt exprimaţi pe celulele imune precum: limfocite *natural killers*, B, T, monocite etc. Interacţiunea IL-10 în celulele imune duce la activarea transcripţională a sute de gene, multe dintre ele fiind stimulate de acestea în vederea unui efect imunosupresiv.(4)

Scleroza multiplă (SM) este o boală autoimună a sistemului nervos central caracterizată într-o primă fază de inflamaţie (care poate fi influenţată de tratamentele imunomodulatoare) ce duce la demielinizare, apoi urmată de procese degenerative cu caracter cronic care nu sunt influenţate de tratament. SM este caracterizată printr-un polimorfism genetic, fiind descrise mai mult de 130 de gene ca având un impact asupra susceptibilităţii de a dezvolta boala. O parte din gene sunt situate în zona CMH. Până acum cercetările nu au evidenţiat un locus major susceptibil, dar interacţiunile dintre numeroasele gene sunt supuse dezbaterilor. Multe studii nu au

[1]Autor corespondent: Rodica Bălaşa, Str. Gh. Marinescu, Nr. 50, Cod 540136, Tîrgu-Mureş, România, E-mail: iipascu@redatronic.ro, Tel: +40742 901746
Articol intrat în redacţie în 18.09.2014 şi acceptat spre publicare în 28.10.2014
ACTA MEDICA TRANSILVANICA Decembrie 2014;2(4):35-38

reuşit să asocieze alelele IL-10 cu progresia SM.

Paradigma modernă privind imunopatogenia SM se referă la rolul limfocitelor Th 17 care joacă un rol central în activarea cascadei proinflamatorii. În encefalomielita autoimună experimentală (EAE), în modelul experimental pe şoareci, IL-10 pare să fi avut un efect protectiv prin producerea celulelor T reglatoare CD4+25 care în final inhibă producerea ce citokine pro-inflamatorii de către Th1 (efect imunosupresiv).(2)

În tratamentele imunomodulatoare din SM, interferonul beta (IFN β) a jucat un rol central în ultimii 20 de ani. Chiar dacă IFN β este folosit în întraga lume, mecanismul de acţiune nu este pe deplin elucidat. Multe studii au demonstrat că IFN β îşi exercită acţiunea antiinflamatorie prin celule dendritice şi macrofage şi stimulează expresia IL-10. Studiile au arătat că tratamentul cu interferon mediază producerea IL-10 prin stimularea unei populaţii de limfocite T antigen specifice. În schimb, IL-10 inhibă răspunsul mediat inflamator /autoimun al limfocitelor Th 17.(4)

Am determinat titrul de IL-10 în serul pacienţilor trataţi cu IFN β-1a intramuscular pe o durată mai lungă de 1 an. Scopul nostru a fost găsirea corelaţiilor dintre titrul seric al IL-10 şi deficitul neurologic, vârsta pacientului, forma clinică de SM, durata bolii, numărul puseelor în anul anterior testării şi durata tratamentului cu IFN β 1a.

MATERIAL ŞI METODĂ DE LUCRU

Pacienţi

Acesta este un studiu prospectiv care a inclus 17 pacienţi consecutivi cu SM formă recurent remisivă (RR) şi secundar progresivă (SP), trataţi cu IFN β 1a intramuscular (cel puţin 18 luni) în Centrul Regional de Scleroză Multiplă Târgu Mureş. Pacienţii au fost recrutaţi într-o perioadă de 3 luni: 1 februarie 2014 - 1 mai 2014. Toţi pacienţii au fost caucazieni, diagnosticaţi cu SM pe baza criteriilor Mc Donald 2010.(5) Am inclus pacienţi adulţi cu SM care nu au prezentat pusee cel puţin 30 de zile înaintea includerii, fără tratament steroid, ce au semnat consimţământul informat. Evaluarea handicapului neurologic a fost făcută pe baza scalei de dizabilitate EDSS. Criteriile de excludere au fost: a). tratament cu metil prednisolon sau orice alt corticoid în ultimele 30 de zile; b). boli cronice (diabet zaharat, alte boli autoimune, neoplazii, HIV, boala Lyme, sifilis etc.) asociate cu SM; c). sarcina; d). tratament cu imunosupresoare. Am inclus un număr de 17 subiecţi sănătoşi în grupul de control cu vârsta şi sexul similare lotului de pacienţi.

Toţi pacienţii au semnat un consimţământ informat care a fost aprobat de Comisia locală de etică. Studiul a respectat Declaraţia de la Helsinki. Toţi pacienţii cu SM au avut un card de urmărire ce conţine a) date demografice (vârstă, sex); b) istoric medical; c) durata SM; d) EDSS; e) numărul recurenţelor în anul anterior testării serologice; f) durata tratamentului cu IFN-β 1a.

Măsurarea IL-10

Probele sanguine au fost recoltate de la 34 de subiecţi, iar serul obţinut după centrifugare la 2000 x timp de 15 minute a fost stocat prin congelare la -70º. Pentru depistarea cantitativă a IL-10 umane a fost utilizat kitul International DRG IL-10 ELISA (cod DRG EIA-4699). În conformitate cu instrucţiunile de utilizare ale kitului, intervalele de referinţă au fost date strict pentru ghidare. DRG a dat orientativ rezultatul la 32 de probe de la subiecţi sănătoşi cu valori între 0-3,3 pg/dl, cu o valoare de eroare de 0,2 pg/dl. Aşa cum fiecare laborator trebuie să îşi stabilească valorile de referinţă şi noi am notat valorile serice ale IL-10 la fiecare pacient şi le-am comparat cu valorile subiecţilor sănătoşi.

Metode statistice

Pentru prelucrarea datelor am folosit baza de date Excel ce a permis aplicarea unei serii de teste. Folosind software de statistică, datele au fost testate pentru evidenţierea distribuţiei Gaussiene şi apoi am aplicat teste parametrice şi non-parametrice. Datele parametrice sunt prezentate ca şi media şi deviaţia standard (DS), iar datele non-parametrice sunt mediana şi range-ul. Am aplicat testul t-Student, Mann Whitney, Wilcoxon. Analiza corelaţiilor a fost făcută utilizând coeficientul de corelaţie Spearman. Valoarea p s-a bazat pe teste statistice two-tailed, stabilindu-se ca nivel de semnificaţie 0,05.

REZULTATE

Principalele date clinice şi demografice ale celor 17 pacienţi (12 femei şi 5 bărbaţi) sunt prezentate în tabelul 1. Am inclus şi caracteristicile subiecţilor sănătoşi care sunt compatibile ca sex şi vârstă cu pacienţii.

Vârsta medie a pacienţilor testaţi a fost de 40.7 ani şi durata medie a bolii de 10.1 ani. Această perioadă lungă a determinat la 5 pacienţi evoluţia spre forma SP de SM, în timp ce restul au rămas la forma RR. Cazurile noastre au avut puţine pusee (0,5) în anul precedent testării, dar cu o deviaţie standard importantă deoarece unul dintre pacienţi are o formă agresivă de SM cu 3 recurenţe în ultimul an (o tânără în vârstă de 26 ani la care SM a fost diagnosticată la vârsta de 14 ani; în urma cu 6 ani s-a iniţiat tratament imunomodulator cu glatiramer acetat; tratamentul a fost oprit după 4 ani deoarece pacienta a dezvoltat lipodistrofii severe şi în ultimii 2 ani a urmat tratament cu IFN-β sub care boala nu este controlată, în faza de remisie pacienta având EDSS de 3.0; ultimul puseu s-a datorat unei plăci de demielinizare de la nivelul emisferei cerebelare stângi cu ataxie severă; a răspuns favorabil la tratamentul cu corticosteroizi; intenţionăm să escaladăm terapia imunomodulatoare cu natalizumab i.v. lunar).

Majoritatea pacienţilor noştri au fost complet ambulatori cu o medie a EDSS-ului de 2.7.

Nivelul seric al IL-10 a fost mai redus la pacienţii cu SM comparativ cu subiecţii sănătoşi (2.9 vs 3.19).

Tabelul nr. 1. Date demografice şi clinice privind pacienţii cu SM şi ale subiecţilor sănătoşi; titrul seric al IL-10 în ambele grupe testate

	Toţi pacienţii	**Subiecţii sănătoşi**
	n=17	**n=17**
Vârsta de debut a SM (ani) ± SD	31,29 ± 11,59	32,29 ± 7,48
Vârsta la testare (ani)±SD	40,70 ± 14,97	
Durata tratamentului (ani) ± SD	4,29 ± 3,40	
Durata SM (ani) ± SD	10,11 ± 6,08	
Bărbaţi/Femei	5/12	5/12
EDSS± SD	2,73 ± 1,84	
Număr de pusee în ultimul an± SD	0,52 ± 0,87	
IL-10 (pg/dL) ± SD	2,90 ± 2,58	3,19 ± 2,77
SMSP/SMRR	5/12	

Am studiat dacă există vreo legătură statistică între valorile serice ale IL-10 şi diferite caracteristici ale pacienţilor cu SM. Pentru a ne atinge scopul am împărţit pacienţii în diferite grupe în funcţie de: a) EDSS (maxim 3 când pacientul are ambulaţia completă fără vreo restricţie de mers şi mai mare de 3 pentru pacienţii cu un handicap moderat); b) durata SM (maxim 5 ani de evoluţie şi mai mult de 5 ani de evoluţie a SM); c) durata tratamentului cu IFN-β 1a (durata scurtă de maximum 3 ani şi peste 3 ani); d) forma de SM (RR vs SP). Datele statistice pe care le-am obţinut sunt prezentate în tabelul numărul 2.

Tabelul nr. 2. Nivelul seric al IL-10 în diferite grupe de pacienţi

	EDSS		Durata SM (ani)		Durata tratamentului (ani)		Forma de SM	
	≤3	> 3	≤5	>5	≤3	>3	SMRR	SMSP
IL-10 (pg/dl)	3,11± 2,70	2,68±2,60	3,45±3,62	2,67±2,18	2,70±2,75	3,14±2,54	2,78±2,42	3,21±3,22

La pacienţii cu un handicap neurologic uşor (EDSS≤3), nivelul seric al IL-10 a fost mai mare, dar fără semnificaţie statistică, comparativ cu pacienţii cu SM mai sever afectaţi, cu EDSS mai mare. De asemenea, durata bolii a influenţat secreţia de IL-10, nivelul seric fiind mai mare în stadiile precoce de evoluţie ale SM, dar fără semnificaţie statistică. O durată mai lungă de tratament cu IFN-β 1a s-a asociat cu un nivel mai crescut de IL-10, dar fără diferenţă statistic semnificativă între cele două grupuri.

DISCUŢII

Evaluarea producerii de citokine la pacienţii trataţi cu IFN-β1 este importantă în vederea elucidării mecanismelor patologice a SM şi a mecanismelor de acţiune ale IFN-β. IL-10 este markerul celulelor Th-2, care au efect antiinflamator în multiple boli autoimune, inclusiv SM.

În majoritatea modelelor de EAE, IL-10 are rol în prevenirea bolii demielinizante, în timp ce rolul IL-10 în EAE în perioada de stare este încă neclar.(2)

Date recente arată că IL-10 are rol mai mult în toleranţa imună, mai puţin în imunitate per se. O cantitate importantă a IL-10 este secretată de Treg. Inducţia acestei citokine determină activarea STAT5, care angajează factorul de transcripţie Foxp3 (foarte important în transferul toleranţei imune, mai ales a toleranţei *self*).(6,7,8) Deşi IL-10 este considerată cea mai importantă citokină anti-inflamatoare având rol în inhibiţia producţiei de citokine pro-inflamatorii, unele studii au găsit date contradictorii. Unii autori au găsit nivel scăzut de IL-10 la pacienţii cu SM (9), în timp ce alţi cercetători (10) au găsit un număr crescut de celule mononucleare periferice, care exprimă mRNA pentru IL-10.

În tratamentul sclerozei multiple, IFN-β are un rol clinic important: scade rata de recurenţe şi severitatea lor, progresia dizabilităţii şi dezvoltarea leziunilor noi demielinizante pe IRM în ponderaţie T2. Mecanismul de acţiune nu este pe deplin cunoscut. Numeroase studii au încercat să demonstreze efectul imunoreglator al IFN-β prin dozarea din ser a diferiţilor biomarkeri de inflamaţie. Tratamentul cu IFN-β a crescut nivelul seric de IL-10, mai ales pe căile IL-17/IL-10.(11,12) Carrieri şi colab. au studiat efectul IFN asupra secreţiei de IL-10 şi IL-12 la pacienţii cu SMRR şi au găsit că pacienţii care răspund favorabil la tratamentul cu IFN-β (lipsa de activitate a bolii sub tratament timp de un an) producţia de IL-10 a fost semnificativ crescută.(13) Krakauer şi colab.(14) au găsit o expresie crescută de mRNA de IL-10 după tratamentul SM cu IFN-β. IFN-β 1a şi 1 b influenţează diferit nivelul de citokine: primul creşte producţia de IL-10 şi IL-4 (efect antiinflamator), în timp ce IFN-β 1b scade nivelul de IFN-γ, care este un citokin pro-inflamator. IFN-β 1a produce o schimbare a profilului de citokine către un fenotip Th2.(16)

IL-10 este utilă pentru determinarea rolului limfocitelor B regulatorii în SM: celulele B la pacienţii cu SM prezintă o secreţie scăzută de IL-10, sugerând un defect în efectul regulator a celulelor B.(15) Grupul din Stockholm a găsit că pacienţii cu SM netratată prezintă un nivel scăzut a celulelor mononucleare secretante de IL-10 comparativ cu grupa control, dar la pacienţii trataţi cu IFN-β această diferenţă dispare.(17) Contrar acestor rezultate, Salmaggi şi colab.(18), urmărind nivelul de IL-10 la pacienţii cu SM activă sau clinic stabilă nu au găsit diferenţe, comparativ cu grupa control (subiecţi sănătoşi). Aceste date sunt concordante cu datele obţinute de noi. Totuşi am găsit un nivel scăzut (însă fără semnificaţie statistică) de IL-10 la pacienţii cu SM comparativ cu grupa control, demonstrând că o boală autoimună ca SM necesită o schimbare către un mediu proinflamator cu o scădere primară sau secundară a citokinelor antiinflamatorii, ca IL-10.

O altă discuţie este momentul în SM (recurenţe sau remisiuni) când IL-10 este secretat în cantităţi crescute. Se presupune că în timpul recurenţelor de SM, nivelele mai crescute de IL-10 se datorează stimulării mecanismelor reglatoare, care suprimă procesul autoimun.(13) Alţi autori, ca Trenova şi colab. (19) au găsit o secreţie crescută de mediatori cu efect opus (IFN-γ, IL 10) în timpul remisiilor, demonstrând un dezechilibru persistent în sistemul Th1-Th2.

Într-un studiu efectuat pe creiere umane postmortem a pacienţilor cu SM, Hulshof şi colab. (20) au găsit un pattern specific de localizare şi expresie ale proteinelor pentru IL-10 la pacienţii cu SM în diferite stadii de dezvoltare, demonstrând că IL-10 participă în constituirea leziunilor cronice în SM.

Discrepanţa dintre rezultatele noastre şi datele publicate sunt în: a) populaţia testată (durate diferite ale SM), b) durate diferite ale tratamentului cu IFN-β, c) vârsta pacienţilor, d) lipsa activităţii fizice la majoritatea pacienţilor, deoarece exerciţiile cresc nivelul de IL-10 (21), e) includerea formelor de RR şi SP, f) includerea pacienţilor doar în faza inactivă abolii.

În concluzie, este nevoie de cercetări suplimentare pentru a stabili dacă scăderea secreţiei de IL-10 la pacienţii cu SM trataţi cu IFN-β 1a este cauza şi/sau consecinţa mecanismelor autoimune complexe, care declanşează și întreţin cascada demielinizării în SM.

REFERINŢE

1. Almeras L, Meresse B, de Seze J, et al. Interleukin-10 promoter polymorphism in multiple sclerosis: association with disease progression. Eur Cytokine Network 2002;13:200-206.
2. Asadullah K, Sterry W, Volk HD. Interleukin-10 therapy-review of a new approach. Pharmacol Rev 2003;55:241-269.
3. Azarpira N, Haghighi AB, Pourjafar M, et al. nterleukin 10 gene polymorphism in Iranian Patients with multiple sclerosis. Acta Neurol Taiwan 2010;19:107-111.
4. Zhang L, Yuan S, Cheng G, et al. Type I IFN promotes IL-10 production from T cells to suppress Th17 cells and Th17-associated autoimmune inflammation. PLOS ONE, 2011;6:e28432.
5. Polman CH, Reingold S, Banwell B, et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 Revisions to the McDonald criteria. Ann Neurol 2011;69:292-302.
6. Ye J, Huang X, Hsueh EC, et al. Human regulatory T cells induce T-lymphocyte senescence. Blood 2012;120:2021-2024.
7. Tsuji-Takayama K, Suzuki M, Yamamoto M, et al. The production of IL-10 by human regulatory T cells is enhanced by IL-2 through a STAT5-responsive intronic enhancer in the IL-10 locus. J Immunol 2008;181:3897-3903
8. Piccio L, Cross AH. Immunology of multiple sclerosis. In: Giesser BS (Ed). Premier on multiple sclerosis. Oxford University Press 2011:47-59.
9. Huang WX, Huang P, Link H, et al. Cytokine analysis in multiple sclerosis by competitive RT-PCR: a decreased

expression of IL-10 and an increased expression of TNF-alfa in chronic progression. Mult Scler 1999;5:342-348.
10. Navikas V, Link J, Palasik W, et al. Increased mRNA expression of IL-10 in monomuclear cells in multiple sclerosis and optic neuritis. Scand J Immunol 1995;41:171-178.
11. Rudick RA, Ransohoff RM, Peppler R, et al. Interferon beta induces interleukin-10 expression: relevance to multiple sclerosis. Ann Neurol 1996;40:618-627.
12. Kvarnstrom M, ydrefors J, Ekerfelt C, et al Longitudinal interferon beta effects in multiple sclerosis: differential regulation of IL-10 and IL-17A, while no sustained effects on IFN-γ, IL-4 or IL-13. J Neurol Sci 2013;325:79-85.
13. Carrieri P, Ladogana P, Di Spigna GD, et al. Interleukin-10 and interleukin-12 modulation in patients with relapsing remitting MS on therapy with interferon-beta 1a: differences in responders and nonresponders. Immunopharmacol Immunotoxicol 2008;30:915-923.
14. Krakauer M, Sorensen P, Khademi M, et al. Increased IL-10 mRNA and IL-23 mRNA expression in multiple sclerosis: interferon-beta treatment increases IL-mRNA expression while reducing IL-23 mRNA expression. Mult Scler 2008;14:622-630.
15. Michel l, Degauque N, Garcia A, et al. Loss if IL-10 secretion by regulatory B lymphocytes in multiple sclerosis patients. J Trans Med 2011; 9 (Suppl 2): P25.
16. Sega S, Wraber B, Mesec A, et al. IFN-β 1a and IFN-β 1b have different patterns of influence on cytokines. Clin Neurol Neurosurg 2004;106:255-258.
17. Ozenci V, Kouwenhoven M, Huang Y, et al. Multiple sclerosis is associated with an imbalance between tumour necrosis factor-alpha and IL-10 screening blood cells that is corrected by interferon-beta treatment. Clin Exp Immunol 2000;120:147-153.
18. Salmaggi A, Dufour A, Eoli M, et al. Low serum interleukin-10 levels in multiple sclerosis: further evidence for decreased systemic immunosuppression? J Neurol 1996; 243:13-17.
19. Trenova AG, Manova M, Kostadinova I, et al. Clinical and laboratory study of proinflammatory and anti-inflammatory cytokines in women with multiple sclerosis. Folia Medica 2011;33:29-33.
20. Hulshof S, Montaigne L, De Groot C, et al. Cellular localization and expression patterns of interleukin-10, interleukin-4, and their receptors in multiple sclerosis lesions. Glia 2002;38:24-35.
21. Mogadasi M, Moeini A, Edalatmanesh M. Effect of resistance training on cytokines in female patients with multiple sclerosis. Ann Biol Res 2013;4:169-173.