

اثر گرافت استخوان اسفنجی با پوشش نانوهیدروکسی آپاتیت در درمان ضایعات استخوانی

(یک مطالعه حیوانی)

*دکتر رسول رحیم زاده، *دکتر پژمان ناظم زمردی، **محمدفرزین تاجوانچی

«دانشگاه آزاد اسلامی، واحد سنندج»

خلاصه

پیش زمینه: نانوهیدروکسی آپاتیت یک ماده زیست سازگار است که دارای خواص هدایت و القای استخوانی است و سبب اتصال بیولوژیکی قوی پیوند با استخوان می‌شود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه آزمایشگاهی، ۱۸ خرگوش نر بالغ نژاد نیوزلندی به سه گروه مساوی تقسیم شدند (هر گروه ۶ خرگوش) و ضایعه استخوان برداشت شده با ۱۰ میلی‌متر طول در وسط استخوان زند زیرین تحت بیهوشی عمومی ایجاد گردید. در گروه ۱، حیوانات بدون پرکننده رها شدند، در گروه ۲ ضایعه با استخوان اسفنجی ۱۰ میلی‌متری، و در گروه ۳ ضایعه با داربست استخوان اسفنجی با پوشش نانوهیدروکسی آپاتیت پر شدند. استخوان‌های زند زیرین جراحی شده ۶۰ روز پس از جراحی خارج و تحت بررسی پاتولوژی و بیومکانیکی قرار گرفتند.

یافته‌ها: در عکس‌های پرتونگاری، مقدار ناچیزی از کالوس داخلی، محل نقیصه را در روز ۶۰ در گروه کنترل و گروه ۱ پر کرد، در گروه ۳ کالوس داخلی در روز ۳۰ تشکیل شد. در شاخص بار نهایی، گروه ۲ و ۳ در مقایسه با گروه ۱ اختلاف معنی‌داری نشان دادند ($p < 0.05$). در ارزیابی پاتولوژی استخوان‌سازی داخل غضروفی و ترمیم ثانویه شکستگی در قسمت میانی ناحیه نقیصه در گروه‌های ۲ و ۳ رخ داد.

نتیجه‌گیری: در این مطالعه بین دو گروه با و بدون پوشش نانوهیدروکسی آپاتیت تفاوت معنی‌داری وجود داشت و عملکرد این دو ماده در روند التیام استخوانی ۱۲ هفته پس از جراحی نسبت به گروه کنترل قابل ملاحظه بود.

واژه‌های کلیدی: هیدروکسی آپاتیت، ساختار نانو، استخوان، پیوند استخوانی

دریافت مقاله: ۵ ماه قبل از چاپ؛ مراحل اصلاح و بازنگری: ۳ بار؛ پذیرش مقاله: ۱ ماه قبل از چاپ

Nano-Hydroxyapatite-Coated Cancellous Bone Graft in Bone-Defect Repair

(An Animal Study)

*Rasoul Rahimzadeh, PhD; *Pejman Nazem Zomorrodi, PhD; **Mohammad Farzin Tajavanchi

Abstract

Background: Nano could promote strong biological bonding between implants. In this study the effect of cancellous bone scaffold coated with/without Nano-hydroxyapatite in vivo using an animal model of bone healing was studied.

Methods: In an experimental study, 18 adult male New Zealand white rabbits were used dividing into three groups of six rabbits each. A segmental bone defect of 10 mm in length was created in the middle of the right radial shaft under general effective anesthesia in all rabbits. The defects in group I were left as such without filler, in group II the defect were filled up with harvested 10 mm rib bone and in group III the defect were packed with rib bone covered with nano-hydroxyapatite. The operated radiuses were removed on the 60th day and were pathologically and biomechanically evaluated.

Results: The radiographs showed a trace of internal callus filled the gap in 60 days in group I, whereas in group II and III internal callus almost was formed on 30 days. Repair defect in group I and II with group III; and load bearing of group II, III compared with group I showed no significant difference ($p < 0.05$). In pathological evaluation, active endochondral ossification and secondary fracture repair took place in the middle of the defects in group II, III.

Conclusions: In this study, significant difference was observed between cancellous bone scaffold coated with/without nano-hydroxyapatite and healing process of these two materials were significantly better than the control group at 12 weeks post injury.

Keywords: Hydroxyapatites; Nanostructures; Bone and Bones; Bone Transplantation

Received: 5 months before printing ; Accepted: 1 month before printing

*Veterinarian, **Student of Veterinary Medicine
Department of Clinical Sciences, Sanandaj Branch, Islamic Azad University, Sanandaj, IRAN.

Corresponding Author: Rasoul Rahimzadeh, PhD
Islamic Azad University, Sanandaj Branch, Pasdaran Boulevard, Sanandaj, Iran
E-mail: drtwor@gmail.com

مقدمه

باتوجه به بیماری‌های متعدد استخوانی نظیر عفونت‌های استخوان، تومورهای استخوان و از دست‌دادن استخوان توسط زخم و آسیب، نیاز فزاینده‌ای برای بازتولید استخوان وجود دارد. تکنیک‌های پیوند استخوان و مواد مورد استفاده برای پرکردن نقصه جهت بازگرداندن شکل و عملکرد استخوان از دست‌رفته معمولاً به دلیل مشکلات خاصی از قبیل پس‌زدن پیوند، محدودیت دهنده استخوان، افزایش زمان عمل، عفونت‌ها، درد و در نهایت مرگ و میر احتمالی با محدودیت مواجه هستند^(۱,۲). به‌منظور رفع این محدودیت‌ها طی چندین دهه گذشته تحقیقات زیادی جهت یافتن ماده‌ای که بتواند جایگزین مناسب برای ترمیم بافت استخوانی باشد، انجام گرفته و مواد سنتزی متعدد به‌عنوان جایگزین‌های استخوان و جایگزین‌های مواد استخوانی، استفاده شده‌اند^(۳,۴). در این راستا رشته مواد زیست پزشکی در چند سال گذشته به‌سرعت گسترش یافته تا راه‌حل‌های جدیدی جهت کاهش زمان دوره التیام شکستگی‌ها و دیگر مشکلات سلامت ارائه نمایند. هدف از این مطالعات، بدست آوردن توانایی وزن‌گیری و انجام حرکات معمولی و فعالیت‌های فیزیکی طبیعی عضو درگیر است که این موضوع به افزایش میانگین طول عمر کمک می‌کند. کلسیم هیدروکسی آپاتیت برای بازسازی بافت استخوانی و درمانی بیماری‌های استخوان در جراحی ارتوپدی و شکسته‌بندی قابل استفاده است و به‌ویژه پودر نانومتری آن می‌تواند با قابلیت بیشتر و در زمان کوتاه‌تر، بازسازی بافت استخوانی را میسر سازد و به‌خوبی جایگزین روش‌های قبلی مانند پیوند استخوان شود^(۵,۶). ترمیم و دژنراسانس هر بافت، به تکثیر سلولی و ساخت ماده زمینه‌ای جدید در ناحیه صدمه دیده بستگی دارد. پیوند استخوان مطلوب با ایجاد ساختار مجدد استخوانی باید از طریق جراحی قابل کاشت باشد، جهت پرکردن ضایعه‌های غیرمنظم قالب‌پذیر باشند، سخت و قوی باشد که در تماس با استخوان توانایی تحمل نیرو را فوراً داشته باشد، باید شکل جدید استخوان و به‌هم پیوستن توسط استخوان میزبان ارتقاء یابد، و در نهایت بایستی کاملاً ترکیبی باشد^(۷,۸). مواد سرامیکی

(هیدروکسی آپاتیت و تری کلسیم فسفات) به‌طور گسترده و به‌عنوان جایگزین‌های بالقوه پیوند استخوانی بررسی شده‌اند. محققین زیادی بر ترمیم موفقیت‌آمیز نقایص استخوانی پس از استفاده از نانو هیدروکسی آپاتیت تاکید کرده‌اند. از آنجا که این مواد از نظر خواص فیزیکی و شیمیایی دارای شباهت‌های نزدیکی با ساختار طبیعی استخوان می‌باشند، در صورت استفاده باعث تحریک کمتر بافت میزبان و در نتیجه بروز واکنش‌های آماسی کمتر می‌گردند^(۹,۱۰). بنابراین تحقیقات زیادی در زمینه ظرفیت القاء استخوان‌سازی این ماده انجام شده است. هدف اصلی این پژوهش برطرف کردن مشکلاتی از قبیل ناسازگاری زیستی و نیاز به انواع پیوندهای استخوانی بود. در مهندسی بافت استخوان، قالب به‌عنوان ماتریس‌هایی از تشکیل بافت به کار می‌رود و نقش اساسی در ترکیب استخوانی و ترکیب بافت ایفا می‌کند که پیوند استخوان به‌طور مکرر برای تقویت التیام استخوان با رویکردهای متعدد جهت ساختار مجدد یا جایگزینی ضایعه‌های اسکلتی به‌کار می‌رود. پیوند استخوان خودی مؤثرترین مواد پیوند دهنده است زیرا سه عامل مورد نیاز برای استخوان و بازتولید آن را فراهم می‌کند. هدایت استخوانی و القاء استخوانی شامل این موارد است^(۱۱,۱۲,۱۳). در این مطالعه استخوان دنده تولید شده به‌صورت خودبه‌خودی و پوشانده شده با نانو هیدروکسی آپاتیت قصد دارد هدایت و استحکام استخوانی ضایعه را افزایش دهد و فرآیند سه‌بعدی رشد عروق‌زایی، رشد مویرگ‌های بافتی و سلول‌های استخوان‌ساز میزبان را در پیوند میسر سازد.

مواد و روش‌ها

این مطالعه مطابق اصول اخلاقی مطالعات آزمایشگاهی حیوانی انجام شد و حیوانات در طی تحقیق، تحت مراقبت بودند. هجده خرگوش بالغ نر نیوزلندی با وزن ۳ الی ۳/۵ کیلوگرم، به سه گروه؛ هر گروه شش خرگوش، تقسیم شدند. حیوانات در هر گروه به دو گروه فرعی تقسیم شدند به طوری که سه خرگوش به مدت یک ماه و سه خرگوش به مدت سه ماه وجود داشت. در طی آزمایش، تمامی خرگوش‌ها در قفسه‌های انفرادی

و در شرایط سالم و بهداشتی نگاه‌داری شدند، و میزان استاندارد غذا و آب به آنها داده شد.

رویکرد جراحی

تحت تزریق بین ماهیچه‌ای، دیازپام به میزان ۱ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن، کتامین هیدروکلرید بین وریدی ۳۵ میلی‌گرم/کیلوگرم و زایلازین ۳۵ میلی‌گرم/کیلوگرم بیهوشی عمومی صورت گرفت. ناحیه قدامی جانبی دست راست به طور عادی برای جراحی فراهم شد. یک برش طولی به اندازه ۴ سانتی‌متر ایجاد شد. فضای بین ماهیچه‌های جمع شونده و منبسط شونده برش داده شد و یک دید گسترده از استخوان زند زیرین فراهم شد. سپس با استفاده از اره استخوان‌بر برقی ارتوپدی، از ناحیه وسط استخوان زندزبرین، قطعه‌ای تمام قطر به اندازه ۱ سانتی‌متر برداشته شد و ضایعه با یک پلیت فلزی کوچک با ۴ پیچ ثابت گردید. در گروه یک (گروه کنترل)، ضایعه به‌طور خالی حفظ شد، در گروه دوم، ضایعه با استخوان دنده‌ای اسفنجی خودی پر شد، و در گروه سوم، ضایعه استخوانی با قطعه‌ای از داربست استخوان اسفنجی با پوشش نانوهیدروکسی‌آپاتیت تحت پوشش قرار گرفت.

مراقبت بعد از جراحی

جهت جلوگیری از عفونت‌های احتمالی روزانه ۶۰/۰۰۰ واحد پنی‌سیلین G و ۵ میلی‌گرم/کیلوگرم جنتامایسین به‌صورت عضلانی تزریق شد. این تزریق‌ها تا روز ۵ بعد از عمل جراحی ادامه داشت. بعد از دو هفته پانسمان گچی برداشته شد و ورم، التهاب، ترشحات یا عفونت‌های احتمالی موضع، بررسی گردید. بنخیه‌ها در روز ۱۲ بعد از جراحی کشیده شدند.

تجزیه و تحلیل خواص مکانیکی

تمامی آزمایش‌های مکانیکی با استفاده از دستگاه تراکم‌سنج (Zwick/Roell ساخت کشور آلمان) انجام شد. منحنی فاصله- بار جهت به‌دست‌آوردن ویژگی‌های مکانیکی ثبت شد. تحمل بار با استفاده از بار ماکزیمم ثبت گردید. در قسمت خطی

منحنی فاصله- بار ثبت شد. ویژگی‌های مکانیکی استخوان محور طبیعی برای به دست آوردن مقادیر منابع اندازه‌گیری شد.

ارزیابی پرتونگاری

برای ارزیابی التیام شکستگی، از روز اول تا پایان هفته ۱۲، هر دو هفته یک‌بار، بررسی‌های پرتونگاری با نمای جانبی بعد از جراحی انجام شد و با به‌کارگیری متغیرهای فاصله، در هر دو گروه، کمیت و کیفیت به‌صورت ثابت (FFD=۱۰۰ سانتی‌متر، MAS=۵/۲ سانتی‌متر، KVP=۴۲ سانتی‌متر) تهیه گردید و روند التیام در نقایص استخوانی مورد ارزیابی کیفی قرار گرفت.

بررسی کیفی پرتونگاری‌ها: در این بررسی موارد زیر در مورد هر یک از پرتونگاری‌ها ارزیابی شد: (۱) میزان کالوس احتمالی تشکیل شده داخلی، (۲) میزان کالوس احتمالی تشکیل شده خارجی، (۳) میزان کالوس احتمالی تشکیل شده به‌صورت بین‌کورتکسی، (۴) تحریک استخوان‌های مجاور نقیصه به شروع استخوان‌سازی^۱، (۵) میزان باقی ماندن آپسیستی^۲ پیوند در محل نقیصه و نقش آن در هدایت استخوان طی روند التیام، (۶) میزان پر شدن نقیصه از کالوس التیامی.

بررسی کمی پرتونگاری‌ها: تراکم پرتونگاری‌های استخوان زند زبرین، با استفاده از دستگاه تراکم‌سنج (Konica, PDA-85) ساخت ژاپن) و فرمول $D = \log \frac{I_0}{I}$ (D=تراکم، I_0 = شدت نور تابشی، I= شدت نور عبوری) در هر سه گروه اندازه‌گیری شد.

ارزیابی آسیب‌شناسی

جهت بررسی آسیب‌شناسی، بافت‌های نرم اندام‌های جلویی کاملاً جدا شد و برش محوری که دربرگیرنده ناحیه نقیصه باشد، با یک اره با سرعت پایین انجام شد. سپس هر برش در بافر فرمالین ۱۰٪ قرارگرفت تا نمونه‌هایی که با بافر اسیدفرمیک ۱۵٪ درصد کلسیم‌گیری شده بودند، تثبیت و برای آزمایش‌های آسیب‌شناسی آماده شوند. دو برش با ضخامت ۵ میکرومتر از



شکل ۱. پرتونگاری‌های روز ۹۰ در سه گروه

بین میانگین تراکم استخوانی در گروه ۱ و ۲، بلافاصله دو و چهار هفته بعد از جراحی در مقایسه با پای کنترل اختلاف آماری معنی‌داری وجود داشت ($p < 0/05$)، ولی در هفته شش و هشت بعد از جراحی اختلاف آماری معنی‌دار مشاهده نشد ($p \geq 0/05$). بین تراکم استخوانی در گروه ۳ و پای کنترل، بلافاصله بعد از جراحی اختلاف آماری معنی‌داری داشت ($p < 0/05$)، ولی در هفته‌های ۲، ۴، ۶ و ۸ بعد از جراحی اختلاف آماری معنی‌داری مشاهده نشد ($p > 0/05$) (جدول ۱).

یافته‌های آزمایش بیومکانیکی

نتایج نشان داد نقطه شکستگی $388/2 \pm 6$ N برای استخوان طبیعی بود و در گروه ۱ به صورت $72/4 \pm 12/8$ N در یک ماه ثبت شد؛ در حالی که $182/4 \pm 14/2$ N در گروه ۲ و $211/6 \pm 10/4$ N در گروه ۳ در دوره مشابه بود. در پایان ماه سوم، مشاهدات $97/6 \pm 10/2$ N؛ $324/6 \pm 8/2$ N و $372/6 \pm 17/4$ N بود که مقادیر به‌طور قابل توجهی برای فشار متراکم کننده ثبت شد.

ناحیه مرکزی هر نمونه برداشت شد و با هماتوکسیلین اتوزین رنگ‌آمیزی گردید. برش‌ها توسط پاتولوژیست بررسی شدند^(۱۴،۱۵).

تحلیل داده‌ها به صورت توصیفی شامل محاسبه شاخص‌های آماری، و استنباطی با استفاده از تحلیل واریانس یک طرفه و آزمون توکی با نرم‌افزار آماری SPSS انجام، و سطح معنی‌داری ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

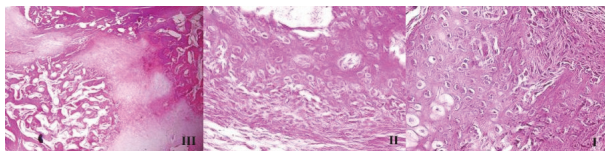
یافته‌های پرتونگاری و ارزیابی کیفی

ارزیابی نتایج حاصل از آزمون سنجش تراکم نشان داد که طی روند ترمیم، تراکم در هفته دوم در گروه کنترل و آزمایش در محل نقیصه ایجاد شد و به‌صورت رادیولوسنت دیده شد، ولی در گروه آزمایش مقداری تراکم بالاتر و دارای رادیوپاسیته بیشتری بود. در هفته چهارم ناحیه نقیصه در گروه آزمایش توسط کالوس پر شده، و هم در حاشیه و هم در منطقه مرکزی نقیصه دیده شد. در گروه کنترل، نقاط جزئی از تشکیل کالوس در حاشیه‌ها دیده شد. در هفته هشتم نقیصه ایجاد شده به‌سختی مشاهده گردید و تراکم استخوان ایجاد شده مشابه استخوان میزبان بود؛ در حالی که در گروه کنترل یک منطقه رادیولوسنت در ناحیه نقیصه مشاهده شد (شکل ۱).

جدول ۱. میانگین و انحراف معیار تراکم در گروه‌های مورد مطالعه

زمان بعد از عمل جراحی					
گروه ۱	بلافاصله بعد	دو هفته بعد	چهار هفته بعد	شش هفته بعد	هشت هفته بعد
دست جراحی شده	$0/88 \pm 0/027$	$0/92 \pm 0/026$	$0/94 \pm 0/024$	$0/95 \pm 0/009$	$0/97 \pm 0/009$
دست کنترل	$0/99 \pm 0/01$	$0/99 \pm 0/008$	$0/99 \pm 0/009$	$0/99 \pm 0/007$	$0/99 \pm 0/009$
p-value	$0/002$	$0/002$	$0/011$	$0/059$	$0/078$
گروه ۲					
دست جراحی شده	$0/88 \pm 0/039$	$0/92 \pm 0/03$	$0/94 \pm 0/02$	$0/95 \pm 0/015$	$0/97 \pm 0/009$
دست کنترل	$0/99 \pm 0/008$	$0/99 \pm 0/009$	$0/99 \pm 0/009$	$0/99 \pm 0/006$	$0/99 \pm 0/009$
p-value	$0/002$	$0/002$	$0/011$	$0/066$	$0/078$
گروه ۳					
دست جراحی شده	$0/95 \pm 0/012$	$0/97 \pm 0/017$	$0/99 \pm 0/011$	$0/99 \pm 0/015$	$0/99 \pm 0/009$
دست کنترل	$0/99 \pm 0/008$	$0/99 \pm 0/009$	$0/99 \pm 0/009$	$0/99 \pm 0/006$	$0/99 \pm 0/005$
p-value	$0/002$	$0/002$	$0/054$	۱	$0/078$

استخوان‌سازی داخل غشایی فعال و ترمیم شکستگی ثانویه در وسط مکان نقیصه در حیوانات گروه ۲ و ۳ رخ داد (شکل ۲). پاسخ التهابی معنی‌داری در ضایعات حیوانات گروه‌های مختلف مشهود نبود؛ با این وجود، البته ممکن بود زودتر اتفاق افتاده باشد.



شکل ۲. فوتومیکروگراف: در گروه ۱ بافت پیوندی رشته‌ای در منطقه نقیصه بدون شکل‌گیری مغز استخوان و غضروف فیبروکارتیلاژ گسترده (رنگ‌آمیزی H & E، بزرگنمایی ۴۰×)؛ در گروه ۲ شکل‌گیری استخوان تراپکولار و استخوان بافته شده (رنگ‌آمیزی H & E، بزرگنمایی ۴۰×)؛ در گروه ۳ شکل‌گیری الگوی استخوان اسفنجی در منطقه پیوند و منطقه پیوند با استخوان قدیمی و مغز استخوان (رنگ‌آمیزی H & E، بزرگنمایی ۴۰×).

بحث

یافته‌های تحقیق حاضر نشان دادند که قدرت و استحکام پیوند دنده خودی با پوشش نانوهیدروکسی آپاتیت و بدون آن حفظ می‌شود و پوشش نانوهیدروکسی آپاتیت فرآیند پیونددهی را بهبود می‌بخشد. یک یافته مهم اختلاف بین گروه‌های یک با دو گروه دیگر با استفاده از کاشت‌های استخوانی بود که هدایت استخوانی بسیار خوبی در گروه‌های کاشت شده نشان داد. همچنین استحکام یک علامت بالینی مناسب در جذب بسیار سریع و جایگزینی کاشت توسط استخوان زنده به‌خصوص در گروه ۳ بود که ویژگی‌های مکانیکی را در تمامی خرگوش‌ها افزایش داد. نانوهیدروکسی آپاتیت، چه از نظر ترکیب و چه از نظر ساختار، شبیه بخش معدنی استخوان طبیعی است. این ترکیب می‌تواند سوخت و ساز استخوان طبیعی را تحریک کند و برای ساخت استخوان جدید مفید باشد. ویژگی‌های نانو هیدروکسی آپاتیت تأمین‌کننده یک قالب ایده‌آل برای هدایت ساخت استخوان جدید است، لذا این روند جبرانی نقیصه استخوان را تسریع می‌بخشد^(۱۶). استحکام مکانیکی و ساختاری نشان‌دهنده هدایت استخوان‌سازی و خواص رگ‌زایی این ترکیب

یافته‌ها نشان داد استخوان دنده اسفنجی با نانوهیدروکسی آپاتیت، یک انتخاب خوب برای التیام ضایعه‌های استخوان قطعه قطعه شده است و ویژگی مکانیکی طبیعی افزایش یافته و قدرت بافت طبیعی را ارزیابی می‌کند (جدول ۲).

جدول ۲. میانگین و انحراف معیار شاخص بار نهایی (N) در استخوان بدون نقصان و در گروه‌های مورد مطالعه

زمان	شاخص بار نهایی (N)		
	گروه ۱	گروه ۲	گروه ۳
۱ ماه	۳۸۸/۲±۶	۱۸۲/۴±۱۴/۲	۲۱۱/۶±۱۰/۴
۳ ماه	۳۸۸/۲±۶	۳۲۴/۶±۸/۲	۳۷۲/۲±۷

یافته‌های آسیب‌شناسی

ناحیه نقیصه در تمام گروه‌ها مقادیر متفاوتی از تولید استخوانی جدید را نشان داد؛ اگرچه ناحیه نقیصه در گروه کنترل دارای کمترین میزان از استخوان جدید و گاهی با بافت همبندی فیبروزه ترکیبی و غضروف پوشیده شده بود.

در سطح هیستوپاتولوژیک، ناحیه نقیصه در حیوانات گروه هیدروکسی آپاتیت، در معیارهای بهبود پیشرفت بیشتری نسبت به دو گروه دیگر نشان داد. بافت فیروز اجتماع نیافته یا فیبروکارتیلاژ، در ناحیه نقیصه گروه کنترل غالب بود و تشکیل عروق کم در ناحیه نقیصه دیده شد. پل کالوس و یا اجتماع بافتی در هر یک از نقیصه‌ها، توسعه نیافته بود. این معیارها فرایندهای درمانی بسیار آهسته‌ای را در گروه کنترل نشان داد. نقیصه در دو خرگوش از گروه ۳ با استخوان کورتیکال بالغ پر شد و در ۴ خرگوش توسط بافت فیروز غضروفی جایگزین گردید. اگر چه ناحیه نقیصه در حیوانات گروه ۲ برخی از فعالیت‌های رگ‌زایی را نشان داد، ولی رگ‌زایی جدید به خوبی گروه ۳ نبود (شکل ۲).

تراپکولار عادی و استخوان ساخته شده به‌طور یکنواخت، در ناحیه نقیصه حیوانات گروه ۳ شکل گرفته بود، آپاتیت و ناحیه آسیب این گروه با استخوان تازه پر شد که نشان دهنده بلوغ مناسب بود. با این حال، نقیصه در یک خرگوش موجود، بیشتر از اینکه استخوانی باشد، از جنس فیبروکارتیلاژ بود.

استخوان میزبان قابل شناسایی بود. بین روزهای ۱۵ تا ۳۰ واکنش تشکیل کالوس بدون نشانه جذب داربست قابل مشاهده بود. در روز ۳۰ داربست استخوان اسفنجی با پوشش نانو هیدروکسی آپاتیت در طی روند جذب از هر چهار طرف بود و پرتونگاری، جایگزینی آن با استخوان جدید رشد یافته را نشان داد. در روز ۶۰، کورتکس در ناحیه نقیصه در راستای محور طولی شروع به پل زدن از طریق تشکیل بافت استخوان جدید کرد و پروسه التیام سازماندهی شد. تشکیل پل کامل و ایجاد کالوس بین کورتکس در روز ۹۰ با تراکم مشابه استخوان دیده شد که داربست را دربرگرفت که این مشاهدات با یافته‌های «ناندی»^۳ و همکاران مطابقت می‌کند.^(۲۰) به نظر می‌رسد نانو هیدروکسی آپاتیت علاوه بر خاصیت هدایت رشد استخوان، دارای خاصیت القای استخوانی نیز می‌باشد. در برخی از منابع به صراحت اعلام شده که نانو هیدروکسی آپاتیت، استخوان‌سازی را از طریق تحریک استئوبلاست‌ها و کمک به تفکیک و تمایز این سلول‌ها تحریک می‌نماید. به عبارت دیگر نانو هیدروکسی آپاتیت ضمن تشکیل داربستی برای رشد استخوان، سبب تحریک پروژنیوتورهای استئوژنیک، رشد، تقسیم و تفکیک و تمایز و در نتیجه تحریک فعالیت استخوان‌سازی خواهد شد. نتیجه این است که نانو هیدروکسی آپاتیت در مقایسه با پلیت استخوانی دارای خاصیت القاء استخوانی (استئوژنز) و هدایت استخوانی بهتر و مطلوب‌تری می‌باشد. در بررسی‌هایی که از داربست با پوشش نانو هیدروکسی آپاتیت در پر کردن نقیصه استفاده شده، حضور داربست برای رشد استخوان‌های جدید با پر کردن نقیصه مفید، و حتی کیفیت التیام استخوانی در ناحیه نقیصه در مقایسه با گروه بدون داربست بسیار بالاتر بوده به طوری که در عکس‌های پرتونگاری، تمایز محل نقیصه از استخوان طبیعی در بسیار کم بوده و در واقع تشکیل بافت استخوانی جدید در صورت استفاده از نانو هیدروکسی آپاتیت، بسیار سازمان یافته‌تر از التیام بدون ایمپلنت است.^(۲۱،۲۲،۲۳) براساس یافته‌های پرتونگاری، آسیب‌شناسی و بیومکانیکی، مطالعه حاضر شکل‌گیری الگوی استخوان اسفنجی در منطقه پیوند و منطقه پیوند با استخوان

در داخل بدن است که «رحیم‌زاده» و همکاران نیز از طریق ارزیابی سونوگرافی داپلر به تشکیل عروق جدید در گروه نانو هیدروکسی آپاتیت نسبت به گروه کنترل اشاره کرده‌اند. رگ‌های کوچک منشا گرفته از آندوستیوم و پریوستیوم، به داخل بستر داربست نفوذ کرده و در ناحیه ترمیم مشاهده می‌شوند. این عروق به طور مستقیم با میزان تشکیل استخوان مرتبط هستند. یافته‌های این مطالعه، فعالیت بیولوژیکی داربست علی‌رغم محدودیت حضور آن را تأیید نمود^(۱۷). در تحقیق حاضر، زیست‌پذیر بودن بیولوژیکی استخوان اسفنجی با داربست نانو هیدروکسی آپاتیت به عنوان یک پیوند با نقش دوگانه در کنار پر کردن نقیصه استخوانی و تحریک و افزایش سرعت بهبود نقیصه ارزیابی گردید.

در مقایسه عکس‌های پرتونگاری سه گروه، علت عدم رویت کالوس خارجی، عدم تحریک دو سر نقیصه یا ثابت بودن شکستگی بود. همچنین به دلیل فاصله زیاد دو سر استخوان مجاور نقیصه و عدم ایجاد یک الگوی شکستگی طبیعی در مطالعه حاضر، امکان ترمیم طبیعی استخوان در زمان مورد نظر وجود نداشت. هدایت استخوانی، پیوند التیام استخوان را ارتقا بخشیده و به دست‌یابی مجدد قدرت مکان ضایعه سریع‌تر کمک می‌کند. ارزیابی پرتونگاری در فواصل مختلف زمانی در حیوانات گروه ۱، تحریک کمتر کالوس داخلی در مقایسه با گروه ۲ و ۳ را نشان داد؛ با این حال حداقل واکنش پریوستی و لبه‌های صاف از کورتکس استخوان در محل نقیصه قابل مشاهده بود که می‌تواند به دلیل فاصله زیاد دو سر استخوان مجاور نقیصه باشد که با مشاهدات «زو»^۱ و همکاران همخوانی دارد. پس از آن کاهش قابل توجه اندازه شکاف با ایجاد بافت استخوانی جدید سبب شد لبه‌های شکاف گردتر و صاف‌تر شود که این یافته مشابه گزارش «کاپولاری»^۲ و همکاران بود^(۱۸،۱۹). در گروه آزمایش در روز صفر تصاویر پرتونگاری حاکی از قرار گرفتن درست داربست استخوانی در قسمت میانی شفت دیافیز زند زبرین بود که از نظر تراکم با تفاوت جزئی نسبت به

شوند. در بررسی حاضر استخوان دنده اسفنجی با نانوهیدروکسی آپاتیت تحت پوشش قرار گرفت که می‌تواند یک انتخاب خوب برای التیام ضایعه‌های استخوانی قطعه قطعه شده باشد و بازتولید سریع‌تر را با ویژگی تقریباً مکانیکی طبیعی از ضایعات استخوان فراهم می‌سازد.

نتیجه‌گیری

نانوهیدروکسی آپاتیت، یک گزینه قابل دسترسی برای از بین بردن معایب پیونددهی استخوان خودی و برای بازگشت استحکام و قدرت اولیه در ضایعات مربوط به بدنه استخوان‌های دراز و طویل می‌باشد.

1. Barnes

قدیمی و مغز استخوان در گروه ۲ و ۳ را نشان می‌دهد. «بارنز»^۱ و همکاران نشان دادند که سلول‌های غضروفی به دست آمده از مزانشیمی پروژنیاتور، تکثیر و سنتز ماتریکس غضروفی را تا زمانی انجام می‌دهند که همه بافت فیروزه توسط غضروف جایگزین شده باشد، که در آن از تولید غضروف کاسته، و فیبروبلاست جایگزین منطقه با بافت فیروزه منتشر می‌شود. مناطق غضروفی مجزا به تدریج رشد کرده و ادغام می‌شوند تا یک پلاک فیبروکاریلاژی مرکزی بین قطعات شکستگی به عنوان آتل شکستگی تولید شود.^(۲۴)

همزمان با تحت پوشش قرار دادن فاصله زیاد شکستگی در بدنه استخوان‌های طویل با مواد قالب‌بندی برای مهندسی بافت استخوان، باید هدایت استخوانی نیز صورت گیرد و به این ترتیب سلول‌های تولید کننده استخوان می‌توانند در داربست‌ها اضافه

References

1. Qian XU, Hongyan LU, Jingchao Z, Guoyu LU, Zhennan D, Anchun MO. Tissue engineering scaffold material of porous nanohydroxyapatite/polymide66. *Int J Nanomedicine*. 2010;5:331-5.
2. Li J, Hong J, Zheng Q, Guo X, Lan S, Cui F, Pan H, Zou Z, Chen C. Repair of rat cranial bone defects with nHAC/PLLA and BMP-2-related peptide or rhBMP-2. *J Orthop Res*. 2011;29(11):1745-52.
3. Nascimento C, Issa JPM, Oliveira RR, Iyomasa MM, Siessere S, Regalo SCH. Biomaterials applied to the bone healing process. *Int J Morphol*. 2007;25(4):839-46.
4. Fricain JC, Schlaubitz S, Le Visage C, Arnault I, Derkaoui SM, Siadous R, Catros S, Lalonde C, Bareille R, Renard M, Fabre T, Cornet S, Durand M, Léonard A, Sahraoui N, Letourneur D, Amédée J. A nano-hydroxyapatite-pullulan/dextran polysaccharide composite macroporous material for bone tissue engineering. *Biomaterials*. 2013;34(12):2947-59. doi: 10.1016/j.biomaterials.2013.01.049.
5. Meirelles L, Arvidsson A, Andersson M, Kjellin P, Albrektsson T, Wennerberg A. Nano hydroxyapatite structures influence early bone formation. *J Biomed Mater Res*. 2008;87(A):299-307.
6. Guda T, Walker JA, Pollot BE, Appleford MR, Oh S, Ong JL, Wenke JC. In vivo performance of bilayer hydroxyapatite scaffolds for bone tissue regeneration in the rabbit radius. *J Mater Sci Mater Med*. 2011;22:647-656. doi: 10.1007/s10856.
7. Bucholz RW. Nano allograft osteoconductive bone graft substitutes. *Clin Orthop Relat Res*. 2002;395:44-52.
8. Yang K, Wei J, Wang CY, Yubao I. A study on in vitro and in vivo bioactivity of nano hydroxyapatite /polymer biocomposite. *Chinese Sci Bull*. 2007;52(2):267-71.
9. Sagar N, Pandey AK, Gurbani D, Khan K, Singh D, Chaudhari BP, Soni VP, Chattopadhyay N, Dhawan A, Bellare JR. In-vivo efficacy of compliant 3D nanocomposite in critical-size bone defect repair: a six month preclinical study in rabbit. *PLoS One*. 2013;8(10):e77578. doi: 10.1371/journal.pone.0077578.
10. Xiong Y, Ren C, Zhang B, Yang H, Lang Y, Min L, Zhang W, Pei F, Yan Y, Li H, Mo A, Tu C, Duan H. Analyzing the behavior of a porous nano-hydroxyapatite/polyamide 66 (n-HA/PA66) composite for healing of bone defects. *Int J Nanomedicine*. 2014;9:485-94. doi: 10.2147/IJN.S52990.
11. Bigham-Sadegh A, Mirshokraei P, Karimi I, Oryan A, Aparviz A, Shafiei-Sarvestani Z. Effects of adipose tissue stem cell concurrent with greater omentum on experimental long-bone healing in dog. *Connect Tissue Res*. 2012;53(3):334-42. doi: 10.3109/03008207.2012.660585.
12. Kweon H, Lee KG, Chae CH, Balázi C, Min SK, Kim JY, Choi JY, Kim SG. Development of nano-hydroxyapatite graft with silk fibroin scaffold as a new bone substitute. *J Oral Maxillofac Surg*. 2011;69(6):1578-86. doi: 10.1016/j.joms.2010.07.062.
13. Sun F, Zhou H, Lee J. Various preparation methods of highly porous hydroxyapatite/polymer nanoscale biocomposites for bone regeneration. *Acta Biomater*. 2011;7(11):3813-28. doi: 10.1016/j.actbio.2011.07.002.

14. Voor MJ, Arts JJC, Klein SA, Walschot LHB, Verdonschot N, Buma. Is hydroxyapatite cement an alternative for allograft bone chips in bone grafting procedures? A mechanical and histological study a rabbit cancellous bone defect model. *J Biomed Mater Res Part Appl Biomater.* 2004;71(2):398-407.

15. Lee JS, Park WY, Cha JK, Jung UW, Kim CS, Lee YK, Choi SH. Periodontal tissue reaction to custom-ized nano-hydroxyapatite block scaffold in one-wall intrabony defect: a histologic study in dogs. *J Periodon- tal Implant Sci.* 2012;42(2):50-8. doi: 10.5051/jpis.2012.42.2.50.

16. Bose S, Roy M, Bandyopadhyay A. Recent advances in bone tissue engineering scaffolds. *Trends Biotechnol.* 2012;30(10):546-54. doi: 10.1016/j.tibtech.2012.07.005.

17. Rahimzadeh R, Veshkini A, Sharifi D, Hesaraki S. Value of color Doppler ultrasonography and radiography for the assessment of the cancellous bone scaffold coated with nano-hydroxyapatite in repair of radial bone in rabbit. *Acta Cir Bras.* 2012;27(2):148-54.

18. Zhu W, Wang D, Xiong J, Liu J, You W, Huang J, Duan L, Chen J, Zeng Y. Study on clinical application of nano-hydroxyapatite bone in bone defect repair. *Artif Cells Nanomed Biotechnol.* 2014:14.

19. Caporali EHG, Rahal SC, Morceli J, Taga R, Granjeiro JM, Cestari TM, Mamprim MJ, Correa M.

Assessment of bovine biomaterials containing bone morphogenetic proteins bound to absorbable hydroxylapatite in rabbit segmental bone defects. *Acta Cirúrgica Brasileira.* 2006;21(6):366-73.

20. Nandi SK, Kundu B, Ghosh SK, Kumar D, Basu D. Efficacy of nano-hydroxyapatite prepared by an aqueous solution combustion technique in healing bone defects of goat. *J Vet Sci.* 2008;9(2):183-91.

21. Abedi G, Jahanshahi A, Fathi MH, Haghdoost IS, Veshkini A. Study of nano-hydroxyapatite/zirconia stabilized with yttria in bone healing: histopathological study in rabbit model. *Pol J Pathol.* 2014;65(1):40-7.

22. Meimandi Parizi A, Bigam-Sadegh A, Oryan A, Shafiei-Sarvestani Z. Effectiveness of synthetic hydroxylapatite versus Persian Gulf coral in an animal model of long bone defect reconstruction. *J Orthopaed Traumatol.* 2013;14:259-68. doi: 10.1007/s10195-013-0261-z.

23. Sharifi D, Khoushkerdar HR, Abedi G, Asghari A, Hesaraki S. Mechanical properties of radial bone defects treated with autogenous graft covered with hydroxyapatite in rabbit. *Acta Cir Bras.* 2012;27(3):256-9.

24. Barnes GL, Kostenuik PJ, Gerstenfeld LC, Einhorn TA. Growth factor regulation of fracture repair. *J Bone Miner Res.* 1999;14:1805-15.