

ارزیابی اثر امواج اولتراسوند متناوب با شدت پایین بر روند جوش خوردگی استخوان در مدل شکستگی تجربی تیبیای خرگوش نیوزیلندی

ابوالحسن سخایی^{۱*}، دکتر حسینعلی هادی^{۲*}، دکتر حسین صالحی^{۳**}، زهرا مرادی^۴، مینا قدمیان^{۴†}
^{*}مربی گروه علوم تشریح- دانشگاه علوم پزشکی اراک، ^{**}استادیار گروه ارتوپدی- دانشگاه علوم پزشکی اراک، ^{***}دستیار گروه علوم تشریح -
 دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، [†]کارشناس فیزیوتراپی- دانشگاه علوم پزشکی اراک، [‡]کارشناس آزمایشگاه بافت شناسی- دانشگاه علوم پزشکی اراک.
 تاریخ دریافت: ۱۷/۳/۱۰ تاریخ تایید: ۱۷/۹/۲

چکیده:

زمینه و هدف: ترمیم شکستگی یک روند بیولوژیک پیچیده است که فاکتورهای داخلی و خارجی متعددی روی آن تاثیر می گذارند. یکی از فاکتورهای خارجی، تحریکات مکانیکی امواج اولتراسوند است. هدف از انجام این مطالعه، ارزیابی اثرات اولتراسوند متناوب با شدت پایین روی شکستگی تجربی تیبیای خرگوش نیوزیلندی بود. روش بررسی: در این مطالعه تجربی تعداد ۳۶ سر خرگوش نر بالغ نیوزیلندی را در چهار گروه قرار داده و حیوانات تحت عمل جراحی شکستگی تیبیای راست قرار گرفتند. بعد از بهبود زخم ها، محل شکستگی گروه های آزمایش بترتیب به مدت ۲ و ۴ هفته تحت تاثیر امواج اولتراسوند قرار داده شدند و گروه های کنترل بدون هیچگونه مداخله ای نگه داری شدند. سپس حیوانات را کشته و تیبیای آنها خارج گردید. بعد از فیکس شدن و پاساژ بافتی نمونه ها، از بلوک های پارافین لام تهیه گردیده و با هماتوکسیلین و اتوزین رنگ آمیزی شدند. سپس لام ها برای شاخص های ترمیم استخوان مورد آنالیز استریولوژیک قرار گرفتند و داده ها به کمک آزمون های آماری من ویتنی و کروسکال والیس مورد مقایسه قرار گرفت. یافته ها: نتایج بدست آمده از این مطالعه نشان داد میانگین تغییرات حجمی رشد کالوس غضروفی در خرگوش هایی که تحت تاثیر امواج اولتراسوند قرار داشتند در مقایسه با گروه کنترل به طور معنی داری افزایش یافته بود ($P < 0/05$). اما در سایر شاخص ها (بافت گرانوله و بافت مزانشیمی، بافت استخوانی) اختلاف معنی دار آماری بین گروه های آزمایش و کنترل آنها مشاهده نگردید. نتیجه گیری: امواج اولتراسوند متناوب با فرکانس یک مگا هرتز ممکن است ترمیم شکستگی در تیبیای خرگوش را تسریع نماید.

واژه های کلیدی: امواج اولتراسوند، ترمیم استخوان، شکستگی تیبیا.

مقدمه:

سیتوکین ها گردیده که تمایز و تشکیل سلول های استخوانی جدید را کنترل می کنند (۳). در طی دوره ترمیم شکستگی فاکتورهای داخلی و خارجی متعددی بر روی کمیت و مدت زمان جوش خوردن استخوان تاثیر می گذارند. اثرات این فاکتورهای داخلی به صورت تحریک استوئوز و تسریع رگ زایی می باشد (۴). فاکتورهای خارجی نیز به صورت نیروهای مکانیکی مانند کشش روی استخوان در محل شکستگی ترمیم استخوان را تحت تاثیر قرار داده و سبب تحریک استخوان سازی،

ترمیم شکستگی یک روند پیچیده است (۱) که در آن آبخاری از پدیده های زیستی ناشناخته درگیر بوده و بصورت سیگنال های مولکولی درون و بیرون سلولی، استخوان سازی را القاء می کنند (۲). در طی این روند اوستئوبلاست ها، استئوسیت ها و استئوکلاست ها فعالیت می کنند. عمل متقابل این گروه های سلولی باعث تعدیل فعالیت سلولی شده و برآیند آن به صورت بازسازی و ترمیم استخوان است (۳). این فعالیت های سلولی همچنین منجر به آزاد سازی فاکتورهای رشد سلولی و

^۱نویسنده مسئول: اراک-میدان بسیج-پردیس دانشگاه-دانشکده پزشکی-گروه آناتومی-تلفن: ۰۸۶۱-۴۱۷۳۵۲۹ E-mail: anatomy_47@yahoo.com

تجربی تیپای خرگوش نیوزیلندی بالغ می باشد.

روش بررسی:

این مطالعه بصورت تجربی بوده و در آزمایشگاه بافت شناسی دانشگاه علوم پزشکی اراک روی ۳۶ سر خرگوش نر بالغ نژاد نیوزیلندی با وزن تقریبی ۱۸۰۰ تا ۲۵۰۰ گرم (۴/۵ ماهه به بالا) که از موسسه تحقیقاتی رازی کرج خریداری گردیده، انجام گرفته است. خرگوش ها در شرایط حیوان خانه با درجه حرارت ۱۹ تا ۲۳ درجه نگهداری شدند. این تعداد خرگوش بصورت تصادفی در چهار گروه ۹ تایی قرار داده شدند به طوری که دسترسی آزادانه به آب و غذا داشتند. یک هفته بعد از ورود حیوانات و تطابق با شرایط محیطی حیوانخانه، ساق پای راست آنها با کرم مویر تمیز گردید و خرگوش ها با استفاده از کتامین (۳۵mg/kg) + رامپون (۱۰mg/kg) بیهوش گردیدند. سپس در شرایط استریل یک برش طولی در سطح داخلی تیبا زده شد و پوست، فاسیا و پریوستوم کنار زده شده و در حدود ۱/۵ سانتی متری پایین تکمه تیبا توسط فرزنداندان پزشکی استخوان تیبا بطور کامل استئوتومی گردیده و یک فلاپ عضلانی از عضله تیبال قدامی در محل شکستگی قرار داده شده و پوست و فاسیا دوخته شدند و ساق پا پانسمان و با آتل آلومینیومی فیکس گردید. بمنظور جلوگیری از عفونت پای حیوانات بمدت ۴ روز آمپول جنتامایسین به میزان ۲۰ میلی گرم به ازای هر حیوان تزریق گردید. دو هفته بعد از جراحی و ترمیم زخم پای حیوانات، اولتراسوند تراپی (دستگاه اولتراسوند مدل Enraf 490 S هلند) حیوانات شروع گردید. حیوانات گروه های کنترل بدون هیچ مداخله ای نگه داری شده اما گروه های آزمایش در دو گروه دو و چهار هفته ای تحت تاثیر اولتراسوند متناوب با فرکانس ۱ مگاهرتز، شدت ۵۰ میلی وات بر سانتی متر مربع و به مدت روزانه ۱۰ دقیقه تحت تاثیر قرار داده شدند. علت بکار گیری این امواج با مشخصات ذکر شده عمق نفوذ

تسریع رشد سلولی، تمایز، کموتاکسی و سنتز ماتریکس خارج سلولی می شوند (۵). امروزه تمایل به کاربرد مدالیته های فیزیکی برای تسریع جوش خوردگی استخوان افزایش یافته است. این مدالیته ها شامل اولتراسوند با شدت پایین، امواج شوکی خارجی (Extra corporeal shocke wave)، امواج شوکی فیزیکی (Physical shocke wave) و امواج الکترومغناطیسی ضعیف می باشند (۵-۸).

در خصوص کاربرد امواج اولتراسوند با وجود مطالعات فراوان (۵،۴،۱) هنوز هم موارد متناقض متعددی وجود دارد. چنانکه Takikawa و همکاران نشان دادند امواج اولتراسوند با شدت پایین روند ترمیم شکستگی را در موارد عدم جوش خوردگی در رات افزایش می دهند (۶). اما Saito با بکار بردن امواج اولتراسوند متناوب با شدت پایین (۳۰ تا ۱۲۰ میلی وات بر سانتی متر مربع بصورت روزانه) در محیط کشت استئوبلاست های MC3T3-E1 بیان نمودند که این امواج ظاهراً اثراتی روی سنتز کلاژن و یا افزایش mRNA و پروتئین سلولی در گروه کنترل و گروهی که تحت تاثیر اولتراسوند بوده اند نداشته است (۹). همچنین گروهی از پژوهشگران در یک مطالعه روی خرگوش با بکار بردن امواج اولتراسوند با فرکانس ۳ مگاهرتز بیان نمودند، این امواج در مراحل ترمیم نهایی استخوان زیان آور و نامناسب می باشند (۹). بنابراین با توجه به اینکه برای درمان برخی شکستگی ها روش های جراحی پیشنهاد می گردد و این روش ها تهاجمی بوده و عوارضی همچون خطرات عفونت و عدم جوش خوردگی را به همراه دارد. ضمناً دوران بستری شدن بیمار نیز افزایش یافته و هزینه بر می باشند. لذا کاربرد این مدالیته های فیزیکی راه مناسبی برای تسریع مدت زمان فرآیند جوش خوردگی، بهبود استحکام استخوان و کاهش هزینه های درمانی است. بر این اساس هدف از انجام این تحقیق ارزیابی اثر امواج اولتراسوند متناوب با شدت پایین بر روند جوش خوردگی استخوان در مدل شکستگی

نرم افزار Power point ویرایش ۲۰۰۳ منتقل و بطور همزمان یک صفحه صلیبی که ابعاد آن بر اساس شاخص های استریولوژیک طراحی گردیده بود روی تصویر منتقل گردید. به تفکیک تعداد صلیب هایی که روی بافت مزانشیمی تمایز نیافته، بافت غضروفی تازه تشکیل شده و استخوان نابالغ قرار داشتند شمارش و توسط روش کوالیه (Cavalieri) حجم هر کدام از این شاخص ها محاسبه و مقادیر مورد مطالعه قرار گرفتند (۱۱، ۱۲).

سپس داده های این تحقیق با استفاده از آزمون های آماری من ویتنی و کروسکال والیس مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

یافته ها:

در این مطالعه سه شاخص حجم بافت گرانوله و مزانشیمی، حجم بافت غضروفی (کالوس غضروفی) و حجم بافت استخوانی نابالغ مورد مطالعه قرار گرفت و نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد: میانگین حجم بافت غضروفی در محل ترمیم شکستگی در مقایسه بین گروه های دریافت کننده امواج اولتراسوند ۲ و ۴ هفتگی با گروه های کنترل بطور معنی داری افزایش یافته بود ($P < 0/05$) (جدول شماره ۱ و تصاویر شماره ۱ و ۲ و ۳). میانگین میزان حجمی رشد بافت گرانوله و مزانشیمی با وجود افزایش حجم در گروه دریافت کننده امواج اولتراسوند (۲ هفتگی) در مقایسه با گروه کنترل آن اختلاف معنی داری را نشان نداد (جدول شماره ۱).

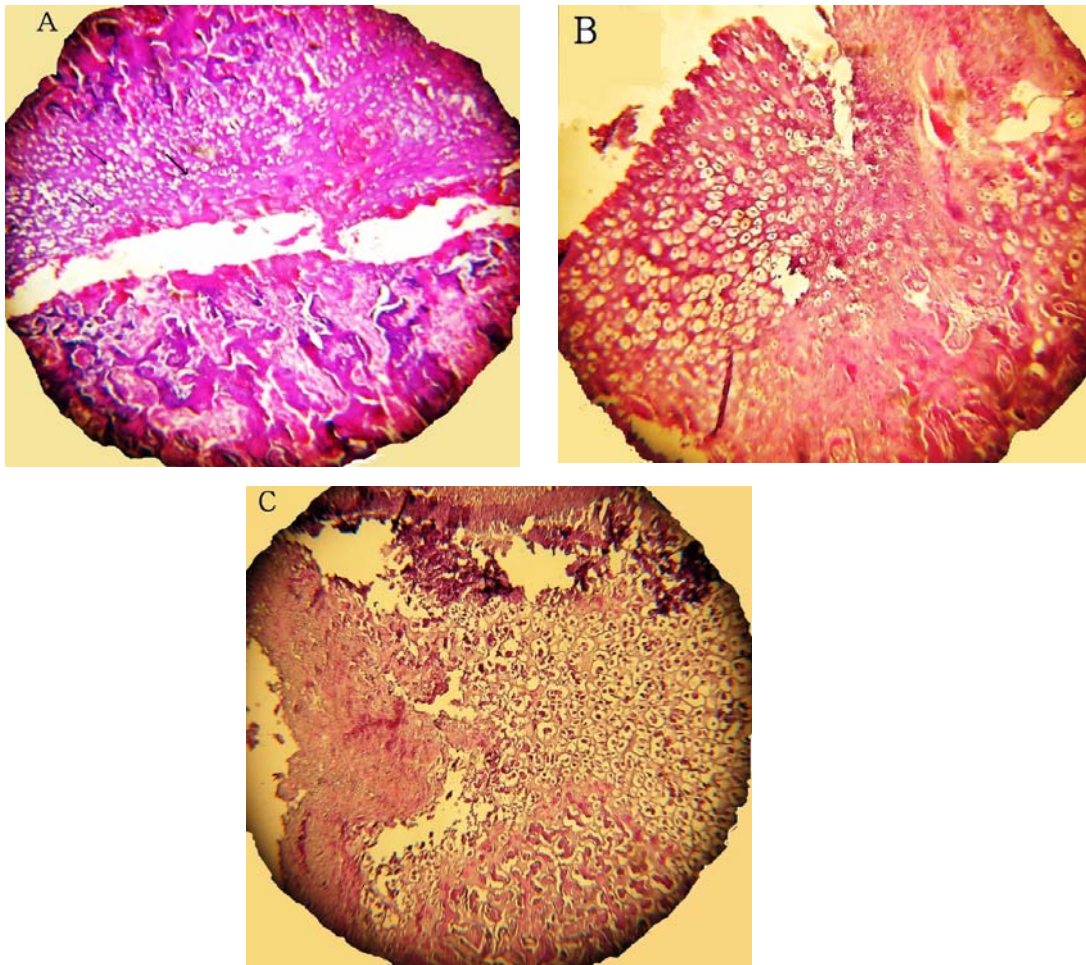
مناسب آنها می باشد. بعد از انجام آزمایشات و بر اساس دستورالعمل کار با حیوانات آزمایشگاهی خرگوش ها با تزریق داخل قلبی ۲ میلی مول محلول KCL کشته شدند. بلافاصله استخوان تیبیای آنها خارج گردید، عضلات اطراف آن تمیز گردیده و قطعات محل جوش خوردگی از بقیه استخوان جدا شده و بمدت ۷۲ ساعت در فرمالین ۱۰ درصد نگه داری گردیدند. بعد از تثبیت، نمونه ها برای کلسیم برداری به محلول ۸ درصد اسید فرمیک+اسید نیتریک (کمپانی مرک) منتقل گردیده و تا کلسیم برداری کامل، محلول یک روز در میان تعویض گردید. بعد از کلسیم برداری نمونه ها به مدت نیم ساعت به محلول آمونیاک منتقل گردیده تا اسیدیته آنها خنثی گردد (۱۰). بعد از طی این مراحل پاساژ بافتی (Tissue processor مدل DS2000/H شرکت دید سیز) داده شد و پس از تهیه بلوک های پارافینی نمونه ها بصورت عرضی به ضخامت ۷ میکرون برش خورده، توسط هماتوکسیلین و آئوزین رنگ آمیزی گردیدند. برای بررسی تغییرات کمی حجم بافت استخوانی از آنالیز استریولوژی بهره گرفتیم. برای انجام این روش برشها را بصورت سریال انجام داده و اولین شماره برش را بصورت تصادفی توسط شماره های ۱ تا ۹ انتخاب کرده و بقیه مقاطع با فاصله ۹۹ مقطع از همدیگر انتخاب شدند (دلیل انتخاب عدد ۹۹ بزرگی اندازه نمونه بود). در نهایت از هر نمونه حدود ۲۲ تا ۲۷ لام تهیه گردید. سپس لامها توسط میکروسکپ (Uromax ساخت هلند) مورد بررسی قرار گرفته و از تمام فیله های آنها توسط دوربین (Nikon ساخت ژاپن) عکس برداری گردید. عکس ها به

جدول شماره ۱: مقایسه میانگین حجم شاخص های رشد بافت استخوانی تیبیا به دنبال شکستگی تجربی آن بر حسب (میکرومتر مکعب)

شاخص بافتی	زمان آزمایش		گروه های آزمایش		گروه های کنترل	
	دوهفته ای	چهار هفته ای	دوهفته ای	چهار هفته ای	دوهفته ای	چهار هفته ای
بافت گرانوله و مزانشیمی	۱۴۸۱۰۳±۶۰۸	۹۶۴۹۶±۳۷	۱۲۴۸۹۵±۶۲	۴۱۷۲۳±۸۳۹		
بافت غضروفی	۱۲۰۶۲±۰۴۶*	۱۳۲۳۲±۶۲*	۷۳۷۹±۷۳۳	۵۵۹۸±۴۱۸		
بافت استخوانی نابالغ	۳۸۹۵۸±۳۴۷	۷۳۹۲۴±۵۶۷	۳۲۴۹۶±۲۷۳	۳۹۴۹۴±۲۹۶		

* $P < 0/05$ نسبت به گروه کنترل

گروه های آزمایش: گروه های دریافت کننده امواج اولتراسوند



تصویر شماره ۱: هجوم بافت غضروفی در محل شکستگی به ترتیب شامل گروه کنترل (A)، اولتراسوند هفتگی ۲ (B) و اولتراسوند ۴ هفتگی (C) می باشد و در تصویر C (بخش تحتانی) استخوان نابالغ هم دیده می شود (H&E, 10X).

اولتراسوند متناوب میانگین حجم بافت غضروفی رشد یافته در محل شکستگی، در مقایسه بین گروه های آزمایش و کنترل بطور معنی داری افزایش یافته بود ($P < 0.05$). اما سایر شاخص ها (حجم بافت گرانوله و مزانشیمی، استخوان نابالغ) تغییر چندانی نداشتند. مکانیزم اثر این امواج روی بافت ها بصورت افزایش فاکتور رشد اندوتلیالی عروق (Vascular endothelial growth factor) و افزایش رگ زایی، تنظیم فعالیت TGF- و آدنیلات سیکلاز، همچنین تحریک استخوان سازی از طریق سیگنال های کلسیمی داخل سلولی می باشد. همچنین نشان داده شده است که این امواج اثرات تحریکی روی استخوان سازی داخل غضروف داشته و تمایز سلول های استخوانی را تسریع می کند (۱۳). در مورد کاربرد امواج اولتراسوند

در ارتباط با میانگین تغییرات حجم بافت گرانوله و مزانشیمی و مقایسه آن بین گروه دریافت کننده امواج اولتراسوند ۴ هفته ای و گروه کنترل میزان بافت گرانوله در محل جوش خوردن استخوان کاهش یافته بود اما این میزان نیز اختلاف معنی داری را نشان نداد (تصویر شماره ۱، جدول شماره ۱). همچنین میانگین حجم بافت استخوانی نابالغ در محل جوش خوردن شکستگی در مقایسه بین گروه های دریافت کننده امواج اولتراسوند ۲ و ۴ هفته ای با گروه های کنترل تفاوت معنی داری را نشان نمی داد (جدول شماره ۱).

بحث:

نتایج این تحقیق نشان داد، تحت تاثیر امواج

Korstjens و همکارانش نیز نشان داد که تحت تاثیر امواج اولتراسوند روی محیط کشت سلول های استخوانی متاتارس های جنینی در دوره های سه و شش روزه با مقایسه گروه های آزمایش و کنترل حاکی از افزایش درصد حجم غضروف می باشد (۱۶). که نتایج این مطالعه با نتایج مطالعه ما هم خوانی دارد. مطالعات *In vitro* نیز نشان داده اند امواج اولتراسوند سبب تحریکاتی روی بیان ژنهای مرتبط با تشکیل غضروف گردیده و باعث مشارکت بیشتر کلسیم در تشکیل سلول های غضروفی شده و فعالیت آدنیل سیکلاز را تعدیل می کند (۱۸). در مطالعه حاضر بیشترین تاثیر این امواج در دوره چهار هفتگی بود. در مطالعه ای نیز با تاثیر اولتراسوند متناوب بر شکستگی جزئی تیبیای خرگوش دریافتند که بعد از ۲۸ روز تاثیر اولتراسوند بر ساق پای حیوان، رتبه توصیفی تشکیل بافت استخوانی جدید نسبت به گروه کنترل آن بطور معنی داری افزایش یافته در صورتی که در سایر دوره های زمانی این تفاوت وجود نداشت (۱۹). در باره موثرترین دوره زمانی تاثیر این امواج مطالعات متعددی بیان نموده اند که بیشترین تاثیر این امواج مربوط به دوره التهابی و تشکیل کالوس استخوانی است و تاثیر کمتری در دوره باز سازی استخوان دارد (۲۰). Yang و همکارانش نیز نشان دادند بیان ژن آگریکان در استخوان های فموری که تحت تاثیر امواج اولتراسوند متناوب قرار داشتند در مقایسه با گروهی که این درمان را دریافت نکردند در طی روز هفتم بطور معنی داری افزایش و روز چهاردهم کاهش یافت (۲۱). در مطالعه ای همچنین با ارزیابی بوسیله دوپلر دریافتند حداکثر تاثیر این امواج در دوره رگ زایی ناحیه شکستگی النای سگ در روز دهم و به میزان ۳۳ درصد بوده است. اما نتایج پژوهش دیگری نشان داد در طی دوره های مختلف از (۸-۱)، (۱۶-۹) و (۲۴-۱۷) روز تاثیر این امواج روی شکستگی فمور رات تراکم و نیروی گشتاوری استخوان بطور معنی داری نسبت به گروه کنترل افزایش یافت (۲۲). در بررسی تاثیر امواج اولتراسوند متناوب روی

متناوب روی بافت استخوانی تحقیقات گسترده ای به صورت *In vivo* و *In vitro* انجام گرفته و طیف وسیعی از شدت ها و فرکانس های مختلف مورد استفاده قرار گرفته اند (۱۴،۶،۴). در باره اثرات این امواج نتایج متناقض فراوانی بیان گردیده است. چنانکه یکی از این مطالعات اثر این امواج را در تسریع ترمیم استخوان در موارد عدم جوش خوردگی استخوان تیبیای رات موثر دانسته (۶) اما نتایج پژوهشی نشان داد این امواج روی شکستگی های تیبیا که فیکساتور داخلی داشته اند تاثیری نداشته و حتی شدت های بالاتر از ۱۰۰ میلی وات بر سانتی متر مربع را مضر گزارش کرده اند (۱۵). در نتایج مطالعه حاضر تنها شاخص تاثیر دار افزایش معنی دار میانگین حجم غضروف در محل شکستگی بود. نتیجه این بخش از تحقیق ما با نتایج تحقیقی که بصورت *In vitro* روی محیط کشت سلول های استخوانی اعمال گردید، همخوانی داشت. در این تحقیق امواج اولتراسوند با شدت ۳۰ میلی وات بر سانتی متر مربع با فرکانس ۱/۵ مگاهرتز را روی محیط کشت بافت غضروفی متاتارس های جنینی بکار بردند و بیان نمودند که حجم بافت غضروفی در حاشیه محیط کشت افزایش یافته است (۱۶). اما در مطالعه صدرایی و همکاران، نتایج نشان داد بافت کالوس شکستگی به شدت های ۵۰ و ۱۰۰ میلی وات بر سانتی متر مربع حساس نبوده و تاثیری بر ترمیم شکستگی تیبیای خرگوش نداشته است (۱۷). علت تفاوت در نتایج و موارد متناقض فراوان در تاثیر اولتراسوند بر ترمیم شکستگی ها و موارد عدم جوش خوردگی استخوان می تواند ناشی از تفاوت در فرکانس ها، دوزهای مختلف، مدت زمان استفاده، دوره زمانی کاربرد این امواج، ساختار فیزیولوژیک بافت استخوانی در مدل های مختلف، ساختمان های بافت نرم مجاور در معرض این امواج و محیط *In vitro* یا *In vivo* می باشند. تحت تاثیر دوره زمانی کاربرد این امواج روی استخوان تیبیا تنها شاخص حجمی که تحت تاثیر این دوره زمانی تغییر نمود، افزایش حجم بافت غضروفی طی دوره های زمانی دو و چهار هفتگی بود. نتایج مطالعه

در مطالعه Takayama و همکاران نیز در محیط کشت سلول های ROS 17/2.8 نشان داده شد که امواج اولتراسوند متناوب سبب تحریک ژنهای وابسته به استئوژنز گردیده و سبب جلو بردن روند تشکیل نودول های استخوانی در محیط کشت می گردد (۲۴). در حالی که در مطالعه ای بصورت دو سویه کور روی ماندیبول محققین نشان دادند که امواج اولتراسوند متناوب با شدت ۳۰ میلی وات بر سانتی متر مربع و فرکانس ۱/۵ مگاهرتز هیچگونه اثر تحریکی استخوان سازی بر استخوان ماندیبول که سایدگی زیادی داشته ندارد (۱۴). دلیل این تفاوت ها را شاید نهایتاً به فاکتورهای متعددی از آن جمله نوع مطالعه، شدت های متفاوت در امواج بکار گرفته شده، تفاوت های فیزیولوژیک بافت ها وابسته دانست.

نتیجه گیری:

در مجموع بنظر می رسد امواج اولتراسوند متناوب روی روند استخوان سازی بخصوص در استخوان سازی داخل غضروفی نقش بسزایی داشته باشد. اما با توجه به تعدد مطالعات و تناقض های موجود پیشنهاد می گردد یک مطالعه چند مرکزی (Multi center) و با اقسام گوناگون مطالعات و با تفکیک پارامترهای مختلف دخیل در این امواج صورت پذیرد تا نتیجه قطعی بدست بیاید.

تشکر و قدردانی:

این مقاله حاصل بخشی از طرح تحقیقاتی مصوب معاونت آموزش تحقیقات و فن آوری دانشگاه علوم پزشکی اراک می باشد که از معاونت محترم و کارشناسان آن واحد تشکر به عمل می آید.

بافت گرانوله و مزانشیمی تمایز نیافته نتایج این مطالعه نشان داد که این امواج در گروهی که دو هفته امواج را دریافت نموده اند نسبت به گروه کنترل مقدار مختصری حجم بافت گرانوله را کاهش داده اند اما در گروه چهار هفتگی این مقادیر افزایش یافته اند که البته ارتباط معنی داری بین هیچکدام وجود ندارد. اما دلیل این افزایش در گروهی که بمدت ۴ هفته امواج را دریافت نمودند ممکن است ناشی از توانایی این امواج در تسریع تمایز سلولی در سلول های مزانشیمی تمایز نیافته به بافت غضروفی ناحیه شکستگی باشد. چنانکه در مطالعه ای بیان گردیده که این امواج سبب افزایش تمایز سلولی شده ولی سرعت رشد سلول ها را در محیط کشت کندرو بلاست های متاتارس ها افزایش نداده اند (۱۶). در حالی که در مطالعه Li و همکاران بیان گردیده است که نوع خاصی از امواج اولتراسوند (فرکانس ۱ مگاهرتز متناوب، با شدت ۶۰۰ میلی وات بر سانتی متر مربع) سبب افزایش جمعیت اوستئو بلاستی در محیط کشت نیز گردیده اند (۲۳). در مطالعه حاضر این افزایش حجم معنی دار نبود و این تفاوت ممکن است ناشی از تفاوت در نوع مطالعه و مشخصات تحریکات بکار برده باشد. در ارتباط با میزان تغییرات حجمی استخوان نابالغ در محل شکستگی و تفاوت آن بین گروه های دریافت کننده امواج اولتراسوند و گروه های کنترل روند تغییرات بصورت افزایشی بوده اما تغییرات آن معنی داری نمی باشند. ولی در مطالعه Korstjens و همکاران بیان گردیده است، در محیط کشت کندرو بلاستی حجم بخش استخوانی در حاشیه ناحیه غضروفی در حال رشد در طی روزهای سوم تا ششم که تحت تاثیر امواج اولتراسوند بوده اند افزایش یافته است (۱۶).

1. Erdogan O, Esen E, Ustun Y, Kurkcü M, Akova T, Gonlusen G, et al. Effects of low-intensity pulsed ultrasound on healing of mandibular fractures: an experimental study in rabbits. *J Oral Maxillofac Surg.* 2006 Feb; 64(2): 180-8.
2. Tsiridis E, Upadhyay N, Giannoudis P. Molecular aspects of fracture healing: which are the important molecules? *Injury.* 2007 Mar; 38(Suppl 1): 11-25.
3. Maddi A, Hai H, Ong ST, Sharp L, Harris M, Meghji S. Long wave ultrasound may enhance bone regeneration by altering OPG/RANKL ratio in human osteoblast-like cells. *Bone.* 2006 Aug; 39(2): 283-8.
4. Reher P, Harris M, Whiteman M, Hai HK, Meghji S. Ultrasound stimulates nitric oxide and prostaglandin E2 production by human osteoblasts. *Bone.* 2002 Jul; 31(1): 236-41.
5. Ikeda K, Takayama T, Suzuki N, Shimada K, Otsuka K, Ito K. Effects of low-intensity pulsed ultrasound on the differentiation of C2C12 cells. *Life Sci.* 2006 Oct; 79(20): 1936-43.
6. Takikawa S, Matsui N, Kokubu T, Tsunoda M, Fujioka H, Mizuno K, et al. Low-intensity pulsed ultrasound initiates bone healing in rat nonunion fracture model. *J Ultrasound Med.* 2001 Mar; 20(3): 197-205.
7. Bulut O, Eroglu M, Ozturk H, Tezeren G, Bulut S, Koptagel E. Extracorporeal shock wave treatment for defective nonunion of the radius: a rabbit model. *J Orthop Surg.* 2006 Aug; 14(2): 133-7.
8. Wang FS, Wang CJ, Huang HJ, Chung H, Chen RF, Yang KD. Physical shock wave mediates membrane hyperpolarization and Ras activation for osteogenesis in human bone marrow stromal cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001 Sep; 287(3): 648-55.
9. Saito M, Soshi S, Tanaka T, Fujii K. Intensity-related differences in collagen post-translational modification in MC3T3-E1 osteoblasts after exposure to low- and high-intensity pulsed ultrasound. *Bone.* 2004 Sep; 35(3): 644-55.
10. Bancroft JD, Gamble M. *Bone.* In: Bancroft JD, Gamble M. *Theory and practice of histological techniques.* China: Harcourt Publishers Limited; 2002. P: 269-300.
11. Howard CV, Reed MG. *Unbiased stereology: three-dimensional measurement in microscopy.* 2nd ed. New York: Priscilla Goldby. 1998; p: 15-20.
12. Mahmoudzadeh Sagheb HR. [A stereological analysis of number and volume of renal glomeruli following chronic Lead acetate intoxication. Research thesis for PhD of histology. Ahvaz Univ of Med Sci. 1380.]Persian
13. Siska PA, Gruen GS, Pape HC. External adjuncts to enhance fracture healing: what is the role of ultrasound? *Injury.* 2008 Oct; 39(10): 1095-105.
14. Schortinghuis J, Bronckers AL, Stegenga B, Raghoobar GM, de Bont LG. Ultrasound to stimulate early bone formation in a distraction gap: a double blind randomized clinical pilot trial in the edentulous mandible. *Arch Oral Biol.* 2005 Apr; 50(4): 411-20.
15. Emami A, Petren-Mallmin M, Larsson S. No effect of low-intensity ultrasound on healing time of intramedullary fixed tibial fractures. *J Orthop Trauma.* 1999 May; 13(4): 252-7.
16. Korstjens CM, Nolte PA, Burger EH, Albers GH, Semeins CM, Aartman IH, et al. Stimulation of bone cell differentiation by low-intensity ultrasound-a histomorphometric in vitro study. *J Orthop Res.* 2004 May; 22(3): 495-500.

17. Sadraei SH, Kaka GHR, Bahadoran H, Mirshafiei GHA, Ghanjal A, Rezaei YA, et al. [Study of the effects of low – intensity pulsed ultrasound on fracture healing of tibia in rabbits. (A histomorphometrical and immunohistochemical evaluation). *Kowsar Med J.* 2007; 12(3): 229-37.]Persian
18. Tis JE, Meffert CR, Inoue N, McCarthy EF, Machen MS, McHale KA, et al. The effect of low intensity pulsed ultrasound applied to rabbit tibiae during the consolidation phase of distraction osteogenesis. *J Orthop Res.* 2002 Jul; 20(4): 793-800.
19. Bashardoust S, Kazemi S, Shahverdi AH, Azari A, Imani H, Jabal Ameli M. [Effects of 1MHz frequency ultrasound on bone tissue after partial osteotomy in rabbits: a histologic study. *Yakhteh Med J.* 2003; 17(5): 29-34.]Persian
20. Claes L, Willie B. The enhancement of bone regeneration by ultrasound. *Prog Biophys Mol Biol.* 2007 Jan-Apr; 93(1-3): 384-98.
21. Yang KH, Parvizi J, Wang SJ, Lewallen DG, Kinnick RR, Greenleaf JF, et al. Exposure to low-intensity ultrasound increases *aggrecan* gene expression in a rat femur fracture model. *J Orthop Res.* 1996 Sep; 14(5): 802-9.
22. Azuma Y, Ito M, Harada Y, Takagi H, Ohta T, Jingushi S. Low-intensity pulsed ultrasound accelerates rat femoral fracture healing by acting on the various cellular reactions in the fracture callus. *J Bone Miner Res.* 2001 Apr; 16(4): 671-80.
23. Li JK, Chang WH, Lin JC, Ruaan RC, Liu HC, Sun JS. Cytokine release from osteoblasts in response to ultrasound stimulation. *Biomaterials.* 2003 Jun; 24(13): 2379-85.
24. Takayama T, Suzuki N, Ikeda K, Shimada T, Suzuki A, Maeno M, et al. Low-intensity pulsed ultrasound stimulates osteogenic differentiation in ROS 17/2.8 cells. *Life Sci.* 2007 Feb; 80(10): 965-71.