

بررسی رادیوگرافی میزان القاء و هدایت استخوان سازی با استفاده از نانو کلسیم فسفات دو فازی در استخوان ران خرگوش

پژمان ناظم زمردی^{۱*}، شاهین گل محمدی^۲، خشایار معارفیان^۲

۱. گروه علوم درمانگاهی، واحد سنندج، دانشگاه آزاد اسلامی، سنندج، ایران

۲. دانش آموخته دکتری دامپزشکی، واحد سنندج، دانشگاه آزاد اسلامی، سنندج، ایران

Email: P_ZOMORRODI@iausdj.ac.ir

(دریافت مقاله: ۱۴۰۴/۵/۱۱ پذیرش نهایی: ۱۴۰۴/۷/۱۹)

چکیده:

زمینه و هدف: نقیصه های استخوانی، به ویژه در بافت اسفنجی، از چالش های اصلی درمان ضایعات اسکلتی در پزشکی و دامپزشکی بوده و یافتن راهکاری موثر جهت تسریع و ارتقا کیفی روند ترمیم آنها بسیار حائز اهمیت است. پژوهش حاضر با هدف بررسی اثر داربست نانوکلسیم فسفات دوفازی (BCP) بر القاء و هدایت استخوان سازی در نقیصه استخوان ران خرگوش انجام شده است.

مواد و روش کار: در این مطالعه تجربی، تعداد ۱۲ سر خرگوش ماده نژاد نیوزلندی انتخاب شده و در هر دو پای حیوان سوراخی به قطر ۵ میلی متر در کورتکس قدامی دیافیز استخوان ران ایجاد گردید. سپس سوراخ پای چپ با گرانول نانوکلسیم فسفات دوفازی پر شده (گروه آزمایش) و سوراخ پای راست نیز به عنوان گروه شاهد، فاقد هرگونه ماده پر کننده، باقی ماند. ارزیابی های رادیوگرافیک در روزهای صفر، ۱۵، ۳۰، ۴۵ و ۶۰ پس از جراحی انجام شده و نتایج کیفی و کمی بر اساس سیستم نمره دهی لین و سندهو تجزیه و تحلیل گردید.

نتایج: تشکیل کالوس و پرشدگی نقیصه در گروه آزمایش، زودتر و با شدت بیشتری نسبت به گروه شاهد انجام شده و آزمون های آماری بیانگر اختلاف معنی دار بین دو گروه مطالعه در روزهای ۴۵ و ۶۰ از نظر میزان ترمیم استخوانی بودند.

بحث و نتیجه گیری: یافته های حاصله بیانگر آن است که نانوکلسیم فسفات دوفازی با ایجاد بستری مناسب برای عملکرد سلول های استخوان ساز، موجب تسریع روند ترمیم استخوان شده و می تواند به عنوان داربستی مؤثر در بازسازی ضایعات استخوانی مد نظر قرار گیرد.

واژگان کلیدی: نانوکلسیم فسفات دوفازی، استخوان سازی، رادیوگرافی، نقیصه استخوان، خرگوش

محدودیت‌هایی از جمله کمبود منابع و خطر عفونت مواجه هستند. این امر موجب توجه ویژه به بیومتریال‌های نوین، به ویژه نانوکلسیم فسفات دو فازی (BCP) شده است. BCP ترکیبی از هیدروکسی آپاتیت (HA) و بتا-تری کلسیم فسفات (β -TCP) در مقیاس نانو است که هر کدام ویژگی‌های منحصر به فردی در تسهیل بازسازی استخوان دارند (Boller et al., 2021).

هیدروکسی آپاتیت (HA) به دلیل شباهت ساختاری با مواد معدنی استخوان طبیعی، از زیست‌سازگاری و زیست‌فعالی بالایی برخوردار است. این فاز نقش کلیدی در ایجاد پایداری مکانیکی داربست ایفا می‌کند. با توجه به انحلال‌پذیری پایین، HA به عنوان فاز دیرجذب شناخته می‌شود که حضور طولانی‌مدت آن در محل پیوند، موجب حمایت از تکثیر سلولی و القای تمایز استخوانی می‌گردد (Boller et al., 2021). برخلاف HA، فاز β -TCP با سرعت بیشتری در بدن تجزیه و جذب شده که این ویژگی منحصر به فرد به دلیل نرخ بالای بازجذب آن است که با آزادسازی یون‌های کلسیم فسفات، شرایط را برای تشکیل ماتریکس معدنی و استخوان جدید فراهم می‌کند. این مکانیسم موجب تسریع قابل توجه در فرآیندهای بازسازی و ترمیم استخوان می‌گردد (LeGeros et al., 2003).

استخوان به عنوان بافت همبند تخصصی، اسکلت بدن انسان و مهره‌داران را تشکیل داده و نقش حیاتی در حفظ ساختار، پایداری و عملکرد اندام‌ها دارد. این بافت نیمه سفت و معدنی متشکل از سلول‌های تخصصی در یک ماتریکس سخت و منظم بوده که حدود ۱۴٪ وزن بدن مهره‌داران را شامل می‌شود (Ansari et al., 2019). استخوان با وجود سبکی، مقاومت مکانیکی بالایی داشته و همزمان استحکام و سبکی را تأمین می‌کند (Mohd Zaffarin et al., 2021).

استخوان بافتی زنده و پویاست که به طور مداوم در حال بازسازی و ترمیم است. ساختار آن عمدتاً از استئوسیت‌ها تشکیل شده که در یک ماتریکس سه‌بعدی حاوی کلاژن، پروتئوگلیکان‌ها و مواد معدنی (به ویژه هیدروکسی آپاتیت) قرار دارند. این ترکیب منحصر به فرد، استخوان را به سخت‌ترین بافت همبند تبدیل کرده و عملکردهای حیاتی مانند خون‌سازی و ذخیره‌سازی مواد معدنی را ممکن می‌سازد (Zura et al., 2017).

با افزایش آسیب‌های استخوانی، نیاز به روش‌های ترمیمی مؤثرتر بیش از پیش احساس می‌شود. روش‌های سنتی مانند پیوند استخوان با

ایمپلنت با استخوان میزبان گردیده است. به همین دلیل، این ماده در سال های اخیر به طور گسترده در حوزه های ارتوپدی، دندانپزشکی (ایمپلنت، جراحی فک و صورت) و حتی جراحی های ترمیمی پیشرفته مورد استفاده و مطالعه قرار گرفته است (Lee et al., 2020).

با توجه به این مزایای ساختاری و زیستی، انجام ارزیابی های کلینیکی و آزمایشگاهی (اعم از رادیوگرافی، میکروسکوپی و مولکولی) جهت بررسی کارایی نانوکلسیم فسفات دو فازی در مدل های حیوانی از جمله خرگوش، اهمیت ویژه ای پیدا می کند. استفاده از روش های تصویربرداری رادیوگرافیک، ارزیابی دینامیک فرآیند ترمیم استخوان و میزان القا و هدایت استخوان سازی توسط BCP را به صورت غیر تهاجمی و کمی (quantitative) ممکن می سازد؛ مسیری که می تواند ضمن شناسایی پارامترهای مؤثر بر بازسازی موفقیت آمیز، راهگشای توسعه درمان های نوین و ایمپلنت های زیستی در حوزه پزشکی ترمیمی باشد (Lee et al., 2021). از این رو هدف از انجام تحقیق حاضر، بررسی رادیوگرافی میزان القاء و هدایت استخوان سازی با استفاده از نانو کلسیم فسفات دو فازی در استخوان ران خرگوش بود.

BCP با ترکیب هوشمندانه HA (پایدار) و β -TCP (جذب شونده)، داربستی ایده آل برای ترمیم استخوان ایجاد می کند. ساختار نانویی آن با افزایش سطح تماس، چسبندگی و تکثیر سلولی را بهبود بخشیده و استخوان سازی را تسریع می کند. مطالعات نشان می دهند BCP نانویی نسبت به نمونه های تک فازی عملکرد بهتری در بازسازی استخوان دارد (Lee et al., 2023).

یکی دیگر از مزیت های قابل توجه BCP، همخوانی شیمیایی و ساختاری آن با مینرال های طبیعی استخوان می باشد که باعث کاهش احتمال واکنش های التهابی و ایمنولوژیک می شود (LeGeros et al, 2003). علاوه بر این، امکان مهندسی نرخ جذب و تجزیه BCP از طریق تنظیم نسبت دو فاز، شرایط استراتژیک هدایت رشد بافت جدید و تدریجی جایگزینی داربست با استخوان طبیعی را فراهم می کند، به طوری که فرآیند ریمودلینگ فیزیولوژیک بدون اختلال پیش می رود (Merli et al., 2018; Dahlin et al., 2015). مطالعات متعدد حیوانی و انسانی نیز نشان داده اند که استفاده از داربست های BCP، منجر به بهبود چشمگیر سرعت و کیفیت ترمیم محل نقص های استخوانی، افزایش عروق زایی، و بهبود ادغام زیستی (osseointegration)

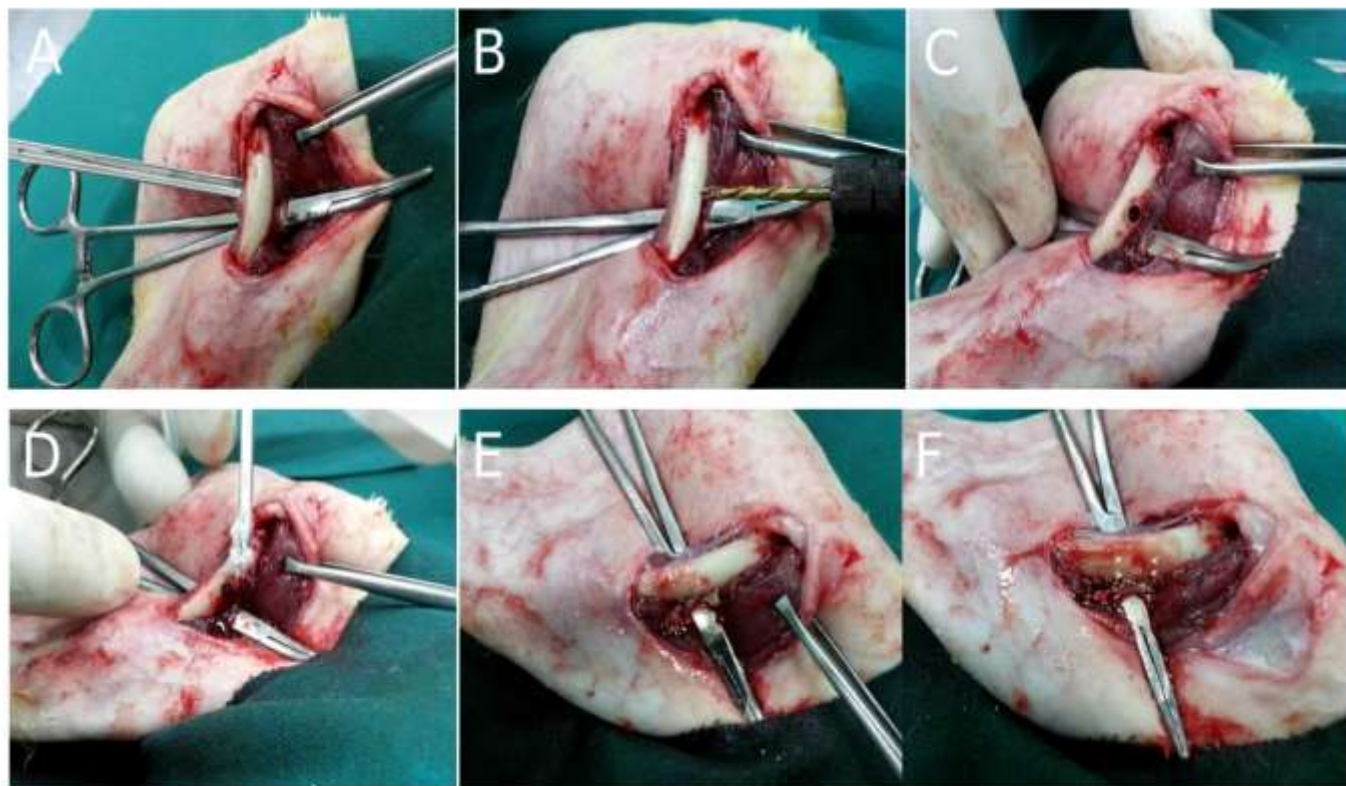
روش کار:

در این مطالعه، تعداد ۱۲ سر خرگوش ماده نژاد نیوزلندی با وزن متوسط ۱/۵ تا ۲ کیلوگرم انتخاب شدند. حیوانات در محیطی با شرایط یکنواخت نگهداری و با غذای پلت مخصوص خرگوش و هویج تازه تغذیه شدند (Mousavi & Rezaei, 2011; Mousavi et al., 2010). پیش از شروع جراحی، همه خرگوش‌ها به مدت یک هفته از نظر سلامت عمومی بررسی و پایدارسازی شده و ۸ ساعت پیش از عمل، حیوانات در حالت پرهیز آب و غذا قرار گرفتند. جهت القای بیهوشی عمومی، از تزریق عضلانی کتامین (50 mg/kg) و زایلازین (35 mg/kg) استفاده شد. ناحیه خلفی اندام حرکتی (از زانو تا لگن) به‌طور کامل تراشیده، ضدعفونی و شان گذاری گردید. سپس پای راست تحت برش پوستی حدوداً سه سانتی‌متر قرار گرفته و بافت‌های زیرجلدی و عضلات کنار زده شد تا استخوان ران آشکار گردد. جهت ایجاد نقیصه استخوانی، با استفاده از دریل و مته ارتوپدی (ابتدا قطر ۲ میلی‌متر، سپس افزایش تا ۵ میلی‌متر)، سوراخی در دیافیز قدامی استخوان ران (تا رسیدن به کانال میانی) ایجاد شد. موضع جراحی با نرمال سالین شستشو داده شده و خرده‌های استخوانی خارج گردید. سپس سوراخ پای راست (گروه آزمایش)، با گرانول نانوکلسیم فسفات دوفازی

مرطوب شده با سرم فیزیولوژی (کاملاً پر شده و نهایتاً عضلات و پوست به‌ترتیب با نخ ویکریل ۴-۰ و نایلون ۳-۰ بخیه شدند. در پای مقابل نیز (چپ) تمامی مراحل مشابه اجرا شد. با این تفاوت که گرافتی کاشته نشده و سوراخ خالی به‌عنوان گروه شاهد تلقی گردید. (تصویر ۱) پس از پایان جراحی، محل عمل ضدعفونی و خرگوش‌ها تا خروج کامل از بیهوشی در اتاقی کم‌نور و گرم تحت مراقبت ویژه قرار گرفتند (Mousavi et al., 2010). به منظور پیشگیری از عفونت، آنتی بیوتیک تریمتوپریم-سولفادiazین به مدت پنج روز و اسپری آنتی‌بیوتیک موضعی نیز استفاده گردید.

تصویربرداری رادیوگرافیک و ارزیابی‌ها:

در روزهای صفر (روز جراحی)، ۱۵، ۳۰، ۴۵ و ۶۰ پس از عمل، به خرگوش‌ها داروی کتامین (۵۰ میلی‌گر/کیلوگرم) + زایلازین (۵ میلی‌گر/کیلوگرم) تزریق شده و سپس دو رادیوگراف متقاطع (Craniocaudal و Lateral) از هر دو پای آنها تهیه گردید. نهایتاً رادیوگراف‌ها بر اساس شاخص‌های کیفی و کمی استاندارد شامل میزان تشکیل کالوس، یکنواختی استخوان تازه و پرشدگی ناحیه نقص مورد ارزیابی قرار گرفتند (Sadi et al., 2011; Lane & Sandhu, 1987; Wulsten et al., 2011).



تصویر ۱: A: استخوان ران خرگوش - B: مته گذاری استخوان - C: سوراخ نیم میلی متری - D: پر نمودن سوراخ با گرانول مرطوب شده با سالین
E و F: پر شدن کامل سوراخ استخوان با نانو کلسیم فسفات دو فاز و هم سطح نمودن آن با پریوست استخوان

نتایج

ارزیابی کیفی رادیوگرافها

ارزیابی کیفی رادیوگرافها در پنج بازه زمانی
(روزهای صفر، ۱۵، ۳۰، ۴۵ و ۶۰ پس از

جراحی) انجام شد و شاخص هایی نظیر تشکیل
کالوس داخلی، کالوس خارجی، کالوس
بین کورتکسی، تحریک استخوان های مجاور،
میزان اپسیتی گرفت و پرشدگی نقیصه با کالوس
مورد بررسی قرار گرفت.

ترمیم می‌شد. این یافته‌ها در تصاویر رادیوگرافی ۲-۵ مستند شده‌اند.

تحلیل کمی رادیوگراف‌ها

تحلیل کمی بر مبنای سیستم نمره‌دهی استاندارد Lane & Sandhu (1987) صورت گرفت. در این ارزیابی، تشکیل استخوان جدید، ترمیم شکستگی و بازسازی ساختار استخوانی به صورت عددی بررسی شد. نتایج بیانگر آن بود که در تمامی مراحل ارزیابی، گروه آزمایش به شکل معناداری دارای نمرات بالاتر بازسازی استخوان نسبت به گروه شاهد بود. این تفاوت، به ویژه از روز ۳۰ به بعد محسوس‌تر شد و در روز ۶۰، حداکثر بازسازی استخوان در گروه آزمایش مشاهده گردید.

تحلیل آماری

جهت تحلیل داده‌های کمی و مقایسه بین دو گروه در روزهای مختلف، ابتدا آزمون کولموگروف-اسمیرنوف برای سنجش نرمال بودن توزیع داده‌ها اجرا شد. این آزمون نشان داد که توزیع داده‌ها نرمال نیست (سطح معناداری > 0.05)؛ بنابراین، برای مقایسه بین گروه‌ها از آزمون نان پارامتریک من-ویتنی استفاده شد. نتایج این آزمون نشان داد که مجموعاً بین دو گروه، تفاوت آماری معنادار وجود دارد ($P = 0.000$) که بر اثر مثبت و قابل توجه گرانون

در هر دو گروه آزمایش و شاهد، التهاب بافت نرم در روز صفر مشاهده گردید که به تدریج تا روز ۱۵ کاهش یافته و تا روز ۳۰ به طور کامل برطرف شد. در گروه آزمایش، تشکیل کالوس داخلی از روز ۱۵ به وضوح آغاز شد؛ در حالی که در گروه شاهد این فرایند با تأخیر و از روز ۳۰ شروع شد. تشکیل کالوس خارجی در هیچ‌یک از گروه‌ها طی مدت مطالعه رخ نداد. کالوس بین‌کورتکسی در گروه آزمایش از روز ۴۵ به صورت نسبی ظاهر گردید و تا روز ۶۰ در گروه شاهد نیز مشاهده شد.

تحریک استخوان‌های مجاور ناحیه نقیصه در گروه آزمایش از روز ۴۵ آغاز شد، اما در گروه شاهد تا روز ۶۰ به تأخیر افتاد. اپسیتی گرفت در گروه آزمایش از روز صفر نسبی بود و تا روز ۶۰ به حداکثر رسید؛ در حالی که در گروه شاهد، اپسیتی صرفاً از روز ۳۰ به طور اولیه دیده شد و تا پایان مطالعه کامل نگردید. پرشدگی نقیصه با کالوس در گروه آزمایش از روز ۱۵ شروع شد و در روز ۳۰ به طور دقیق قابل ارزیابی بود. در گروه شاهد این روند با تأخیر، از روز ۳۰ آغاز، و تا روز ۴۵ کامل‌تر گردید. تا روز ۶۰، شکل‌یابی کورتکس استخوان در گروه آزمایش تقریباً کامل شد، هرچند ناهمواری‌هایی در سطح آن باقی ماند که احتمالاً در دوره زمانی پس از روز ۶۰ نیز

نانوکلسیم فسفات دوفازی بر روند بازسازی استخوانی دلالت دارد.

در روزهای صفر، ۱۵ و ۳۰ تفاوت آماری معناداری مشاهده نشد ($P < 0.05$)، اما در روز ۴۵ تفاوت معنی دار ($P = 0.042$) با افزایش بازسازی در گروه آزمایش دیده شد. در روز ۶۰ نیز اختلاف معناداری، به نفع گروه آزمایش به ثبت رسید ($P = 0.047$)، که نشان دهنده اثربخشی بیشتر n-BCP در ترمیم استخوان است.

جمع بندی

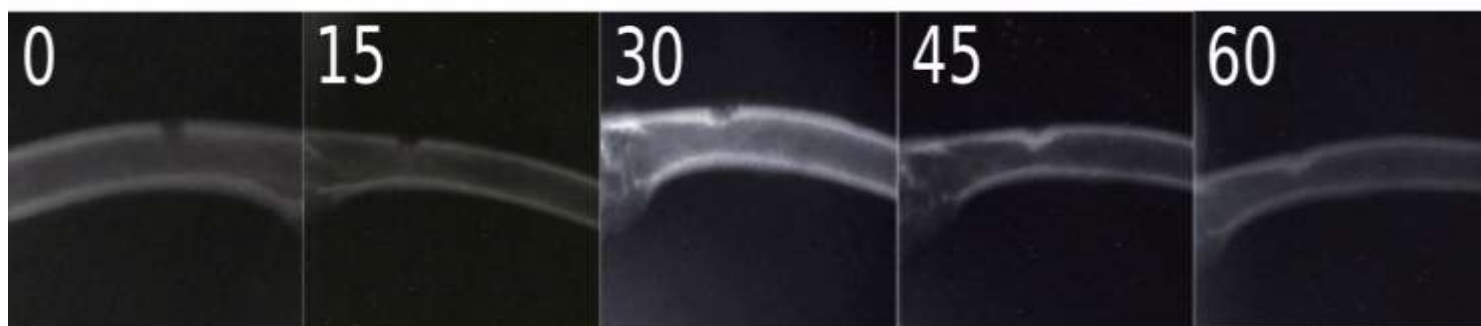
تحلیل های آماری این مطالعه نشان داد که روند ترمیم استخوان در گروه آزمایش از روز ۴۵ به بعد به طور معنی دار بهتر از گروه شاهد بوده است. این یافته ها تأکید می کنند که گرانول نانوکلسیم فسفات دوفازی موجب تسریع ترمیم، افزایش تشکیل کالوس و بهبود بازسازی استخوانی می شود.



تصویر ۲: حالت گماری کranیوکودال - گروه شاهد



تصویر ۳: حالت گماری کرانیو کودال - گروه



تصویر ۴: حالت گماری مدیولترال - گروه



تصویر ۵: حالت گماری مدیولترال - گروه آزمایش

بحث و نتیجه گیری:

از دهه ۱۹۷۰، یافتن جایگزین های مؤثر برای ترمیم استخوان به یکی از اهداف اصلی پژوهش های بیومواد و مهندسی بافت تبدیل شده است، به ویژه موادی که علاوه بر زیست سازگاری، قابلیت تسريع بازسازی استخوان را نیز داشته باشند (Zhao et al., 2021; Shamsoddin et al., 2019). در این راستا، کلسیم فسفات دوفازی (BCP) به دلیل ترکیب متعادل هیدروکسی آپاتیت (HA) و تری کلسیم فسفات (β -TCP)، در پر کردن نقص های استخوانی و القای استخوان سازی عملکرد مطلوبی داشته است. در پژوهش حاضر، از نوع پیشرفته تر این ماده یعنی نانو کلسیم فسفات دوفازی (n-BCP) که به صورت بومی تولید شده، استفاده

شد. ساختار نانویی n-BCP موجب افزایش سطح تماس با سلول ها و تنظیم بهتر ویژگی های فیزیکی شیمیایی شده و این امر تعامل مطلوب با سلول های استخوان ساز (استئوبلاست ها)، تحریک آن ها، تسريع معدنی شدن ماتریکس خارج سلولی و بازسازی مؤثر استخوان را تسهیل می کند. نتایج تحقیق حاضر نیز اثربخشی مطلوب این ماده در هدایت استخوان سازی را تأیید کرده که همسو با یافته های پیشین است؛ مطالعات پیش بالینی و بالینی نیز کارایی آن را در درمان نقص های اطراف ایمپلنت و زیست سازگاری آن را در مرورهای نظام مند تأیید کرده اند.

مطالعه Lee و همکاران (۲۰۲۳) اثربخشی بالینی و رادیوگرافی گرافت‌های مبتنی بر کلسیم فسفات دوفازی در درمان نقص‌های استخوانی اطراف ایمپلنت را بررسی کرد. نتایج نشان داد که این ماده موجب ترمیم مؤثر ناحیه نقص شده و در مقایسه با مواد رایج، کیفیت بازسازی استخوان، وضعیت بافت نرم و شاخص‌های کلینیکی و رادیوگرافی در سطح رضایت‌بخشی قرار دارد. همچنین، استفاده از BCP با عوارض بالینی کم و بهبود مناسب زخم همراه بود. این یافته‌ها با نتایج پژوهش حاضر همسوست؛ چرا که در هر دو مطالعه، داربست‌های BCP بستر مناسبی برای فعالیت استئوبلاست‌ها و بهبود کمی و کیفی بازسازی استخوان فراهم کردند. این همسویی را می‌توان به ساختار فیزیکوشیمیایی خاص، زیست‌سازگاری بالا و توان القا و هدایت استخوان‌سازی این ماده نسبت داد که آن را به گزینه‌ای مؤثر و ایمن برای ترمیم ضایعات استخوانی تبدیل می‌کند. مطالعه

Arunjaroensuk و همکاران (۲۰۱۸) نشان داد که نانو کلسیم فسفات دوفازی با تسریع روند ترمیم نقص‌های استخوانی، تأثیر مثبتی بر بازسازی بافت دارد؛ یافته‌ای که با نتایج مطالعه حاضر هم‌راستا است. این همخوانی به خواص فیزیکوشیمیایی مطلوب n-BCP مانند وجود فازهای قابل جذب و پایدار، تخلخل مناسب و سطح ویژه بالا نسبت داده می‌شود که موجب تحریک مهاجرت و تمایز

سلول‌های استخوان‌ساز و در نهایت تشکیل استخوان جدید می‌گردد.

در مطالعه مشابهی، Lee و همکاران (۲۰۲۳) گزارش کردند که نانو کریستال‌های بیفازیک کلسیم فسفات متخلخل با ساختاری مشابه آپاتیت طبیعی، توانستند پاسخ‌های زیستی مطلوبی نظیر جذب پروتئین، تشکیل آپاتیت، و تمایز استئوژنیک را القا کنند. یافته‌های این پژوهش نیز با تحقیق حاضر مطابقت دارد و نقش کلیدی ساختار نانو کریستالی در ارتقای چسبندگی، تکثیر و تمایز سلولی و تشکیل ماتریکس استخوانی را نشان می‌دهد. چنین ساختاری، تخریب‌پذیری ماده، تشکیل آپاتیت و پتانسیل استئوژنیک را افزایش داده و عملکرد بازسازی استخوان را نسبت به فرم‌های غیرنانویی بهبود می‌بخشد. این نتایج بر اهمیت نانو ساختار در توسعه بیومتریال‌های استخوانی مؤثر تأکید دارند (Jung et al., 2021; Tanaka et al., 2020).

Kasai و همکاران (۲۰۲۳) نشان دادند که نانو هیدروکسی آپاتیت با افزایش بیان ژن‌های مرتبط با تمایز استئوبلاستی و استخوان‌سازی، به بهبود کمی و کیفی تشکیل استخوان در محل شکستگی کمک می‌کند؛ این یافته‌ها با نتایج مطالعه حاضر مطابقت دارد. در تحقیق فعلی، کاشت n-BCP در استخوان ران خرگوش باعث افزایش سرعت و کیفیت ترمیم، از جمله تسریع کالوس‌سازی داخلی و بین‌کورتکسی شد. به‌طور مشخص، کالوس داخلی از روز ۱۵ و کالوس بین‌کورتکسی از روز ۴۵ در گروه n-BCP مشاهده گردید، در حالی که گروه شاهد با تأخیر یا فقدان این پدیده مواجه بود. همچنین، شکل‌گیری پریوست جدید

در گروه n-BCP تا روز ۶۰ مشهود بود، در حالی که در گروه شاهد دیده نشد.

تسریع و بهینه کند (Jepsen et al., 2019; Yamada et al., 2018).

یافته‌های بافت‌شناسی و رادیوگرافی نیز نقش n-BCP را در هدایت استخوان‌سازی (osteoconduction) و تحریک القای استخوان‌سازی (osteoinduction) تأیید کردند. حضور اپسیتی گسترده و یکنواخت استخوان جدید و تحریک استخوان میزبان از جمله شواهد این عملکرد مطلوب بودند (Tumedei et al., 2019; Dahlin et al., 2015). افزایش بر این، n-BCP با برخورداری از خواص مکانیکی مناسب و اثرات ایمنی‌تعدیلی، با تحریک IL-10 و مهار TNF- α ، التهاب مزمن را کاهش داده و از طریق القای تغییر فنوتیپ ماکروفاژها از M1 به M2، محیطی بازسازی‌پذیر فراهم می‌آورد که منجر به بهبود فرآیند ترمیم استخوان می‌شود (Fukuba et al., 2021; Lee et al., 2020; LeGros et al., 2003).

در مطالعه‌ای مشابه، Boller و همکاران (۲۰۲۱) نشان دادند که نانو هیدروکسی‌آپاتیت موجب تسریع قابل‌توجه در استخوان‌سازی و ترمیم شکستگی‌های استخوان و غضروف در مدل موش صحرایی می‌شود و باعث بهبود کیفیت بازسازی و کاهش مدت زمان ترمیم می‌گردد؛ یافته‌هایی که با نتایج تحقیق حاضر هم‌راستا هستند. از منظر مکانیزم، ترمیم شکستگی‌ها معمولاً از طریق استخوان‌سازی درون‌غشایی و بازسازی تدریجی ناحیه آسیب‌دیده انجام می‌شود. با این حال، شواهد موجود و یافته‌های این مطالعه تأیید می‌کنند که استفاده از نانوذرات هیدروکسی‌آپاتیت می‌تواند این فرآیند را به‌طور مؤثری

همچنین، Jung و همکاران (۲۰۲۱) و Lee و همکاران (۲۰۲۱) در مطالعات خود با استفاده از نانوکلسیم فسفات دوفازی گزارش کردند که این ماده نه تنها موجب تسریع استخوان‌سازی می‌شود، بلکه در مقایسه با سایر ترکیبات مشابه، عوارض جانبی کمتری نیز دارد؛ یافته‌ای که با نتایج مطالعه حاضر تطابق دارد (Jung et al., 2021; Lee et al., 2021).

مطالعه Mohd Zaffarin و همکاران (۲۰۲۱) نشان داد که نانو هیدروکسی‌آپاتیت با ایجاد محیطی مناسب برای رشد سلول‌های استخوان‌ساز، حتی در مدل‌های حیوانی با نقایص بحرانی، شکستگی‌های باز یا آلوده، توان ترمیم ساختاری و عملکردی قابل‌توجهی دارد. این یافته‌ها با نتایج مطالعه حاضر هم‌راستا بوده و بر اهمیت کاربرد فناوری نانو در ارتقای درمان‌های استخوانی تأکید دارند (Merli et al., 2018).

داربست‌های مصنوعی امروزه بخش مهمی از مهندسی بافت استخوان به‌شمار می‌آیند و باید ویژگی‌هایی نظیر زیست‌سازگاری، تجزیه‌پذیری کنترل‌شده، رسانایی و القای استخوان، ساختار متخلخل مناسب، و خواص مکانیکی مشابه استخوان طبیعی را داشته باشند (Lee et al., 2022; Jung et al., 2021; Rh et al., 2018; Naenni et al., 2017; Yuan et al., 2006).

مطالعات پیشین بیان کرده‌اند که افزودن nBCP به داربست‌های پلیمری موجب بهبود بازسازی بافت استخوانی از طریق شبیه‌سازی ساختار استخوان طبیعی

در تسريع و بهبود ترميم استخوان دارد. به‌ويژه در قالب داربست‌هاى زيستى، اين ماده با القاي فرآيندهاى بازسازى و تسهيل تشكيل استخوان جديد، گزينه‌اى مؤثر و ايمن در درمان نقيصه‌هاى استخوانى محسوب مى‌شود. با توجه به نتايج، پيشنهاد مى‌شود كه در مطالعات آينده، عملكرد n-BCP در مدل‌هاى حيوانى بزرگ‌تر با بهره‌گيرى از روش‌هاى دقيق‌ترى چون آناليزهاى مولكولى و ايمونوهيستوشيمى بررسى شود.

مى‌شود (Mondal et al., 2018; Zhang et al., 2010). در حالى كه برخى پژوهش‌ها اثر مثبت nBCP بر تمايز استخوانى را تأييد كرده‌اند (Chu et al., 2015; Curtin et al., 2017)، برخى ديگر نيز نشان داده‌اند كه اين ماده ممكن است در شرايط خاص، تمايز غضروفى را نيز تحريك كند (Hu et al., 2021; Jia et al., 2021). با اين حال، مسيرهاى دقيق مولكولى اين تفاوت‌ها هنوز نيازمند بررسى بيشتر است.

بر اساس شواهد موجود و يافته‌هاى مطالعه حاضر، مى‌توان نتيجه گرفت كه nBCP تأثير مثبت و معنادارى

REFERENCES:

- Ansari, M. Bone tissue regeneration: biology, strategies and interface studies. *Progress in biomaterials*, 2019, 8(4), 223-237.
- Arunjaroensuk S, Panmekiate S, Pimkhaokham A. The stability of augmented bone between two different membranes used for guided bone regeneration simultaneous with dental implant placement in the esthetic zone. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2018;33:206–216. doi: 10.11607/jomi.5492.
- Boller LA, Shiels SM, Florian DC, Peck SH, Schoenecker JG, Duvall C, Wenke JC, Guelcher SA. Effects of nanocrystalline hydroxyapatite concentration and skeletal site on bone and cartilage formation in rats. *Acta Biomater*. 2021 Aug;130:485-496.
- Chu W., Huang Y., Yang C., Liao Y., Zhang X., Yan M., Cui S., Zhao C. Calcium phosphate nanoparticles functionalized with alendronate-conjugated polyethylene glycol (PEG) for the treatment of bone metastasis. *Int. J. Pharm*. 2017;516:352–363.
- Curtin C.M., Tierney E.G., McSorley K., Cryan S.A., Duffy G.P., O'Brien F.J. Combinatorial gene therapy accelerates bone regeneration: Non-viral dual delivery of VEGF and BMP2 in a collagen-nanohydroxyapatite scaffold. *Adv. Healthc. Mater*. 2015;4:223–227.
- Dahlin C, Obrecht M, Dard M, Donos N. Bone tissue modelling and remodelling following guided bone regeneration in combination with biphasic calcium phosphate materials presenting different microporosity. *Clin Oral Implants Res*. 2015;26:814–822. doi: 10.1111/clr.12361.
- Fukuba S, Okada M, Nohara K, Iwata T. Alloplastic bone substitutes for periodontal and bone regeneration in dentistry: current status and prospects. *Materials (Basel)* 2021;14:1096. doi: 10.3390/ma14051096.
- Hu Z., Tang Q., Yan D., Zheng G., Gu M., Luo Z., Mao C., Qian Z., Ni W., Shen L. A multi-functionalized calcitriol sustainable delivery system for promoting osteoporotic bone regeneration both in vitro and in vivo. *Appl. Mater. Today*. 2021;22:100906.
- Jepsen S, Schwarz F, Cordaro L, Derks J, Hämmerle CH, Heitz-Mayfield LJ, et al. Regeneration of alveolar ridge defects. Consensus report of group 4 of the 15th European

Workshop on Periodontology on Bone Regeneration. *J Clin Periodontol*. 2019;46(Suppl 21):277–286. doi: 10.1111/jcpe.13121.

Jia S., Liu Y., Ma Z., Liu C., Chai J., Li Z., Song W., Hu K. A novel vertical aligned mesoporous silica coated nanohydroxyapatite particle as efficient dexamethasone carrier for potential application in osteogenesis. *Biomed. Mater*. 2021;16:035030.

Jung EH, Jeong SN, Lee JH. Augmentation stability and early wound healing outcomes of guided bone regeneration in peri-implant dehiscence defects with L- and I-shaped soft block bone substitutes: a clinical and radiographic study. *Clin Oral Implants Res*. 2021;32:1308–1317. doi: 10.1111/clr.13830.

Kasai H, Bergamo ET, Balderrama ÍD, Imamura K, Witek L, Jalkh EB, Bonfante EA, Inoue K, Coelho PG, Yamano S. The effect of nano hydroxyapatite coating implant surfaces on gene expression and osseointegration. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2023 Nov 22:26303.

Lane, J. M., & Sandhu, H. S. (1987). Current approaches to experimental bone grafting. *Orthopedic Clinics of North America*, 18(2), 213-225.

Lee JH, An HW, Im JS, Kim WJ, Lee DW, Yun JH. Evaluation of the clinical and radiographic effectiveness of treating peri-implant bone defects with a new biphasic calcium phosphate bone graft: a prospective, multicenter randomized controlled trial. *J Periodontal Implant Sci*. 2023 Aug;53(4):306-317. doi: 10.5051/jpis.2300640032. Epub 2023 Jun 9. Erratum in: *J Periodontal Implant Sci*. 2024 Jun;54(3):205. doi: 10.5051/jpis.2423032err01. PMID: 37524378; PMCID: PMC10465810.

Lee JH, Jung EH, Jeong SN. Augmentation stability of guided bone regeneration for peri-implant dehiscence defects with l-shaped porcine-derived block bone substitute. *Materials (Basel)* 2021;14:6580. doi: 10.3390/ma14216580.

Lee JH, Jung EH, Jeong SN. Profilometric, volumetric, and esthetic analysis of guided bone regeneration with L-shaped collagenated bone substitute and connective tissue graft in the maxillary esthetic zone: a case series with 1-year observational study. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2022;24:655–663. doi: 10.1111/cid.13116.

Lee JT, Lee Y, Lee D, Choi Y, Park J, Kim S. Evaluation of the mechanical properties and clinical efficacy of biphasic calcium phosphate-added collagen membrane in ridge preservation. *J Periodontal Implant Sci*. 2020;50:238–250. doi: 10.5051/jpis.2001080054.

- LeGeros RZ, Lin S, Rohanizadeh R, Mijares D, LeGeros JP. Biphasic calcium phosphate bioceramics: preparation, properties and applications. *J Mater Sci Mater Med*. 2003;14:201–209. doi: 10.1023/a:1022872421333.
- Merli M, Moscatelli M, Mariotti G, Pagliaro U, Raffaelli E, Nieri M. Comparing membranes and bone substitutes in a one-stage procedure for horizontal bone augmentation. Three-year post-loading results of a double-blind randomised controlled trial. *Eur J Oral Implantology*. 2018;11:441–452.
- Mohd Zaffarin, A. S., Ng, S. F., Ng, M. H., Hassan, H., & Alias, E. (2021). Nano-Hydroxyapatite as a Delivery System for Promoting Bone Regeneration In Vivo: A Systematic Review. *Nanomaterials*, 11(10), 2569.
- Mondal S., Dorozhkin S.V., Pal U. Recent progress on fabrication and drug delivery applications of nanostructured hydroxyapatite. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol*. 2018;10:e1504.
- Mousavi, Gh., Sharifi, D., Mohajeri, D., Rezaie, A., Mortazavi, P., Soroori, S. and Hesarakhi, S. (2010): Effect of Calcium Phosphate Bone Cement and Type I Collagen Mixture on Healing of Segmental Bone Defect in Rabbit Radius. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 4(10): 5144-5153.
- Mousavi, Gh. and Rezaie, A. (2011): Biomechanical Effects of Calcium Phosphate Bone Cement and Bone Matrix Gelatin Mixture on Healing of Bone Defect in Rabbits. *World Applied Sciences Journal*, 13(9): 2042-2046.
- Naenni N, Schneider D, Jung RE, Hüsler J, Hämmerle CH, Thoma DS. Randomized clinical study assessing two membranes for guided bone regeneration of peri-implant bone defects: clinical and histological outcomes at 6 months. *Clin Oral Implants Res*. 2017;28:1309–1317. doi: 10.1111/clr.12977.
- Rh Owen G, Dard M, Larjava H. Hydroxyapatite/beta-tricalcium phosphate biphasic ceramics as regenerative material for the repair of complex bone defects. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2018;106:2493–2512. doi: 10.1002/jbm.b.34049.
- Sadi, F., Rahimzadeh, R., Amiri, A. K., Veshkini, A., & Sharifi, D. (2011). Radiological Study of Cartilage Graft in Repair of Experimentally Radial Bone Defect in Rabbit.

Shamsoddin E, Houshmand B, Golabgiran M. Biomaterial selection for bone augmentation in implant dentistry: a systematic review. *J Adv Pharm Technol Res.* 2019;10:46–50. doi: 10.4103/japtr.JAPTR_327_18.

Tanaka K, Botticelli D, Canullo L, Baba S, Xavier SP. New bone ingrowth into β -TCP/HA graft activated with argon plasma: a histomorphometric study on sinus lifting in rabbits. *Int J Implant Dent.* 2020;6:36. doi: 10.1186/s40729-020-00236-4.

Wulsten, D., Glatt, V., Ellinghaus, A., Schmidt-Bleek, K., Petersen, A., Schell, H., ... & Duda, G. N. (2011). Time kinetics of bone defect healing in response to BMP-2 and GDF-5 characterised by in vivo biomechanics. *Eur Cell Mater*, 21(2), 177-192.

Yamada M, Egusa H. Current bone substitutes for implant dentistry. *J Prosthodont Res.* 2018;62:152–161. doi: 10.1016/j.jpor.2017.08.010.

Yuan H, van Blitterswijk CA, de Groot K, de Bruijn JD. Cross-species comparison of ectopic bone formation in biphasic calcium phosphate (BCP) and hydroxyapatite (HA) scaffolds. *Tissue Eng.* 2006;12:1607–1615. doi: 10.1089/ten.2006.12.1607.

Zhang J.C., Lu H.Y., Lv G.Y., Mo A.C., Yan Y.G., Huang C. The repair of critical-size defects with porous hydroxyapatite/polyamide nanocomposite: An experimental study in rabbit mandibles. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* 2010;39:469–477.

Zhao R, Yang R, Cooper PR, Khurshid Z, Shavandi A, Ratnayake J. Bone grafts and substitutes in dentistry: a review of current trends and developments. *Molecules.* 2021;26:3007. doi: 10.3390/molecules26103007.

Radiographic Evaluation of the Osteoinductive and Osteoconductive Potential of Biphasic Nano-Calcium Phosphate in Rabbit Femoral Bone

Pejman Nazem Zomorodi^{1*}, Shahin Gulmuhammadi², Khashayar Moarefian²

1- Department of Veterinary sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Sanandaj Branch, Islamic Azad University (IAU), Sanandaj, Iran.

2- Doctoral Student of Veterinary Medicine, Department of Veterinary Basic sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Sanandaj Branch, Islamic Azad University (IAU), Sanandaj, Iran.

Email: P_ZOMORODI@iausdj.ac.ir

Abstract:

Background and Purpose: Bone defects, particularly in cancellous bone, represent a major therapeutic challenge in skeletal lesions for both human and veterinary medicine. Developing effective strategies to accelerate and enhance the quality of bone repair is of paramount importance. This study aimed to investigate the osteoinductive and osteoconductive effects of biphasic calcium phosphate (BCP) nanoscaffold in femoral bone defects of rabbits.

Materials and Methods: In this experimental study, 12 female New Zealand white rabbits were selected. A 5-mm diameter cortical defect was created in the anterior diaphysis of both femurs. The left femoral defects were filled with BCP nanogranules (treatment group), while the right femoral defects remained unfilled (control group). Radiographic evaluations were performed at days 0, 15, 30, 45, and 60 post-surgery. Qualitative and quantitative analyses were conducted using the Lane-Sandhu scoring system.

Results: Callus formation and defect filling occurred earlier and more extensively in the treatment group compared to controls. Statistical analyses revealed significant differences in bone healing between groups at days 45 and 60 post-operation ($p < 0.05$).

Conclusion: The findings demonstrate that biphasic calcium phosphate nanoscaffold provides a suitable matrix for osteogenic cell activity, significantly accelerating bone repair. These results suggest BCP as an effective scaffold for bone tissue regeneration in skeletal defects.

Keywords: Biphasic calcium phosphate, Osteogenesis, Radiography, Bone defect, Rabbit