

## PERİODONTOLOJİDE BOR Boron in Periodontology

Mehmet SAĞLAM<sup>1</sup>, Serhat KÖSEOĞLU<sup>1</sup>, Şükrü ENHOŞ<sup>1</sup>

**Özet :** Borun, insanlar ve hayvanlar için esansiyel bir element olduğu bilinmektedir. Bor, embriyogenez, kemik gelişimi, immün sistem ve psikomotor yetenekleri içeren birçok yaşamsal olayda önemli rol oynamaktadır. Aynı zamanda bor bileşiklerinin bakteriostatik, bakterisidal, fungistatik, fungisidal ve antiviral etkilerinin olduğu belirtilmiştir. Borun, antibakteriyel özelliği, kemik metabolizması ve immün cevap üzerine bilinen etkileri periodontoloji ile uğraşan araştırmacıların da ilgisini çekmiştir. Yakın zamanda bor içerikli ajanların periodontolojide kullanımı düşünülmektedir.

**Anahtar kelimeler:** Bor, periodontoloji, antiinflamatuar, antibakteriyel

Bor elementi, periyodik sistemin üçüncü grubunun başında bulunmaktadır. Atom numarası 5, atom ağırlığı 10.82, özgül ağırlığı 2.84, ergime noktası 2190±20°C'dir. Non-metal bir element olan borun üç adet dış elektronu mevcut olup silisyum ile benzerlik göstermektedir. Doğada bor saf halde bulunmayıp, oksijenle birleşerek, bor tuzları şeklinde veya silikatlar halinde bulunur. Doğada başta borik asit ve boraks olmak üzere iki yüze yakın bor bileşiği bulunmaktadır (1,2).

Bor adının Arapça Buraq veya Farsça Burah kelimesinden geldiği düşünülmektedir. Tarihte boru ilk kez Babilliler altın elde etmek amacıyla kullan-

**Summary:** It is known that boron is an essential element for humans and animals. Boron play important roles in many life processes including embryogenesis, bone growth and maintenance, immune function and psychomotor skills. However, it is indicated that boron compounds have bacteriostatic, bacteriocidal, fungistatic, fungicidal and antiviral effects. The antibacterial property and known effects of boron on bone metabolism and immune response attracted the attention of researchers dealing with periodontics. In the near future, the use of boron-containing agents in periodontology will be considered.

**Keywords:** Boron, periodontology, antiinflammatory, antibacterial

mışlardır. Eski Yunanlılar ve Romalılar bor bileşiklerini temizlik maddesi olarak kullanmışlardır. Eski Mısırlılar'ın ölülerini mumyalamakta boraks kullandıkları iddia edilmektedir. Çin'de milattan 300 yıl kadar önce glazürlerin yapımında boraks kullanılmıştır. İlaç olarak M.S. 875 yılında Arap doktorlar tarafından kullanılmıştır. Borik asit 18. yüzyıl başlarında elde edilmiş ve yine aynı yüzyılda Güney Amerika'da And Dağları'nda bulunmuştur. Elementel bor ise 19. yüzyıl başlarında bulunmuştur (2,3).

Bor, meyve, posa içeriği yüksek sebzeler, sert kabuklu meyveler, kurubaklagiller, şarap, bira ve elma suyunda zengin olarak bulunmaktadır (4). Borun bitkiler için gerekli temel bir element olduğu bilinmekte olup, son yıllarda insanlar için de gerekli olduğu kanıtlanmıştır (5).

<sup>1</sup> Yrd.Doç.Dr.İzmir Katip Çelebi Ün. Diş Hek. Fak. Periodon. AD, İzmir

Geliş Tarihi : 11.07.2012 Kabul Tarihi : 15.03.2013

Dünya Sağlık Örgütü'nün kullandığı hayvan ve insan araştırmalarına göre yetişkinler için, bor tüketiminin kabul edilebilir güvenlik aralığı 1-13 mg/gün olarak belirtilmiştir (5). Borun optimal dozu uygun fizyolojik fonksiyonlar için 3-6 mg/gün'dür. Bu doz, bol sebze, meyve, kurubaklagil ve sert kabuklu meyvelerden sağlanabilir. Diyetlerinde yeterli ölçüde bu maddeleri tüketmeyenlerin günde 3 mg bor almaları gerekir. Artritli kemikler normalden daha az bor bulduğundan dolayı günlük 6-9 mg bor alımı gerekmektedir (6).

Borik asitin 20-25mg/kg dozlarının mide bulantısı ve kusma ile sonuçlandığı belirtilmiştir. Ayrıca 100 mg üzeri alımların toksik etkiye yol açtığı bilinmektedir. Öldürücü doz ise yetişkinlerde; 15-20 g (yaklaşık 200-300 mg/kg), çocuklarda 3-6 g (yaklaşık 70-85mg/kg) ve yenidoğanlarda 2-3 g (30-45mg/kg) olarak belirtilmiştir (7, 8).

#### BOR VE KEMİK METABOLİZMASI

Alveoler kemik; dişler için primer destek yapı oluşturan, mandibula ve maksillanın özel bir parçasıdır. Araştırmacılar borun kemik oluşumu ve tamirinde borun özellikle trabeküler ve alveoler kemik üzerine faydalı etkileri olduğundan bahsetmişlerdir (8,9). Bordan yoksun diyetle (0.1 mg/kg diyet) beslenen erkek sıçanlarla bor destekli diyetle (3mg/kg diyet) beslenen sıçanlar bilgisayarlı mikro tomografi (Mikro-CT) ile karşılaştırıldığında bor yoksunluğunun kemik hacmi fraksiyonunu, trabeküler kalınlığı azalttığı ve trabeküler boşlukları arttırdığı görülmüştür. Mikro-CT bulguları borun kemik dayanıklılığını düzenleyen trabeküler mikroyapısı için gerekli olmasa da, bu yapı için faydalı olduğunu göstermiştir (8). Bor yoksunluğunun aynı zamanda diş çekimi sonrası hemen başlayan alveoler kemik tamirini de bozduğu bulunmuştur. Bor içeren diyetle beslenen fareler (3mg/kg) daha az bor içeren diyetle beslenen farelerle (0.07mg/kg) karşılaştırıldığında, diş çekildikten 14 gün sonra kemik oluşumundaki farkedilir azalmadan dolayı alveoler kemik iyileşmesinde bozulma görülmüştür (9).

Dokuz hafta boyunca bordan yoksun (0.07 mg/kg) diyetle beslenen fareler, bor eklenmiş (3 mg/kg) diyetle beslenen farelerle kıyaslandığında, osteoblast yüzeyinin azaldığı ve alveoler kemiğin hem lingual, hem de bukkal yüzeyinde pasif kemik oluşum yüzeyinin arttığı rapor edilmiştir (10).

Bor eksikliğinin, kemikteki kalsiyum ve fosfor konsantrasyonlarını belirgin şekilde etkilemediği; ancak osteoblast ve osteoklast aktivitesini, farklılaşma ve kemik formasyonu ile ilişkili minerallerin (magnezyum, potasyum, bakır ve çinko vb.) konsantrasyonunu etkilediği bildirilmiştir (11, 12).

#### BOR VE İMMÜN CEVAP

Araştırmalarda mevcut bor durumunun hasara veya enfeksiyona karşı cevabı etkilediğini bulunmuştur. Bu bulgular arasında mevcut bor durumunun, enjekte edilen antijenlere cevabı etkilediği görülmüştür. Sıçanlara artiriti indükleyen bir antijen (*Mycobacterium butyricum*) enjekte edildiğinde, bor destekli diyetle (2 mg/kg diyet) beslenen sıçanlarda, daha az bor içeren (0.1 mg/kg diyet) diyetle beslenen sıçanlara göre patilerde daha az şişme ve doğal öldürücü ve CD8a+/CD4<sup>-</sup> hücrelerinin daha düşük konsantrasyonlarda olduğu görülmüştür (13). Bir başka çalışmada düşük bor içeren diyetle (0.2 mg/kg), bor desteği (20mg/kg diyet) yapıldığında, sıçanlardaki *Mycobacterium tuberculosis* ile indüklenen artrit başlangıcını geciktirdiği bulunmuştur (13). Bor destekli diyetle (5mg/kg diyet) beslenen domuzlar, bor miktarı az olan (1-2mg/kg) diyetle beslenen domuzlarla kıyaslandığında, intradermal fitohemaglutinin enjeksiyonuna karşı oluşan antienflamatuvar cevabın daha az olduğu görülmüştür (14).

Borun, enflamatuvar cevap üzerindeki faydalı etkisini araştıran bir çalışmada, osteoartrit olduğu radyografik olarak kabul edilen 20 hastaya, 8 hafta boyunca günde 6 mg bor ya da plasebo verilmiştir. Bor desteği alan artritli bireylerde subjektif olarak eklemelerde şişliğin azaldığı, sınırlı hareketlerde gelişme ve ağrı için daha az analjezik kullanımı rapor edilmiştir (8).

## PERİODONTOLOJİDE BOR KULLANIMI

Borun, antibakteriyel özelliği, kemik ve immün cevap üzerine bilinen etkileri periodontoloji alanındaki araştırmacıların da ilgisini çekmiştir.

Borik asit bileşiklerinin, genel tıpta antibakteriyel (15) ve antienflamatuvar etkisi (8) rapor edilmiştir.

### Antimikrobiyal Etkileri

Bor içerikli ilk doğal biyomolekül, *Streptomyces antibioticus*'un bir suşundan elde edilen 'boromisin' adı verilen bir antibiyotiktir. Boromisinin, gram (+), belirli bazı mantarlar ve protozoalara karşı etkili olduğu ancak gram (-) bakterilere karşı etkisiz olduğu belirtilmiştir (16). Borik asit esterlerinin, klinikte kullanılan eritromisin, gentamisin ve streptomisin gibi antibiyotikler ile kıyaslanabilir olduğu rapor edilmiştir (17).

Yapılan bazı çalışmalarda; % 0.4-5 konsantrasyondaki borik asidin *Candida albicans*'ın klinik izolatlarını inhibe ettiği ve antifungal etki gösterdiği, 500 mg borik asidin 48 saat içinde *C.albicans* izolatlarının % 50-90'ını öldürdüğü bildirilmiştir. Bununla yanında mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte, borat tuzlarının *Herpes* virüslerin replikasyon ve sitopatik aktivitelerini engellediği belirtilmektedir (18).

Arslan ve ark. (19) %12'lik borik asit solüsyonunun, *Streptococcus mutans* RSHM 06029, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecium* (Vankomisin dirençli), *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumonia* ATCC 700603, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 gibi gram (+) ve gram (-) bakteriler üzerine etkili olduğunu rapor etmişlerdir.

Borik asit kinolin esterleri, son zamanlarda yeni antibakteriyel bileşikler olarak tanımlanmıştır (17). Bu bileşiklerden biri de, *Staphylococcus aureus*'un deride kolonizasyonu ile ilişkili olan atopik dermatitis tedavisinde yaygın olarak kullanılan AN0128'dir (20). Luan ve ark.,(21) borik asit içerikli AN0128'in, periodontal hastalıkla ilişkili olan *Prevotella intermedia*, *Porphyromonas gingivalis*, *Eubacteria nodatum* ve *Treponema denticola* gibi

bakteriler üzerine in vitroda antibakteriyel etkisi olduğunu belirtmiştir.

### Kemik Rejenerasyonu

Periodontal rejenerasyon, periodontal tedavinin esas amacıdır. Periodontal defektlerde periodontal rejenerasyonu arttırmak için kemik greftleri kullanılmaktadır (22). Biyoaktif materyaller, kaybedilen kemik dokusunu yerine koymak ya da kemik dokusunun iyileşmesine yardımcı olmak için kullanılır. Zayıf osteoporotik kemikleri desteklemek ve kemik defektlerini doldurmak için bu materyallere gereksinim duyulur (23,24). Borun kemik oluşumu ve tamirindeki bilinen faydalı etkileri, bor içerikli bir biyoaktif camın geliştirilmesine öncülük etmiştir. Biyoaktif cam, kemik doku mühendisliği ve doğal kemik rejenerasyonu için bir doku iskelesi olarak kullanılır. 45S5 biyocam, bor eklenerek modifiye edildiğinde kemik oluşumu artırdığı görülmüştür (25). Pan ve ark. (23) stronsiyum borat camın yeni kemik oluşumunu uyarımasından dolayı, kemik rejenerasyonunda yeni nesil bir biyomateryal olduğunu belirtmişlerdir.

### Antienflamatuvar Etki

Periodontal dokuların yapısal olarak ana elemanlarından biri protein olduğu için, periodontal doku yıkımında proteinazlar anahtar enzimlerdir. Doku matriks makromoleküllerinin yıkımında etkili proteinazlar; metallo (MMP), serin, sistein, aspartik proteinazlar olmak üzere dört temel sınıfta toplanmaktadır. Periodontal hastalıklarda MMP'ler ve bir grup serin proteinaz en fazla etkinliğe sahip proteolitik enzimler olarak bilinmektedir (26,27). Serin proteazlar (elastaz, kimaz, katepsin G) aktive olmuş lökositlerden salınan, yapısal proteinleri parçalayan majör proteolitik enzimlerdir. Borik asit bileşiklerinin serin proteazların aktivitelerini etkilediği ve bu enzimleri inhibe ettiği belirtilmiştir (16). Sağlam (28), kronik periodontitisli hastalarda yaptıkları çalışmada cerrahi olmayan periodontal tedaviye ek olarak uygulanan subgingival % 0.75'lik borik asit uygulamasının, serum fizyolojik uygulanan kontrol grubuna göre, dişeti oluğu sıvısındaki matriks metalloproteinaz-8 (MMP-8) miktarını anlamlı şekilde azalttığını rapor etmiştir.

Periodontal hastalıkta, nötrofiller enflamasyon bölgesine girdiklerinde, hidroksil radikalleri (OH<sup>-</sup>) ve hidrojen peroksiti (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) içeren reaktif oksijen türleri üretirler (16, 29,30). Bu reaktif oksijen türleri, hücre zarları ve organellerle etkileşerek hücre ve dokularda hasara neden olabilirler (16, 31). Borun, antioksidant bir ajan olan glutatyon ve türevlerini arttırarak ya da reaktif oksijen türlerini nötralize eden diğer ajanları uyararak, oksidatif hasarı engellediği belirtilmiştir (31).

Borun sahip olduğu bu etkiler periodontoloji alanında çalışanlarında ilgisini çekmiştir. Ancak periodontoloji alanında bu zamana kadar yapılan çalışma sayısı azdır.

Borik asit içerikli AN0128'in periodontal hastalığın tedavisindeki etkinliğini test etmek amacıyla yapılan bir çalışmada, ligatür bağlanarak deneysel periodontitis oluşturulan sıçanlarda AN0128 topikal olarak uygulanmıştır. AN0128 bor içerikli bileşiklerle tedavi edilen sıçanlarda, topikal olarak taşıyıcı ile tedavi edilen ve tedavi edilmeyen sıçanlara göre önemli derecede daha az kemik kaybı ve daha az enflamatuvar infiltrat rapor edilmiştir. Sıçanlardaki azı dişleri arasındaki alveoler kemik alanı histolojik olarak incelendiğinde, AN0128 grubunda alveoler kemik alanında % 50 kemik oluşumu gözlenmiş olup, bu sonuç alveoler kemik alanında sırasıyla % 33 kemik oluşumu gözlenen tetrasiklin ve % 40 kemik oluşumu gözlenen klorheksidin ile kıyaslanabilir bulunmuştur. Ayrıca AN0128 bor içerikli bileşimin, taşıyıcı ile tedavi edilen gruba göre enflamatuvar infiltratı % 42 oranında azalttığı rapor edilmiştir (21).

Demirer ve ark. (32) ligatür bağlanarak deneysel periodontitis oluşturulan sıçanlara, ağız yoluyla 11 gün boyunca günlük 3mg sistemik borik asit vermişlerdir. Sıçanları 11 gün sonra sakrifiye edip, alveoler kemikteki değişiklikleri histomorfometrik olarak, doku örneklerini ise histopatolojik olarak incelemişlerdir. Enflamatuvar hücre infiltrasyonu, osteoklast sayısı ve alveoler kemik kaybının borik asit verilen sıçanlarda, borik asit verilmeyen kontrol grubuna göre daha az olduğunu tespit etmişlerdir. Sonuç olarak sistemik borik asit uygulamasının, periodontal hastalıklı sıçanlarda periodontal

enflamasyonu ve alveoler kemik kaybını azalttığını rapor etmişlerdir.

Sağlam (28), kronik periodontitis hastalarında cerrahi olmayan periodontal tedaviye ek olarak subgingival borik asit irrigasyonunun, klinik parametreler olan klinik ataçman seviyesi, plak indeksi, gingival indeks ve sondlamada kanamada ve dişeti oluşu sıvısındaki MMP-8 miktarında, serum fizyolojik uygulanan kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha fazla azalma sağladığını rapor etmiştir.

Son yıllarda borun biyolojik önemi ve metabolizma üzerine etkilerini araştıran çalışmalar devam etmektedir. Bor ve bor türevli bileşiklerin sağlık sektöründeki kullanımı her geçen gün artmaktadır. Periodontoloji alanında bor ile yapılan çalışmalar çok azdır. Borun antibakteriyel özelliği, kemik ve immün cevap üzerine bilinen etkileri yapılacak olan daha fazla çalışma ile desteklenirse, yakın zamanda bor içerikli greft materyalleri, antibakteriyel ajanlar ve bor kaplamalı implant yüzeyleri geliştirilebilir ve borun periodontoloji kliniklerine girmesi sağlanabilir.

#### KAYNAKLAR

1. Saygıdeğer DB. Borun İnsan ve Bitki için Önemi ve Bazı Üzüm Çeşitlerinde Bor tayini. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Adana 2005; ss: 1
2. Moseman RF. Chemical disposition of boron in animals and humans. Environ Health Perspect 1994; 102:113-117.
3. Yiğitbaşıoğlu H. Türkiye için önemli bir madde: Bor. Ankara Üniversitesi Coğrafi Bilimler Dergisi 2004; 2:13-25.
4. Eren M. Bor'un biyolojik önemi ve metabolizma üzerine etkileri. Erciyes Üniv Vet Fak Derg 2004; 1:55-59
5. Nielsen FH. Is boron nutritionally relevant? Nutrition Reviews 2008; 66: 183-91.

6. Gregory S., Kelly N.D. Boron: A review of its nutritional interactions and therapeutic uses. *Alternative Medicine Review* 1997; 2: 48-56.
7. USEPA. *Toxicological Review of Boron and Compounds*. EPA June 2004; 635-04-052.
8. Nielsen FH. Biochemical and physiologic consequences of boron deprivation in humans. *Environ Health Perspect* 1994; 102: 59-63.
9. Gorustovich AA, Steimetz T, Nielsen FH, Guglielmotti MB. A histomorphometric study of alveolar bone modelling and remodelling in mice fed a boron-deficient diet. *Arch Oral Biol* 2008; 53:677-682.
10. Gorustovich AA, Steimetz T, Nielsen FH, Guglielmotti MB. A histomorphometric study of alveolar bone modelling and remodeling in mice fed a boron-deficient diet. *FASEB J* 2006; 20:A195
11. Nielsen FH. The alteration of magnesium, calcium and phosphorus metabolism by dietary magnesium deprivation in postmenopausal women is not affected by dietary boron deprivation. *Magnes Res* 2004; 17:197-210.
12. Nielsen FH, Stoecker BJ, Penland JG. Boron as a dietary factor for bone microarchitecture and central nervous system function. In: Xu F, Goldbach HE, Brown PH, Bell RW, Fujiwara T, Hunt CD, Goldberg S, Shi L, Eds. *Advances in Plant and Animal Boron Nutrition*. Dordrecht, The Netherlands: Springer; 2007:277-290.
13. Hunt CD, Idso JP. Dietary boron as a physiological regulator of the normal inflammatory response: a review and current research progress. *J Trace Elem Exp Biol* 1999; 12:221-233.
14. Armstrong TA, Spears JW, Lloyd KE. Inflammatory response, growth, and thyroid hormone concentrations are affected by long-term boron supplementation in gilts. *J Anim Sci* 2001; 79:1549-1556.
15. Bailey PJ, Cousins G, Snow GA, White AJ. Boron-containing antibacterial agents: effects on growth and morphology of bacteria under various culture conditions. *Antimicrob Agents Chemother* 1980; 17:549-553.
16. Hunt CD, Dietary Boron: An Overview of the Evidence for Its Role in Immune Function. *J. Trace Elem. Exp. Med.* 2003; 16:291-306.
17. Benkovic SJ, Baker SJ, Alley MR, et al. Identification of borinic esters as inhibitors of bacterial cell growth and bacterial methyltransferases, CcrM and MenH. *J Med Chem* 2005; 48:7468-7476.
18. Kahyaoglu M. Bor bileşiklerinin mikrobiyal etkileri ve kullanım alanları. IV. Uluslararası Bor Sempozyumu. Eskişehir 15-17 Ekim 2009,ss: 209-213.
19. Arslan U, Bozkurt SB, Hakki EE, Findik D, Hakki SS. Boric acid as a promising antibacterial agent for clinical usage. 4<sup>th</sup> International Symposium on Trace Elements and Minerals in Medicine and Biology. St.Petersburg, Russia, 9-12 June 2010, p86.
20. Baker SJ, Akama T, Zhang YK, Sauro V, Pandit C, Singh R, et al. Identification of a novel boron-containing antibacterial agent (AN0128) with anti-inflammatory activity, for the potential treatment of cutaneous diseases. *Bioorg Med Chem Lett* 2006; 16:5963-5967.
21. Luan Q, Desta T, Chehab L, Sanders VJ, Plattner J, Graves DT. Inhibition of experimental periodontitis by a topical boron-based antimicrobial. *J Dent Res.* 2008; 87: 148-152.
22. Shirakata Y, Oda S, Kinoshita A, Kikuchi S, Tsuchioka H, Ishikawa I. Histocompatible healing of periodontal defects after application of an injectable calcium phosphate bone cement. A preliminary study in dogs. *J Periodontol* 2002; 73:1043-1053.

23. Pan HB, Zhao XL, Zhang X, et al. Strontium borate glass: potential biomaterial for bone regeneration. *J R Soc Interface* 2010; 7:1025-1031
24. Koşay MC. Osteoporotik omurga kırıklarında kullanılan güçlendirici materyaller. *Türkiye Klinikleri J Orthop & Traumatol-Special Topics* 2008; 1:79-82
25. Gorustovich AA, Porto López JM, Guglielmotti MB, Cabrini RL. Biological performance of boron-modified bioactive glass particles implanted in rat tibia bone marrow. *Biomed Mater* 2006; 1:100-105.
26. Reynolds JJ & Meikle MC. Mechanisms of connective tissue matrix destruction in periodontitis. *Periodontol* 2000 1997; 14: 144-57.
27. Reel B. Matris metalloproteinaz enzimleri ve ateroskleroz. *Türkiye Klinikleri J Med Sci* 2006; 26:527-537
28. Sağlam M. Kronik Periodontitis Hastalarında Cerrahisiz Periodontal Tedaviye Ek Olarak Klorheksidin, Borik Asit ve Diyod Lazer Kullanımının Klinik ve Biyokimyasal Parametreler Üzerine Etkisi. *Doktora Tezi, Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Periodontoloji Anabilim Dalı Konya 2011, ss:111*
29. Tamaki N, Tomofuji T, Ekuni D, Yamanaka R, Yamamoto T, Morita M. Short-term effects of non-surgical periodontal treatment on plasma level of reactive oxygen metabolites in patients with chronic periodontitis. *J Periodontol* 2009;80:901-906.
30. Özden FO, Öngöz F, Gündüz K, Avsever H, Avcı B. The importance of oxidative stress and antioxidants in periodontal diseases: review. *Türkiye Klinikleri J Dental Sci* 2012; 18:77-86.
31. Ince S, Kucukkurt I, Cigerci IH, Fatih Fidan A, Eryavuz A. The effects of dietary boric acid and borax supplementation on lipid peroxidation, antioxidant activity, and DNA damage in rats. *J Trace Elem Med Biol* 2010; 24:161-164.
32. Demirel S, Kara MI, Erciyas K, Ozdemir H, Ozer H, Ay S. Effects of boric acid on experimental periodontitis and alveolar bone loss in rats. *Arch Oral Biol* 2012; 57:60-65.