

بررسی اثر اولتراسوند درمانی بر ایجاد ناهنجاریهای کروموزومی در لنفوسیت‌های خون محیطی انسان

اسماعیل پسیانیان^۱، علی موفقی^۲، دکتر عبدالناصر رفیع^۳، دکتر محمدعلی حسین پور فیضی^۴

^۱نویسنده مسئول، مربی گروه رادیولوژی دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز E-Mail: i.pesianian@yahoo.com

^۲کارشناس ارشد فیزیک پزشکی بیمارستان امام خمینی تبریز ^۳استاد گروه علوم آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی تبریز ^۴استاد گروه بیولوژی دانشگاه تبریز

چکیده

زمینه و هدف: امواج اولتراسوند به منظور کاربردهای درمانی در فیزیوتراپی بصورت گسترده مورد استفاده قرار می‌گیرند. اثرات درمانی امواج اولتراسوند اغلب ناشی از افزایش دما در بافتهای تحت تابش می‌باشد. هر چند اثرات غیرحرارتی مانند کاویتاسیون هم اهمیت درمانی دارند. مقدار حرارت ایجاد شده به شدت و فرکانس امواج اولتراسوند بستگی دارد. این مطالعه به منظور بررسی اثر تغییرات شدت و فرکانس اولتراسوند درمانی بر ناهنجاریهای کروموزومی لنفوسیت‌های خون محیطی انسان انجام شد.

روش کار: این پژوهش یک مطالعه طولی و نیمه تجربی بوده که به صورت قبل و بعد از درمان و در شرایط *in vivo* انجام گردید. در این مطالعه تعداد ۲۰ نفر از بین بیماران مراجعه کننده به بخش فیزیوتراپی به صورت غیرتصادفی وارد مطالعه شدند. نمونه‌های مورد مطالعه از خون محیطی در چهار مرحله به ترتیب قبل از درمان، انتهای جلسه پنجم درمان، انتهای جلسه دهم درمان و یک هفته بعد از پایان درمان تهیه شدند. درمان توسط امواج اولتراسوند در شدت و فرکانسهای متفاوت انجام گرفت و نتایج قبل از درمان با سه مرحله بعد از آن مقایسه گردید. نتایج از طریق آزمونهای آماری ویلکاکسون و فریدمن مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

یافته‌ها: میانگین درصد کل ناهنجاری کروموزومی در مرحله اول قبل از تابش ۰/۴۵٪ بود که در مقایسه با مرحله دوم بعد از تابش به ۱/۶۲٪ ($p=0/02$)، در مرحله سوم به ۳/۲۳٪ ($p=0/008$) و در چهارمین مرحله به ۱/۵۹٪ ($p=0/03$) رسید. افزایش معنی دار بین فراوانی ناهنجاریهای کروموزومی با افزایش شدت اولتراسوند مشاهده شد ($p=0/002$).

نتیجه گیری: تابش امواج اولتراسوند درمانی با شدتهای بالا موجب افزایش در فراوانی ناهنجاریهای کروموزومی لنفوسیت‌های خون محیطی افراد تحت تابش می‌شود، ولی افزایش فرکانس این پرتوها تأثیر قابل ملاحظه‌ای در ناهنجاریهای کروموزومی نمونه‌های مورد مطالعه ندارد.

واژه‌های کلیدی: اولتراسوند درمانی، ناهنجاریهای کروموزومی، لنفوسیت‌های خون محیطی

پذیرش: ۸۶/۷/۸

دریافت: ۸۵/۱۰/۷

مقدمه

شکستگیها هم مورد استفاده قرار می‌گیرند [۵]. امواج اولتراسوند درمانی توانایی ایجاد حرارت جهت اثرات درمانی را دارند [۲].

هیپرترمی اولتراسوند یکی از روش‌های درمانی معمول در درمان بیماری‌هایی از قبیل کشش لیگامانها، تاندونیت، دردهای عضلانی، ورم و التهاب مفاصل است [۱ و ۲]. این پرتوها اخیراً در درمان آسیبهای عضلانی [۳]، ترومبولیزیس [۴] و جهت افزایش سرعت بهبود

در مطالعات مشابه دیگری رابطه افزایش فراوانی ناهنجاریهای کروموزومی با افزایش شدت امواج اولتراسوند نشان داده شده است [۱۵، ۱۶]. با توجه به اینکه تمام این مطالعات در شرایط آزمایشگاهی انجام یافته اند لذا این پژوهش جهت بررسی اثر امواج اولتراسوند درمانی با شدت و فرکانس متغیر، بر فراوانی ناهنجاریهای احتمالی کروموزومی لنفوسیت‌های خون محیطی انسان به صورت *in vivo* انجام گردید.

روش کار

این مطالعه از نوع طولی و نیمه تجربی است و به صورت قبل و بعد از اولتراسوند انجام شده است. در این پژوهش تعداد ۲۰ نفر از بین بیمارانی که جهت درمان با اولتراسوند به مرکز، فیزیوتراپی شهید چمران تبریز مراجعه کرده بودند، انتخاب شدند. شرایط شرکت در مطالعه نداشتن اعتیاد به سیگار و عدم کار با مواد پرتوزا یا امواج یونیزان بود [۱۷].

تمامی شرکت کنندگان در مطالعه بجز دو مورد که رادیوگرافی سینه داشتند، در طول یک سال گذشته، رادیوگرافی انجام نداده بودند. دستگاه اولتراسوند درمانی مورد استفاده مارک Phyaction ساخت هلند بود که شدت امواج خروجی آن از صفر تا ۳ وات بر سانتی متر مربع و فرکانس قابل استفاده بین ۱ تا ۳ مگا هرتز، مدت زمان تابش تا ۳۰ دقیقه و در دو حالت پیوسته و پالسی قابل تنظیم بود. میانگین سنی بیماران 36 ± 7 سال بود. ۵۵٪ از بیماران مرد و ۴۵٪ زن بودند. ۷۵٪ از بیماران با فرکانس ۱ مگا هرتز و ۲۵٪ با فرکانس ۳ مگا هرتز تحت درمان قرار گرفتند. میانگین فرکانس مورد استفاده $1/5 \pm 0/88$ مگا هرتز بود.

حداقل و حداکثر شدت تابش اولتراسوند به نواحی تحت درمان به ترتیب ۰/۵ تا ۲ وات بر سانتی مترمربع و میانگین شدت اعمال شده $0/53 \pm 1/2$ وات بر سانتی مترمربع بود. ناحیه مورد درمان در ۱۰ نفر از بیماران (۵۰٪) مفصل شانه، در چهار نفر (۲۰٪) مفصل آرنج، در ۲ نفر (۱۰٪) مفصل مچ دست و در ۴ نفر (۲۰٪) منطقه فقرات کمری بود.

در سال ۱۹۸۷ دایسون^۱ اظهار داشت که برای درمان بافت از طریق ایجاد حرارت، لازم است دمای آن از ۴۰ به ۴۵ درجه سانتی گراد حداقل به مدت ۵ دقیقه افزایش یابد [۲].

مطالعات نشان داده اند که امواج اولتراسوند با شدت ۱ وات بر سانتی متر مربع و فرکانس ۱ مگا هرتز منجر به افزایش دمای بافت به میزان ۰/۸۶ درجه سانتی گراد بر دقیقه می گردد [۶].

اشتون^۲ و چان^۳ برای اندازه گیری مستقیم میزان افزایش دما در حین تابش امواج اولتراسوند درمانی، با قرار دادن ترمیستورهای مختلف تا عمق ۵ سانتی متری بافت در مدت زمان ۱۰ دقیقه با فرکانس ۱ و ۳ مگا هرتز، دمای عضله را در عمقهای مختلف اندازه گیری نمودند [۸، ۷].

این مطالعات نشان دادند که افزایش دمای بافت با فرکانس و شدت امواج اولتراسوند رابطه مستقیم دارد [۹].

شواهدی موجود است که فرآیندهای مکانیکی غیرحرارتی مثل فشار صوتی و کاونتاسیون هم اهمیت درمانی دارند، به طوری که فشارهای مکانیکی ایجاد شده توسط امواج اولتراسوند منجر به حرکت یک سوپه مایعات در اطراف و امتداد غشای سلولی می شوند [۱۰].

اغلب مطالعات انجام یافته در مورد اثرات امواج اولتراسوند بر لنفوسیت‌های خون محیطی انسان به صورت آزمایشگاهی (*in vitro*) و بر میزان وقوع تبادل کروماتید خواهری متمرکز بوده است [۱۱، ۱۲] و تنها تعداد اندکی از مطالعات به بررسی اثر امواج اولتراسوند بر ناهنجاریهای کروموزومی پرداخته اند. در مطالعات انجام شده توسط مکینتاش^۴ و استوارت^۵ شواهدی مبنی بر افزایش ناهنجاریهای کروموزومی در اثر تابش اولتراسوند گزارش گردید [۱۳، ۱۴].

¹ Dyson

² Astoh DF

³ Chan AK

⁴ Macintosh

⁵ Stewart

حلقوی مورد بررسی قرار گرفتند [۲۰]. از آزمون های آماری ویلکاکسون، فریدمن و نرم افزار SPSS برای آنالیز داده ها استفاده شد.

یافته ها

در این مطالعه تعداد ۲۲۳۸ سلول متافازی در مرحله اول، ۲۳۶۵ در مرحله دوم، ۲۲۳۹ در مرحله سوم و ۲۱۷۸ سلول در مرحله چهارم قرار داشتند. اختلاف آماری معنی داری بین تعداد سلولهای مورد مطالعه در چهار مرحله وجود نداشت ($p=0/90$).

در بررسی انواع ناهنجاریهای کروموزومی در مراحل دوم و سوم در حین درمان، قطعه فاقد سانترومر به ترتیب با ۰/۷۶ و ۱/۲۵٪، شکاف جفت کروماتیدی با ۰/۴ و ۱/۱۹٪، کروموزوم حلقوی با ۰/۲۳ و ۰/۶۷٪ بیشترین ناهنجاری کروموزومی را به خود اختصاص دادند (جدول ۱).

آزمون آماری، میانگین درصد کل ناهنجاری کروموزومی در مرحله اول قبل از تابش را ۰/۴۵٪ نشان داد که در انتهای جلسه پنجم درمان به ۱/۶۲٪ ($p=0/02$)، در انتهای جلسه دهم درمان به ۳/۲۳٪ ($p=0/008$) و یک هفته بعد از پایان درمان به ۱/۵۹٪ ($p=0/003$) رسید (نمودار ۱).

مقایسه تغییرات شدت امواج اولتراسوند با فراوانی ناهنجاری کروموزومی از نظر آماری تفاوت معنی داری داشت ($p=0/002$) ولی تغییرات فرکانس امواج اولتراسوند در مقایسه با فراوانی ناهنجاریهای کروموزومی بجز در مورد کروموزوم حلقوی ($p=0/003$) معنی دار نبود ($p>0/05$).

نمودار ۲ رابطه بین شدت اولتراسوند درمانی و میانگین درصد ناهنجاریهای کروموزومی را نشان می دهد.

در بررسی رابطه بین جنسیت بیماران و کل ناهنجاریهای کروموزومی بعد از انجام تابش اختلاف آماری معنی داری مشاهده نگردید ($p>0/05$).

مدت زمان درمان طبق پروتکل درمان در هر جلسه ۶ دقیقه بود. نمونه ها در چهار مرحله تهیه شدند. مرحله اول نمونه گیری قبل از شروع درمان جهت تعیین درصد ناهنجاریهای کروموزومی زمینه انجام گرفت. مرحله دوم نمونه گیری انتهای جلسه پنجم، مرحله سوم در انتهای جلسه دهم درمان و مرحله چهارم یک هفته بعد از پایان درمان تهیه شدند. نمونه ها از خون محیطی کامل بیماران از ناحیه آنته کوبیتال به حجم ۱ میلی لیتر در شرایط استریل تهیه شده و در حین خون گیری جهت جلوگیری از لخته شدن، هپارینه شده و به فاصله کوتاهی در شرایط ویژه کشت داده شدند [۱۸].

روش کشت نمونه ها به صورت میکروکالچر و تکنیک کشت گیمسا بود. کشت نمونه ها در آزمایشگاه بیولوژی دانشگاه تبریز انجام گردید. به اختصار، از محیط کشت پایه از نوع F-10(HAM) با مارک GIBCO/BRL استفاده شده و مقدار ۲۰ میلی لیتر سرم تازه گوساله با همان مارک و نیز مقدار ۱ میلی لیتر فیتوهماکلوتینین به عنوان میتوزن و آنتی بیوتیک (پنی سیلین و استرپتومایسین) به ازای هر ۱۰۰ میلی لیتر محیط کشت به آن افزوده شد [۱۹].

برای پیشگیری از آلودگی، تقسیم بندی نمونه ها در زیر دستگاه لامینارفلو انجام گرفت. بعد از افزودن ۶ قطره خون کامل به هر ویال، محیط کشتهای حاوی نمونه به درون انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۷۲ ساعت منتقل شدند.

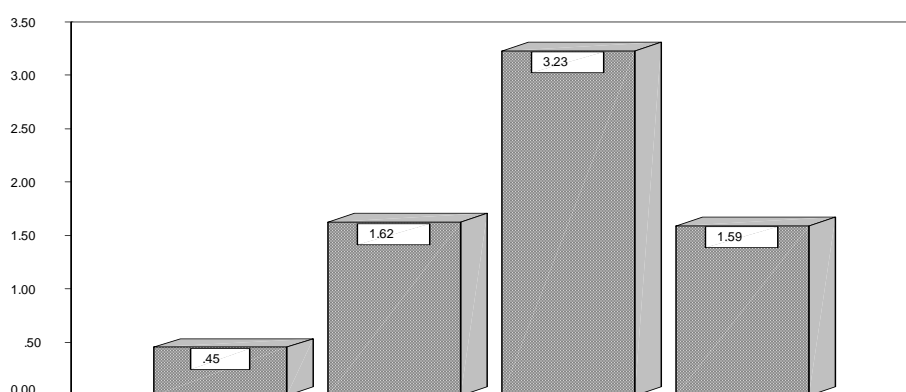
در پایان ساعت هفتاد، مقدار ۰/۲ میلی لیتر کلشیسین با غلظت ۱۰ میکروگرم در لیتر جهت توقف تقسیم سلولی در مرحله متافاز به هر محیط کشت افزوده شد. جهت فیکسه کردن نمونه ها از محلول استیک متانول (۱:۳) استفاده گردید [۱۸].

سلولهای فیکسه شده پس از همزدن، از ارتفاع ۳۰ سانتی متری بر روی لامهای کددار و تمیز و بدون چربی چکانده شدند. برای رنگ آمیزی از محلول گیمسای ۱۰٪ مرک استفاده گردید. فقط ناهنجاریهای ساختمانی از قبیل شکاف جفت کروماتیدی، قطعه فاقد سانترومر، کروموزوم دو سانترومری و کروموزوم

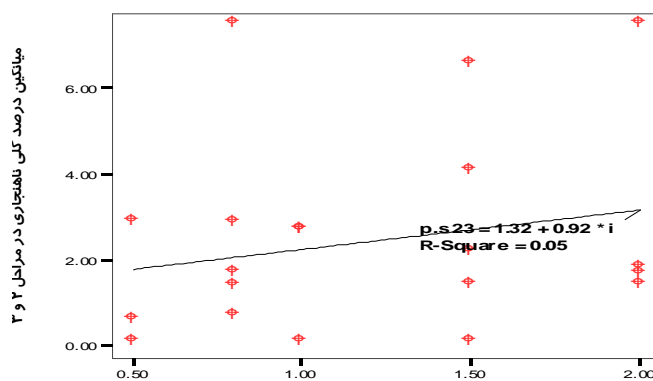
جدول ۱. میانگین درصد ناهنجاریهای کروموزومی به تفکیک نوع ناهنجاری

مرحله نمونه گیری	شکاف جفت کروماتیدی خطای معیار میانگین	قطعه فاقد سانترومر خطای معیار میانگین	کروموزوم دوسانترمری خطای معیار میانگین	کروموزوم حلقوی خطای معیار میانگین	P value
اول	۰/۱۳±۰/۰۸	۰/۱۴±۰/۰۷	۰/۱۱±۰/۰۱	۰/۰۸±۰/۰۷	—
دوم	۰/۴±۰/۱۷	۰/۷۶±۰/۲۳	.	۰/۲۳±۰/۰۹	۰/۰۲*
سوم	۱/۱۹±۰/۵۷	۱/۲۵±۰/۶۴	.	۰/۶۷±۰/۳۹	۰/۰۰۸**
چهارم	۰/۴۳±۰/۴۲	۰/۵۲±۰/۲۰	۰/۱۷±۰/۱۴	۰/۴۷±۰/۲۲	۰/۰۳***

* مقایسه مرحله اول قبل از تابش با مرحله دوم پس از تابش
** مقایسه مرحله اول قبل از تابش با مرحله سوم پس از تابش
*** مقایسه مرحله اول قبل از تابش با مرحله چهارم پس از تابش



نمودار ۱: مقایسه میانگین درصد کل ناهنجاری کروموزومی در چهار مرحله نمونه گیری



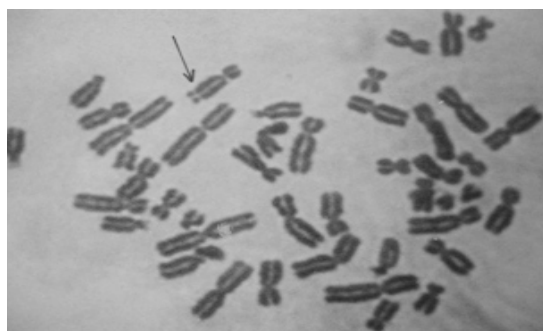
نمودار ۲: رابطه شدت آلتراساند درمانی با میانگین درصد کل ناهنجاریهای کروموزومی در مرحله دوم و سوم در حین درمان

بحث

شدت امواج اولتراسوند باعث افزایش درصد ناهنجاریهای کروموزومی در مقایسه با گروه کنترل می شود. افزایش ناهنجاریهای کروموزومی از شدت ۸ میلی وات بر سانتی متر مربع و با فرکانس ثابت ۲ مگاهرتز شروع و با افزایش شدت پرتوها افزایش می

در مطالعه انجام شده توسط مکینتاش و همکاران تغییرات شدت امواج اولتراسوند بر ناهنجاری های کروموزومی در شرایط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه نشان داده شد که افزایش

از نوع قطعه فاقد سانترومر و شکاف جفت کروماتیدی بودند [۲۳].



شکل ۱. گسترش متافازی دارای ناهنجاری کروموزومی از نوع شکاف جفت کروماتیدی مربوط به بیمار شماره ۵

نتیجه گیری

نتایج مطالعه حاضر هر چند با شدت حداکثر ۲ وات بر سانتی متر مربع انجام شده ولی مؤید افزایش معنی دار در ناهنجاریهای کروموزومی افراد تحت تابش با امواج اولتراسوند درمانی است. همچنین ارتباط معنی داری بین شدت پرتوها و ناهنجاریهای کروموزومی وجود داشت که نتایج مطالعات قبلی را تایید می نماید ($p=0/002$) ولی بین تغییرات فرکانسی امواج اولتراسوند و میزان وقوع ناهنجاریهای کروموزومی رابطه معنی داری مشاهده نشد ($p>0/05$). هر چند امواج اولتراسوند مانند سایر امواج یونیزان خطرناک نیستند و اگر چه بررسی این موضوع که ناهنجاریهای کروموزومی مشاهده شده در مطالعه حاضر موثران هستند یا نه به مطالعات بیشتری نیاز دارد، با این وجود، اطلاعات بسیار کمتری از اثرات تابشهای طولانی مدت امواج اولتراسوند بر بیماران و کارکنان مراکز فوق در دست است.

پیشنهادات

لازم است فیزیوتراپی توسط افراد ورزیده با تحصیلات آکادمیک صورت گرفته و از محدوده شدتهای درمانی بیشتر از ۲ وات بر سانتی متر مربع و زمانهای تابش طولانی تر از پروتکل های درمانی توصیه شده در منابع استفاده نگردد.

یافت [۱۶]. در مطالعه دیگری در سال ۱۹۹۶ در آمریکا، ناهنجاریهای کروموزومی در اثر تابش امواج اولتراسوند درمانی و کاهش دوکهای میتوزی گزارش گردید [۲۱]. در مطالعه حاضر چون لنفوسیتها فاقد فعالیت تقسیمی بوده و در مرحله G0 انتر فاز متوقف می شوند، لذا در این مرحله مولکولهای DNA تک رشته ای بوده و همانند سازی نکرده اند. پس ممکن است هر گونه آسیب ایجاد شده در صورت عدم ترمیم منجر به ایجاد آسیب یا ناهنجاری کروموزومی شود [۲۲] (شکل ۱). به دلیل اینکه نمونه های مطالعه حاضر را لنفوسیتهای خون محیطی تازه انسان تشکیل می داد که به طریقه *in vivo* تحت تابش امواج اولتراسوند درمانی با شدت و فرکانس متفاوتی قرار گرفته بودند، لذا به نظر می رسد که ناهنجاریهای مشاهده شده از نوع کروموزومی، در اثر تابش امواج اولتراسوند اتفاق افتاده باشد. برای نشان دادن فعالیتهای ترمیمی کروموزومی در اثر تابش امواج اولتراسوند، نمونه ها در سه نوبت بعد از تابش تهیه شدند. زیرا اگر ناهنجاریهای کروموزومی در اثر تابش امواج اولتراسوند ایجاد می شدند، انتظار این بود که روند ترمیم موجب کاهش میزان ناهنجاریها گردد. یافته ها نشان دادند که ناهنجاریهای کروموزومی در مرحله سوم نمونه گیری نسبت به مرحله دوم افزایش یافته و در مرحله چهارم یک هفته بعد از تابش کاهش می یابد (نمودار ۱). این تغییرات ناشی از عملکرد طبیعی کروموزومها در ترمیم ناهنجاریها بوده و ممکن است دلیلی بر ایجاد ناهنجاری های کروموزومی در اثر تابش اولتراسوند باشد. این مطالعه میانگین درصد کل ناهنجاریهای کروموزومی در مراحل دوم و سوم حین درمان را نسبت به قبل از تابش به ترتیب ۰/۴۵ و ۲/۴۲ درصد نشان داد که از نظر آماری اختلاف معنی داری بین آنها وجود داشت ($p=0/002$). اخیراً یک مطالعه بر روی کارکنان بخشهای داپلر اولتراسوند نشان داد که ناهنجاریهای کروموزومی قابل ملاحظه ای در نمونه های لنفوسیتهای خون محیطی این افراد نسبت به گروه کنترل وجود داشت ($p<0/001$) و اغلب این ناهنجاریها

References

- 1- Kitchen SS, Partridge CJ. A review of therapeutic ultrasound. *Physiotherapy* 1990; 76: 593-600.
- 2- Dyson M. Mechanisms involved in therapeutic ultrasound. *Physiotherapy* 1987; 73: 116-120.
- 3- Rantanen J, Thorsson O, Wollmer P, Hurme T, Kalimo H. Effects of therapeutic ultrasound on the regeneration of skeletal myofibers after experimental muscle injury. *Am J Sports Med* 1999; 27: 54-59.
- 4- Harpaz D, Chen X, Francis CW, Marder VJ, Meltzer RS. Ultrasound enhancement of thrombolysis and reperfusion in vitro. *J Am Coll Cardiol* 1993; 21(6): 1507-11.
- 5- Hadjiargyrou M, Mcleod K, Ryaby JP, Rubin C. Enhancement of fracture healing by low intensity ultrasound, *Clin Orthop* 1998; 355(suppl): 216-229.
- 6- Williams R. production and transmission of ultrasound. *Physiotherapy* 1987; 73: 113-116.
- 7- Aston DF, Draper Do, Myrer JW. Temperature rise in human muscle during ultrasound treatments using Flex-All as a coupling agent. *J Athl Train* 1998; 33: 136-140.
- 8- Chan AK, Myrer JW, Measom G, Deaper Do. Temperature changes in human patellar tendon in response to therapeutic ultrasound. *J Athl Train* 1998; 33:130-135.
- 9- Draper DO, Castel JC, Castel D. Rate of temperature increase in human muscle during 1-MHZ and 3-MHZ continuous ultrasound. *J Orthop Sports Phys Ther* 1995; 22:142-150.
- 10- Nyborg WL. Ultrasonic microstreaming and related phenomena. *Br J Cancer Suppl* 1982; 45: 156-160.
- 11- Miller MW, Azadniv M, Cox C, Miller WM. Lack of induced increase in sister chromatid exchanges in human lymphocytes exposed to in vivo therapeutic ultrasound. *Ultrasound Med Biol* 1991; 17:81-83.
- 12- Barnett SB, Barnstable SM, Kossoff G. Sister chromatid exchange frequency in human lymphocytes after long duration exposure to pulsed ultrasound. *J Ultrasound Med* 1987; 6: 639-42.
- 13- Macintosh IJC, Davey DA. Chromosome aberrations induced by an ultrasonic fetal pulse detector. *Br Med J* 1970; 727: 92-93.
- 14- Stewart HD, Stewart HF, Moore RM Jr, Garry J. Compilation of reported biological effects data and ultrasound exposure levels. *J Clin Ultrasound* 1985Mar-Apr; 13 (3): 167-86.
- 15- Miller DL, Reese JA, Frazier ME. Single strand DNA breaks in human leukocytes induced by ultrasound in vitro. *Ultrasound Med Biol* 1989; 15: 765-771.
- 16- Macintosh IJC, Davey DA. Relationship between intensity of ultrasound and induction of chromosome aberrations. *Br J Radial* 1972; 45: 320-27.
- 17- Sierra-Torres MS, Arboleda-Moreno YY, Hoyosls, Sierra-Torres CH. Chromosome aberrations among cigarette smokers in Colombia. *Mutat Res* 2004 ; 562: 67-75.
- 18- Rooney DE. Human cytogenetics. Oxford England: IRL Press Ltd, 1986: 47-50.
- 19- Kasuba V, Sentija K, Garaj-Vrhovac V, Fucic A. Chromosome aberrations in peripheral blood lymphocytes from control individuals. *Mutat Res*. 1995; 346: 187-93.
- 20- Lalic H, Lekic A, Radosevic B. Comparison of chromosome aberrations in peripheral blood lymphocytes from people occupationally exposed to ionizing and radiofrequency radiation. *Acta Med Okayama*. 2001; 55: 117-127.
- 21- De Deyne PG, Kirsch-Volders M. In vitro effects of therapeutic ultrasound on the nucleus of human fibroblasts. *Phys Ther*. 1996; 76: 78-9.
- 22- Bundy ML, Lerner J, Messier DL. Effects of ultrasound on transport in Avian Erythrocytes. *Ultrasound Med Biol*. 1978; 4: 259-262.
- 23- Garaj-Vrhovac V, Kopjar N. Cytogenetic monitoring of cardiology unit hospital workers exposed to doppler ultrasound. *J Appl Toxicol*. 2000; 20: 259-64.