مقایسه اثر بیوایمپلنت استخوانی زنوژن و گرانول کلسیم فسفات در التیام نقیصه تجربی ایجاد شده در استخوان فمور خرگوش

غفور موسوی[1*]، داریوش مهاجری[2]، فرهاد صادق‌پور گلزار[3]

۱. دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تبریز، دانشکده دامپزشکی، گروه علوم درمانگاهی، تبریز، ایران
۲. دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تبریز، دانشکده دامپزشکی، گروه پاتوبیولوژی، تبریز، ایران
۳. دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تبریز، دانشکده دامپزشکی، دانش آموخته دامپزشکی، تبریز، ایران
* نویسنده مسئول مکاتبات: gh_mousavi@iaut.ac.ir

(دریافت مقاله: ۹۱/٤/۷، پذیرش نهایی: ۹۱/٦/۱۵)

چکیده

بازسازی و ترمیم استخوان از دست رفته، خواه ناشی از علل فیزیولوژیک و خواه به سبب عوامل پاتولوژیک یکی از انگیزه‌های جراحان از زمان‌های دور بوده است. خاصیت القای استخوان سازی استخوان دکلسیفیه شده ناشی از فاکتورهای رشد موجود در آن است. هدف از انجام این مطالعه مقایسه هیستوپاتولوژی اثر پیوند استخوانی دکلسیفیه خشک شده زنوژن و گرانول کلسیم فسفات در التیام نقیصه ایجاد شده در استخوان فمور خرگوش می‌باشد. این مطالعه تجربی آزمایشگاهی روی ۱۵ سر خرگوش سفید نیوزلندی انجام شد. خرگوش‌ها به صورت تصادفی به ۳ گروه (تیمارها و شاهد) تقسیم شدند. پس از القای بیهوشی عمومی با استفاده از مته دندانپزشکی دو سوراخ به قطر ۲ میلی‌متر در عرض استخوان فمور تا رسیدن به کانال مدولاری ایجاد شد. در گروه شاهد محل نقیصه به صورت خالی رها شد و در گروه دوم استخوان دکلسیفیه شده قرار داده شد و در گروه سوم گرانول کلسیم فسفات در محل نقیصه قرار داده شد. ٤٥ روز پس از جراحی، خرگوش‌ها آسان‌کشی شده و مقاطع هیستوپاتولوژیک از محل نقیصه ایجاد شده تهیه و رنگ آمیزی هماتوکسیلین- ائوزین انجام گردید و مورد ارزیابی هیستوپاتولوژی و هیستومورفومتری قرار گرفت. در گروه شاهد محل نقیصه توسط استخوان نابالغ به همراه فضاهایی از مغز استخوان پر شده بود و استخوان‌سازی ضعیفی در محل نقیصه قابل مشاهده بود. در گروه آزمایش گرانول کلسیم فسفات، مقادیر فراوانی از ترابکول‌های استخوانی جوان شکل گرفته بود که به صورت سازمان یافته به نظر می‌رسید. نتایج ارزیابی هیستومورفومتری نشان داد که گرانول کلسیم فسفات دارای تاثیر معنی‌داری در التیام استخوان نسبت به گروه استخوان دکلسیفیه و گروه شاهد می‌باشد.

مجله دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز، ۱۳۹۱، دوره ٦، شماره ۱، پیاپی ۲۱، صفحات: ۱٤۹۲-۱٤۸۳.

کلید واژه‌ها: استخوان دکلسیفیه زنوژن، گرانول کلسیم فسفات، التیام استخوان، خرگوش، هیستوپاتولوژی

مقدمه

با وجود پیشرفت‌های فراوانی که امروزه در جراحی ارتوپدی ایجاد شده است ولی التیام استخوان کماکان یک مسئله چالش برانگیز می‌باشد. روش‌های درمانی که به طور رایج در شکستگی‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد، شامل تثبیت خارجی از طریق بی‌حرکت نمودن استخوان شکسته و یا تثبیت داخلی استخوان شکسته می‌باشد. با وجود این، روش‌های مذکور در مواردی مانند عدم جوش خوردگی و جوش خوردگی تأخیری، شکستگی‌های خرد شده، آماس‌های مغز استخوان و تومورهای

استخوانی همیشه موفق نبوده‌اند (١٦). در التیام استخوان، سلول-های تولید کننده استخوان نیاز به یک ماده زمینه‌ای استخوانی برای رشد، اضافه شدن و ملحق شدن به مواد معدنی و پروتئین-های استخوان دارند. در روند طبیعی التیام شکستگی استخوان، لخته‌های خون و بافت پیوندی، فضای ایجاد شده توسط شکستگی را پر می‌کند و همچنین ساختار و داربست مناسبی برای رشد استخوان فراهم می‌کند (١٧). پیوند استخوان اسفنجی معمولا از بخش لگن بیمار برداشت شده و به محل مورد نظر منتقل می‌شود، با این حال پیوند استخوان اسفنجی می‌تواند دارای عوارضی مانند خونریزی، بی‌حسی، آسیب به دستگاه ادراری، فتق، دردهای مزمن، عفونت‌ها، شکستگی‌های ناحیه‌ای، عدم تعادل در ناحیه لگن و... باشد (٥ و ١٢). به منظور رفع این محدودیت‌ها امروزه از انواع گوناگون مواد جایگزین شونده گرافت‌های استخوانی که به طور مصنوعی یا به صورت آلوژن تهیه می‌گردند استفاده می‌شود. این دسته از مواد یا از خاصیت القای استخوان‌سازی (استئواینداکتیویتی) برخوردار بوده و یا به صورت انتقال‌دهنده عوامل استخوان‌ساز (استئوکانداکتیو) به عنوان حاملی جهت انتقال پروتئین‌های هدایت‌کننده استخوان عمل می‌کنند (١٦، ١٧ و ١٩). در سال‌های اخیر با پیشرفت استفاده از بیومتریال‌ها به عنوان جایگزین‌های استخوانی، ترکیبات کلسیم فسفات دور نمای خوبی را در روش‌های جراحی پیشرفته تثبیت نموده‌اند (٦ و ٢١). شکل‌های مختلفی از ترکیبات کلسیم فسفات قابل عرضه می‌باشند. مطالعه‌های مختلف نشان داده است که ترکیبات کلسیم فسفات دارای خاصیت زیست سازگاری با بدن بوده و به عنوان یک عامل استئوکانداکتیو بازسازی بافتی استخوان را تحریک می‌کنند (١، ١١ و ١٨). مطالعات حیوانی متعددی نشان دادند که دمینرالیزه کردن پیوند آلوژن استخوان کورتیکال، موجب اکسپوز شدن پروتئین‌های مرفوژنیک استخوانی (BMPs) و در نتیجه افزایش پتانسیل استئوژنیک آن می‌شود زیرا BMPs توانایی القاء تمایز سلول‌های میزبان به استئوبلاست را دارا می‌باشند (١٣). بررسی‌های انجام شده توسط Urist و همکارانش حکایت از پتانسیل استئوژنیک استخوان دکلسیفیه خشک شده آلوژن را دارد، که در نتیجه اکسپوز شدن پروتئین‌های مرفوژنیک استخوانی است که باعث القاء تمایز سلول‌های میزبان به استئوبلاست می‌شوند (٢٣). انجام این مطالعات نشان می‌دهد که از استخوان دکلسیفیه شده می‌توان به عنوان یک ماده پیوندی استفاده کرد. هدف از انجام این مطالعه ارزیابی مقایسه‌ای پیوند گرانول کلسیم فسفات و پیوند استخوان دکلسیفیه خشک شده که اخیراً داخل کشور تولید شده و در این مطالعه به صورت زنوژن مورد استفاده قرار گرفته است در التیام نقیصه ایجاد شده استخوان فمور در مدل حیوانی خرگوش می‌باشد که به صورت ارزیابی هیستوپاتولوژی و هیستومورفومتری صورت گرفته است.

مواد و روش‌ها

مطالعه حاضر به صورت تجربی آزمایشگاهی انجام گرفت. از ١٥ سر خرگوش نر سفید نیوزلندی ٦ ماهه، با وزن ٣ـ٢/٥ کیلوگرم استفاده شد. خرگوش‌ها از مرکز پرورش حیوانات آزمایشگاهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی تبریز تهیه گردید و به صورت ١٢ ساعت روشنایی و ١٢ ساعت تاریکی و درجه حرارت ٢±٢٣ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی هفتاد درصد نگهداری می‌گردیدند. هر خرگوش طی دوره آزمایش، در یک قفس انفرادی تمیز با دسترسی آزاد به آب و خوراک مخصوص حیوانات آزمایشگاهی نگهداری شدند. پروتکل این مطالعه مطابق اصول اخلاقی مورد تائید کمیته‌های بین‌المللی حمایت از حقوق حیوانات آزمایشگاهی طراحی شده است. خرگوش‌ها به صورت تصادفی به ٣ گروه کنترل (گروه شاهد)، گروه دوم (گروه استخوان دکلسیفیه) و گروه سوم (گروه گرانول کلسیم فسفات)، با ٥ سر خرگوش تقسیم شدند.

بیوایمپلنت استخوان دکلسیفیه خشک شده:

بیوایمپلنت مورد استفاده در این مطالعه ساخت داخل کشور و توسط شرکت همانندساز بافت تولید و با نام تجاری Ceno bone به بازار عرضه شده است. این محصول به صورت کاملاً

استریل تهیه و در یک ویال استریل بسته‌بندی شده و تا زمان تاریخ انقضای مندرج روی بسته در دمای معمولی محیط (١٥ تا ٢٥ درجه سانتیگراد) قابل نگه‌داری می‌باشد.

گرانول کلسیم فسفات:

گرانول کلسیم فسفات مورد استفاده در این مطالعه ساخت شرکت Kasios TCH فرانسه می‌باشد و به صورت بیوفازیک تهیه و دارای پایه تری‌کلسیم‌فسفات و هیدروکسی آپاتیت می‌باشد. ترکیبات مورد استفاده در ساخت این محصول به صورت زیر می‌باشد:

75% hydroxylapatite ± 5% $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$
25% tricalcium phosphate ± 5%$Ca_3(PO_4)_2$

گرانول‌های مورد استفاده اندازه‌ای به طول ٢ الی ٣ میلی‌متر را دارا بوده و به صورت بلوک‌های مربع تهیه گردیده‌اند. این گرانول‌ها دارای تخلخل ٧٠٪ می‌باشند که اندازه هر یک از این تخلخل‌ها ٢٠٠ الی ٥٠٠ میکرومتر می‌باشد و مطابق بروشور کارخانه سازنده دارای مقاومت ١ الی ٥ مگاپاسکال هستند.

روش جراحی:

به منظور ایجاد بیهوشی از کتامین (Ketamine 10%, Alfasan,Woerden-Holland) به میزان ٣٥ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن و زایلازین (Xylazin 2%, Alfasan,Woerden-Holland) به مقدار ٥ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن به صورت داخل وریدی از طریق ورید گوش استفاده شد. پس از ایجاد بیهوشی ناحیه ستیغ لگنی تا مفصل زانوی اندام حرکتی خلفی چپ به صورت معمول آماده جراحی گردید. برشی به طول ٣ سانتی‌متر روی پوست بخش جانبی اندام خلفی چپ در موازات استخوان فمور ایجاد گردید. فاسیا و بافت‌های همبندی زیرجلدی به صورت کُندکاری جدا و سپس عضلات ناحیه از محل اتصال آنها به همدیگر باز گردیدند و استخوان فمور در معرض دید قرار گرفت. با استفاده از مته دندانپزشکی و حداکثر سرعت چرخش ٦٠٠٠ دور در دقیقه، ٢ سوراخ به قطر ٣ میلی‌متر در عرض استخوان فمور در قسمت دیافیز تا رسیدن به کانال مدولاری و با فاصله یک سانتی‌متر از همدیگر ایجاد شد، موضع جراحی با نرمال سالین شستشو داده شد. پس از آن در گروه شاهد از هیچ ماده‌ای برای پرکردن نقیصه ایجاد شده، استفاده نگردید. در گروه دوم، تعدادی از قطعات استخوان دکلسیفیه خشک شده از ویال خارج و در داخل یک ظرف استریل در سالین نرمال قرار داده شد، پس از گذشت چند دقیقه استخوان‌های دکلسیفه نرم و حالت اسفنجی گرفته و سپس در محل نقیصه ایجاد شده، قرار داده شدند. در گروه سوم، گرانول کلسیم فسفات از ویال خارج و سپس در محل نقیصه ایجاد شده قرار داده شدند. سپس عضلات به صورت سرتاسری ساده با نخ بخیه قابل جذب سنتتیک پلی‌گلی-کولات ٠-٤ ساخت کارخانه سوپا بخیه زده شد و پوست با نخ بخیه سیلک ٣ صفر ساخت کارخانه سوپا به صورت سرتاسری ساده بخیه گردید و موضع عمل توسط بتادین ضدعفونی و از اسپری آنتی‌بیوتیک تتراسیکلین برای ضدعفونی محل جراحی استفاده شد و موضع عمل پانسمان گردید. بعد از به هوش آمدن کامل، خرگوش‌ها به قفس‌های مخصوص خود انتقال داده شدند و در اختیارشان آب و غذا قرار گرفت. جهت جلوگیری از عفونت‌های احتمالی روزانه ٦٠٠٠٠ واحد پنی‌سیلین G (شرکت داروسازی جابربن حیان) و ٥ میلی‌گرم جنتامایسین (شرکت داروسازی البرز دارو) به ازای هر کیلوگرم وزن بدن به صورت عضلانی به مدت ٥ روز تزریق شد و ٦ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن سلکوکسیب (سلکسیب، ١٠٠ میلی‌گرم، شرکت کارخانجات داروپخش) به صورت خوراکی به مدت ٥ روز خورانده شد.

ارزیابی هیستوپاتولوژی:

به منظور ارزیابی و مقایسه هیستوپاتولوژی ترمیم در محل نقیصه، در روز ٤٦ بعد از جراحی، خرگوش‌ها پس از ایجاد بیهوشی استنشاقی، با تزریق دز بالای تیوپنتال سدیم (٢٠ میلی‌گرم بر اساس کیلوگرم) به صورت داخل صفاقی آسان‌کشی شدند. سپس برش در پوست ایجاد شده، فاسیا و عضلات از روی کالوس استخوانی کنار زده شد. استخوان فمور جدا و در

محلول فرمالین بافر ۱۰ درصد قرار داده شد، همچنین استخوان فمور سالم اندام حرکتی مقابل نیز جهت ارزیابی هیستومورفومتری به منظور تعیین مقادیر نرمال استخوان سالم هر مورد جدا گردید و در داخل محلول فرمالین بافر ۱۰ درصد قرار داده شد. پس از پایدار شدن نمونه‌ها، کلسیم زدایی از بافت استخوان توسط محلول اسیدنیتریک ۱۰ درصد انجام گردید. از هر نمونه برش‌های پی‌درپی به ضخامت ۵ میکرومتر از محل نقیصه استخوانی تهیه شد. مقاطع تهیه شده به روش هماتوکسیلین ـ ائوزین رنگ‌آمیزی و با استفاده از میکروسکوپ نوری مدل نیکون (ECLIPSE E200, Japan) مورد مطالعه هیستوپاتولوژی قرار گرفتند.

ارزیابی هیستومورفومتری:

برای ارزیابی هیستومورفومتری توسط اندازه‌گیری خطی از طریق خطوط مشبک متقاطع و توسط یک عدسی چشمی مشبک، حاوی ۱۰۰ خانه مربعی، با تعیین درصدی از نقیصه استخوانی که توسط ۱) مغز استخوان، ۲) استخوان نابالغ و ۳) استخوان لاملار اشغال شده بود، صورت پذیرفت (۳). اجزای بافتی مذکور با بزرگنمایی ٤٠× و نشانگر ماوس، تعیین و مورد سنجش قرار گرفتند. مغز استخوان با سلول‌های چربی فراوان و بافت همبند با حضور تعداد فراوانی فیبروبلاست و رشته‌های کلاژن مشخص گردید. به منظور تعیین مقادیر نرمال استخوان لاملار، استخوان تیغه‌ای و مغز استخوان، قطعه استخوانی سالم اندام حرکتی مقابل نیز جدا و مورد ارزیابی هیستومورفومتری قرار گرفت. کلیه مراحل آزمایش (شامل تیمار، نمونه‌برداری و پاتولوژی) به صورت دوسو کور انجام گردید.

ارزیابی آماری

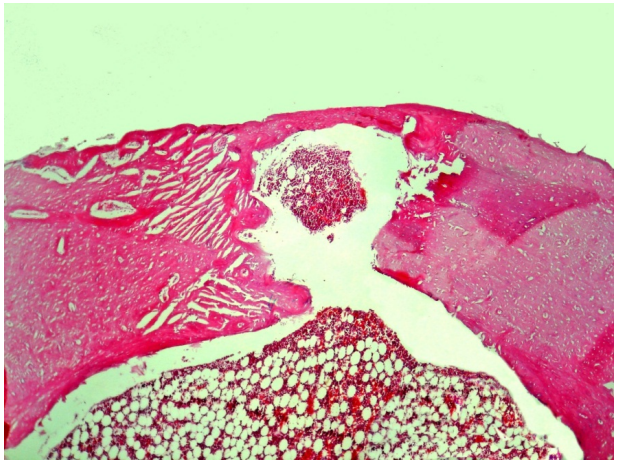
با توجه به نتایج آزمون همگونی واریانس‌ها و آزمون توزیع نرمال دادها (کولموگرواسمیرنوف) داده‌های به‌دست آمده کمّی، به صورت میانگین و انحراف استاندارد ارائه و اختلاف معنی‌دار بین گروه‌ها توسط آزمون آماری آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) و آزمون تعقیبی توکی (Tukey) و α=۰/۰۵، در سطح معنی‌داری p<۰/۰۵ توسط بسته نرم‌افزاری SPSS ویرایش ۱۸ برآورد گردید.

یافته‌ها

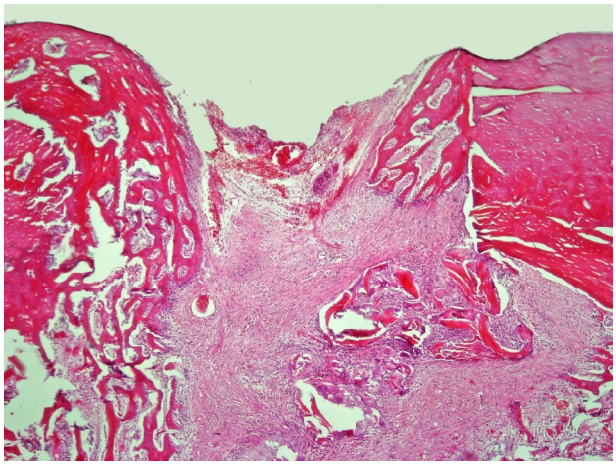
نتایج هیستوپاتولوژی:

ارزیابی نتایج هیستوپاتولوژی نقیصه ایجاد شده در قسمت میانی دیافیز استخوان فمور در گروه شاهد نشان‌دهنده آن است که نقیصه توسط پل نازکی از استخوان مسدود شده است. استخوان متراکم اولیه که به تازگی تشکیل شده حفره مغز استخوان را مسدود نموده است. ارزیابی‌های این گروه نشان می‌دهد که استخوان نابالغ به همراه فضاهای وسیعی از مغز استخوان در بین آنها در محل نقیصه تشکیل شده است، بافت استخوان نابالغ تازه تشکیل شده توسط استئوبلاست‌های فعال پوشانیده شده بود که حاکی از یک استخوان‌سازی فعال می‌باشد. این استئوبلاست‌ها اولین استخوان لاملایی (تیغه استخوانی) را بر اسپیکول از قبل تشکیل شده (استخوان نابالغ) تشکیل می‌دهند. در این موقع ترابکول حاوی مغزی از استخوان نابالغ بوده که توسط استخوان تیغه‌ای احاطه شده است. عدم تولید کافی ماتریکس آلی استخوانی و کلسیفیکاسیون آن مانع از ایجاد تراکم در توده استخوانی تازه تشکیل و در نهایت تشکیل استخوان متراکم شده است (نگاره ۱). نتایج به دست آمده از گروه پیوند استخوانی زنوگرافت در محل نقیصه استخوانی در قسمت میانی دیافیز فمور، لایه نسبتاً، ضخیمی از نسج گرانولاسیون نابالغ به همراه سلول‌های التهابی اشغال شده است. حفره مرکزی استخوان نیز توسط نسج گرانولاسیون نابالغ پر شده است. الگوی استخوان-سازی در این گروه به این صورت است که استخوان تیغه‌ای اولیه از کناره‌های نقیصه شروع شده است به سمت مرکز توسط نسج گرانولاسیون ادامه یافته است. حضور استخوان دکلسیفیه شده زنوژن در محل نقیصه باعث فعال‌تر شدن استئوکلاست‌ها در محل نقیصه شده است و حضور فعال استئوکلاست‌ها باعث بازجذب تیغه‌های استخوانی تازه تشکیل نیز شده است و این امر مانع گسترش استخوان‌های نوبنیاد گردیده است. نکته مهم در

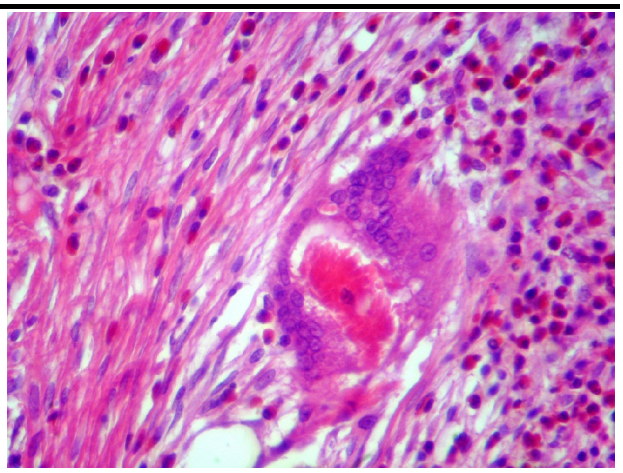
این گروه حضور فعال سلول‌های التهابی در نسج گرانولاسیون می‌باشد (نگاره‌های ٢ و ٣). ارزیابی نتایج به‌دست آمده از گروه گرانول کلسیم‌فسفات نشان می‌دهد که نقیصه ایجاد شده در قسمت میانی دیافیز استخوان فمور تقریبا توسط استخوان تازه تشکیل پر شده است. مشاهده مقدار زیادی استخوان تیغه‌ای در منطقه ترمیم حاکی از یک روند بازسازی در آن می‌باشد. مقدار استخوان نوبنیاد در این گروه نسبت به شاهد به طور قابل توجهی بیشتر می‌باشد. استخوان سازی فعال در این گروه به همراه کلسیفیکاسیون موجب تراکم در توده استخوانی تازه شده است. افزایش ریمودلینگ بافت استخوانی تازه تشکیل موجب تشکیل سیستم هاورس در این گروه شده است. همچنان فضاهای وسیع مغز استخوانی مابین بافت استخوانی مشاهده می‌شود. بررسی‌های مقاطع نشان می‌دهد که ٤٥ روز پس از جراحی مقادیری از گرانول کلسیم فسفات همچنان دیده می‌شود (نگاره ٤).



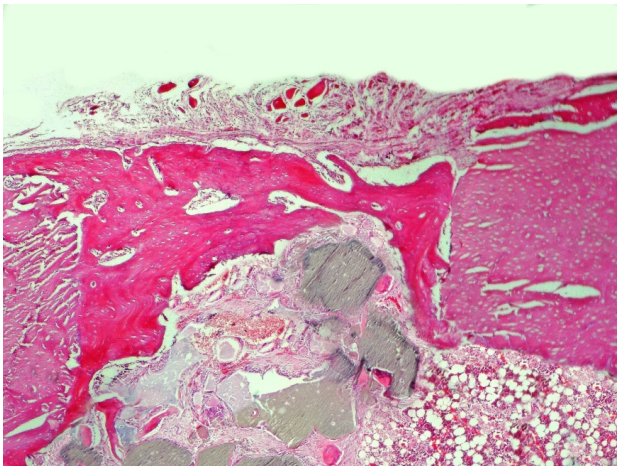
نگاره ١- نمای ریزبینی از جایگاه ترمیم نقیصه تجربی ایجاد شده در قسمت میانی دیافیز استخوان فمور در یک خرگوش از گروه شاهد. در سمت راست تصویر، نوار باریکی از استخوان متراکم اولیه تازه تشکیل، قسمت بیرونی نقیصه استخوانی را تا حدودی اشغال نموده و نقیصه و حفره مغز استخوان را مسدود نموده است. در سمت چپ تصویر اسپیکول‌های استخوان نابالغ تازه تشکیل با فضاهای خالی وسیع مابین آنها نقیصه را از یک سمت به مقدار قابل توجهی اشغال نموده است. عدم تولید کافی ماتریکس آلی استخوانی و کلسیفیکاسیون آن مانع از ایجاد تراکم در توده استخوانی تازه تشکیل و در نهایت تشکیل استخوان متراکم شده است (هماتوکسیلین-ائوزین، بزرگنمایی ٤٠).



نگاره ٢- نمای ریزبینی از جایگاه ترمیم نقیصه تجربی ایجاد شده در قسمت میانی دیافیز استخوان فمور در یک خرگوش از گروه پیوند استخوان دکلسیفیه زنوژن. قسمت بیرونی نقیصه توسط نسج گرانولاسیون نابالغ و مقداری از سلول‌های التهابی پلی مورف نوکلوئر اشغال شده و قسمت عمقی نقیصه و قسمت اعظمی از حفره مرکزی استخوان فمور توسط نسج گرانولاسیون نسبتاً بالغ پر شده است. استخوان‌سازی به صورت تشکیل استخوان تیغه‌ای اولیه از کناره‌های نقیصه و لبه‌های استخوان قدیمی در مجاور نسج گرانولاسیون رو به قسمت مرکزی حفره مرکزی استخوان فمور قابل مشاهده است. حضور استئوکلاست‌های فراوان با جذب شدید تیغه‌های استخوانی تازه تشکیل مانع از تشکیل و گسترش استخوان نوبنیاد در درون نسج گرانولاسیون گردیده است (هماتوکسیلین-ائوزین، بزرگنمایی ٤٠).



نگاره ٣- نمای ریزبینی با درشتنمایی بیشتر از جایگاه ترمیم نقیصه تجربی ایجاد شده در قسمت میانی دیافیز استخوان فمور در یک خرگوش از گروه پیوند استخوان دکلسیفیه زنوژن. سلول‌های التهابی پلی‌مورف نوکلوئر به مقدار فراوان در نسج گرانولاسیون قابل مشاهده بوده و بازجذب قطعه کوچکی از تیغه استخوانی تازه تشکیل توسط استئوکلاست‌های فعال مشاهده می‌گردد (هماتوکسیلین-ائوزین، بزرگنمایی ٤٠٠).



نگاره ٤- نمای ریزبینی از جایگاه ترمیم نقیصه تجربی ایجاد شده در قسمت میانی دیافیز استخوان فمور در یک خرگوش از گروه پیوند گرانول کلسیم-فسفات. نقیصه استخوانی تقریباً به میزان قابل توجهی توسط استخوان تازه تشکیل پر شده است و مقدار استخوان نوبنیاد نسبت به شاهد بیشتر می‌باشد. استخوان تازه تشکیل به دلیل تشکیل فعال استیئوئید و کلسیفیکاسیون آن بسیار اسیدوفیلیک می‌باشد. عدم پیوستگی و وجود شکاف بین سطوح مشترک استخوان تازه تشکیل و استخوان قدیمی برقرار می‌باشد. به هر حال، افزایش قابل توجهی در ریمودلینگ بافت استخوانی تازه تشکیل و توسعه سیستم‌های هاورسی در این نمونه مشخص می‌باشد. فضاهای وسیع مغز استخوانی در برخی مناطق بافت استخوانی تازه تشکیل همچنان مشاهده می‌گردد. در حفره مرکزی استخوان فمور، توده‌های سیمان استخوان بجا مانده که توسط بافت همبند پوشیده شده است، قابل مشاهده می‌باشد (هماتوکسیلین-ائوزین، بزرگنمایی ٤٠).

نتایج *هیستومورفومتری*

بررسی هیستومورفومتری انجام شده نشان‌دهنده آن است که استخوان لاملار شکل گرفته در گروه‌های آزمایش دوم و سوم به‌طور معنی‌داری بیشتر از گروه شاهد می‌باشد (p=٠/٠٠٠) و در مقایسه با مقادیر استخوان سالم به‌طور معنی‌داری کمتر می‌باشد (p=٠/٠٠٠). بیشترین مقدار استخوان لاملار شکل‌گرفته در بین گروه‌های مورد مطالعه، در گروه آزمایش سوم یا گروه گرانول کلسیم فسفات می‌باشد. مقدار استخوان نابالغ و مغز استخوان در گروه شاهد به‌طور معنی‌داری بیشتر از دو گروه دیگر می‌باشد (p=٠/٠٠٠). در مقایسه دو به دو مابین گروه‌های مورد مطالعه از لحاظ میزان تشکیل استخوان لاملار تفاوت معنی‌داری بین گروه استخوان دکلسیفیه و گروه شاهد وجود دارد همچنین مابین گروه گرانول کلسیم فسفات و گروه شاهد نیز تفاوت معنی‌دار می‌باشد (p=٠/٠٠٠) و در مقایسه دو به دوی مابین دو گروه آزمایش، تفاوت معنی‌داری بین گروه گرانول کلسیم فسفات و استخوان دکلسیفیه از لحاظ میزان تشکیل استخوان لاملار مشاهده می‌شود (p=٠/٠٠٠). نتایج ارزیابی هیستومورفومتری ترمیم و مقایسه آن مابین گروه‌های مورد آزمایش، در جدول ١ ارائه گردیده است.

جدول ١- مقایسه میانگین و انحراف استاندارد اجزای بافت استخوان جایگاه ترمیم بین گروه‌های مورد مطالعه

	استخوان سالم	گروه اول (شاهد)	گروه دوم	گروه سوم
استخوان لاملار	٩٥/١٤±١/٦٣^{a}	١٧/١٣±٢/٢١^{b}	٤٤/٣١±١/٣٥^{c}	٥٧/٦٣±٢/٤٣^{d}
استخوان نابالغ	٣/٢٨±١/٢٩^{a}	٤١/٢٣±١/٢١^{b}	٣٣/٢١±١/٢٣^{c}	٢٨/٢٤±١/٣٤^{d}
مغز استخوان	١/٥٨±٠/٥٣^{a}	٤١/٦٤±٢/٥٣^{b}	٢٢/٤٨±١/١٤^{c}	١٤/١٣±١/٢٤^{d}

a b c d: حروف غیر مشابه نشان‌دهنده معنی‌دار بودن اختلاف در هر ردیف می‌باشد. مقادیر استخوان لاملار شکل گرفته در گروه‌های آزمایش دوم و سوم بیشتر از گروه شاهد (p=٠/٠٠٠). تفاوت معنی‌داری بین دو گروه پیوند استخوان دکلسیفیه زنوژن و گرانول کلسیم فسفات از لحاظ میزان تشکیل استخوان لاملار مشاهده می‌شود (p=٠/٠٠٠).

بحث و نتیجه‌گیری

نتایج هیستوپاتولوژی به‌دست آمده در این مطالعه نشان می‌دهد در گروه شاهد که نقیصه استخوانی به صورت حفره‌ای خالی بود به دلیل عدم حضور ماده‌ای که حالت تحریک کننده رشد یا هدایت استخوانی را داشته باشد تبدیل بافت همبندی به استخوان و شکل‌گیری التیام از وسعت و شدت بالایی برخوردار نبود. با توجه به این الگوی التیامی در گروه شاهد بدین ترتیب است که مقدار زیادی لخته‌های فیبرینی و گلبول‌های قرمز ناحیه نقیصه را پر می‌کنند و بدنبال آن عروق کناری و بافت فیبروزه به داخل آنها نفوذ می‌کند. تشکیل استخوان جدید همراه با تشکیل عروق جدید از اطراف شروع و با پیشرفت به سمت مرکز آن را پر می‌کنند. در پایان دوره مطالعه، گروه شاهد دارای مقدار زیادی بافت همبند در ناحیه نقیصه بود، در حالی‌که مقدار بافت فیبروزه در گروه‌های مورد آزمایش به مقدار کمتری بود و به جای مقادیر زیادی بافت مزانشیم تمایز نیافته جوش‌خوردگی استخوان وجود داشت، و مقادیر مختلفی از استخوان دیده می‌شد که ناحیه نقیصه را پر کرده بود. با توجه به تحریک‌آمیز بودن مواد بکار رفته در بافت استخوانی و تسریع واکنش بافتی چنانچه از نتایج هیستوپاتولوژی بر می‌آید در گروه گرانول کلسیم فسفات، تیغه‌های استخوانی سازمان یافته و منظم‌تر نسبت به گروه شاهد تشکیل شده بودند و در مقایسه با گروه شاهد نقیصه ایجاد شده با سلول‌های استخوانی جدید پر شده و این امر مانع از تشکیل بافت فیبروز در محل نقیصه گردیده بود. ارزیابی نتایج هیستومورفومتری نشان می‌دهد که قسمت اعظم نقیصه در گروه شاهد توسط استخوان نابالغ و بافت همبند پر شده است و استخوان نابالغ و بافت همبند بیشتر از گروه‌های مورد آزمایش و استخوان سالم می‌باشد و مقدار استخوان لاملار تشکیل شده در گروه شاهد نسبت به گروه گرانول کلسیم فسفات بسیار کم می‌باشد، این در حالی است که در گروه گرانول کلسیم فسفات، استخوان لاملار بیشتر از گروه استخوان دکلسیفیه می‌باشد ولی از مقدار طبیعی آن در استخوان سالم کمتر می‌باشد که نشان‌دهنده یک استخوان‌سازی فعال نسبت به گروه شاهد و گروه استخوان دکلسیفیه شده می‌باشد. در ارزیابی هیستوپاتولوژی گروه گرانول کلسیم فسفات به جای مقادیر زیاد بافت مزانشیم تمایز نیافته، جوش‌خوردگی استخوان وجود داشت و مقادیر مختلفی از استخوان دیده می‌شود که ناحیه نقیصه را پر کرده و جایگزین پیوند استخوان شده بود. به‌طوری‌که اسپیکول‌های استخوانی نسبتاً نابالغ در حال تبدیل به استخوان منظم و لاملار گرانول کلسیم فسفات را احاطه کرده بود. اسپیکول‌های استخوانی از نوع استخوان نابالغ به مقدار زیاد و مقادیر کمتری از ترابکول‌های استخوانی نسبتاً بالغ و منظم و در حال تبدیل شدن به استخوان از نوع لاملار ناحیه نقیصه را پر کرده و جایگزین پیوند استخوان شده بود. به نظر می‌رسد در گروه گرانول کلسیم فسفات بستری برای سلول‌های استئوژنیک ایجاد می‌شود که این سلول‌ها به راحتی بتوانند در امتداد آن رشد نموده و به مرور به‌طور مناسب کناره‌های نقیصه استخوانی را به همدیگر پیوند دهند. ارزیابی نتایج هیستوپاتولوژی و هیستومورفومتری به‌دست

آمده در این تحقیق نشان‌دهندهٔ آن است که گرانول کلسیم فسفات، باعث افزایش القای استخوانی و تسریع روند استخوان‌سازی در مقایسه با گروه‌های شاهد و استخوان دکلسیفیه می‌شود.

در سال ۲۰۰۳ بررسی مقایسه‌ای انجام شده سولفات کلسیم حاوی استخوان دکلسیفیه شده با پیوند استخوان اسفنجی اتوژن صورت گرفت. در این مطالعه ضریب کشسانی و نیروی فشاری استخوان جدید در یک مدل کانین در سگ مورد بررسی قرار گرفت، نتایج این مطالعه نشان دهنده تاثیر مثبت استخوان دکلسیفیه شده در التیام استخوان می باشد (۲۲). در سال ۲۰۰٤ نیز مطالعه‌ای در انیستیتوی تکنولوژی دانشگاه جورجیا انجام گرفت، در این مطالعه از اسیدهیالورونیک به عنوان ماده حامل جهت استخوان دکلسیفیه شده استفاده شد. منطق استفاده از این ماده حامل، حضور این ماده در ماتریکس خارج سلولی بود که ممکن است بر خاصیت استئواینداکتیوی استخوان دکلسیفیه حداقل اثر را داشته باشد. نتایج گزارش شده این بود که اگر اسیدهیالورنیک در دوز مناسب ترکیب شود، روی اثر استئواینداکتیوی استخوان دکلسیفیه حداقل اثر را خواهد داشت (۲۰). در سال ۱۹۹٤، Becker و همکارانش به بررسی اثرات استئواینداکتیو استخوان دکلسیفیه پرداختند، از چهار بانک مختلف نسجی ماده پیوندی تهیه شد و در عضله خوکچه‌های هندی قرار گرفت، ماتریکس استخوان کورتیکال انسانی به عنوان کنترل منفی و پروتئین مرفوژنیک استخوانی به عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شد. در نواحی که از استخوان دکلسیفیه استفاده شده بود، میانگین حضور استخوان غیر زنده ۷۸/٤ درصد تا ۹۲/۵ درصد بود. در گروه کنترل منفی تشکیل استخوان مشاهده نشد و در گروه مثبت ۹٦ درصد استخوان جدید مشاهده شد. گزارش شده است ترکیبات کلسیم فسفات پس از کاشته شدن دچار تغییرات شیمیایی شده و چرخه تقسیم سلولی و نهایتاً تفکیک و تمایز و تکثیر سلول‌های استخوانی، بیان ژن‌ها، استئوژنز و سنتز فاکتورهای رشد را تقویت خواهند کرد (۲). در حضور ذرات گرانول کلسیم فسفات، استئوژنز افزایش یافته و پاسخ ترمیمی استخوان القاء خواهد شد. به نظر می‌رسد گرانول کلسیم فسفات علاوه بر خاصیت هدایت رشد استخوان، دارای خاصیت القای استخوانی نیز هست، کلسیم فسفات، استخوان‌سازی را از طریق تحریک استئوبلاست‌ها و کمک به تفکیک و تمایز این سلول‌ها تحریک می‌نماید، به عبارت دیگر کلسیم فسفات ضمن تشکیل داربستی برای رشد استخوان، سبب تحریک پروژنیتورهای استئوژنیک، رشد، تقسیم و تفکیک و تمایز و در نتیجه تحریک فعالیت استخوان‌سازی خواهد شد (۱۷). در مطالعه‌ای که توسط Ignjatovic و همکاران در سال ۲۰۰۷ با پوشش کلسیم‌فسفات دوفازی با استفاده از بیومواد Poly-D-, L- Lactide-co-Glycolide به عنوان جایگزین استخوان انجام شده است، نشان داده شده که کلسیم‌فسفات و هیدروکسی آپاتیت نقش مهمی را در تجمع فیبروبلاست‌ها و چسبندگی آنها به سطح این مواد داشته است که زمینه را در محل نقیصه استخوانی جهت بازسازی بافت استخوانی فراهم کرده است (۹). در مطالعه‌ای که توسط Daculsi و همکاران در سال ۲۰۰٦ انجام شده است از سرامیک کلسیم فسفات دوفازی به همراه پیوند زنوگرافت استخوان گاو در التیام استخوان موش صحرایی استفاده شده و نشان داده شده است که به دلیل افزایش تحریک موضعی و تجمع بیش از اندازه کلسیم در محل شکل-گیری استخوان جدید به دلیل وجود هیدروکسی‌آپاتیت از کیفیت بهتری برخوردار بوده است (٤). همچنین در مطالعه دیگری که توسط Motomiya و همکاران در سال ۲۰۰۷ روی مهره‌های کمر ۳٦ سر خرگوش انجام شده است، از هیدروکسی‌آپاتیت با تخلخل ۱۵، ۵۰ و ۸۵ درصد به همراه استخوان اتوژن استفاده شده، نشان داده شده است که میزان استخوان‌سازی در گروه هیدروکسی‌آپاتیت با تخلخل ۸۵ درصد به طور معنی‌داری بیشتر از دو گروه دیگر بوده است (۱۵). در مطالعه بالینی که توسط Weissman و همکاران در سال ۱۹۹٦ انجام شده است از سیمان هیدروکسی‌آپاتیت به منظور اصلاح نقیصه استخوانی در

ناحیه فک ٢٤ فرد بالغ استفاده شده است و در رادیوگراف‌های تهیه شده نشان داده شده که سیمان هیدروکسی‌آپاتیت به خوبی باعث تحریک استخوان سازی در ناحیه صورت گردیده است (٢٤). همچنین در مطالعه رادیولوژی که توسط Menon و Varma در سال ٢٠٠٥ انجام شده از گرانول‌های متخلخل هیدروکسی‌آپاتیت در شکستگی استخوان تیبیای ٢٨ انسان استفاده شده است و در طی یک سال رادیوگراف‌های متوالی از محل شکستگی تهیه شده و نتیجه‌گیری شده است که گرانول متخلخل هیدروکسی‌آپاتیت یک بیومواد با کاربری آسان بوده که می‌تواند باعث تحریک استخوان‌سازی در محل شکستگی گردد (١٤). در مطالعه‌ای که توسط Komaki و همکاران در سال ٢٠٠٦ انجام شده و به ارزیابی ترکیب بتا تری‌کلسیم فسفات و فاکتور رشد فیبروبلاستی٢ (Fibroblast growth factor-2) پرداخته است، نشان داده شده که سیمان بتا تری‌کلسیم فسفات باعث افزایش استخوان‌سازی در نقیصه ایجاد شده در استخوان تیبیای خرگوش در طی ٣ ماه شده است و با افزودن فاکتور رشد فیبروبلاستی٢ در همین مدت باعث افزایش القای استخوانی و استخوان‌سازی در گروه مورد مطالعه گردیده است (١٠). با توجه به تحریک آمیز بودن تری‌کلسیم‌فسفات در بافت استخوانی و تسریع واکنش بافتی، به نظر می‌رسد چنانچه ماده‌ای که خصوصیات القای استخوانی را نیز افزایش دهد به تری‌کلسیم فسفات افزوده شود، می‌تواند به راحتی در نقایص استخوانی استفاده شود. Turner TM و همکاران در سال ٢٠٠٣ گزارش دادند که با استفاده از نوعی داربست به نام ProOsteon 200R که متخلخل می‌باشد میزان رشد استخوان جدید به داخل این ماده کلسیم متخلخل به‌طور چشمگیری بیشتر از واکنش موضعی سیمان به تنهایی بوده است و در عرض ٨-٦ هفته بخش اعظمی از سیمان به‌دلیل نفوذ بافت میزبان جذب شده است (٢٢). Hu و همکارانش با کشت ماتریکس ژلاتینی انسانی (hBMG) به صورت آلوگرافت در عضله چهار سر رانی موش، بعد از ٤-٣ هفته استخوان‌سازی جدید و مغز استخوان را گزارش کرد (٨). کشت استخوان در بافت عضلانی حیوان آزمایشگاهی رت (٧) و حتی موش دیابتی نیز با وجود برهم خوردن متابولیسم مواد معدنی کاملاً مشهود بود (٢٥).

مطالعه نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که گرانول کلسیم فسفات با قدرت هدایت استخوانی و القای استخوانی می‌تواند باعث افزایش روند التیام استخوان شود و استخوان دکلسیفیه شده نیز می‌تواند باعث تحریک استخوانی شود ولی در مقایسه با گروه گرانول کلسیم فسفات از قدرت کمتری برخوردار است و به‌دلیل پیوند زنوژن بودن آن به نظر می‌رسد باعث تحریک واکنش‌های التهابی نیز شده است.

تشکر و قدردانی

مقاله حاضر مستخرج از رساله دکترای حرفه‌ای دامپزشکی می‌باشد. بدینوسیله نویسندگان مقاله مراتب تشکر و قدردانی خود را از بخش جراحی و آزمایشگاه پاتولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز ابراز می‌نمایند.

منابع

1. Apelt, D., Theiss, F., El-Warrak, A.O., Zlinszky, K., Bettschart-Wolfisberger, R. Bohner, M., Matter, S., Auer, J.A. and Von Rechenberg, B., (2004): In vivo behavior of three different injectable hydraulic calcium phosphate cements. Biomaterials, 25(7–8): 1439–1451.
2. Becker, W., Becker, B.E. and Caffesse, R., (1994) : A comparison of demineralized freeze-dried bone and autologous bone to induce bone formation in human extraction sockets. J. Periodontol., 65(12): 1128-1133.
3. Carmagnola, D., Berglundh, T. and Lindhe, J., (2002): The effect of a fibrin glue on the integration of Bio-Oss with bone tissue. A experimental study in labrador dogs. J. Clin. Periodontol, 29(5): 377-383.

4. Daculsi, G., Corre, P. and Malard, O., (2006): Performance for bone ingrowth of Biphasic calcium phosphate ceramic versus Bovine bone substitute. Key Engineering Materials, 309-311(Part 1-2): 1379-1382.
5. Ebraheim, NA. and Elgafy, H., (2001): Bone-graft harvesting from iliac and fibular donor sites: techniques and complications. Journal of Am Acad Orthop Surg, 9: 210-218.
6. Ginebra, M.P., Boltong, M.G., Fernández, E., Planell, J.A. and Driessens, F.C.M., (1995): Effect of various additives and of the temperature on some properties of an apatitic calcium phosphate cement. J. Mater. Sci., Mater. Med, 6: 612–616.
7. Horisaka, Y., (1994): Histological changes of implanted collagen material during bone induction. J. Bio. Mat. Res., 28: 97-103.
8. Hu, X., (1993): Experimental and clinical investigation of human insoluble bone matrix gelatin. Clin Orthop, 293: 360-365.
9. Ignjatovic, N., Nikov, P. and Ajdukovic, Z., (2007): Biphasic calcium phosphate coated with poly-D,L-lactide-co-glycolide biomaterial as a bone substitute. Journal of the European Ceramic Society, 27: 1589-1594.
10. Komaki, H., Tanaka, T. and Chazono, M., (2006): Repair of segmental bone defects in rabbit tibiae using a complex of β-tricalcium phosphate, type I collagen, and fibroblast growth factor-2. Biomaterials, 27: 5118-5126.
11. Larsson, S. and Bauer, T.W., (2002): Use of injectable calcium phosphate cement for fracture fixation: a review. Clin. Orthop. Relat. Res, 395: 23–32.
12. Lekovic, V., Camargo, PM., Weinlaender, M., Vasilic, N. and Kenney, EB., (2002): Comparision of platelet-rich plasma, bovine porous bone mineral, and guided tissue regeneration versus platelet-rich plasma and bovine porous bone mineral in the treatment of intrabony defects: A re-eentry study. J Periodontol, 73(2): 198-205.
13. Mellonig, J.T., Masters, L.B., Brunsvold, M.A. and Nummikoski, P.V., (1996): A clinical evaluation of demineralized freeze-dried bone allograft in combination with tetracycline in the treatment of periodontal osseous defects. J. Periodontol, 67(8): 770-781.
14. Menon, K.V. and Varma, H.K., (2005): Radiological outcome of tibial plateau fractures treated with percutaneously introduced synthetic porous Hydroxyapatite granules. European Journal of Orthopaedic Surgery & Traumatology, 15: 205-213.
15. Motomiya, M., Ito, M. and Takahata, M., (2007): Effect of Hydroxyapatite porous characteristics on healing outcomes in rabbit posterolateral spinal fusion model. European Spine Journal, 16: 2215–2224.
16. 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.
17. Mousavi, Gh., Sharifi, D., Mohajeri, D., Rezaie, A., Mortazavi, P., Soroori, S. and Hesaraki, 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.
18. Ooms, E.M., Wolke, J.G.C., van de Heuvel, M.T., Jeschke, B. and Jansen, J.A., (2003): Histological evaluation of the bone response to calcium phosphate cement implanted in cortical bone. Biomaterials, 24(6): 989–1000.
19. Schmitz, JP. and Hollinger, JO., (2001): The biology of platelet-rich plasma. J Oral Maxillofac Surg, 59(9): 1119-1121.
20. Schwartz, Z., Goldstein, M., Raviv, E., Hirsch, A., Ranly, D.M. and Boyan, B.D., (2006): Clinical evaluation of demineralized bone allograft in a hyaluronic acid carrier for sinus lift augmentation in humans: a computed tomography and histomorphometric study. Clin. Oral Impl. Res, 10.1111/j.1600-0501.2006.01303.x.
21. Tofighi, A., Mounic, S., Chakravarthy, P., Rey, C. and Lee, D., (2000): Setting reactions involved in injectable cements based on amorphous calcium phosphate. Key Eng. Mater, 192–195: 769–772.
22. Turner, T.M., Urban, R.M., Gitelis, S., Haggard, W.O. and Richelsoph, K., (2003): Resorption evalution of a large bolus of calcium sulfate in a canine medullary defect. Orthopedics, 26: 577-579.
23. Urist, M.R., Nilsson, O.S., Hudak, R. and Rasmusse, W., (1985): Immunologic evidence of bone morphogenic proteine in the milieu intereur. Ann. Biol. Clin., 43: 755-766.
24. Weissman, J.L., Snyderman, C.H. and Hirsch, B.E., (1996): Hydroxyapatite cement to repair skull base defects: radiologic appearance. American Journal of Neuroradiology, 17: 1569-1574.
25. Yamashita, K., (1993): Ultrastructure of calcified muscle fibers at the implantation site of dematerialized bone matrix gelatin. Int. J Exp. Path., 74(6): 547-552.

Vet. J. of Islamic Azad Uni. Tabriz Branch. 6, 1:1483-1492, 2012

Comparison of xenogenic bone bioimplant and calcium phosphate granules on experimental femoral bone defect healing in rabbits

Mousavi, GH.[1*], Mohajeri, D.[2], Sadeghpour Golzar, F.[3]

1- Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran
2- Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran
3-Graduate of Veterinary Medicine, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran

[*]***Corresponding author's email:*** *gh_mousavi@iaut.ac.ir*

(Received: 2012/6/27, Accepted: 2012/9/6)

Abstract

Rebuilding and renovation of lost bone whether because of physiologic or pathologic factors was one of the surgeons' motivations from the past. Osteogenesis of decalcified bone induced by growth factors contained in it. This study is to assay probability effect of decalcified bone and calcium phosphate granules on osteogenesis which is made in experimental flaw and it is as a laboratory pattern in rabbit femur. This experimental study is made on 15 male rabbits. Animals were divided randomly into 3 groups (control and treatments). After induction of general anesthesia, 2 holes in size of 2 mm in diameter was made using a dental bit in femur width to medullary channel. After surgery, the control group left untreated and decalcified bones was placed in group 2 and calcium phosphate granules were placed in group 3. Histopathological and histomorphometrical studies for evaluation of bone healing were carried out in experimental rats, which were euthanized after 45 days of the experiment using hematoxylin-eosin (H&E) staining method. In control group, defect seemed to be filled with woven bone and bone marrow spaces and in spite of a poor osteogenic activity. In calcium phosphate group, young bone trabeculas increased in number and bone trabeculas more organized. Histomorphometric results, observed that calcium phosphate granules has significant effect on bone healing than decalcified and control groups.

Keywords: Decalcified xenogeneic bone, Calcium phosphate granules, Bone healing, Rabbit, Histopathology