



ارزیابی تأثیر تزریق داخل عضلانی هورمون رشد بر تغییرات هیستومورفومتری صفحه رشد استخوان‌ها در خرگوش نابالغ

فرزانه حسینی^{۱*}، ایرج کریمی^۲، مرتضی حسینی نژاد^۳، سعید حبیبیان دهکردی^۴

۱. استادیار، گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد- ایران.

۲. دانشیار، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد- ایران.

۳. دانشیار، گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد- ایران.

۴. دانشیار، گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد- ایران.

پذیرش: ۸ خردادماه ۹۵

دریافت: ۱۸ بهمن ماه ۹۴

چکیده

این پژوهش به منظور ارزیابی تأثیرات هیستوپاتولوژیک هورمون رشد بر صفحه رشد برخی استخوان‌ها در خرگوش نابالغ به انجام رسید. بدین منظور، شانزده راس خرگوش سفید نیوزلندی نابالغ نر با سن ۴-۲ ماه، به دو گروه آزمایش (گروه اول) و کنترل (گروه دوم) تقسیم شدند. به گروه آزمایش، در فواصل ۷ روزه به مدت ۱۰ هفته، ۰/۳ واحد به ازای هر کیلوگرم وزن بدن به مدت ده هفته، سوماتوتروپین به صورت عضلانی تزریق شد و به گروه کنترل در فواصل مشابه، هم حجم دارو، نرمال سالین تزریق گردید. در پایان مطالعه، خرگوش‌ها با تزریق داروی بیهوشی، کشته شدند و استخوان‌های زند زبرین، بازو، ران، درشت نی و مهره اول کمری جداسازی شد و بررسی مورفومتریکی روی دو انتها و بخش میانی صفحه رشد انجام گردید و داده‌های به دست آمده (به میلی‌متر) به روش آنالیز واریانس یک‌طرفه مقایسه شدند. نتایج بررسی نشان داد قطر صفحه رشد استخوان زند زبرین، در گروه اول نسبت به گروه دوم، تفاوت معنی‌داری نداشت در حالیکه اندازه‌گیری قطر صفحه رشد در استخوان‌های ران ($P=0/039$)، بازو ($P=0/045$)، درشت نی ($P=0/047$) و مهره اول کمری ($P=0/023$)، نشان دهنده افزایش معنی‌دار قطر صفحه رشد نسبت به گروه کنترل بود. نتایج این بررسی نشان داد تزریق دزاً پایین سوماتوتروپین در مدت زمان مذکور، در خرگوش‌های نابالغ منجر به افزایش قطر صفحه رشد و کمک به فعالیت طولانی‌تر آن در فرایند رشد استخوان‌های کورتیکال و تراپیکولار می‌شود و در عین حال، تأثیر یکسانی بر استخوان‌های بلند ندارد.

واژه‌های کلیدی: نهورمون رشد، خرگوش، صفحه رشد.

مقدمه

بررسی، اقدام به تزریق مستقیم هورمون رشد به داخل صفحه رشد استخوان درشت نی شده، که منجر به افزایش طول استخوان گردیده است (۶). بسیاری از گونه‌های حیوانات هورمون رشد اختصاصی دارند در حالیکه اغلب پستانداران از جمله خرگوش‌ها به هورمون رشد انسانی پاسخ می‌دهند (۴).

تحریک بیش از اندازه صفحات رشد توسط داروهای دیگر توانسته است منجر به تخلیه سریع سلول‌های بنیادی

هورمون رشد برای رشد و نمو حیوانات و رشد استخوان‌ها ضروری است. رشد طولی استخوان‌ها در حیوانات در نتیجه تکثیر کندروسیت‌ها در صفحه رشد اتفاق می‌افتد. نمود این رشد وقتی مشخص می‌شود که هیپوفیز حیوان برداشته شود. در این صورت، میزان تکثیر سلول‌ها کم می‌شود در حالیکه تجویز هورمون رشد منجر به افزایش تقسیمات سلولی در این محل می‌شود. در یک





تحت نگهداری قرار گرفتند. پس از آن، خرگوش‌ها به طور تصادفی، به دو گروه آزمایش (گروه اول) و کنترل (گروه دوم) تقسیم شدند. به گروه آزمایش، در فواصل ۷ روزه به مدت ۱۰ هفته، به میزان ۰/۳ واحد به ازای هر کیلوگرم وزن بدن، سوماتوتروپین سنتتیک انسانی به صورت عضلانی تزریق شد و به گروه کنترل در فواصل مشابه، هم حجم دارو، نرمال سالین تزریق گردید (۶). خرگوش‌های گروه آزمایش، در مجموع، ده مرتبه، دارو دریافت کردند.

در انتهای مطالعه، خرگوش‌ها با تزریق وریدی داروی بی‌هوشی نسدونال به میزان دو برابر دوز معمول، کشته شد و مورد کالبدگشایی قرار گرفتند. استخوان‌های زند زبرین (Radius)، بازو (Humerus)، ران (Femur)، درشت نی (Tibia) و مهره اول کمری (lumbar Vertebrae) هر کدام از خرگوش‌ها در بخش کالبدگشایی و هیستوپاتولوژی دانشکده دامپزشکی جداسازی شد و برای مطالعات هیستوپاتولوژیک آماده‌سازی شدند.

به منظور بررسی هیستوپاتولوژیک، ابتدا استخوان‌ها به مدت سه روز در محلول فرمالین ۱۰ درصد قرار گرفتند؛ سپس روند کلسیم‌زدایی (Decalcification) با قرار دادن استخوان‌ها در محلول اسید نیتریک ۵ درصد در آب مقطر تا زمان آماده شدن بافت استخوان برای انجام برش پاتولوژیک انجام شد؛ سپس استخوان‌ها به مدت دو روز دیگر در محلول فرمالین ۱۰ درصد قرار گرفتند (۲).

با تهیه مقاطع هیستوپاتولوژیک (شکل ۱) از صفحه رشد استخوان، بررسی مورفومتریک با استفاده از لنزهای مدرج میکروسکوپ نوری روی دو انتها و بخش میانی صفحه رشد انجام گرفت و داده‌های به دست آمده (به میلی‌متر) پس از بررسی وجود توزیع نرمال، با نرم‌افزار SPSS و به روش آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) مقایسه شد و نتایج مقایسه آماری با سطح اطمینان ۰/۰۵٪ شد.

شود و پس از دوره‌ای از رشد منجر به کاهش میزان این سلول‌ها شود. این اثر ممکن است با تزریق هورمون رشد با منشأ خارجی نیز منجر به بسته شدن زود هنگام این صفحه شود و نگرانی‌هایی در این زمینه وجود دارد (۱۳).

برخی از اثراتی که به هورمون رشد نسبت داده می‌شود، برگرفته از پژوهش‌هایی است که در موارد درمان کمبود ترشح هورمون رشد در انسان یا حیوانات بوده است و یا علایمی که در آکرومگالی دیده می‌شود. پژوهش‌هایی که در موارد دچار کمبود هورمون رشد و آکرومگالی انجام شده اطلاعات متفاوت و متضاد بسیاری دارند، به همین دلیل، بسیاری از پژوهشگران، انجام پژوهش‌های جامع‌تر و کنترل شده‌ای را توصیه کرده‌اند (۵).

ضرورت بررسی اثر هورمون رشد در یک مدل حیوانی سالم و استاندارد تحت شرایط کنترل شده، نتایج قابل استنادتری برای بررسی اثرات این هورمون ایجاد می‌کند. خرگوش یک حیوان آزمایشگاهی استاندارد برای پژوهش‌های پزشکی و دامپزشکی است. گیرنده‌های هورمون رشد خرگوش تمایل زیادی برای اتصال با هورمون رشد انسانی از خود نشان داده‌اند و مؤثر بودن هورمون رشد سنتتیک انسانی بر سلول‌های استخوانی خرگوش در *In Vitro* و *In Vivo* نشان داده شده است. برخی پژوهش‌ها شباهت زیادی بین اثرات ایجاد شده توسط هورمون رشد در انسان و خرگوش را نشان داده‌اند و به همین دلیل، نتایج این بررسی می‌تواند در مورد انسان نیز مدنظر قرار گیرد (۱۴). نگرانی از تخلیه سریع سلول‌های زایا و بسته شدن زود هنگام صفحات رشد در کنار لزوم بررسی کنترل شده اثر تزریق هورمون رشد در سن قبل از بلوغ حیوان و نیز بررسی تفاوت استخوان‌های قسمت‌های مختلف بدن، از دلایل انجام این بررسی است.

مواد و روش کار

شانزده راس خرگوش سفید نیوزلندی نابالغ نر با سن ۲-۴ ماه، تهیه شد و در شرایط یکسان تغذیه‌ای و محیطی



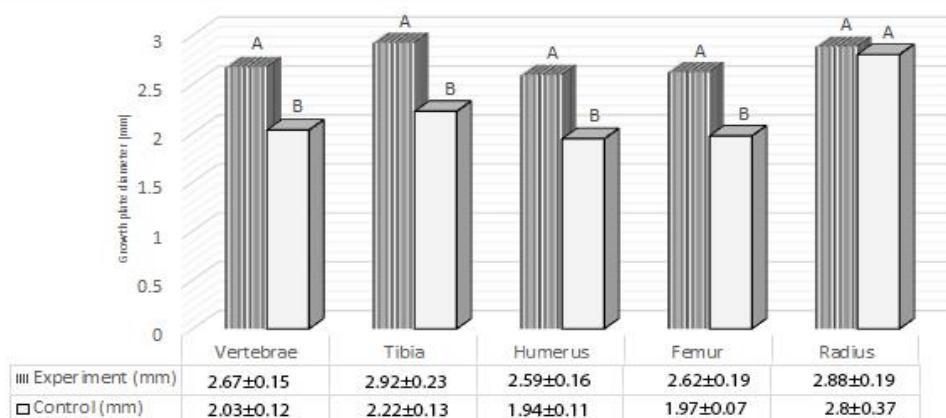
نتایج

قطر صفحه رشد استخوان درشت نی نیز نشان دهنده تفاوت آماری معنی‌دار در میزان آن در گروه کنترل ($2/22 \pm 0/13$) و آزمایش ($2/92 \pm 0/23$) بود ($P=0/047$). اولین استخوان از مهره‌های کمری نیز در این بررسی جداسازی و پس از آماده‌سازی قطر صفحات رشد اندازه‌گیری شد. نتایج بررسی، نشان داد که بیشتر بودن مقادیر اندازه‌ها در گروه آزمایش ($2/67 \pm 0/15$) نسبت به گروه کنترل ($2/03 \pm 0/12$) معنی‌دار بود ($P=0/023$). در مجموع، نتایج این بررسی نشان داد، تزریق سوماتوتروپین به خرگوش‌های نابالغ، منجر به تأخیر در بسته شدن و تعویق در کاهش قطر صفحات رشد استخوان‌های ران، بازو، درشت نی و مهره اول کمری می‌شود، حال آنکه تزریق یا تزریق نکردن هورمون رشد، تأثیری در بسته شدن و اندازه صفحه رشد استخوان زند زبرین، ندارد (شکل ۱).

نتایج بررسی مقایسه‌ای قطر صفحه رشد استخوان زند زبرین (Radius) در خرگوش‌های مورد بررسی نشان داد که این میزان ($Mean \pm SE$) در گروه کنترل $2/88 \pm 0/19$ میلی‌متر و در مورد گروه آزمایش، $2/80 \pm 0/37$ بود. بررسی آماری نتایج، نشان دهنده تفاوت معنی‌داری در این مورد نبود.

بررسی صفحات رشد استخوانی در استخوان بازو نشان داد قطر صفحه رشد، در گروه کنترل $1/94 \pm 0/11$ میلی‌متر و در گروه آزمایش، $2/59 \pm 0/16$ میلی‌متر بود که بررسی آماری نشان دهنده تفاوت معنی‌دار این مقادیر بود ($P=0/045$).

ارزیابی مقایسه‌ای انجام شده در مورد استخوان ران نشان دهنده قطر $2/62 \pm 0/19$ میلی‌متر در مورد صفحه رشد گروه کنترل و قطر $1/97 \pm 0/07$ میلی‌متر در مورد گروه آزمایش بود و بررسی مقایسه‌ای نشان دهنده تفاوت معنی‌دار این دو مقدار بود ($P=0/039$).



شکل ۱- قطر صفحه‌های رشد استخوان‌های مورد بررسی (میلی‌متر) در انتهای دوره تزریق طولانی مدت سوماتوتروپین به خرگوش‌های تحت مطالعه (حروف غیرهمنام در مورد هر گروه نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در مقادیر دو گروه است).

بحث

رشد در دوران قبل از بلوغ، به دلیل مناسب بودن این حیوان برای تزریق هورمون‌های رشد سنتتیک در بازار و نیز شرایط مناسب برای ایجاد مدل تجربی در این حیوان بود. بر اساس مطالعات قبلی، خرگوش یک حیوان

این بررسی به منظور مطالعه تأثیر استفاده از هورمون سوماتوتروپین بر صفحه رشد خرگوش‌های نابالغ انجام شد. استفاده از خرگوش برای بررسی اثر ناشی از تزریق هورمون



خرگوش‌هایی که هورمون رشد دریافت می‌نمودند با گروه کنترل مشاهده نشد.

نتایج برخی مطالعات مبنی بر تحریک بیش از اندازه صفحات رشد توسط برخی داروها و تخلیه سریع صفحه رشد از سلول‌های بنیادی این نگرانی را به وجود آورده است که پس از یک دوره رشد سریع متعاقب دارو درمانی، به دلیل کاهش سلول‌ها، استخوان دچار کاهش رشد شده اند و این اثر ممکن است توسط تزریق هورمون رشد با منشأ خارجی نیز انجام شده (۱۳)، منجر به بسته شدن مطالعه حاضر نشان می‌دهد استفاده طولانی مدت از این هورمون با دزهاژ پایین، این تأثیر را در خرگوش‌های نابالغ به دنبال ندارد.

افزایش قطر صفحه رشد در استخوان‌های مهره‌های کمری نشان می‌دهد هورمون رشد سنتتیک با منشاء انسانی با دزهاژ پایین، در طولانی مدت منجر به افزایش مدت زمان فعالیت سلول‌های صفحه رشد شده و می‌تواند بر رشد استخوان‌های تراپیکولار خرگوش نیز تأثیرگذار باشد.

نتایج بررسی‌های پیشین نشان می‌دهد استفاده از هورمون رشد سنتتیک انسانی منجر به افزایش رشد استخوان درشت نی در خرگوش شده است (۴). استفاده از ۵۰ نانوگرم در میلی لیتر هورمون رشد انسانی منجر به افزایش رشد صفحه رشد در خرگوش شده است (۷). در این بررسی، پس از تزریق هورمون رشد نو ترکیب انسانی به ۴۰ خرگوش بالغ، اقدام به اندازه‌گیری اندکس‌های استخوانی شده است. میزان تولید استخوان و محتوای مواد معدنی استخوان در عرض ۱-۲ ماه افزایش پیدا کرده است. در سال ۲۰۰۴ در مطالعه‌ای روی مدل خرگوشی سندرم روده کوتاه (short bowel syndrome) هورمون رشد انسانی اثر جبرانی بر کاهش دانسیته استخوانی ناشی از این سندرم داشته است (۵). بررسی اثر هورمون رشد در سگ‌ها نشان داده است که رشد استخوان

آزمایشگاهی استاندارد برای پژوهش‌های دامپزشکی و پزشکی است. گیرنده‌های هورمون رشد خرگوش تمایل زیادی برای اتصال با هورمون رشد انسانی از خود نشان می‌دهند (۱۴) و از سوی دیگر نشان داده شده است که هورمون رشد سنتتیک انسانی بر سلول‌های استخوانی خرگوش مؤثر است. بررسی‌های پیشین، شباهت زیادی بین اثرات ایجاد شده توسط هورمون رشد در انسان و خرگوش نشان داده‌اند (۴ و ۵).

در سال ۱۹۹۸ Costa و همکاران در خرگوش‌های انتقال ژن یافته (Transgenic) که هورمون رشد گاوی تولید می‌کردند، نشان دادند که در این خرگوش‌ها تغییرات آناتومیکی، متابولیکی و هیستولوژیکی بسیار مشابه به آکرومگالی دیده می‌شود (۳).

مطالعات بسیاری اثر هورمون رشد را بر دانسیته استخوانی در بیماران دچار ازدیاد ترشح هورمون رشد بررسی کرده‌اند، اما نتایج متناقض بوده و کاهش یا افزایش دانسیته گزارش شده است. اما به طور کلی اکثر مطالعات پیشنهاد کرده‌اند که دانسیته استخوان کورتیکال افزایش می‌یابد اما دانسیته استخوان تراپیکولار (Trabecular) تغییر نمی‌کند (۹).

در مطالعه حاضر، اثرات طولانی مدت استفاده از دوز پایین هورمون رشد بر صفحه رشد استخوان‌های خرگوش مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس مطالعات پیشین، استفاده از این دوز، منجر به افزایش غلظت سرمی IGF-I در خرگوش می‌شود (۸). انتخاب استخوان‌های مورد بررسی از این واقعیت منشاء می‌گیرد که استخوان‌های بلند، اغلب از استخوان کورتیکال (Cortical) و مهره‌ها، اغلب از استخوان تراپیکولار (Trabecular) تشکیل شده‌اند (۱۲).

استفاده از هورمون رشد با دزهاژ و دوره زمانی مذکور در خرگوش، منجر به افزایش قطر صفحه رشد در استخوان‌های ران، بازو و درشت نی شده است. اما تفاوت محسوسی در اندازه صفحه رشد استخوان زند زبرین در



- Orskov, H; Growth hormone stimulates bone formation and strength of cortical bone in aged rats. *J. Bone and Mineral Res*; 1995; 10(7): 1057-1067.
- 2- Callis, G. and Sterchi, D; Decalcification of bone: Literature review and practical study of various decalcifying agents. Methods, and their effects on bone histology. *J. Histotech.*; 1998; 21(1): 49-58.
- 3- Costa, C; Solanes, G; Visa, J. and Bosch, F; Transgenic rabbits overexpressing growth hormone develop acromegaly and diabetes mellitus. *The FASEB j*; 1998; 12(14): 1455-1460.
- 4- Ehrnberg, A; Brosjö, O; Låftman, P; Nilsson, O. and Strömberg, L; Enhancement of bone formation in rabbits by recombinant human growth hormone. *Acta Orthopaed*; 1993; 64(5): 562-566.
- 5- Giardino, R; Torricelli, P; Giavaresi, G; Fini, M; Aldini, N.N; Ruggeri, G; Lima, M. and Carpi, A; Histomorphometric bone modifications induced by growth hormone treatment in a rabbit model of short bowel syndrome. *Biomed & Pharmacotherapy*; 2004; 58(2): 116-122.

و افزایش حجم استخوان‌ها متعاقب تزریق این هورمون اتفاق می‌افتد (۱۱). مطالعات در خرگوش نشان داده‌اند که تزریق هورمون رشد به خرگوش بالغ، منجر به بهبود سریع تر در استخوان‌های آسیب دیده نمی‌شود (۱۰).

عدم تغییر در صفحه رشد استخوان زند زبرین در خرگوش‌های مورد بررسی در مطالعه حاضر می‌تواند به تفاوت‌های ناحیه‌ای این هورمون مربوط باشد. Andreassen و همکاران در سال ۱۹۹۵ گزارش دادند، تجویز هورمون رشد در رت‌های پیر موجب تحریک ساخت استخوان زیر پریوستئوم می‌شود، بدون اینکه اثری بر سطح اندوستئومی استخوان داشته باشد. همچنین Andreassen و همکاران در سال ۱۹۹۶ گزارش دادند تفاوت‌های ناحیه‌ای در تولید استخوان به دنبال تجویز هورمون رشد دیده می‌شود (۱).

نتایج این بررسی نشان می‌دهد تجویز طولانی مدت و با دز از پایین هورمون رشد در خرگوش‌های نابالغ، منجر به بسته شدن ناگهانی صفحات رشد (که می‌تواند به دلیل کاهش یکباره سلول‌های زایا ایجاد شود) نشده و در استخوان‌های ستون فقرات و استخوان‌های بلند بازو، ران و درشت نی منجر به افزایش معنی‌دار قطر صفحه رشد می‌شود و تأثیری بر اندکس‌های مربوط به صفحه رشد استخوان زند زبرین ندارد.

تشکر و قدردانی

این مقاله مستخرج از نتایج طرح تحقیقاتی اجرا شده از محل اعتبارات معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه شهرکرد است. نویسندگان، از زحمات کارکنان محترم کلینیک دانشکده دامپزشکی، مخصوصاً آقایان جمشید کبیری تشکر و قدردانی به عمل می‌آورند.

منابع

- 1- Andreassen, T.T; Jorgensen, P.H; Oxlund, H; Flyvbjerg, A. and





- Dissociation between the effect of bovine growth hormone in articular cartilage and in bone of the adult dog. *J. Bone Joint Surg Am*; 1978; 60(8): 1071-5.
- 12- Ohlsson, C; Bengtsson, B.A.k; Isaksson, O.G; Andreassen, T.T. and Sootweg, M.C; Growth Hormone and Bone 1. *Endocrine Rev*; 1998; 19(1): 55-79.
- 13- Peralta, J.M; Arnold, A.M; Currie, W.B. and Thonney, M.L; Effects of testosterone on skeletal growth in lambs as assessed by labeling index of chondrocytes in the metacarpal bone growth plate. *J Anim Sci*; 1994; 72(10): 2629-2634.
- 14- Spencer, S.A; Hammonds, R.G; Henzel, W.J; Rodriguez, H; Waters, M.J. and Wood, W.I; Rabbit liver growth hormone receptor and serum binding protein. Purification, characterization, and sequence. *Biolog Chem*; 1988; 263(16): 7862-7867.
- 6- Isaksson, O.G; Jansson, J.O. and Gause, I.A; Growth hormone stimulates longitudinal bone growth directly. *Science*; 1982; 216(4551): 1237-1239.
- 7- Isaksson, O.G.P; Lindahl, A; Isgaard, J. and Nilsson, A; Hormonal regulation of longitudinal bone growth. *Calcified Tissue International*; 1986; 39: 12-13.
- 8- Khafi, A; Soroori, S; Nakhjavani, M; Mortazavi, P; Vajhi, A. and Bahonar, A; The effects of growth hormone administration on bone density in healthy adult rabbits. *Tehran Univ Med Sci*; 2011; 69(1).
- 9- Kotzmann, H; Bernecker, P; Hübsch, P; Pietschmann, P; Woloszczuk, W; Svoboda, T; Geyer, G. and Luger, A; Bone mineral density and parameters of bone metabolism in patients with acromegaly. *J Bone and Mineral Res*; 1993; 8(4): 459-465.
- 10- Laftman, P; Holmstrom, T; Kairento, A.L; Nilsson, O.S; Sigurdsson, F. and Stromberg, L; No effect of growth hormone on recovery of load-protected bone. Cortical bone mass and strength studied in rabbits. *Acta Orthop Scand*; 1988; 59(1): 24-8.
- 11- Mankin, H.J; Thrasher, A.Z; Weinberg, E.H. and Harris, W.H;





Evaluation of the Effects of Intramuscular Injection of Growth Hormone on Histo-Morphometric Changes of Growth Plate in pre-Pubertal Rabbits Bones

Hosseini, F.^{1*}; Karimi, I.²; Hosseininejad, M.³; Habibian Dehkordi, S.⁴

1. Assistant Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University, Shahrekord- Iran.
2. Associate Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University, Shahrekord- Iran.
3. Associate Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University, Shahrekord- Iran.
4. Associate Professor, Department of Veterinary Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University, Shahrekord- Iran.

Received: 7 February 2015

Accepted: 29 May 2016

Summary

This study was aimed to evaluate histopathological effects of growth hormone on growth plate of different bones of pre-pubertal rabbits. A total number of 16 white New-Zealand rabbits of 2-4 months age were divided into two groups of eight, the experiment and control groups, and were then caged under the same environmental and nutritional conditions. In the experiment group, 3 Iu/Kg Somatotropin was intramuscularly injected every seven days and control group received the same amount of normal saline. At the end of study rabbits were euthanized using anesthetic drugs and Radius, Humerus, Femur, Tibia and the first lumbar vertebrae were isolated for histomorphometric examinations. The results showed that the thickness of growth plate of radius had no significant statistical difference between rabbits of experiment and control groups while this parameter was statistically greater in other bones of the experiment group including femur (P=0.039), Humerus (P=0.045), Tibia (P=0.047) and the first lumbar vertebrae (P=0.023). The results of this study showed that long term, low dose somatotropin injection to pre-pubertal rabbits causes thickening of growth plate and helps its longer activity during the growth period of cortical and trabecular bones although its effects is not the same for all bones.

Keywords: Growth Plate, Somatotropin, Rabbit.

* Corresponding Author E-mail: hosseinifm@gmail.com

