



# 실험동물로서의 미니돼지

## < Miniature pig as laboratory animal >

- 1 서론
- 2 miniature pig의 특성
- 3 miniature pig의 품종
- 4 질병
- 5 실험동물로서의 연구분야
- 6 SPF SNU miniature pig
- 7 참고자료



## 1.서론

돼지는 식용동물로 주로 사용되는 잘 알려진 동물이다. 역사적으로 유럽지역에서는 3,500년 전부터 사육이 되었다는 기록이 있으며, 학명은 *Sus scrofa*이다. 우리에게도 친근한 이 동물은 최근 들어 사람과의 생리해부학적 유사성 때문에 다양한 분야에서 연구용 모델동물로서 많이 사용되고 있다.

특히, 1950년대에 개발된 miniature pig는 영장류와 개 등에 대한 비설치류를 이용한 의학실험이 점차 제한되고 있어 실험동물학적 가치가 증가하고 있다.

miniature pig는 피부의 형태와 기능, 소화기, 심혈관계, 신요도계 뿐만 아니라 면역체계에서 사람과 높은 유사성을 보여주고 있다. 지난 5년간의 시험결과를 바탕으로 2010년에 보고된 EU의 자료에 의하면, miniature pig가 설치류, 개 및 영장류에 비하여 신약에 대한 시험동물로서 가장 우수한 결과를 도출하는 것으로 보고되었다.

돼지는 산업동물로서 인식이 되어왔기 때문에 영장류나 개에 비하여 윤리적인 논쟁의 가능성이 적다. 하지만 아직까지는 돼지를 이용한 많은 실험이 이뤄지지 않고 있다. 이 이유는 많은 연구자들이 돼지를 다루는데 익숙하지 않고, 실험결과에 대한 공인이 어려울지 모른다는 우려가 있기 때문이다. 우리나라에도 회사 및 대학의 연구소에 몇 종류의 miniature pig가 도입되어 유지 및 실험에 이용되고 있다. 아직까지 활발한 연구 및 사용이 이뤄지지 않고 있지만, 점차 그 저변이 확대되고 있는 점은 고무적이다. 특히 세계적인 추세와 연구의 다변화를 고려할 때, 관련 분야의 활성화 및 체계적인 시설 및 인력의 양성이 필요하다.

## 2.miniature pig의 특성

실험용 동물로서의 돼지는 그 사용이 제한적이었다. 기존에는 어리고 작은 크기의 domestic pig가 주로 이용되었으나, 빠른 성장 때문에 장기간의 실험기간이 소요되는 연구에서는 적합하지 않았다.

하지만, miniature pig는 크기와 특성이 domestic pig에 비하여 장기 실험에 적합하다. miniature pig의 경우 domestic pig에 비하여 빠른 성성숙을 나타내며, 암컷의 경우 3.5~6개월 이면 성성숙이 된다고 알려져 있다<sup>1</sup>.

임신기간은 114일로 동일하며, 산자수는 평균적으로 5~6마리 수준으로 domestic pig에 비하여 적고, 성체의 체중은 품종에 따라 차이가 있으나, 약 80kg 수준인 경우가 많다<sup>2</sup>. miniature pig는 여러 연구기관에서 연구용으로 개발되어져 왔는데, 최근에는 여러 종류는 Swine leukocyte antigen (SLA) homozygote miniature pig 품종들이 보고 되고 있다<sup>3</sup>.

miniature pig는 사람과의 형태, 생리해부학적 유사성이 높으며, 특히 피부, 심혈관계, 소화기계, 비뇨기계의 형태가 사람과 유사하다<sup>4</sup>.

이러한 특성을 이용하여 radiology, traumatology, dermatology, pathology, embryology, gastroenterology, cardiology, nephrology, surgery, pediatrics 와 odontology 뿐만 아니라, 최근 형질 전환된 동물을 이용한 xenotransplantation 연구 등에서 많이 이용되고 있어 그 활용 범위가 넓다<sup>5</sup>.

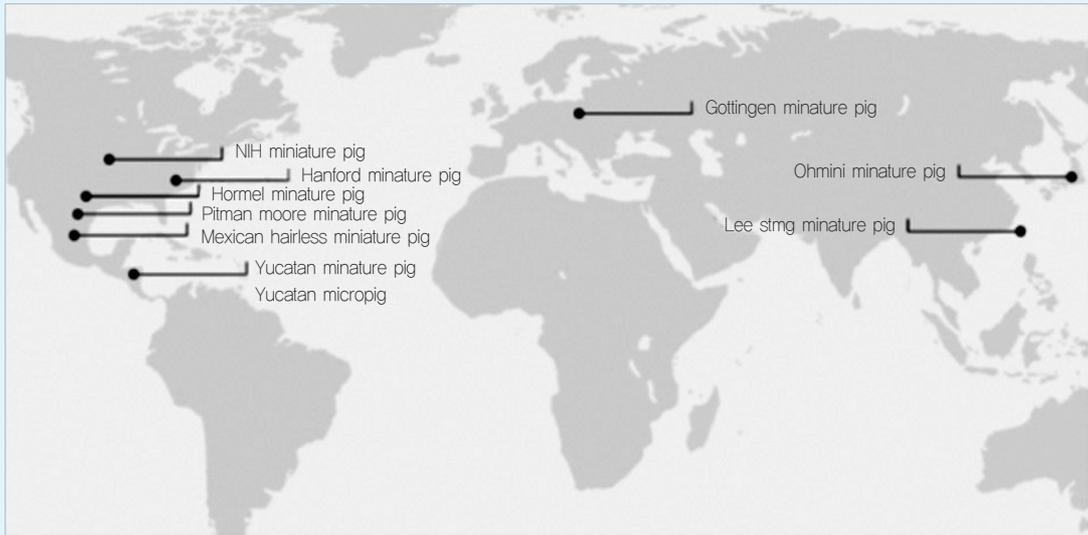
또한 miniature pig는 다른 설치류 등에 비하여 취할 수 있는 샘플의 양이 많아서 사람과 비슷한 수준의 검사를 수행해 볼 수 있으며, 성질이 유순하여 실험의 진행이 용이하다. 최근 miniature pig의 중요성이 증가하면서 돼지를 이용한 수술, 마취, 관리, 작업 등에 대한 정보가 발전된 형태로 제공되고 있다.

### 3.miniature pig의 품종

세계적으로 여러 종류의 miniature pig가 보고되고 있으며, 주로 미국, 유럽 등에서 많이 활용되고 있다.

잘 알려진 miniature pig 종류로는 Yucatan miniature pig 6, Hanford miniature pig 7, Sinclair miniature pig 8와 Gottingen miniature pig4, Ohmini miniature pig 9, Clawn miniature pig 10, NIBS 등이 있다.

실험동물로서의 미니돼지 ■  
 < Miniature pig as laboratory animal >



< Figure 1 : Popular miniature pig breed of world >

miniature pig는 동물의 크기가 작은 재래돼지를 유지하여 유전형질과 표현형질을 안정화시켜 실험동물로 사용하는 경우와, 여러 종류의 돼지 품종들을 교잡 및 육종함으로써 원하는 크기 및 형태로 개발시키는 형태가 동시에 진행되었다.

miniature pig의 개발은 1950년대 미국에서 개시되었으며, 육종을 통해 최초로 개발된 miniature pig는 Minnesota miniature pig (Hormel) miniature pig로서 의과대학생들을 위한 해부실습용 목적이었다. 대부분의 육종을 통해 개발된 miniature pig는 이 Minnesota miniature pig를 그 근원으로 하고 있다 11.

Yucatan miniature pig는 작은 크기의 재래돼지를 콜로라도 주립대학에서 유지하면서 실험동물로 확립하였다. 유순한 측면이 있고 0.74kg의 평균 생시 체중을 나타내며, 성체의 체중은 70~80kg 수준이다 6.

Hanford miniature pig는 1958년에 Hanford laboratory에서 개발되었다. 이 품종은 Falouse gilt와 Pittman-Moore boar의 F1 생산을 통해 확립되었으며, 하얀색의 피모를 가지고, 상대적으

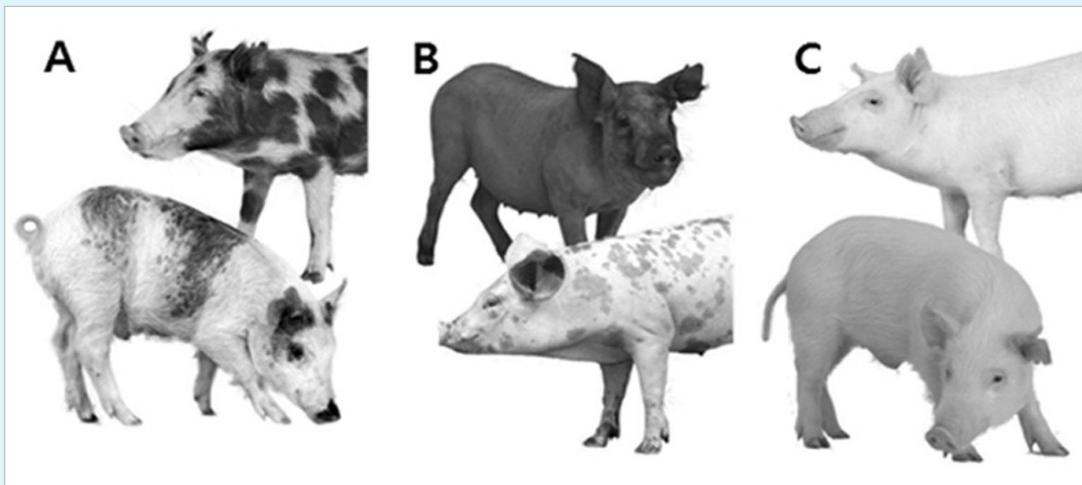
로 적은 피하지방이 특징이다. 40~50kg 수준의 Hanford miniature pig는 성인과 유사한 심장크기를 나타내므로 심혈관계 연구에 많이 사용된다 12.

Sinclair miniature pig는 Minnesota miniature pig에서 유래하여, Sinclair farm에서 발전되었다. 최초 Minnesota miniature pig는 Minnesota 대학의 Hormmel 연구소에서 5가지 작은 품종의 재래돼지를 교잡하여 인체 수술실습용으로 적합한 크기로 개발되었다.

Cutaneous melanoma의 발생율이 높은 계통으로 사람의 melanoma와 조직병리학적으로 유사한 특징을 나타내어 melanoma의 연구에 많이 이용이 된다 8.

Gottingen miniature pig는 최근 가장 널리 사용되고 있는 miniature pig 품종이다. 이 품종은 Minnesota miniature pig와 Vietnam Pot-Bellied pig 및 German landrace 종을 교잡하여 창백한 피부의 작은 크기인 miniature pig 품종을 완성하였으며, 비교적 안정적인 유전형질과 표현형을 나타낸다 4.

Clawn miniature pig는 Gottingen 돼지와 Ohmi 돼지의 교잡을 통해 개발되었으며, 후에 번식능력향상과 하얀색 피부색을 위해 Landrace와 Yorkshire의 유전형질을 도입하였다.



< Figure 2 . Miniature pig breeds >

A : Sinclair miniature pig, B : Yucatan miniature pig, C : Hanford miniature pig, URL : <http://www.sinclairbioresources.com/>



## 4. 질병

miniature pig는 돼지에서 발생하는 바이러스 및 세균성질병에 감수성을 나타낸다.

따라서 domestic pig의 질병이 그대로 발생할 수 있다. 하지만 miniature pig는 domestic pig에 비하여 크기가 작아서, 적절한 barrier의 확립을 통해 특정병원체부재동물(Specific Pathogen Free: SPF) 상태로 유지하기가 용이하다. 실험용 돼지는 돼지에서 질병을 일으키는 병원체, 인수공 통전염병 및 사람에게서 병원성을 유발할 수 있는 원인체가 없는 상태로 유지하여야 한다.

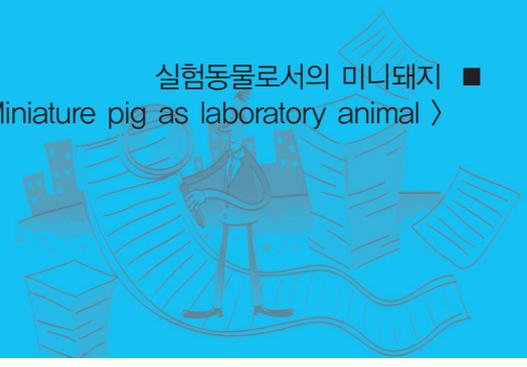
Federation of European Laboratory Animal Science Association (FELASA)의 돼지에 대한 모니터링 항목은 18종의 바이러스, 20종의 병원성세균 및 8종의 기생충성 질병에 대하여 음성을 유지하여야 한다<sup>13</sup>. (Table 1) 돼지의 췌도세포를 사람에게 이식하는 것을 연구하는 이종장기이식 연구의 경우 FELASA의 검사기준에 비하여 많은 검사항목 및 엄격한 관리기준이 적용된다<sup>14</sup>. SPF 상태로 유지되는 pig colony에서 예상치 않은 질병이 발생하기도 하는데, Swedish SPF herd에서 Staphylococcus hycus와 porcine circovirus type II에 의해 유발 된 exudative epidermitis가 발생하였다는 보고가 그 예이다<sup>15</sup>.

즉 domestic pig에서는 질병을 일으키지 않거나, 주된 유발 병원체가 아닌 경우에도, SPF 상태로 대부분의 병원체가 없고 관련 병원체에 대한 항체가 없는 경우, non specific pathogen에 의해서 임상증상이 유발 될 수도 있다.

< Table 1. List of specific pathogen of FELASA recommendation >

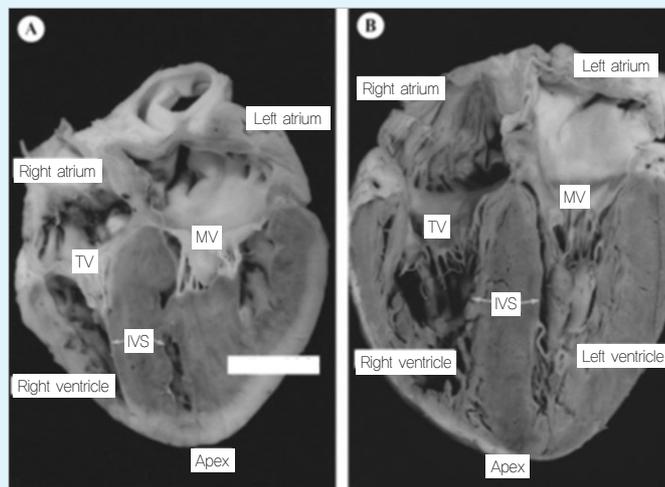
List of viral infections to be serologically monitored, when present in the country	test method
African swine fever	ELISA
Aujeszky disease virus	ELISA
Classical swine fever	ELISA
Encephalomyocarditis virus	ELISA, PCR
Haemagglutination encephalomyelitis	HA, NT, ELISA
Porcine cytomegalovirus (inclusion body rhinitis)	NT
Porcine influenza (H1N1, H3N2)	ELISA, HI
Porcine parvovirus	ELISA, HI
Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS)	ELISA
SMEDI	NT
Teschen/Talfan disease virus	IFA, NT
Transmissible gastroenteritis (TGE)	ELISA

List of viral infections to be monitored by other method	test method
Porcine epidemic diarrhoea Porcine rotavirus	ELISA,EM,Latex agglutination ELISA,EM,Latex agglutination
Viral infections to be monitored on request and when present in the country	test method
Foot and mouth disease virus (FMD) Porcine respiratory coronavirus Swine vesicular disease virus (SVDV) Vesicular exanthema virus (VEV) Vesicular stomatitis virus of swine (VSVS)	ELISA ELISA ELISA NT NT
Bacterial and mycoplasmal infection to be monitored compulsorily	test method
Actinobacillus peluropneumoniae Bordetella bronchiseptica Erysipelothrix rhusiopathiae Eubacterium (Corynebacterium) suis Haemophilus parasuis Leptospira spp. Mycoplasma hyopneumoniae Pasteurella multocida (toxin producing) Salmonella spp. Staphylococcus hyicus Streptococci beta-haemolytic Streptococcus suis Yersinia interocolitica	Serology Culture Culture, serology Culture Culture, serology Serology Culture, serology Culture, serology Culture Culture Culture Culture Culture Culture Culture Culture
Bacterial and fungal infections to be monitored on request	test method
Actinomyces pyogenes Brucella suis clostridium perfringens Escherichia coli Mycrosporium spp. Serpulina hyodysenteriae Trichophyton spp	Culture Culture Culture Culture Culture Culture, serology Culture
Compulsory list of parasites to be monitored	test method
All helminths Eimeria spp Isospora spp Sarcoptes sp	
Parasites to be monitored on request	test method
Cryptosporidium parvum Eperythrozoon suis Toxoplasma gondii Trichinella	Ziehl-Neelsen staining, IFA Serology Serology Serology



## 5. 실험동물로서의 연구분야

앞에서 언급한 바와 같이, miniature pig는 사람과 해부 및 생리학적 유사성으로 인하여 심혈관계 관련 연구나, 영양학적 소화기계 모델, 신장질환 모델, 실습용 동물, 장기이식연구 및 기타 독성실험 등 다양한 분야에서 사용되고 있다. (Table 2) 심혈관계의 경우, coronary sinus로 들어가는 left azygous vein의 존재를 제외하면 사람과 거의 유사한 형태를 나타낸다. 어린 miniature pig의 심장과 혈관의 형태나 크기 및 성장 속도는 사람의 어린아이와 비교할 때 상당부분 유사하고 40~50 kg 정도의 miniature pig는 성인과 비슷한 크기의 심장크기를 나타낸다고 알려져 있다. 또한 25~30kg수준의 miniature pig 체중대비 심장의 크기는 성인의 그것과 거의 유사하다<sup>16</sup>. 하지만 miniature pig strain별 차이가 일부 나타나므로 연구용 품종을 선택할 때 주의할 필요가 있다<sup>17</sup>. 실험적인 사람과 유사한 형태의 동맥경화증(atherosclerosis)은 atherosclerosis diet를 공급함으로써 유발시킬 수도 있다<sup>18</sup>. 이외에도 관상동물 협착과 경색에 관한 연구, 선천성 심장질환연구, 심부전 연구, 전기생리학연구, 이식연구, Stents 연구 및 Yucatan miniature pig에서의 선천성 심실중격결손 (ventricular septal defect) 연구 등이 가능하다.



〈 Figure 3 : Anatomy of normal heart of pig (A) and human (B)<sup>19</sup> 〉

돼지의 피부는 사람과 유사하게, 상대적으로 피모가 적고, 피하조직이 견고하게 연결되어 있다. Apocrine sweat gland가 없다는 점을 제외한다면 epidermal thickness, cellular composition, cutaneous blood supply의 형태 등의 전체적인 형태가 사람과 유사하다 20. 소화기계가 사람과 유사하고, 소화생리가 사람과 유사하며 잡식성의 특성을 이용하여, 영양소 흡수 및 성장관련 연구, 소화기계 이동연구, 간 대사연구 및 과사성 장결장염 등의 연구를 수행할 수 있다.



< Figure 4.  $\alpha$ -1,3-galactosyl transferase Knock out pig of PPL (ref : Nature news). >

돼지의 소화기 및 비뇨기계의 기능 또한 다른 대부분의 동물 종에 비하여 사람과 높은 유사성을 나타내며<sup>21</sup>, 신장 및 췌도 세포 (islet cell)의 경우 그 기능학적 유사성 때문에 이종장기이식연구의 주요 target organ으로 연구가 진행되어져 왔다<sup>22-23</sup>. miniature pig는 이종장기이식연구의 공여동물로서 영장류나 다른 동물종에 비하여 많은 장점을 가지는데, 1) 영장류에 비하여 인수공통전염병에 안정성이 있으며, 적합한 barrier을 운영함으로써 미생물학적 오염을 예방, 근절할 수 있으며, 2) 면역반응 유발 유전자의 형질전환 또는 유전자 제거(Knock out) 동물을 생산이 용의하고,  $\alpha$ -Gal 유전자를 제거된 동물을 비롯한 다양한 종류의 유전자 적중 또는 제거 동물이 생산되어 연구에 이용되고 있으며, 3) 돼지의 특성 상, 상대적으로 짧고 많은 산자를 얻을 수 있어 대량 생산이 가능하다



또한 다른 동물에 비하여 윤리적인 면에서 상대적으로 자유로운 점도 큰 이점이다. 이외에도 신장유래 고혈압, 방광요관역류연구, 신장내역류 및 요로폐쇄 등의 연구용으로 사용이 가능하고, 전신독성과 피부독성, 패혈증 및 출혈성 쇼크, 면역학, 당뇨, malignant melanoma, malignant hyperthermia 등의 모델 동물로서도 이용되고 있다.

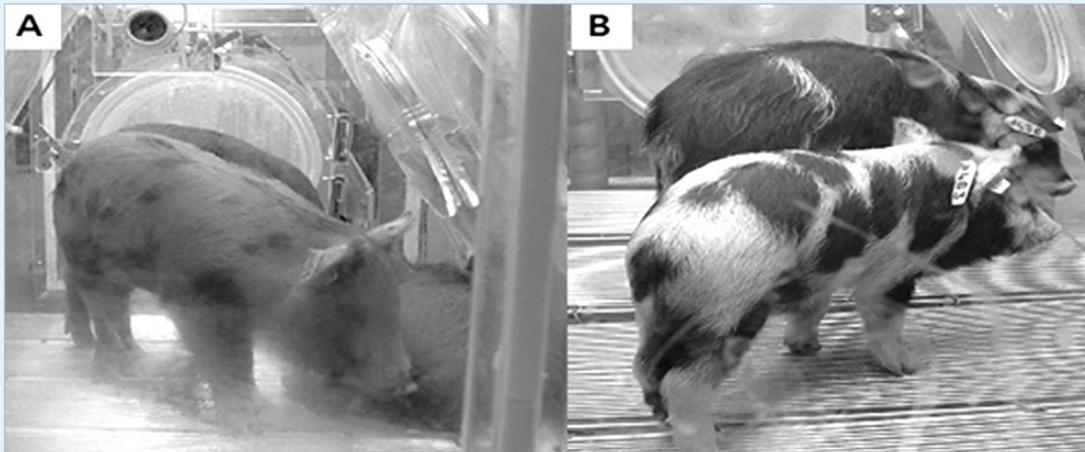
〈 Table 2. Pig as a bio-medical research animal model 〉

<b>심혈관계 관련연구 : 해부 및 생리가 사람과 비슷</b>
(a) 동맥경화증(atherosclerosis) - 콜레스테롤과 지방이 다량 함유된 사료 급여 - 풍선모양의 카테터로 혈관 내피세포 손상 (b) 관상동맥 협착과 경색 (c) 선천성 심장 질환 (d) 심부전(volume- and pressure-overload) (e) 전기생리학 (f) 이식 실험 (g) stents (h) interventional devices (i) 선천적 심실중격결손(VSD, ventricular septal defect) 모델: Yucatan
<b>영양학적 모델, 소화기계 모델 : 잡식성으로 소화생리가 사람과 비슷함</b>
(a) 영양소 흡수, 성장 (b) 소화기계 이동 (c) 간에서의 대사 (d) 총 비경구적 영양(total parenteral nutrition) (e) 괴사성 장결장염
<b>신장질환 : 신장유래 고혈압, 방광요관역류, 신장내역류, 요로폐쇄의 연구</b>
<b>실습용 모델 : 크기 및 해부학적 특징, 외과수술, 복강경 및 내시경 연구의 모델</b>
<b>장기 이식 연구 : 체중, 장기 크기, 해부, 생리, 면역억제제 대한 반응 등</b> - 이종이식의 공여자로 사용: 심장, 폐, 간, 신장 등 (형질전환돼지의 발달)
<b>성형외과 : 피부의 해부학적 및 생리학적 특징</b> <b>외과수술 : 태아수술, 근골격계, 중추신경계, 소화기계, 비노생식기계, 심장, 폐 등</b>
<b>기타 : 전신독성 및 피부독성, 패혈증 및 출혈성 쇼크, 면역학, 당뇨, 악성흑색종, 악성 고열증, 위궤양 등</b>

※ Ref : 최재영, (주) 샘타코

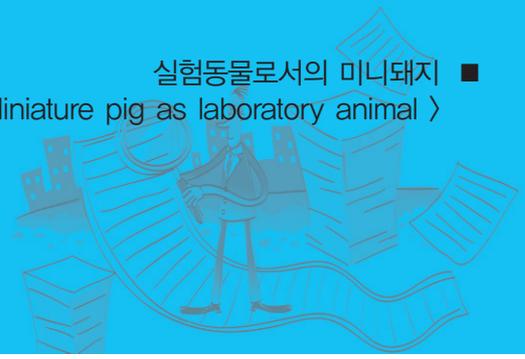
## 6.DPF SNU miniature pig

서울대학교 의과대학에서 연구용으로 유지하고 있는 SNU miniature pig는 Minnesota miniature pig를 기원으로 하며, 이종장기이식용 및 실험동물로서 적합한 Designated pathogen free 상태로 유지 중이다. 외관의 피모색은 Brown과 White-black spot이며 성체인 경우 약 80~100kg의 체중을 나타낸다.



〈 Figure 4. Appearance of SNU miniature pig in College of medicine, SNU. 〉  
A : Brown hair color and B : White and black spot color line.

Minnesota 주립대학의 Hormel 연구소에서 유지되던 Minnesota miniature pig 시설은 1973년 연구를 중단하게 되며, 시설의 운영 종료 전에 재미 한인 면역학자인 김윤범 교수가 일부 Minnesota miniature pig를 자궁적출술(hysterectomy)의 방법으로 Specific pathogen free (SPF) 상태로 확립한 뒤, 뉴욕의 Sloan Kettering Institute for Cancer Research의 miniature pig 시설에서 유지하고, 이후 1984년에 University of Health Science/The Chicago Medical School의 SPF miniature pig 시설로 옮겨 유지하였다.



30년 이상 miniature pig를 SPF 상태로 유지하면서 CMS miniature pig로 명명하고 면역학/Gnotobiotic animal 연구를 수행하였다. 2004년에 24마리의 CMS miniature pig를 김윤범 교수로부터 기증 받아서, 서울대학교 의과대학 특수생명자원센터 DPF miniature pig 시설에서 유지하고 있으며, SNU miniature pig로서 명명하였다. 

특수생명자원센터의 DPF miniature pig 시설의 운영 형태를 간단히 요약하면,

#### **Environmental control**

- Air filtering
  - inlet: ULPA (0.2 $\mu$ m, 99.9997% efficiency)
  - outlet: HEPA (0.3  $\mu$ m, 99.97% efficiency)
- Water: R/O water + chloride 2ppm, (Membrane pore size: 0.2  $\mu$ m)
- Temperature: 24 $^{\circ}$ C (23~25 $^{\circ}$ C)
- Humidity: 50% (50~60%)
- Illumination: 8:00~20:00 (12 hour/day)

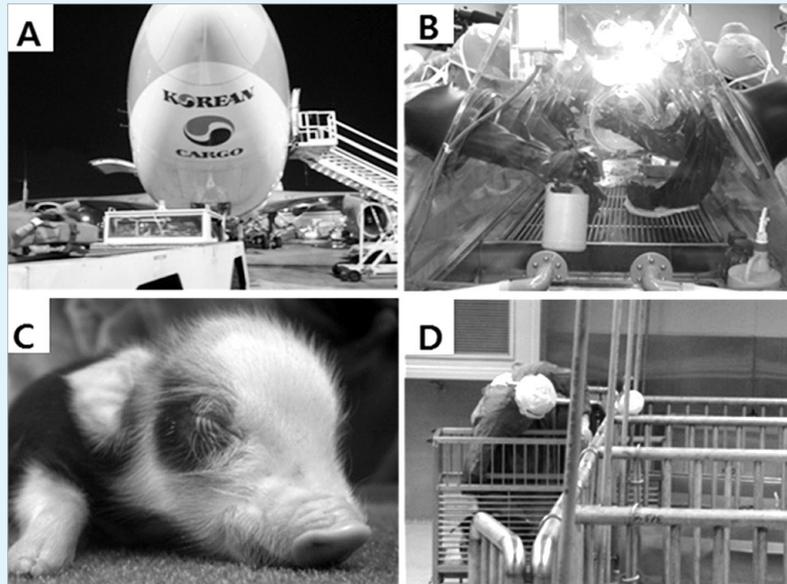
#### **Feeding**

- Irradiation 3M rad, use after microbiological test
- Commercial pig feed (Purina Korea), No mammalian materials
- 2 type feed (weaning feed, growing feed)

#### **Person**

- Miniature pig manage: 2 person, Laboratory animal technician
- Enter the facility for management: 1 time/day, everyday

**Standard operation procedure (SOP) establish: 2ndversion**

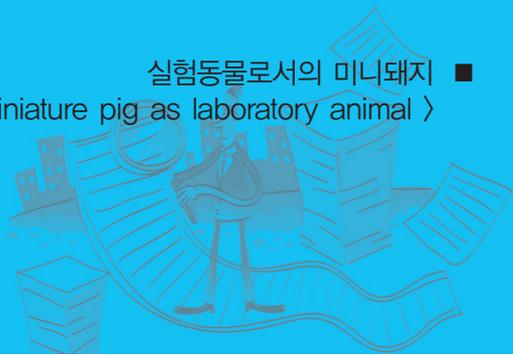


< Figure 5. SNU miniature pig in Center for Animal Resource and Development, Seoul National University. >

A) Transportation of miniature pig using the Germ free isolator and Airplain, B) Hysterectomy,  
C) SNU miniature pig in Germ free isolator and D) Barrier of miniature pig facility of CARD, SNU.

### 참고문헌

- 1) B L, ed Disease and condition of miniature pet pigs. In: care and management of miniature pet pigs. Santa Barbara, CA: Veterinary Practice Publishing company; 1993.
- 2) Cooper DK, Gollackner B, Sachs DH. Will the pig solve the transplantation backlog? Annu Rev Med. 2002;53:133-147.
- 3) Yeom SC, Park CG, Lee BC, Lee WJ. SLA typing using the PCR-SSP method and establishment of the SLA homozygote line in pedigreed SNU miniature pigs. Anim Sci J. Apr 2010;81(2):158-164.
- 4) Larsen MO, Rolin B. Use of the Gottingen minipig as a model of diabetes, with special focus on type 1 diabetes research. ILAR J. 2004;45(3):303-313.
- 5) Tetsuo Nunoya KS, Toshiki Saitoh, Hajime Yazawa, Keigo Nakamura, Yasuko Baba and Takuya Hirai. Use of Miniature pig for biomedical research, with Reference to toxicologic studies. J toxicol pathol. 2007;20:125-132.



- 6) Panepinto LM, Phillips RW, Wheeler LR, Will DH. The Yucatan miniature pig as a laboratory animal. *Lab Anim Sci*. Jun 1978;28(3):308-313.
- 7) Shulman RJ, Henning SJ, Nichols BL. The miniature pig as an animal model for the study of intestinal enzyme development. *Pediatr Res*. Mar 1988;23(3):311-315.
- 8) Misfeldt ML, Grimm DR. Sinclair miniature swine: an animal model of human melanoma. *Vet Immunol Immunopathol*. Oct 1994;43(1-3):167-175.
- 9) Oshima S, Sato H, Nagase S, Hirohashi K, Omi H. A new strain of small-sized pig originating from a Chinese breed. *Jikken Dobutsu*. 1973;22 Suppl(0):253-259.
- 10) Yabuki A, Kamimura R, Setoyama K, et al. Skin morphology of the Clawn miniature pig. *Exp Anim*. Oct 2007;56(5):369-373.
- 11) Dettmers A, Rempel WE. Minnesota's miniature pigs. *Lab Anim Care*. Feb 1968;18(1):104-109.
- 12) MS CPaS. Information Resources on Swine in Biomedical Research: USDA; 2000.
- 13) Rehbinder C, Baneux P, Forbes D, et al. FELASA recommendations for the health monitoring of breeding colonies and experimental units of cats, dogs and pigs. Report of the Federation of European Laboratory Animal Science Associations (FELASA) Working Group on Animal Health. *Lab Anim*. Jan 1998;32(1):1-17.
- 14) Onions D, Cooper DK, Alexander TJ, et al. An approach to the control of disease transmission in pig-to-human xenotransplantation. *Xenotransplantation*. May 2000;7(2):143-155.
- 15) Watrang E, McNeilly F, Allan GM, Greko C, Fossum C, Wallgren P. Exudative epidermitis and porcine circovirus-2 infection in a Swedish SPF-herd. *Vet Microbiol*. May 24 2002;86(4):281-293.
- 16) Hughes HC. Swine in cardiovascular research. *Lab Anim Sci*. Aug 1986;36(4):348-350.
- 17) Smith AC, Spinale FG, Swindle MM. Cardiac function and morphology of Hanford miniature swine and Yucatan miniature and micro swine. *Lab Anim Sci*. Jan 1990;40(1):47-50.
- 18) Reitman JS MR, and Fry DL. Yucatan miniature swine as a model for diet-induced atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 1982;43:119-132.
- 19) Crick SJ, Sheppard MN, Ho SY, Gebstein L, Anderson RH. Anatomy of the pig heart: comparisons with normal human cardiac structure. *J Anat*. Jul 1998;193 ( Pt 1):105-119.
- 20) Zhang Z, Monteiro-Riviere NA. Comparison of integrins in human skin, pig skin, and perfused skin: an in vitro skin toxicology model. *J Appl Toxicol*. Jul-Aug 1997;17(4):247-253.
- 21) Shulman RJ HS, and Nichols BL. The miniature pig as an animal model for the study of intestinal enzyme development. *Pediatr Res*. 1988;23:311-315.
- 22) Wang XM, Chen G, Chen S, et al. A novel model of pig-to-monkey kidney xenotransplantation. *Transplant Proc*. Nov-Dec 2001;33(7-8):3859.
- 23) Hering BJ, Walawalkar N. Pig-to-nonhuman primate islet xenotransplantation. *Transpl Immunol*. Jun 2009;21(2):81-86.