

اثر اولتراسوند متناوب بر میزان آلکالین فسفاتاز سرمی در روند جوش خوردگی تیبیای خرگوش نیوزیلندی

ابوالحسن سخایی^{۱*}، علی قضاوی^۲، دکتر حسینعلی هادی^۳، دکتر قاسم مسیعی^۴

۱- مربی، گروه آناتومی، دانشگاه علوم پزشکی اراک

۲- مربی، گروه میکروبی شناسی و ایمنی شناسی، دانشگاه علوم پزشکی اراک

۳- استادیار، متخصص جراحی ارتوپدی، بیمارستان ولی عصر اراک

۴- استادیار، گروه میکروبی شناسی و ایمنی شناسی، دانشگاه علوم پزشکی اراک

تاریخ دریافت ۸۶/۶/۲۹، تاریخ پذیرش ۸۶/۱۰/۲۶

چکیده

مقدمه: آلکالین فسفاتاز (ALP) سرمی، گلیکو پروتئین مترشحه اوستئو بلاستی است. در شکستگی‌ها میزان ALP تغییر می‌کند. امواج اولتراسوند متناوب و با شدت پایین، رشد و بازسازی استخوان را در شکستگی‌ها تسریع می‌کنند. با این حال ارتباط بین اولتراسوند متناوب و تغییرات میزان ALP سرمی در خرگوش نیوزیلندی مورد بررسی قرار نگرفته است. هدف از انجام این مطالعه بررسی اثرات اولتراسوند متناوب با شدت پایین، بر سطح سرمی ALP در خلال روند جوش خوردگی تیبیای خرگوش نیوزیلندی است.

روش کار: این مطالعه تجربی بود. تعداد ۵۴ سر خرگوش نر بالغ نژاد نیوزیلندی به طور تصادفی در شش گروه (سه گروه آزمایش و سه گروه کنترل) قرار داده شدند. تمام شش گروه برای ایجاد یک مدل شکستگی تحت جراحی قرار گرفتند. بعد از ترمیم زخم‌ها، ساق پای حیوانات گروه‌های آزمایش به ترتیب به مدت ۲، ۴ و ۶ هفته، تحت تاثیر امواج اولتراسوند قرار داده شد. حیوانات گروه‌های کنترل نیز بدون هیچ‌گونه دخالتی طی همین دوره زمانی نگاه‌داری شدند. بعد از طی این زمان‌ها، پس از بیهوش کردن حیوانات از قلب آنها خون‌گیری و کشته شدند. سپس سرم آنها جدا گردید و آنزیم ALP سرم توسط اسپکتروفوتومتر قرائت گردید. داده‌ها با آزمون‌های من ویتنی یو و کروسکال والیس مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

نتایج: نتایج نشان داد که میانگین سطح سرمی ALP در گروه آزمایشی که به مدت ۴ هفته امواج اولتراسوند متناوب را دریافت کردند نسبت به گروه کنترل خودش، به طور معنی‌داری افزایش یافته بود ($p=0/03$). در سایر گروه‌ها تغییرات معنی‌داری مشاهده نشد.

نتیجه گیری: نتایج این مطالعه نشان داد که امواج اولتراسوند متناوب و با شدت پایین، سطح سرمی ALP را افزایش داده و جوش خوردگی استخوان را تسریع می‌نماید.

واژگان کلیدی: امواج اولتراسوند متناوب، آنزیم آلکالین فسفاتاز، استخوان، ترمیم

*نویسنده مسئول: اراک، سردشت، دانشکده پزشکی، گروه آناتومی

Email: anatomy_47@yahoo.com

مقدمه

ترمیم استخوان یک روند فیزیولوژیک پیچیده است که چندین گروه از سلول‌ها، پروتئین‌ها، فاکتورهای رشد و صدها ژن در آن مشارکت دارند (۵-۱). برخی فاکتورهای سرمی همانند آلکالین فسفاتاز (ALP)^۱، کلسیم و فسفر به عنوان مارکرها بیوشیمیایی در طی ترمیم استخوان تغییر کرده و از این فاکتورها می‌توان به عنوان شاخص آزمایشگاهی مناسبی جهت ارزیابی روند ترمیم استفاده نمود (۱). ALP استخوانی یک گلیکو پروتئین مشخص کننده رده استئوبلاستی است که در تمایز سلول‌های استخوانی و فنوتیپ استئوبلاستی نقش دارد. ALP نقش اساسی در رسوب کلسیم در کال غضروفی اطراف محل شکستگی در استخوان‌های بلند دارد. نقش اختصاصی دیگر ALP، هیدرولیز کردن مقادیر متناوبی استرهای فسفات و انتقال آنها به ماتریکس استخوانی در حال تشکیل است. بعد از شکستگی‌ها فعالیت آنزیمی ALP رو به افزایش گذاشته و به میزان قابل ملاحظه‌ای بالا می‌رود (۳). امواج اولتراسوند با تأثیر بر ALP و اوستئو کلسین، که یک پروتئین ماتریکس استخوانی است، در تسریع ساخت بافت استخوانی نقش دارند (۴). اثرات بیولوژیک امواج اولتراسوند، تحریک رشد و تمایز فیبرو بلاست‌ها و کندرو بلاست‌ها، بیان ژن‌های مربوط به رگ زایی و افزایش جریان خون در ناحیه شکستگی است. این امواج باعث افزایش ورود پتاسیم در غشاء سلولی سلول‌های کشت داده شده، تنظیم فعالیت آنزیم آدنیل سیکلاز و تنظیم سنتز $TGF-\beta$ می‌شوند. با کاربرد اولتراسوند، ورود کلسیم به داخل سلول افزایش می‌یابد و در نتیجه آن، فعالیت پیامبرهای ثانویه افزایش یافته و فاکتورهای رشد استخوانی مانند $TGF-\beta$ ، فعالیت اوستئوبلاستی را تسریع می‌کنند (۵). با توجه به این که در بررسی‌های انجام شده، مطالعه‌ای در مورد ارتباط بین تغییرات

سطح سرمی ALP با تحریکات امواج اولتراسوند متناوب مشاهده نشد انجام این مطالعه ضروری به نظر می‌رسید. هدف از انجام مطالعه حاضر، بررسی سطح سرمی ALP در خلال روند ترمیم استخوان به دنبال استفاده از امواج اولتراسوند متناوب با شدت پایین به عنوان یک شاخص کمی جهت بررسی روند ترمیم استخوان است.

روش کار

این مطالعه تجربی بود. تعداد ۵۴ سر خرگوش نر بالغ نژاد نیوزیلندی با حدود سنی ۴/۵ ماه از موسسه تحقیقات و سرم سازی رازی خریداری شدند. حیوانات به مدت یک هفته در محیط حیوان خانه نگهداری شده تا با شرایط محیطی موجود تطابق حاصل نمایند. دمای محیط بین ۱۸ تا ۲۳ درجه سانتی‌گراد متغیر بود. هر کدام از حیوانات در یک قفس جداگانه با مختصات ۲۸×۴۳×۳۹ سانتی‌متر نگهداری شدند. برای حیوانات، دسترسی آزادانه به آب و غذای مخصوص خرگوش وجود داشت. حیوانات به صورت تصادفی در ۳ گروه آزمایش (دریافت کننده امواج اولتراسوند) و ۳ گروه کنترل (بدون دریافت امواج اولتراسوند) قرار داده شدند. برای بررسی اثرات اولتراسوند بر روند ترمیم استخوان، ساق پای راست حیوانات جراحی گردید.

روش جراحی: ابتدا موی ساق پای راست حیوانات تمییز گردیده و حیوانات با کتامین (۳۵ میلی‌گرم به ازای هر کیلو گرم وزن بدن) و رامپون (۱۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن) بیهوش گردیدند. سپس از ۱/۵ سانتی‌متری زیر تکمه تیبیا با تیغ جراحی سایز ۱۰، برشی به طول ۲/۵ سانتی‌متر در سطح داخلی ساق پا داده شد و پوست، فاسیا و پریوستیوم روی تیبیا کنار زده شده و توسط فرز دندانپزشکی تیبیای خرگوش‌ها، اوستئوتومی کامل گردید. سپس فاسیا و پوست دوخته شد و پا با آتل آلومینیومی فیکس شده و بانداز گردید. دو هفته بعد از جراحی و ترمیم کامل زخم، ساق پای حیوانات

1 - Alkaline phosphatase.

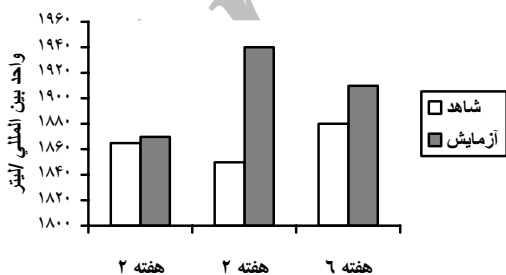
2 - Transforming growth factor- Beta.

نتایج

تغییرات میزان ALP سرمی در گروه‌های آزمایش و شاهد به این شرح بود:

در گروه حیواناتی که دو هفته تحت تأثیر امواج اولتراسوند قرار گرفتند، میزان افزایش ALP نسبت به گروه کنترل خودش ۳/۵ واحد بین المللی در لیتر بود. در گروه حیواناتی که چهار هفته تحت تأثیر امواج اولتراسوند قرار گرفتند میزان افزایش ALP نسبت به گروه کنترل خودش ۲۱۴ واحد بین المللی در لیتر بود. در گروه حیواناتی که شش هفته تحت تأثیر امواج اولتراسوند قرار گرفتند، میزان افزایش ALP نسبت به گروه کنترل خودش ۱۳۳ واحد بین المللی در لیتر بود. اختلاف میزان تغییرات سطح سرمی ALP بین سه گروه آزمایشی معنی دار بود ($p < 0/05$ ، نمودار ۱)

میانگین تغییرات سطح سرمی ALP در گروه آزمایشی که امواج اولتراسوند را به مدت ۴ هفته دریافت کردند، معنی دار بود ($p = 0/03$). میانگین تغییرات ALP در گروهی که امواج اولتراسوند را به مدت ۲ هفته دریافت کردند، معنی دار نبود. در گروهی که امواج اولتراسوند را به مدت شش هفته دریافت کردند هر چند افزایش در سطح ALP سرمی مشاهده شد ولی این افزایش معنی دار نبود (نمودار ۱).



نمودار ۱. میانگین غلظت سرمی ALP در گروه‌های آزمایش و مقایسه آن با گروه‌های کنترل

گروه‌های آزمایش توسط دستگاه اولتراسوند (سونوپالس ۴۹۰S ساخت کمپانی انراف هلند) با شدت ۰/۰۵ وات بر سانتی‌متر مربع و فرکانس ۱ مگا هرتز و با تناوب ۵۰ درصد تحت تأثیر امواج اولتراسوند قرار گرفتند. مدت زمان انجام اولتراسوند برای گروه‌های آزمایش به ترتیب دو، چهار و شش هفته بود. حیوانات گروه‌های کنترل در همان شرایط بدون دریافت اولتراسوند نگاه‌داری شدند. ۲۴ ساعت بعد از اتمام دوره اولتراسوند، حیوانات بیهوش گردیده و با سرنگ، ۵ میلی لیتر خون از قلب آنها گرفته شد. سپس با رعایت دستورالعمل مربوط به حمایت از حیوانات آزمایشگاهی، حیوانات با تزریق داخل قلبی ۲ میلی مول به ازای هر کیلوگرم کلرید سدیم کشته شدند.

سنجش آنزیم ALP: فعالیت آنزیم ALP به روش استاندارد انجمن شیمی بالینی آمریکا (AACC) و فدراسیون بین المللی شیمی بالینی (IFCC) و توسط کیت شرکت زیست شیمی ایران اندازه‌گیری شد (۶، ۷). در این روش آنزیم ALP سرم، سوپسترای بی رنگ ۴- نیترو فنیل فسفات (۴-NPP) را در $pH = 10/3$ و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد هیدرولیز می‌کند و به ۴- نیترو فنل زرد رنگ تبدیل می‌کند. دقیقاً پس از گذشت ۱۵ دقیقه، با اضافه کردن هیدروکسید سدیم، واکنش آنزیمی متوقف شد و شدت رنگ با اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۰۵ نانومتر قرائت شد. فعالیت آنزیم ALP با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید:

$1000 \times \text{جذب استاندارد} / \text{جذب بلانک} - \text{سرم} - \text{جذب آزمایش} = \text{فعالیت آنزیم ALP (واحد بین المللی در لیتر)}$

تجزیه و تحلیل آماری: توزیع نرمال داده‌ها توسط آزمون نرمالیتی کولموگروف - اسمیرنوف بررسی گردید و با استفاده از آزمون‌های من ویتنی یو و کروسکال والیس، داده‌ها مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. $p < 0/05$ معنی دار محسوب شد.

بحث

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که بین افزایش سطح سرمی ALP با تحریکات اولتراسوند متناوب در هفته چهارم بعد از شکستگی ارتباط معنی داری وجود دارد. در مورد نقش آنزیمی ALP و ارتباط آن با رشد استخوانی مطالعات وسیعی صورت گرفته است (۱، ۲، ۵). افزایش میزان ALP ارتباط مستقیمی با سرعت رشد استخوان دارد (۲). ولپین و همکاران نشان دادند افزایش ALP در سرم، ناشی از افزایش فعالیت کندروبلاستی است و فعالیت کندروبلاستی باعث تشکیل جزایر استخوانی در ماتریکس و تسریع جوش خوردگی استخوان می شود (۳).

در استخوان سازی داخل غضروفی، شروع رسوب هیدروکسی آپاتیت در داخل و اطراف ماتریکس نشان دهنده افزایش فعالیت ALP است (۱). در مطالعه ای روی سگ ها نشان داده شد که در حیواناتی که تاخیر در جوش خوردگی استخوان داشتند، میزان ALP هم چنان بالا باقی ماند. ولی در گروهی که جوش خوردگی سریع تر بود، میزان ALP زودتر به حد طبیعی خودش برگشت (۳).

رونک-سن و همکاران نشان دادند که امواج اولتراسوند، بلوغ اوستئو بلاستی را افزایش داده و روند تولید اوستئو کلاست ها را کم می کند. هم چنین امواج اولتراسوند پیوسته، باعث افزایش فعالیت ALP شده و تشکیل جزایر استخوانی را تشدید می کند (۸). با استفاده از اولترا سوند بر روی رده سلول های اوستئو بلاستی، ورود کلسیم داخل سلولی افزایش یافته و در نتیجه فعالیت پیامبرهای ثانویه و β - TGF افزایش می یابد (۵). از طرف دیگر تحقیقات روی کندرو بلاست های کشت داده شده، نشان داد که امواج اولتراسوند، میزان بیان mRNA آلکالین فسفاتاز و استئو کلسین را بالا برده و این تغییرات باعث تشکیل استخوان جدید می شود (۹). در مجموع نتایج حاصل از این مطالعات نشان می دهند که اولاً میزان ALP سرمی ارتباط مستقیمی با فعالیت کندرو بلاست ها

دارد و ثانياً اولتراسوند نوع پیوسته، سطح سرمی ALP را هم در محیط کشت (۱۰) و هم به صورت In vivo افزایش می دهد (۱۱). این نتایج با مطالعه ما که در آن از امواج اولتراسوند نوع متناوب استفاده شد، هم خوانی دارد. اولترا سوند نوع متناوب در این مطالعه باعث افزایش ALP تا هفته چهارم شد و ادامه آن تا هفته ششم، تأثیری بر افزایش ALP نداشت. بنابراین می توان نتیجه گرفت که در خرگوش های نیوزیلندی احتمالاً حداکثر رشد استخوانی تیبیا تا هفته چهارم است و بعد از آن پدیده رسوب کلسیم روی کال استخوانی اتفاق می افتد و استخوان تازه تشکیل شده محکم می شود. در مطالعه تاداهيرو نیز نشان داده شده است که در حضور تحریکات اولتراسوند، فعالیت آنزیمی ALP روی رده سلولی ROS17/2.8 تا روز هفتم به میزان معنی داری افزایش می یابد و در طی این زمان حداکثر فعالیت رسوب یون های معدنی اتفاق افتاد. سپس این میزان تا روز دهم کاهش می یابد (۹).

نتیجه گیری

امواج اولتراسوند متناوب در مدت زمان مشخصی باعث حداکثر افزایش در فعالیت ALP و روند استخوان سازی می شوند و استفاده بیشتر از آنها تغییرات چندانی ایجاد نمی کند. بنابراین با سوق دادن این مطالعه به سمت مطالعات انسانی می توان نتیجه گرفت که اولاً با تحریکات اولترا سوند مناسب می توان باعث تسریع جوش خوردگی استخوان شد و در نتیجه مدت زمان بستری شدن بیماران و هزینه های درمانی آنها را کاهش داد. ثانياً بررسی سطح سرمی ALP، یک فاکتور مناسب برای پی گیری روند جوش خوردگی استخوان است. بنابراین پیشنهاد می گردد، سطح سرمی ALP در طی زمان های مختلف استفاده از امواج اولتراسوند در شکستگی های استخوانی نمونه های انسانی مورد سنجش قرار گیرد و در صورت تأیید نتایج مطالعه حاضر، به عنوان یک

increases the fracture callus strength in diabetic BB Wistar rats but does not affect cellular proliferation. *Journal of Orthopedic Research* 2002; 20: 587-92.

6. Burtis CA, Ashwood ER. *Tietz text book of clinical chemistry*. 3rd ed. Philadelphia: Saunders company; 1999. p.617-716.

7. Tietz NW. *Clinical guide to laboratory tests*. 3rd ed. Philadelphia: Saunders company; 1999. p. 30-6.

8. Rong-Sen Y, Win-Li L, Ying-Zehn Ch, Chih-Hsin T, Tsang-Hai H, et al. Regulation by ultrasound treatment on the integrin expression and differentiation of osteoblasts. *Bone* 2005; 36: 276-83.

9. Takayama T, Suzuki N, Ikeda K, Shimada T, Suzuki A. low-intensity pulsed ultrasound stimulates osteogenic differentiation in ROS 17/2.8 cells. *Life science* 2007; 80: 965- 71.

10. Warden SJ, Favalaro JM, Bennell KL, McMeeken JM, Kong-Wah NG, Zajac JD, Wark JD. Low-Intensity Ultrasound stimulates a bone-forming response in UMR-106 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communication* 2001; 286: 443- 45.

11. Duarte LR. The stimulation of bone growth by ultrasound. *Arch Orthp Surg* 1983; 101: 153- 61.

شاخص جهت بررسی روند جوش خوردگی استخوان‌ها در کنار سایر آزمایشات پاراکلینیکی مورد استفاده قرار گیرد.

منابع

1. Komnenou A, Karayannopoulou M, Polizopoulou ZS, Constantinidis TC, Desasiris A. Correlation of serum alkaline phosphatase activity with the healing process of long bone fracture in dogs. *Veterinary Clinical Pathology* 2005; 34:35-8.
2. Taniguchi T, Matsumoto T, Shindo H. Changes of serum levels of osteocalcin, alkaline phosphatase, IGF- I and IGF- binding protein-3 during fracture healing injury. *J Care Injured* 2003; 34: 477- 79.
3. Volpin. G, Rees JA, Ali SY, Bentley G. Distribution of alkaline phosphatase activity in experimentally produced callus in rats. *The journal of bone and joint surgery* 1986; 68-B: 629- 34.
4. Stuart J, Warden SJ, Jenny M, Favalaro KL, Bennell JM, McMeeken. Low-intensity pulsed ultrasound stimulates a bone-forming response in UMR -106 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2001; 286: 443-50.
5. Gebauer GP, Sheldon S, Lin H, Bean A, Viera PJ, Parsons R. Low-intensity pulsed ultrasound

The effect of pulsed ultrasound on serum Alkaline Phosphatase during bone healing of tibia in New Zealand rabbit

Sakhaie A^{*3}, Ghazavi A⁴, Hadi HA⁵, Mosayebi Gh⁶

Abstract

Introduction: Serum Alkaline Phosphatase (ALP) is a glycoprotein that is secreted from osteoblasts. In fractures, the rate of ALP will be changed. Low intensity pulsed ultrasound accelerates the growth and remodeling of fractures. However the relation between pulsed ultrasound and changing the rate of serum ALP in New Zealand rabbit is not studied yet. The aim of this study is to investigate the effect of pulsed ultrasound on serum ALP during bone healing of tibia in New Zealand rabbit.

Materials and Methods: This is an experimental study. 54 male and mature New Zealand rabbits were randomly divided into six groups (3 experimentals and 3 controls). All of them were operated for inducing a model of experimental fracture. After repair of wounds, the right leg of experimental groups was exposed to pulsed ultrasound for 2, 4 and 6 weeks. The control groups were kept without any intervention during the same time. After experiment, the rabbits were anesthetized and blood samples were taken from their hearts for ALP serology, and then the rabbits were killed. Blood was centrifuged and serum ALP was read by spectrophotometer. Data was analyzed by Mann-Whitney U and Kruskal-Wallis tests.

Results: Results showed that the mean serum ALP level in experimental group after 4 weeks exposing to pulsed ultrasound was significantly higher as compared to control group ($p=0.03$). There was no significant difference between the other groups.

Conclusion: The results of this study demonstrate that pulsed ultrasound wave increases serum ALP and accelerates the bone healing.

Key words: Pulsed ultrasonography, Alkaline Phosphatase (ALP), bone, healing.

*Corresponding author;

Email: anatomy_47@yahoo.com

Address: Department of anatomy, school of medicine, Arak University of medical sciences, Sardasht, Arak, Iran.

3- Lecturer, department of anatomy, school of medicine, Arak University of medical sciences, Arak, Iran.

4- Lecturer, department of microbiology and immunology, school of medicine, Arak University of medical sciences.

5- Orthopaedic surgen, Vali-e-Asr hospital, Arak, Iran.

6- Assistant professor of immunology, department of microbiology and immunology, school of medicine, Arak University of medical sciences, Arak, Iran.