

اثرات کاربرد همزمان لخته خون و داکسی‌سایکلین در التیام استخوان، روی مدل حیوانی خرگوش

چکیده

پیش‌زمینه: تسهیل پروسه التیام استخوان با هدف افزایش سرعت ترمیم و کاهش مشکلات دوره ریکاوری امری ضروری است. هدف از این مطالعه بررسی اثرات لخته خون و داکسی‌سایکلین بر التیام استخوان بود.

مواد و روش کار: در این مطالعه ۲۰ سر خرگوش نر نیوزلندی بالغ، به صورت تصادفی به ۴ گروه مساوی تقسیم شدند. سپس نقیصه استخوانی به طول یک سانتی‌متر در استخوان زنده‌ترین دست راست هر کدام از خرگوش‌ها ایجاد شد. در گروه کنترل، نقیصه بدون جاگذاری مواد پیوندی، خالی رها شد و در سایر گروه‌ها نقیصه‌های استخوانی با لخته خون، داکسی‌سایکلین و ترکیب این دو پر شد. سپس گراف‌های رادیولوژی در هفته‌های ۲، ۴، ۶ و ۸ از دست جراحی شده تهیه شد. مقاطع هیستوپاتولوژی نیز در پایان هفته هشتم، بعد از آسان‌کشی خرگوش‌ها تهیه شدند.

یافته‌ها: بررسی‌های رادیولوژیک اختلاف معنی‌داری را بین گروه‌های مختلف در هفته‌های متفاوت به نمایش نگذاشت ($p > 0.05$). اما بررسی‌های هیستوپاتولوژیک نشان از برتری تمامی گروه‌های درمانی بر گروه کنترل داشت ($p < 0.05$). همچنین، گروه ترکیب از دیدگاه هیستوپاتولوژی در روز ۵۶ نسبت به سایر گروه‌های درمانی عملکرد بهتری را به معرض نمایش درآورد ($p < 0.05$). هیچ‌گونه شواهدی مبنی بر پس زدن پیوند در هیچ‌یک از گروه‌ها مشاهده نشد.

نتیجه‌گیری: یافته‌های این مطالعه ثابت کرد که ترکیب لخته خون و داکسی‌سایکلین نسبت به سایر گروه‌های دارویی عملکرد بهتری را در پروسه التیام استخوان داشته است.

واژگان کلیدی: مواد زیستی، لخته خون، داکسی‌سایکلین، بازسازی استخوان، خرگوش.

دریافت مقاله: ۴ ماه قبل از چاپ؛ **پذیرش مقاله:** ۲ ماه قبل از چاپ.

دکتر امین بیغم صادق، دکتر سعید لطفی، دکتر احمد عریان، دکتر ایمان حفار

مقدمه

استخوان بافت پیوندی بافتی سخت و خاص دارد که از خود مقاومت بالایی در برابر فشار و آسیب نشان می‌دهد^(۱). این بافت در اثر ضربات^۱، اختلالات تکاملی^۲، برش و برداشت بافت‌های سرطانی^۳، عفونت^۴، شکستگی‌های دیرجوش خورنده و جوش نخورنده^۵، استیاتیس^۶، استئوکتومی^۷، کیست استخوانی^۸ و برخی از عوامل دیگر دچار نقص می‌شود^(۳،۲). برای تسریع التیام این نقص‌ها از پیوندهای استخوانی اتوگرافت، آلوگرافت، زنوگرافت، جایگزین‌های پیوند استخوان و به تازگی از نانومتربال‌ها و چارچوب‌های آغشته به انواع آنتی‌بیوتیک‌ها می‌توان بهره گرفت^(۴). پیوند استخوانی مطلوب دارای ویژگی هدایت استخوانی^۹، استخوان‌سازی^{۱۰} و القای استخوانی^{۱۱} است و پیوند اتوگرافت تجمیع ویژگی‌های فوق است. اما این پیوند نیازمند یک جراحی مضاعف در محل برداشت پیوند (معمولاً ستیج ایلئوم) است که این کار عوارضی مانند درد، افزایش احتمال عفونت، شکستگی و از دست دادن خون بیشتر را به بیمار تحمیل می‌کند. از سوی دیگر، مقادیر قابل برداشت بافت پیوندی محدود است^(۵). آلوگرافت‌ها نسبت به اتوگرافت‌ها در دسترس‌تر بوده ولی عیب بزرگ آنها افزایش احتمال سرایت بیماری‌های مسری مانند ویروس نقص ایمنی انسان، هپاتیت C، توبرکلوزیز و هاری است^(۶). از طرف دیگر، استفاده از زنوگرافت‌ها

۱. استاد، بخش جراحی و رادیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران.
۳. استاد، بخش پاتولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران.
۲، ۴. دانش‌آموخته دکتری حرفه‌ای دامپزشکی، گروه جراحی و رادیولوژی، دانشکده دامپزشکی شهرکرد، شهرکرد، استان چهارمحال و بختیاری، ایران.

1. Trauma.
2. Developmental Anomalies.
3. Oncologic Resections.
4. Infection.
5. Delayed unions and Non-unions.
6. Osteitis.
7. Osteotomies.
8. Bone cyst.
9. Osteoconduction.
10. Osteogenesis.
11. Osteoinduction.

نویسنده مسئول:

امین بیغم صادق

Email:
dr.bigham@gmail.com

نقش مؤثری در تسریع التیام استخوان دارد. از طرف دیگر، ایجاد لخته خون خودی نسبت به اخذ پیوند استخوانی اتوگرافت فرایند ساده‌تری را طی می‌کند و معایب ذکر شده را ندارد^(۱۹). نقش مثبت داکسی‌سایکلین در ترمیم استخوان آئوتولار فکی از طریق افزایش استئوبلاست‌ها و کاهش استئوکلاست‌ها و افزایش فعالیت Wnt^{۱۵} قبلاً در مطالعه‌ای به اثبات رسیده بود^(۱۵)، اما در ارتباط با نقش ترمیمی آن در شکستگی تجربی استخوان‌های بلند سندی وجود نداشت لذا مطالعه حاضر طوری طراحی شد که نقش ترمیم آن در استخوان‌های بلند به شکل تجربی ارزیابی شود.

این مطالعه با هدف بررسی اثرات لخته خون خودی و داکسی‌سایکلین به صورت مجزا و نیز در ترکیب با یکدیگر، بر التیام نقیصه استخوانی در مدل حیوانی خرگوش انجام شد.

مواد و روش کار

مطالعه پژوهشی حاضر در بخش جراحی و رادیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهرکرد در بهار و تابستان ۹۸ انجام شد. کمیته اخلاق دانشگاه آن را تایید کرد و در طول مدت پژوهش حقوق حیوانات و اصول کار با حیوانات رعایت شد. مصوبه شورای پژوهشی دانشکده به شماره ۱۷۰/۱۳۹۳ نیز برای این تحقیق دریافت شد.

نمونه حیوانی:

برای این مطالعه ۲۰ سر خرگوش نر نیوزلندی سفید بالغ به وزن ۱۶۰۰ تا ۲۲۰۰ گرم و سن ۱۲ ماه، برای تطابق با شرایط جدید (نور، نوع تغذیه و محل نگهداری) ۱۵ روز در خانه حیوانات نگه‌داری شدند. خرگوش‌ها روز اول و روز چهاردهم، یک دوز آپورمکتین زیر جلدی دریافت کردند.

داکسی‌سایکلین ۵۰٪ به صورت پودر در بسته‌های ۱۰۰ گرمی از داروخانه تهیه شد.

تهیه «لخته خون» و ترکیب «داکسی‌سایکلین و لخته خون»

ابتدا پیستون سرنگ خارج و پودر داکسی‌سایکلین به درون محفظه سرنگ ریخته شد، سپس با همان سرنگ، خون از قلب خرگوش که با کتامین، میدازولام و آسپرومازین بیهوش شده بود، گرفته شد. خون لخته شده با آنتی‌بیوتیک، برای تزریق در محل نقیصه (defect) استخوانی ذخیره شد. خون بدون آنتی‌بیوتیک نیز به همین طریق آماده و ذخیره شد. شماره هر خرگوش روی سرنگ مرتبط یادداشت شد تا در نقیصه استخوانی همان خرگوش مورد استفاده قرار گیرد.

خرگوش‌ها به صورت تصادفی به چهار گروه پنج‌تایی تقسیم شدند: گروه کنترل، گروه لخته خون، گروه داکسی‌سایکلین و گروه ترکیب لخته خون و داکسی‌سایکلین.

افزایش احتمال انتقال بیماری‌های مشترک بین انسان و دام (مانند ویروس آنفولانزای خوکی، ویروس تب خوکی و جنون گاوی) را در پی خواهد داشت. استفاده از جایگزین‌های پیوند استخوان مانند پلیمرها، سرامیک‌ها و برخی از فلزات در موارد نقصان اسکلتی وسیع، راهگشاست اما توانایی بازتولید بافت استخوان را ندارد^(۹).

داکسی‌سایکلین نوعی آنتی‌بیوتیک از نسل دوم تتراسایکلین‌ها است. علاوه بر خواص باکتریواستاتیک، مطالعات اخیر نشانگر اثرات ضدالتهابی، ضد کاتابولیسمی و آنتی‌اکسیدانی آن بوده و اثرات مثبت داکسی‌سایکلین بر تعداد استئوبلاست‌ها و اثرات منفی آن بر تعداد استئوکلاست‌ها چه در محیط آزمایشگاه و چه در موارد بالینی به اثبات رسیده است^(۱۵ تا ۱۷). استفاده از داکسی‌سایکلین به دلیل خاصیت باکتریواستاتیکی خود شاید بتواند از بروز عفونت در موضع جراحی جلوگیری کند.

التیام استخوان به دو صورت التیام اولیه (التیام مستقیم) و ثانویه (التیام غیرمستقیم یا التیام با واسطه تشکیل کالوس) صورت می‌پذیرد. زمانی که فاصله بین دو قطعه شکسته استخوان کمتر از ۱ میلی‌متر باشد، التیام از نوع اولیه خواهد بود، مانند تثبیت استخوان با پلاک. در صورتی که فاصله دو قطعه شکسته استخوان بیش از ۱ میلی‌متر باشد، التیام از نوع ثانویه رخ خواهد داد که ابتدا با بروز شکستگی، عروق خونی موضع پاره گشته، خونریزی رخ داده و هماتوم تشکیل می‌شود، سپس هماتوم به بافت فیبروزه تبدیل می‌شود و در مرحله بعد، بافت فیبروزه به غضروف و در نهایت به بافت غضروفی کلسیفیه شده و به استخوان تبدیل می‌گردد^(۱۶). در هر دو نوع التیام استخوانی، لخته خون به‌عنوان داربست فیبرینی، بلافاصله بعد از شکستگی استخوان در محل ایجاد می‌شود. لخته خون علاوه بر دارا بودن فیبرین حاوی مقدار قابل توجهی پلاکت، اریتروسیت، لکوسیت، فاکتورها و سیگنال‌های رشد و مواد معدنی و مغذی است که همه این اجزاء نقش مؤثری در فرایند ترمیم و بازسازی استخوان ایفا می‌کنند^(۱۷).

آنها به دلیل حضور فاکتورهای رشد مختلف توانایی ایجاد بازتولید بافت استخوان را دارند. برای مثال، پلاسمای غنی از پلاکت اولین بار توسط مارکس^{۱۲} و همکاران در التیام استخوان به کار گرفته شد. مثال دیگری از ترکیبات پلاکتی مؤثر در التیام استخوان، پلاکت لیوفیلیزه^{۱۳} است که اولین بار توسط حفار^{۱۴} و همکاران در التیام استخوان‌های بلند در مدل حیوانی خرگوش به کار گرفته شد^(۳).

صرف نظر از وجود پلاکت در لخته خون از دیگر مؤلفه‌های موجود در لخته خون می‌توان به فاکتورها و سیگنال‌های رشد نظیر فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (VEGF)، فاکتور رشد تراریختی بتا-۱ (TGFβ1) و پروتئین مورفوژنتیک استخوانی (BMPs) اشاره کرد^(۱۸، ۱۷).

لخته خون خودی همانند بافت پیوندی استخوان اتوگرافت، از خود فرد اخذ می‌شود، لذا سبب تحریک سیستم ایمنی نمی‌شود و به همین دلیل

12. Marx.

13. Lyophilized Platelet.

14. Hafar.

۱۵. فاکتور محرک سلول به سلول (Wingless-Int).

جدول ۱: نحوه ارزیابی هیستوپاتولوژی با استفاده از سیستم Emery	
درجه	مشاهدات
۰	عدم مشاهده نشانه‌ای از شکل‌گیری استخوان
۱	مشاهده بافت همبند فیبروزه به تنهایی
۲	مشاهده ترکیب بافت فیروز و فیبروکارتیلیج با غالبیت بافت فیروز
۳	مشاهده ترکیب بافت فیروز و فیبروکارتیلیج با غالبیت بافت فیبروکارتیلیج
۴	مشاهده بافت فیبروکارتیلیج به تنهایی
۵	مشاهده ترکیب بافت فیبروکارتیلیج و استخوان با غالبیت بافت فیبروکارتیلیج
۶	مشاهده ترکیب بافت فیبروکارتیلیج و استخوان با غالبیت بافت استخوان
۷	مشاهده بافت استخوان به تنهایی

جدول ۲: مجموع امتیازات رادیوگرافی ترمیم استخوان براساس سیستم Sandhu و lane					
p ^a	ترکیب لخته خون و داکسی‌سایکلین	داکسی‌سایکلین	لخته خون	کنترل	گروه
					هفته
۰,۰۹	۱(۰-۳)	۲(۰-۴)	۲(۱-۳)	۴(۳-۶)	۲
۰,۱۹	۵(۳-۸)	۳(۰-۴)	۶(۴-۷)	۶(۳-۹)	۴
۰,۸۷	۷(۵-۹)	۷(۶-۱۰)	۷(۶-۹)	۶(۳-۹)	۶
۰,۲۳	۹(۹-۱۰)	۸(۷-۱۰)	۷(۷-۱۰)	۶(۴-۱۰)	۸

ارزیابی خرگوش‌ها در سطوح بالینی (هر روز)، رادیولوژیک (هر دو هفته یکبار) و هیستوپاتولوژیک (یک‌بار در پایان دوره) صورت گرفت. در ارزیابی بالینی، وضعیت التهاب، عفونت، خونریزی و نحوه وزن‌گیری در اندام مورد نظر، مورد توجه قرار گرفت.

ارزیابی رادیولوژی

در پایان هفته‌های ۲، ۴، ۶ و ۸ پس از جراحی، با آرام‌بخشی ملایم، خرگوش‌ها آرام شده و از نمای جانبی-میانی دست راست خرگوش‌ها گراف رادیولوژی تهیه شد. برای ارزیابی و درجه‌بندی التیام در گراف‌های رادیولوژی، از سیستم تغییرشکل یافته Sandhu و Lane استفاده شد، در این سیستم زمانی که شواهدی دال بر تشکیل استخوان در موضع دیده شود، امتیاز ۴ به آن تعلق می‌گیرد و زمانی که جوش خوردن این استخوان تازه تشکیل شده، به ترتیب با استخوان قسمت فوقانی و قسمت تحتانی موضع دیده شود، به هرکدام امتیاز ۲ به صورت جداگانه تعلق می‌گیرد و زمانی که فرایند بازآرایی استخوان دیده شود ۲ امتیاز دیگر به مجموع امتیازات فوق افزوده می‌شود. در بهترین حالت از التیام استخوان، مجموع این امتیازها به ۱۰ خواهد رسید.

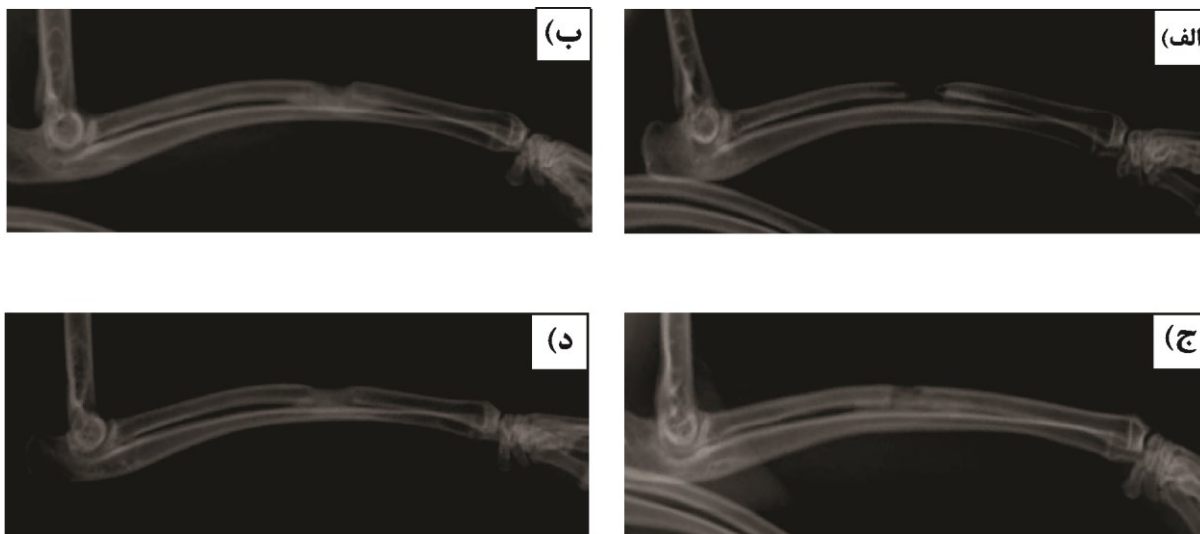
بیهوشی

ابتدا با تزریق عضلانی کوکتل دارویی که حاوی داروهای کتامین، میدازولام و آسپرومازین به ترتیب با دوز ۴، ۳۰ و ۰/۲ میلی‌گرم/کیلوگرم بود، القای بیهوشی صورت گرفت، سپس ادامه بیهوشی تا پایان جراحی با اتصال حیوان به دستگاه بیهوشی استنشاقی حاوی ایزوفلوران و اکسیژن توسط ماسک انجام شد.

روش جراحی

پس از القای بیهوشی، پوست در سطح قدامی-داخلی روی استخوان زنده‌ترین برش داده شد و قطعه‌ای حدود ۱۰ میلی‌متر از استخوان برداشته شد و نقیصه استخوانی ایجاد گردید. سپس نقیصه با «لخته خون و داکسی‌سایکلین» و یا «لخته خون تنها» طبق گروه‌بندی‌های یاد شده پر شد. بعد از ریکاوری، خرگوش‌ها بدون تثبیت خارجی، به صورت آزاد در قفس رها شدند. سپس به مدت ۳ روز، تزریق عضلانی آنتی‌بیوتیک انروفلوکساسین ۱۰٪ با دوز ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به صورت روزانه برای آنها انجام شد.

تصویر ۴: تصاویر رادیوگرافی هفته ۸ پس از جراحی



الف) گروه کنترل، ب) گروه لخته خون، ج) گروه داکسی‌سایکلین، د) گروه ترکیب لخته خون و داکسی‌سایکلین.

۲۸، ۴۲ و ۵۶ پس از جراحی مورد تفسیر قرار گرفت. در این ارزیابی اختلاف معنی‌داری بین گروه‌ها مشاهده نشد ($p > 0.05$)، (جدول ۲، شکل ۱).

تست Nonparametric Kruskal-wallis صورت گرفت و اختلاف بین گروه‌ها در هفته‌های مختلف با $p < 0.05$ معنی‌دار تلقی شد. زمانی که $p < 0.05$ بود، تست تکمیلی Mann-Whitney U Test انجام می‌گرفت.

نتایج حاصل از هیستوپاتولوژی

در ارزیابی‌های هیستوپاتولوژی روز ۵۶ پس از عمل جراحی، تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های مختلف مشاهده شد ($p < 0.05$). در ارزیابی بین گروه کنترل و گروه‌های «لخته خون»، «داکسی‌سایکلین» و «ترکیب لخته خون و داکسی‌سایکلین» تفاوت معنی‌داری (به ترتیب $p = 0.04$ ، $p = 0.04$ و $p = 0.01$) مشاهده شد که نشان می‌داد تمام گروه‌های درمانی نسبت به گروه کنترل عملکرد بهتری داشتند (جدول ۳).

بین گروه‌های درمانی، گروه ترکیب لخته خون و داکسی‌سایکلین نسبت به گروه لخته خون و گروه داکسی‌سایکلین برتری معنی‌داری (به ترتیب $p = 0.01$ و $p = 0.01$) را از خود به نمایش گذاشت (جدول ۳). بین گروه‌های لخته خون و داکسی‌سایکلین تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد ($p > 0.05$)، (جدول ۳).

بررسی‌ها نشان داد وجود پلاک‌های فیبروزی در گروه کنترل مانع از تشکیل کامل استخوان شده است (تصویر ۵ - الف).

رادیوگراف‌ها توسط یک شخص و بدون آگاهی از گروه‌های مورد مطالعه ارزیابی شدند، همچنین فقط یک بار، تمام رادیوگراف‌ها ارزیابی شدند^(۲۱،۲۰،۳).

ارزیابی هیستوپاتولوژی

روز ۵۶ پس از جراحی، القای بیهوشی خرگوش‌ها با ترکیب کتامین و آسپرومازین صورت گرفت و با استفاده از تزریق داخل قلبی دوز بالای سولفات منیزیم آسان‌کشی شدند. سپس عضلات و فاسیا به طور کامل از استخوان جدا شدند و استخوان زنده زیرین و زیرین در فرمالین ۱۰٪ انداخته شد و به آزمایشگاه هیستوپاتولوژی فرستاده شد. لام‌ها توسط میکروسکوپ نوری و بزرگنمایی چهار برابر، با سیستم درجه‌بندی Emery مورد ارزیابی هیستوپاتولوژی قرار گرفتند (جدول ۱)^(۳۱).

داده‌های رادیوگرافیک و هیستوپاتولوژیک با آزمون Nonparametric Kruskal-wallis ارزیابی شدند و زمانی که $p < 0.05$ شد، با تست تکمیلی Mann-Whitney U Test مقایسه شدند و زمانی که $p > 0.05$ شد معنی‌دار تلقی گردید. در آنالیز آماری از نسخه ۲۴ نرم افزار SPSS استفاده شد.

یافته‌ها

از نظر بالینی به جز عدم تمایل به حرکت در روزهای اول، عفونت یا مشکل زخم دیده نشد.

نتایج رادیولوژیک:

تصاویر رادیوگرافیک موضع جراحی در گروه‌های کنترل، لخته خون، داکسی‌سایکلین و ترکیب لخته خون با داکسی‌سایکلین، در روزهای ۱۴،

جدول ۳: مجموع امتیازات هیستوپاتولوژی ترمیم استخوان در هفته ۸ پس از جراحی (درجه بندی Emery)

p ^a	ترکیب داکسی‌سایکلین و لخته‌خون	داکسی‌سایکلین	لخته خون	کنترل	گروه
۰/۰۰۹	۷ (۷-۷) ^{d,e,f}	۶ (۵-۶) ^c	۶ (۵-۶) ^b	۴ (۴-۵)	۸

a. تست Nonparametric Kruskal-wallis انجام شد و اختلاف بین گروه‌ها با $p < 0/05$ معنی‌دار تلقی گردید. زمانی که $p < 0/05$ بود، تست تکمیلی Mann-Whitney U Test انجام شد.

b. اختلاف معنی‌دار (۰/۰۴) بین گروه کنترل و گروه لخته‌خون مشاهده شد که نشانگر برتری گروه لخته‌خون است.

c. اختلاف معنی‌دار (۰/۰۴) بین گروه کنترل و گروه داکسی‌سایکلین مشاهده شد که نشانگر برتری گروه داکسی‌سایکلین است.

d. اختلاف معنی‌دار (۰/۰۱) بین گروه کنترل و گروه ترکیب داکسی‌سایکلین و لخته‌خون مشاهده شد که نشانگر برتری گروه ترکیب است.

e. اختلاف معنی‌دار (۰/۰۱) بین گروه لخته‌خون و گروه ترکیب لخته‌خون و داکسی‌سایکلین مشاهده شد که نشانگر برتری گروه ترکیب است.

f. اختلاف معنی‌دار (۰/۰۱) بین گروه داکسی‌سایکلین و گروه ترکیب لخته‌خون و داکسی‌سایکلین مشاهده شد که نشانگر برتری گروه ترکیب است.

بیشتر حذف شود، میزان تأثیر مخرب آن بر التیام استخوان بیشتر خواهد بود.^(۲۳)

گراننس^{۱۸} و همکاران در سال ۱۹۹۳، در یک مطالعه به مدت ۴ هفته، بر روی تعدادی رت، به بررسی اثر هماتوم روی التیام استخوان پرداختند که نتایج حاکی از عدم تفاوت در میزان تشکیل کالوس استخوانی و میزان نیروی لازم جهت شکستگی بود اما گشتاور خمشی^{۱۹} و سختی خمشی^{۲۰} در سمت لخته خون بیشتر بود.^(۲۴)

اوزاکی^{۲۱} و همکاران در سال ۲۰۰۰، نشان دادند که هماتوم شکستگی برای تکثیر سلول‌های پرپوستی استخوان لازم و ضروری است.^(۱۹)

کولار^{۲۲} و همکاران در سال ۲۰۱۱، ثابت کردند که هماتوم شکستگی خودش را با شرایط هیپوکسی تطابق می‌دهد که این منجر به افزایش رگ‌زایی، کموتاکسی و استخوان‌سازی می‌شود؛ افزایش VEGF^{۲۳} و IL6^{۲۴} که به ترتیب سبب تحریک رگ‌زایی (vascularization) و مهاجرت لکوسیت‌ها به موضع می‌شود، همچنین افزایش بیومارکرهای استئوبلاستی نظیر SPP1^{۲۵} تقویت‌کننده استخوان‌سازی در شرایط هیپوکسی است.^(۲۵)

پرینینگر^{۲۶} و همکاران در سال ۲۰۱۲، ثابت کردند هماتوم شکستگی مؤلفه‌ای ضروری جهت التیام استخوان در مدل حیوانی رت است و افزودن پروتئین‌های مورفوژنتیک استخوان به هماتوم، توانایی التیام کامل استخوان را در مدت ۶ هفته دارد.^(۱۸)

مطالعه اسپل^{۲۷} و همکاران در سال ۲۰۱۲ و ۲۰۱۷، بر استئوتومی استخوان درشت نی گوسفند بدین نتیجه رسید که حذف هماتوم اولیه به دلایلی مانند افزایش دید جراح سبب اثر منفی بر التیام استخوان

در گروه‌های لخته‌خون و داکسی‌سایکلین، بافت استخوانی تراکولار به خوبی دیده می‌شود (تصویر ۵ - ب و تصویر ۵ - ج).

در گروه ترکیب لخته‌خون و داکسی‌سایکلین که برترین گروه از دیدگاه هیستوپاتولوژیک بود، تشکیل کانال مغز استخوان به همراه بافت استخوانی تراکولار که در حال تبدیل شدن به بافت استخوانی ورقه‌ای می‌باشد، به خوبی دیده می‌شود (تصویر ۵ - ج). در این گروه تمامی اسلایدها بالاترین امتیاز ممکن یعنی امتیاز ۷ را به دست آوردند (جدول ۳).

بحث

در این مطالعه از لخته‌خون خودی به عنوان یک داربست فیبرینی و تسریع‌دهنده مراحل اولیه التیام استخوان و داکسی‌سایکلین به منظور مهارکننده عوامل مخرب استخوان به صورت مجزا و نیز در ترکیب با یکدیگر، جهت بررسی اثر آنها بر التیام نقیصه استخوانی در مدل حیوانی خرگوش استفاده شد. بررسی اثر لخته‌خون خودی به عنوان یک بافت پیوندی با خواص استخوان‌سازی و القای استخوان‌سازی و هدایت استخوانی که پاسخ ایمنی بدن را تحریک نمی‌کند، از دیگر اهداف این مطالعه بود.^(۲۲،۱۵)

تسوندا^{۱۶} و همکاران در سال ۱۹۹۳، با جداسازی عناصر سلولی و خارج سلولی هماتوم شکستگی به این نتیجه دست یافتند که در شرایط آزمایشگاهی بخش سلولی هماتوم شکستگی با افزودن عوامل القاگر استخوان‌سازی، توانایی تبدیل به کندروبلاست یا استئوبلاست را دارند.^(۲۲)

گراننس^{۱۷} و همکاران در سال ۱۹۹۳، در یک مطالعه بر استخوان ران رت نشان دادند که هماتوم شکستگی نقش مثبتی در التیام شکستگی بر عهده دارد، در حالی که حذف آن سبب تأخیر در التیام استخوان می‌شود. از طرف دیگر، هرچقدر هماتوم با شستشو از محل شکستگی

18. Grundnes.

19. Bending moment.

20. Bending rigidity.

21. Ozaki.

22. Kolar.

23. Vascular Endothelial Growth Factor.

24. Interleukin 6

25. Gene SPP1

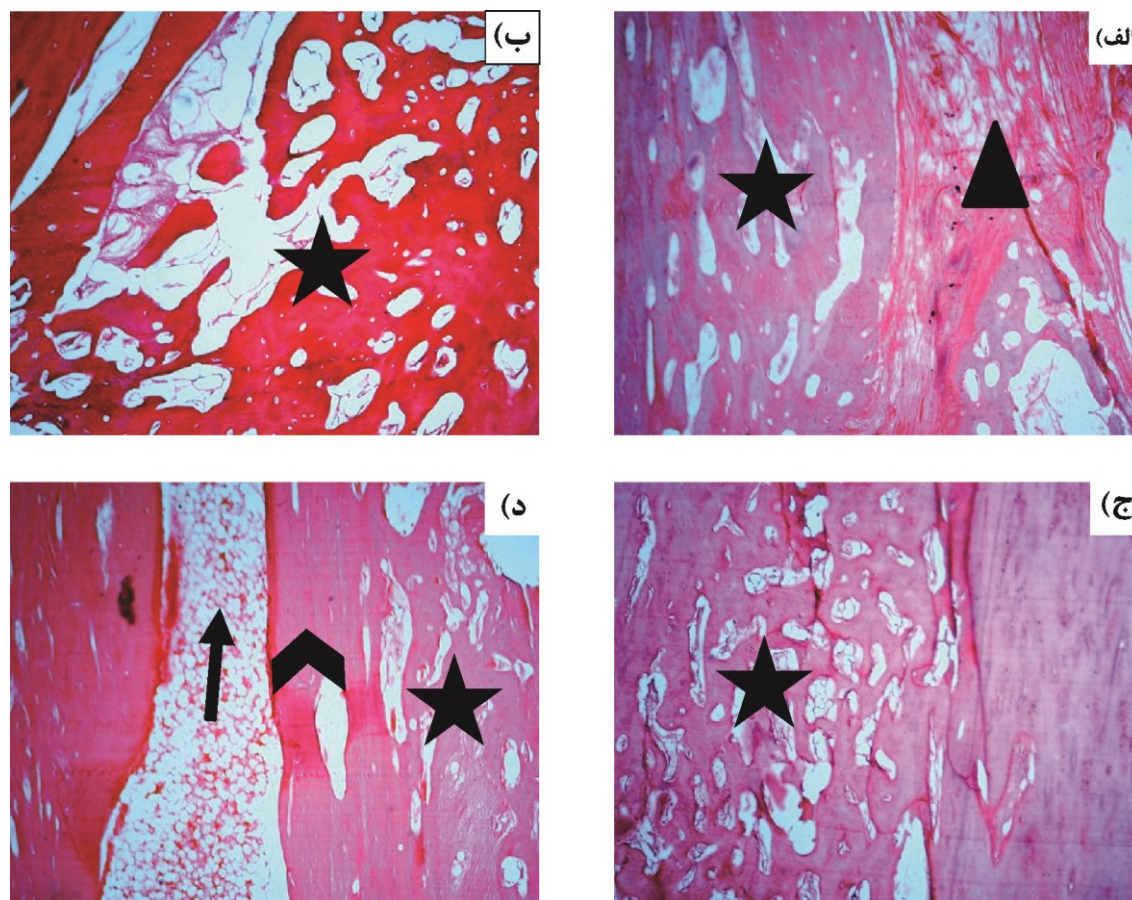
26. Preininger.

27. Schell.

16. Tsunoda.

17. Grundnes.

تصویر ۵: مقاطع هیستوپاتولوژی از گروه‌های کنترل و پیوند، ۵۶ روز پس از عمل با بزرگنمایی ۴ برابر



الف) گروه کنترل، ب) گروه لخته خون، ج) گروه داکسی‌سایکلین و د) گروه ترکیب لخته خون و داکسی‌سایکلین. هر کدام از نمادهای موجود در این مقاطع نمایانگر بافتی خاص است: ■ پلاک فیبروزی، ■ استخوان تراپکولار جدید، ▲ استخوان ورقه‌ای جدید و ↑ کانال مغز استخوان جدید

تراپکولار به خوبی تشکیل شده بود و برخلاف گروه کنترل هیچ‌گونه بافت فیبروزی در موضع مشاهده نگردید.

یکی دیگر از اهداف این مطالعه بررسی اثر آنتی‌بیوتیک داکسی‌سایکلین بر التیام استخوان بود.

از داکسی‌سایکلین برای درمان بیماری‌های عفونی به صورت سیستمیک و موضعی استفاده می‌شود. علاوه بر این، عملکردهای بیولوژیک کاملاً مستقل از خواص ضد میکروبی آن نیز به اثبات رسیده است. گلوب^{۲۸} و همکاران در مطالعه‌ای در سال ۱۹۹۱ بیان داشتند که این خانواده از آنتی‌بیوتیک‌ها علاوه بر خواص ضدالتهابی و آنتی‌اکسیدانی خود، سبب مهار فعالیت‌های کاتابولیسیمی ژلاتینازها و کلاژنازهای انسانی می‌شوند که به طور مستقیم بر پریدونتایتیس^{۲۹} و غیرمستقیم بر بیماری‌هایی نظیر استئوپروز^{۳۰}، آرتروز و سرطان اثرگذار هستند^{۲۸}.

دارد و ادعا کردند که خونریزی ثانویه به دلیل اینکه فاقد سلول‌های سازنده استخوان یا غضروف است، می‌تواند التیام و تشکیل استخوان را به عقب بیاندازد^{۲۶}.

این تحقیقات نشان داد که باید در هنگام درمان بالینی شکستگی، هماتوم اصلی را که به محض شکستگی تشکیل می‌شود حفظ کرد تا از نیروی التیام‌بخش آن سود برده شود. پلاکت‌ها نیز یکی از ترکیبات موجود در لخته خون هستند، به وسیله قطعه قطعه شدن مگاکاریوسیت‌های ساخته می‌شوند و اثر ترمیمی فوق‌العاده دارند. آنها به دلیل حضور فاکتورهای رشد مختلف توانایی ایجاد رزئراسیون بافت استخوان را دارا هستند^{۲۷}.

در مطالعه حاضر، گروه لخته خون از دیدگاه تصویربرداری تشخیصی نسبت به سایر گروه‌ها، در روزهای ۱۴، ۲۸، ۴۲ و ۵۶ تفاوت معنی‌داری از خود نشان نداد، اما آنالیز داده‌های آماری هیستوپاتولوژی نشانگر برتری این گروه نسبت به گروه کنترل بود؛ در این گروه بافت استخوان

28. Golub.

29. Periodontitis.

30. Osteoporosis.

نتیجه‌گیری: این مطالعه همانند سایر مطالعات نقش مثبت لخته‌خون و داکسی‌سایکلین را بر التیام استخوان نشان داد و از طرف دیگر، نشانگر افزایش توانمندی این دو در صورت ترکیب شدن با یکدیگر بود.

تضاد منافع: تمامی نویسندگان بدین وسیله تأیید می‌کنند که هیچ گونه تضاد منافی در این مطالعه ندارند.

منابع

- Palumbo C, Palazzini S, Zaffe D, Marotti G. Osteocyte differentiation in the tibia of newborn rabbit: an ultrastructural study of the formation of cytoplasmic processes. *Acta Anat.* 1990;137(4):350-8. PMID: 2368590 DOI: 10.1159/000146907.
- Bigham-Sadegh A, Shadkhast M, Khalegi MR. Demineralized calf foetal growth plate effects on experimental bone healing in rabbit model. *Veterinarski arhiv.* 2013; 83(5):525-36.
- Hafar I, Bigham-sadegh A, Nematollahi A, Karimi I, Lotfi S. The Effect of Fish Bone Powder and Human Lyophilized Platelet on Bone Healing in Rabbit Model. *Iranian Journal of Orthopaedic Surgery.* 2019; 17(2):57-69.
- Finkemeier CG. Bone-Grafting and Bone-Graft Substitutes. *J Bone Joint Surg Am.* 2002;84(3):454-64. PMID: 11886919 DOI: 10.2106/00004623-200203000-00020.
- Bigham A, Dehghani S, Shafiei Z, Torabi Nezhad S. Experimental bone defect healing with xenogenic demineralized bone matrix and bovine fetal growth plate as a new xenograft: radiological, histopathological and biomechanical evaluation. *Cell Tissue Bank.* 2009;10(1):33-41. PMID: 18810656 DOI: 10.1007/s10561-008-9107-y.
- Trotter JF. Transmission of hepatitis C by implantation of a processed bone graft: a case report. *J Bone Joint Surg Am.* 2003;85(11):2215-7. PMID: 14630857 DOI: 10.2106/00004623-200311000-00026.
- Ng VY. Risk of disease transmission with bone allograft. *Orthopedics.* 2012;35(8):679-81. PMID: 22868589 DOI: 10.3928/01477447-20120725-04.
- Burton EC, Burns DK, Opatowsky MJ, El-Feky WH, Fischbach B, et al. Rabies encephalomyelitis: clinical, neuroradiological, and pathological findings in 4 transplant recipients. *Arch Neurol.* 2005;62(6):873-82. PMID: 15956158 DOI: 10.1001/archneur.62.6.873.
- Laurencin CT, Jiang T. Bone Graft Substitutes and Bone Regenerative Engineering: ASTM International; 2014.
- Bezerra M, Brito G, Ribeiro R, Rocha F. Low-dose doxycycline prevents inflammatory bone resorption in rats. *Braz J Med Biol Res.* 2002;35(5):613-6. PMID: 12011948 DOI: 10.1590/s0100-879x2002000500015.
- Hanemaaijer R, Visser H, Koolwijk P, Sorsa T, Salo T, et al. Inhibition of MMP synthesis by doxycycline and chemically modified tetracyclines (CMTs) in human endothelial cells. *Adv Dent Res.* 1998;12(2):114-8. PMID: 9972133 DOI: 10.1177/08959374980120010301.
- Zhang C, TANG TT, REN WP, ZHANG XI, DAI KR. Inhibiting wear particles-induced osteolysis with doxycycline. *Acta Pharmacol Sin.* 2007;28(10):1603-10. PMID: 17883947 DOI: 10.1111/j.1745-7254.2007.00638.x.

هانماژر^{۳۱} و همکاران در سال ۱۹۹۸ نشان دادند که سنتز MMP-8^{۳۲} و MMP-9 تحت اثر دوزهای درمانی داکسی‌سایکلین کاهش می‌یابد که سبب مهار التهاب، کاهش رگ‌زایی و نورگ‌زایی در سلول‌های اندوتلیال انسانی می‌شود^(۱۱). بزرا^{۳۳} و همکاران نیز شواهدی مبنی بر کاهش بازجذب التهابی استخوان در پی استفاده از داکسی‌سایکلین ارائه کردند^(۱۰). گومز^{۳۴} و همکاران در شرایط آزمایشگاهی با افزودن دو آنتی‌بیوتیک از خانواده تتراسایکلین‌ها شامل داکسی‌سایکلین و مینوسایکلین، به محیط کشت سلول‌های استئوبلاستیک مغز استخوان انسان اعلام کردند که افزایش قابل توجهی از سلول‌های استئوبلاستیک و در نتیجه ساخت ماتریکس معدنی نرمال را مشاهده کرده‌اند^(۱۳). ژانگ^{۳۵} و همکاران نیز نشان دادند که گروه‌های درمانی با داکسی‌سایکلین در شرایط آزمایشگاه به صورت مؤثری استئوکلاست‌های بالغ را مهار کرده و از ساخت استئوکلاست‌ها^{۳۶} جلوگیری کرده‌اند، همچنین این تحقیقات نشان داد که داکسی‌سایکلین توانایی شدیدی در مهار ساخت استئوکلاست‌ها و استئولیز را در شرایط بالینی دارد^(۱۲). بدی^{۳۷} و همکاران به بررسی اثرات داکسی‌سایکلین بر روی مهار متالوپروتینازهای ماتریکس سلولی و نقش آن در فرایند ترمیم عضلات و تاندون‌ها پرداختند و گفتند مهار MMP و افزایش سازمان‌دهی شبکه کلاژنی باعث بهبود فرایند ترمیم می‌شود^(۱۴). گونر و همکاران نیز نتایج مشابهی به دست آوردند^(۱۶).

در مطالعه حاضر، گروه داکسی‌سایکلین همانند گروه لخته‌خون، تفاوت معنی‌داری با سایر گروه‌ها در ارزیابی رادیوگرافیک نشان نداد، لیکن آنالیز داده‌های آماری هیستوپاتولوژیک نشانگر برتری این گروه بر گروه کنترل بود. همچنین این گروه عملکردی همانند با گروه لخته‌خون از خود نشان داد؛ بافت استخوان تراپیکولار به خوبی مشاهده شد و هیچ بافت فیبروزی در موضع دیده نشد.

گروه ترکیب لخته‌خون و داکسی‌سایکلین نسبت به سایر گروه‌ها در ارزیابی رادیوگرافیک تفاوت معنی‌داری را به نمایش نگذاشت اما آنالیز داده‌های آماری هیستوپاتولوژی نشانگر برتری معنی‌دار این گروه بر سایر گروه‌ها بود؛ کانال مغز استخوان به خوبی تشکیل شده و استخوان تراپیکولار در حال تبدیل به استخوان ورقه‌ای بود.

میزان اکسیژن موجود در مواد پیوندی بر التیام بافت استخوان مؤثر است، لذا به دانشمندان پیشنهاد می‌شود با نخ‌گیری از سرخرگ و سایه‌رگ، اثر لخته‌خون حاصل از آن‌ها را نیز بر التیام استخوان بررسی کنند.

31. Hanemaaijer.

32. Matrix metalloproteinase-6

33. Bezerra.

34. Gomes.

35. Zhang.

36. Osteoclastogenesis.

37. Bedi.

13. Gomes PS, Fernandes MH. Effect of therapeutic levels of doxycycline and minocycline in the proliferation and differentiation of human bone marrow osteoblastic cells. *Arch Oral Biol.* 2007;52(3):251-9. PMID: 17141175 DOI: 10.1016/j.archoralbio.2006.10.005.
14. Bedi A, Fox A, Kovacevic D, Deng XH, Warren R. et al. Doxycycline-Mediated Inhibition of Matrix Metalloproteinases Improves Healing After Rotator Cuff Repair. *Am J Sports Med.* 2010;38(2):308-17. PMID: 19826139 DOI: 10.1177/0363546509347366.
15. do Nascimento Gomes K, Alves APNN, Dutra PGP, de Barros Viana GS. Doxycycline induces bone repair and changes in Wnt signalling. *Int J Oral Sci.* 2017;9(3):158-66. PMID: 28960195 PMCID: PMC5709545 DOI: 10.1038/ijos.2017.28.
16. Slatter DH. *Textbook of small animal surgery: Elsevier Health Sciences; rd Edition (2-Volume Set).* 2003.
17. Wang X, Friis T, Glatt V, Crawford R, Xiao Y. Structural properties of fracture haematoma: current status and future clinical implications. *J Tissue Eng Regen Med.* 2017;11(10):2864-75. PMID: 27401283 DOI: 10.1002/term.2190.
18. Preininger B, Gerigk H, Bruckner J, Perka C, Schell H, et al. An experimental setup to evaluate innovative therapy options for the enhancement of bone healing using BMP as a benchmark—a pilot study. *Eur Cell Mater.* 2012;23:262-71. PMID: 22492018 DOI: 10.22203/ecm.v023a20.
19. Ozaki A, Tsunoda M, Kinoshita S, Saura R. Role of fracture hematoma and periosteum during fracture healing in rats: interaction of fracture hematoma and the periosteum in the initial step of the healing process. *J Orthop Sci.* 2000;5(1):64-70. PMID: 10664441 DOI: 10.1007/s007760050010.
20. Oryan A, Bigham-Sadegh A, Monazzah S. Fish bone versus fish demineralized bone matrix (vertebra) effects on healing of experimental radial defect in rat model. *Comparat Clin Pathol.* 2016;25(5):981-5.
21. 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. *J Bone Joint Surg Am.* 1994;76(4):540-8. PMID: 8150821 DOI: 10.2106/00004623-199404000-00008.
22. Tsunoda M, Mizuno K, Matsubara T. The osteogenic potential of fracture hematoma and its mechanism on bone formation--through fracture hematoma culture and transplantation of freeze-dried hematoma. *Kobe J Med Sci.* 1993;39(1):35-50. PMID: 8366663
23. Grundnes O, Reikerås O. The importance of the hematoma for fracture healing in rats. *Acta Orthop Scand.* 1993;64(3):340-2. PMID: 8322595 DOI: 10.3109/17453679308993640.
24. Grundnes O, Reikerås O. The role of hematoma and periosteal sealing for fracture healing in rats. *Acta Orthop Scand.* 1993;64(1):47-9. PMID: 8451946 DOI: 10.3109/17453679308994527.
25. Kolar P, Gaber T, Perka C, Duda GN, Buttgerit F. Human early fracture hematoma is characterized by inflammation and hypoxia. *Clin Orthop Relat Res.* 2011;469(11):3118-26. PMID: 21409457 PMCID: PMC3183184 DOI: 10.1007/s11999-011-1865-3.
26. Schell H, Peters A, Duda G. et al. Removal of fracture hematoma and replacement with fresh hematoma delays bone healing in sheep. *Bone.* 2012(50):S115.
27. Schell H, Duda G, Peters A, Tsitsilonis S, Johnson K. et al. The haematoma and its role in bone healing. *J Exp Orthop.* 2017;4(1):5. PMID: 28176273 PMCID: PMC5296258 DOI: 10.1186/s40634-017-0079-3.
28. Golub LM, Ramamurthy N, McNamara TF, Greenwald RA, Rifkin BR. Tetracyclines inhibit connective tissue breakdown: new therapeutic implications for an old family of drugs. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1991;2(3):297-321. PMID: 1654139 DOI: 10.1177/10454411910020030201.