

## سلول‌های تک‌هسته‌ای به دست آمده از مغز استخوان خودی ممکن است بر درمان جوش‌ناخوردگی استخوان‌های بلند تأثیر مثبت داشته باشند

### چکیده

**مقدمه:** «جوش‌ناخوردگی» (nonunion)، یک عارضه جدی به دنبال شکستگی استخوان‌های بلند است که چالش بزرگی برای جراحان ارتوپد به همراه دارد. این نوع شکستگی‌ها عوارض زیادی به دنبال دارند. فاکتورهای تحریک‌کننده استخوان‌سازی، همراه با بهبود شرایط مکانیکال محیطی می‌توانند سرعت جوش خوردن را افزایش دهند. در این مطالعه، هدف ما درمان جوش‌ناخوردگی به کمک سلول‌های تک‌هسته‌ای به دست آمده از مغز استخوان، BMDMC (bone marrow-derived mononuclear cell) و تغلیظ و کاربرد آن به عنوان منشأ سلول‌های استئوپروژنی‌تور همراه با فیکساسیون داخلی بود.

**مواد و روش‌ها:** از نوامبر ۲۰۱۰ تا می ۲۰۱۳، ۱۹ بیمار با جوش‌ناخوردگی استخوان، تحت درمان با سلول تک‌هسته‌ای مشتق از مغز استخوان (BMDMC) قرار گرفتند که شامل ۱۵ مرد و ۴ زن با متوسط سنی ۳۷/۸ سال (۱۸ تا ۸۱ سال) بود. فاصله زمانی بین تروما تا درمان بین ۷ تا ۲۸ ماه (میانگین ۱۳/۴ ماه) بود. ابتدا قشرزدایی اطراف محل جوش‌ناخورده انجام شد تا بستر مناسب برای سلول‌های تک‌هسته‌ای ایجاد شود. سپس ۲ میلی‌لیتر مغز استخوان تغلیظ شده در محل قرار داده شد که به صورت مخلوط با چسب آلوگرافت کورتیکونسلوس دمنیرالیزه بود. سرعت ترمیم به صورت بالینی و رادیولوژیک هر ۴ هفته پیگیری شد.

**یافته‌ها:** جوش خوردن استخوان در ۱۸ بیمار از ۱۹ بیمار، در طول ۱/۰۶ تا ۶ ماه با متوسط زمانی ۳/۵ ماه، به دست آمد. در طول مدت بهبودی عارضه‌ای نداشتیم و هیچ موردی از عفونت، هماتوم یا درد مزمن در بیماران ایجاد نشد.

**نتیجه‌گیری:** پیوند مغز استخوان خودی با BMDMC یک درمان منطقی، مؤثر و آسان برای درمان جوش‌ناخوردگی استخوان‌های بلند مثل تیبیا و فمور بعد از فیکساسیون داخلی به شمار می‌رود.

**واژگان کلیدی:** جوش نخوردن استخوان، ترمیم شکستگی، سلول‌های مغز استخوان، پیوند مغز استخوان، کال استخوانی دریافت مقاله: ۴ ماه قبل از چاپ؛ مراحل اصلاح و بازنگری: ۲ بار؛ پذیرش مقاله: ۱ ماه قبل از چاپ

\*دکتر امین رازی، \*\*دکتر محمد تقی پیوندی، \*دکتر علی بیرجندی نژاد، \*\*\*دکتر سارا عامل فرزاد

### مقدمه

ترمیم شکستگی یک روند پیچیده فیزیولوژیک شامل فرایندهای متوالی هماهنگ در سلول‌های مختلف پروتئین‌ها و بروز ژن‌ها است که در جهت بازسازی ساختار استخوان، بدون ایجاد عارضه و نقص عمل می‌کند<sup>(۱)</sup>.

بازسازی و ترمیم کامل استخوان نیازمند ترکیبی از عملکرد بیولوژیک و بیومکانیک است<sup>(۲)</sup>. علی‌رغم پیشرفت تکنیک‌های جراحی، تقریباً ۵ تا ۱۰ درصد شکستگی‌ها ترمیم نشده باقی می‌مانند که اصطلاحاً «نان‌یونین» یا «جوش‌ناخورده» نامیده می‌شوند<sup>(۳)</sup>. جوش‌ناخوردگی مشکلی در استئوسنتز است که از فاکتورهای متعدد سیستمیک و موضعی ناشی می‌شود، مانند شدت آسیب نسج نرم، عوامل مربوط به خود بیمار مثل بیماری‌های زمینه‌ای، سیگار کشیدن، چاقی، اعتیاد به الکل، دیابت، آسیب‌های عروق محیطی، فاکتورهای یاتروژنیک و نقص‌های استخوانی ساده یا سگمنتال<sup>(۴و۳)</sup>.

رویکرد درمانی مطلوب برای مقابله با جوش‌ناخوردگی شامل ترکیبی از مداخلات مناسب جراحی همراه با اقدامات حمایتی مانند کنترل عفونت، بهبود وضعیت تغذیه و قطع سیگار است. هر دو عامل «ناپایداری شکستگی» و «اختلال در پاسخ بیولوژیک» می‌توانند در ایجاد جوش‌ناخوردگی مؤثر باشند. پایداری ناکافی شایعترین عاملی است که به دنبال فیکساسیون چه داخلی و چه خارجی می‌تواند رخ دهد. کمبودهای بیولوژیک در حال حاضر از طریق گرافت استخوان خودی رفع می‌شود. در این روش فاکتورهای رشد و مکانیسم سلولی برای استخوان‌سازی (Osteoinduction) را فراهم می‌کند<sup>(۴و۲)</sup>.

\* استادیار ارتوپدی دانشگاه علوم پزشکی مشهد.  
\*\* دانشیار ارتوپدی دانشگاه علوم پزشکی مشهد.  
\*\*\* فارماکولوژیست پژوهشگرده بوعلی دانشگاه علوم پزشکی مشهد

نویسنده مسئول:

دکتر محمد تقی پیوندی، دپارتمان ارتوپدی، بیمارستان امدادی شهید کامیاب، دانشگاه علوم پزشکی مشهد

Email: peivandimt@mums.ac.ir

hernigou و همکاران تأثیر سلول‌های پروژنیاتور تغلیظ شده در محل جوش‌ناخورده را بررسی کردند. آنها از روش واحد تشکیل کلونی فیبروپلاست‌ها برای تخمین تعداد سلول‌های پروژنیاتور استفاده کردند. مغز استخوان آسپیره شده از بال ایلپاک به طور متوسط حاوی  $612 \pm 134$  سلول پروژنیاتور در هر سانتی‌متر مکعب بود و بعد از تغلیظ توسط جداساز سلولی به طور متوسط  $2579 \pm 1121$  سلول پروژنیاتور در هر سانتی‌متر مکعب وجود داشت. به طور میانگین تعداد  $51 \times 10^3$  واحد سازنده فیبروبلاست در حجم متوسط ۲۰ سانتی‌متر مکعب در محل آتروفیک و غیرعفونی جوش‌ناخورده تیبیا تزریق شد. در ۵۳ بیمار (۹۸/۱٪) که به طور متوسط  $54/962 \pm 17/431$  سلول پروژنیاتور دریافت کرده بودند جوش خوردگی رخ داد. این نتایج نشان داد در ۷ بیماری که جوش خوردگی مشاهده نشد، مشخصاً تعداد سلول‌های پروژنیاتور تزریق شده از غلظت کمتری برخوردار بود. بنابراین موفقیت درمانی در این روش با تعداد سلول‌های پروژنیاتور موجود در گرافت در ارتباط بود.<sup>(۶)</sup>

هدف ما در این مطالعه ایجاد جوش خوردگی به کمک تغلیظ سلول‌های تک‌هسته‌ای مشتق از مغز استخوان (BMNCS) به عنوان منشأ سلول‌های استئوپروژنیاتور بود. برای ترکیب فاکتورهای بیولوژیکی و بیومکانیکی، آسپیره BMNCS در ترکیب با چیس آلوگرافت کورتیکو کنسلوس در محل قرار داده شد.

## مواد و روش‌ها

### مشخصات بیماران:

در بازه زمانی آبان ۱۳۸۹ تا اردیبهشت ۱۳۹۲، ۱۹ بیمار به مرکز ما ارجاع شدند (جدول ۱). بیماران شامل ۴ زن و ۱۵ مرد با متوسط سنی ۳۷/۸ سال (۱۸ تا ۸۱ سال) بودند که به طور متوسط ۱۳/۴ ماه (۷ تا ۲۸ ماه) از آسیب اولیه آنان گذشته بود. در تمام بیماران، جوش‌ناخورده، با ارزیابی بالینی (وجود درد و حرکت در محل شکستگی و یا عدم توانایی وزن‌گذاری) و رادیوگرافیک (فقدان کال استخوانی و خط شکستگی قابل مشاهده در نماهای AP و لترال) تأیید شد. ۱۱ بیمار در تیبیا و ۸ بیمار در فمور جوش‌ناخورده داشتند. در ۷ بیمار شکستگی اولیه ساق بر اساس طبقه‌بندی گاستیلو- اندرسون از نوع ۳ شناخته شد و در بیماران دیگر شکستگی بسته بود. ۳ بیمار، بیشتر از ۲ عمل جراحی قبلی، مانند تعویض اینترلاک یا اکسترنال فیکساتور داشتند و سایر بیماران سابقه جراحی برای

ایلپاک کرسست یا استخوانی نزدیک به محل جوش‌ناخورده‌گی متداول‌ترین محل برداشت گرافت است. متأسفانه برداشت گرافت خودی (autograft) ممکن است باعث ایجاد عوارض اضافه مثل از دست دادن خون، درد و احتمال عفونت شود که بیشتر به تکنیک برداشتن وابسته است. گرافت‌های غیرخودی (allograft) به احتمال زیاد باعث تحریک سیستم ایمنی می‌شوند و این منجر به پس زدن گرافت می‌شود. بیماری‌های قابل انتقال از طریق گرافت‌غیرخودی نیز از سایر مشکلات به شمار می‌آیند.<sup>(۵)</sup> این مشکلات و چالش‌ها باعث شده جراحان بیشتر به تکنیک‌های ساده و کم‌تهاجمی روی بیاورند.

یک روش دیگر درمان جوش‌ناخورده‌گی، سلول درمانی است.<sup>(۵)</sup> سلول‌های تک‌هسته‌ای استخراج شده از مغز استخوان در این روش استفاده می‌شوند. این سلول‌ها از طریق آسپیراسیون مغز استخوان به دست می‌آیند و از طریق پوست یا جراحی باز در محل جوش‌ناخورده تزریق می‌شوند. در این روش، میزان جوش خوردگی و حجم کال تشکیل شده مرتبط با تعداد و میزان تغلیظ سلول‌های پروژنیاتور (نیایاخته) آسپیره شده است.<sup>(۶،۳)</sup>

در حال حاضر مطالعات مختلف نشان داده که تزریق مغز استخوان خودی (autologous) از طریق پوست روش آسان، مطمئن و قابل اعتماد در فرایند جوش خوردگی است. در آن مطالعات مغز استخوان از بال ایلپاک آسپیره شده و از طریق پوست در محل شکستگی بعد از جراحی اصلی و حتی بیماران سرپایی تزریق شده است.

تزریق از راه پوست (پروکتانه) یک تا سه بار انجام و در اکثر بیماران جوش خوردگی کامل در فاصله زمانی ۳ تا ۹ ماه مشاهده شده است.<sup>(۶،۳)</sup> به نظر می‌رسد تزریق مغز استخوان خودی از راه پوست یک درمان آسان، مؤثر و اقتصادی است. گرچه میزان موفقیت این روش درمانی به برخی از عوامل مانند فیکساسیون پایدار داخلی یا خارجی، وسعت نقص استخوان و کوتاهی یا دفورمیتی زاویه‌ای موجود از قبل بستگی دارد.<sup>(۱۴،۶)</sup> در مطالعه‌ای دیگر، Healey و همکاران نتایج بالینی خوبی از گرافت مغز استخوان در موارد جوش‌ناخورده گزارش کرده‌اند. آنها سعی کردند ۸ بیمار با جوش خوردگی تأخیری و یا جوش‌ناخورده‌گی مبتلا به سارکوم اولیه را با تزریق مغز استخوان اتوزن در محل شکستگی درمان کنند. از این میان ۵ بیمار شیمی‌درمانی شدند و یک بیمار نیز تحت پرتودرمانی قرار گرفت. استخوان‌سازی در ۷ بیمار (۸۷/۵٪) مشاهده شد و در ۵ بیمار (۶۳٪) جوش خوردگی کامل به دست آمد.<sup>(۱۵)</sup>

جدول ۱: مشخصات بیماران و مشکلات همراه

	Gender	Age (yr.)	Time from initial injury to the present in our study (mo.)	Location of nonunion	Initial treatment	Treatment with bone marrow transfer	Comorbidities
1	Male	48	9	Tibia	IMN <sup>1</sup>	IMN	Tobacco use
2	Male	30	18	Femur	IMN	IMN	Tobacco use
3	Male	53	16	Tibia	External fixator	Locking plate	Tobacco use
4	Male	81	13	Tibia	Compression plate	Locking plate	HTN <sup>2</sup>
5	Male	43	24	Tibia	External fixator	DCP <sup>3</sup> plate	NO
6	Male	18	6	Femur	IMN	IMN	NO
7	Female	24	15	Femur	IMN	IMN	NO
8	Male	22	21	Tibia	Compression plate	DCP	Tobacco use
9	Male	22	6	Tibia	Compression plate	Locking plate	Diabetes mellitus
10	Female	45	28	Femur	IMN	IMN	Tobacco use and Diabetes mellitus
11	Male	35	6	Femur	IMN	IMN	Tobacco use
12	Male	29	14	Tibia	IMN	IMN	Tobacco use
13	Male	41	8	Femur	Compression plate	Compression plate	Tobacco use
15	Male	19	13	Tibia	IMN	IMN	Tobacco use
16	Male	24	6	Femur	Compression plate	DCS <sup>4</sup>	NO
17	Female	36	8	Femur	IMN	IMN	NO
18	Female	44	6	Tibia	IMN	IMN	Diabetes mellitus
19	Male	33	21	Tibia	IMN	IMN	Tobacco use

1. IMN: Intra Medullary Nailing.

2. HTN: Hypertension.

3. DCP: Dynamic Compression Plate.

4. DCS: Dynamic Compression Screw.

### آسپیراسیون مغز استخوان

در تمام ۱۹ بیمار، آسپیراسیون از خار ایلیاک خلفی فوقانی (PSIS)<sup>۱</sup> تحت بیهوشی عمومی و در وضعیت پرون (prone) انجام شد. در شرایط استریل، برش پوستی به طول ۲ میلی‌متر در سطح PSIS داده شد و سوزن جمشیدی (MEDax® model 13 G) به اندازه ۱۲ میلی‌متر در بافت اسفنجی استخوان وارد شد و به میزان ۵۰ میلی‌لیتر از هر نقطه به داخل یک سرنگ آسپیره شد. حجم کلی به دست آمده برای هر بیمار ۱۲۰ تا ۱۳۰ میلی‌متر مغز استخوان بود که از ۴ نقطه مختلف در دو طرف PSIS برداشته شد. برای جلوگیری از لخته

جوش ناخوردگی نداشتند. همه بیماران با فیکساسیون داخلی درمان شده بودند (جدول ۱: مشخصات بیماران و مشکلات همراه).

قبل از گرافت مغز استخوان، آزمایش کامل خون و شمارش سلولی (CBC) و ESR و CRP برای همه بیماران انجام شد تا موارد عفونی مشخص و حذف شوند. این مطالعه توسط کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی مشهد تأیید شد و تمام بیماران با رضایت شخصی و با توضیح شرایط عمل و عوارض احتمالی پس از امضای فرم رضایتنامه کتبی در مطالعه شرکت کردند.

1. posterior superior iliac spine

بالینی طی ۶ ماه بررسی شد. معیارهای بالینی شامل وزن‌گذاری کامل و نبود درد و تندرست در محل شکستگی بود<sup>(۱۶)</sup>.

### روش‌های آماری

تمام بررسی‌های آماری به کمک نسخه ۱۶ نرم افزار SPSS انجام شد. ارزش احتمال معنادار آماری  $p < 0.05$  تعیین شد. متغیرهای اندازه‌گیری شده شامل موفقیت درمانی و زمان سپری شده تا جوش خوردن بود. فاکتوری که می‌توانست در بهبودی مؤثر باشد تعداد سلول‌های BMNCS تزریق شده بود. عوامل متغیر در بیماران شامل سن، جنس و مشکلات همراه و محل جوش‌ناخوردگی و زمان گذشته از آسیب اولیه بود. آنالیزهای آماری توصیفی برای تمام متغیرها و آنالیزهای چند متغیره برای ارزیابی ارتباط بین متغیرها و نتایج درمان انجام شد.

### نتایج

در طول بیهوشی هیچ عارضه‌ای رخ نداد، به‌ویژه کاهش در اشباع اکسیژن خون، یا تغییر در فشارخون، یا تعداد ضربان پیش نیامد. همچنین سندروم کمپارتمان نیز بعد از جراحی در هیچ بیماری مشاهده نشد. عفونت، هماتوم یا درد مزمن نیز در محل جراحی مشاهده نشد.

### عوامل متغیر در بیماران و مغز استخوان

حجم متوسط مغز استخوان برداشت شده از ایلپاک خلفی دوطرفه در هر بیمار به میزان  $120 \pm 10$  میلی‌لیتر بود. تعداد کل سلول‌های تک‌هسته‌ای به دست آمده از بیماران در محدوده ۳۳ تا ۵۶۰ میلیون سلول، با میانگین  $203/15$  میلیون سلول بود. تعداد سلول‌های تک‌هسته‌ای ارتباط معناداری با سن بیماران نداشت. تعداد سلول تک‌هسته‌ای در مردان  $172/3 \pm 127/6$  (میلیون)، در مقایسه با زنان  $295/7 \pm 150/9$  (میلیون) کمتر بود، اما از نظر آماری معنادار نبود ( $p=0/111$ ).

در بیماران حاضر در مطالعه، مشکلات همراه مثل اعتیاد به سیگار، دیابت و مصرف دارو، با تعداد سلول استخراج شده ارتباطی نداشت.

### نتایج درمانی جوش‌ناخوردگی

در ۱۸ بیمار از ۱۹ بیمار تحت مطالعه جوش‌خوردگی حاصل شد. کال استخوانی به طور معمول در رادیوگرافی‌های بین ۱۲ روز تا ۱۰ هفته مشاهده شد که میانگین زمانی ۴/۹ هفته بعد از عمل بود. روند طی شده در بیماران به طور نمونه در بیمار شماره ۵، در شکل ۱ نشان داده شده است.

شدن خون، به ازای هر ۱۲۰ میلی‌لیتر،  $40/000$  واحد هپارین (HEPARODIC® 25000) به هر سرنگ افزوده شد.

### استخراج و تغلیظ سلول‌های تک‌هسته‌ای مغز استخوان

سلول‌های تک‌هسته‌ای مغز استخوان با روش فایکول<sup>۲</sup> به دست آمد. مغز استخوان به نسبت ۱ به ۱ با نرمال سالین ترکیب و توسط ۱۵ میلی‌لیتر محلول فایکول پوشانده شد. یک پوشش غلیظ بوفی بعد از ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ با فشار ۴۰۰ گرادیان حاصل شد. این پوشش بوفی حاوی سلول‌های پروژنیاتور و سایر سلول‌های تک‌هسته‌ای است که منشأ سیتوکین‌های پروژنیاتور و آنژیوژنیک با تأثیر بالینی هستند. سپس پوشش بوفی جمع‌آوری شد و ۳ نوبت به مدت ۱۰ دقیقه، با فشار ۴۰۰ گرادیان با نرمال سالین شستشو شد. در پایان سلول‌های تک‌هسته‌ای حاصل (BMNC)<sup>۳</sup> با ۲ میلی‌لیتر نرمال سالین مخلوط و کمیت سلولی بررسی و در محل جوش‌ناخوردگی قرار داده شد<sup>(۲۵و۲۶)</sup>. گرافت مغز استخوان به دست آمده، بعد از تغلیظ و جداسازی، حاوی ۲۳ تا ۵۶۰ میلیون سلول BMNC با متوسط  $138/1 \pm 195$  میلیون بود.

### تکنیک جراحی

پس از اسپراسیون مغز استخوان و پروسه تغلیظ و جداسازی، عمل جراحی توسط جراح ارتوپد حاذق برای تمام بیماران انجام شد. در ۵ بیمار پلاک تعویض شد، در ۳ بیمار نیل اینترامدولاری تعویض شد و در ۱۲ بیمار هیچ اقدام اضافی انجام نشد. در مرحله بعد، برای ایجاد بستر مناسب برای سلول‌ها، تازه‌سازی و قشرزدایی اطراف محل جوش‌ناخوردگی انجام شد و در نهایت سلول‌های BMDMCS در ترکیب با چیپس آلوگرافت کورتیکوکنسولوس دمینرالیزه ساخت ایران<sup>۴</sup> در محل قرار داده شد.

### مراقبت‌های پس از عمل

در طول ۲ هفته اول بعد از عمل، بیماران از نظر التهاب یا عفونت محل جراحی بررسی شدند. زمانی که کال به صورت رادیولوژیک مشاهده شد، وزن‌گذاری نسبی توصیه شد. سرعت ترمیم در هر بیمار از نظر بالینی و رادیولوژیک هر ۴ هفته بررسی شد. برای بررسی ایجاد کال و پیشرفت جوش‌خوردگی تا زمان جوش‌خوردن کامل ارزیابی رادیوگرافیک انجام شد. در خاتمه، درمان و بهبودی کامل با معیارهای رادیوگرافیک و

2. Ficoll-Paque TM Plus
3. bone marrow mononuclear cell
4. Ceno Bone co. Iran.

## بحث

حتی با وجود اقدامات مداخله‌ای متعدد که در حال حاضر انجام می‌شود، درمان جوش‌ناخوردگی همچنان چالش بزرگی در ارتوپدی به شمار می‌آید. بازسازی استخوان نیاز به مداخله بیولوژیک و بیومکانیک دارد. بنابراین تکنیک‌های درمانی متعددی به این منظور وجود دارند. از جمله این روش‌ها، مداخلات تهاجمی مثل فیکساسیون داخلی با، یا بدون گرفت استخوانی و یا غیرتهاجمی مثل اولتراسوند یا فیلد الکترومگناطیس است<sup>(۱۴۶)</sup>. پیوند مغزاستخوان اتوزن یک منبع بیولوژیکی است که فاکتورهای رشد و نیازهای سلولی برای استخوان‌سازی را فراهم می‌کند<sup>(۴۲)</sup>. این ماده معمولاً با آسپیراسیون از ایلپیک کرست برداشت می‌شود و می‌تواند از طریق پوست تزریق شود و یا از طریق جراحی در محل قرار داده شود<sup>(۶،۴۳)</sup>. مطالعات متعدد نشان داده اند که روش تزریق مغز استخوان از راه پوست می‌تواند یک درمان مطمئن، آسان و قابل اعتماد باشد<sup>(۲۹،۳۷)</sup>.

محدودیت‌هایی نیز در این روش وجود دارد، از جمله این که نباید دفورمیتی یا کوتاهی استخوان وجود داشته باشد چون در این صورت دسترسی به محل جوش‌ناخوردگی را با مشکل مواجه می‌کند. همچنین، اندازه شکاف (gap) شکستگی باید کمتر از ۵

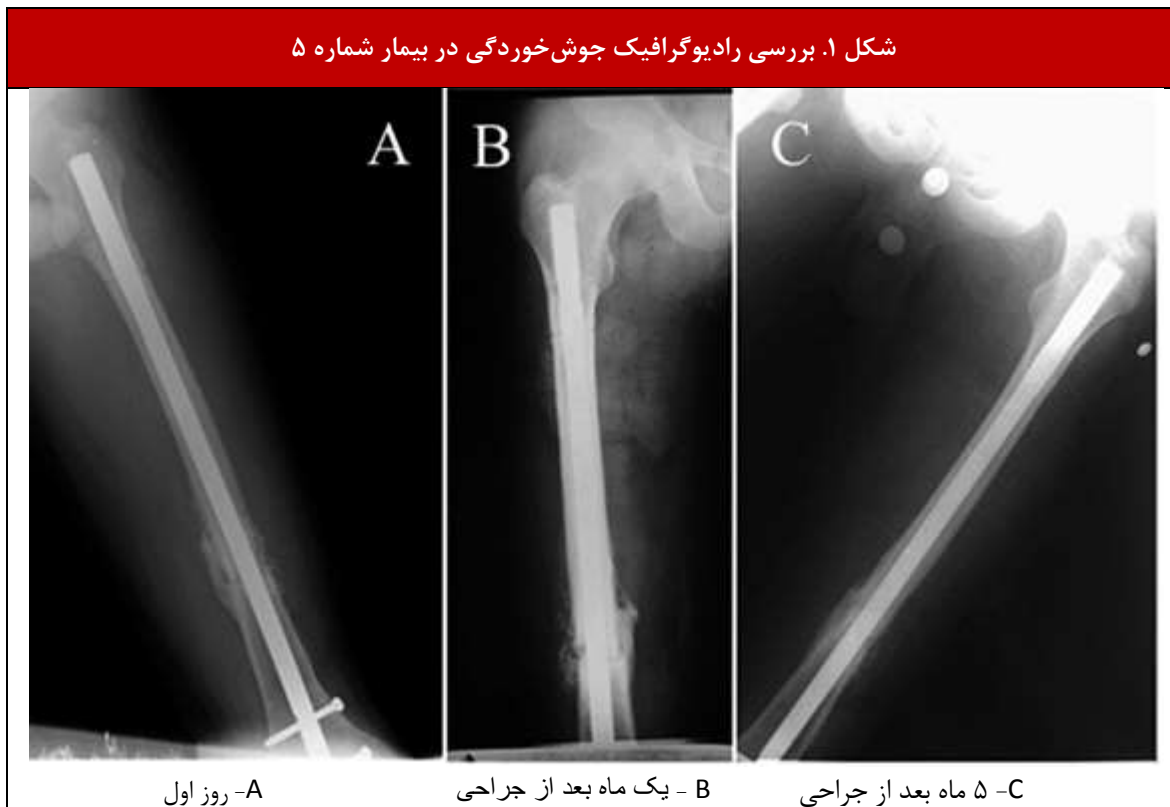
شواهد رادیوگرافیک جوش‌خوردگی کامل بعد از متوسط ۳/۵ ماه (بین ۱/۰۶ تا ۶ ماه) مشاهده شد.

بررسی‌های آماری نشان داد جنس، محل جوش‌ناخوردگی، تعداد سلول‌های تک‌هسته‌ای و مدت زمان گذشته از آسیب اولیه در زمان شروع کال استخوانی و درمان نهایی تأثیری نداشتند. بین متغیرهایی که با t-test آنالیز شدند، تنها سن بیماران، به طور مشخص در زمان ترمیم نهایی تأثیر داشت ( $p < 0.001$ )، ولی بدون تأثیر مشخص در شروع ایجاد جوش‌خوردگی بود. در نهایت، ارتباط معناداری بین مشکلات همراه و زمان ایجاد جوش‌خوردن وجود داشت ( $p = 0.004$ ).

۱۲ بیمار، با یکی، یا بیشتر از یکی از مشکلات همراه، زمان بیشتری تا درمان نشان دادند که به طور متوسط ۱۴ هفته بود، در مقایسه با دیگر بیماران، که زمان درمان به طور میانگین ۱۰/۵ هفته بود.

بین ۱۹ بیمار، یک بیمار، هیچ علامتی از شروع جوش‌خوردن و ایجاد کال نداشت. همچنین درد در محل جوش‌ناخوردگی را ذکر می‌کرد. این بیمار هیچ فاکتور خطری برای جوش‌ناخوردگی مانند دیابت یا اعتیاد به سیگار نداشت و شکستگی در ناحیه ساب‌تروکانتریک او بود که توسط نیل داخلی کانال مدولاری فیکس شده بود.

شکل ۱. بررسی رادیوگرافیک جوش‌خوردگی در بیمار شماره ۵



اما Hernigou و همکاران بر این باورند که تعداد سلول مورد نیاز، مرتبط با زنده ماندن سلول‌ها بعد از پیوند است که تحت تأثیر فاکتورهای محدود کننده متفاوتی مانند میزان اکسیژن فراهم در موضع قرار دارد.

از آنجا که سلول‌های پیوندی برای دریافت اکسیژن با سلول‌های دیگر رقابت می‌کنند، تعداد زیاد سلول‌های پیوندی می‌تواند میزان دسترسی به اکسیژن را کاهش دهد که به همین علت آنها ممکن است در زنده ماندن مشکل داشته و تأثیر درمانی مناسبی نداشته باشند.

مطالعات مختلف کاهش در تعداد سلول‌های پروژنیاتور موجود در بافت همبند و مغز استخوان را با افزایش سن، جنس و بیماری‌های موضعی و سیستمیک نشان داده اند<sup>(۲۴،۲۳،۱۷)</sup>. گرچه این پدیده در مطالعات با تعداد بیمار کم چندان واضح نیست. علاوه بر این، تأثیر مشخصی از سن بیمار، محل جوش‌ناخوردگی، تعداد سلول‌های تک‌هسته‌ای و زمانی که بین آسیب اولیه تا پیوند مغز استخوان گذشته است بر زمان ایجاد جوش‌ناخوردگی دیده نشد. از طرف دیگر، ارتباط واضحی بین سن بیمار و زمان بهبود جوش‌ناخوردگی وجود داشت<sup>(P=۰/۰۰۱)</sup>. این ناهمبندی‌ها در سایر مطالعات نیز مشاهده می‌شود که بیشتر تحت تأثیر تعداد کم بیماران در دسترس است. این محدودیت یعنی تعداد کم بیمار، باعث ایجاد طیف وسیع و متنوعی از بیماران از نظر تشخیص می‌شود (مانند جوش‌ناخوردگی یا جوش‌خوردگی تأخیری)، نوع استخوان بلند درگیر (مانند تیبیا، فمور و هومروس)، موقعیت آناتومیک ضایعه (مانند دیافیز یا متافیز) و تکنیک جراحی یا سایر درمان‌های مرتبط با BMDMCS، هر کدام، فاکتورهایی هستند که می‌توانند نتایج را تحت تأثیر قرار دهند و گزارش مقاله‌های مختلف نیز طبیعتاً متفاوت خواهد بود<sup>(۲۳،۱۴،۶)</sup>. نقطه ضعف دیگر این مطالعه نبود یک مطالعه کوهورت با درمان پلاسبو، مثل تزریق نرمال سالین بود<sup>(۶)</sup>. با وجود این محدودیت‌ها، نتایج این مطالعه حاکی از ۹۴٪ بهبودی در بازه زمانی ۱ تا ۶ ماه بعد از عمل بود که نشانه سودمند بودن این تکنیک است. محدودیت‌های مطالعه حاضر شامل این موارد بود: استفاده از چپس آلوگرافت دمنرالیزه، تغییر نوع فیکساسیون با وسیله دیگر و حذف بافت فیبرو در محل جوش‌ناخوردگی. بنابراین نمی‌توان تأثیر آسپیراسیون و تغلیظ مغز استخوان بر جوش‌ناخوردگی را تنها عامل مؤثر در درمان ذکر کرد. همچنین برای تعداد سلول مورد نیاز نیز راهنمای مشخصی وجود ندارد.

میلی‌متر باشد<sup>(۱۴،۱۱،۶)</sup>. در نهایت، حجم کال و سرعت جوش خوردن در ارتباط با تعداد سلول‌های پروژنیاتور تغلیظ شده است<sup>(۶،۴،۳)</sup>.

هدف ما در این مطالعه درمان جوش‌ناخوردگی استخوان با استفاده از آسپیراسیون مغز استخوان و تغلیظ و تزریق آن با تکنیک جراحی باز بود که محدودیت‌های روش تزریق از راه پوست را ندارد. بنابراین حجم کلی ۱۲۰ تا ۱۳۰ میلی‌لیتر از مغز استخوان ایلپاک کرس استخراج و با تکنیک فایکول تغلیظ شد<sup>(۲۶)</sup>. پوشش بوفی تغلیظ شده حاوی BMNCS، مجدداً با ۲ میلی‌لیتر نرمال سالین رقیق شد و در محل جوش‌ناخوردگی همراه با چپس آلوگرافت کورتیکونسلوس قرار داده شد. گرافت مغز استخوان تغلیظ شده به طور متوسط ۳۳ تا ۵۶۰ میلیون سلول تک‌هسته‌ای دارد. ۷ بیمار قبل از دریافت BMDMCS، سابقه تعویض ایمپلنت داشتند. نتایج نشان داد در ۱۸ بیمار از ۱۹ بیمار بین ۱ تا ۶ ماه بعد از عمل، جوش‌خوردگی به دست آمده بود. عفونت یا سایر عوارض در هیچ بیماری مشاهده نشد. نتایج، سودمند بودن این روش درمانی را اثبات کرد.

در گذشته، حذف بافت فیبرو در محل جوش‌ناخوردگی همراه با فیکساسیون داخلی به عنوان درمان اصلی جوش‌ناخوردگی آتروفیک به شمار می‌رفت<sup>(۶)</sup>. در این مطالعه، ما گرافت مغز استخوان را برای تحریک سلول‌های بیو اکتیو همراه با فیکساسیون داخلی استفاده کردیم. بر اساس شواهد موجود، اطلاعات دقیقی مبنی بر ارتباط بین تعداد سلول و ایجاد جوش‌خوردگی وجود ندارد و ما حجم و تعداد سلول را مشابه با سایر مطالعات انتخاب کردیم. تعداد سلول‌های تک‌هسته‌ای به دست آمده از هر بیمار در محدوده ۳۳ تا ۵۶۰ میلیون سلول بود. از آنجایی که تعداد سلول پروژنیاتور مرتبط با تعداد سلول‌های تک‌هسته‌ای است، هر چه این سلول‌ها بیشتر باشند به این معنی است که سلول‌های پروژنیاتور بیشتری وجود دارند<sup>(۶)</sup>. مطالعات مختلف ارتباط مستقیم بین حجم کال و سرعت جوش‌خوردگی را با تعداد سلول پروژنیاتور موجود در گرافت نشان داده‌اند<sup>(۱۹،۱۷،۶)</sup>. تغلیظ آسپیره توسط دستگاه جداساز سلولی و استفاده از ماده خلل و فرج‌دار قابل کشت در بدن، یک روش جایگزین برای تغلیظ و انتخاب پروژنیاتورهای بافت همبندی است<sup>(۲۲،۲۰،۶)</sup>. در این مطالعه تغلیظ مغز استخوان با روش فایکول انجام و در محل جوش‌ناخورده در ترکیب با چپس آلوگرافت دمنرالیزه قرار داده شد. گرچه تعداد سلول مورد نیاز برای شروع کال استخوانی هنوز مشخص نشده است،



## نتیجه‌گیری

در مجموع تزریق مغز استخوان آسپیره و تغلیظ شده از استخوان خودی، یک گزینه درمانی منطقی یا احتمالاً مؤثر، آسان و کم‌تهاجمی برای جوش‌ناخوردگی‌های تیبیا و فمور بعد از فیکساسیون داخلی است که باعث افزایش فعالیت استئوبلاست‌ها در محل شکستگی می‌شود و تسریع در ایجاد جوش خوردگی را به دنبال دارد. از طرف دیگر، آسپیراسیون مغز استخوان از بال ایلیاک باعث طولانی شدن زمان بستری یا محدودیت درمان نمی‌شود. بنابراین، به نظر می‌رسد روش درمانی مناسب برای بیمارانی باشد که جوش‌ناخوردگی طولانی‌مدت با سابقه چندین نوبت جراحی قبلی ناموفق داشته‌اند.

## ملاحظات اخلاقی

این مطالعه مطابق با مقررات بین‌المللی اخلاق پزشکی و مطالعات انسانی هلسینکی انجام شد. همچنین توسط کمیته اخلاق پزشکی دانشگاه علوم پزشکی مشهد (کد ۹۳/۵/۲۱-۹۰۰۹۳۹) تأیید شده و از همه بیماران رضایت کتبی دریافت شده است.

## تقدیر و تشکر:

حمایت مالی این مطالعه توسط معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مشهد انجام شده است (کد ثبت شده ۹۰۰۹۳۹). همچنین از آقای موحدیان در دانشگاه علوم پزشکی مشهد از جهت همکاری در آنالیز آماری و از آقای رضا افتخاری مسئول شرکت سیناروین تجهیز (نماینده رسمی کمپانی Bio safe) که راهنمایی‌های علمی در این مطالعه داشتند کمال تشکر را داریم.

## منابع

1. Giannoudis PV, Einhorn TA, Marsh D. Fracture healing: the diamond concept. *Injury*. 2007;38(4):S3-6.
2. Fayaz HC, Giannoudis PV, Vrahas MS, Smith RM, Moran C, Pape HC, et al. The role of stem cells in fracture healing and nonunion. *Int Orthop*. 2011; 35(11):1587-97.
3. Matthews SJ, Nikolaou VS, Giannoudis PV. Innovations in osteosynthesis and fracture care *Injury*. 2008; 39(8):827-38.
4. Schoelles K, Snyder D, Kaczmarek J, Kuserk E, Erinoff E, Turkelson C, et al., editors. *The Role of Bone Growth Stimulating Devices and Orthobiologics in Healing Nonunion*. Rockville, MD: Agency for Healthcare Research and Quality (US). 2005; p. 156. Available from: <https://www.cms.gov/Medicare/Coverage/DeterminationProcess/Downloads/id29TA.pdf>.
5. Kim SJ, Shin YW, Yang KH, Kim SB, Yoo MJ, Han SK, et al. A multi-center, randomized, clinical study to compare the effect and safety of autologous cultured osteoblast (Ossron) injection to treat fractures. *BMC Musculoskelet Disord*. 2009; Feb 12:10- 20.
6. Hernigou P, Poignard A, Beaujean F, Rouard H. Percutaneous autologous bone-marrow grafting for nonunion. Influence of the number and concentration of progenitor cells. *J Bone Joint Surg Am*. 2005; 87(7) 1430-37.
7. Matsuda Y, Sakayama K, Okumura H, Kawatani Y, Mashima N, Shibata T. Percutaneous autologous for bone marrow transplantation of the nonunion of the femur. *Nihon Geka Hokan*. 1998; 67(1):10-17.
8. Li Y, Shi S, Liu Z, Li Z, Wang R, Guo Y, et al. Treatment of humeral shaft nonunion with interlocking nail and percutaneous injection of bone marrow. *Zhonghua Wai Ke Za Zhi*. 2000; 38(10):732-5, 42.
9. Wang L, Li WS, Zhang QS. Autogenous bone marrow graft for the management of nonunion of tibia. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi*. 2001; 15(1):24-25.
10. Bhargava R, Sankhla S, Gupta A, Changani R, Gagal K. Percutaneous autologous bone marrow injection in the treatment of delayed or nonunion. *Indian J Orthop*. 2007; 41(1):67-71.
11. Ma JT, Yu M, Zhang MC, Zhu XJ, Xu HY, Liang GJ. Clinical observation on percutaneous autologous bone marrow grafting for treatment of fracture nonunion. *Zhongguo Gu Shang*. 2009; 22(11):862-64.
12. Tang ZH, Zhu LX, Xu TB, Wang K, Zhou XM, Li Q. Treatment of focal bone defect in postoperative nonunion with autologous red bone marrow injection. *Zhongguo Gu Shang*. 2009; 22(7):549-50.

13. Ling HM, Wu HX, Huang CY, Ma SQ. Deep fascia composite autologous red bone marrow transplantation for the treatment of fracture nonunion. *Zhongguo Gu Shang*. 2009; 22(11):859-61.
14. Braly HL, O'Connor DP, Brinker MR. Percutaneous autologous bone marrow injection in the treatment of distal metaphyseal tibial nonunion and delayed unions. *J Orthop Trauma*. 2013; 27(9):527-33.
15. Healey JH, Zimmerman PA, McDonnell JM, Lane JM. percutaneous bone marrow grafting of delayed union and nonunion in cancer patients. *Clin Orthop Relat Res*. 1990 ;( 256):280-5.
16. Luis A. Corrales, Saam Morshed, Mohit Bhandari, Theodore Miclau, III, Variability in the Assessment of Fracture-Healing in Orthopaedic Trauma Studies. *J Bone Joint Surg Am*. 2008; 90(9):1862-8.
17. Hernigou P, Beaujean F. Treatment of osteonecrosis with autologous bone marrow grafting. *Clin Orthop Relat Res*. 2002;(405):14-23.
18. Connolly J, Guse R, Lippiello L, Dehne R. Development of an osteogenic bone-marrow preparation. 1989; 71(5):684-91.
19. Gangji V, Hauzeur JP, Matos C, De Maertelaer V, Toungouz M, Lambermont M. Treatment of osteonecrosis of the femoral head with implantation of autologous bone-marrow cells. *J Bone Joint Surg Am*. 2004; 86-A (6):1153-60.
20. Muschler GF, Nitto H, Matsukura Y, Boehm C, Valdevit A, Kambic H, et al. Spine fusion using cell matrix composites enriched in bone marrow-derived cells. *Clin Orthop Relat Res*. 2003; (407):102-18.
21. Hernigou P, Poignard A, Manicom O, Mathieu G, Rouard H. The use of percutaneous autologous bone marrow transplantation in nonunion and avascular necrosis of bone. *J Bone Joint Surg Br*. 2005; 87(7):896-902.
22. Hernigou P, Mathieu G, Poignard A, Manicom O, Beaujean F, Rouard H. Percutaneous autologous bone-marrow grafting for nonunion. *Surgical Technique. J Bone Joint Surg Am*. 2006; 88 Suppl 1 Pt 2:322-7.
23. Muschler GF, Boehm C, Easley K. Aspiration to obtain osteoblast progenitor cells from human bone marrow: the influence of aspiration volume. *J Bone Joint Surg Am*. 1997; 79(11):1699-709.
24. Muschler GF, Nitto H, Boehm CA, Easley KA. Age- and gender-related changes in the cellularity of human bone marrow and the prevalence of osteoblastic progenitors. *J Orthop Res*. 2001; 19(1):117-25.
25. Michela Pierini, Barbara Dozza, Enrico Lucarelli, Pier Luigi Tazzari. Efficient isolation and enrichment of mesenchymal stem cells from bone marrow. *Cytotherapy*. 2012; 14(6):686-93.
26. Yuhan Chang, Pang-Hsin Hsieh, Chuck C-K Chao. The efficiency of Percoll and Ficoll density gradient media in the isolation of marrow derived human mesenchymal stem cells with osteogenic potential. *Chang Gung Med J*. 2009; 32(3):264-75.
27. Pingal Desai , Saad Mumtaz Hasan , Lester Zambrana. Bone Mesenchymal Stem Cells with Growth Factors Successfully Treat Nonunions and Delayed Unions. *HSS J*. 2015; 11(2):104-11.
28. Valerio Sansone , Manuel Brañes , Pietro Romeo. A novel bimodal approach for treating atrophic bone non-unions with extracorporeal shockwaves and autologous mesenchymal stem cell transplant. *Med Hypotheses*. 2018; 111:4-7.
29. Jean-Baptiste Gross , Jérôme Diligent , Danièle Bensoussan. Percutaneous autologous bone marrow injection for treatment of delayed and non-union of long bone: a retrospective study of 45 cases. *Biomed Mater Eng*. 2015; 25(1 Suppl):187-97.
30. Ramji Lal Sahu. Percutaneous autogenous bone marrow injection for delayed union or non-union of long bone fractures after internal fixation. *Rev Bras Ortop*. 2018; 53(6): 668-673.