

تأثیر نانو هیدروکسی آپاتیت به همراه مغز استخوان برای ترمیم نقیصه استخوانی در خرگوش؛ بررسی رادیولوژیکی و هیستوپاتولوژیکی

چکیده

پیش‌زمینه: امروزه در ارتوپدی دامپزشکی و انسانی برای تحریک فرایند التیام شکستگی‌ها، سرعت بخشیدن به اتصال مفصلی و ترمیم نقیصه‌های استخوانی از پیوند استخوانی استفاده می‌شود. در این مطالعه اثرات استفاده توام نانو هیدروکسی آپاتیت با مغز استخوان در ترمیم شکستگی استخوان خرگوش به شکل رادیولوژیکی و هیستوپاتولوژیکی بررسی می‌شود.

مواد و روش‌ها: این مطالعه تجربی در بهار و تابستان ۱۳۹۸، بر روی ۲۰ خرگوش نر بالغ نژاد نیوزلندی ۱۲ ماهه، به وزن تقریبی ۲ کیلوگرم انجام شد. خرگوش‌ها به صورت تصادفی به ۴ گروه تقسیم شدند. قطعه استخوانی از استخوان رادیوس برداشته شد در گروه اول (تعداد=۵) (گروه کنترل)، نقیصه استخوانی خالی ماند و هیچ ماده‌ای تزریق نشد. در گروه دوم (تعداد=۵)، در محل نقیصه نانو هیدروکسی آپاتیت، در گروه سوم (تعداد=۵)، مغز استخوان و در گروه چهارم (تعداد=۵)، نانو هیدروکسی آپاتیت به همراه مغز استخوان تزریق و پوست و عضلات بخیه شد.

رادیوگراف از دست خرگوش‌ها بعد از عمل و در روز های ۱۴، ۲۸، ۴۲ و ۵۶ در نمای جانبی تهیه شد. نمونه برداری از استخوان جهت ارزیابی هیستوپاتولوژی در هفته هشتم انجام گرفت. رادیوگراف و نمونه‌ها از لحاظ میزان جوش خوردگی، فعالیت استخوان‌سازی و دوباره شکل‌پذیری مورد بررسی آماری قرار گرفت.

یافته‌ها: در بررسی رادیوگرافیک در هفته‌های دوم و چهارم و ششم و هشتم اختلاف آماری معنی‌داری بین گروه‌ها مشهود بود ($p < 0/05$) که این اختلاف در هفته ششم بیشتر شاخص بود. در هفته ششم مشاهده شد که گروه نانو هیدروکسی آپاتیت+مغز استخوان بهتر از گروه نانو هیدروکسی آپاتیت به تنهایی عمل کرده بود ($p = 0/02$). در بررسی هیستوپاتولوژیکی گروه نانوذرات هیدروکسی آپاتیت به همراه مغز استخوان، در مقایسه با گروه کنترل روند استخوان‌سازی از شدت بیشتری برخوردار بود.

نتیجه‌گیری: نتیجه به دست آمده در مطالعه ما بیانگر این است که گروه «نانو هیدروکسی آپاتیت+مغز استخوان» در مقایسه با دو گروه دیگر «نانو هیدروکسی آپاتیت به تنهایی» و گروه «کنترل» از نظر ترمیم استخوانی بهتر عمل کرده است. پیشنهاد می‌شود این آزمایش با مدل حیوانی بزرگتر انجام شود تا کاربرد بالینی پیدا کند.

واژگان کلیدی: خرگوش، ترمیم شکستگی، مواد بیولوژیکی، مغز استخوان، هیدروکسی آپاتیت.

دریافت مقاله: ۴ ماه قبل از چاپ؛ مراحل اصلاح و بازنگری: ۱ بار؛ پذیرش مقاله: ۱ ماه قبل از چاپ

*دکتر مهرداد یادگاری، **دکتر امین بیغم صادق، ***دکتر عبدالرسول نامجو، ****دکتر سانا فر هنگ، *****دکتر سجاد فرهنگی

مقدمه

امروزه در ارتوپدی دامپزشکی و انسانی برای تحریک التیام شکستگی‌ها و سرعت بخشیدن به ترمیم نقیصه‌های استخوان، از پیوند استخوان استفاده می‌شود. پیوندهای خودی استخوانی معروف به اتوگرافت هنوز هم به عنوان یک معیار طلایی برای مقایسه با سایر عوامل تحریک کننده استخوان‌سازی مطرح است. استخوان اتوگرافت علاوه بر داشتن مواد تحریک کننده التیام، واکنش‌های ایمنی را تحریک نمی‌کند و باعث انتقال بیماری‌های مسری نمی‌شود^(۱). برای جمع‌آوری استخوان خودی از ستیغ ایلئوم، متافیز بالای استخوان درشت نی و الکرانسون، و غیره استفاده می‌شود. ولی همین جمع‌آوری استخوان خودی عوارضی مثل درد، عفونت، شکستگی، از دست دادن خون و افزایش مراحل جراحی را در پی دارد و نیز مقدار استخوان برداشت شده محدود است^(۲،۳). با توجه به احتمال وقوع این مشکلات، تمایل برای استفاده از پیوند استخوان غیر خودی مثل آلوگرافت و زنوگرافت یا جایگزین‌های مصنوعی بیشتر شده است.

* استادیار گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد ایران
** استاد بخش جراحی و رادیولوژی دانشکده دامپزشکی شیراز، شیراز، ایران، استاد بخش جراحی و رادیولوژی دانشکده دامپزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران
*** دانشیار گروه پاتولوژی دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد ایران
**** رزیدنت رادیولوژی دامپزشکی واحد علوم تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد ایران
***** دانش‌آموخته دکتری دامپزشکی
نویسنده مسئول: دکتر امین بیغم صادق
Email: dr.bigham@gmail.com

ویژگی‌های مشترکی با سلول‌های اندوتلیال، اپی‌تلیال و عضلانی دارند و در نتیجه آنتی‌ژن‌های سطحی متنوعی را بیان می‌کنند^(۱۴). سلول‌های بنیادی مزانشیمی واکنش‌های لنفوسیتی ایجاد نمی‌کنند و قادر به تعدیل و سرکوب سیستم ایمنی هستند^(۱۵). از طرفی سلول‌های ایده‌آل برای پیوند باید چندین خصوصیت از جمله دستیابی آسان، قدرت تکثیر سریع در محیط کشت، قدرت حیات طولانی و عدم رد پیوند در میزبان را داشته باشند که سلول‌های استرومایی مغز استخوان تمامی این صفات را دارا هستند. سلول‌های بنیادی به دست آمده از مغز استخوان، زمانی که در حضور دگزامتازون، اسکوربیک اسید و بتاگلیسرول فسفات کشت داده شوند از استئوبلاست‌ها تمایز پیدا می‌کنند^(۱۶). در جستجوی منابع، مطالعاتی وجود داشت که در آنها به کاربرد نانو هیدروکسی آپاتیت به تنهایی یا همراه استخوان اسفنجی یا کورتیکال اشاره شده بود ولی در مورد استفاده توام با مغز استخوان خودی در ترمیم شکستگی استخوان مطالعه‌ای صورت نگرفته بود^(۱۷). هدف از انجام این مطالعه بررسی رادیولوژیکی و هیستوپاتولوژیکی تأثیر نانو هیدروکسی آپاتیت به همراه مغز استخوان خودی در ترمیم شکستگی تجربی در خرگوش بود.

مواد و روش‌ها

ابتدا ۲۰ خرگوش نر از نژاد نیوزلندی، به وزن تقریبی ۲ کیلوگرم از خانه حیوانات دانشکده دامپزشکی خریداری شد و داروی ضدانگل آیورمکتین زیرپوستی به آنها تزریق شد. خرگوش‌ها به مدت ۱۰ روز، در محیط جدید نگهداری شدند تا اثرات استرس حمل و نقل بر نتایج آزمایش تأثیر نگذارد. مطالعه پژوهشی حاضر در بخش جراحی و رادیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهرکرد در بهار و تابستان ۱۳۹۸ صورت گرفت. این مطالعه در کمیته اخلاق دانشگاه تایید و در طول مدت پژوهش تمام حقوق حیوانات رعایت شد. مطابق اصول کار با حیوانات مصوبه شورای پژوهشی دانشکده به شماره ۱۸۲۵-۱-۱۱-۲۶ مقررات اجرا شد.

آماده سازی نانو هیدروکسی آپاتیت

نانو هیدروکسی آپاتیت با بسته‌بندی ۲۰ گرمی استریل که مصارف پزشکی و دندانپزشکی دارد از شرکت فنی مهندسی نیک سرام رازی تهیه شد.

کاربرد این مواد مصنوعی در پیوند استخوان از نظر مقدار برداشت محدودیت ندارد و حاوی سلول‌ها و مواد پروتئینی محرک التیام استخوان است. به علاوه، به شکل مکانیکی یک داربست حمایتی را در شکاف‌های بزرگ استخوانی مثل محل برداشت تومورها و از دست رفتن بافت استخوانی تشکیل می‌دهد^(۴). با این حال، استفاده از آلوگرافت‌ها خطر انتقال بیماری‌های مسری و ایجاد واکنش‌های ایمنولوژیک و انتقال ویروس و محدودیت منبعی برای پیوند را نیز با خود دارد^(۵).

هیدروکسی آپاتیت سنتتیک، تری کلسیم فسفات و ترکیب هر دوی آنها از جمله مواد متداول برای پیوند استخوان هستند و 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 کاهش بروز واکنش‌های آماسی می‌شوند^(۶). هیدروکسی آپاتیت به خاطر شباهت در فرمول و فاز معدنی شدن استخوان همواره گزینه اول است و خاصیت استئوکنداکتیو^۱ دارد و به عنوان داربست جهت رشد سلول‌های استخوان ساز کار می‌کند و خاصیت استئواینداکتیو^۲ ندارد^(۸). نانوذرات هیدروکسی آپاتیت به علت اندازه کوچکتر و شارژ سطحی بالاتر ذرات و همچنین درجه بلورینگی و ثبات کلئوئیدال بالاتری که دارند، به بهبود خواص استحکام بخشی و سهولت کاربرد منجر می‌شوند. تحقیقات نشان داده است که حضور نانو ذرات سرامیکی هیدروکسی آپاتیت در کامپوزیت‌ها سبب تحریک استخوان‌زایی در اطراف بافت و ایمپلنت می‌شود^(۹).

مغز استخوان علاوه بر داشتن سلول‌های رده خون‌ساز، سلول‌های داربستی با خاصیت کلون‌زایی نیز دارد. مهم‌ترین ویژگی این سلول‌ها، توان تمایز آنها بین کلون‌هایی شبه غضروف با استخوان است^(۱۰). همچنین سلول‌های بنیادی مزانشیمی توان تمایز سه ظرفیتی دارند و علاوه بر غضروف و استخوان، قادر به تمایز سلول‌های رده چربی نیز هستند. این سلول‌ها به دلیل این که به راحتی از نمونه‌های مغز استخوان قابل استخراج هستند و از طرفی در شرایط کشت به راحتی تکثیر می‌شوند، سلول مناسبی برای استفاده در مطالعات مرتبط با ژن درمانی، سلول درمانی و مهندسی بافت، به ویژه بافت استخوان در نظر گرفته می‌شوند^(۱۱). مزیت دیگر استفاده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی این است که می‌توان از آنها در پیوندهای آلوژنیک استفاده کرد^(۱۲). مطالعات پیشین نشان داده‌اند که این سلول‌ها

1. Osteoconduction
2. Osteoinduction

نحوه اخذ مغز استخوان

قسمت فوقانی استخوان درشت نی در خرگوش‌ها تراشیده و به شکل اسپتیک آماده‌سازی جراحی شد. از هر خرگوش با استفاده از سوزن جمشیدی (که مختص اخذ مغز استخوان است) به میزان ۱ سی‌سی مغز استخوان از بخش اسفنجی درشت نی دریافت شد.

یافته‌ها

جهت انجام اعمال جراحی بر خرگوش‌ها آنها یکی یکی از سالن نگهداری به سالن جراحی منتقل شدند. در سالن آماده‌سازی با تزریق داروی آسپرومازین با دوز ۰/۰۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم آرام شدند و با ترکیب کتامین با دوز ۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم و زایلازین با دوز ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم و دیازپام با دوز ۴ میلی‌گرم بر کیلوگرم بیهوش شدند و دست راست آنها تراشیده شد. سپس، به اتاق عمل برده شدند و با تکنیک دقیق جراحی از هر درشت نی ۱۰ میلی‌متر استخوان برداشته شد. در مرحله بعد، خرگوش‌ها به صورت کاملاً تصادفی به ۴ گروه مساوی ۵ عددی تقسیم شدند:

در گروه کنترل منفی، نقیصه استخوانی دست نخورده ماند.

در گروه اول تجربی، نقیصه استخوانی با نانو هیدروکسی آپاتیت پر شد.

در گروه دوم تجربی، نقیصه استخوانی با مغز استخوان دریافتی از خود حیوان پر شد.

در گروه سوم تجربی، نقیصه استخوانی با نانو هیدروکسی آپاتیت به همراه مغز استخوان پر شد.

لازم به توضیح است که در گروه مغز استخوان به تنهایی، یا نانو هیدروکسی آپاتیت به تنهایی، به ترتیب ۱ سی‌سی مغز استخوان یا ۱ سی‌سی نانو هیدروکسی آپاتیت در نقیصه استخوانی تزریق می‌شد و در گروه ترکیب مغز استخوان با نانو هیدروکسی آپاتیت از هر کدام ۰/۵ سی‌سی در یک سرنگ ترکیب و در نقیصه تزریق می‌شد.

روش جراحی:

برای ارزیابی و درجه‌بندی رادیوگراف‌های تهیه شده، از سیستم درجه‌بندی تغییر شکل یافته «Ln و سندا» استفاده شد که به شرح زیر است^(۱۸) (جدول ۱).

جدول ۱- سیستم درجه‌بندی برای رادیوگراف‌ها به روش تغییر شکل یافته لین و سندهو (Sandhu و Lane)	
درجه	(Bone formation) شکل‌گیری استخوان
۰	هیچ نشانه‌ای از شکل‌گیری استخوان
۱	شکل‌گیری استخوان و پر شدن ۲۵٪ نقیصه
۲	شکل‌گیری استخوان و پر شدن ۵۰٪ نقیصه
۳	شکل‌گیری استخوان و پر شدن ۷۵٪ نقیصه
۴	شکل‌گیری استخوان و پر شدن ۱۰۰٪ نقیصه
Union جوش خوردگی (فوقانی و تحتانی)	
۰	عدم جوش خوردگی
۱	احتمالاً جوش خوردگی
۲	جوش خوردگی کامل
Remodeling بازسازی	
۰	هیچ نشانه‌ای از بازسازی
۱	نشانه‌های ضعیف بازسازی
۲	بازسازی کامل

بررسی هیستوپاتولوژیک:

خرگوش‌ها مدت ۸ هفته نگهداری شدند و در روز ۵۶ تمام آنها پس از القای بیهوشی با تزریق سولفات منیزیم زیاد به شکل تزریق داخل قلبی معدوم شدند. سپس استخوان زنده زبرین هر خرگوش جدا شد و تمامی بافت‌های نرم اطراف آن را از استخوان جدا کردیم و نمونه‌برداری برای بررسی هیستوپاتولوژیکی انجام شد. لام‌های هیستوپاتولوژی تهیه و با میکروسکوپ نوری بررسی شدند و در نهایت با سیستم امتیازدهی امری درجه‌بندی شدند (جدول ۲).

تجزیه و تحلیل آماری

ابتدا نتایج به دست آمده به وسیله آزمون آماری Kruskal-Wallis non parametric ANOVA مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت، زمانی که ارزش p کمتر از ۰/۰۵ شد، یافته‌ها دوباره با آزمون آماری Mann-Whitney U test مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار می‌گرفتند. در این آزمون اگر ارزش احتمال کمتر از ۰/۰۵ بود ($p < 0.05$)، از نظر آماری معنی‌دار تلقی شد. برای انجام تست‌های آماری از نرم افزار SPSS version 16 (SPSS, Inc, Chicago, USA) استفاده شد.

نتایج رادیوگرافی

جدول ۲- سیستم درجه‌بندی برای هیستوپاتولوژی به روش امری ^(۱۹)	
درجه‌بندی	بافت
۰	خالی
۱	فقط بافت فیبروز
۲	بافت فیبروز بیشتر از بافت فیبروکارتیلیج
۳	بافت فیبروکارتیلیج بیشتر از بافت فیبروز
۴	فیبروکارتیلیج
۵	بافت فیبروکارتیلیج بیشتر از بافت استخوانی
۶	بافت استخوانی بیشتر از بافت فیبروکارتیلیج
۷	بافت استخوانی

ارزیابی رادیوگرافی روند التیام در خرگوش‌ها در چهار گروه «نانوهیدروکسی آپاتیت»، «مغز استخوان»، «کنترل» و «مغز استخوان + نانو هیدروکسی آپاتیت» و در روزهای ۱۴، ۲۸، ۴۲ و ۵۶ بعد از عمل انجام شد. درجه‌بندی از نظر شکل‌گیری استخوان، میزان جوش خوردگی فوقانی و تحتانی و شکل‌پذیری دوباره استخوان (بازسازی) صورت گرفت (شکل ۱، جدول ۳). در هفته دوم، اختلاف معناداری بین گروه «کنترل» و گروه «نانوهیدروکسی آپاتیت» و گروه «مغز استخوان» و گروه «نانوهیدروکسی آپاتیت + مغز استخوان» ($p=0/01$) مشاهده شد. در هفته چهارم، اختلاف معناداری بین گروه‌های «نانوهیدروکسی آپاتیت» ($p=0/02$) و «نانوهیدروکسی آپاتیت + مغز استخوان» ($p=0/02$) مشاهده شد که گروه «کنترل» ضعیف‌تر از گروه «نانوهیدروکسی آپاتیت» و گروه «نانوهیدروکسی آپاتیت + مغز استخوان» بود. در این هفته، بقیه گروه‌ها اختلاف معناداری نداشتند ($p=0/05$). در هفته ششم، اختلاف معناداری بین گروه «کنترل» و گروه «مغز استخوان» ($p=0/04$) و گروه «نانوهیدروکسی آپاتیت + مغز استخوان» ($p=0/02$) مشاهده شد که گروه

«کنترل» ضعیف‌تر از دو گروه مذکور بود.

اختلاف معناداری بین گروه «نانوهیدروکسی آپاتیت» با گروه «نانوهیدروکسی آپاتیت + مغز استخوان» ($p=0/02$) مشاهده شد که گروه «نانوهیدروکسی آپاتیت + مغز استخوان» بهتر از گروه «نانوهیدروکسی آپاتیت» به تنهایی بود. دیگر هیچ یک از گروه‌ها باهم اختلاف نداشتند.

جدول ۳- بررسی مقایسه‌ای ارزیابی رادیوگرافی بین گروه‌ها در هفته‌های مختلف

بر اساس تقسیم‌بندی لین و سندهو (Sandhu و Lane) شامل «کمترین»، «بیشترین» و «میان»

گروه هفته	گروه کنترل	گروه نانو هیدروکسی آپاتیت	گروه مغز استخوان	گروه نانو هیدروکسی آپاتیت + مغز استخوان	P^a
هفته دوم	$0(0-0)^b$	$5(4-6)$	$2(2-6)$	$5(5-7)$	$0/005$
هفته چهارم	$5(4-5)^c$	$6(6-8)$	$7(4-9)$	$9(6-9)$	$0/05$
هفته ششم	$7(7-8)^d$	$7(7-9)^e$	$9(8-9)$	$10(9-10)$	$0/01$
هفته هشتم	$9(8-9)^f$	$8(8-9)^g$	$10(10-10)$	$10(10-10)$	$0/005$

a آنالیز آماری Kruskal-Wallis non parametric ANOVA انجام شد و زمانی که بعد از آن اختلاف معناداری بین گروه‌ها در نظر گرفته شد (ارزش p کمتر از $0/05$ بود) تست تکمیلی Mann Withney U test انجام گرفت.

b اختلاف معناداری بین گروه کنترل و گروه نانو هیدروکسی آپاتیت و گروه مغز استخوان و گروه نانو هیدروکسی آپاتیت + مغز استخوان در هفته دوم مشاهده شد ($p=0/01$).

c در هفته چهارم اختلاف معناداری بین گروه‌های نانو هیدروکسی آپاتیت ($p=0/02$) و نانو هیدروکسی آپاتیت + مغز استخوان ($p=0/01$) مشاهده شد که گروه کنترل ضعیف‌تر از گروه نانو هیدروکسی آپاتیت و گروه نانو هیدروکسی آپاتیت + مغز استخوان بود و در این هفته بقیه گروه‌ها اختلاف معناداری نداشتند ($p>0/05$).

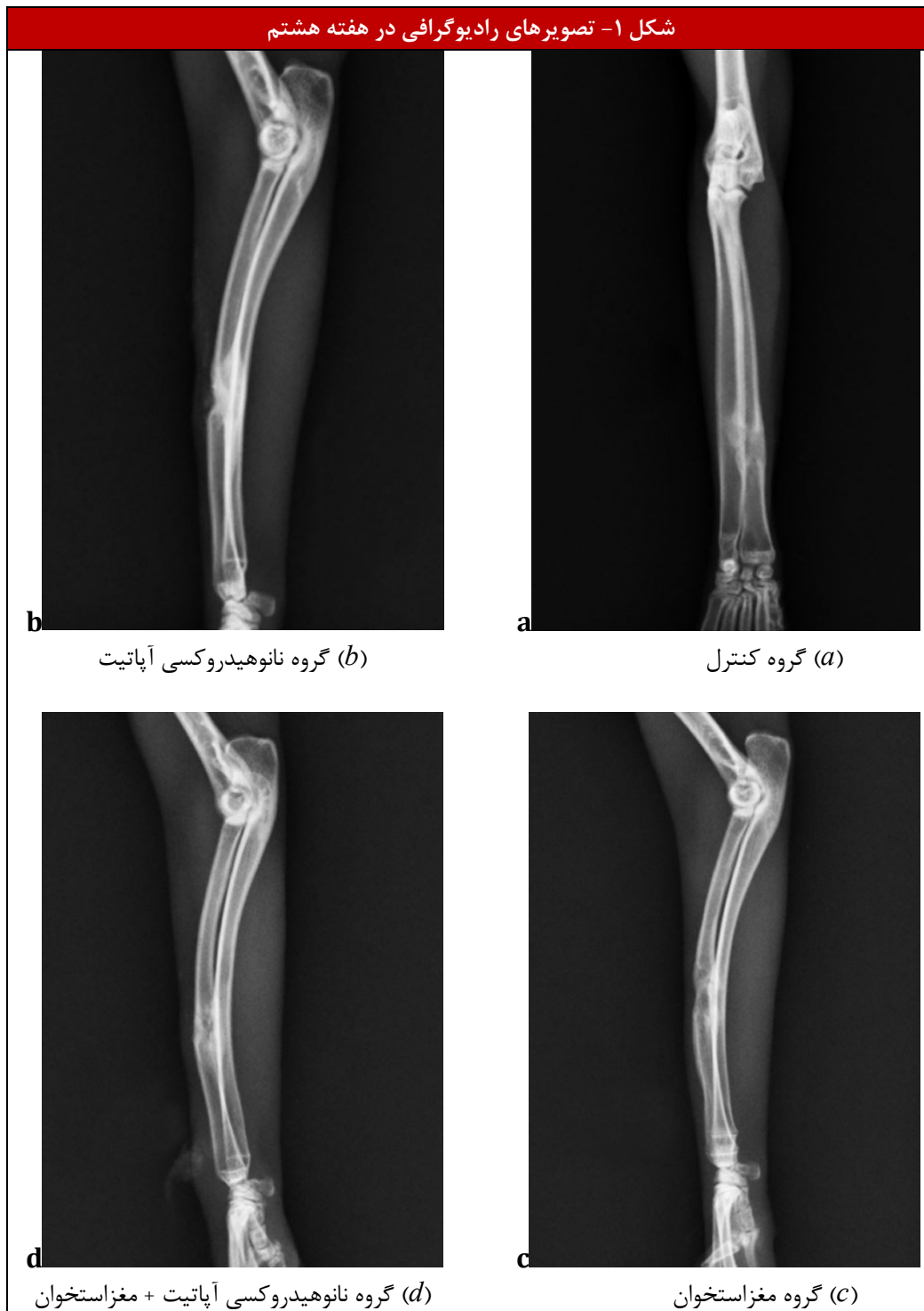
d اختلاف معناداری بین گروه کنترل و گروه مغز استخوان ($p=0/04$) و گروه نانو هیدروکسی آپاتیت + مغز استخوان ($p=0/02$) در هفته ششم مشاهده شد که گروه کنترل ضعیف‌تر از دو گروه مذکور بود.

e اختلاف معناداری بین گروه نانو هیدروکسی آپاتیت با گروه نانو هیدروکسی آپاتیت + مغز استخوان ($p=0/02$) مشاهده شد که گروه نانو هیدروکسی آپاتیت - مغز استخوان بهتر از گروه نانو هیدروکسی آپاتیت به تنهایی بود. دیگر هیچیک از گروه‌ها باهم اختلاف نداشتند.

f اختلاف معناداری بین گروه‌های کنترل و مغز استخوان و نانو هیدروکسی آپاتیت + مغز استخوان ($p=0/01$) در هفته هشتم مشاهده شد.

g اختلاف معناداری بین گروه نانو هیدروکسی آپاتیت به تنهایی با گروه مغز استخوان و گروه نانو هیدروکسی آپاتیت + مغز استخوان ($p=0/01$) در هفته هشتم مشاهده شد.

شکل ۱- تصویرهای رادیوگرافی در هفته هشتم



(b) گروه نانوهیدروکسی آپاتیت

(a) گروه کنترل

(d) گروه نانوهیدروکسی آپاتیت + مغز استخوان

(c) گروه مغز استخوان

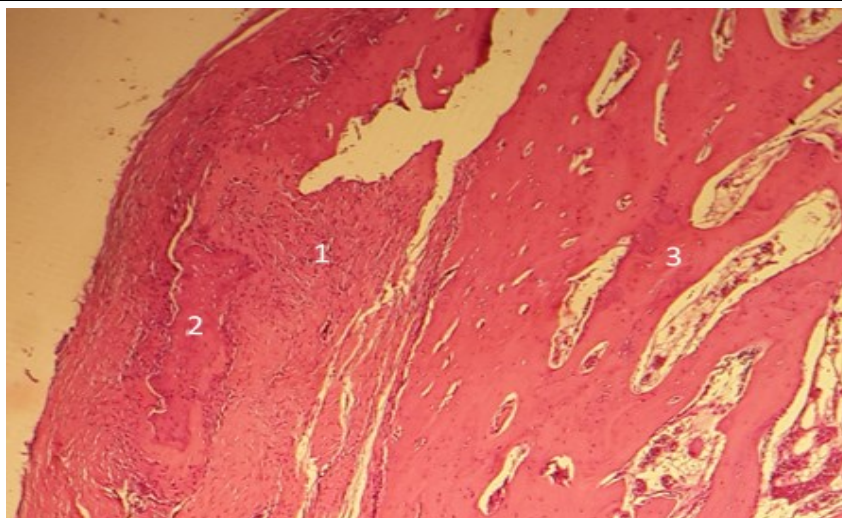
نتایج به دست آمده از هیستوپاتولوژی نمونه‌ها:

۵۶ روز بعد از عمل، استخوان رادیوس خارج شد و نمونه‌های جدا شده، برای ارزیابی هیستوپاتولوژی به آزمایشگاه ارسال شدند.

در گروهی که برای آنها از نانوذرات هیدروکسی آپاتیت در نقیصه استخوانی استفاده شد بیشترین واکنش استخوان‌سازی از طریق

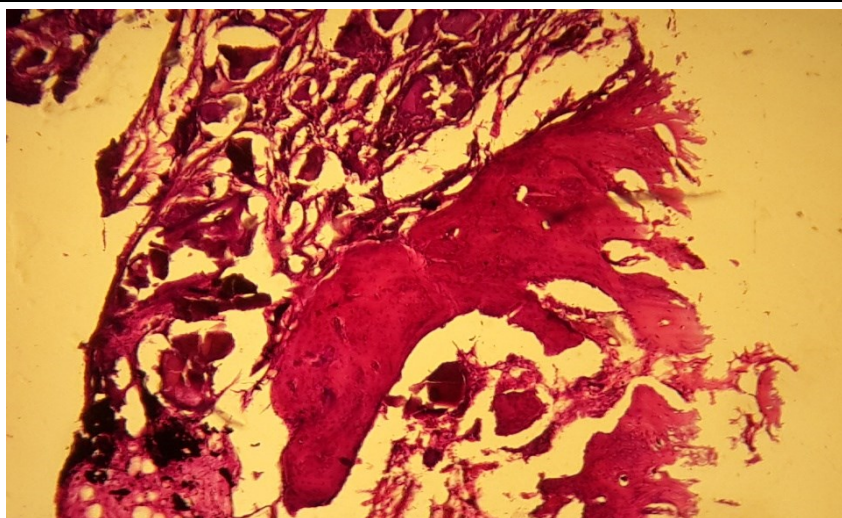
در هفته هشتم، اختلاف معناداری بین گروه‌های «کنترل» و «مغز استخوان» و «نانوهیدروکسی آپاتیت + مغز استخوان» ($p=0/01$) مشاهده شد. اختلاف معناداری بین گروه «نانوهیدروکسی آپاتیت» با گروه «مغز استخوان» و گروه «نانوهیدروکسی آپاتیت + مغز استخوان» ($p=0/01$) مشاهده شد.

شکل ۲- ارزیابی هیستوپاتولوژیک گروه «مغز استخوان»



در گروه مغز استخوان، بافت همبند فیبروزه کالوس (1) همراه با کانون‌های معدنی شده (2) و تراکول‌های استخوان اولیه (3) مشاهده می‌شود (رنگ آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین $\times 100$).

شکل ۳- ارزیابی هیستوپاتولوژیک گروه «نانوهیدروکسی آپاتیت + مغز استخوان»



در گروه مغز استخوان + نانوهیدروکسی آپاتیت، بافت استخوانی اولیه، همراه با کانون‌های معدنی شده، ماده استوئید و رسوب هیدروکسی آپاتیت همراه با بافت همبند فیبروزه دیده می‌شود (رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین $\times 100$).

ولی در مقایسه با گروه کنترل، میزان بافت همبند فیبروزه کالوس آن کمتر بود (شکل ۲).

در گروه «نانوذرات هیدروکسی آپاتیت + مغز استخوان» در مقایسه با گروه «کنترل»، روند معدنی شدن از شدت بیشتری برخوردار بوده است. در گروه «نانوذرات هیدروکسی آپاتیت + مغز استخوان»، علاوه بر استخوان‌سازی از طریق بافت همبند، کانون‌های معدنی شدن و رسوبات هیدروکسی آپاتیت به فراوانی مشاهده شد (شکل ۳).

تشکیل بافت همبند (فیبروپلازی) و رسوب نانوذرات هیدروکسی آپاتیت بر روی بستر فیبروزه بوده است؛ در حالی که در این گروه، برخلاف گروه کنترل، بافت غضروفی مشاهده نشد. بعلاوه، در گروه کنترل، سلول‌های التهابی به طور پراکنده در بافت همبند فیبروزه نیز وجود داشتند. در مقایسه با گروه کنترل، معدنی شدن در گروه نانوذرات هیدروکسی آپاتیت با شدت بیشتری مشاهده شد. گروه مغز استخوان برای تشکیل استخوان همانند گروه کنترل، از روند تشکیل غضروف استفاده کرده بود

بحث

در مقایسه گروه «نانوذرات هیدروکسی آپاتیت + مغز استخوان» و گروه «مغز استخوان»، در گروه اخیر تشکیل بافت غضروفی در روند تشکیل استخوان از اهمیت بیشتری برخوردار بوده است در حالی که در گروه قبلی روند تشکیل استخوان به طور عمده از طریق بافت همبند و بدون تشکیل بافت غضروفی بوده است.

به طور کلی استفاده از نانوذرات هیدروکسی آپاتیت + مغز استخوان به صورت توأم، می‌تواند علاوه بر به کارگیری روش استخوان‌سازی از طریق تبدیل بافت همبند به استخوان و تحریک نانوذرات هیدروکسی آپاتیت، در پیشرفت فرایند معدنی شدن نسبت به گروه کنترل و گروه نانوذرات هیدروکسی آپاتیت بر شدت و سرعت استخوان‌سازی اضافه کند. اگرچه روند استخوان‌سازی در گروه نانوذرات هیدروکسی آپاتیت + مغز استخوان تا حدود زیادی مشابه گروه نانوذرات هیدروکسی آپاتیت است ولی فرآیند پیشرفت استخوانی شدن در گروه نانوذرات هیدروکسی آپاتیت + مغز استخوان نسبت به گروه کنترل و گروه نانوذرات هیدروکسی آپاتیت به مراتب بیشتر بوده است. بعلاوه، اگرچه در گروه مغز استخوان روند تشکیل بافت غضروفی مشاهده شد، ولی بر خلاف انتظار، در گروه نانوذرات هیدروکسی آپاتیت + مغز استخوان بافت غضروفی مشاهده نشد. مطالعه روند التیام استخوان بهتر است که به جای موش صحرایی، در مدل خرگوش انجام پذیرد، زیرا سیستم هاورس استخوان‌های بلند خرگوش شبیه به انسان است و همچنین، به علت اتصالی استخوان زند زیرین با زیرین بعد از برداشت قطعه‌ای از استخوان زند زیرین نیاز به تثبیت با پیچ و پلاک نیست و تداخلی در روند ترمیم ناحیه نقیصه به وجود نمی‌آید. به همین دلیل، خرگوش مدل خوبی برای انجام مطالعات جهت روند التیام شکستگی‌ها محسوب می‌شود و در مطالعه حاضر از خرگوش به عنوان حیوان مدل استفاده شد.^(۲۰)

ارزیابی هیستوپاتولوژیک بر روی استخوان رادیوس خرگوش نشان داد که پیوند نانوذرات هیدروکسی آپاتیت + مغز استخوان نتایج بهتری در ترمیم نقص استخوانی ایجاد شده نسبت به سایر گروه‌ها ایجاد می‌کند، به طوری که اولین نشانه‌های شروع استخوان‌سازی طی هفته‌های اول به صورت کال در اطراف ضایعه شکل گرفته بود. علاوه بر این، رشته‌های کلاژن متراکم در نمونه‌های بافتی به وضوح قابل مشاهده بود. در همین راستا، در سال ۲۰۰۵، مطالعه‌ای توسط کاراگورجیو و همکاران صورت گرفت که نشان داد هیدروکسی آپاتیت + ژلاتین می‌تواند به

عنوان داربستی مناسب جهت القای استخوان‌سازی شناخته شود.^(۲۱) در سال ۲۰۱۸، کاربرد داربست هیدروکسی آپاتیت + سیلک فیبروئین به همراه سلول‌های استرومال مغز استخوان، به ترمیم کامل ضایعه استخوانی در استخوان ساعد خرگوش انجامید.^(۲۲) در مطالعه‌ای دیگر که توسط قلی‌پور و همکاران در سال ۲۰۱۴ صورت گرفت، نشان داد که اسکفولدهای هیدروکسی آپاتیت + سیلک فیبروئین در مقایسه با گروه شاهد، ماهیت زیستی سلول‌های بنیادی مزانشیمال مغز استخوان را تغییر نداده است. علاوه بر این، میکروگراف‌های تهیه شده توسط میکروسکوپ الکترونی اسکینینگ نشان داد که سلول‌ها به سوی حفرات مهاجرت کرده و کاملاً به داربست‌ها اتصال یافته‌اند و امکان تمایز آنها به استئوبلاست‌ها وجود دارد که این حاکی از اتصال سلولی مناسب، سازگاری زیستی بالا و عدم سمیت سلولی در اسکفولدهای هیدروکسی آپاتیت + سیلک فیبروئین است.^(۲۳)

در تحقیق حاضر، عملکرد گروه مغز استخوان در مقایسه با نانوهیدروکسی آپاتیت + مغز استخوان تقریباً پایایی بوده و نقش مثبتی در ترمیم نقیصه استخوانی داشته است. در تحقیقات بسیاری که قبلاً صورت گرفته نقش کاشت مغز استخوان در ترمیم شکستگی‌ها به صورت بالینی و تجربی به اثبات رسیده است که ناشی از ویژگی‌های کلون‌زایی و قدرت تکثیر بالا و نیز چسبندگی سلول‌های موجود مغز استخوان است.^(۲۴-۲۶) در این پژوهش، نتایج مطلوب از گروه مغز استخوان در ترمیم استخوان با یافته‌های سایر محققین یکسان است.^(۲۷)

گروه نانوهیدروکسی آپاتیت نسبت به گروه کنترل، اختلاف معناداری داشت و بهتر از گروه کنترل عمل کرده بود. رحیم زاده و همکاران در تحقیقی استفاده از روکش نانوهیدروکسی آپاتیت روی پیوند استخوانی بخشی از دنده در ترمیم استخوان را آزموده و نتایج مطلوبی گرفته بودند که تأیید کننده نتایج مطالعه ما در استفاده از نانوهیدروکسی آپاتیت است.^(۱۷) همچنین مطالعه‌ای در سال ۲۰۰۸، تأکید کننده نقش مهم هیدروکسی آپاتیت در تسریع ترمیم استخوان از طریق هدایت استخوان‌سازی و همچنین افزایش تحریک تشکیل عروق جدید در محل نقیصه بود. محققان در نقیصه پر شده با نانوهیدروکسی آپاتیت، توانستند مراحل آنژیوژنیک جوانه‌ای و غیرجوانه‌ای را نشان دهند.^(۲۸)

به‌طور کلی، بر اساس نتایج رادیولوژی و هیستوپاتولوژی، استخوان‌سازی در گروه کنترل به مراتب ضعیف‌تر از سایر گروه‌ها بوده و محل نقیصه بیشتر با بافت فیبروزه و به ندرت غضروف،

بیشتر انجام گیرد تا در استفاده بالینی در حیوان و انسان با اطمینان بیشتری به کار برده شود.

نتیجه‌گیری

در این تحقیق نتایج آنالیزهای رادیولوژی نشان داد میانگین رتبه‌های شاخص جوش خوردگی استخوان در گروه نانوهیدروکسی آپاتیت + مغزاستخوان از همه بیشتر بود که نشان‌دهنده قدرت تسریع ترمیم استخوانی بهتر این گروه نسبت به سایر گروه‌ها است.

به‌جای بافت استخوانی، پر شده است. این نوع ترمیم نامطلوب استخوان در محل نقیصه و به دلیل عدم حضور فاکتورهای القاکننده ترمیم در گروه کنترل انتظار می‌رفت. در صورت نبود غضروف، محل نقیصه با فیبروز گرانوله ساخته شده توسط فیبروبلاست‌ها جایگزین می‌شود. این عدم پیوستگی در غضروف تشکیل شده در ناحیه، و به وجود آمدن مراکز فیبروکارتیلاژی در بین قطعات شکسته، مانع از التیام کامل^(۲۹) و باعث به وجود آمدن ساختاری سست می‌شود.

در مطالعه حاضر محدودیت‌هایی از قبیل استفاده از تراکم‌سنجی محل ترمیم، یا سی‌تی‌اسکن میکرو، در ناحیه ترمیم وجود داشت که به علت عدم دسترسی انجام نشد، با این حال توصیه می‌شود تحقیق حاضر در مدل حیوانی بزرگتر و با ارزیابی‌های تکمیلی

منابع

1. Bigham-Sadegh A, Oryan A. Selection of animal models for pre-clinical strategies in evaluating the fracture healing, bone graft substitutes and bone tissue regeneration and engineering. *Connective tissue research*. 2015;56(3):175-94.
2. Wang J-L, Zin Y-T, Tzeng C-C, Lin C-I, Lin S-W, Chang G-L. The assay of bone reaction after implantation of calcium sulfate and a composite of calcium sulfate and calcium phosphate. *Journal of Medical and biological Engineering*. 2003;23(4):205-12.
3. Yuan J, Zhang WJ, Liu G, Wei M, Qi ZL, Liu W, et al. Repair of canine mandibular bone defects with bone marrow stromal cells and coral. *Tissue Engineering Part A*. 2010;16(4):1385-94.
4. Dorea H, McLaughlin R, Cantwell H, Read R, Armbrust L, Pool R, et al. Evaluation of healing in feline femoral defects filled with cancellous autograft, cancellous allograft or Bioglass. *Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology*. 2005;18(03):157-68.
5. Weitao Y, Kangmei K, Xinjia W, Weili Q. Bone regeneration using an injectable calcium phosphate/autologous iliac crest bone composites for segmental ulnar defects in rabbits. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2008;19(6):2485-92.
6. Brighton CT, Hunt RM. Early histologic and ultrastructural changes in microvessels of periosteal callus. *Journal of orthopaedic trauma*. 1997;11(4):244-53.
7. do Nascimento C, Issa JPM, de Oliveira RR, Iyomasa MM, Siessere S, Regalo SCH, et al. Biomaterials applied to the bone healing process. *Int J Morphol*. 2007;25(4):839-46.
8. Parizi AM, Oryan A, Shafiei-Sarvestani Z, Bigham-Sadegh A. Effectiveness of synthetic hydroxyapatite versus Persian Gulf coral in an animal model of long bone defect reconstruction. *Journal of Orthopaedics and Traumatology*. 2013;14(4):259-68.
9. Zimmermann KA, LeBlanc JM, Sheets KT, Fox RW, Gatenholm P. Biomimetic design of a bacterial cellulose/hydroxyapatite nanocomposite for bone healing applications. *Materials Science and Engineering: C*. 2011;31(1):43-9.
10. Galli D, Vitale M, Vaccarezza M. Bone marrow-derived mesenchymal cell differentiation toward myogenic lineages: facts and perspectives. *BioMed research international*. 2014;2014.
11. Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science*. 1997;276(5309):71-4.
12. Petite H, Viateau V, Bensaid W, Meunier A, de Pollak C, Bourguignon M, et al. Tissue-engineered bone regeneration. *Nature biotechnology*. 2000; 18(9): 959-63.
13. Wei F, Zhou Y, Wang J, Liu C, Xiao Y. The immunomodulatory role of BMP-2 on macrophages to accelerate osteogenesis. *Tissue Engineering Part A*. 2018;24(7-8):584-94.
14. 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. *Connective tissue research*. 2012;53(4):334-42.
15. Pittenger M, Mosca J, McIntosh K. Human mesenchymal stem cells: progenitor cells for cartilage, bone, fat and stroma. *Lymphoid organogenesis: Springer*; 2000. p. 3-11.

16. Jaiswal N, Haynesworth SE, Caplan AI, Bruder SP. Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. *Journal of cellular biochemistry*. 1997;64(2):295-312.
17. Rahimzadeh R, Zomorodi PN, Tajavanchi MF. Nano-Hydroxyapatite-Coated Cancellous Bone Graft in Bone-Defect Repair. *Iranian Journal of Orthopedic Surgery*. 2017;12:132-9.
18. Lane JM, Sandhu H. Current approaches to experimental bone grafting. *The Orthopedic clinics of North America*. 1987;18(2):213-25.
19. Emery SE, Brazinski MS, Koka A, Bensusan JS, Stevenson S. The biological and biomechanical effects of irradiation on anterior spinal bone grafts in a canine model. *The Journal of bone and joint surgery American volume*. 1994;76(4):540-8.
20. Matos MA, Araújo FP, Paixão FB. Histomorphometric evaluation of bone healing in rabbit fibular osteotomy model without fixation. *Journal of orthopaedic surgery and research*. 2008;3(1):1.
21. Karageorgiou V, Kaplan D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials*. 2005;26(27):5474-91.
22. Farokhi M, Mottaghitalab F, Samani S, Shokrgozar MA, Kundu SC, Reis RL, et al. Silk fibroin/hydroxyapatite composites for bone tissue engineering. *Biotechnology advances*. 2018;36(1):68-91.
23. Gholipourmalekabadi M, Mozafari M, Gholipourmalekabadi M, Nazm Bojnordi M, Hashemi-soteh MB, Salimi M, et al. In vitro and in vivo evaluations of three-dimensional hydroxyapatite/silk fibroin nanocomposite scaffolds. *Biotechnology and applied biochemistry*. 2015;62(4):441-50.
24. Lee DH, Ryu KJ, Kim JW, Kang KC, Choi YR. Bone marrow aspirate concentrate and platelet-rich plasma enhanced bone healing in distraction osteogenesis of the tibia. *Clinical Orthopaedics and Related Research*®. 2014;472(12):3789-97.
25. Gianakos A, Ni A, Zambrana L, Kennedy JG, Lane JM. Bone marrow aspirate concentrate in animal long bone healing: an analysis of basic science evidence. *Journal of Orthopaedic Trauma*. 2016;30(1):1-9.
26. Nagata MJ, Santinoni CS, Pola NM, De Campos N, Messora MR, Bomfim SR, et al. Bone marrow aspirate combined with low-level laser therapy: a new therapeutic approach to enhance bone healing. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2013;121:6-14.
27. Bigham A, Shadkhast M, Dehghani S. Autogenous bone marrow concurrent with static magnetic field effects on bone-defect healing: radiological and histological study. *Comparative Clinical Pathology*. 2009;18(2):163.
28. Kilian O, Wenisch S, Karnati S, Baumgart-Vogt E, Hild A, Fuhrmann R, et al. Observations on the microvasculature of bone defects filled with biodegradable nanoparticulate hydroxyapatite. *Biomaterials*. 2008;29(24-25):3429-37.
29. Oryan A, Bigham-Sadegh A, Abbasi-Teshnizi F. Effects of osteogenic medium on healing of the experimental critical bone defect in a rabbit model. *Bone*. 2014;63:53-60.