

ارزیابی خصوصیات استئوژنیک مغز استخوان و پیوند خودی در سگ

دکتر داود شریفی^۱، دکتر سید حسین مرجانمهر^۲

مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، دوره ۵۶، شماره ۳، ۶۵-۶۱، ۱۳۸۰

مجدداً قرص لوامیزول با همان دوز قبلی به حیوانات خوراندند، که متجموعاً بعد از سه هفته برای عمل آماده گردیدند. دوازده ساعت قبل از عمل پرهیز غذایی داده شده و تحت تزریق پنی سیلین ۶:۳:۳ قرار گرفتند. قبل از القای بیهوشی از کتامین هیدروکلراید به میزان ۵ میلیگرم و آسه پرومازین مالئات به میزان ۰/۰۵ میلیگرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن به عنوان پیش بیهوشی به صورت عضلانی استفاده گردید. حیوانات با تزریق وریدی تیوپنتال سدیم ۵ درصد به میزان ۱۰ میلیگرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن بیهوش شدند و سپس عمق بیهوشی با هالوتان ۱ درصد کنترل گردید. در گروه اول (۵ حیوان) با استفاده از استخوان برقی ۰/۵ سانتیمتر از قسمت وسط استخوان زنده‌ترین چپ برداشته شد. محل توسط مغز استخوان پوشش داده شد و با استفاده از پلت ۴ سوراخه فلزی (DCP)، استخوان ثابت شد و در گروه دوم (۵ حیوان) همانند گروه اول بعد از برداشت ۰/۵ سانتیمتر از وسط استخوان زنده‌ترین چپ، محل توسط استخوان اسفنجی دنده خودی پر شده و سپس به وسیله پلت فلزی ۴ سوراخه، استخوان ثابت گردید.

تهیه نمونه‌های کالوس: در روز ۶۰ پس از کاشت مغز استخوان و گرافت خودی در استخوان زنده‌ترین، تحت بیهوشی عمومی (تیوپنتال سدیم ۲۰ میلیگرم به ازای هر کیلوگرم وزن) از کلیه حیوانات در هر دو گروه نمونه کالوس از محل پیوند، بعد از جداسازی بافت فیبری اطراف، حدود ۱ سانتیمتر تهیه گردید و در محلول ۱۰ درصد فرمالین قرار داده شد. مراحل مختلف کلسیم‌گیری با استفاده از اسید نیتریک انجام گرفت و مقاطع تهیه شده با استفاده از روش H & E رنگ آمیزی شدند.

نتایج

جهت بررسی بهتر و ارزیابی دقیق‌تر ترمیم استخوانی و مقایسه دو نوع گرافت به کار رفته، عوامل تأثیر گذار بر روی شکل‌گیری کالوس در نظر گرفته شد (جداول ۱ و ۲). بدین ترتیب در هر یک از جداول پس از نظر گرفتن شماره نمونه‌ها و نوع بافت پیوندی، شدت واکنش‌های آماسی براساس میزان حضور سلولهای آماسی در بافت همبند مورد بررسی قرار گرفت. سلولهای آماسی مشاهده شده براساس تعداد آنها و فراوانی حضور در نمونه بافتی به سه دسته کم، متوسط و زیاد تقسیم گردیدند (تصویر ۳).

بدین ترتیب که عدم نفوذ سلولهای آماسی یا نفوذ بسیار پراکنده آنها معادل صفر یا مشاهده نگردید، نفوذ پراکنده سلولهای آماسی معادل فراوانی کم، نفوذ سلولهای آماسی به گونه‌ای که جزئیات بافت قابل رؤیت باشد معادل فراوانی متوسط، و نفوذ شدید سلولهای آماسی به طوری که جزئیات بافت قابل رؤیت نباشد معادل فراوانی زیاد درجه‌بندی گردید.

عامل بعدی مورد مطالعه، تشکیل بافت غضروفی از نوع هیالین بود که در صورت مشاهده، نمونه براساس میزان تشکیل آن و وسعت آن، مقادیر ۱+ برای میزان کم بافت تا ۳+ برای نواحی وسیعی از بافت غضروفی در نظر گرفته شد (تصویر ۵). همچنین چون در تمامی نمونه‌ها مقادیر متفاوتی از بافت همبند فیبروزه تشکیل شده بود، وسعت این بافت کلاژنی مشابه بافت غضروفی به سه دسته ۱+ و ۲+ و ۳+ تقسیم گردید (تصویر ۱).

برای این درجه‌بندی نیز با استفاده از کراتیکول شطرنجی با خانه‌های مشخص ابتدا مساحت کلی مقطع بافتی مورد مطالعه برحسب تعداد خانه‌های اشغال شده اندازه‌گیری و محاسبه شد و سپس با تقسیم تعداد خانه‌های مربوط به هر کدام از بافت‌های غضروفی و بافت همبند فیبروزه به طور جداگانه برای هر کدام نسبتی به دست آمد که به صورت درصد و در

در کنار روشهای مختلفی نظیر تثبیت داخلی و خارجی، تحریک الکتریکی، دارو درمانی و پیوند استخوانی که برای درمان و التیام شکستگیها استفاده می‌شود پیوند استخوان با داشتن تحریک و القای استخوان سازی، قدرت بخشیدن به تزیاید سلولهای استخوانی و جلوگیری از کوتاه شدن استخوان شکسته از متداولترین روشهایی است که مورد استفاده قرار می‌گیرد. در این تحقیق از ۱۰ قلابه سگ بالغ و سالم از نژاد مخلوط با میانگین سن ۴/۴± ۳۰ ماه و میانگین وزن ۱۲/۱۲±۲۵ کیلوگرم استفاده شد حیوانات مذکور به دو گروه پنج تایی تقسیم شدند. خصوصیات استئوژنیک مغز استخوان در گروه اول و گرافت خودی (دنده) در گروه دوم مورد ارزیابی قرار گرفت. میزان ۰/۵ سانتیمتر از وسط استخوان زنده‌ترین چپ در کلیه حیوانات برداشته شد و سپس بعد از کاشت مغز استخوان در نقیصه گروه اول و گرافت استخوانی حاصل از دنده در گروه دوم استخوان زنده‌ترین حیوانات با پلیت فلزی (DCP) ۴ سوراخه ثابت گردید. این حیوانات برای مدت ۶۰ روز تحت مراقبت ویژه قرار گرفتند. نتایج بررسی هیستوپاتولوژیک نمونه‌های کالوس از محل پیوند در روز ۶۰ نشان داد که بافت غضروفی، بافت فیبروزه همراه با رسوب کلاژن و تریابیکولهای استخوانی با درصد کمتری در گروه اول و با درصد بیشتری در گروه دوم تشکیل شده است. این امر نشان دهنده روند کند استخوان‌سازی بخصوص در گروه دوم (دنده) می‌باشد. در هر دو گروه تریابیکولهای استخوانی از جنس اولیه یا نابالغ با ضخامت متفاوت مشاهده گردید. وجود استئوبلاستهای فعال با سیتوپلاسم بازوفیلیک در مجاورت تیغه‌های استخوانی نشانگر ادامه روند استخوان‌سازی در هر دو گروه بود که این روند و تراکم بافتی در گروه اول (مغز استخوانی) بیشتر و به مراتب منسجم‌تر و طبیعی‌تر بود.

واژه‌های کلیدی: مغز استخوان، گرافت خودی، سگ.

شکستگی استخوان از رایجترین آسیب‌های نسوج سخت است که در صورت جوش نخوردن و یا تأخیر در جوش خوردن، استخوان از وظایف خود باز می‌ماند. در این ارتباط از روشهایی همچون تحریک الکتریکی، دارو درمانی، کشش ممتد، استفاده از ترکیبات سرامیکی، پیوند استخوان و ... استفاده می‌شود. (۸، ۹، ۱۲). در این میان پیوند استخوان یکی از روشهایی است که با داشتن قدرت تحریک و القای استخوان‌سازی، سرعت بخشیدن به تزیاید سلولهای استخوانی در محل و ایجاد چارچوبی محکم برای تشکیل استخوان جدید، با توجه به موقعیت استخوان شکسته مورد استفاده قرار می‌گیرد. از جمله موارد استفاده از پیوند استخوان، پر کردن حفره‌های ناشی از کیستها، تومورها و تثبیت مفاصل و ارتباط دادن بین قطعات استخوان شکسته می‌باشد (۱۴ و ۱۷). در این بررسی، با در نظر گرفتن خواص بافت‌شناسی و مکانیکی استخوان خصوصیات استئوژنیک مغز استخوان و گرافت خودی حاصل از دنده مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش کار

برای بررسی خصوصیات استئوژنیک مغز استخوان خودی در این مطالعه از ۱۰ قلابه سگ بالغ و سالم و از نژاد مخلوط که با میانگین ۴/۴±۳۰ ماه سن، ۱۲/۱۲±۲۵ کیلوگرم وزن داشتند استفاده گردید. این حیوانات سه هفته قبل از انجام آزمایش، در شرایطی استاندارد نگهداری و بعد از تزریق واکسن هاری، تحت درمان انگل‌زدایی قرار گرفتند. در هفته اول قرص لوامیزول (۵ میلیگرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن)، در هفته دوم قرص انگل‌پرازی کوانتل به میزان ۵ میلیگرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن و در هفته سوم

۱) گروه آموزشی علوم درمانگاهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران.

۲) گروه آموزشی پاتولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران.

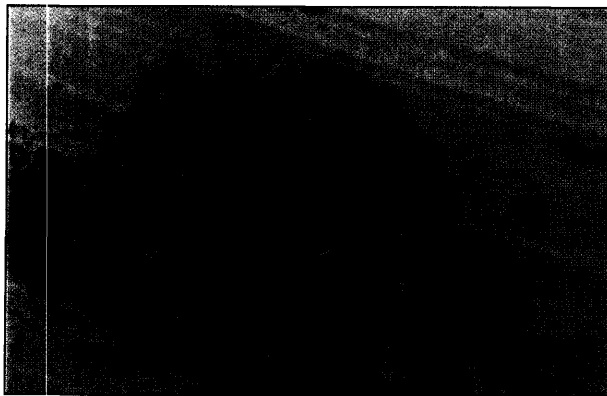




تصویر ۲- ساخته شدن ترابیکولهای استخوانی : در تصویر سلولهای استئوبلاست فعال (پیکان) با سیتوپلاسم بازوفیلیک و اندازه‌های درشت در حال فعالیت و ساختن تیغه‌های استخوانی دیده می‌شوند (H&E× ۲۶۴).



تصویر ۱- تشکیل بافت همبند فیبروزه : در نمای تهیه شده قسمتی از کالوس همراه تیغه‌های استخوانی نابالغ (پیکان) و تشکیل مقدار زیادی بافت همبند فیبروزه در اطراف آن دیده می‌شود (H&E× ۵۳).



تصویر ۴- ترابیکولهای ضخیم استخوانی تشکیل شده در کالوس: در تصویر نمایی کلی از کالوس دیده می‌شود که در آن تشکیل تیغه‌های استخوانی در وسعتی زیاد و با اندازه‌های ضخیم و قابل توجه آشکار است (H&E× ۵۳).



تصویر ۳- حضور واکنشهای آماسی : در اطراف دو تیغه استخوانی نابالغ تشکیل شده تعداد قابل توجهی سلولهای آماسی حضور دارند که بیانگر واکنشهای آماسی با شدت متوسط می‌باشند. به علاوه در مجاورت تیغه های استخوانی در حال تشکیل استئوبلاست فعال (پیکان) مشهود هستند (H&E× ۲۶۴).

تازه تشکیل شده است و بتدریج به تیغه‌های استخوانی بالغ تبدیل شده و آنگاه به آهستگی کم‌کم به تیغه‌های استخوانی بالغ و کوتاه و سخت تبدیل می‌گردد (نقل از: ۷). دوم اینکه ولف معتقد است که کاهش اندازه تیغه‌های استخوان بالغ ممکن است به صورت مستقیم با پهنا و وسعت بریدگی ارتباط داشته باشد. (نقل از: ۱۱ و ۱۲)، هر چند در هر دو گروه با توجه به نمونه‌های کالوس اخذ شده، ترابیکولهای استخوانی از جنس استخوان اولیه یا نابالغ با ضخامت متفاوت مشاهده گردید، ولی در مجاورت تیغه‌های استخوانی سلولهای استئوبلاست فعال وجود داشته که نشانگر ادامه روند استخوان‌سازی می‌باشد. در گروه اول با توجه به استفاده از مغز استخوان ماده محرک استخوان‌سازی بافت همبند فیبروزه سختی از رشته‌های کلژن و غضروف هیالین نسبتاً منظم مشاهده شد که از اطراف شروع و با پیشرفت به سمت مرکز فاصله را پر می‌کند (۱۳) به طوری که در جدول (۱) تشکیل بافت غضروفی از نوع هیالین که با توجه به وسعت آن مورد تأیید قرار می‌گیرد. در صورتی که در گروه دوم (جدول ۲) تفاوت عمده مراحل التیامی در دو گروه در مقدار جایگزین شدن بافت پیوندی در ناحیه بریدگی می‌باشد (۱۳). حتی اگر مقداری از بافت مزانشیم تمایز نیافته با بافت فیبروزه باقی بمانند تشکیل استخوان به کندی صورت می‌پذیرد روی این اصل این نشانه‌ها گواه بر جوش خوردن استخوان می‌نماید، به طوری که بومبرگر و لاکاناس نشان دادند که بی‌حرکت کردن ناحیه بدون برداشت بافت فیبروزه باعث عدم جوش خوردگی استخوان می‌شود (۶).

زیست ملکولی هرچند آگاهی و دانش نسبت به ترمیم بافتهای استخوانی بیشتر شده است، ولی عملکرد مواد بیولوژیکی متعددی که در چند دهه اخیر معرفی و به‌کار گرفته شده، مورد توجه بوده و چگونگی استخوان‌سازی این مواد بیولوژیکی همانند مغز استخوان و دنده مورد بررسی قرار گرفته است.

یافته‌های علمی مربوط به پاسخهای پیوندی در مورد پیوند استخوانی نشانگر این مطلب است که این پروسه با تشکیل لخته در اطراف استخوان پیوند یافته شروع می‌شود ولی نقش لخته در آن هنوز ناشناخته است (۱) و از طرفی اگر چه ممکن است سلولهای پیوندی کمتری در پیوند قادر به ادامه حیات باشند، با این حال اصل پیوند در روند التیام شکستگی خاصیت هدایت استخوانی (osteoconduction) یا القای استخوانی (osteoinduction) دارد (۲).

با توجه به شواهد پاسخهای میزبانی مربوط به گرافت استخوان اسفنجی نسبت به نوع تراکم از نظر سرعت و تکمیل نقیصه متفاوت است، ولی فرضیه به‌کارگیری مغز استخوان خودی شامل عوامل پیشاهنگ استئوژنری می‌باشد (۳ و ۴) و قاعدتاً بایستی سهم عمده ای در تشکیل استخوان داشته باشد.

به لحاظ هیستوپاتولوژی افت تدریجی ترابیکولهای استخوانی در طول زمان تحت تاثیر دو فاکتور می‌باشد. اول اینکه پریچارد معتقد است نوع استخوان جدیدی که در ناحیه بریدگی بوجود می‌آید از تیغه‌های استخوانی





تصویر ۶- تراپیکولهای استخوان نابالغ : در این تصویر بخشی از تیغه‌های استخوانی ضخیم مربوط به تصویر شماره ۴ با درشت‌نمایی قابل دیدن است. در تیغه‌های تشکیل شده چندین ردیف سلولهای استئوسیت در کنار هم دیده می‌شوند که بعلاوه تازه بودن یا نابالغ بودن تیغه استخوانی نحوه قرار گرفتن آنها جهت رشته‌های کلاژن منظم و مرتب نیست (H&E×).

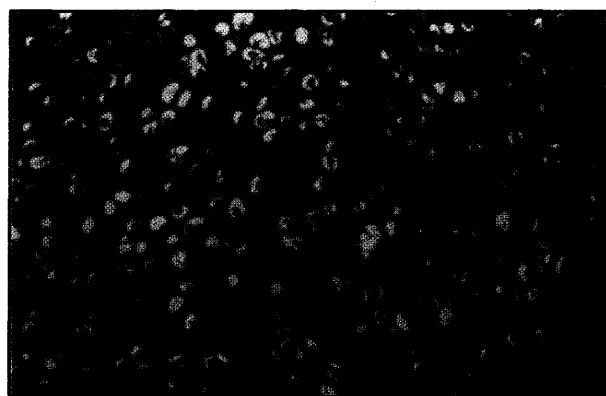
توجه به خصوصیات القای استخوانی مغزاستخوان و دنده از نظر هیستوپاتولوژیکی نشان می‌دهد که کالوس تشکیل شده در ناحیه در فاصله زمانی ۶۰ روز بعد از ایجاد فاصله شکستگی، بیشترین ضخامت در تراپیکولهای استخوانی فراهم آمده و نسبت بالایی از تراپیکولهای استخوانی به بافت غضروفی و فیبروزه به وجود می‌آید.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله مجری طرح و همکاران از شورای محترم پژوهشی گروه علوم درمانگاهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران و معاونت محترم پژوهشی دانشگاه تهران جهت تأیید و تصویب این طرح و حمایت‌های مادی صمیمانه تشکر می‌نمایند.

References

1. Albertson, k.s. (1991): The Use of periosteally Vascularized Autografts To Augment The Fixation of Large Autografts. Clin-Orthop. Rel.Res. 269:113-119.
2. Alexander, J. (1983): Use of a Combination of Cortical Bone Allografts And Cancellous Bone Autograft To Replace Massive Bone Loss In Fresh Fractures And Selected Non-Union J. Am. Anim Hosp Assoc. 14(s): 671-680.
3. Anderson, H-C. (1969): Vesicles Associated With Calcification In The Matrix of Epiphyseal Cartilage. J.Cell. Biol- 41:58.
4. Avany, L. Baranyia, T. Mandi, A. (1980): Arteriographic Studies In Delayed Union And Non-Union of Fractures Radial. Diag. 21:673.
5. Banet. C.A. (1961): Influence of Oxygen Concentration And Mechanical Factors On Differentiation of Connective Tissue In Vitro. Nature. 190:460-461 Cline-Orthop. Rel. Res. 87:49-59.
6. Bolander. M.F. (1992): Regulation On Fracture Repair By Growth Factors: Proc Sco. Exper. Biol Med. 200.165-170.
7. Devies, W.J. And Runjon, C.L. (1996): Effect of Volume Variations On Osteogenic Capabilities of Autogenous Cancellous Bone Graft In Dog. Am. J. Vet. Res. 57(10). 1501-1505.
8. Einhorn, T.A. Simon, G; Devlin V.T. Wloran And J. Sidhusps (1990): The Osteogenic Response To Distant Skeletal Injury. J. Bone. Joint. Surg. 72-A-1278-1374.
9. Gayil, I. Kamish, M. Holymon, L. And Bab, I (1990): Regenerating Marrow Induces Systemic Increase In Osteo Chondrogenesis Endocrinology. 126:2607-2613.
10. Gray. J.C. And Elves, M.W. (1981): Osteogenesis In Bone Graft After Short Term Storage And Topical Antibiotic Treatment. J. Bone. Joint. Surg. 63:441-445.
11. Grover, R.k. And Sobti. V.k. (1998): Clinical. Haematological And Radiological Evaluation of Fragmented Antogenous Cortical Bone Grafting of Radius In Dogs. J. Vet. Med. A. 45.303-308.
12. Johnson, K.A. And Bellenger, C.K. (1980): The Effects of Autogenous Bone Grafting on Bone Healing After Carpal Arthrodesis In The Dog. Vet. Rec. 107(5): 126-132.
13. penwick, R.C. Mosier, D.A. And Clark. D.m. (1991): Healing of Canines Autogenous Cancellous Bone Graft Donor Sites, Vet. Surg. 20 (4). 229-234.
14. Ray, R.D. (1972): Vascularization of Bone Grafts and Implants Clin-orthop. Rel. Res. 87:43.47.
15. Ray, R.D. And Sabet. T.Y. (1963): Bone Graft; Cellular Survival Versus Induction J. Bone, Joint. Surg. 45: 337-344.



تصویر ۵- تشکیل غضروف هیالین : در تصویر منطقه هیپرتروفی از غضروف هیالین تشکیل شده که در آن کندروسیت‌ها هیپرتروفی پیدا کرده‌اند دیده می‌شود (H&E×264).

با توجه به اینکه دنده خود از نظر بافتی از استحکام برخوردار است، ولی مغزاستخوان به دلیل روان بودن آن نیاز به پوششی در اطراف شکستگی دارد تا در محل ثابت بماند و اثرات استخوان‌سازی خود را مستقیماً نشان دهد. عابدی در مطالعه خود نشان داد که استفاده از سیمان استخوانی در محل نقیصه منجر به تشکیل کپسول فیبری می‌شود که خود پوشش خوبی برای نگهداری گرافت استخوانی در محل می‌باشد. با این تفسیر به دلیل وجود کپسول نفوذ عروقی به محل کاهش پیدا کرده و گرافت در مدت زمان بیشتری ولی مستقیماً عمل می‌نماید. بنابراین خون‌رسانی کافی و پایداری قطعات شکسته به‌طور اولیه در التیام شکستگی مهم هستند و فاکتورهای محیطی از قبیل فشار اکسیژن، کشش مکانیکی و فشار در محل شکستگی در مراحل بازسازی موثر می‌باشد (۱۶) در این روش خواص استخوان‌زایی و القا بر استخوان و هدایت استخوانی به وسیله پیوند استخوان اسفنجی تازه به‌وجود می‌آید، ولی این نوع پیوند قادر به تامین مکانیکی ناحیه بریدگی نمی‌باشد (۱۴، ۱۵، ۱۰، ۵) در واقع نتایج به‌دست آمده در این مطالعه با



16. Thomson, (1995): Thomson's Special Veterinary Pathology. Mosby 2nd ed. PP. 423-435.
17. Szentimery, D. Fowler, D. Johnson. G And Wilkinson, A (1995). Transplantation of The Canine Distal Ulna As Free Vascularized Bone Graft, Vet, Surg. 24 (4): 215-225.

Evaluation of osteogenic characteristics of bone marrow and autogeneou bone graft in dog

Sharifi, D.¹, Marjanmehr, H.²

¹*Department of Clinical Sciences Faculty of Veterinary Medicines University of Tehran, Tehran - Iran.* ²*Department of Pathology, Faculty of Veterinary Medicines University of Tehran, Tehran -Iran.*

The fracture is the commenst defect of bone that due to delayed union or non-union losses its actual menchanical function. Now-a-days different methods of internal and external fixation, electrical stimulation, medical regimen, bone graft and etc have been used for acceleration of fractures healing. Bone grafting that acts as scaffold at fracture-site and has potency of osteogenesis, acccelerates cellular differentiation considered to be the latest and commenst method for osteogenesis and shortening healing period. In this study 10 clinically healthy adult mongreal dogs of either sex between 30.0±4.4 months of age and weighting 25.0±5.12 kg Bw were divided into two groups (I&II) of 5 animals each. In group I after removal of 0.5 cm fragment of mid-shaft from left radial bone the space was filled up by bone marrow whereas in group II cancellous rib bone was used to cover the gap. Radial bone was fixed with bone plate in all animals of both groups. There was much more callus formation in group II than group I. The Compactness of callus tissue in group I (bone marrow) was much better than group II with less periosteal reaction Than group II. There was less fibrocartilages Callus tissue with Collagen and bony trabeculae in group I than group II. There was primary and immaturred with different diameter bony trabeculae in both groups having active osteoblastic cells with basophilic cytoplasm nearby bony trabeculae indicating continuation of osteogenesis in animal of both groups. These changes were more compact and near normal in group I animals.

Key words: Bone marrow, Autogenous bone graft-Dog.

