

## بررسی اثرات امواج اولتراسوند منقطع با فرکانس پایین بر ترمیم شکستگی استخوان تیبیا در خرگوش (یک ارزیابی هیستومورفومتریکی و ایمونوهیستوشیمی)

سیدهمايون صدرائی<sup>Ph.D.</sup>، غلامرضا کاكا<sup>M.Sc.</sup>، حسين بهادران<sup>Ph.D.</sup>،  
غلامعلی میرشفيعی<sup>M.Sc.</sup>، علی غنجال<sup>M.Sc.</sup>، يداله رضائی<sup>M.D.</sup>،  
علی نوروززاده<sup>M.Sc.</sup>

### چکیده

**هدف:** هدف از تحقیق حاضر این است که آیا اولتراسوند با شدت پائین بر افزایش تراکولای استخوانی یا تکثیر سلولی اثر دارد یا خیر؟

**روش بررسی:** ۲۰ سر خرگوش نر سفید بالغ از نژاد Dutch به یک گروه کنترل و دو گروه اولتراسوند درمانی تقسیم شدند. تحت بیهوشی عمومی یک شکستگی عرضی در قسمت میانی تنه استخوان تیبیای پای راست آنها ایجاد شد و با استفاده از فیکساتور خارجی در دو طرف استخوان تیبیا محل شکستگی فیکس گردید. خرگوش ها به طور تصادفی به یک گروه کنترل و دو گروه اولتراسوند درمانی ۵۰ و ۱۰۰ میلی وات بر سانتی متر مربع تقسیم شدند. در خرگوشهای گروه تجربی از امواج اولتراسوند منقطع، با دوز ۵۰ و ۱۰۰ میلی وات بر سانتی متر مربع و به مدت ۱۵ دقیقه روزانه استفاده شد. در خرگوشهای گروه کنترل نیز، دستگاه اولتراسوند به کار گرفته شد با این تفاوت که شدت جریان دستگاه صفر بود. بعد از گذشت ۷ هفته، خرگوشها به روش استنشاق با کلروفورم در فضای بسته کشته شدند. به دقت فیکساتور خارجی از پای حیوانات باز شد و استخوان تیبیای آنها همراه با کال استخوانی به طور کامل خارج گردید. جهت مطالعات بافت شناسی، استخوانها دکلسیفیه و فیکس شدند، پس از پردازش بافتی، مقاطع ۵ میکرونی از بلوکهای پارافینی، حاوی ناحیه کال استخوانی تهیه گردید و پس از رنگ آمیزی نمونهها به روش هماتوکسیلین-ائوزین و نیز تری کروم ماسون، مطالعه مورفومتری به کمک نرم افزار موتیک انجام شد. در بررسیهای مورفومتری، میزان تراکولای استخوانی ناحیه کال استخوان، اندازه گیری و ثبت شدند. همچنین تعداد استئوبلاستها نیز، در ناحیه کال شمارش گردید. علاوه بر آن، از هر گروه تعدادی از مقاطع بافتی جهت رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی و استفاده از مارکر ki67 برای مطالعه پرولیفراسیون سلولی مورد استفاده قرار گرفتند.

**یافته ها:** نتایج به دست آمده از مطالعات هیستومورفومتری نیز نشان داد که میانگین میزان تراکولاهای استخوانی در گروه کنترل  $64/4 \pm 6/06$  و در گروه تجربی (۵۰ میلی وات بر سانتیمتر مربع)  $56/57 \pm 5/81$  و همچنین در گروه تجربی (۱۰۰ میلی وات بر سانتیمتر مربع)  $84/04 \pm 6/74$  بود که بدین ترتیب اختلاف معنی دار آماری را بین این گروهها نشان نداده است ( $P < 0/05$ ).

میانگین تعداد استئوبلاست ها در گروه کنترل  $23/26 \pm 1/08$  و در گروه تجربی (۵۰ میلی وات بر سانتیمتر مربع)  $17/58 \pm 0/95$  و همچنین در گروه تجربی (۱۰۰ میلی وات بر سانتیمتر مربع)  $26/80 \pm 1/65$  بود که بدین ترتیب اختلاف معنی دار آماری را بین این گروهها نشان نداده است ( $P < 0/05$ ).

**نتیجه گیری:** این نتایج نشان داد که بافت کال شکستگی به این شدت اولتراسوند حساس نبوده و تاثیری بر ترمیم شکستگی تیبیای خرگوش نداشته است.

**واژه های کلیدی:** امواج اولتراسوند، کال استخوانی، هیستومورفومتری، شکستگی

دریافت مقاله: ۸۶/۲/۱۷، اصلاح مقاله: ۸۶/۱۲/۱۸، پذیرش مقاله: ۸۶/۱۲/۲۵

کاتب نویسنده مسئول: گروه آناتومی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بقیهاله (عج)، تهران - ایران

\* گروه آناتومی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بقیهاله (عج)

\*\* مرکز تحقیقات راهبردی، دانشگاه علوم پزشکی بقیهاله (عج)

\*\*\* گروه ارتوپدی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بقیهاله (عج)

\*\*\*\* گروه فیزیولوژی و بیوفیزیک، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بقیهاله (عج)

آدرس پست الکترونیکی: h\_sadraie@yahoo.com

## مقدمه

میلیونها شکستگی هر ساله در جهان روی می‌دهد. حدود ۶/۲ میلیون شکستگی تنها در آمریکا گزارش شده است و علیرغم روشهای درمانی متعدد طبق آمار هنوز حدود ۵ تا ۱۰ درصد از این شکستگیها با مشکل جوش خوردن مواجه هستند (۱). تحقیقات گذشته مانند Wang و همکاران افزایش مقاومت استخوان در مقابل نیروی چرخشی استخوان فمور پس از درمان با اولتراسوند (۲) و Ryaby استفاده از اولتراسوند در محیط کشت (Invitro) بر روی استئوبلاستها موثر دانست (۳،۴) و یا اینکه Massaya (۵) نشان داده که افزایش سطح فاکتور رشد (PDGF و BFGF) پس از استفاده از اولتراسوند بر روی استئوبلاستها در محیط invitro دیده شده است. همچنین Wu و همکاران (۶) نشان دادند که میزان بیان ژنی در کندروسیتها زمانی که از اولتراسوند استفاده کرده‌اند بیشتر شده است و Yang (۷) نیز چنین مشاهداتی را در استئوبلاستهای انسانی گزارش کرد. این تحقیقات نشان می‌دهد که اولتراسوند درمانی بر روی پروسه ترمیم شکستگی تأثیر مثبت داشته است. اولتراسوند در فیوژن مهره‌ای و در شکستگیهای مبتلا به عارضه جوش نخوردن و نیز در زمان کاشت پروتز و پیوند استخوان سبب تسریع استخوان‌سازی شده است (۸). Erdogan و همکاران وی و از سوی دیگر Tsunoda و دستیارانش نیز پس از استفاده از اولتراسوند در درمان شکستگی اثرات اولتراسوند را در ترمیم استخوان گزارش کردند (۹،۱۰). Mukai و همکارانش نیز نشان دادند که اولتراسوند بر روند تکثیر و تمایز کندروسیتها تأثیر مثبت می‌گذارد (۱۱). کاظمی آشتیانی و همکاران تأثیر اولتراسوند درمانی در ترمیم ضایعه استخوانی ناقص استخوان تیبیای خرگوش را بررسی کرده و نشان داده‌اند که در ۱۵ روز اول، حیوانات گروه تجربی نسبت به گروه کنترل از سرعت التیام بیشتری برخوردار بوده و از روز پانزدهم تا بیست و هفتم، در مراحل تشکیل کال و تجدید ساختار، گروه کنترل از سرعت بیشتری برخوردار بوده است (۱۲). نتایج Lu در سال ۲۰۰۶ نیز نشان داد که اولتراسوند توانسته است

بر میزان و سرعت جوش خوردن تاندون به استخوان بیفزاید (۱۳). علیرغم مثبت نشان دادن تأثیر اولتراسوند در روند استخوان‌سازی در تحقیقات ذکر شده، تعدادی از تحقیقات نیز نتیجه مثبتی را از امواج اولتراسوند بر ترمیم شکستگی استخوان گزارش نکرده و گاهی نتیجه معکوس را نیز عنوان کرده‌اند. Emami و همکاران نشان دادند که استفاده از امواج اولتراسوند در ترمیم شکستگی‌های تیبیا که با استفاده از Intramedullary nail فیکس شده‌اند بی‌تأثیر بوده است (۱۴). Handolin و همکارانش نیز اثرات امواج اولتراسوند را روی ترمیم ناحیه دیستال استخوان فمور موشهای صحرایی در ۳، ۶ و ۱۲ هفته بررسی و مشاهده کردند بعد از استفاده از اولتراسوند در گروه سه‌هفته‌ای مختصری اثر مثبت نشان داده شد در حالیکه در گروههای ۶ و ۱۲ هفته‌ای نتایج بررسی‌های هیستومورفومتریک هیچ تفاوت معنی‌دار میان دو گروه اولتراسوند درمانی و کنترل وجود نداشت (۱۵). Joseph و همکاران در سال ۱۹۹۸ نشان دادند که امواج اولتراسوند با خصوصیات ۲۰Min & ۳۰ mw/cm<sup>2</sup> & ۱MHz بر رشد طولی و دانسیته استخوان در فمور و تیبیای موش نر صحرایی بی‌تأثیر بود و تفاوتی میان طول استخوان و دانسیته استخوان در گروه کنترل و اولتراسوند درمانی مشاهده نشد (۱۶). Handolin و همکارانش نیز در تحقیقات خود در سال ۲۰۰۵ نشان دادند که امواج اولتراسوند در ترمیم شکستگی‌های قوزک خارجی پا هیچگونه تأثیر مثبتی نداشتند (۱۷-۱۹). Gregory نیز در سال ۲۰۰۲ اثرات امواج اولتراسوند را با شدت ۳۰mw/cm<sup>2</sup> و فرکانس ۱/۵MHz روی دو گروه موش دیابتی که شکستگی در تنه استخوان فیبولا داشتند، بررسی و مشاهده کردند که هیچ تفاوتی از نظر افزایش تعداد سلولها میان دو گروه وجود نداشت (۲۰). هدف از تحقیق حاضر این بود که آیا اولتراسوند با شدتهای پائین ۵۰ و ۱۰۰ میلی وات بر سانتی متر مربع بر افزایش تراکولای استخوانی یا تکثیر سلولی در ناحیه کال استخوانی تیبیا در خرگوش اثر دارد یا خیر؟

## روش بررسی

در این تحقیق از ۲۰ راس خرگوش نرسفید بالغ از نژاد Dutch با وزن حدود ۲/۵ تا ۳ کیلو گرم و حدود ۶ ماه سن که از موسسه رازی حصارک کرج خریداری شده استفاده شده است. خرگوشها هر یک به طور جداگانه در قفسهای مخصوص نگهداری شدند. خوراک دام خرگوش بصورت حبه به همراه آب بصورت آزاد در دسترس آنها قرار گرفت. دمای حیوانخانه در حدود  $22 \pm 2$  و روشنایی آن به طور متناوب ۱۲ ساعت نور و ۱۲ ساعت خاموشی تنظیم گردید.

**جراحی خرگوشها.** برای جراحی خرگوشها با استفاده از تزریق عضلانی زایلین هیدروکلراید (Zylasine hydrochloride) به مقدار ۱۰ میلی گرم برکیلو گرم و کتامین هیدروکلراید (Ketamin hydrochloride) به مقدار ۴۰ میلی گرم برکیلوگرم خرگوشها بی‌هوش گردیدند.

اندام عقبی راست خرگوشها از مچ پا تا بالای زانو شیو (Shave) گردید و با استفاده از بتادین ضدعفونی شد. با استفاده از دریل، دو شنز به قطر ۱/۵ میلی متر در ناحیه دیستال استخوان تیبیا بطور عرضی قرار گرفت و دو شنز دیگر که به قطر ۲ میلی متر بود، به همین ترتیب در ناحیه پروگزیمال استخوان تیبیا قرار گرفت. دو میله (Rod) به موازات محور طولی استخوان و در دو طرف استخوان قرار داده شدند و سر شنزها بوسیله کلامپ (clamp) روی میله‌ها ثابت شدند (شکل ۴). بعد از قرار دادن شنزها در داخل استخوان با استفاده از تیغ بیستوری بین دو شنز وسطی حدود ۳ سانتی متر به صورت طولی باز و فاسیای عمقی و پریوست نیز بریده و سپس بوسیله اکارتور، عضلات و پریوست کنار زده شدند. با اره برقی که ضخامت تیغه اره آن ۱ میلی متر بود برش عرضی روی استخوان تیبیا در ناحیه میدشفت (Midshaft) ایجاد گردید. در حین برش استخوان تیبیا، سرم فیزیولوژی به صورت آهسته روی محل برش استخوان ریخته شد تا مانع ایجاد گرما شود. در این روش استئوتومی کامل بوده و استخوان به طور عرضی کاملاً بریده شد. سپس پریوست بر روی استخوان کشیده شد، فاسیای عمقی و پوست با نخ ۴ صفر سیلک بنخیه زده شد.

سفاژولین با دوز ۲۰ میلی گرم بر کیلوگرم به مدت ۳ روز به صورت

داخل عضلانی جهت پروفیلاکسی تزریق شد.

خرگوشها به طور تصادفی در دو گروه تجربی (اولتراسوند درمانی) ۵۰ و ۱۰۰ میلی وات بر سانتیمتر مربع و یک گروه کنترل قرار گرفتند. به این ترتیب که در هر گروه تجربی (اولتراسوند درمانی) ۶ خرگوش و در گروه کنترل ۸ خرگوش قرار گرفتند.

**اولتراسوند درمانی.** سه روز بعد از انجام جراحی، حیوانات گروه تجربی به وسیله محفظه نگهدارنده بی حرکت شدند و روی پوست ناحیه قدامی داخلی ساق در همان محل جراحی از ژل مخصوص استفاده شد و اولتراسوند درمانی به وسیله دستگاه Sonopuls مدل ۴۹۱ (ساخت شرکت Enraf Nonius کشور هلند) با خصوصیات:

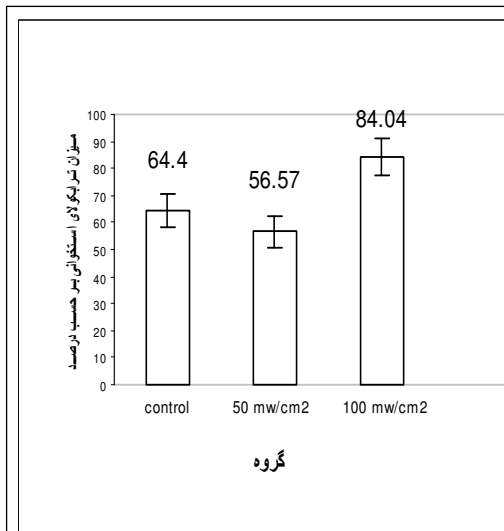
MHZ and Cycle = 1:1 and 50, 100 mw/cm<sup>2</sup> and 15 min  
به صورت روزانه انجام شد. خرگوشهای گروه شاهد نیز روزانه بمدت ۱۵ دقیقه در محفظه نگهدارنده و در وضعیت گروه تجربی منتهی در زیر دستگاه خاموش قرار گرفتند.

**مطالعه مورفومتری بافت استخوانی ناحیه کال.** جهت بررسی میزان تراکولا در کال استخوانی از مجموعه سخت افزاری (شامل کامپیوتر و میکروسکوپ مخصوص) و نرم افزاری Motic استفاده شد. بدین ترتیب که از هر نمونه تعداد ۱۰ مقطع از لامهای بافت شناسی تهیه شده از محل کال، به طور سریال و با نسبت ۱ به ۵ انتخاب شده، از مقاطع بافتی توسط سیستم Motic و با بزرگنمایی  $\times 100$  تصویربرداری انجام شد و در کامپیوتر ذخیره و سپس با استفاده از نرم افزار موتیک در میدانی به طول ۱۳۶۸/۳ میکرو متر و عرض ۱۰۱۹/۷ میکرومتر و سطحی برابر ۱۳۹۵۲۵۵ میکرومتر مربع میزان تراکولاها اندازه گیری و ثبت گردید و میزان تراکولا به بافت همبندی عروقی را برحسب درصد در مقاطع تعیین و سپس بین گروههای مختلف مقایسه شدند.

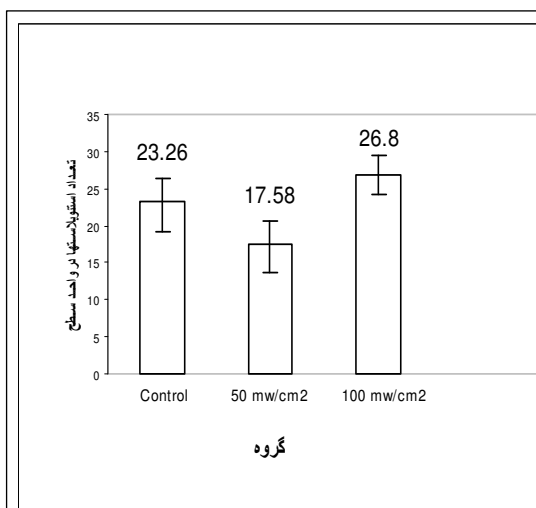
**انجام شمارش سلولی.** از هر نمونه تعداد ۱۰ مقطع از لامهای بافت شناسی تهیه شده از محل کال، در سطحی برابر ۱۲۲۰۰ میکرومتر مربع و با بزرگنمایی  $\times 400$  مورد مطالعه قرار گرفتند. تعداد سلولهای استئوبلاست در سطح مذکور شمارش و ثبت گردیدند و میان گروههای مختلف، مورد مقایسه قرار گرفتند.

**رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی و استفاده از مارکر Ki67.** مقاطع بافتی ۳ میکرونی از ناحیه کال استخوانی

(۱۰۰ میلی وات بر سانتیمتر مربع) ۱۵/۷ درصد بود که اختلاف فاحشی میان تعداد سلولهای در حال تقسیم در گروههای کنترل و تجربی مشاهده نگردید و عملاً تاثیری از اولتراسوند در تحریک میتوز در سلولهای استئوبلاست ملاحظه نگردید (شکل ۲).



نمودار ۱. در مقایسه میانگین میزان ترابکولای استخوانی بر حسب درصد در گروههای مختلف پس از انجام مورفومتری، اختلاف معنی داری بین گروههای مختلف دیده نمی شود.



نمودار ۲. در مقایسه میانگین تعداد استئوبلاستها در واحد سطح در گروههای مختلف، اختلاف معنی داری بین گروههای مختلف دیده نمی شود.

تهیه و با استفاده از مارکر Ki67 و نیز با بهره گیری از روش اصلاح شده Bimer جهت مطالعه میزان پرولیفراسیون سلولی رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی انجام گردید (۳۷).

**روش آماری تجزیه و تحلیل داده ها.** باتوجه به اینکه دو گروه در طرح مورد بررسی قرار گرفتند، از روش آماری t-test استفاده شد و میزان  $P < 0.05$  معنی دار محسوب شد.

## یافته‌ها

**یافته‌های حاصل از مطالعه مورفومتری استخوان در محل تشکیل کال.** نمودار ۳ میانگین و انحراف معیار میزان ترابکولای استخوانی را برحسب درصد در گروههای مختلف نشان می دهد.

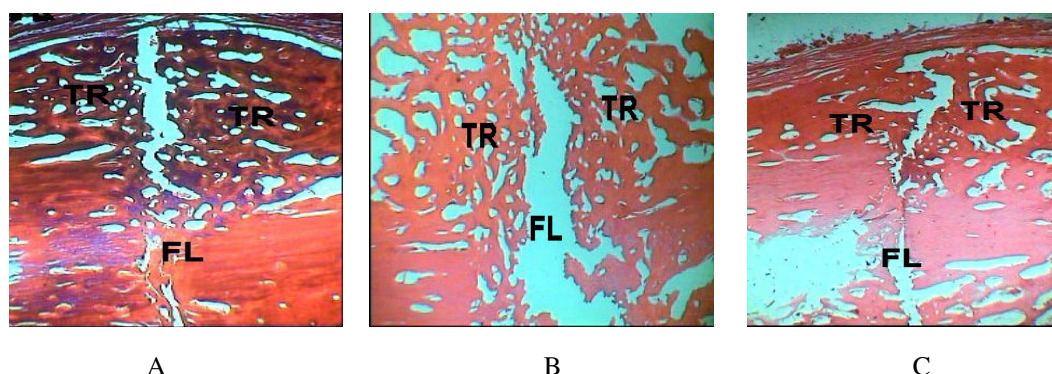
این نمودار مشخص می کند که میانگین میزان ترابکولای استخوانی در گروه کنترل  $64.4 \pm 6.06$  و در گروه تجربی (۵۰ میلی وات بر سانتیمتر مربع)  $56.57 \pm 5.81$  و همچنین در گروه تجربی (۱۰۰ میلی وات بر سانتیمتر مربع)  $84.04 \pm 6.74$  می باشد که اختلاف معنی دار آماری را بین این گروهها نشان نمی دهد (شکل ۱، نمودار ۱). ( $P < 0.05$ )

یافته‌های حاصل از شمارش استئوبلاستها در محل کال استخوانی نمودار ۴ میانگین و انحراف معیار تعداد استئوبلاستها را نشان می دهد.

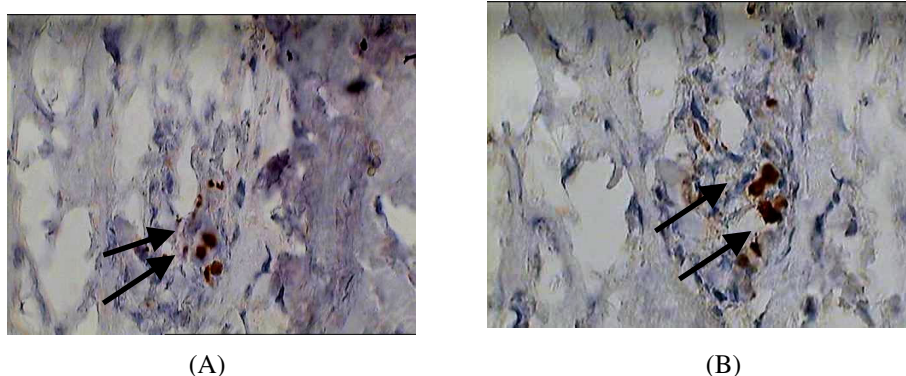
این نمودار مشخص می کند که میانگین تعداد استئوبلاستها در گروه کنترل  $23.26 \pm 3.08$  و در گروه تجربی (۵۰ میلی وات بر سانتیمتر مربع)  $17.58 \pm 2.95$  و همچنین در گروه تجربی (۱۰۰ میلی وات بر سانتیمتر مربع)  $26.8 \pm 2.65$  می باشد که بررسی این متغیر نیز اختلاف معنی دار آماری را بین این گروهها نشان نمی دهد ( $p < 0.05$ ) (نمودار ۲).

## یافته‌های حاصل از مطالعه ایمونوهیستوشیمی.

نتایج ایمونوهیستوشیمی ناشی از شمارش سلولهای استئوبلاست مارک دار شده با ki67 که یک مارکر تکثیر سلولی است نشان داد که تعداد این سلولها در گروه کنترل ۱۴/۹ درصد و در گروه تجربی (۵۰ میلی وات بر سانتیمتر مربع) ۱۳/۸ درصد و در گروه تجربی



شکل ۱. تصویر ناحیه کال استخوانی در گروه‌های مختلف (A: گروه کنترل و B: گروه تجربی ۵۰ میلی وات بر سانتیمتر مربع و C: گروه تجربی ۱۰۰ میلی وات بر سانتیمتر مربع) (بزرگنمایی  $\times 100$ ): FL: خط شکستگی، TR: تراپکولای استخوانی همانطور که ملاحظه می‌شود تفاوت چشمگیری در میزان کال استخوانی در گروه‌های مختلف دیده نمی‌شود.



شکل ۲. تصویر ناحیه کال استخوانی در گروه کنترل (A) و تجربی  $100 \text{ mW/cm}^2$  (B) را نشان می‌دهد (بزرگنمایی  $\times 400$ ). فلش‌ها سلولهای نشان‌دار شده با ki67 را مشخص کرده است. تفاوت مشخصی در سلولهای نشان‌دار شده در این دو گروه دیده نمی‌شود.

## بحث

شدتهای کمتر را غیر مفید دانسته‌اند (۶) و بیشتر محققین شدتهای بین ۳۰ تا ۱۰۰ میلی وات بر سانتی متر مربع را مثبت گزارش کرده و بالاتر از آن را بی‌اثر و یا مضر دانسته‌اند (۸،۲). در تحقیق ما با انتخاب شدتهای ۵۰ و ۱۰۰ میلی وات بر سانتی متر مربع فرض بر این قرار گرفت که با استفاده از این دوزها اثرات مثبت برروی استخوان‌سازی در محل کال مشاهده گردد که نتایج بدست آمده موید چنین نظری نبود و چنین اثری از اولتراسوند در ترمیم شکستگی استخوان تیبیای خرگوش مشاهده نگردید.

نتایج ما با آن دسته از تحقیقاتی که تاثیر مثبت برای اولتراسوند در پروسه ترمیم شکستگی و نیز در پدیده استخوان‌سازی داخل غضروفی نشان داد، همخوانی نداشت (۸، ۱۰، ۱۳) و یافته‌های ما با نتایج این محققین همسو نبود.

از سوی دیگر نتایج ما با یافته‌های برخی دیگر از محققین که اثر

نتایج حاصل از تحقیق حاضر نشان داد که استفاده از امواج اولتراسوند با شدتهای مورد استفاده بر کال استخوان تیبیای خرگوش از نظر میزان تراپکولای استخوانی و تکثیر تاثیر چندان مثبتی نداشت و تفاوت معنی‌داری میان گروههای تجربی و کنترل مشاهده نگردید.

تحقیقات انجام شده در رابطه با اثر امواج اولتراسوند بر ترمیم استخوان چه در محیط *In vivo* و چه محیط *In vivo* نشان داد که از این امواج در شدتهای بسیار متنوع از ۳۰ میلی وات بر سانتی متر مربع تا ۲۲۰۰ میلی وات بر سانتی متر مربع، استفاده شده است.

بعضی از محققین دوز ۵۰۰ یا ۶۰۰ میلی وات بر سانتی متر مربع را بر رشد استخوان و ترمیم شکستگی مفید گزارش کرده‌اند و

مثبتی برای اولتراسوند در ترمیم استخوان ذکر نکرده‌اند همخوانی داشت (۱۶-۱۹، ۱۴).

تفاوت در نتایج تحقیقات بررسی اثر اولتراسوند بر بافت استخوانی و ترمیم شکستگی استخوان، می‌تواند ناشی از استفاده از دوزها و زمانهای مختلف بوده، استفاده از اولتراسوند در مدل‌های انسانی یا حیوانی و گاهی استفاده از اولتراسوند در محیط‌های *In vitro* بر روی سلول‌های استخوانی یا غضروفی و یا در محیط *In vivo* و بر روی بدن جاندار تحقیقاتی بوده باشد.

کاربرد اولتراسوند در محیط کشت سلول‌هایی که بطور مجزا از محیط بدن قرار گرفته و از سایر بافتها و جریان سیرکولاسیون عمومی و فاکتورهای مختلف از جمله هورمون‌ها و فاکتورهای ایمنی و رشد و نمو که از راه جریان خون و سلول‌های بافت‌های مجاور به آن می‌رسد می‌تواند بسیار متفاوت از اثر اولتراسوند بر بافت استخوانی در محیط بدن موجود زنده *In vivo* باشد. چراکه در محیط طبیعی بدن یعنی در شرایط *In vivo* فاکتورهای دیگری مانند رگزایی، هورمون‌ها، فاکتورهای رشد و مانند اینها بر روی ترمیم استخوان تاثیرگذارند. بنابراین تنها زمانی می‌توان اثر مثبت یا منفی یک یا چند عامل از جمله اولتراسوند را بر سلول یا بافت زنده مورد ارزیابی قرار داد که نتایج مطالعات *In vivo* نیز آن را تایید کند.

استفاده از روشهای متفاوت ایجاد نقص استخوانی و یا شکستگی و یا استفاده از شدتهای مختلف اولتراسوند، از جمله عوامل تاثیر گذار بوده و باعث گردیده که نتایج پژوهشها با هم متفاوت باشد.

در انتخاب شدت موثر اولتراسوند نتایج بطور یکسان گزارش نشده است و هر یک بنابر تجربه خود یک دوز را پیشنهاد کرده‌اند، حتی گاهی مغایرت نتایج در استفاده از یک دوز واحد نیز در تحقیقات مختلف دیده می‌شود.

Emami در بررسی رادیوگرافیهای بیماران که شکستگی آنها با بروش Nailing عمل شده و سپس با اولتراسوند درمان شده بودند در مقایسه با گروه کنترل نشان دادند که امواج اولتراسوند در روند تسریع و ترمیم شکستگی استخوانهای این بیماران تاثیر بسزایی نداشته است (۱۴). مشابه چنین نتایج را در یافته‌های Handolin و همکارانش می‌بینیم. ایشان نیز نشان دادند که امواج اولتراسوند

در ترمیم شکستگی‌های قوزک خارجی پا هیچگونه تاثیر مثبتی نداشته است (۲۰-۱۷).

این در حالی است که Tanzer نشان داد که استفاده از اولتراسوند در درمان شکستگی استخوان فیکس شده با *Intramedullary implants* در سگ موثر بوده و نتایج بدست آمده اختلاف معنی‌دار بین گروه تجربی با گروه کنترل نشان داده است (۲۴).

در مورد اثرات اولتراسوند روی استخوان و ترمیم شکستگی، باید به تفاوت میان شدتهای درمانی و تشخیصی اولتراسوند توجه داشت. پاسخ بافتها به امواج اولتراسوند، بستگی به میزان شدت امواج و مدت زمان رسیدن انرژی به بافت دارد. استخوان در مقایسه با چربی، عضله و یا هماتوم دانسیته بیشتری دارد و این اختلاف جذب امواج، ممکن است نقش مهمی در تاثیر اولتراسوند بر محل شکستگی داشته باشند. جذب انرژی باعث تبدیل انرژی مکانیکی به گرما می‌شود. اگرچه این اثر گرمایی کوچک است (کمتر از یک درجه سانتی گراد)، ولی بعضی از آنزیم‌ها مثل کلاژناز به تغییرات خیلی کم گرما نیز حساس هستند. بنابراین اولتراسوند ممکن است جریانهای آنزیمی را تسهیل کند.

به هر حال مکانیسمهایی که از طریق آن اولتراسوند رشد استخوان را در ناحیه کال استخوانی تحریک و یا تقویت نماید، به طور کامل شناخته نشده است (۳۶).

Ryaby در محیط *in vitro* امواج اولتراسوند را بر استئوبلاستها اثر داد و مشاهده کرد که *influx* کلسیم و بدنال آن فعالیت پیامبر ثانویه و میزان TGF-b که یک فاکتور رشد استخوان است افزایش یافته و فعالیت استئوبلاستها را در تولید ماتریکس استخوانی تشدید گردیده است (۳).

تحقیقات انجام شده بر ترمیم شکستگی فمور با استفاده از امواج اولتراسوند نشان داده است که سطح mRNA استئوپوتین به طور معنی‌دار افزایش می‌یابد (۲۲). اخیرا نیز گزارش شده که استفاده از امواج اولتراسوند پالس با شدت پایین به مدت ۲۰ دقیقه سبب افزایش *cbfa1/Runx2* و بیان ژنی mRNA استئوکلسین در استئوبلاست انسانی می‌شود (۲۳).

در بررسی‌های هیستولوژیک بافتها پس از دریافت امواج اولتراسوند در زمان ترمیم بافت و جوش خوردن استخوان و در مطالعه

رزمی دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌اله (عج) می‌باشد که از مساعدتهای مسئولین محترم پژوهشکده طب رزمی تقدیر و تشکر می‌گردد.

## References

1. Claes L, Willie B. The enhancement of bone regeneration by ultrasound. *Prog. Biophys. Mol. Biol* 2007; 93(1-3): 384-98.
2. Wang SJ, Lewallen DG, Bolander ME, Chao EYS, Ilstrup DM, Greenleaf JF. Low intensity ultrasound treatment increases strength in a rat femoral fracture model. *J Orthop Res* 1994; 12: 40-7.
3. Ryaby JT, Bachner EJ, Bendo J, Dalton PF, Tannenbaum S, Pilla AA. Low intensity pulsed ultrasound increases calcium G.P. Gebauer et al. *Journal of Orthopaedic Research* 2002; 587-592. incorporation in both cartilage and bone cell cultures. *Orthop Res Soc Trans* 1989; 14: 15.
4. Ryaby JT, Matthew J, Duarte-Alves P. Low intensity pulsed ultrasound affects adenylate cyclase activity and TGF-b synthesis in osteoblastic cells. *Orthop Res Soc Trans* 1992; 17: 590.
5. Masaya I, Yoshiaki A, Tomohiro O, Keiji K. Effects of ultrasound on the co-cultured of osteoblasts with endothelial cells. *Trans Int Soc Frac Repair* 1999; 13(4): 161-166.
6. Wu C-C, Lewallen DG, Bolander ME, Bronk J, Kinnick R, Greenleaf JF. Exposure to low intensity ultrasound stimulates aggrecan gene expression by cultured chondrocytes. *Orthop Res Soc Trans* 1996; 21: 622.
7. Yang K, Parvizi J, Wang S, Lewallen D, Kinnick R, Greenleaf J, et al. Exposure to low-intensity

سلولهای استخوانی اعم از استئوبلاستها، استئوکلاستها، کندروسیتها و سلولهای بنیادین مزانشیمی چنین بنظر می‌رسد که اثرات امواج اولتراسوند محدود به بافتهای نرم بوده و بر سلولهای مستقر در بافتهای سخت و کلسیفیه اثری نداشته است (۱).

در بررسی‌های کشت بافتی اثر اولتراسوند بر تمایز سلولی و سنتز پروتئین توسط سلولها بیان شده است. این در حالی است که انرژی امواج اولتراسوند بسیار پایین بوده و احتمالاً اثرات این امواج مربوط به مکانیسمهای غیرگرمایی است که بر نفوذپذیری غشا سلول و افزایش فعالیت سلولی اعمال می‌گردد (۱). گرچه در تحقیق حاضر تعدادی از پارامترها در گروه اولتراسوند درمانی با دوز  $100 \text{ mw/cm}^2$  نتایج بهتری را نسبت به گروه کنترل نشان می‌داد، اما این نتایج نیز غیرمعنی‌دار بود.

نتایج ایمونوهیستوشیمی و استفاده از مارکر Ki67 جهت نشان‌دار کردن سلولهای در حال تکثیر استخوانی در تحقیق ما نیز نشان داد که اولتراسوند بر میزان تکثیر سلولی و تقسیم میتوز در سلولهای استخوانی چندان تاثیری نداشته است. مشابه نتایج ما نیز در نتایج تحقیقاتی دیگر که اولتراسوند را در میزان پرولیفراسیون سلولی بی‌تاثیر دانسته‌اند، دیده می‌شود (۲۰). نتایج ما نشان داد که اولتراسوند در ترمیم شکستگی‌های استخوان تیبیای خرگوش تاثیر قابل ملاحظه‌ای نداشته است.

## نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از تحقیق حاضر نشان داد که استفاده از امواج اولتراسوند با مشخصات  $1\text{MHZ}$  and  $\text{Cycle} = 1:1$  and  $50$  and  $100 \text{ mw/cm}^2$  and  $15 \text{ min}$  در محل شکستگی از جهت میزان تراکولای استخوانی و تعداد سلولهای استئوبلاست تاثیر بسزایی در ترمیم شکستگی استخوان تیبیای خرگوش نداشته است. این بدین معنی نیست که اولتراسوند بعنوان یک مدالیتی در ترمیم استخوان باید رد شود، بلکه بدین معنی است که در این زمینه نیازمند تحقیقات بیشتر با شدتها و مدت زمانهای متفاوت می‌باشد.

## تقدیر و تشکر

این تحقیق، طرح تحقیقاتی مصوب مرکز ترومای پژوهشکده طب

- ultrasound increases aggrecan gene expression in a rat femur fracture model. *J Orthop Res* 1996; 14: 802-9.
8. White cloud TS, Cook SD, Salkeld SL, Ryaby JP. Acceleration of spine fusions with a low intensity pulsed ultrasound device. *Trans Orthop Res* 1998; 23: 1049.
9. Erdogan O, Esen E, Ustun Y, Kurkcü M, Akova T, Gonlusen G, Uysal H, Cevlik F. Effects of low-intensity pulsed ultrasound on healing of mandibular fractures: an experimental study in rabbits. *J Oral Maxillofac Surg* 2006; 64(2): 180-8.
10. Tsunoda M. Treatment of non-union and delayed-union by low intensity pulsed ultrasound. *Clin Calcium*. 2003; 13(10): 293-6.
11. Mukai S, Ito H, Nakagawa Y, Akiyama H, Miyamoto M, Nakamura T. Transforming growth factor-beta1 mediates the effects of low-intensity pulsed ultrasound in chondrocytes. *Ultrasound Med Biol* 2005; 31(12):1713-21.
۱۲. کاظمی آشتیانی س. تاثیر اولتراسوند درمانی در ترمیم استخوان خرگوش. فصلنامه علمی پژوهشی فیض. دانشگاه علوم پزشکی تهران، ۱۳۷۹ صفحات ۲۹-۳۵.
13. Lu H, Qin L, Fok P, Cheung W, Lee K, Guo X, Wong W, Leung K. Low-intensity pulsed ultrasound accelerates bone-tendon junction healing: a partial patellectomy model in rabbits. *Am J Sports Med* 2006; 34(8):1287-96. Epub 2006 Mar 27.
14. Emami A, Petren-Mallmin M, Larsson S. No effect of low-intensity ultrasound on healing time of intramedullary fixed tibial fractures. *J Orthop Truma* 1999; 13: 252-7.
15. Handolin L, Partio EK, Arnala I, Pajarinen J, Patiala H, Rokkanen P. The effect of low-intensity pulsed ultrasound on bone healing in SR-PLLA rod fixed experimental distal femur osteotomy in rat. *J Mater Sci Mater Med* 2007; Feb 3.
16. Joseph A. Spadaro and Stephen A. Albanese. Application of low-intensity ultrasound to growing bone in rats. *Ultrasound in Med & Biol* 1998; (24): 567-573.
17. Handolin L, Kiljunen V, Arnala I, Kiuru MJ, Pajarinen J, Partio EK, Rokkanen P. No long-term effects of ultrasound therapy on bioabsorbable screw-fixed lateral malleolar fracture. *Scand J Surg* 2005; 94(3): 239-42.
18. Handolin L, Kiljunen V, Arnala I, Kiuru MJ, Pajarinen J, Partio EK, Rokkanen P. Effect of ultrasound therapy on bone healing of lateral malleolar fractures of the ankle joint fixed with bioabsorbable screws. *J Orthop Sci* 2005; 10(4): 391-5.
19. Handolin L, Kiljunen V, Arnala I, Pajarinen J, Partio EK, Rokkanen P. The effect of low intensity ultrasound and bioabsorbable self-reinforced poly-L-lactide screw fixation on bone in lateral malleolar fractures. *Arch Orthop Trauma Surg* 2005; 125(5): 317-21.
20. Gregory P. Gebauer, Sheldon S. Lin, Heather A. Beam, Pedro Vieira, J. Russell Parsons. Low-intensity pulsed ultrasound increases the fracture callus strength in diabetic BB Wistar rats but does not affect cellular proliferation. *Journal of Orthopaedic Research* 2002; (20): 587-592.



21. Bimer P, Ritzi M, et al. Immunohistochemical detection of cell growth fraction in formalin-fixed and paraffin-embedded murine tissue. *Am J Pathol* 158: 1991-1996.
22. Hadjiargyrou M, Lombardo F, Zhao S, Ahrens W, Joo J, Ahn H, et al. *J Biol Chem* 2002; 277: 30177- 82.
23. Chen YJ, Wang CJ, Yang KD, Chang PR, Huang HC, Huang YT, et al. Pertussis toxin-sensitive Galphai protein and ERK-dependent pathways mediate ultrasound promotion of osteogenic transcription in human osteoblasts. *FEBS Lett* 2003; 554: 154-8.
24. Tanzer M, Kantor S, Bobyn JD. Enhancement of bone growth into porous intramedullary implants using non-invasive low intensity ultrasound. *J Orthopaedic Research* 2001; 19: 195-199.