# مطالعه اثرات هیدروکسی آپاتیت در مدل تاخیری التیام شکستگی در استخوان زند زبرین موش صحرایی

محی‌الدین احمدی[۱]، حمیدرضا مسلمی[۲*]، مهدی شمسائی[۱]، رضا صداقت[۳]

۱- عضو باشگاه پژوهشگران جوان دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرمسار، گرمسار ـ ایران.

۲ -استادیار گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرمسار، گرمسار ـ ایران.

۳ -استادیار گروه پاتوبیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه شاهد، تهران ـ ایران.

*نویسنده مسئول: moslemi34@yahoo.com

## چکیده

**درمان شکستگی یکی از مباحث مهم و مورد توجه در علم پزشکی و دامپزشکی می باشد و همواره یافتن یک تکنیک جدید که بتواند حداقل عوارض جانبی را داشته باشد و سرعت التیام شکستگی را افزایش دهد، مورد توجه بوده است.**

**برای انجام این تحقیق ۱۸ قطعه موش صحرایی با وزن تقریبی ۳۰±۲۵۰ گرم انتخاب و به ۲ گروه ۹ قطعه ای و هر گروه نیز به سه زیر گروه ۳ تایی تقسیم شدند. روز عمل ابتدا موهای اندام حرکتی قدامی سمت راست بصورت کامل تراشیده شد و ده دقیقه قبل از شروع عمل با استفاده از ترکیب کتامین - زایلازین بیهوشی القاء گردید. سپس شکافی به طول ۲ سانتی متر در سطح قدامی – داخلی دست راست داده شده و پس از رویت استخوان زند زبرین در ناحیه وسط استخوان شکافی به طول ۵ میلی متر ایجاد گردید. درگروه درمان، ناحیه با هیدروکسی آپاتیت پر شد و در گروه کنترل محل شکستگی پس از شستشو با سرم فیزیولوژی، بخیه گردید.**

**در کلیه موش‌های صحرایی علاوه بر روز جراحی، در روزهای چهاردهم، بیست و هشتم و چهل و دوم رادیو گرافی در حالت گماری جانبی تهیه شد. جهت انجام آزمایش هیستوپاتولوژی، در دو گروه مورد مطالعه، در روزهای چهاردهم، بیست و هشتم و چهل و دوم حیوانات به روش انسانی معدوم و بلافاصله نمونه گیری انجام گردید. سپس نمونه ها به بخش پاتولوژی منتقل و با روش استاندارد از آنها مقاطع میکروسکوپی تهیه شد. پس از آماده شدن، اسلایدها توسط میکروسکوپ نوری مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج هیستوپاتولوژی در گروه درمانی با هیدروکسی آپاتیت در روزهای چهاردهم، بیست و هشتم و چهل و دوم نشان داد که میزان بافت همبند، غضروفی واستخوانی در نمونه های این گروه روند بسیار خوبی را نسبت به گروه کنترل در همان روزها داشته است. لذا نتایج نشان داد که، بکارگیری هیدروکسی آپاتیت می تواند روند التیام شکستگی را در استخوان زند زبرین موشهای صحرایی در مقایسه با گروه کنترل افزایش دهد.** پژوهشنامه دامپزشکی، ۱۳۸۹، دوره ۶، ضمیمه ۱، ۱۶۸-۱۶۳.

**واژه‌های کلیدی:** هیدروکسی آپاتیت، شکستگی تاخیری، زند زبرین، موش صحرایی.

## Study of the effects of Hydroxyapatite on delayed Radial Fracture Healing in Rat

Ahmadi M. [1], Moslemi H. R.[*2], Shamsaee M. [1], Sedaghat R. [3]

*1. Graduated of Veterinary faculty, Islamic Azad University, Garmsar branch*

*2.Department of Clinical Science, Veterinary faculty, Islamic Azad University, Garmsar branch.*

*3.Department of Pathobiology, Shahed University, Tehran-Iran.*

**Abstract**

Hydroxyapatite (HA), as bone substitute materials has the advantages of abundant supply and absence of immunogenecity. This study was conducted to evaluate the effects of hydroxyapatite on delayed radial fracture healing in rats was assessed by radiographic and histological methods. Eighteen healthy rats were randomly divided into two equal groups. Each group was divided to three subgroups (n = 3). All rats were generally anesthetized and transverse osteotomy was performed in the mid-shaft of the right radius under aseptic condition. In group 1, the osteotomy gap was filled with the HA. Group 2 not received any treatment, and was used as a negative control. Radiographs were taken in lateral view at days of 0, 14, 28 and 42. From each subgroup three rats were euthanized at days of 14, 28 and 42 and the radial bones harvested and prepared for histological test. In radiography, callus formation, gap and cross reaction between radius and ulna were evaluated. In histology, healing rate and tissue inflammation were evaluated.

Radiographic signs of bone healing in negative control were lower than from treated group. In histological finding, healing process in treated group was higher than from negative control significantly. It was concluded that application of hydroxyapatite has the positive effects on delayed radial fracture healing process in rats. ***Vet.Res.Bull.6, Sup.1, 163-168.***

**Key words:** Hydroxyapatite, Delayed Radial Fracture, Rats.

## مقدمه

درمان شکستگی یکی از مباحث مهم و مورد توجه در علم پزشکی و دامپزشکی می باشد و همواره یافتن یک تکنیک جدید که بتواند حداقل عوارض جانبی را داشته باشد و سرعت التیام شکستگی را افزایش دهد، مورد توجه بوده است. هیدروکسی آپاتیت اصلی ترین ترکیب غیرآلی در بافت های سخت بدن نظیر دندان، استخوان و دنده می باشد که ۷۰-۶۰ درصد فاز معدنی را در استخوان انسان تشکیل می دهد. این ماده دارای خاصیت هدایت استخوانی بوده و به عنوان یک فیلتر در ضایعات استخوانی عمل می نماید. از اینرو بر آن شدیم تا با ایجاد مدل تاخیری التیام در استخوان زند زبرین و بکارگیری هیدروکسی آپاتیت به مطالعه اثرات آن در ترمیم شکستگی در مدل حیوانی مورد نظر بپردازیم. روش های ارزیابی در این مطالعه، رادیوگرافی و هیستوپاتولوژی می باشد.

## مواد و روش کار

۱۸قطعه موش صحرایی با وزن تقریبی ۳۰±۲۵۰ گرم انتخاب و به ۲ گروه ۹ قطعه ای و سپس هر گروه، به سه زیر گروه ۳ تایی تقسیم شده و در قفسهای مخصوص نگهداری می شدند. روز عمل ابتدا موهای اندام حرکتی قدامی راست بصورت کامل تراشیده می شد. ده دقیقه قبل از شروع عمل با استفاده از مخلوط کتامین هیدروکلراید ۵ ٪ به میزان ۵۰ mg/kg و زایلازین هیدروکلراید ۲٪ به میزان ۵ mg/kg بصورت داخل صفاقی بیهوشی القاء می گردید. سپس حیوان در موقعیت جانبی روی میز جراحی قرار گرفته و مقید می شدند. پس از ضد عفونی و شان گذاری موضع عمل، شکافی به طول ۲ سانتی متر در سطح قدامی – داخلی دست راست در ناحیه استخوان زندزبرین داده شده و پس از شکاف پوست، فشیا و عضلات ناحیه از روی استخوان کنار زده می شد. سپس در ناحیه وسط استخوان زندزبرین با استفاده از الکتروموتور یک شکاف به طول ۵ میلی متر ایجاد گردیده و ذرات استخوان بریده شده با سرم فیزیولوژی از موضع عمل خارج می شد. درگروه درمان ناحیه با هیدروکسی آپاتیت پرمی شد و در گروه کنترل محل شکستگی پس از شستشو با سرم فیزیولوژی، بخیه می گردید. در کلیه حیوانات علاوه بر روز جراحی، در روزهای چهاردهم، بیست و هشتم و چهل و دوم رادیو گرافی در حالت گماری جانبی تهیه شد. جهت انجام آزمایش هیستوپاتولوژی، در دو گروه مورد مطالعه، در روزهای چهاردهم، بیست و هشتم و چهل و دوم موش ها به روش انسانی معدوم و بلافاصله نمونه گیری انجام گردید. سپس نمونه ها به بخش پاتولوژی منتقل و با روش استاندارد از آنها مقاطع میکروسکوپی تهیه شد. پس از آماده شدن، اسلایدها توسط میکروسکوپ نوری مورد مطالعه قرار گرفت.

## نتایج

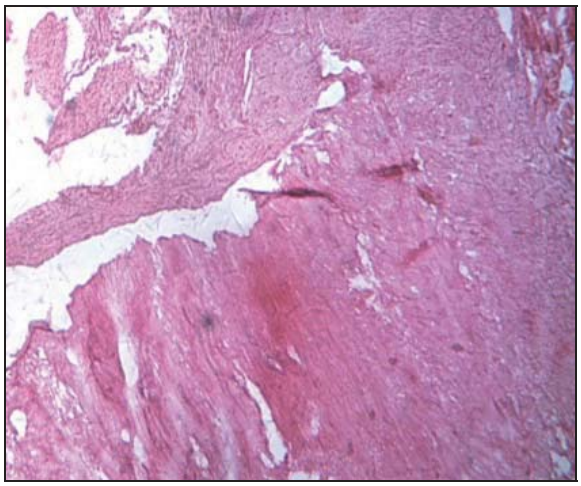
نتایج هیستوپاتولوژی در گروه درمانی با هیدروکسی آپاتیت در روز چهاردهم نشان داد که میزان استخوان سازی در نمونه های این گروه روند خوبی داشته است. به طوری که در دو نمونه این میزان ۲+ و در یک نمونه دیگر صفر بوده است .بر این اساس میزان غضروف و بافت همبندی در این گروه در حد متوسط و کم می باشد که تاییدی بر روند استخوان سازی در این گروه درمانی می باشد. (جدول ۱ و تصویر ۱). بر این اساس در گروه بدون هیدروکسی آپاتیت (گروه کنترل) روند التیام کند می باشد به طوری که بافت غضروفی و استخوانی در این نمونه ها مشاده نشد و تنها بافت همبندی وجود داشت.(جدول ۱ و تصویر ۲).

همچنین این نتایج در گروه درمانی با هیدروکسی آپاتیت در روز بیست و هشتم نشان داد که میزان استخوان سازی در نمونه های این گروه روند بسیار بهتری نسبت به گروه کنترل در همان روز داشته است.(جدول ۱ و تصویر ۳ و ۴ ).

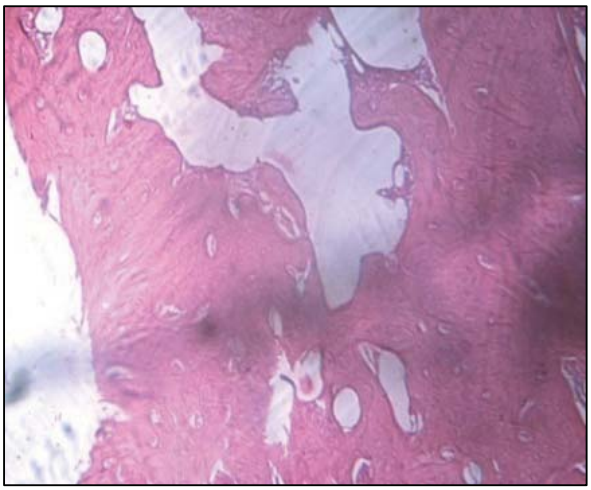
همچنین نتایج هیستوپاتولوژی در گروه درمانی با هیدروکسی آپاتیت در روز چهل و دوم نشان داد که میزان استخوان سازی در نمونه های این گروه روند بسیاربهتری نسبت به گروه کنترل در همان روز داشته است بطوری که در سه نمونه این میزان ۳+ (زیاد) بوده است و همچنین بر این اساس میزان بافت همبندی و غضروفی در هر سه

نمونه صفر می باشد (جدول ۱ و تصویر ۵). اما نتایج هیستوپاتولوژی مربوط به گروه بدون هیدروکسی آپاتیت روز چهل و دوم (گروه کنترل) بیانگر روند کندتر التیام است به طوری که میزان استخوان سازی در هر سه نمونه ۲+ (متوسط) می باشد و هچنین بر این اساس میزان بافت همبندی و بافت غضروفی در هر سه نمونه صفر می باشد (جدول ۱ و تصویر ۶).

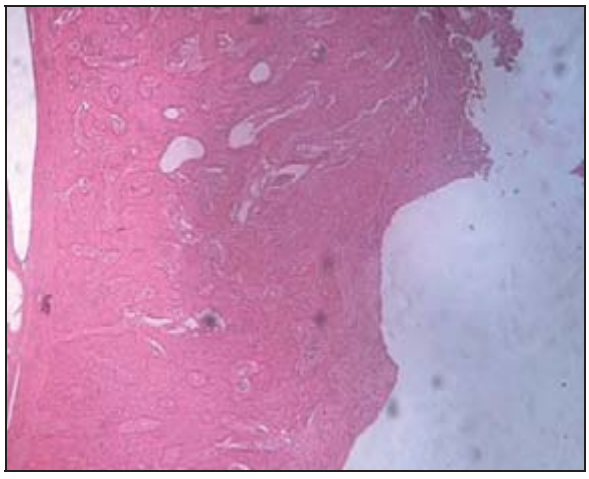
داده های حاصل از تست هیستوپاتولوژی با استفاده از آزمون آماری Kruskall-Wallis تحت نرم‌افزار SPS، نسخه ۱۶، مقایسه شد. بر این اساس اختلاف آماری معنی داری بین گروه های درمان و کنترل از نظر میزان التیام مشخص شد. بدین معنی که روند التیام در گروه درمانی هیدروکسی آپاتیت به طور معنا داری بالاتر از گروه کنترل بود.



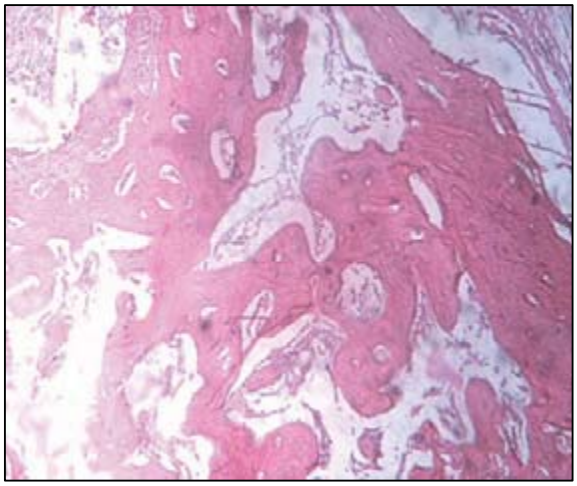
تصویر ۱: گروه درمانی روز چهاردهم



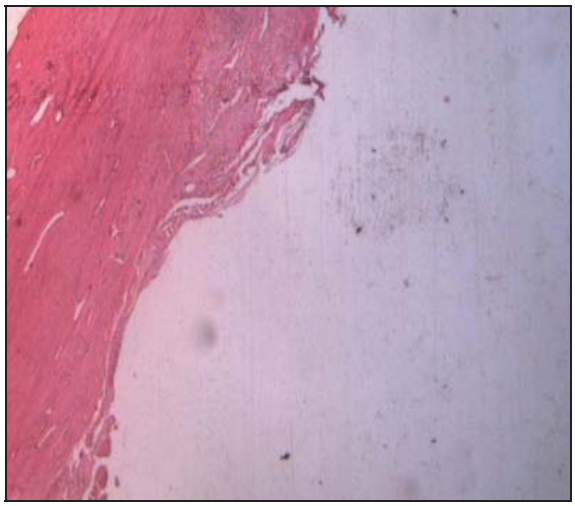
تصویر ۳: گروه درمانی روز بیست و هشتم



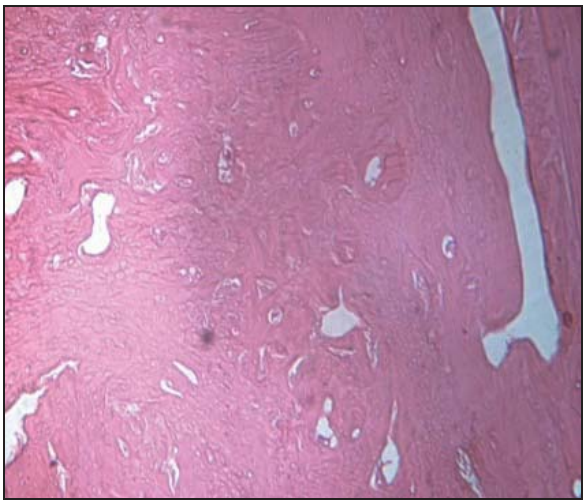
تصویر ۲: گروه کنترل روز چهاردهم



تصویر شماره ٤: گروه کنترل روز بیست و هشتم



تصویر ۵: گروه درمانی روز چهل و دوم



تصویر ٦: گروه کنترل روز چهل و دوم

جدول ۱: میانگین و انحراف معیار فاکتورهای مورد مطالعه در گروه‌های مختلف

| فاکتور / روز | بافت همبند | بافت غضروفی | بافت استخوانی |
|---|---|---|---|
| درمان-۱۴ | ۱±۱/۷۳ | ۱/۳۳ ± ۰/۵۸ | ۱/۳۳±۱/۱۶ |
| درمان- ۲۸ | ۰ | ۰/۳۳±۰/۵۸ | ۳ |
| درمان- ۴۲ | ۰ | ۰ | ۳ |
| کنترل- ۱۴ | ۳ | ۰ | ۰ |
| کنترل- ۲۸ | ۰/۶۷±۱/۱۵ | ۲±۱ | ۰/۶۷±۰/۵۸ |
| کنترل- ۴۲ | ۰ | ۰ | ۲ |

## بحث و نتیجه‌گیری

درمان شکستگی یکی از مباحث چالش برانگیز در علم پزشکی و دامپزشکی می باشد و همواره مطالعات فراوانی در جهت یافتن تکنیکهای جدید که بتواند سرعت التیام شکستگی را افزایش دهد، مورد توجه بوده است. از اینرو در این مطالعه با ایجاد مدل تاخیری التیام در استخوان زند زبرین و بکارگیری هیدروکسی آپاتیت به مطالعه اثرات آن در ترمیم شکستگی در مدل حیوانی مورد نظر پرداختیم. علت انتخاب استخوان زند زبرین به خاطر وجود استخوان زند زیرین است که به عنوان نگهدارنده عمل نموده و در نتیجه نیازی به داشتن فیکساتور و نگه دارنده خارجی نمی باشد.

نتایج این مطالعه نشان داد که، بافت استخوانی در گروه هیدروکسی آپاتیت نسبت به گروه کنترل بیشتر بوده است. دلیل این امر به خاطر وجود کلسیم و فسفر خالص در هیدروکسی آپاتیت است که دارای خاصیت هدایت استخوانی بوده و به عنوان یک فیلتر در ضایعات استخوانی عمل می نماید و باعث می شود روند تشکیل بافت استخوانی سرعت بیشتری گرفته و بطور کامل به بافت استخوانی تبدیل شود. همچنین میزان بافت همبندی و

بافت غضروفی در این گروه بطور معناداری پایین تر از گروه کنترل بوده است. مطالعات سایر محققین نیز بیانگر تاثیر مثبت این ماده در روند التیام می باشد که موید نتایج حاصل از این مطالعه می باشد. اوونیشی و همکاران، از هیدروکسی آپاتیت در جراحی های جایگزینی مفصل لگن استفاده نمودند. این محققین با بررسی های رادیوگرافی در مدت ۱۰سال بیان داشتند که در موارد استفاده از هیدروکسی آپاتیت اتصالات مستقیم و محکمی بین این ماده و استخوان بدون ایجاد هیچ تغییر مورفولوژیکی مشاهده می شود (۱۰).

گریفیت و همکاران، با بکارگیری پین های پوشیده شده با هیدروکسی آپاتیت در شکستگی تجربی در استخوان ران موش صحرایی دریافتند که این ماده سازگاری مناسبی با استخوان داشته و در افزایش سرعت التیام در ضایعات استخوانی بسیار مناسب است(۵ و ۶).

لیو و همکاران، ایمپلنت های مختلفی از هیدروکسی آپاتیت را در استخوان مندیبل و ایلیاک کرست در گوسفند قرار دادند. آنها در مطالعات هیستوپاتولوژی خود بیان نمودند که این کامپوزیت دارای خاصیت استخوان سازی و هدایت استخوانی بالایی می باشد(۹).

جمالی و همکاران، به ارزیابی رادیوگرافی اثرات هیدروکسی آپاتیت در استخوان درشت نی خرگوش پرداختند و بیان داشتند که این ماده سازگاری مناسبی با استخوان داشته و می تواند در ضایعات استخوانی استفاده شود(۸). بلوم و همکاران، با بررسی بیومکانیکی اثرات بکارگیری هیدروکسی آپاتیت در برداشت کامل مفصل لگن در گوسفند بیان داشتند که، این سرامیک ها ثبات اولیه مناسبی را در محل شکستگی ایجاد کرده و در تسریع التیام نقش بسزایی دارند(۱). ولچ و همکاران، در مطالعه خود ضایعات استخوان فمور بز را با استفاده از هیدروکسی آپاتیت، پلی متیل مت آکریلات و پیوند استخوان پر نمودند. آنها با مطالعات بیومکانیکی بیان داشتند که سیمان هیدروکسی آپاتیت یک انتخاب مناسب برای ترمیم این ضایعات بوده و مزیت مهم آن سازگاری بسیار خوب با بافت استخوان میزبان می باشد(۱۱).

بولدر و همکاران، در بازسازی ضایعات استابولوم از هیدروکسی آپاتیت استفاده نمودند. نامبردگان در بررسی خود بیان داشتند که این ماده سازگاری مناسبی با استخوان داشته و خاصیت استخوان سازی بالایی دارد(۲).

هوشیکاوا و همکاران، به بررسی روند جذب و هدایت استخوانی سیمان فسفات کلسیم (هیدروکسی آپاتیت) بکار رفته در کندیل استخوان فمور خرگوش پرداختند. نامبردگان در بررسی های بیومکانیکی و هیستوپاتولوژی خود بیان داشتند که پر نمودن محل ضایعه با این سیمان یک روش موثر در درمان این شکستگی ها می باشد(۷).

فوجی شیرو و همکاران، از هیدروکسی آپاتیت برای بازسازی ضایعات استخوان ران استفاده نمودند. نامبردگان بیان داشتند که این کامپوزیت می تواند ثبات اولیه بسیار مناسبی را در موارد جراحی های آرتروپلاستی فمور ایجاد نماید(۴). همچنین ژائو و همکاران، با کاشتن نانوتیوب های هیدروکسی آپاتیت در شکستگی درشت نی در خرگوش بیان نمودند که این ماده سازگاری بسیار خوبی با استخوان داشته و می تواند سرعت التیام را بدون هیچ واکنشی تسریع نماید(۱۲). کاریا و همکاران، به بررسی بکارگیری توام هیدروکسی آپاتیت و پیوند پری استیومی در ضایعات ماگزیلا در موش صحرایی پرداختند. این محققین با بررسی های هیستوپاتولوژی بیان داشتند که هیدروکسی آپاتیت به عنوان یک شبکه متخلخل در محل شکستگی عمل نموده و در جذب مواد زیستی در این ناحیه مفید و موثر می باشد(۳). نتایج بررسی ها در این مطالعه نشان داد که روش درمانی استفاده از هیدروکسی آپاتیت می تواند روند التیام شکستگی را در مدل تاخیری التیام در استخوان زند زبرین موش صحرایی تسریع نماید.

## References


1- Blom, AW. Grimm, B. Miles, AW. Cunningham, JL. Learmonth, I.D. (2002) Subsidence in impaction grafting: the effect of adding a ceramic bone graft extender to bone. *J Eng Med*; **216**: 265-270.

2- Bolder, SB. Verdonschot, N. Schreurs, BW. Buma, P. (2003) The initial stability of cemented acetabular cups can be augmented

by mixing morsellized bone grafts with tricalciumphosphate/hydroxy-apatite particles in bone impaction grafting. *J Arthroplasty*; **18(8)**: 1056-1063.

3- Caria, PHF. Kawachi, EY. Bertran, CA. Camilli, JA. (2007). Biological assessment of porous-implant hydroxyapatite combined with periosteal grafting in maxillary defects, (1985). *J Oral Maxillofac Surg*; **65**: 847-854.

4- Fujishiro, T. Nishikawa, T. Niikura, T. Takikawa, S. Nishiyama, T. Mizuno, K. Yoshiya, S. Kurosaka, M. (2005) Impaction bone grafting with hydroxyapatite. *Acta Orthop*; **76(4):** 550-554.

5- Griffet, J. Chevallier, A. Elhayek, T. Odin, G. Pebeyer, B. Accorsi, E.(1999) Diaphyseal fracture treated by polylactide and hydroxyapatite pins, Experimental study. *J Mater Sic: Mater in Med*; **10**: 411-418.

6- Griffet, J. Chevallier, A. Accorsi, E. Elhayek, T. Odin, G. Pebeyer, B. (1999) Osteosynthesis of diaphyseal fracture by ossatite experimental study in rat. *Biomaterals*; **20**:511-515.

7- Hoshikawa, A. Fukui, N. Fukuda, A. Sawamura, T. Hattori, M. Nakamura, K. Oda, H. (2003) Quantitative analysis of the resorption and osteocunduction process of a calcium phosphate cement and its mechanical effect for screw fixation. *Biomaterials*; **24**: 4967-4975.

8- Jamali, A. Hilpert, A. Debes, J. Afshar, P. Rahban, S. Holmes, R. (2002). Hydroxyapatite/ calcium carbonate (HA/CC) vs. plaster of paris: a histomorphometric and radiographic study in a rabbit tibial defect model. *Calcif Tissue Int*; **71**: 172-178.

9- Liu, YL. Schoenaers, J. De Groot, K. De Wijn, R. Schepers, E.(2000) Bone healing in porous implants: a histilogical and histometrical comparative study on sheep. *J Mater Sci: Mater in Med*; **11**: 711-717.

10- Oonishi, H. Iwaki, Y. Kin, N. Kushitani, S. Murata, N. Wakitani, S. Imoto, K. (1997) Hydroxyapatite in revision of total hip replacements with massive acetabular defects. *J Bone Joint Surg*; **79B**: 87-92.

11- Welch, RD. Berry, BH. Crawford, K. Zhang, H. Zobitz, M. Bronson, D. Krishnan, S. (2002) Subchondral defects in caprine femora augmented with in situ setting hydroxyapatite cement, polymethylmethacrylate, or autogenous bone graft: biomechanical and histomorphological analysis after tow-years. *J Orthop Res*; **20**: 464-472.

12- Zhao, DM. Liu, ZH. Wu ,SO. Li, AM. Zhao, JJ. Wang, P. Sun, KN. (2006). Biocompatibility of carbon nanotubes/hydroxyapatite composite with tibia of rabbit. *Chinese J Biomed Eng*; **25**(3): 342-345.