تأثیر تابش لیزر کم توان هلیوم نئون بر التیام نقص استخوانی جزیی در تیبیا خرگوش

سیامک بشردوست [*] ، دکتر محمد بیات [**] ، دکتر اسماعیل ابراهیمی [*]
دکتر محمد علی حسینیان [**] ، دکتر فیروز آزردگان [***] ، دکتر محمد کمالی [*]
افسانه آذری [****]

خلاصه

سابقه و هدف : با توجه به نتایج متضاد به دست آمده در ارتباط با آثار التیامی لیزر کم توان هلیوم - نئون بر التیام شکستگی ، در تحقیق حاضر اثرات تابش لیزر کم توان هلیوم نئون بر التیام نقص استخوانی جزیی استخوان تیبیا خرگوش به روش تجربی بررسی گردید.

مواد و روشها : تحقیق به روش تجربی (experimental) صورت پذیرفت و از ۳۹ خرگوش سفید نر استفاده شد. خرگوشها به طور تصادفی در گروههای شاهد و تجربی قرار گرفتند. با رعایت شرایط استریل و تحت بیهوشی عمومی برشی در پوست و فاسیای عمقی سطح داخلی استخوان تیبیا سمت چپ حیوان ایجاد کرده و با یک دریل برقی دارای مته فولادی استریل با قطر ۲ میلی‌متر نقص استخوانی جزیی تا کانال استخوانی در این سطح به وجود آمد. روز عمل جراحی روز صفر و روز بعد روز یک محسوب گردید. خرگوشهای هر یک از گروهها در سه دورهٔ ۱۴ ، ۲۱ و ۲۸ روزه قرار گرفتند، به خرگوشهای گروه تجربی لیزر کم توان هلیوم نئون با دانسیته انرژی $1/2\ J/cm^2$ به طور روزانه و روزی یک بار تابانده شد. خرگوشها در موعدهای زمانی مقرر با روش استنشاق اتر در فضای بسته کشته و کل استخوان تیبیای چپ آنها برای مطالعات بیومکانیک جدا و به وسیله دستگاه سنجش استحکام مواد ، آزمون خمش سه نقطه بر روی آن انجام گرفت و انرژی جذب شده در نقطه شکستگی و میزان تغییر شکل استخوان و استحکام ارتجاعی آن به دست آمد.

یافته‌ها : در گروه تجربی میزان افزایش استحکام ارتجاعی استخوان در روز ۲۱ ($P<0/05$) و انرژی جذب شده در نقطه شکستگی در روز ۲۸ ($P<0/05$) معنی‌دار بود. سیر افزاینده ویژگی‌های بیومکانیک در روزهای مورد بررسی مشاهده شد و نتایج مربوط به اختلاف روزهای (۱۴ و ۲۸) و (۲۱ و ۲۸) معنی‌دار بود.

نتیجه‌گیری: تابش لیزر کم توان هلیوم نئون با دانسیته انرژی $1/2\ J/cm^2$ طبق برنامه اجرا شده در تحقیق حاضر، موجب تسریع معنی‌دار التیام کال استخوانی تشکیل شده در محل نقص استخوانی جزیی تیبیا خرگوش شد.

واژگان کلیدی : لیزر کم توان هلیوم نئون ، نقص استخوانی جزیی ، بیومکانیک ، خرگوش

* دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی ایران ، دانشکده توانبخشی
** دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی شهید بهشتی
*** دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی تهران
**** دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی ایران ، جهاد دانشگاهی

مقدمه

روند التیام شکستگی استخوان در برگیرنده وقایعی با زمان‌بندی دقیق است که در نهایت منجر به بازیابی مجدد پیوستگی استخوان می‌شود. این روند با تشکیل لخته خونی شروع و با فاز التهاب و تشکیل کال ادامه می‌یابد و در انتهای آن فاز تجدید ساختار است (۱). سرعت سیر این روند آهسته است و موجب تداوم ناتوانی بیمار و در نتیجه تحمل مشکلات ناشی از شکستگی برای مدت نسبتاً طولانی می‌گردد که خسارات اقتصادی سنگینی را بر دوش جامعه و بیمار تحمیل می‌کند(۲). از این رو هدف بسیاری از برنامه‌های درمانی تسریع روند التیام شکستگی است (۳) محققان تاثیرات بیواستیمولاتوری لیزر کم توان هلیوم نئون را بررسی و نتایج مثبت تابش آن را بر روند التیام زخم پوستی در مدل‌های حیوانی وبالینی گزارش کرده‌اند (۴،۵،۶). با توجه به این نتایج مثبت ، محققان دیگری اثرات لیزر کم توان هلیوم نئون را بر تشکیل کال و روند التیام شکستگی مطالعه کرده‌اند.

Motomura و همکاران در سال ۱۹۸۴ تحریک تشکیل کال را در استخوان استئوتومی شده به وسیله تابش لیزر هلیوم نئون در استخوان ران موش صحرایی نشان دادند (۷).

Trelles و Mayayoe در سال ۱۹۸۷ کاربرد لیزر هلیوم نئون را به منظور تسریع التیام استخوان تیبیا استئوتومی شده بررسی (۳) و نتیجه تحقیق Motomura و همکاران (۷) را به اضافه افزایش عروق و شبکه ترابکولار متراکم مشاهده کردند . David و همکاران در سال ۱۹۹۶ تاثیر لیزر هلیوم نئون بر استخوان تیبیا استئوتومی شده موش صحرایی را مطالعه کردند امّا تأثیر مثبت آن بر التیام شکستگی را مشاهده ننمودند(۲). با مرور بر بررسی‌های مذکور مشخص گردید که اولاً تحقیقات کنترل شده اندکی راجع به تاثیر لیزرهای کم توان هلیوم نئون بر التیام شکستگی در مدل‌های حیوانی انجام گرفته و ثانیاً نتایج آنها با یکدیگر متفاوت است. بنابراین در تحقیق حاضر ، اثرات تابش لیزر کم توان هلیوم نئون بر روند التیام کال استخوانی تشکیل شده در محل نقص استخوانی جزیی (Partial Osteotomy) تیبیا خرگوش به وسیله ویژگی‌های بیومکانیکی : انرژی جذب شده در نقطه شکست ، میزان تغییر شکل در نقطه شکست و استحکام ارتجاعی در فاز (Elastic) و منحنی بار- تغییر شکل (Load-Deformation) مورد ارزیابی و بررسی قرار گرفت.

مواد و روشها

پژوهش حاضر به روش تجربی (experomental) صورت پذیرفت و از ۳۹ رأس خرگوش نر سفید نژاد DUTCH که در هنگام عمل جراحی حدود ۵ ماه سن و ۲ کیلوگرم وزن داشتند استفاده گردید. همه خرگوشها در یک حیوانخانه که ۱۲ ساعت روشن و ۱۲ ساعت تاریک با درجه حرارت ۲۰ تا ۲۳ درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌شدند و هر خرگوش در یک قفس انفرادی تمیز با دسترسی آزاد به آب و خوراک (کاهو و هویج) خرگوش بود . برای توزیع خرگوشها در گروه‌های شاهد و تجربی ، روش تصادفی به کار رفت. به منظور ایجاد بیهوشی عمومی از پنتازوسین (Pentazogon محصول شرکت ایتالیایی Induspharma) به میزان ۰/۵ mg/kg و دیازپام (محصول شرکت شیمی‌دارو ایران) به‌میزان ۴ mg/kg و کتامین‌هیدروکلراید(Calypsol محصول شرکت مجارستانی Gedeon Richter Budapest) به میزان ۵۰ mg/kg که به صورت داخل عضلانی تحت شرایط استریل تزریق می‌شدند، استفاده گردید. در حین عمل جراحی در صورت

نیاز بیهوشی با اتر ادامه می‌یافت. هم چنین برای جلوگیری از بروز عفونت ، آنتی‌بیوتیک درمانی به دو شیوه عمومی و موضعی انجام می‌گرفت . در شیوه عمومی پنی‌سیلین G با پروکایین ۸۰۰۰۰۰ (تولید شرکت جابربن حیان) به میزان ۴۰۰۰۰ Unit/Kg به صورت داخل عضلانی روز قبل از عمل جراحی و حین آن تزریق می‌شد و در شیوه موضعی در محل برش پوست، پماد جنتامایسین (محصول شرکت تولیداروی ایران) در حین پانسمان به کار می‌رفت. خرگوش بیهوش را از پشت بر روی تخت جراحی قرار داده و اندامهای حرکتی‌اش را به وسیله ریسمان از چهار طرف به میخ‌های چهارگوشه تخت جراحی ثابت کرده و در شرایط استریل برشی به طول ۲ سانتی‌متر به وسیله تیغ بیستوری نمره ۱۸ در پوست و فاسیای عمقی قسمت میانی سطح داخلی استخوان تیبیا سمت چپ حیوان ایجادکرده و با یک مته فولادی استریل به قطر ۲ میلی‌متر که به یک دریل برقی وصل بود نقص استخوانی جزیی (Partial Osteotomy) به شکل Hole و Dental تا عمق کانال استخوانی در وسط سطح داخلی استخوان ، ۴/۵ سانتی‌متر پایین‌تر از توبرزیته تیبیا ایجاد گردید. محل نقص به وسیله واکس استخوانی (Bone Wax) (محصول شرکت آلمانی Braun Melsungen) پر شد. سپس فاسیای عمقی با نخ جذبی Catgut 3/0 (ساخت شرکت آلمانی Braun) وپوست با نخ سیلک Curvedreversecutting 3/0 (ساخت شرکت سوپا ایران) به روش بخیه غیرپیوسته دوخته شد . محل جراحی پانسمان و روز عمل جراحی روز صفر محسوب می‌گردید. پانسمان‌ها روزانه تا روز ۱۴ تعویض و بخیه‌ها روز ۷ کشیده می‌شدند. خرگوشهای هر دو گروه در سه دوره روزهای ۱۴ ، ۲۱ و ۲۸ قرار گرفتند . در خرگوشهای گروه تجربی از روز یک پرتو لیزر کم توان هلیوم نئون با دانسیته انرژی $1/2\ J/cm^2$ با تکنیک GRID به هر یک از دو مربع یک سانتی‌متر مربعی پوشاننده نقص استخوانی و ناحیه مجاور و از نزدیک سطح پوست به طور روزانه و یک بار در روز تابیده می‌شد. دستگاه لیزر (IR-2000 و ساخت سازمان انرژی اتمی ایران) قبل از شروع تابش‌ها کالیبره گردید. خرگوشها در موعدهای زمانی مقرر به روش استنشاق اتر در فضای بسته کشته شدند و بلافاصله استخوان‌های تیبیا برای مطالعات بیومکانیک خمش سه نقطه (Three Point Bending) جدا می‌گردیدند و به وسیله دستگاه آلمانی سنجش استحکام مواد (Zwick 1494 Universal Testing Machine) ارزیابی می‌شدند. نمونه‌ها به طور آزاد روی دو پایه ثابت دستگاه مستقرو سرعت حرکت بازوی متحرک ۱۰ mm/min تعیین می‌گردید. اعمال نیرو به وسیله بازوی متحرک تا زمان شکسته شدن استخوان ادامه می‌یافت و انرژی جذبی (N/m^2) توسط استخوان تا نقطه شکستگی ، میزان تغییر شکل تا نقطه فوق (میلی‌متر) و منحنی بار- تغییر شکل به وسیله دستگاه مشخص می‌گردیدند و استحکام ارتجاعی استخوان به روش زیر به دست می‌آمد: خط مستقیمی از قسمت خطی (Linera Region) منحنی بار- تغییر شکل گذرانده و امتداد آن محور افقی منحنی‌راقطع‌می‌کرد، تانژانت این زاویه معرف استحکام ارتجاعی‌نمونه‌درفاز ارتجاعی‌منحنی بود.داده‌های هر یک از گروهها در سه روز مورد قضاوت آماری قرار گرفت و $P<0/05$ معنی دار تلقی شد.

یافته‌ها

طی دوره درمان در هیچ یک از زخمها ترشح و تورم مشاهده نگردید و دو راس از خرگوشها در حین تحقیق و پیش از رسیدن به موعد نمونه‌برداری از بین

رفتند.

در جدول (۱) میانگین و خطای معیار ویژگی‌های بیومکانیک گروههای شاهد و تجربی در روزهای مورد بررسی درج شده است و همان گونه که مشاهده می‌گردد در گروه تجربی افزایش مقادیر استحکام ارتجاعی استخوان تیبیا در روز ۲۱ ($P< ۰/۰۵$) و انرژی جذب شده در نقطه شکستگی در روز ۲۸ ($P< ۰/۰۵$) نسبت به گروه شاهد معنی‌دار است.

در گروه شاهد میزان انرژی جذب شده استخوان بین روزهای مورد بررسی معنی دار بود ($P< ۰/۰۵$) و این اختلاف بین روزهای (۱۴ و ۲۱) و (۲۱ و ۲۸) وجود داشت ومطالعه دقیق نتایج نشان می‌دهد ظرفیت جذب انرژی در روز ۲۱ کاهش و در روز ۲۸ افزایش یافته است. در گروه تجربی هم میزان انرژی جذب گردیده بین روزهای مورد بررسی معنی‌دار بود ($P< ۰/۰۵$) و این اختلاف بین روزهای (۱۴ و ۲۸) و (۲۱ و ۲۸) دیده شد که نشان دهنده سیر افزاینده ظرفیت جذب انرژی در استخوان‌های تیبیا تحت تابش لیزر است.

در هر دو گروه شاهد و تجربی میزان تغییرات استحکام ارتجاعی بین روزهای مورد بررسی معنی‌دار بود ($P< ۰/۰۰۱$) و این اختلاف بین روزهای (۱۴ و ۲۱) و (۲۱ و ۲۸) وجود داشت.

در گروه شاهد اختلاف معنی دار بین میزان تغییر شکل استخوان در روزهای مورد بررسی مشاهده نگردید. در گروه تجربی میزان تغییر شکل استخوان در روزهای مورد بررسی معنی‌دار بود ($P< ۰/۰۵$) و این اختلاف بین روزهای (۱۴ و ۲۸) و (۲۱ و ۲۸) وجود داشت که نشان دهنده سیر افزاینده میزان تغییر شکل استخوان تیبیا تحت تابش لیزر است.

جدول ۱ـ میانگین و خطای معیار ویژگی‌های بیومکانیک استخوان تیبیا خرگوش دراثر تابش لیزر کم توان هلیوم نئون و گروه شاهد آنها

روزهای مورد بررسی		۱۴	۲۱	۲۸
شاخص‌ها / گروهها / ویژگی‌های بیومکانیک		$\bar{X}\pm SD$	$\bar{X}\pm SD$	$\bar{X}\pm SD$
انرژی جذب شده در نقطه شکستگی	شاهد (n=۶)	۰/۲۸±۰/۰۳	۰/۱۷±۰/۰۱	۰/۲۷±۰/۰۳
	تجربی (n=۷)	۰/۲۸±۰/۰۶	۰/۲۷±۰/۰۵*	۰/۴۸±۰/۰۱ (n=۵)*
استحکام ارتجاعی	شاهد (n=۶)	۲/۳±۰/۱۳	۱/۸±۰/۲۸	۶/۹±۱/۰۵
	تجربی (n=۷)	۲/۵±۰/۲۷*	۳/۱±۰/۳۱*	۹±۱/۳ (n=۵)*
میزان تغییر شکل در نقطه شکستگی	شاهد (n=۶)	۱/۳±۰/۱۳	۱/۴±۰/۰۶	۱/۷±۰/۱۴
	تجربی (n=۷)	۱/۳±۰/۰۷*	۱/۴±۰/۱۶*	۲±۰/۰۵ (n=۵)*

بحث

در تحقیق حاضر تابش لیزر کم توان هلیوم نئون با دانسیته انرژی $1/2\ J/cm^2$ موجب افزایش معنی‌دار آماری استحکام ارتجاعی استخوان تیبیا با نقص استخوانی

جزیی در روز ۲۱ و انرژی جذب شده آن در نقطه شکستگی در روز ۲۸ شد. هم چنین تابش لیزر موجب گردید افزایش انرژی جذب شده استخوان در نقطه شکستگی در روز ۲۸ نسبت به روزهای ۱۴ و ۲۱ از نظر آماری معنی‌دار باشد. مفهوم این تغییرات تسریع روند التیام کال استخوانی تشکیل شده در محل نقص استخوانی جزیی تیبیا خرگوش تحت تابش لیزر می‌باشد.

نتایج این تحقیق با یافته‌های Trelles و Mayayo در سال ۱۹۸۷ (۳) ، Motomura در سال ۱۹۸۴ (۷) و Yamada در سال ۱۹۹۱ (۸) هم سویی دارد ولی با یافته‌های David در سال ۱۹۹۶ (۲) مغایرت دارد. با بررسی روشهای به کار رفته در تحقیق آخر نکات قابل توجه زیر مشاهده می‌شود که ممکن است توجیه کننده این مغایرت باشد :

روش استئوتومی به وسیله اره انجام گرفته است که اولاً امکان صدمه نسج نرم اطراف وجود دارد و ثانیاً احتمالاً ضایعه ایجاد شده در استخوان با این روش در نمونه‌های مختلف یکسان نبوده است و بنابراین روش استئوتومی به عنوان متغیر مداخله گر محسوب می‌گردد.

ایجاد همزمان استئوتومی در هر دو استخوان‌های تیبیا به اضافه جراحات بافت نرم همراه و سایر صدمات ناشی از عمل جراحی، حیوان و ظرفیت‌های بیولوژی‌اش را شدیداً تحت تاثیر قرار داده ، زندگی طبیعی‌اش را مختل کرده که جبران آن بسیار مشکل خواهد بود(۹). علاوه بر آن مصرف انرژی ناشی از فعالیت روزمره حیوان را هم باید مد نظر قرار داد که در مجموع می‌تواند منجر به ضعف بدنی شدید حیوان شده و روند التیام را با کندی مواجه نماید. در همین خصوص عدم اشاره محققین به تغییرات وزن موشهای صحرایی در قبل از عمل جراحی و به هنگام نمونه‌برداری احتمال وقوع این گمان را تشدید می‌کند.

ثابت کردن داخلی شکستگی با سیم‌های Kirschner که از کانال استخوانی رد می‌شدند متغیر مداخله‌گر محسوب می‌گردد که احتمالاً بر نتایج تحقیق تاثیر گذاشته‌اند.

معیارهای ارزیابی بافت شناسی و پرتوشناسی تحقیق فوق توصیفی بوده و بنابراین دقیق نمی‌باشند و روش ارزیابی بیومکانیک چهار نقطه‌ای هر چند یک روش کمی و دقیق می‌باشد به خاطر کوچکی استخوان تیبیا موش صحرایی، درستی انجام ارزیابی بیومکانیک به صورت عملی را با علامت سوال مواجه می‌سازد و با توجه به لزوم خارج ساختن ثابت کننده‌های داخلی از کانال استخوانی پیش از انجام آزمون، دستکاری استخوان به منظور خارج ساختن آنها اجتناب ناپذیر خواهد بود و این امر مداخله دیگری در تحقیق محسوب می‌شود که تاثیر منفی بر محل شکستگی و آزمون بیومکانیک خواهد داشت.

آزمون خمش زمانی درست است که استخوان توسط دو بازوی نگه دارنده به طور آزاد حمایت گردد و آنگاه یک یا دو نیروی فشارنده با سرعت ثابت بر روی استخوان عمل کند(۱۰) ، در حالی که در آزمون‌های بیومکانیک تحقیق David و همکاران (۲) این نکات رعایت نشده است و با توجه به این که معیارهای دیگر تحقیق توصیفی بوده‌اند به نظر می‌رسد با ملاحظه مجموع دلایل فوق، نتایج حاصل از این تحقیق (۲) دقیق و معتبر نمی‌باشند.

علل افزایش معنی‌دار استحکام ارتجاعی استخوان در روز ۲۱ بررسی حاضر و میزان انرژی جذبی آن در نقطه شکستگی در روز ۲۸ درگروه تجربی می‌تواند به دلایل زیر باشد :

در ناحیه شکستگی تورم و اتساع واضح عروق و

افزایش لوکوسیت‌ها وجود دارد و به دنبال تابش لیزر به خاطر تحریک گردش خون ، ادم جذب می‌گردد که این امر به شروع زودتر سنتز استخوان کمک می‌کند (۳). تابش لیزر موجب افزایش سطح پروستاگلاندین E2 و قوام کال استخوانی می‌گردد(۳) که با نتایج تحقیق دیگری (۷) در زمینه تاثیر لیزر کم توان هلیوم نئون‌بر کال استخوانی هماهنگی دارد. در محل شکستگی در استخوانهای تحت تابش لیزر بافت رشته‌ای همبند مشخص وجود دارد و درون این بافت استئوبلاستهای واضح و استئوسیتهای درون استئویید قرار دارند(۳)، در حالی که در استخوانهای گروه شاهد عروق اندک در بافت غضروفی مشاهده می‌شود و بیانگرآن است در حیواناتی‌که تحت تابش لیزر نبوده‌اند، روند التیام شکستگی (در مقایسه با گروه لیزر) در مراحل اولیه آن یعنی فاز رشته‌ای (غضروفی) قرار دارد(۳). از طرف دیگر، این حقیقت که استئوسیتهای حیوانات تحت تابش در مجرای هاورس قرار دارند نشان دهنده تشکیل بافت استخوانی می‌باشد. به عبارت دیگر، در این حیوانات بافت استخوانی با قوام تشکیل شده است (۳). تابش لیزرکم توان هلیوم نئون بر سلولهای استئوبلاستیک در محیط کشت موجب افزایش سنتز DNA و رشد سلول در فاز رشد و تجمع کلسیم در طی فاز طولانی تابش گردید. مطالعه با میکروسکوپ الکترونی تمایل به افزایش ابعاد دستگاه گلژی را آشکار می‌سازد(۸). به نظر می‌رسد پرتو لیزر به وسیله ایجاد عروق و عوامل ضد التهابی بیشتر امکان فعالیت بیشتر استئوبلاستها را فراهم می‌کند و مکانیسم‌های اثر پرتو لیزر در التیام شکستگی فقط بر روی استئوبلاستها نیست بلکه ایجاد زمینه و شرایط محیطی مناسبی است که التیام شکستگی را تسریع می‌کند.

کاربرد لیزر کم توان هلیوم نئون با دانسیته انرژی ۱/۲ J/cm^2 و طبق برنامه اجرا گردیده در تحقیق حاضر موجب تسریع معنی‌دار التیام کال استخوانی تشکیل شده در محل نقص استخوانی جزیی (Partialosteotomy) استخوان تیبیا خرگوش گردید.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله نگارندگان این مقاله از مسئولین و کارکنان گرامی گروه پژوهشی فیزیوتراپی جهاد دانشگاهی علوم پزشکی ایران و آن جهاد محترم که بودجه این تحقیق را تامین و در حین اجرای آن مساعدت فراوان به عمل آوردند ، تشکر و قدردانی می‌نمایند.

References:

1. Buck Wlaker JA. Cruess RL., Healing of the musculoskeletal tissues. In: Rockwood CA (Ed). and Green's Fracture in Adults. 3rd ed., Philadelphia: Lippincott; 1991: 181-222.
2. David R. Nissan M. Cohen I. Soudry M., Effect of low power He-Ne laser on fracture healing in rats, Lasers Surg Med. 1996; 19: 458-461.
3. Trelles MA. Mayayo E., Bone fracture consolidates faster with low power laser,. Laser Surg Med. 1987; 7: 36-45.

4. Mester E. Spiry T., Effect of laser rays on wound healing, Am J Surg. 1971; 122: 532-535.

5. Mester E. Ludany G., Experimental and clinical observations with laser, Panminerva Med. 1971; 13: 538-543.

6. Mester E. Jaszsagi Nagy E., The effects of laser radiation in wound healing and collagen synthesis, Stud Biophys. 1973; 35: 227-230.

7.Motomura K. Nakajima M. Ihara A. Atsum K., Effect of laser irradiation on callus formation after ostetomy, Nipon Reza Igakkai shi. 1984; 4: 195-196).

8. Yamada K., Biological effects of low power laser irradiation on clonal osteoblastic cell (CMC 3T3-E1), J Jpn Orthopaed Assoc. 1991; 65: 101-111.

9. Greenbaum MA. Kanta IO., Current concepts in bone healing: Review of literature, J Am Podiatr Med Associ. 1993; 83: 123-129.

10. Nordin M. Frankel HV., Basic mechanics of the musculoskeletal system, 2ed. Philadelphia: Lea & Febiger; 1989: 3-29.