

ارزیابی رادیوگرافیک روند ترمیم نقایص استخوانی فک پایین با ترکیب ژل غنی پلاکتی و نانوذرات هیدروکسی آپاتیت در سگ

علی رونق^۱، هادی نداف^۲، صالح اسماعیلزاده^۳، علیرضا غدیری^{۴*}، حسین نجفزاده‌ورزی^۴، ایرج کاظمی‌نژاد^۵، عبدالرحمان راسخ^۶ و محمدعلی جلالی‌فر^۷

تاریخ دریافت: ۹۲/۹/۲۳

تاریخ پذیرش: ۹۳/۴/۱۷

خلاصه

نانوهیدروکسی آپاتیت یک ماده‌ی استئوکنداکتیو بوده که اخیراً به عنوان پیوند استخوانی در برخی تحقیقات مورد استفاده قرار گرفته است. این ذرات به دلیل داشتن مزایای نظیر خلوص بالاتر، داشتن ارتباط بیشتر با سلول‌های اطراف خود، بازجذب سریع‌تر و تعداد بیشتر مولکول‌ها در واحد سطح نسبت به هیدروکسی آپاتیت معمولی، سرعت ترمیم استخوان را افزایش می‌دهند، از طرف دیگر پلاسمای غنی از پلاکت نیز به عنوان منبع فاکتورهای استئواینداکتیو برای ترمیم استخوان مورد استفاده قرار می‌گیرد؛ بدین ترتیب مطالعه‌ی حاضر با هدف ارزیابی اثربخشی ترکیب نانو هیدروکسی آپاتیت و ژل غنی پلاکتی بر روند ترمیم نقایص استخوانی انجام گردید. برای این مطالعه ۱۵ سگ نر در نظر گرفته شد. ۶ نقیصه گرد به قطر ۵ میلی‌متر در هر دو طرف فک پایین ایجاد گردید و سپس در هر نقیصه یکی از مواد زیر کار گذاشته شد: هیدروکسی آپاتیت معمولی، نانو هیدروکسی آپاتیت، ژل پلاکتی، ترکیب ژل پلاکتی و هیدروکسی آپاتیت و ترکیب نانو هیدروکسی آپاتیت و ژل پلاکتی. در نهایت یک نقیصه نیز به عنوان گروه کنترل خالی ماند. ارزیابی ترمیم نقیصه‌ها با اخذ رادیوگراف در روزهای ۰، ۷، ۱۴، ۲۱، ۲۸، ۳۵، ۴۲، ۴۹ و ۵۶ صورت گرفت. نتایج این مطالعه مشخص کرد که ترکیب نانو هیدروکسی آپاتیت و ژل پلاکتی در روزهای ۲۱ و ۴۹ نسبت به نانو هیدروکسی آپاتیت و در روزهای ۲۸، ۳۵، ۴۲، ۴۹ و ۵۶ نسبت به ژل پلاکتی میانگین امتیازی بیشتر را کسب نموده است. علی‌رغم این که اختلاف، معنی‌دار نبوده است ($P > 0.05$) ولی با توجه به کسب میانگین امتیازی بالاتر شاید بتوان گفت که ترکیب نانو هیدروکسی آپاتیت و ژل پلاکتی اثر ترمیمی بهتری از نانو هیدروکسی آپاتیت و به خصوص ژل پلاکتی به تنهایی دارد و احتمالاً این ترکیب بتواند به عنوان انتخابی مناسب برای پر کردن نقیصه‌های استخوانی مدنظر قرار گیرد، اگر چه برای اثبات این ادعا نیاز به انجام مطالعات بیشتر است.

کلمات کلیدی: نانو هیدروکسی آپاتیت، ژل پلاکتی، فک پایین، سگ، ترمیم، نقیصه

مقدمه

بالقوه و بی‌نظیر استخوان‌سازی، ویژگی‌های استئوکنداکتیو و استئواینداکتیو، عدم رد پیوند و عدم انتقال بیماری می‌باشند. به علاوه، گرافت‌های استخوانی اتولوگ نیازی به تکنیک‌های پیشرفته و گران برای حصول ندارند (Eposito et al. 2006)؛ اما به دلایلی نظیر درد پس از عمل، از دست دادن خون، زخم ثانویه‌ی ناشی از جراحی و خطر ترومبوز، در سال‌های اخیر مواد سازگار زیستی به

گرافت‌های استخوانی همواره در ترمیم نقیصه‌های استخوانی به کار رفته‌اند. گرافت علاوه بر پر کردن نقیصه و حمایت مکانیکی از آن، روند بازسازی استخوان را نیز تشدید می‌کند (Cypher and Grossman 1996, Domein and Persons 1991). استخوان اتوژن به عنوان استاندارد طلایی توصیه می‌گردد (Marx 2004, Sanchez et al. 2003). گرافت‌های استخوانی اتولوگ دارای مزایای

(نویسنده‌ی مسئول)

E-mail: alighadiri@scu.ac.ir

^۱ دانش‌آموخته دکتری تخصصی جراحی، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز

^{۲*} دانشیار گروه علوم درمانگاهی، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز

^۳ دانشیار گروه پاتوبیولوژی، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز

^۴ استاد گروه علوم پایه، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز

^۵ دانشیار گروه فیزیک، دانشکده‌ی علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز

^۶ استاد گروه آمار، دانشکده‌ی علوم ریاضی و کامپیوتر، دانشگاه شهید چمران اهواز

^۷ مربی مرکز تحقیقات تالاسمی و هموگلوبینوپتی دانشگاه جندی‌شاپور اهواز

به تازگی گرافت‌های نانوکریستال مصنوعی هیدروکسی‌آپاتیت برای افزایش ترمیم نقیصه‌های استخوانی معرفی شده‌اند (Kasaj et al. 2008). مزایای چنین مواد نانوساختاری در مقایسه با مواد اولیه حجیم^۱ شامل تماس نزدیک با بافت‌های اطراف، بازجذب سریع و تعداد زیاد مولکول‌ها در سطح می‌باشد. مطالعات بر روی بدن موجود زنده، ترمیم سریع نقیصه‌ها با اندازه‌ی بحرانی را پس از استفاده از نانوهیدروکسی‌آپاتیت نشان داده است (Gerber et al. 2003, Henkel et al. 2005). علاوه بر این، یکپارچگی منظم استخوانی و بازجذب کامل ماده‌ی پیوندی را می‌توان مشاهده کرد. فرآیند بازجذب کامل مواد پیوندی در مرحله‌ی بازآرایی^۲ بافت استخوانی جدید توسط سلول‌های استئوکلاست انجام می‌گردد (Henkel et al. 2005).

پلاسمای غنی از پلاکت شامل تعداد فراوانی پلاکت است که دارای فاکتورهای رشد بالقوه‌ای هستند که پس از تماس پلاکت‌ها با مواد خارج سلولی به خصوص کلاژن، توسط پلاکت‌ها ترشح شده و برای شروع روند ترمیم لازم هستند (Marx et al. 1998). پلاسمای غنی شده از پلاکت حاوی سه پروتئین فیبرینوژن، فیبرونکتین و ویترونکتین است که به مولکول‌های چسب سلولی^۳ در روند هدایت استخوانی و نیز به عنوان ماتریکس برای استخوان، بافت همبند نرم و مهاجرت سلول‌های اپی‌تلیال عمل می‌کنند (Marx 2004). ماده‌ی مزبور سرعت رادیوگرافیکی ترمیم را ۱/۶۲ تا ۲/۱۶ برابر افزایش داده و دانسیته‌ی نهایی گرافت همراه خود را نسبت به گرافتی که پلاسمای غنی از پلاکت به آن افزوده نشده است را به میزان قابل توجهی افزایش می‌دهد (Marx et al. 1998) به علاوه، به واسطه‌ی دارا بودن پتانسیل تحریک فیبروپلازی و رگ‌زایی و افزایش استحکام اولیه‌ی زخم ترمیم بافت‌های نرم را هم بهبود می‌بخشد. مهم‌ترین مسئله در مورد پلاسمای غنی از پلاکت، بی‌خطر بودن آن از نظر انتقال بیماری‌های

عنوان جایگزین‌های استخوان اتولوگ پدیدار شده‌اند (Begley et al. 1995, Khan et al. 2005, Silva et al. 2003, Whang and Wang 2004). این مواد را می‌توان به دو گروه بزرگ آلی و مصنوعی تقسیم‌بندی کرد. در میان مواد زیستی مصنوعی می‌توان هیدروکسی‌آپاتیت مصنوعی، بیوگلاس و بیوسرامیک را نام برد (Esposit et al. 2006). پیوندهای آلوگرافت بر محدودیت‌های بالا غلبه کرده؛ اما خطر انتقال بیماری‌های عفونی نظیر ایدز و هپاتیت در انسان دارند (Grauer et al. 2005). جایگزین ممکن دیگر برای درمان نقیصه‌های استخوانی استفاده از زئوگرافت استخوانی است که از نظر مورفولوژیکی و ساختاری شبیه به استخوان انسان است (Krishna et al. 2002). از نظر مواد تشکیل دهنده، استخوان گاوی از ترکیبات آلی و غیرآلی ساخته شده است. بخش آلی آن به طور عمده حاوی کلاژن و پروتئین و بخش غیرآلی آن به طور عمده هیدروکسی‌آپاتیت به همراه درصد کمی از عناصر کمیاب دیگر هم‌چون کربنات، منیزیم و سدیم است که در ساختمان استخوان شرکت کرده‌اند (Krishna et al. 2002). از آن جایی که هیدروکسی‌آپاتیت التهاب‌زا نبوده و موجب پاسخ‌های ایمنی و تحریک کننده نمی‌گردد، لذا استفاده از این ماده به عنوان جایگزین استخوان سودمند است (Gil-Albarova 2004). مشکل بزرگ هیدروکسی‌آپاتیت سنتتیک ویژگی‌های مکانیکی ضعیف آن است به خصوص زمانی که در معرض محیط مرطوب قرار می‌گیرد (Greish et al. 2005, Kong et al. 2005, Sato et al. 2005). بنابراین، کاربردهای کلینیکی آن به مواردی که فشار کمی در محل وارد می‌گردد نظیر جایگزین ریشه‌ی دندان، پر کردن حفره‌ی اطراف دندانی، حفره‌های کیستیک، مناطق مجاور ایمپلنت، فیوز کردن مهره‌های نخاعی، نقیصه‌های حدفصل و شکستگی‌های جوش نخورده در استخوان‌های بلند محدود می‌گردد (Suchanek et al. 1998, Yang et al. 2004).

- 1- bulk material
- 2- remodeling
- 3- cell adhesion molecules

پلاکتی / گرانول‌های هیدروکسی آپاتیت به طور تصادفی قرار داده شد و یکی از نقیصه‌ها نیز به عنوان گروه کنترل، خالی نگه داشته شد (تصویر ۲). سپس بافت نرم روی نقیصه‌ها کشیده شده و بعد از آن پوست با الگوی ساده تکی بخیه گردید.

هیدروکسی آپاتیت استفاده شده در این مطالعه با نام تجاری ^۲Cera bone® و اندازه‌ی گرانول‌های آن ۰/۵ تا ۱ میلی‌متر بود. نانو هیدروکسی آپاتیت مورد استفاده در این تحقیق محصول مطالعه‌ی Kazemi nezhad و همکاران در سال ۲۰۱۳ بود که به روش سل-ژل احتراقی تولید شده و اندازه‌ی ذرات حاصل ۳۰ نانومتر بود. برای تهیه‌ی ژل پلاکتی، ۴۰ میلی‌لیتر خون وریدی سگ در لوله‌های استریل ۱۰ سی‌سی حاوی ماده‌ی ضد انعقاد سدیم سیترات قرار داده می‌شد. نمونه‌ها به مدت ۸ دقیقه با نیروی ۵۸۰g، در دمای اتاق و در سیستم PRGF-Endort (BTI Biotechnology Institute, S.L., Miñano, Álava, Spain) ساتریفورژ گردید. پلاسمای غلظت پلاکتی به سه قسمت تقسیم شد: بخش اول که دو حجم را شامل می‌شد و در قسمت فوقانی قرار داشت (PPP) Platelet Poor Plasma نام داشت که تعداد پلاکت‌های آن مشابه خون محیطی بود. قسمت دوم پلاسمای که یک حجم را در بر می‌گرفت Platelet Average (PAP) Plasma نامیده می‌شد و تعداد پلاکت‌های آن دو برابر خون محیطی بود و قسمت سوم که یک حجم را شامل می‌شد Platelet-Rich-Plasma (PRP) بود که دقیقاً روی باقی‌مانده قرار داشت و غلظت پلاکت‌های آن چهار برابر خون محیطی بود. PPP و PAP توسط پیپت جدا و دور ریخته شدند. پس از آن، قسمت مورد نظر که PRP بود تا حد امکان جدا و میزان پلاکت‌های آن به وسیله‌ی سل کانتور^۳ بررسی و تأیید گردید (میانگین شمار پلاکت‌ها 528×10^3 در میکرولیتر بود).

عفونی نظیر ایدز است که به دلیل اتولوگ بودن آن است (Barber et al. 2009).

با توجه به تأثیر مثبت پلاسمای غنی از پلاکت در ترمیم استخوان و معرفی آن به عنوان یک گرافت مناسب (Gallo et al. 2010, Nagata et al. 2009) و نیز تأیید اثر مفید نانوذرات هیدروکسی آپاتیت در ترمیم استخوان توسط برخی محققان (Gerber et al. 2002)، مطالعه‌ی حاضر با هدف بررسی اثر ترکیبی این دو ماده بر ترمیم نقیصه‌های استخوانی در سگ طراحی گردید.

مواد و روش کار

مطالعه‌ی حاضر روی ۱۵ قلاده سگ نر بالغ ۱/۵ تا ۲ ساله از نژاد بومی مخلوط انجام گردید. حیوانات به طور کامل معاینه شدند. به منظور آماده‌سازی اولیه، به حیوانات مورد مطالعه داروی آرامبخش زایلازین (IM و ۰/۵ mg/kg) به صورت عضلانی تزریق گردید. سپس اقدام به موزنی ناحیه‌ی وسیعی از دو فک تحتانی و نواحی اطراف و نصب آنژیوکت در سیاهرگ صافن شد. بیهوشی با تزریق وریدی ترکیب دیازپام (۰/۲mg/kg) و کتامین (۱۰ mg/kg) انجام شد و به منظور نگهداشت بیهوشی، کتامین با همین دوز تجویز گردید (Hall 2001). پس از القای بیهوشی، با رهیافت خارج دهانی، دسترسی به فک تحتانی حاصل شد. بعد از جداسازی ضریع خارجی، با استفاده از موتور جراحی و ترفین^۱ (با قطر بیرونی ۵ میلی‌متر)، شش عدد نقیصه به قطر ۵ میلی‌متر، عمق ۳ میلی‌متر و با فاصله‌ی ۷ میلی‌متر از یکدیگر در مرز تحتانی فک پایین و در فاصله‌ی ۵ تا ۷ میلی‌متر از سر ریشه‌ی دندان‌ها ایجاد شد (تصویر ۱) (Behnia et al. 2012). در این نقیصه‌ها، نانو ذرات هیدروکسی آپاتیت، ژل پلاکتی، ترکیب ژل پلاکتی / نانو ذرات هیدروکسی آپاتیت، گرانول‌های هیدروکسی آپاتیت و مخلوط ژل

1- Trephine bur

۲- این محصول مربوط به شرکت aap Biomaterials GmbH در کشور آلمان است که از شرکت اعتماد منصور تهیه گردید.

3- Mindray BC-2800 Vet

SPSS نسخه ۱۹ و آزمون 2-related sample مورد ارزیابی آماری قرار گرفتند و $P \leq 0/05$ معنی دار تلقی شد.



تصویر ۱: ایجاد نقیصه با استفاده از ترفاین ۵ میلی متری



تصویر ۲: قرار دادن مواد پیوندی در نقیصه‌ها

پس از تأیید، به منظور فعال کردن پلاکت‌ها از محلول کلرید کلسیم به میزان ۰/۰۵ میلی لیتر به ازای هر میلی لیتر خون استفاده شد. سپس نمونه‌ی فعال شده آماده‌ی به کارگیری در نقیصه‌ها گردید (Anitua 2011). ضمن این که تمامی مراحل آماده‌سازی در فرآیند مذکور در شرایط آسپتیک صورت گرفت.

پس از انجام جراحی، سفازولین با دوز IM و ۲۲mg/kg به مدت ۳ روز به منظور پیش‌گیری از عفونت و مورفین با دوز IM و ۰/۰۴ mg/kg به مدت ۳ روز برای بی‌دردی تجویز شد. سگ‌ها تا خاتمه‌ی تحقیق، به صورت انفرادی در قفس‌های مخصوص، نگهداری شده و با غذای مناسب و آب آزاد، تغذیه شدند. به منظور ارزیابی روند ترمیم نقیصه‌ها گرفتن رادیوگراف در روزهای صفر، هفت، چهارده، بیست و یک، بیست و هشت، سی و پنج، چهل و دو، چهل و نه، پنجاه و شش پس از جراحی انجام شد. لازم به ذکر است، تمامی رادیوگراف‌ها توسط یک متخصص رادیولوژی و به صورت کور گرفته شد و بر اساس جدول ۱ مورد ارزیابی و امتیازدهی قرار گرفتند. در پایان، نتایج به دست آمده با استفاده از نرم‌افزار آماری

جدول ۱: نحوه‌ی امتیازدهی به ترمیم نقیصه‌ها براساس ارزیابی رادیولوژیکی

امتیاز	شرح
۰	امکان مشاهده نقیصه با محدوده‌ی کاملاً مشخص و یا افزایش رادیوآپسیت در محل نقیصه دیده نمی‌شود.
۱	افزایش رادیوآپسیت در محل نقیصه به میزان کم، ولی قابل مشاهده، شروع نشانه‌های پرشدگی نقیصه، ولی محدوده‌ی نقیصه دیده می‌شود.
۲	محدوده نقیصه به واسطه پرشدگی، نامشخص و نامعین شده است و یا افزایش رادیوآپسیت در محل نقیصه دیده می‌شود.
۳	پرشدگی کامل نقیصه و یا عدم مشاهده محدوده‌ی آن، مشابه با استخوان مجاور شده است.

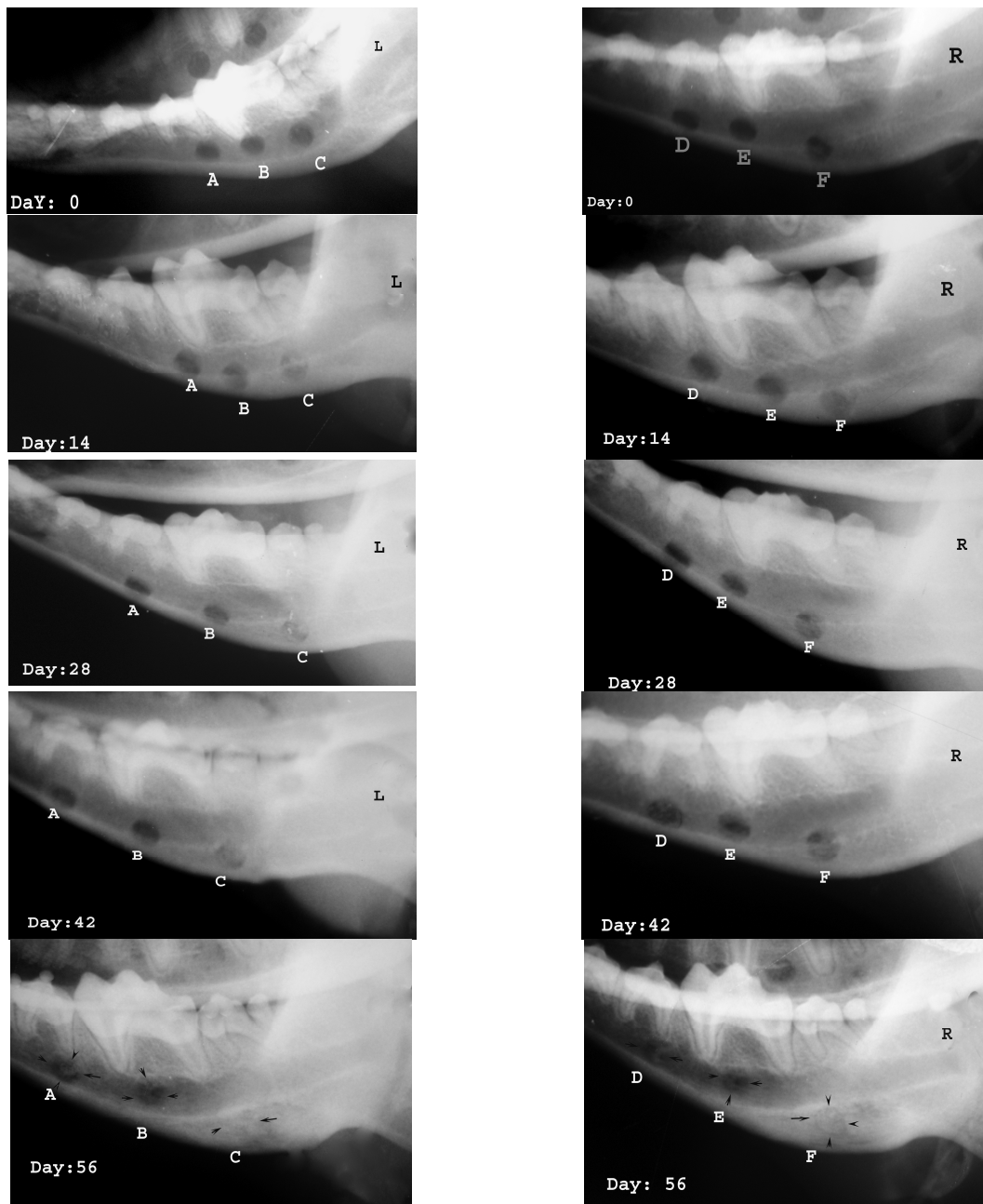
نتایج

در گروه‌های +Hydroxy apatite platelet rich gel و Nanohydroxy apatite+platelet rich gel، میانگین امتیاز بیش‌تری نسبت به گروه‌های دیگر داشته است. این امر نشان می‌دهد شروع واکنش‌های ترمیمی در گروه‌های مذکور بیش‌تر بوده است. هم‌چنین در جدول ۲ مشاهده می‌گردد از روز ۳۵ پس از عمل در گروه Nano HA

میانگین \pm انحراف معیار امتیازدهی به ترمیم نقیصه‌ی استخوانی فک پایین حیوانات مورد مطالعه در جدول ۲ آورده شده است. با مقایسه‌ی بین گروه‌های مختلف در روزهای متفاوت، تفاوت معنی‌داری بین گروه‌ها دیده نشد. با وجود این، همانگونه که در جدول ۲ مشاهده می‌گردد و از تصویر ۳ برمی‌آید، در روز ۲۱ پس از عمل

ترمیم نسبت به گروه کنترل و این امر تا پایان روز ۵۶ ادامه داشته است. فرآیند ترمیم در روزهای ۲۸، ۳۵، ۴۲ و ۵۶ با گروه کنترل مشابه بود.

گروه Nano HA+PRP gel، گروه Nano HA کم تر و در روزهای ۲۸، ۳۵، ۴۲ و ۵۶ در گروه های HA+PRP



تصویر ۳: تصاویر رادیوگرافی از زمان‌های مختلف به منظور ارزیابی روند ترمیم نقایص استخوانی فک پایین با ترکیب ژل غنی پلاکتی و نانو ذرات هیدروکسی آپاتیت در سگ. همان‌گونه که در تصاویر مشاهده می‌گردد در روز ۵۶ بعد از عمل ترکیب ژل پلاکتی و نانوهیدروکسی آپاتیت (D) و نیز ترکیب ژل پلاکتی و هیدروکسی آپاتیت (F) دارای اثر ترمیمی بهتری نسبت به هر کدام از آن‌ها به تنهایی دارند: A: نانوهیدروکسی آپاتیت، B: کنترل (بدون ماده)، C: هیدروکسی آپاتیت، D: ترکیب نانوهیدروکسی - آپاتیت و ژل پلاکتی، E: ژل پلاکتی، F: ترکیب هیدروکسی آپاتیت و ژل پلاکتی.

جدول ۲: میانگین \pm انحراف معیار امتیازدهی به ترمیم نقیصه‌ی استخوانی فک پایین (کنترل (Cont)، هیدروکسی آپاتیت (HA)، نانوهیدروکسی آپاتیت (NanoHA)، ژل پلاکتی (PRP gel)، هیدروکسی آپاتیت و ژل پلاکتی (HA+PRPgel)، نانوهیدروکسی آپاتیت و ژل پلاکتی (NanoHA+ PRP gel).

	گروه					
	روز					
NanoHA+ PRP gel	PRP gel	HA+PRP gel	NanoHA	Cont	HA	
۰/۶±۰/۵۱۶	۰/۶±۰/۵۱۶	۰/۶±۰/۵۱۶	۰/۵±۰/۵۲۷	۰/۵±۰/۵۲۷	۰/۵±۰/۵۲۷	۲۱
۱/۰±۰/۴۷۱	۰/۹±۰/۳۱۶	۱/۰	۱/۰	۰/۹±۰/۳۱۶	۱/۰	۲۸
۱/۶±۰/۵۴۷	۱/۲±۰/۴۴۷	۱/۶±۰/۵۴۷	۱/۶±۰/۵۴۷	۱/۲±۰/۴۴۷	۱/۴±۰/۵۴۷	۳۵
۲/۰	۱/۸±۰/۴۴۷	۲/۰	۲/۰	۱/۸±۰/۴۴۷	۱/۸±۰/۴۴۷	۴۲
۲/۲±۰/۴۴۷	۲/۰	۲/۰	۲/۰	۱/۸±۰/۴۴۷	۱/۸±۰/۴۴۷	۴۹
۲/۲±۰/۴۴۷	۲/۰	۲/۲±۰/۴۴۷	۲/۲±۰/۴۴۷	۲/۰	۲/۰	۵۶

بحث

با قرار دادن ایمپلنت تیتانیومی پوشیده شده با نانوهیدروکسی آپاتیت و نیز تیتانیوم بدون پوشش انجام دادند و به این نتیجه رسیدند که پس از هفته‌ی چهارم ترمیم در گروه ایمپلنت پوشیده شده با نانوهیدروکسی آپاتیت به طور معنی‌داری بیش‌تر بود، از طرف دیگر تحقیقات فراوانی نیز روی پلاسمای غنی از پلاکت صورت گرفته که تعدادی از آن‌ها اثر مثبت این ماده را روی ترمیم استخوان تایید کرده‌اند. برای مثال Kanthan و همکاران در سال ۲۰۱۱ اثر پلاسمای غنی از پلاکت را بر روند ترمیم استخوان در نقیصه‌های ایجاد شده در تیبیای خرگوش بررسی و با ارزیابی رادیولوژیکی مشخص نمودند که میزان ترمیم استخوان در گروهی که پلاسمای غنی از پلاکت به کار رفته بود به طور معنی‌داری از گروه کنترل بیش‌تر بود. در مواردی نیز ترکیب نمودن پلاسمای غنی از پلاکت با مواد پیوندی دیگر موجب افزایش قدرت ترمیمی آن‌ها شده است. عریان و همکاران در سال ۲۰۱۱ اثر ترکیب پلاسمای غنی از پلاکت انسانی و هیدروکسی آپاتیت را در ترمیم نقایص استخوانی در زند زبیرین خرگوش بررسی کردند. ارزیابی رادیولوژیکی مشخص نمود ترکیب هیدروکسی آپاتیت و پلاسمای غنی از پلاکت می‌تواند جایگزینی مناسب برای بازسازی نقایص استخوانی باشد، لذا با توجه به مطالعات صورت

برای ارزیابی قدرت بالقوه ترمیمی ترکیب نانوهیدروکسی آپاتیت و ژل پلاکتی، مدل نقیصه در فک پایین سگ انتخاب شد که این انتخاب به دلیل عدم نیاز به تثبیت خارجی و داخلی در این مدل و نیز عدم وارد آمدن نیروهای خارجی بود که امکان داشت روند ترمیم را مختل کنند. مدل‌های مشابه در استخوان فک پایین رت (Schortinghuis et al. 2003) و در استخوان پیشانی رت (Wiltfang et al. 2004) انجام شده است. به تازگی مواد پیوندی نانوکریستال‌های هیدروکسی آپاتیت برای تقویت روش‌های ترمیم نقیصه‌های استخوانی معرفی شده‌اند (Gerber et al. 2002). مزیت این مواد نسبت به مواد حجیم شامل ارتباط تنگاتنگ با بافت‌های پیرامون و جذب سریع‌تر است (Gerber et al. 2003, Henkel et al. 2005)، به علاوه، یکپارچگی استخوان حفظ شده و نیز بازجذب توسط استئوکلاست‌ها در زمان بازآرایی بافت استخوانی جدید، صورت می‌گیرد (Henkel et al. 2005). Kasaj و همکاران در سال ۲۰۰۸ پاسخ فیروبلست‌های پرپودنتال را نسبت به نانوهیدروکسی آپاتیت بررسی کردند و نتیجه گرفتند که نانوذرات هیدروکسی آپاتیت محرکی قوی برای سلول‌های پرپودنتال و نیز تکثیر آن‌هاست. Meirelles و همکاران در سال ۲۰۰۸ اثر نانوهیدروکسی آپاتیت را بر تشکیل زودرس استخوان بررسی کردند. آن‌ها این کار را

مطالعه‌ی عریان و همکاران در سال ۲۰۱۱ مطابقت داشت. این امر نشان می‌دهد PRP gel قدرت ترمیمی نانوهیدروکسی‌آپاتیت را هم‌چون زمانی که با ذرات هیدروکسی‌آپاتیت ترکیب می‌گردد، افزایش می‌دهد.

هم‌چنین مقایسه‌ی میانگین امتیاز بین گروه Nano HA و گروه HA نشان داد، علی‌رغم نبود اختلاف معنی‌دار بین این دو گروه در روزهای ۳۵، ۴۲، ۴۹ و ۵۶ میانگین امتیاز گروه Nano HA از گروه HA بالاتر بوده است که این امر می‌تواند به دلیل تماس بیش‌تر ذرات نانوهیدروکسی‌آپاتیت با بافت‌های پیرامون، بازجذب سریع‌تر این نانوذرات نسبت به هیدروکسی‌آپاتیت معمولی و تعداد زیاد مولکول‌ها در سطح باشد (Gerber et al. 2003, Henkel et al. 2005). بدین ترتیب با توجه به خصوصیات ذکر شده در مورد نانوذرات هیدروکسی‌آپاتیت از یک سو و خواص مربوط به PRP gel (نظیر دارا بودن فاکتورهای رشد و پروتئین‌هایی مثل فیبرینوزن، فیبرونکتین و ویتروکتین) (Marx 2004) از سوی دیگر، بالا بودن میانگین امتیاز نقیصه‌های پر شده با ترکیب Nano HA+PRP gel نسبت به نقیصه‌های پر شده با HA می‌تواند قابل توجه باشد. هم‌چنین میانگین امتیاز دو گروه Nano HA+PRP gel و HA+PRP gel در روزهای ۲۱، ۲۸، ۳۵ و ۵۶ امتیاز یکسانی را کسب کرده‌اند. همان‌طور که در مطالعه‌ی عریان و همکاران در سال ۲۰۱۱ مشخص شد و در مطالعه‌ی حاضر نیز نشان داده شده است، همراه شدن PRP با HA می‌تواند توانایی این ماده را در ترمیم استخوان ارتقا بخشد به گونه‌ای که در این مطالعه اثر ترمیمی آن مشابه با ترکیب Nano HA+PRP gel گشته است.

در نهایت، بررسی رادیوگرافی نقیصه‌های پر شده با مواد مزبور نشان می‌دهد اگر چه اختلاف معنی‌دار بین گروه ترکیب Nano HA+PRP gel با گروه کنترل وجود ندارد، اما شروع و ادامه‌ی روند ترمیم در مورد گروه Nano HA+PRP gel نسبت به گروه کنترل، سریع‌تر و

گرفته روی نانوهیدروکسی‌آپاتیت و پلاسمای غنی از پلاکت که نتایج آن‌ها ذکر گردید، این فرضیه بر این اساس شکل گرفت که اضافه کردن ژل پلاکتی به ذرات نانوهیدروکسی‌آپاتیت می‌تواند اثر ترمیمی بهتری نسبت به هر کدام از آن‌ها به تنهایی و نیز نسبت به ترکیب ژل پلاکتی و ذرات هیدروکسی‌آپاتیت و نیز هیدروکسی‌آپاتیت تنها داشته باشد.

بررسی رادیولوژیک نمونه‌ها نشان داد که شروع روند ترمیم در نقیصه‌ای که در آن از ترکیب Nano HA+PRP gel استفاده شده بود، نسبت به گروه PRP gel بهتر بوده و این برتری تقریباً تا پایان روز ۵۶ پس از عمل ادامه داشته است. نتایج مطالعات دیگر محققین نیز روند ترمیمی PRP gel را در زمانی که به تنهایی به کار برده شده‌اند به صورت متناقض گزارش داده‌اند. برخی از آن‌ها اثر ترمیمی PRP gel را در اطراف ایمپلنت در ستیج ایلپاک در سگ (Kim et al. 2002) و فک پایین خوک مینیاتوری (Zechner et al. 2003) تأیید و برخی اثرات سودمند ترمیمی این ماده در ترمیم نقیصه‌هایی با اندازه‌های بحرانی در استخوان پیشانی خرگوش (Aghaloo et al. 2002) و نقیصه با اندازه‌ی بحرانی در استخوان پیشانی خوک (Wiltfang et al. 2004) را رد می‌کنند. نتیجه‌ی حاصل از مطالعه‌ی حاضر نیز با نظر گروه دوم موافق است زیرا، چنانچه در جدول ۲ مشاهده می‌شود نقیصه‌هایی که PRP gel به تنهایی در آن‌ها استفاده شده بود نسبت به گروه کنترل از نظر میانگین امتیاز در روزهای ۲۸، ۳۵، ۴۲ و ۵۶ تفاوتی را نشان نداد، اما ترکیب نمودن نانوذرات هیدروکسی‌آپاتیت با PRP gel قدرت ترمیمی بهتری را نسبت به گروه PRP gel در روزهای ۲۸، ۳۵، ۴۲ و ۴۹ و ۵۶ داده است، در حالی که قدرت ترمیمی این ترکیب با گروهی که تنها از ذرات نانوهیدروکسی‌آپاتیت استفاده کرده بود در روزهای ۲۸، ۳۵، ۴۲ و ۵۶ تفاوتی نداشت. از طرف دیگر ترکیب Nano HA+PRP gel میانگین امتیازی بیش‌تری را از گروه HA کسب کرد که این نتیجه با نتایج

اگر چه برای اثبات این ادعا به انجام مطالعات بیش‌تری نیازمندیم.

بیش‌تر بوده است؛ لذا احتمالاً این ترکیب می‌تواند یک جایگزین مناسب برای پر کردن نقیصه‌های استخوانی باشد،

تشکر و قدردانی

تمامی نویسندگان این مطالعه از معاونت پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز جهت حمایت‌های مالی تشکر و قدردانی می‌نمایند.

منابع

- Aghaloo, T.L.; Moy, P.K. and Freymiller, E.G. (2002). Investigation of platelet-rich plasma in rabbit cranial defects: a pilot study. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 60: 1176–1181.
- Anitua, E.; Sanchez, M.; Merayo-Llodes, J.; De la Fuente, M.; Muruzabal, F. and Orive, G. (2011). Plasma rich in growth factors (PRGF-Endoret) stimulates proliferation and migration of primary keratocytes and conjunctival fibroblasts and inhibits and reverts TGF- β 1-induced myodifferentiation. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 52: 6066-6073.
- Barber, H.D.; Myers, R.L. and Iverson, B. (2009). Platelet-rich plasma and bone grafting in implant surgery. In: Fonseca RJ, Editor. *Oral and Maxillofacial Surgery*. 2nd ed. W.B. Saunders, Missouri, PP:501.
- Begley, C.T.; Doherty, M.J.; Mollan, R.A.B. and Wilson, J.D. (1995). Comparative study of the osteoinductive properties of bioceramic, coral and processed bone graft substitutes. *Biomaterials*, 16: 1181–1185.
- Behnia, H.; Khoshzaban, A.; Zarinfar, M.; Mashhadi Abbas, F.; Bahrami nasab, H. Khojasteh, A. (2012). Histological evaluation of regeneration in rabbit calvarial bone defects using demineralized bone matrix, mesenchymal stem cell and platelet rich in growth factor, 30(3): 143-154.
- Cypher, T.J. and Grossman, J.P. (1996). Biological principles of bone graft healing. *Journal of Foot and Ankle Surgery*, 35:413-417.
- Domien, C.J. and Persons, J.R. (1991). Bone graft and bone graft substitutes: a review of current technology and application. *Journal of Applied Biometry*, 2:187-208.
- Esposito, M.; Grusovin, M.G.; Coulthard, P. and Worthington, H.V. (2006). The efficacy of various bone augmentation procedures for dental implants: a Cochrane systematic review of randomized controlled clinical trials. *International Journal of Oral Maxillofacial Implants*, 21:696-710.
- Gallo, I.; Saenz, A.; Artinano, E. and Esquide, J. (2010). Autologous platelet-rich plasma: effect on sternal healing in the sheep model. *Interactive Cardiovascular Thoracic Surgery*, 11:223-225.
- Gerber, T.; Traykova, T.; Henkel, K.O. and Bienengraeber, V. (2002). A new sol-gel derived bone grafting material. *Key Engineering Material*, 218-220: 399–404.
- Gerber, Th.; Traykova, T.; Henkel, K.O.; Bienengraeber, V.; Witt, M. and Koewitz, J. (2003). Silica/calcium phosphate sol-gel derived bone grafting material and bone remodeling. An eight month in vivo study. *Key Engineering Material*, 240–242:411-414.
- Gil-Albarova, J.; Garrido-Lahiguera, L.; Salinasc, Ay.; Roman, J.; Bueno-Lozano, A.L.; Gil-Albarova, R. and Vallet-Regi, M. (2004). The in vivo performance of a sol-gel glass and a glass-ceramic in the treatment of limited bone defects. *Biomaterials*, 25: 4639-4645.
- Grauer, J.N.; Beiber, J.M.; Kwon, B. and Vaccaro, A.R. (2005). The evolution of allograft bone for spinal applications. *Orthopedics Journal*, 28: 573-577.
- Greish, Y.E.; Bender, J.D.; Lakshmi, S.; Brown, P.W.; Allcock, H.R. and Laurencin, C.T. (2005). Low temperature formation of hydroxyapatite-poly(alkyloxybenzoate) phosphazene composites for biomedical applications. *Biomaterials*, 26: 1-9.
- Hall, L.W. (2001). *Veterinary Anesthesia*. 10th ed. W.B. Saunders, London, PP: 371.
- Henkel, K.O.; Bienengraeber, V.; Lenz, S.; Gerber, T.H. (2005). Comparison of a new kind of calcium phosphate formula versus conventional calcium phosphate matrices in treating bone defects—a long-term investigation in pigs. *Key Engineering Material*, 284–286: 885–888.

- Kanthan, S.R.; Kavitha, G.; Addi, S.; Choon, D.S. and Kamarul, T. (2011). Platelet-rich plasma (PRP) enhances bone healing in non-union critical-sized defects: a preliminary study involving rabbit models. *Injury*, 42(8): 782-789.
- Kasaj, A.; Willershausen, B.; Reichert, C.; Zafiroopoulos G.G. and Schmidt, M. (2008). Human periodontal fibroblast response to a nanostructured hydroxyapatite bone replacement graft in vitro. *Archives of Oral Biology*, 53(7): 683-689.
- Kazemi nezhad, I.; Jahangirnejhad, M.; Saki, Gh.; Rahim zadeh larki, M. and Amirpour, Sh. (2013). Evaluation of nanohydroxyapatite powder synthetic by sol-gel combination method and Bio Oss on reconstruction of platelet bone defect in rat, *Jundishapur science medical journal*, 12(2).
- Kim, S-G.; Chung, C-H.; Kim, Y-K.; Park, J.C. and Lim, S-C. (2002). Use of particulate dentinplaster of Paris combination with/without platelet-rich plasma in the treatment of bone defects around implants. *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, 17: 86-94.
- Kong, Y.M.; Bae, C.J.; Lee, S.H.; Kim, H.W. and Kim, H.E. (2005). Improvement in biocompatibility of $ZrO_2-Al_2O_3$ nano-composite by addition of HA, *Biomaterials*, 26: 509-517.
- Marx, R.E. (2004). Platelet-rich plasma: evidence to support its use. *Journal of Oral Maxillofacial Surgery*, 62:489-496.
- Marx, R.E.; Carlson, E.R.; Eichsteadt, R.M., Schimmele, S.R.; Strauss, J.E. and Georgeff, K.R. (1998). Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone graft. *Journal of Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology*, 85: 638-646.
- Meirelles, L.; Arvidsson, A.; Andersson, M.; Kjellin, P.; Albrektsson, T. and Wennerberg, A. (2008). Nano hydroxyapatite structures influence early bone formation. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 87: 299-307.
- Nagata, M.J.H.; Melo, L.G.N.; Messora, M.R.; Bomfim, S.R.M.; Fucini, S.E.; Garcia, V.G. et al. (2009). Effect of platelet-rich plasma on bone healing of autogenous bone grafts in critical-size defects. *Journal of Clinical Periodontology*, 36: 775-783.
- Oryan, A.; Meimandi Parizi, A.; Shafiei-Sarvestani, Z. and Bigham, A.S. (2011). Effects of combined hydroxyapatite and human platelet rich plasma on bone healing in rabbit model: radiological, macroscopical, histopathological and biomechanical evaluation. *Cell Tissue Bank*, 13(4):639-651.
- Sato, M.; Slamovich, E.B. and Webster, T.J. (2005). Enhanced osteoblast adhesion on hydrothermally treated hydroxyapatite/ titania/ poly (lactide-co-glycolide) sol-gel titanium coatings, *Biomaterials*, 26: 1349-1357.
- Schortinghuis, J.; Ruben, J.L.; Meijer, H.J.A.; Bronckers A.L.J.J.; Raghoobar, G.M. and Stegenga, B. (2003). Microradiography to evaluate bone growth into a rat mandibular defect, *Archives of Oral Biology*, 48, 155-160.
- Silva, R.V.; Camilli, J.A.; Bertran, C.A. and Moreira, N.H. (2004). The use of hydroxyapatite and autogenous cancellous bone grafts to repair bone defects in rats. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 34(2): 178-184.
- Siva Rama Krishna, D.; Chaitanya, C.K.; Seshadri, S.K. and Kumar, T.S.S. (2002). Fluorinated hydroxyapatite by hydrolysis under microwave irradiation. *Trends in Biomaterials and Artificial Organs*, 16: 15-17.
- Suchanek, W.; Yashima, M.; Kakihana, M. and Yoshimura M. (1998), Processing and mechanical properties of hydroxyapatite reinforced with hydroxyapatite whiskers, *Biomaterials*, 17: 1715-1723.
- Whang, P.G. and Wang, J.C. (2003). Bone graft substitutes for spinal fusion. *Spine Journal*, 3: 155-165.
- Wiltfang, J.; Kloss, F.R.; Kessler, P.; Nkenke, E.; Schultze-Mosgau, S.; Zimmermann, R. and Schlegel, K.A. (2004). Effects of platelet-rich plasma on bone healing in combination with autogenous bone and bone substitutes in critical-size defects. *Clinical Oral Implant Research*, 15(2): 187-193.
- Yang, Z.; Jiang, Y.; Wang, Y.; Ma, L. and Li, F. (2004). Preparation and thermal stability analysis of hydroxyapatite derived from the precipitation process and microwave irradiation method *Material Letters*, 58: 3586-3590.
- Zechner, W.; Tangl, S.; Tepper, G.; Furst, G.; Bernhart, T.; Haas, R. et al. (2003). Influence of platelet-rich plasma on osseous healing of dental implants: a histologic and histomorphometric study in minipigs. *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, 18: 15-22.

A radiographic survey of mandibular bone defect healing by combination of platelet-rich-plasma (PRP) and nanohydroxyapatite in dog

Rounagh, A.¹; Naddaf, H.²; Esmailzadeh, S.³; Ghadiri, A.²; Najafzadeh Varzi, H.⁴; Kazeminejhad, I.⁵; Rasekh, A.⁶ and Jalalifar, M.A.⁷

Received: 14.12.2013

Accepted: 08.07.2014

Abstract

Nanohydroxyapatite is an osteoconductive agent which has recently been used in some research as a bone graft. It has been showed that these particles increase the rate of bone repair due to advantages such as high purity, having more connections with surrounding cells, faster absorption and greater number of molecules per unit area than conventional hydroxyapatite. On the other hand, platelet-rich plasma is used as a source of osteoinductive factors for bone repair. Thus, the present study was performed to evaluate the efficacy of nanohydroxyapatite and platelet-rich gel combination on healing bone defects. For this study, 15 male dogs were considered. Six circular defects of 5 mm in diameter was created on both sides of mandible and then each defect was filled with one of the following material: conventional hydroxyapatite, nanohydroxyapatite, platelet-rich gel, hydroxyapatite and platelet-rich gel combination, nanohydroxyapatite and platelet-rich gel combination and finally a defect was excluded as the control group. Evaluation of defect healing was performed with radiographs on days 0, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49 and 56. The results showed that nanohydroxyapatite and platelet-rich gel combination can heal faster than nanohydroxyapatite and especially platelet-rich gel alone, but the differences were not significant. Probably, this combination can be considered as an alternative to fill the bone defect. Further studies are needed to substantiate this claim.

Key words: Nanohydroxyapatite, Platelet gel, Mandible, Dog, Healing, Defect

1- Graduated of Veterinary Surgery, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Iran

2- Associate Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Iran

3- Associate Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Iran

4- Professor, Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Iran

5- Associate Professor, Department of Physic, Faculty of Science, Shahid Chamran University of Ahvaz, Iran

6- Professor, Department of Statistics, Faculty of Mathematic and Computer Sciences, Shahid Chamran University of Ahvaz, Iran

7- Instructor, Health research institute, Research Center of Thalassemia and Hemoglobinopathy, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Iran

Corresponding Author: Ghadiri, A., E-mail: alighadiri@scu.ac.ir