

ارزیابی درون‌تنی نانوبیوسرامیک‌های زیست فعال در بازسازی و ترمیم استخوان

(مطالعه حیوانی)

* علی دوست محمدی، ** محمد حسین فتحی، *** امین بیغم صادق، ** امیرحسین توکلی‌زاده، ** حامد اکبریان

«دانشگاه شهرکرد»

خلاصه

پیش‌زمینه: در سال‌های اخیر بیوسرامیک‌های زیست فعال مورد توجه ویژه پژوهشگران قرار گرفته‌اند. شیشه زیست فعال (بیوگلاس) و هیدروکسی آپاتیت از جمله این بیوسرامیک‌ها هستند. هدف از این پژوهش، ساخت و مشخصه‌یابی نانو ذرات بیوگلاس و هیدروکسی آپاتیت برای جایگزینی یا ترمیم استخوان بود.

مواد و روش‌ها: نانوبیوگلاس و هیدروکسی آپاتیت مطابق روش‌های مستند موجود ساخته شد. تحلیل عنصری بیوسرامیک‌های ساخته شده به کمک پرتو ایکس انجام گردید و شکل و اندازه ذرات به کمک میکروسکوپ الکترونی مورد بررسی قرار گرفت. در نهایت، ذرات بیوسرامیک و ترکیب ساخته شده از آنها در استخوان خرگوش کاشته شد و فعالیت زیستی آنها از طریق هیستولوژی و پرتونگاری بررسی و مقایسه گردید.

یافته‌ها: آزمون‌های مشخصه‌یابی، تولید نانو ذرات بیوگلاس و هیدروکسی آپاتیت طبیعی را با ترکیب مورد نظر تأیید کرد. نتایج آزمون‌های هیستوپاتولوژی و پرتونگاری نشان داد که نانو ذرات بیوگلاس، هیدروکسی آپاتیت و کامپوزیت بیوگلاس/هیدروکسی آپاتیت، فعالیت زیستی قابل توجهی داشته و پس از گذشت ۴ تا ۶ هفته باعث ترمیم نواقص استخوانی می‌شوند. همچنین مشاهده شد عملکرد زیستی کامپوزیت بیوگلاس/هیدروکسی آپاتیت نسبت به هر کدام از اجزای آن، به تنهایی بالاتر است.

نتیجه‌گیری: تلفیق خاصیت هدایت استخوانی هیدروکسی آپاتیت و القای استخوانی بیوگلاس در کامپوزیت بیوگلاس/هیدروکسی آپاتیت، منجر به زیست فعالی بسیار خوب این ترکیب و پاسخ زیستی مناسب بافت سخت استخوان به این بیوسرامیک ترکیبی می‌گردد.

واژه‌های کلیدی: نانوکامپوزیت، بازسازی استخوان، بیوگلاس، هیدروکسی آپاتیت

دریافت مقاله: ۹ ماه قبل از چاپ؛ مراحل اصلاح و بازنگری: ۲ بار؛ پذیرش مقاله: ۱ ماه قبل از چاپ

In Vivo Evaluation of Bioactive Nano Bioceramics for Bone Regeneration and Repair (an Animal Study)

*Ali Doostmohammadi, PhD; ** Mohammad Hossein Fathi, *** Amin Bigham Sadegh,
** Amir Hossein Tavakolizadeh, ** Hamed Akbarian

Abstract

Background: Bioactive bioceramics have been regarded by researchers in recent years. Bioglass and Hydroxyapatite (HA) are the examples of these bioactive bioceramics. Production and characterization of nano bioglass and HA for bone repair applications were the purpose of this study.

Methods: Nano bioglass and HA were produced and the particles shape and size were characterized by X-ray fluorescence (XRF). The bioactivity of the particles of HA and nano bioglass and combination of the two were tested, by introducing them into the cavities formed in rabbit's Tibia. The incorporation and bone induction of these 3 different particles in bone were evaluated by radiography and also histopathology of the resected specimens.

Results: The characterized tests confirmed that nano bioglass and natural HA were produced with desired composition. The radiographic and histopathologic evaluation illustrated good bioactivity of nano-size bioglass, HA and HA-bioglass composite, leading to restoration of bone defects after 4 to 6 weeks. It was also observed that bioactivity of HA-bioglass composite was superior to bioglass and HA used singularly.

Conclusions: The osteoconductivity of HA and osteoinductivity of bioglass combined as a composite lead to excellent bioactivity and good response in the hard bony tissue.

Key words: Nanocomposites; Bone regeneration; Bioglass; Hydroxyapatite

Received: 9 months before printing ; Accepted: 1 month before printing

*Materials Engineer, Materials Department, Engineering Faculty, Shahrekord University, Shahrekord, IRAN.

**Materials Engineer, Materials Engineering Department, Isfahan University of Technology, Isfahan, IRAN.

***Veterinary Surgeon, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University, Sharekord, IRAN.

Corresponding author: Ali Doostmohammadi, PhD
Materials Department, Engineering Faculty, Shahrekord University, Shahrekord, Iran.
e-mail: alidstm@gmail.com

مقدمه

فلزات و آلیاژها در دندانپزشکی، ارتوپدی و ترمیم استخوان شکسته کاربرد گسترده‌ای به‌عنوان کاشتنی^۱ مصنوعی یا مواد ترمیمی دارند. آلیاژهای تیتانیوم، آلیاژهای پایه کبالت و فولاد زنگ نزن ۳۱۶L، از معمول‌ترین آلیاژهایی هستند که در ساخت کاشتنی‌های استخوانی به کار می‌روند^(۱,۲). ویژگی اصلی این آلیاژها، دارا بودن خواص مکانیکی مناسب است ولی همیشه نگرانی در مورد مقاومت خوردگی این آلیاژها در محلول‌های فیزیولوژیکی و زیست‌فعالی آنها وجود داشته است. کم بودن زیست‌فعالی این آلیاژها به معنای عدم توانایی آنها در اتصال به بافت زنده بدون اعمال نیروهای خارجی است. برخلاف این آلیاژها، سرامیک و شیشه‌های شناخته شده‌ای وجود دارند که زیست‌سازگارند و خواص زیست‌فعالی فوق‌العاده‌ای دارند^(۳). در سال‌های اخیر این سرامیک‌های زیست‌فعال به موفقیت‌های شایان‌ذکری در ترمیم‌های استخوانی دست یافته‌اند^(۴).

شیشه‌های زیست‌فعال (بیوگلاس)^۲ با ایجاد یک پیوند شیمیایی قوی پاسخ زیستی مناسبی در فصل مشترک استخوان و بافت نشان می‌دهند و از این رو کاربردهای وسیعی در پزشکی دارند^(۳,۵). به هر حال به دلیل خواص مکانیکی نه‌چندان مطلوب این شیشه‌ها، کاربرد آنها در مصارف تحت بار با مشکلاتی روبروست، در حالی که آلیاژهای فلزی هنوز هم بهترین گزینه برای کاربرد در مکان‌هایی هستند که متحمل بار مکانیکی می‌شوند. هدف اصلی بکارگیری این شیشه‌ها بهبود و بازسازی استخوان در اطراف کاشتنی است^(۶). در میان همه مواد زیست‌فعال، بهترین رفتار زیست‌فعالی متعلق به بیوسرامیک‌های هیدروکسی‌آپاتیت^۳ و شیشه‌های زیست‌فعال است که در برگیرنده گروهی از ترکیبات کلسیم - فسفات می‌باشند که در زمان کوتاهی با بافت پیوند برقرار می‌کنند^(۱,۶). ترکیبات مشخص از شیشه‌های زیست‌فعال شامل P_2O_5, SiO_2, CaO قادر به اتصال به بافت‌های نرم و سخت بدون مداخله لایه‌های فیبری هستند. تحقیقات اخیر نشان می‌دهد که یک کنترل ژنتیکی بر

پاسخ سلول‌های استخوانی به شیشه‌های زیست‌فعال وجود دارد^(۵). کاربردهای متنوعی از مصارف پودری بیوگلاس و هیدروکسی‌آپاتیت گزارش شده است که شامل مصارفی نظیر کاشتنی‌های ارتوپدی و دندان‌های هستند^(۵,۶). انواع طبیعی هیدروکسی‌آپاتیت نیز در سال‌های اخیر مورد توجه پژوهشگران قرار گرفته است^(۷,۸,۹).

هنگامی که استحکام مکانیکی در درجه دوم اهمیت قرار داشته باشد، بیوسرامیک‌های زیست‌فعال می‌توانند برای کاربردهای ویژه ساخته شوند. اولین استفاده موفق شیشه زیستی جایگزینی استخوان کوچک گوش میانی بود که برای درمان ناشنوایی انجام گرفت^(۱). در دندانپزشکی نیز استفاده از این مواد زیست‌فعال روبه‌گسترش است^(۱,۴,۵,۶). مقالات متعددی نیز در زمینه تأثیر مثبت بیوسرامیک‌های زیست‌فعال بر رشد سلول‌های استخوانی و ترغیب و تحریک رشد استخوان گزارش شده است^(۴,۱۰). به نظر می‌رسد کاربرد این مواد در شکسته‌بندی و ارتوپدی نیز می‌تواند بسیار سودمند و مفید باشد.

انتظار می‌رود ابعاد نانومتری ذرات بیوسرامیک عملکرد زیستی مناسب‌تری داشته باشند. مزایا و فواید بسیاری برای نانوذرات بیوگلاس و هیدروکسی‌آپاتیت می‌توان شمرد که مهم‌ترین آن، افزایش فعالیت زیستی ذرات شیشه است^(۱). باتوجه به مبانی نظری و مکانیزم زیست‌فعالی این مواد، واضح است که هرچه اندازه ذرات ریزتر باشد، سطح تماس بیشتری در معرض محیط خارج (شامل سلول‌ها و سیالات بین‌بافتی) قرار می‌گیرد و فعالیت زیستی افزایش می‌یابد. به عبارت دیگر، اگر دو ترکیب یکسان بیوسرامیک با مقدار وزنی مشابه در میان بافت سخت یا در معرض سلول‌های استخوانی قرار گیرند، فعالیت زیستی (رهایش یون‌های مؤثر بر استخوان‌سازی) در نمونه‌ای بیشتر است که اندازه ذرات ریزتری دارد^(۱,۱۰,۱۱). از سوی دیگر در جایی که این مواد به‌عنوان حامل و وسیله انتقال ژن یا دارو به درون سلول‌ها مدنظر باشد، نانومتری بودن ابعاد ذرات آن بسیار تعیین‌کننده خواهد بود^(۱,۴). ریزی هرچه بیشتر ذرات شیشه در ساخت ترکیبات پلیمری نیز این امکان را به سازنده خواهد داد که حجم بیشتری از بیوگلاس را به‌عنوان فاز پرکننده زیست

1. Implant
2. Bioactive glass (Bioglass)
3. Hydroxyapatite (HA)

آلومینیومی نصب شدند. پوشش‌دهی نمونه‌ها نیز به کمک لایه نازکی از طلا و پالادیوم انجام شد.

۴- آزمون‌های درون‌تنی! تعداد ۱۵ خرگوش نر بالغ تقریباً هم وزن و به ظاهر سالم انتخاب شدند و پس از ارزیابی‌های جسمی و معاینات خونی و اطمینان از سلامتی آنها، از استخوان درشت‌نی پای چپ خرگوش‌ها تصاویر پرتونگاری تهیه شد. یک ساعت قبل از عمل جراحی کاشت، مقدار یک میلی‌گرم بر کیلوگرم آنتی‌بیوتیک سفتیوفور^۲ به‌صورت داخل عضلانی تزریق شد. خرگوش‌ها با ترکیبی شامل ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم زایلازین^۳ و ۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم کتامین^۴ به‌صورت تزریق عضلانی بیهوش شدند. استخوان درشت‌نی پای چپ برای جراحی آماده شد. پس از برش پوست و شکافت عضلات و کنارزدن ضریع استخوان با استفاده از مته ارتوپدی استریل با قطر ۰/۵ میلی‌متر سه حفره با فواصل ۱/۵ سانتی‌متر در استخوان درشت‌نی ایجاد شد. در هر استخوان درشت‌نی، یک حفره با ذرات بیوگلاس، یکی با ذرات هیدروکسی آپاتیت و حفره سوم با کامپوزیت بیوگلاس-هیدروکسی آپاتیت پر شد. پرکردن حفره‌ها با نمونه‌های مورد نظر به‌صورت چرخشی انجام شد تا محل هر نمونه در استخوان درشت‌نی متفاوت باشد. پس از اتمام عمل جراحی، از دو نمای رخ و نیم‌رخ از استخوان درشت‌نی تصاویر پرتونگاری تهیه شد تا از پرشدن منافذ با نمونه‌ها اطمینان حاصل شود. در ۲۴ ساعت اول پس از جراحی به تمام خرگوش‌ها یک میلی‌گرم بر کیلوگرم آنتی‌بیوتیک سفتیوفور هر ۸ ساعت تجویز شد. به‌منظور کنترل درد در ۲۴ ساعت اول هر ۶ ساعت، از داروی ضد درد با بوبره‌نورفین^۵ با دوز یک میلی‌گرم بر کیلوگرم به‌صورت عضلانی استفاده شد. در فواصل زمانی دو و چهار هفته پس از عمل جراحی، مجدداً تصاویر پرتونگاری تهیه شد. شش هفته (۴۲ روز) بعد از جراحی و پس از تهیه تصاویر پرتونگاری، خرگوش‌ها به‌روش مرگ آسان کشته شدند. استخوان ساق جدا شد. سپس با استفاده از گیره و ارّه مویی، نمونه‌ها از فواصل

فعال به زمینه پلیمری بیفزاید زیرا فاز زمینه ذره پلیمری را به آسانی در میان خود جای داده و ناپیوستگی در فصل مشترک ذره و زمینه حاصل نخواهد شد.^(۹،۱۰)

هدف از این پژوهش، ساخت و مشخصه‌یابی نانو ذرات شیشه زیست‌فعال و هیدروکسی آپاتیت برای جایگزینی یا ترمیم استخوان بود. به این منظور نانوبیوسرامیک‌های ساخته شده در استخوان حیوان کاشته و نتایج عملکرد آنها بررسی و ارزیابی شد.

مواد و روش‌ها

۱- ساخت نانوذرات بیوگلاس و استحصال نانوهیدروکسی آپاتیت طبیعی: بیوگلاس مورد بررسی در این پژوهش به سیستم $\text{CaO-SiO}_2\text{-P}_2\text{O}_5$ تعلق داشت و دارای ترکیب شیمیایی $28\text{CaO} - 72\text{SiO}_2 - 3\text{P}_2\text{O}_5$ (درصد مولی) بود. روند ساخت نانوذرات بیوگلاس مطابق روش‌های ارائه شده در مقالات بود.^(۱۱) نانوهیدروکسی آپاتیت طبیعی نیز از استخوان ران گاو بالغ و مطابق روش ارائه شده در مراجع استحصال شد.^(۱۲)

۲- ساخت نمونه‌های کامپوزیت بیوگلاس/هیدروکسی آپاتیت: نمونه‌های کامپوزیت بیوگلاس/هیدروکسی آپاتیت با ۵۰ درصد وزنی از هرکدام از اجزاء، پس از پرس شدن تحت فشار ۱۰ مگاپاسکال، در دمای ۱۲۰۰ درجه سانتیگراد تحت عملیات تف جوشی قرار گرفتند.

۳- مشخصه‌یابی فیزیکی- شیمیایی ذرات:

○ آنالیز عنصری: به منظور تأیید حضور عناصر و اکسیدها در ترکیب نهایی بیوگلاس مطابق درصد مولی موردنظر، آنالیز عنصری پرتو ایکس (XRF) (S4PIONEER) انجام شد. آنالیز عنصری هیدروکسی آپاتیت طبیعی تهیه شده نیز توسط طیف سنجی فلورسنس انرژی پرتو ایکس (EDXRF) (XEPOS SPECTRO) انجام گرفت.

○ ارزیابی ذرات پودر به کمک میکروسکوپ الکترونی روبشی: به‌منظور بررسی شکل و ظاهر ذرات تولید شده و برآورد نسبی از میزان اندازه آنها، از میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) (SUPRA 40 VP FE-SEM, Carl Zeiss AG, Germany) بهره گرفته شد. ولتاژ کاری دستگاه ۲۰ کیلو ولت بود و نمونه‌ها قبل از مشاهده بر روی قالب‌های مخصوص

1. In vivo evaluation
2. Ceftiofur
3. Xylazine
4. Ketamine
5. Buprenorphine

بین منافذ از یکدیگر جدا شدند. نمونه‌ها در ظروف حاوی فرمالین بافر ۱۰ درصد قرار گرفتند و به آزمایشگاه‌های میکروسکوپ الکترونی روبشی و آسیب‌شناسی بافت منتقل شدند.

○ ارزیابی (هیستوپاتولوژی): پس از کلسیم‌زدایی در محلول بافر اسیدفرمیک ۱۵ درصد و تثبیت نمونه‌ها در فرمالین، نمونه‌ها مطابق روش‌های معمول آماده شدند. مقاطع بافتی با قطر ۵ میکرومتر تهیه و پس از رنگ‌آمیزی با هماتوکسیلین-ائوزین، توسط میکروسکوپ نوری و مطابق روش امتیازدهی «لین»^۱ و «ساندهو»^۲ اصلاح شده توسط «هیپل»^۳ و همکاران در سال ۱۹۸۷ مورد ارزیابی قرار گرفت^(۱۳). ارزیابی هیستوپاتولوژیک بر روی ۹ خرگوش و به کمک روش امتیازدهی فوق، مطابق جدول ۱ انجام شد.

پس از امتیازدهی تصاویر، داده‌ها با استفاده از آزمون کروسکال-والیس^۴ با یکدیگر مقایسه شدند ($p \geq 0/05$). در صورت وجود اختلاف آماری معنی‌دار، دو گروه با آزمون غیرپارامتری من‌ویتنی^۵ مقایسه شدند ($p = 0/017$).

○ ارزیابی پرتونگاری: به‌منظور ارزیابی تشکیل استخوان، یکپارچگی و بازآرایی نواقص، تصاویر پرتونگاری استخوان درشتنی در هفته‌های دوم و چهارم، ثبت و بررسی شدند. جریان دستگاه پرتونگار، پنج میلی‌آمپر ثانیه و ولتاژ آن ۵۰ کیلو ولت بود. نتایج به‌طور جداگانه و مطابق شیوه امتیازدهی بدین شرح رتبه‌بندی شدند^(۱۴): شفاف در برابر پرتو (۰)؛ بسیار شفاف در برابر پرتو (-۱)؛ کدر در برابر پرتو (+۱)؛ تیرگی نسبتاً افزایش یافته در برابر پرتو (+۲)؛ تیرگی افزایش یافته در برابر پرتو (+۳)؛ تیرگی بسیار افزایش یافته در برابر پرتو (+۴).

یافته‌ها

۱- آنالیز عنصری و ترکیب شیمیایی: نتایج آنالیز عنصری پرتو ایکس بر روی نانوذرات بیوگلاس تهیه شده به‌روش سل-ژل، در جدول ۲ آورده شده است. باتوجه به درصد عناصر بدست آمده و با فرض شرکت کلیه عناصر در ترکیبات، رایانه درصد مولی اکسیدها

جدول ۱. روش «لین» و «ساندهو» اصلاح شده توسط «هیپل» و همکاران برای ارزیابی و امتیازدهی تصاویر بافتی^(۱۳)

یکپارچگی	
۰	عدم مشاهده آثاری از یکپارچگی
۱	یکپارچگی فیبروزی
۲	یکپارچگی غضروفی-استخوانی
۳	یکپارچگی استخوانی
۴	سازمان یافتگی کامل بدنه
استخوان اسفنجی	
۰	بدون فعالیت سلول‌های استخوانی
۱	مراحل اولیه تشکیل استخوان جدید
۲	تشکیل فعال استخوان جدید
۳	باز آرای استخوان اسفنجی
۴	باز آرای کامل استخوان اسفنجی
استخوان قشری	
۰	عدم تشکیل استخوان قشری
۱	نشانه‌هایی از تشکیل استخوان قشری
۲	تشکیل استخوان قشری
۳	باز آرای زیاد استخوان قشری
۴	باز آرای کامل استخوان قشری
مغز استخوان	
۰	عدم مشاهده مغز استخوان در منطقه بریده شده
۱	شروع پیدایش مغز استخوان
۲	وجود مغز استخوان در بیش از نیمی از سطح ضایعه
۳	پرشدهگی کامل با مغز استخوان قرمز رنگ
۴	وجود مغز استخوان بالغ
امتیاز نهایی ممکن برای هر دسته	
۴	یکپارچگی موقعیت نزدیک
۴	یکپارچگی موقعیت دور
۴	استخوان اسفنجی
۴	استخوان قشری
۴	مغز استخوان
۲۰	حداکثر نمره ممکن

را بیان می‌کند^(۱۵). درصدهای مولی بدست آمده با تقریب قابل قبولی مشابه درصدهای مولی محاسبه شده است. این نتایج حصول بیوگلاس با درصدهای مولی مطلوب (63S) را تأیید می‌کند^(۱۱،۱۵).

جدول ۲. نتیجه آنالیز عنصری پرتو ایکس و درصد مولی اکسیدهای تشکیل‌دهنده بیوگلاس

اکسید	درصد مولی در شیشه ساخته شده	درصد مولی در ترکیب 63S
SiO ₂	۶۲/۱۷	۶۳
CaO	۲۸/۵۸	۲۸
P ₂ O ₅	۹/۲۵	۹

1. Lane
2. Sandhu
3. Heiple
4. Kruskal-Wallis
5. Mann-Whitney U test

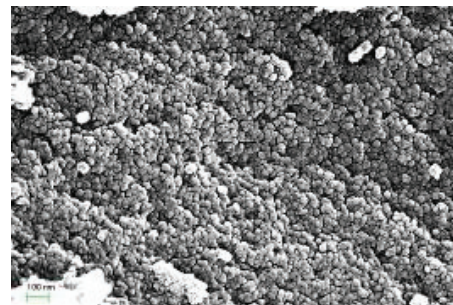
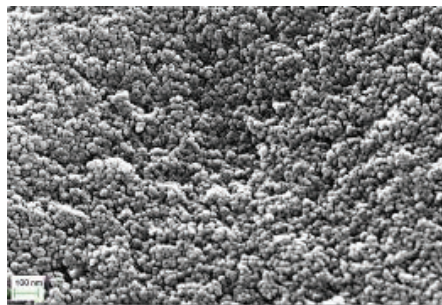
جدول ۳. غلظت عناصر (میانگین و انحراف معیار) موجود در هیدروکسی آپاتیت اندازه‌گیری شده به روش طیف سنجی فلورسنس انرژی پرتو ایکس

عنصر	غلظت (%w/w)
Ca	۴۱/۷۷ (۱/۱۴)
P	۱۶/۷۱ (۰/۵۲)
Si	۰/۷۴ (۰/۱۸)
Mg	۰/۶۳ (۰/۲۰)
Na	۰/۴۰ (۰/۱۸)
K	۰/۲۴ (۰/۱۱)
Cl	۰/۱۲ (۰/۱۹)
Sr	۰/۱۱ (۰/۱۶)
S	۰/۰۸۳ (۰/۱۰)
Zn	۰/۰۱۶ (۰/۰۲)
Ba	۰/۰۱۱ (۰/۰۱)
V	۰/۰۰۴۵ (۰/۰۰۹)
Al	۰/۰۰۲۰ (۰/۰۰۰۵۳)
Mn	۰/۰۰۱۰ (۰/۰۰۰۴۱)
Pb	۰/۰۰۰۹ (۰/۰۰۱)
Cu	۰/۰۰۰۵ (۰/۰۰۰۳۶)
Fe	۰/۰۰۰۱ (۰/۰۰۰۲۴)

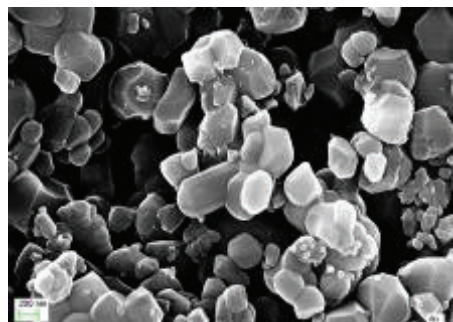
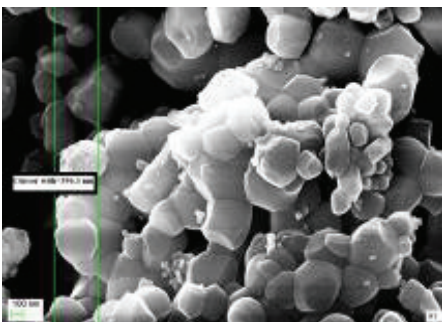
به‌منظور سنجش دقیق عناصر کمیاب موجود در ترکیب هیدروکسی آپاتیت گاوی، از آزمون طیف سنجی فلورسنس انرژی پرتو ایکس استفاده شد. نتیجه این آزمون، در جدول ۳ ارائه شده است. عناصر اصلی ذرات سرامیک، کلسیم و فسفر با میانگین نسبت مولی (کلسیم به فسفر) حدود ۱/۹۳ می‌باشند. سیلیسیم (Si)، منیزیم (Mg) و سدیم (Na) نیز در مقادیر کمتر وجود دارند. علاوه بر این، مقادیر ناچیزی از پتاسیم (K)، استرانسیم (Sr)، روی (Zn)، باریوم (Ba)، وانادیم (V)، آلومینیوم (Al)، منگنز (Mn)، سرب (Pb)، مس (Cu) و آهن (Fe) نیز در هیدروکسی آپاتیت گاوی تهیه شده مشاهده گردید. مقادیر کمی گزارش شده برای هر عنصر در جدول ۳، نتیجه میانگین چندین آزمون جداگانه است.

۲- ارزیابی نانوذرات به کمک میکروسکوپ الکترونی روبشی: تصاویر گرفته شده به کمک میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)، اندازه و شکل ذرات پودری بیوگلاس تولید شده را نشان می‌دهد (شکل ۱). شکل و محدوده اندازه ذرات (کمتر از ۱۰۰ نانومتر) با نتایج سایر پژوهشگران نیز مطابقت دارد^(۱۱،۱۲،۱۵). از این تصاویر نتیجه گرفته می‌شود که حصول نانوذرات بیوگلاس با اندازه تقریبی ۲۰ تا ۸۰ نانومتر است. شکل ۲ میکروساختار و ساختمان هیدروکسی آپاتیت طبیعی را نشان می‌دهد. اندازه کریستال‌ها نیز از ۵۰ تا ۵۰۰ نانومتر متغیر بود.

شکل ۱. تصاویر گرفته شده به وسیله میکروسکوپ الکترونی روبشی از نانو ذرات بیوگلاس



شکل ۲. تصاویر گرفته شده به کمک میکروسکوپ الکترونی روبشی مربوط به ذرات هیدروکسی آپاتیت که تنوع شکل و اندازه دانه‌ها در بزرگنمایی‌های مختلف را نشان می‌دهد.



۳- آزمون‌های درون تنی

○ نتایج ارزیابی پرتونگاری: تصاویر پرتونگاری استخوان درشت‌نی خرگوش پس از گذشت دو و چهار هفته از زمان کاشت بیوسرامیک‌ها، در شکل‌های ۳ و ۴ نشان داده شده است. اعداد داخل پرانتز، امتیاز بیوسرامیک را براساس شیوه امتیازدهی ذکر شده در بخش مواد و روش‌ها نشان می‌دهند.

شکل ۳. پرتونگاری استخوان

میزبان در هفته دوم. از بالا به پایین: (۱) کامپوزیت هیدروکسی آپاتیت- بیوگلاس (نمره ۴)، (۲) هیدروکسی آپاتیت (نمره ۳)، (۳) بیوگلاس (نمره ۲)



شکل ۴. پرتونگاری استخوان

میزبان در هفته چهارم. از بالا به پایین: (۱) کامپوزیت هیدروکسی آپاتیت- بیوگلاس (نمره ۴)، (۲) بیوگلاس (نمره ۲)، (۳) هیدروکسی آپاتیت (نمره ۳)



همان‌گونه که قبلاً گفته شد، امتیازدهی تصاویر پرتونگاری بر پایه کدر و شفاف بودن منطقه نقص در برابر پرتو انجام می‌گیرد. هرچه عملکرد زیستی بیوسرامیک در ترمیم استخوان بهتر باشد، تراکم استخوانی در منطقه نقص بیشتر و در نتیجه، کدر بودن در برابر پرتو شدیدتر خواهد بود. در این شرایط عبور پرتو از محل، کمتر و بازتاب آن بیشتر خواهد بود. تمامی این عوامل منجر به سفید دیده شدن محل نقص و ضایعه ترمیم یافته در تصاویر پرتونگاری خواهد شد. پس هر چه محل نقص در تصاویر روشن‌تر باشد، توانایی ماده کاشتنی در القای تشکیل استخوان بیشتر بوده است. تصاویر

پرتونگاری نمونه‌های کاشته شده در استخوان درشت نی خرگوش باتوجه به توضیحات فوق امتیازدهی شده‌اند (شکل‌های ۳ و ۴). این نتایج، برتری محسوس کامپوزیت هیدروکسی آپاتیت/ بیوگلاس را نسبت به هر کدام از اجزای آن نشان می‌دهد. در مقایسه عملکرد هرکدام از بیوسرامیک‌ها به‌تنهایی، تصاویر پرتونگاری برتری هیدروکسی آپاتیت طبیعی را نسبت به بیوگلاس نشان می‌دهند. هرچند این تفوق چندان قابل ملاحظه نیست. آنچه مسلم است این است که هر سه ترکیب کاشته شده، توانایی ترمیم ضایعه استخوانی ایجاد شده و القای تشکیل استخوان جدید را داشته‌اند. نتیجه جالب توجه، توانایی قابل ملاحظه مخلوط هیدروکسی آپاتیت- بیوگلاس در ترمیم و تشکیل استخوان جدید است.

○ نتایج ارزیابی هیستوپاتولوژی: تصاویر بافتی نمونه‌های بیوگلاس 63S، هیدروکسی آپاتیت طبیعی و کامپوزیت بیوگلاس- هیدروکسی آپاتیت در شکل‌های ۵ و ۶ نشان داده شده است. مشاهدات بافتی توسط میکروسکوپ نوری نشان داد که در مورد همه نمونه‌ها یک اتصال مستقیم با استخوان قشری تشکیل شده است. همچنین در مغز استخوان مقدار زیادی ترابکولای نو تشکیل شد که با تعداد زیادی سلول‌های استخوانی پوشیده شده بود.



الف
شکل ۵. تصویر بافتی کاشتنی پس از ۴۲ روز کاشت در استخوان درشت‌نی خرگوش. الف) بیوگلاس، ب) هیدروکسی آپاتیت.

در شکل ۵- الف استخوان‌سازی داخل غضروفی در فضای ضایعه استخوانی و حضور تیغه‌های استخوانی لاملار، غضروف و بافت همبند در فضای ضایعه مشاهده می‌شود. شکل ۵- ب پرشدن

گروه تفاوت آماری معنی‌دار مشاهده نشد ($p \geq 0/05$) ولی در سایر موارد، تفاوت‌ها معنی‌دار بود. در موارد استخوان اسفنجی و استخوان قشری، گروه ۳ با اختلاف معنی‌داری از گروه‌های ۱ و ۲ بیشتر بود ($p=0/001$). در مورد مغز استخوان نیز گروه ۳ از گروه ۲ و گروه ۱ از گروه ۲ برتر بود ($p=0/001$). در مجموع، امتیاز نهایی گروه ۳ با اختلاف معنی‌داری از گروه‌های ۱ و ۲ بیشتر بود ($p=0/001$) و امتیاز نهایی گروه ۲ نیز اختلاف معنی‌داری با گروه ۱ داشت ($p=0/014$).

بحث

در این پژوهش به ساخت و ارزیابی درون‌تنی رفتار زیستی نانویوگلاس و هیدروکسی آپاتیت طبیعی پرداخته شد. ترکیب بیوگلاس (63S) مورد مطالعه، با توجه به جدیدترین کشف «هنج»^۱ پیرامون ترکیبات بیوگلاس انتخاب شد. اگر رهایش عناصر سیلیسیم، کلسیم و فسفر در محدوده مشخصی باشد، بیوگلاس قادر به فعال‌سازی ژن‌ها، القای تمایز استئوژنیک سلول‌های استخوانی و تحریک تشکیل بافت خواهد بود^(۱۶). ترکیب 63S بیوگلاس از جمله ترکیباتی است که انتظار می‌رود میزان رهایش یون‌های مذکور از آن در محدوده مذکور باشد. آنالیز عنصری هیدروکسی آپاتیت طبیعی نیز نشان داد که علاوه بر کلسیم و فسفر، عناصر کمیاب هم در این بیوسرامیک وجود دارند. وجود این عناصر در ترکیب هیدروکسی آپاتیت طبیعی از مزایای این نوع هیدروکسی آپاتیت نسبت به نوع مصنوعی آن به شمار می‌رود. تقریباً وجود تمامی این عناصر با مقادیر کمی مشابه، در بافت استخوانی انسان نیز گزارش شده است^(۱۷). عملکرد و تأثیر مثبت

فضای ضایعه با استخوان تراپکولار و تشکیل حفرات مغز استخوان که از بارزترین تأثیرات مشاهده شده هیدروکسی آپاتیت کاشتنی بود را نشان می‌دهد.

شکل ۶ تصویر بافتی استخوانی را نشان می‌دهد که در معرض مخلوط ذرات بیوگلاس و هیدروکسی آپاتیت قرار داشته است. آنچه که به وضوح در این تصویر قابل مشاهده است، پرشدن فضای ضایعه با استخوان تراپکولار، تشکیل حفرات مغز استخوان و آغاز بازآرایی تیغه‌های استخوانی است.



شکل ۶. بافت کاشتنی کامپوزیت بیوگلاس- هیدروکسی آپاتیت پس از ۴۲ روز کاشت در استخوان درشت‌نی خرگوش.

نتایج کمی ارزیابی هیستوپاتولوژی نمونه‌های بافتی مربوط به بیوگلاس، هیدروکسی آپاتیت و کامپوزیت بیوگلاس- هیدروکسی آپاتیت که جزئیات و روش انجام آن در بخش مواد و روش‌ها بیان شد، در جدول ۴ نشان داده شده است. از نظر یکپارچگی استخوان تشکیل شده (نزدیک و دور) بین سه

1. Hench

جدول ۴. میانگین (حداقل، حداکثر) امتیاز کسب شده توسط نمونه‌های بافتی پس از ۴۲ روز کاشت در استخوان درشت‌نی خرگوش

p-value	کامپوزیت بیوگلاس- هیدروکسی آپاتیت (گروه ۳) (n=9)	هیدروکسی آپاتیت (گروه ۲) (n=9)	بیوگلاس (گروه ۱) (n=9)	
$\geq 0/05$	۳ (۳-۳)	۳ (۳-۲)	۳ (۳-۲)	یکپارچگی موقعیت نزدیک
$\geq 0/05$	۳ (۳-۳)	۳ (۳-۲)	۳ (۳-۲)	یکپارچگی موقعیت دور
0/011	۴ (۴-۳)	۳ (۳-۲)	۳ (۳-۲)	استخوان اسفنجی
0/021	۴ (۴-۳)	۳ (۳-۲)	۳ (۳-۲)	استخوان قشری
0/001	۴ (۴-۳)	۳ (۳-۲)	۲ (۳-۲)	مغز استخوان
0/001	۱۸	۱۵	۱۴	جمع کل

برخی از این عناصر کمیاب بر روی سوخت و ساز و فعالیت بافت استخوانی به گونه‌ای است که برخی پژوهشگران به استفاده منفرد و جداگانه این عناصر در ترمیم نواقص استخوانی روی آورده‌اند. برای مثال در پژوهشی که نتایج آن به تازگی منتشر شده است، تأثیر مثبت استرانسیم بر روی رشد و ترمیم بافت استخوانی در آزمون‌های درون‌تنی، به اثبات رسیده است^(۱۸). وظیفه و عملکرد تمامی عناصر کمیاب در متابولیسم استخوان در مستندات موجود است^(۱۷).

همان‌گونه که در تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی مشاهده شد، اندازه ذرات بیوگلاس کمتر از ۱۰۰ نانومتر بود. گزارش شده است که هرچه اندازه ذرات یک بیوسرامیک زیست فعال کمتر باشد، فعالیت زیستی آن افزایش می‌یابد. به عبارت دیگر سلول‌های استخوانی در مجاورت ذرات زیست فعال بسیار ریز، تکثیر و تزايد بیشتری دارند^(۱۹). زیست فعالی بیوسرامیکی مانند بیوگلاس، وابستگی زیادی به میزان و نرخ رهایش عناصر شیمیایی موجود در ترکیب آن دارد. هرچه اندازه ذرات ریزتر باشد، نرخ رهایش یون‌های مؤثر بر استخوان‌سازی بیشتر خواهد بود^(۱۹). همچنین تصاویر میکروسکوپ الکترونی اندازه بلورهای هیدروکسی آپاتیت را ۵۰ تا ۵۰۰ نانومتر نشان داد. این در حالی است که این اندازه در استخوان طبیعی حیوانی (گاوی) در محدوده ۲۰ تا ۴۰ نانومتر گزارش شده است^(۹). این میزان افزایش و رشد اندازه دانه‌ها به عملیات حرارتی انجام شده در هنگام تهیه ذرات بیوسرامیک نسبت داده می‌شود. ذوب موضعی و به هم پیوستن دانه‌ها، دلیل اصلی کاهش مرزدانه‌ها و افزایش اندازه دانه‌های هیدروکسی آپاتیت پس از طی عملیات حرارتی در ۷۰۰ درجه سانتیگراد است. گزارش شده است که هرچه اندازه دانه‌های هیدروکسی آپاتیت بیشتر باشد، میزان حلالیت و تخریب‌پذیری آن نیز بیشتر خواهد بود^(۸،۹). به هر حال به نظر نمی‌رسد این میزان ناچیز در افزایش اندازه دانه (حداکثر تا ۵۰۰ نانومتر)، تأثیر چندانی بر روی میزان انحلال پذیری ذرات هیدروکسی آپاتیت داشته باشد، هرچند ممکن است خواص مکانیکی (سختی و استحکام) توده‌های ساخته شده از هیدروکسی آپاتیت با بلورهای بزرگتر، ضعیف‌تر باشد.

آنچه که به وضوح می‌توان از آزمون‌های پرتونگاری و هیستوپاتولوژی نتیجه گرفت، برتری محسوس کامپوزیت بیوگلاس/هیدروکسی آپاتیت در ترمیم و القای تشکیل استخوان جدید است. در پژوهش‌های انجام شده توسط سایر پژوهشگران، گزارشی مبنی بر مقایسه زیست فعالی کامپوزیت بیوگلاس/هیدروکسی آپاتیت با هر یک از اجزای آن مشاهده نمی‌شود. اکثر پژوهشگران به منظور افزایش و ارتقای خواص مکانیکی، اقدام به ساخت کامپوزیت‌های بیوگلاس/هیدروکسی آپاتیت نموده‌اند^(۲۰،۲۱). در مقالات منتشر شده، عمدتاً به توانایی این مخلوط در تشکیل آپاتیت در محلول شبیه‌سازی شده بدن و در برخی موارد زیست سازگاری در شرایط برون‌تنی پرداخته شده است که نتایج آن قابل پیش‌بینی به نظر می‌رسد. برخی از پژوهشگران نیز تنها به مقایسه عملکرد بیوگلاس و هیدروکسی آپاتیت پرداخته‌اند. «فوجیشیرو»^۱ و «هنج» و همکاران فعالیت زیستی ذرات میکرو ذرات بیوگلاس و هیدروکسی آپاتیت را در شرایط درون‌تنی و پس از شش هفته کاشت در استخوان ران خرگوش بررسی و مقایسه کردند^(۲۲). «میستری»^۲ و همکاران نیز به بررسی و مقایسه عملکرد زیستی بیوگلاس و هیدروکسی آپاتیت به‌عنوان پوششی برای کاشتنی دندان‌های تیتانیومی پرداختند^(۳). لیکن هیچ‌کدام به بررسی تأثیر کامپوزیت این دو بیوسرامیک در شرایط درون‌تنی نپرداخته‌اند. همان‌گونه که پیش از این نیز عنوان شد، ساخت کامپوزیت بیوگلاس-هیدروکسی آپاتیت تنها با هدف ارتقای خواص مکانیکی مدنظر بوده است. نتایج این پژوهش نشان داد که علاوه بر خواص مکانیکی، خواص و فعالیت زیستی این کامپوزیت نیز نسبت به هر کدام از اجزای آن به تنهایی ارتقا می‌یابد.

هنگامی که هر کدام از بیوسرامیک‌های بیوگلاس و هیدروکسی آپاتیت طبیعی در درون بافت سخت استخوانی کاشته می‌شوند، مزایا و نقاط قوت منحصر به فردی خواهند داشت. به نظر می‌رسد هرگاه بتوان از توانایی‌ها و قابلیت‌های بیوگلاس و هیدروکسی آپاتیت به‌صورت همزمان بهره گرفت، فعالیت و عملکرد زیستی نیز افزایش یافته است. هیدروکسی

زیستی این مخلوط تلفیقی از بهترین قابلیت هدایت (هیدروکسی آپاتیت) و القای استخوانی (بیوگلاس) است و عملکرد آن از عملکرد زیستی هرکدام از اجزاء آن بالاتر خواهد بود.

در این پژوهش استحکام استخوان و خواص بیومکانیکی آن سنجیده نشد. بررسی این خواص می‌تواند در پژوهش دیگری انجام شده و نتایج این مطالعات را تکمیل نماید. همچنین نتایج فوق مربوط به یک بررسی کوتاه‌مدت بود. عوارض جانبی احتمالی و اثرات بلندمدت این مواد در بدن نیاز به ارزیابی طولانی مدت و آزمون‌های تکمیلی دارد که در این پژوهش قابل انجام نبود.

نتیجه‌گیری

در این پژوهش نانو ذرات بیوگلاس، نانوهیدروکسی آپاتیت طبیعی و کامپوزیت این مواد ساخته و مشخصه یابی شد. ارزیابی رفتار زیستی این مواد در شرایط درون تنی دو نتیجه مهم در پی داشت. نتیجه اول، اثبات و تأیید زیست‌فعالی این بیوسرامیک‌ها در تماس با بافت سخت استخوانی بود. به عبارت دیگر، استخوان آسیب دیده در تماس با این بیوسرامیک‌های زیست فعال با سرعت و کیفیت بیشتری ترمیم می‌یابد. نتیجه دوم این پژوهش، اثبات برتری عملکرد زیستی کامپوزیت بیوگلاس/هیدروکسی آپاتیت نسبت به هر یک از اجزای آن بود. به بیان دیگر هرگاه از کامپوزیت بیوگلاس/هیدروکسی آپاتیت در ترمیم استخوان آسیب دیده استفاده شود، نتیجه به مراتب بهتر خواهد بود. در تمامی کاربردها و مصارفی که برای بیوگلاس و هیدروکسی آپاتیت در اشکال مختلف (ذره، توده و پوشش) ارائه شده است، می‌توان کامپوزیت آنها را جایگزین کرد. زیست‌فعالی بیشتر و متعاقب آن بهبودی و التیام هرچه سریع‌تر بافت سخت از مهم‌ترین مزایای بکارگیری این کامپوزیت خواهد بود.

آپاتیت طبیعی (مشتق از استخوان حیوان) فوق‌العاده زیست‌سازگار است به گونه‌ای که در استخوان میزبان به‌عنوان یک عامل کاملاً خودی و بی‌خطر محسوب می‌شود^(۱،۸). این مزیت منحصر به فرد، منجر به پاسخ مناسب بدن به این عامل خارجی خواهد بود. جذب سریع پروتئین‌های واسطه به سمت این ماده و اتصال مناسب سلول‌های استخوانی با آن از مهم‌ترین این پاسخ‌هاست. به‌طورکلی هیدروکسی آپاتیت به‌عنوان یک بیوسرامیک با قابلیت هدایت استخوانی بسیار خوب شناخته می‌شود^(۲۴). اما علیرغم توانایی هیدروکسی آپاتیت در جذب و هدایت سلول‌های استخوانی، به‌دلیل پایداری ساختار و فعالیت شیمیایی بسیار کم، القای خارجی مثبتی از سوی این ماده بر روی سلول‌ها صورت نمی‌گیرد. این دقیقاً همان خصوصیتی است که مزیت و برتری عمده بیوگلاس محسوب می‌شود^(۱،۶،۱۹). بیوگلاس به‌دلیل اینکه یک عامل خارجی متفاوت با استخوان میزبان است، در ابتدا پاسخ مناسبی از سوی سیستم ایمنی بدن دریافت نمی‌کند. به عبارت دیگر، تمایلی از سوی سلول‌های استخوانی و پروتئین‌های واسطه برای جذب شدن به‌سوی بیوگلاس وجود ندارد^(۶). از سوی دیگر، بیوگلاس با رهایش یون‌های کلسیم و فسفر در محیط اطراف، کمک قابل‌توجهی به رشد و فعالیت سلول‌های استخوانی و ترمیم ضایعه در استخوان میزبان خواهد کرد^(۱۹). بیوگلاس به‌عنوان یک بیوماده با قابلیت بالای القای تشکیل استخوان شناخته شده است و مکانیزم زیست‌فعالی متفاوتی با سایر بیوسرامیک‌های مشابه خود دارد^(۱۹،۲۵).

با توجه به مطالب فوق می‌توان این‌گونه نتیجه گرفت: هیدروکسی آپاتیت موجود در کامپوزیت بیوگلاس-هیدروکسی آپاتیت طبیعی کاشته شده در بدن، عامل حرکت و جذب سلول‌ها به سمت کاشتنی و بیوگلاس حاضر در ترکیب، عامل مؤثر بر رشد، فعالیت و تکثیر سلول‌ها خواهد بود. در نتیجه عملکرد

References

1. Hench LL. An Introduction to Bioceramics. 1st edition. London, 1993. p 55-70.
2. Na L, Qing J, Sumin Z, Ruoding W. Preparation and characterization of macroporous sol-gel bioglass. *J Ceram Int*. 2005;31(5):641-6.
3. Garcia C, Cere S, Duran A. Bioactive coatings prepared by sol-gel on stainless steel 316L. *J Noncryst Sol* 2004;348:218-24.
4. Brunski J. An introduction to materials in medicine 2nd ed. NY: Academic Press. 1996. p 37.

5. **Jianli L, Xigeng M.** Sol-gel derived bioglass as a coating material for porous alumina scaffolds. *Ceram Int* 2004; 30 (7):1781-5.
6. **Hench LL, Polak JM.** Third-generation biomedical materials. *Science*. 2002;295(5557):1014-7.
7. **Kapoor S, Batra U.** Preparation and bioactivity evaluation of bone like hydroxyapatite - bioglass composite. *Int J Chem Bio Eng*. 2010;3(1):24-8.
8. **Köseoğlu NC, Büyükkaksoy A, Oral AY, Aslan MH.** Hydroxyapatite/Bioactive glass films produced by a sol-gel method: In vitro behavior. *Advanced Eng Mat*. 2009;11(11): 194-9.
9. **Ruksudjarit A, Pengpat K, Rujijanagul G, Tunkasiri T.** "Synthesis and characterization of nanocrystalline hydroxyl-apatite from natural bovine bone". *Curr App Physics*. 2008; 8:270-2.
10. **Doostmoammadi A.** Preparation and characterization of bioactive glass nanopowder and its coating for improvement of biocompatibility of human body implant. PhD dissertation, *Isfahan University of Technology*, Isfahan, Iran. 2006.
11. **Doostmohammadi A, Monshi A, Salehi R, Fathi MH, Golniya Z, Daniels AU.** Bioactive glass nanoparticles with negative zeta potential. *Ceram Int*. 2011;37:2311-6.
12. **Doostmohammadi A, Monshi A, Salehi R, Fathi MH, Karbasi S, Pieleles U, Daniels AU.** Preparation, chemistry and physical properties of bone-derived hydroxyapatite particles having a negative zeta potential. *Mat Chem Physics*. 2012;132:446-52.
13. **Lane JM, Sandhu HS.** Current approaches to experimental bone grafting. *Orthop Clin North Am*. 1987;18 (2): 213-25.
14. **Dorea HC, McLaughlin RM, Cantwell HD, Read R, Armbrust L, Pool R, Roush JK, Boyle C.** Evaluation of healing in feline femoral defects filled with cancellous autograft, cancellous allograft or Bioglass. *Vet Comp Orthop Traumatol*. 2005;18(3):157-68.
15. **Fathi MH, Doostmohammadi A.** Preparation and characterization of sol-gel, Bioactive glass coating for improvement of biocompatibility of human body implant. *Mat Sci Eng*. 2008;474:128-33.
16. **Hench LL.** Genetic design of bioactive glass. *J Eur Ceram Soc*. 2009;29:1257-65.
17. **Sandstrom B, Walter P.** Role of trace elements for health promotion and disease prevention. *Nutrition Res*. 1998;23(12):1745-51.
18. **Tian M, Cheng F, Song W, Song Y, Chen Y, Wan C, Zhang X.** In vivo study of porous strontium-doped calcium polyphosphate scaffolds for bone substitute applications. *J Mat Science: Mat Med*. 2009;20:1505-12.
19. **Hench LL.** Use of bioactive glass compositions to stimulate osteoblasts production. *US patent 0009598*. 2004.
20. **Ravarian R, Moztarzadeh F, Hashjin MS, Rabiee SM, Khoshakhlagh P, Tahriri M.** Synthesis, characterization and bioactivity investigation of bioglass/hydroxyapatite composite. *Ceramic Int*. 2010;36(1):291-297.
21. **Cholewa-Kowalska K, Kokoszka J, Laczka M, Niedźwiedzki L, Madej W, Osyczka AM.** Gel-derived bioglass as a compound of hydroxyapatite composites. *Biomed Mat*. 2009;4(5):56-60.
22. **Fujishiro Y, Hench LL, Oonishi H.** Quantitative rates of in vivo bone generation for Bioglass and hydroxyapatite particles as bone graft substitute. *J Mat Science: Mat in Med*. 1997;8 (11):649-52.
23. **Mistry S, Kundu D, Datta S, Basu D.** Comparison of bioactive glass coated and hydroxyapatite coated titanium dental implants in the human jaw bone. *Aus Dent J*. 2011;56(1):68-75.
24. **Fathi MH, Hanifi A, Mortazavi V.** Preparation and bioactivity evaluation of bone-like hydroxyapatite nanopowder. *J Mat Proc Tech*. 2008; 202(1-3):536-42.
25. **Lohbauer U, Jell G, Saravanapavan P, Jones JR, Hench LL.** Indirect cytotoxicity evaluation of silver doped bioglass Ag-S70C30 on human primary keratinocytes. *Key engin mat*. 2005;17:431-4.