

Kronik Myeloid Lösemi K-562 Hücre Hattında Siklofosfamidin Apoptoza Etkileri

The Effects of Cyclophosphamide on Apoptosis in Chronic Myeloid Leukemia K-562 Cell Lines

Ebru DERİCİ¹, Nurcan Aras ATEŞ¹, Kansu BÜYÜKAŞAR², R. Nalân TİFTİK²

¹Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Mersin

²Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, Farmakoloji Anabilim Dalı, Mersin

Özet

Amaç: Bu çalışmada, insan kronik myeloid lösemi K-562 hücre hattında, çeşitli kanser türlerinde yaygın olarak kullanılan siklofosfamidin, kaspaz-8 ile ilişkili olarak apoptoz üzerindeki etkilerinin araştırılması amaçlandı.

Yöntem: Deneysel gruplarda sitotoksiteyi göstermek için belirli dozlarda siklofosfamid uygulandı ve tripan mavisi canlılık testi ile analiz edildi. Deneysel gruplarında 24. ve 48. Saat sonra E.Z.N.A. total RNA kiti ile RNA ve first strand cDNA kiti ile cDNA elde edildi. Kaspaz-8 ve gliseraldehidfosfat dehidrogenaz gen ekspresyonları, Real-Time online Revers Transkriptaz Real-Time PCR yöntemi ile belirlendi. Her grubun geçiş noktası değeri, gliseraldehidfosfat dehidrogenaz ile karşılaştırıldı ve ekspresyonların rölatif oranı saptandı. Erken ve geç apoptotik hücre sayıları Annexin-V FITC kiti ile akım sitometrede gösterildi.

Bulgular: K-562 hücre hattında, 24. saatte siklofosfamidin 10^{-7} M ve 10^{-6} M gruplarında, kaspaz-8 geni için negatif kontrole göre kıyaslandığında ekspresyon düzeylerinde anlamlı bir artış saptandı. 48. saatte tüm gruplarda artış olmasına karşın, siklofosfamidin 10^{-6} M grubunda bu artış anlamlı bulunmuştur.

Sonuç: Bu çalışma, siklofosfamidin apoptozu indüklediğini göstermektedir.

Anahtar Sözcükler: K-562 hücre serisi, apoptoz, siklofosfamid, Real-Time PCR, flow sitometri

Mersin Univ Sağlık Bilim Derg, 2008;1(2):12-18

Geliş Tarihi : 14.12.2007

Kabul Tarihi : 10.04.2008

Yazışma Adresi:

Dr.Nurcan Aras ATEŞ

Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, 33169- Mersin

Tel : 0-324-3412815/1012

Faks : 0-324-3412400

E-posta : naras@mersin.edu.tr

Abstract

Aim: In this study, we aimed to investigate apoptotic effects of cyclophosphamide, which is widely used in the treatment of numerous cancer types, on K-562 cell line, human chronic myeloid leukemia cells, in association with caspase 8.

Method: In experiment groups to indicate cytotoxicity, specific dose of cyclophosphamide for a certain time period was applied and analyzed by Tyripan Blue Exclusion test. After 24 and 48 hours, in experiment groups we carried out RNA isolation with E.Z.N.A total RNA kit and cDNA with first strand cDNA kit. Caspase-8 and housekeeping (glyceraldehydephosphate dehydrogenates GAPDH) gene expression levels were determined by Real-Time online revers transkriptaz RT-PCR. Crossing point (CP) in each group compared GAPDH and determined expression relative rate (Efficiency). Primary and secondary apoptotic cell portions were determined by Annexin-V FITC kit with flow cytometry.

Results: In K-562 cell lines, at the 24th hour the significant increase in caspase-8 expression level in cyclophosphamide 10^{-7} M and 10^{-6} M groups when compared with the negative control. At the 48th hour, increase in all groups was seen, but only 10^{-6} M group was significantly increased.

Conclusion: This study indicates that cyclophosphamide is inducing apoptosis.

Key Words: K-562 cell line, apoptosis, cyclophosphamide, Real-Time PCR, flow cytometry

Giriş ve Amaç

Apoptoz, programlanmış hücre ölümüdür. Apoptozun gereksiz yere oluştuğu veya hızlandığı hastalıklara örnek olarak AIDS, nörodejeneratif hastalıklar, miyokard enfarktüsü ve ateroskleroz gibi hastalıklar verilebilirken; apoptozun yavaşladığı hastalıklara örnek olarak otoimmün hastalıklar ve kanserler verilebilir (1-4).

Kanser, tüm ırk ve yaş gruplarında insanları etkileyen bir hastalıktır ve "Türk Kanser Araştırma ve Savaş Kurumu"nun verilerine göre, ülkemizde gerçekleşen ölümlerde kalp-damar hastalıklarından sonra ikinci sırada yer almaktadır. Temel olarak kanser, hücrelerin çoğalma ve farklılaşmasının bozulması ile ortaya çıkmaktadır. Kanserli bir hücrede apoptoz mekanizması bozulmuştur ve hücre ölümsüz hale gelmiştir. Kanserlin erkeci tedavisi önemlidir. Kanser tanısı ne kadar erken konursa, tedavide başarıya ulaşma şansı o kadar yüksek olur (5,6).

Kronik myeloid lösemi (KML), primitif pluripotent kök hücrenin klonal bir hastalığıdır. Kemik iliğinde aşırı myeloid hiperplazi, çevre kanında olgun myeloid hücrelerden oluşan yüksek lökosit sayısı ve splenomegali ile karakterizedir. Akut lösemide var olan patolojik tablonun aksine, lösemi hücreleri farklılaşma yeteneklerini kaybetmemişlerdir. Yeni tanı konmuş kronik evrede bir KML vakasında çeşitli tedavi yaklaşımları vardır. Bunlar tek ajanla kemoterapi (hidroksiüre veya busulfan), kök hücre transplantasyonu (allogenik veya otolog) ya da interferon alfa ve son yıllarda tirozin kinaz inhibitörlerinin kullanımı olarak sıralanabilir (6-9).

Günümüzde kullanılan kemoterapötikler; DNA'yı etkileyenler (alkilleyici ajanlar), mikrotübülleri etkileyenler ve hormon benzeri reseptörleri etkileyenler olmak üzere üç genel kategoride gruplandırılırlar (7,8). Alkilleyici ilaçlardan en fazla kullanılan siklofosfamid akut ve kronik lenfositik lösemi, Hodgkin-dışı lenfomalar, pediatrik solid tümörler, meme, over, baş-boyun kanserleri gibi hem hematolojik hem de solid tümörlerin tedavisinde başarılı bulunmuştur (10,11). Siklofosfamidden en çok etkilenen hücreler lenfositler olup bunların sayı ve işlev açısından değişiklikleri, bağışıklık sisteminin baskılandığının bir göstergesidir. Bu ilaç çeşitli kanser tiplerinin tedavisinde kullanılmaktadır, bağışıklığı büyük oranda baskılamaktadır ve yakın laboratuvar izlemi gerektiren ciddi yan etkileri bulunmaktadır. En sık görülen yan etkileri, bulantı ve kusmadır. Siklofosfamid bağışıklığı bozan yüksek doz kortikosteroid gibi ilaçlarla birlikte kullanıldığı zaman, savunma sistemini baskılayıp enfeksiyon riskini artırır (11-13).

Bu çalışmada insan kronik myeloid lösemi K-562 hücre hattında, son yıllarda çeşitli kanser türlerinde yaygın olarak kullanılan siklofosfamidin, kaspaz-8 ile ilişkili olarak apoptoz üzerindeki etkilerinin *in vitro* araştırılması amaçlanmıştır.

Yöntem

Bu çalışmada, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalından sağlanan insan kronik myeloid lösemi (KML) hücre hattı olan K-562 hücreleri kullanıldı. Bu hücreler, kültürde çoğaltılarak laboratuvar şartlarına uyumu sağlandı. Sitotoksiteyi göstermek için belirli doz ve sürelerde siklofosfamid uygulandı. Canlılık deneyi tripan mavisi canlılık testi ile yapıldı. Gruplar siklofosfamid konsantrasyonlarına göre, C7: siklofosfamid 10^{-7} M; C6: siklofosfamid 10^{-6} M; NK: negatif kontrol (sadece medium içeren hücre kültürü); PK: pozitif kontrol şeklinde oluşturuldu.

Gen Ekspresyonu Analizi

C7, C6 ve kontrol gruplarında 24. ve 48. saatlerde E.Z.N.A. total RNA kiti (Omega) ile RNA izolasyonu yapıldı. Elde edilen RNA örneklerinden 5 µg/ml alınarak, First Strand cDNA kiti (New England Biolabs) ile cDNA elde edildi ve bu örneklerden kaspaz-8 ve gliseraldehidfosfat dehidrogenaz (GAPDH) housekeeping gen ekspresyonları, Real-Time online Revers Transkriptaz PCR ile Light Cycler Real-Time PCR (Roche, Almanya) cihazı ile belirlendi. Her bir gruptan elde edilen geçiş noktası değeri (crossing point, CP), GAPDH'a oranlanarak ekspresyonların rölatif oranı saptandı ve E değeri olarak ifade edildi. Pozitif ve negatif kontrole göre örneklerin E değeri karşılaştırılarak gen ekspresyon düzeyi belirlendi. Tüm gen ekspresyonu deneyleri üçer kez tekrarlandı.

Akım Sitometri Deneyleri

Erken ve geç apoptozu göstermek için Annexin-V FITC kiti (BD Pharmingen) ile akım sitometrik çalışmalar yapıldı. K-562 hücreleri, ilaç uygulamalarını takiben 10^5 - 10^6 hücre/ml olacak şekilde süspansiyon haline getirildi ve soğuk fosfat-tuz tamponu (PBS=phosphate buffered saline) çözeltisi ile yıkayıp, üstteki sıvı atıldıktan sonra geriye kalan çökeltilere Annexin-V FITC apoptoz tespit kiti içerisindeki bağlanma çözeltisi ilave edildi. Tüpler buz üzerinde tutularak 490 µl hücre süspansiyonuna 5 µl kullanıma hazır Annexin-V FITC ve 5 µl propidyum iyodid eklendi ve hafifçe karıştırıldı. Tüpler buz üzerinde 15-20 dakika karanlıkta inkübe edildi. Hücre örnekleri akım sitometri cihazında analiz edildi. Tüm akım sitometrik analizler ikişer kez tekrarlandı.

İstatistiksel Analizler

Verilerin istatistiksel olarak değerlendirilmesinde tanımlayıcı istatistikler kullanıldı. Gruplar arası karşılaştırmalarda Dunnet t-testi kullanıldı. Yapılan analizlerde Statistica 7.0 ve SPSS for Windows 11.5 paket programları kullanıldı.

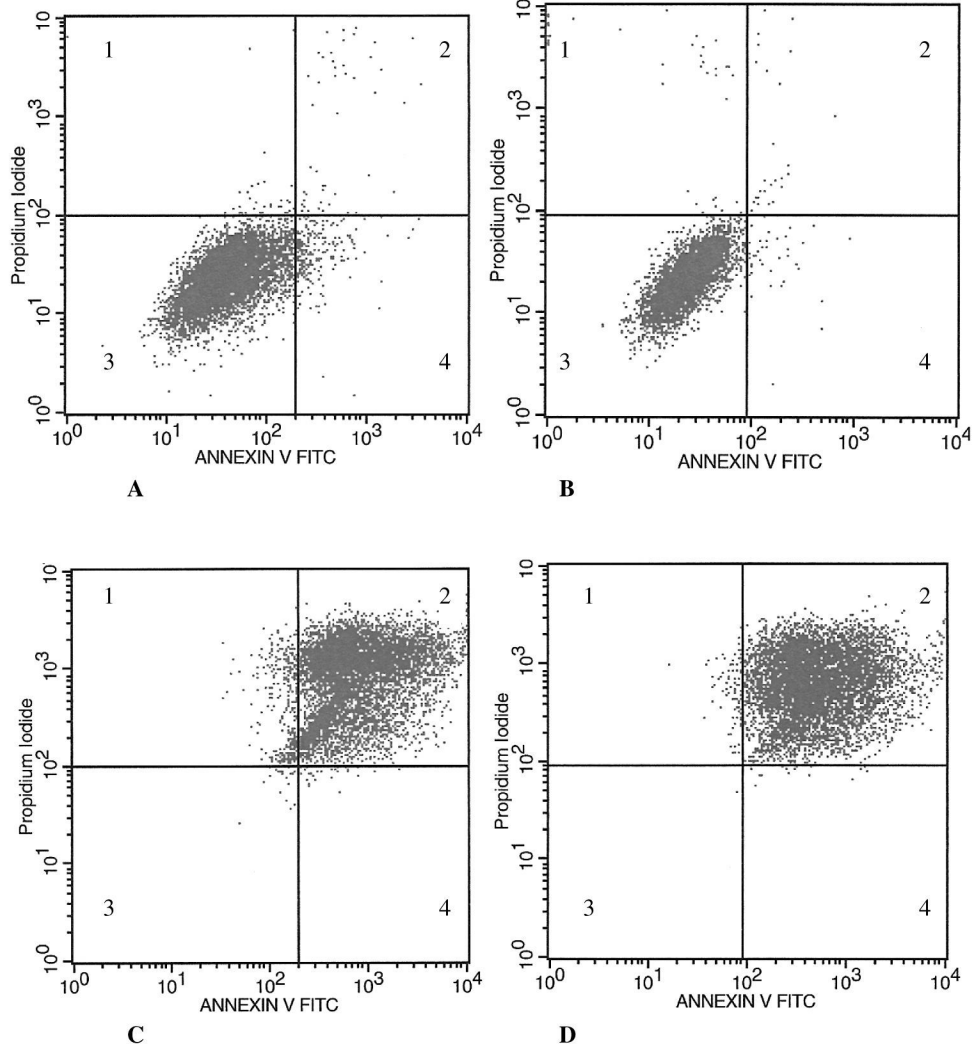
Bulgular

K-562 hücre hattında 24. ve 48. saat sonunda, apoptotik genlerden olan kaspaz-8'in amplifikasyonu araştırıldı (Şekil 1). Çalışılan tüm gruplarda, ekspresyon oranları negatif kontrol esas alınarak hesaplanmıştır.

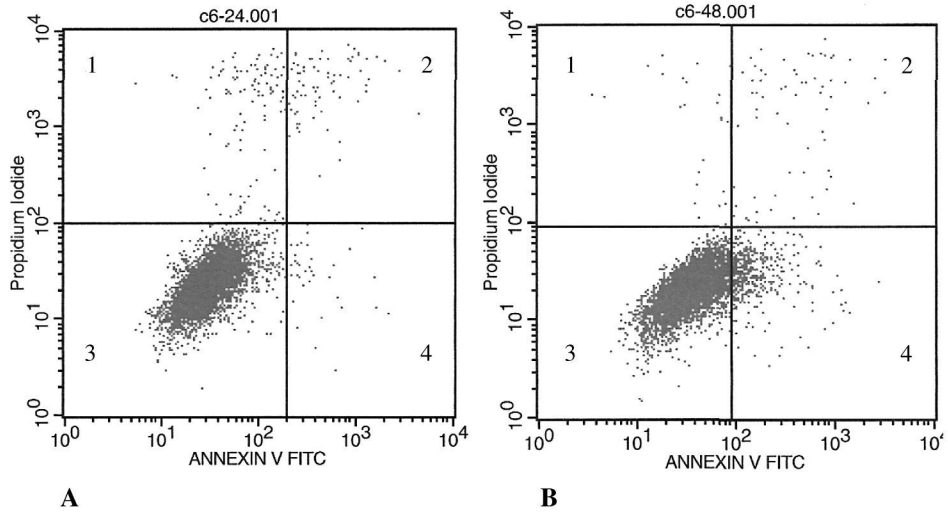
K-562 hücre hattında kaspaz-8 geni için 24. saatte C6 ve C7 gruplarında negatif kontrole göre ekspresyon oranlarında istatistiksel olarak anlamlı bir artış saptanmıştır (Tablo 1). Kırksekizinci saatte negatif kontrole göre her iki grupta da artış olmasına karşın C6 grubunda istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Tablo 2). Negatif kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı artış

gösteren gruplara ait anlamlılık (p) değerleri asteriks işareti (*) ile gösterilmiştir.

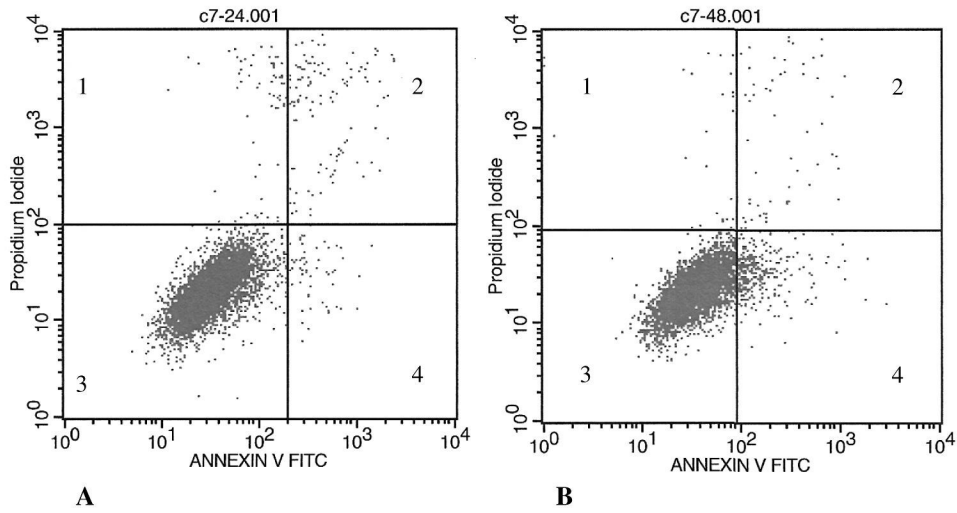
Akım sitometrik analizler ile K-562 hücre hattında 24. saatteki ortalama canlı hücre yüzdesi negatif kontrole göre karşılaştırıldı. Negatif kontrole göre C7 ve C6 gruplarında canlı hücre yüzdesi azalmış olmasına karşın bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Aynı şekilde geç apoptotik ve nekrotik hücre gruplarında da negatif kontrole göre bir artış olmasına karşın bu artış anlamlı bulunmamıştır (Tablo 3). Kırksekizinci saatte tüm gruplarda apoptozda bir artış saptanmış olmasına karşın sadece C6 grubunda erken apoptotik hücre yüzdesinde anlamlı bir artış saptanmıştır (Tablo 4).



Şekil 1. K-562 hücrelerinde canlılığın ve apoptozun akım sitometrik olarak değerlendirilmesi **A)** Negatif Kontrol/24 saat **B)** Negatif Kontrol/48 saat **C)** Pozitif Kontrol/24 saat ve **D)** Pozitif Kontrol/48 saat. 1 nolu alan nekroz, 2 nolu alan geç apoptoz, 3 nolu alan canlı, 4 nolu alan ise erken apoptozu göstermektedir.



Şekil 2. K-562 hücrelerinde canlılığın ve apoptozun akım sitometrik olarak değerlendirilmesi **A)** C6/24 saat; **B)** C6/48 saat. 1 nolu alan nekroz, 2 nolu alan geç apoptoz, 3 nolu alan canlı, 4 nolu alan ise erken apoptozu göstermektedir.



Şekil 3. K-562 hücrelerinde canlılığın ve apoptozun akım sitometrik olarak değerlendirilmesi **A)** C7/24 saat; **B)** C7/48 saat. 1 nolu alan nekroz, 2 nolu alan geç apoptoz, 3 nolu alan canlı, 4 nolu alan ise erken apoptozu göstermektedir.

Tablo 1. Deney gruplarında K-562 hücre hattında kaspaz-8 geni için 24. saatte E değerleri.

Grup Adı	N	Ort±SS	Ortalama Fark	p değeri
C7	3	0.3771±0.0030	0.0203	0.024*
C6	3	0.4081±0.0107	0.0512	0.001**
NK	3	0.3568±0.0051		
PK	3	0.4333±0.0091		

* anlamlı

** çok anlamlı

Tablo 2. Deney gruplarında K-562 hücre hattında kaspaz-8 geni için 48. saatte E değerleri

Grup Adı	N	Ort±SS	Ortalama Fark	p
C7	3	0.3789±0.0069	0.0171	0.205
C6	3	0.4052±0.0086	0.0433	0.001*
NK	3	0.3618±0.0071		
PK	3	0.4446±0.0154		

Tablo 3. Deney gruplarında K-562 hücre hattında 24. saatteki canlı hücre, erken apoptotik hücre, geç apoptotik hücre ve nekrotik hücre sayıları

	Grup	N	Ort±SS	Ortalama Fark	p
Canlı Hücre	C7	2	95.5850±1.6475	-1.5400	0.504
	C6	2	96.2450±0.5303	-0.8800	0.942
	NK	2	97.1250±1.4354		
	PK	2	0.4100±0.1555		
Erken Apoptotik Hücre	C7	2	0.8150±0.0070	-1.0250	0.565
	C6	2	0.6450±0.1343	-1.1950	0.399
	NK	2	1.8400±1.3859		
Geç Apoptotik Hücre	PK	2	0.4050±0.0636		
	C7	2	1.6900±0.1697	1.1100	0.213
	C6	2	1.0250±0.0636	0.4450	0.959
Nekrotik Hücre	NK	2	0.5800±0.0707		
	PK	2	93.8850±1.0818		
	C7	2	1.9100±1.4708	1.460	0.150
	C6	2	2.0850±0.4596	1.635	0.088
Nekrotik Hücre	NK	2	0.4500±0.0283		
	PK	2	5.3050±0.8556		

Tablo 4. Deney gruplarında K-562 hücre hattında 48. saatteki canlı hücre, erken apoptotik hücre, geç apoptotik hücre ve nekrotik hücre sayıları

	Grup Adı	N	Ortalama Hücre Yüzdesi (± standart sapma)	Ortalama Fark	p
Canlı Hücre	C7	2	94.8800±1.1738	-3.9650	0.266
	C6	2	92.9200±0.3677	-5.9250	0.040
	NK	2	98.8450±0.2474		
	PK	2	0.0350±0.0070		
Erken Apoptotik Hücre	C7	2	3.7300±1.3717	3.3250	0.182
	C6	2	5.5800±0.6505	5.1750	0.016*
	NK	2	0.4050±0.1343		
	PK	2	0.5050±0.2899		
Geç Apoptotik Hücre	C7	2	0.7900±0.1131	0.4050	1.000
	C6	2	0.8550±0.1060	0.4700	1.000
	NK	2	0.3850±0.0495		
	PK	2	98.2700±0.1555		
Nekrotik Hücre	C7	2	0.6000±0.3111	0.235	1.000
	C6	2	0.6500±0.3818	0.285	1.000
	NK	2	0.3650±0.1626		
	PK	2	1.1900±0.1273		

Tartışma ve Sonuç

Siklofosfamid, inflamasyonu azaltan ve bağışıklık sistemini baskılayan immünsupresif bir ilaç olup DNA sentezini değiştirerek hücrelerin çoğalmasını engeller. Bu nedenle bu ajan kan hücreleri, saç kökleri ve bağırsak mukozası hücreleri gibi çok aktif çoğalan hücreler üzerine daha etkilidir (10,11). Oluşturulan deney gruplarında, apoptotik gen olan kaspaz-8'in gen ekspresyonu düzeylerindeki değişiklikleri ve akım sitometrik analizleri ile apoptoza etkileri incelendi. Siklofosfamidin kaspaz-8 gen ekspresyonunu artırdığı ve apoptozu uyardığı saptanmıştır.

Güncel olarak KML tedavisinde 3 tedavi seçeneği vardır. Bunlar, interferon-alfa (IFN- α), tirozin kinaz inhibitörü (imatinib) ve allojenik hematopoietik kök hücre naklidir (AHKHN). IFN- α özellikle erken kronik faz KML'de %70 tam hematolojik yanıt sağlar. Imatinib ile yapılan ön çalışmalar, in vitro Bcr-Abl eksprese eden hücrelerin çoğalmasını ve sonrasında KML hastalarında koloni oluşumunu inhibe ettiğini göstermektedir. AHKHN, KML'de hala küratif yaklaşım olarak güncelliğini korumaktadır. Özellikle erken kronik faz ve iyi risk grubundaki hastalarda uzun dönem hastalısız ve toplam sağkalım görülmektedir. Ancak kök hücre transplantasyonuna eşlik eden uzun dönem morbitide ve mortalite nedeniyle transplantasyonla ilişkili ölümü etkileyen faktörleri iyi tanımlamak gerekir. Kırkbeş yaşın altındaki hastalarda, erken kronik faz ve HLA-uygun

kardeş vericisi olanlarda AHKHN iyi seçenek olarak görülmektedir (14-16).

Kemik iliği transplantasyonu öncesinde, lösemi ve solid tümörlerin tedavisinde yaygın olarak kullanılan ve kemoterapötik madde olan siklofosfamid, alkilleyici bir ajandır. Bünyesindeki elektrofilik alkil kökü ile DNA'ya kovalent olarak bağlanarak DNA'nın yapısını bozar. DNA yapısı bozulan hücrenin apoptoza gitmesini sağlayarak etki gösterir (6,7,17). Küçük hücre dışı akciğer tümörlerinde yapılan çalışmalar, sisplatin, topotekan ve siklofosfamid gibi antikanser ilaçların apoptoza indüklediği gösterilmiştir (18).

Apoptoz regülasyonunun bozulmasının, malign hastalıkların oluşumunun bir kısmında en az artmış proliferasyon kadar büyük bir önemi vardır. Ayrıca, radyasyonun da dahil olduğu çoğu kemoterapötik ajanların apoptoza indüklediği bilinmekte olup, apoptoz ve malignite birbiriyle çok sıkı ve kompleks bir ilişki içindedir (19-21). Böylece, apoptozun hücre siklusuyla olan ilişkisi de göz önüne alındığında apoptoz, hücre siklusu ve kemoterapi üçlüsü arasındaki interaksyonların, kanser hastalarının gerek prognozunu gerekse tedaviye yanıtını belirleyeceği bildirilmektedir (22).

Çalışmamızdan elde edilen veriler bu bulgular ile uyumlu olup, farklı doz ve kombinasyonlarda uygulanan siklofosfamidin, K-562 hücrelerini apoptoza götürdüğü saptanmıştır.

KML tedavisinde oldukça başarılı sonuçlara ulaşılmasına rağmen, hastalığın progresyonuna yol açan moleküler mekanizmalar, sitotoksik ilaçların kullanımının etkinliği ve uzun dönem sonuçları henüz tam bilinmemektedir. KML'de antijenlerin tanımlanması ve hedefe yönelik immunterapötik yaklaşımların gelişimi ile ilgili çalışmalar sürmektedir.

Kaynaklar

1. Ulukaya E. Kanser, Apoptoz, Onkogram. Erişim: <http://biyokimya.uludag.edu.tr/dersnotlari.html> Erişim Tarihi: 02.06.2008.
2. Öztürk F. Apoptoz. İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi 2002;9(2):143-8.
3. Öniz H. Apoptoz: Ölmeye Yatmak. SSK Tepecik Hast Dergisi 2004;14(1):1-20.
4. Erdoğan BB, Uzaslan EK. Apoptozis mekanizmaları: tümör gelişiminde Fas-FasL bağımlı apoptozis. Akciğer Arşivi 2003;4:165-74.
5. Türkiye'de Kanser İstatistikleri. Türk Kanser Araştırma ve Savaş Kurumu. Erişim: http://www.turkancer.org/newsfiles/60turkiye_kanser_istatistikleri-2.pdf Erişim Tarihi: 02.08.2008
6. Sağlıker Y. Harrison İç Hastalıkları Prensipleri. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri, 2004;491-547.
7. Onat T, Emerk K, Sözmen EY. İnsan Biyokimyası. Ankara: Palme Yayıncılık, 2002;547-86.
8. Kayaalp O. Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji. Ankara: Hacettepe-Taş Kitapçılık. 10. Baskı, 2002;960-94,1439-63.
9. Jabbour E, Cortes JE, Kantarjian HM. Molecular monitoring in chronic myeloid leukemia: Response to tyrosine kinase inhibitors and prognostic implications. *Cancer* 2008;112(10):2112-8.
10. Dubois RN. New paradigms for cancer prevention. *Carcinogenesis* 2001;22(5):691-2.
11. Fritz G, Kaina B. Rho GTPases: Promising cellular targets for novel anticancer drugs. *Curr Cancer Drug Tar* 2006;6:561-71.
12. Liebermann DA, Hoffman B. Differentiation primary response genes and proto-oncogenes as positive and negative regulators of terminal hematopoietic cell differentiation. *Stem Cells* 1994;12(4):352-69.
13. Callus BA, Vaux DL. Caspase inhibitors: viral, cellular and chemical. *Cell Death Differ* 2007;14:73-8.
14. Ujibe M, Kano S, Osanai Y, Koizumi K, Ohtake T, Kimura K, Uwai K, Takeshita M, Ishikawa M. Octylcaffate induced apoptosis in human leukemia U937 cells. *Biol Pharm Bull* 2005;28(12):2338-41.
15. Curtin, JF, Cotter TG. Apoptosis: Historical perspectives. *Assays Biochem* 2003;39:1-10.
16. Jaattela M. Multiple cell death pathways as regulators of tumor initiation and progression. *Oncogene* 2004;449(2):175-85.
17. Akyol H. Kemoterapinin temel ilkeleri. XIII. TPOG Ulusal Pediatrik Kanser Kongresi Özet Kitabı, Hemşire Programı, 2004;159-63.
18. Ferreira CG, Span SW, Peters GJ, Krutz FA, Giaccone G. Chemotherapy triggers apoptosis in a caspase-8-dependent and mitochondria-controlled manner in the non-small cell lung cancer cell line NCI-H460. *Cancer Res* 2000;60(24):7133-41.
19. Vrdoljak E, Bill CA, Stephens LC, van der Kogel AJ, Ang KK, Tofilon PJ. Radiation-induced apoptosis of oligodendrocytes in vitro. *Int J Radiat Biol* 1992;62(4):475-80.
20. Kerr JF, Winterford CM, Harmon BV. Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer* 1994;73(8):2013-26.

21. Kumar S. Caspases and their many biological functions. *Cell Death Differ* 2007;14:1–2.
22. Timmer JC, Salvesen GS. Caspase substrates. *Cell Death Differ* 2007;14:66–72.