ارزیابی بافت‌شناسی استفاده از ژلاتین ماتریکس استخوان در ترمیم نقص استخوان درشت‌نی در خرگوش

علیقلی سبحانی .Ph.D☆♦، احمدرضا راجی .Ph.D★، بیژن رادمهر .Ph.D★

☆ دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده پزشکی، گروه علوم تشریح

★ دانشگاه فردوسی مشهد، دانشکده دامپزشکی، گروه علوم تشریح

★ دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده دامپزشکی، گروه علوم تشریح

♦آدرس مکاتبه: تهران، صندوق پستی ۷۳۱۳-۱۴۱۵۵، دانشگاه علوم پزشکی تهران، گروه علوم تشریح

چکیده

* **هدف:** استفاده از ژلاتین ماتریکس استخوانی (BMG: Bone Matrix Gelatin) برای هدایت استخوانسازی در ترمیم استخوان درشت‌نی (Tibia) در خرگوش نیوزلندی سفید

* **مواد و روشها:** در این پژوهش برای ارزیابی استخوانسازی تازه در استخوانهای بلند (Tibia) از BMG استفاده شده است. برای این منظور ۶ سر خرگوش نر بالغ با ۲۴ هفته سن، وزن تقریبی ۳/۷۱ کیلوگرم از نژاد نیوزلندی سفید انتخاب و از استخوانهای بلند آنها به روش M.Urist، ژلاتین ماتریکس استخوانی BMG تهیه شد. سپس ۱۲ سر خرگوش از همان نژاد انتخاب و طی عمل جراحی سطح داخلی درشت‌نی پای راست آنها حدود ۲/۵ سانتی‌متر پایین‌تر از کندیل داخلی با استفاده از متهٔ دندانپزشکی به قطر ۳/۵ میلی‌متر سوراخ شد. در ۶ سر از حیوانها در محل سوراخ دو میلی‌گرم از ذرات BMG کار گذاشته شد (نمونه‌های آزمایشی). در ۶ مورد باقی‌مانده (نمونه‌های شاهد) از این ذرات استفاده نشد. برای ارزیابی میزان ترمیم، حیوانها در روزهای ۴۰ و ۶۰ با دوز بالای کلروفرم کشته شدند و از نمونه‌های به‌دست آمده لام بافت‌شناسی تهیه شد. لامها با میکروسکوپ نوری مطالعه شدند. همچنین برای ارزیابی بافت استخوانی متراکم تشکیل شده در گروه آزمایشی با نمونه‌های طبیعی لامهای مشابه از دو نمونه با استفاده از میکروسکوپ نوری و عدسی مدرج مطالعه شد و با روش آماری Mann-Witney non parametric evaluation تجزیه و تحلیل شدند.

* **یافته‌ها:** بررسیهای بافتی نشان داد که در نمونه‌های آزمایشی بافت استخوانی متراکم طبیعی تشکیل یافته اما در گروه شاهد چنین بافتی مشاهده نشد. مقایسه بافت استخوانی تازه تشکیل یافته در نمونه‌های آزمایشی با استخوانهای طبیعی با استفاده از میکروسکوپ نوری و تجزیه و تحلیل آماری نشان‌دهندهٔ جوان بودن این استخوان در نمونه‌های آزمایشی بود.

* **نتیجه‌گیری:** با توجه به قدرت هدایت استخوانسازی BMG در استخوانهای بلند، این ماده می‌تواند کاربرد بالینی داشته باشد.

گل واژگان: ژلاتین ماتریکس استخوان، ترمیم استخوان تیبیا، خرگوش

مقدمه

با توجه به میزان بالای آسیبهای استخوانی (تومورها، کیستها، شکستگیها و...) امروزه محققین عوامل متعددی را در تسریع و تکمیل روند ترمیم استخوان مطالعه می‌کنند که از آن جمله می‌توان به فاکتور رشد فیبروبلاستی (FGF)[1]، فاکتور رشد پلاکتی (PDGF)[2]، پپتید رشد استخوانی (OGP)[3] و ... اشاره نمود (۱). در میان این عوامل پروتئینهای استخوانساز (BMPs)[4] به‌عنوان یک عامل پلی‌پپتیدی در ترمیم استخوانها (۲، ۳، ۴) نظر بیشتری را به خود جلب کرده است.

مطالعات جدید نشان می‌دهد که پروتئینهای (BMPs) از نوع پروتئینهای دایمریک ۳۸-۳۰ دالتونی هستند که رشد و تمایز انواع سلولها از جمله استئوبلاستها، سلولهای عصبی و مرگ سلولهای دیگر نظیر سلولهای عضلانی را سبب می‌شوند (۱). این پروتئینها به گروههای کوچکتری (BMP2-9) تقسیم‌بندی شده‌اند که نقش بعضی از آنها در روند شکل‌گیری اسکلت بدن به اثبات رسیده است.

Dupres با مطالعه روی BMP-2 اعلام نمود که این ماده موجب تحریک سلولهای غضروفی و مهار تکامل سلولهای عضلانی می‌شود (۵).

Lind اثر کموتاکتیک BMP-2، BMP-4 و BMP-6 را بر سلولهای استئوبلاست و سلولهای بافت استخوانی دچار استئوسارکومای انسانی مطالعه کرد و به این نتیجه رسید که BMP-2 در دوزهای مشخص، مهاجرت سلولهای یاد شده را افزایش می‌دهد، بدون آن که BMP-4 و BMP-6 چنین نقشی را داشته باشند (۶). اکثر محققین نقش هدایتی استخوانسازی BMG را به محتویات BMP آن نسبت می‌دهند (۷). اما اغلب از این ماده (BMG) برای هدایت استخوانسازی در داخل عضله یا زیر پوست استفاده نموده‌اند (۸، ۹، ۱۰). به‌هرحال Li از BMP برای ترمیم استخوان فک پایین استفاده کرده و ترمیم کامل استخوان را ۱۰ هفته بعد از عمل گزارش نمود (۱۱). Jin از BMG به‌عنوان ماده القاکننده استخوانسازی در ۳۸ انسان استفاده کرده و نقش هدایت استخوانسازی این ماده را در ۹۵ درصد نمونه‌ها گزارش کرد (۱۲).

Olle نقش BMG را در هدایت استخوانسازی انسان مطالعه نمود که نتیجه رضایت‌بخشی را دربرداشت (۱۳). Hu و همکارانش با کشت ماتریکس ژلاتینی انسانی (hBMG) به‌صورت الوگرافت در عضله چهارسر رانی موش، بعد از ۴-۳ هفته استخوانسازی جدید و مغز استخوان را گزارش کرد (۱۴). کشت استخوان در بافت عضلانی حیوان آزمایشگاهی رت (۱۵، ۱۶) و حتی موش دیابتی نیز با وجود بر هم خوردن متابولیسم مواد معدنی کاملاً مشهود بود (۱۷). به‌هرحال اغلب کارهایی که برای ترمیم استخوان با استفاده از BMG صورت گرفته بیشتر در جراحیهای فک و صورت بوده است که وزنی را تحمل نکرده و به استحکام بالایی نیاز ندارند. در این تحقیق BMG تهیه شده از استخوانهای بلند خرگوش نژاد نیوزلندی سفید برای ترمیم استخوان درشت‌نی (تیبیا) مورد استفاده قرار گرفته و نتایج حاصله بعد از ۴۰ و ۶۰ روز با استفاده از میکروسکوپ نوری مطالعه شده است.

مواد و روشها

* روش نگهداری حیوانات

۱۸ سر خرگوش نژاد نیوزلندی با سن ۲۴ هفته و با وزن تقریبی ۳/۷۱ کیلوگرم از مؤسسه رازی حصارک تهیه شد. خرگوشها در شرایط استاندارد (درجه حرارت ۲۲° و رطوبت ۴۵ درصد) با ۱۲ ساعت نور و ۱۲ ساعت خاموشی و با آب و غذای تهیه شده استاندارد (داخلی) برای حیوان آزمایشگاهی رت نگهداری شدند.

* روش تهیه ژلاتین ماتریکس استخوان (BMG)

۶ سر خرگوش خریداری شده از مؤسسه رازی در این مرحله مورد استفاده قرار گرفتند. خرگوشها با استفاده از دوز بالای کلروفرم کشته شده، پوست روی دست و پای آنها برداشته شد و بافت نرم آنها با دقت کامل جدا گردید. استخوانهای بازو، زند زبرین، زند زیرین، ران و درشت‌نی خرگوش‌ها برداشته شده و در نیتروژن مایع انداخته شد. سپس استخوانها را یکی‌یکی از ظرف نیتروژن مایع بیرون آورده، اپی‌فیزهای آنها را جدا کرده، باقی مانده بافت نرم آن را همراه با پریوست به دقت تمیز کردیم. استخوان‌های به دست آمده با قیچی استخوان‌بر به چند قطعه شکسته شدند.

برای تهیه BMG از روش Urist (۱۸، ۱۹) استفاده شد که خلاصه آن به شرح زیر است:

- استفاده از محلول کلروفرم، متانول به نسبت ۱:۱ به مدت ۴ ساعت در درجه حرارت ۲۵° سانتی‌گراد
- استفاده از محلول اسیدکلریدریک (۰/۶ نرمال) با دو بار تعویض (هر بار ۱۲ ساعت) در دمای ۲° سانتی‌گراد
- استفاده از محلول کلرید کلسیم (۲ مولار) با دو بار تعویض (هر بار ۱۲ ساعت) در دمای ۲° سانتی‌گراد
- استفاده از محلول اتیلن دیامین تتراستیک اسید (EDTA)[5] نیم‌مولار به مدت ۴ ساعت در دمای ۲° سانتی‌گراد
- استفاده از محلول کلرید لیتیم (۸ مولار)، به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲° سانتی‌گراد
- استفاده از آب مقطر ۵۵° سانتی‌گراد به‌مدت ۴ ساعت

تهیه BMG از قطعات استخوانی به دست آمده با استفاده از نیتروژن مایع با ابعاد بین ۵۰۰-۳۰۰ میکرون

لازم به ذکر است که در حد فاصل هر کدام از مراحل، قطعات استخوانی با آب مقطر استریل شستشو داده شدند.

* روش جراحی خرگوشها

۱۲ سر خرگوش به‌وسیلهٔ تزریق داخل عضلانی به‌ترتیب (۲ میلی‌لیتر دیازپام و سپس ۷۵ mg/kg کتامین) بیهوش شدند. دست و

1. Fibroblast Growth Factor
2. Platelet Developmental Growth Factor
3. Osteogenic Growing Peptide
4. Bone Morphogenetic Proteins
5. Etylenediamin Tetraacetic Acid

پای خرگوشها روی یک تخت با ابعاد ۵۰×۴۰ سانتی‌متر با حالت طاقباز بسته شد. سطح داخلی پای سمت راست خرگوشها به‌وسیله تیغ تمیز و با بتادین ضدعفونی شد. با استفاده از لوازم جراحی استریل برشی به‌طول ۲ سانتی‌متر در قسمت پایین کندیل داخلی داده شده و در ۳ سانتی‌متر پایین‌تر از کندیل داخلی سوراخی به قطر ۳ میلی‌متر ایجاد شد. برای پیشگیری از افزایش درجه حرارت، همزمان با چرخش مته در محل، سرم نمکی توسط سرنگ ریخته شد تا سرد شود.

بعد از ایجاد سوراخ در نمونه‌های شاهد (۶ سر) برای جلوگیری از خونریزی از خمیر استخوانی[1] استفاده شد و در نمونه‌های آزمایشی (۶ سر) ۷ ذره BMG در محل کار گذاشته شده و با خمیر استخوانی خونریزی متوقف شد. بعد از اتمام عمل، پریوست را بر روی محل جراحی کشیده و پوست ناحیه با نخ ابریشمی نمره صفر بخیه زده شد. ضمناً در تمام مراحل عمل، بیهوشی خرگوشها به وسیله پنبه آغشته به اتر تحت کنترل بود. خرگوشها بعد از عمل با شرایط قبلی به صورت انفرادی در حیوانخانه نگهداری شدند.

* روش تهیه مقاطع بافتی و مطالعه بافت‌شناسی

خرگوشها در روزهای ۴۰ و ۶۰ (در هر مورد سه قطعه آزمایشی، و سه قطعه کنترل) با دوز بالای کلروفرم کشته شدند. استخوانهای درشت‌نی آنها جدا شده و محل جراحی به فاصله یک سانتی‌متر از بالا و پایین نمونه با اره جدا شد. استخوانها با آرامش شسته شده و در ظروف حاوی فرمالین ۱۰٪ به‌مدت ۱۰ روز قرار داده شدند تا ثابت شوند. برای کلسیم‌گیری از اسیدنیتریک ۵ درصد (به مدت ۱۰ روز) استفاده شد. سپس مراحل پاساژ بافتی شامل آبگیری، شفاف‌سازی، آغشتگی به عمل آمده و نمونه‌ها در پارافین قالب‌گیری شدند.

برشهای بافتی متوالی به‌ضخامت ۵ میکرون با هماتوکسیلین - آئوزین رنگ‌آمیزی شدند و با میکروسکوپ نوری مطالعه شدند.

بررسی آماری

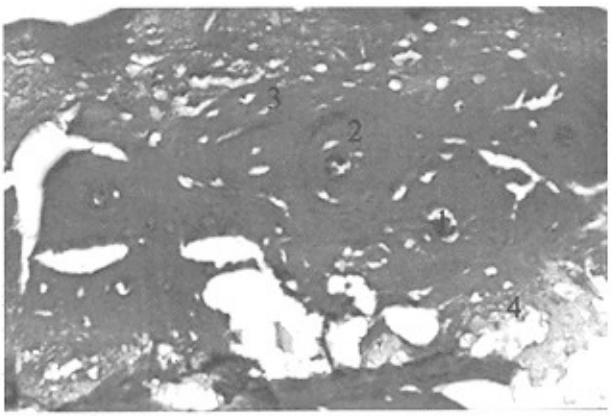
برای بررسی و مقایسه وضعیت بافت استخوانی متراکم تشکیل شده در روز ۶۰ در گروه آزمایشی با استخوان متراکم طبیعی بافتهای موردنظر از سه حیوان آزمایشی و سه حیوان طبیعی به‌طور طولی در پارافین سخت تثبیت شد. برشهای بافتی متوالی با ضخامت ۵ میکرومتر تهیه شد. در هر نسخه ۶ برش با فاصله ۱۵ میکرومتر انتخاب شدند. در هر برش بطور اتفاقی ۵ ناحیه با عدسی چشمی مدرج طبق روش Rubin ارزیابی شد (۲۰)؛ بدین‌صورت که اول تعداد سیستم هاورسی، استئوسیتها و تیغه‌های هاورسی شمارش شدند و بعد با استفاده از صفحه مدرج، قطر سیستم هاورسی، قطر ایجادی هاورسی و قطر تیغه‌های هاورسی اندازه‌گیری شده و در جداول ثبت شد. لازم به توضیح است که بزرگنمایی میکروسکوپ در تمام موارد ۱۶۰ بود.

ارقام بدست آمده با استفاده از روش آماری Mann-Witney non parametric evaluation ارزیابی واقع شدند.

یافته‌ها

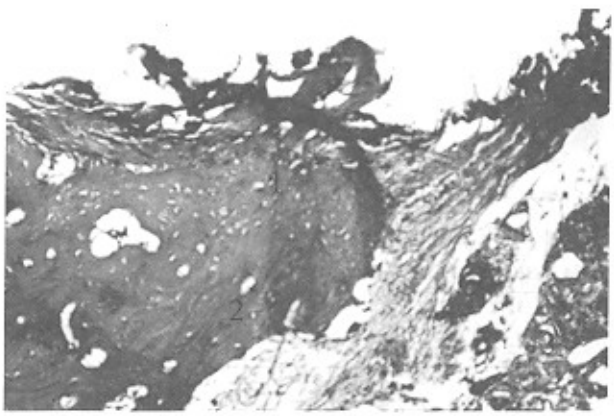
* بافت‌شناسی

مقاطع بافت‌شناسی تهیه شده از نمونه‌های آزمایشی (BMG) در روز ۴۰ نشان‌دهنده تشکیل بافت استخوانی کاملتری نسبت به‌نمونه کنترل است. در این روز در نمونه‌های کنترل فعالیت استخوانسازی ناچیز بود؛ اما در نمونه‌های آزمایشی بافت استخوانی متراکم جوان تشکیل شده به‌طوری که مجاری هاورسی تشکیل شده از ابعاد بیشتری برخوردار بوده، تیغه‌های هاورسی ضخامت بیشتری داشته و استئوسیتهای جوان در اطراف سیستم هاورسی مشاهده شد. همچنین برخی حفرات مربوط به سیستم هاورسی در حال پر شدن بود(شکل ۱).



شکل ۱: مقطع عرضی بافت استخوانی درشت‌نی خرگوش آزمایشی (حاوی BMG) در روز ۴۰ بعد از عمل در محل ضایعه (نمونه 18B) (رنگ‌آمیزی: هماتوکسیلین ـ آئوزین، بزرگنمایی: ×۲۲۰)
۱) مجاری هاورسی، ۲) تیغه هاورسی، ۳) سلولهای استئوسیت، ۴) حفرات استخوانی در حال تشکیل

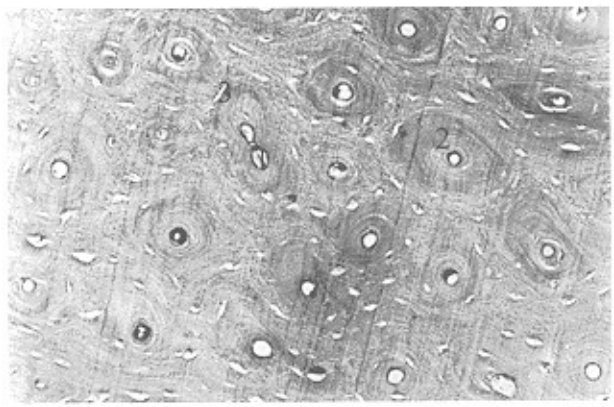
در روز ۶۰ نمونه‌های شاهد، مراکز شکل یافته سیستم هاورسی قابل مشاهده بود، اما از سازمان بندی کاملی برخوردار نبود (شکل ۲) اما در نمونه‌های آزمایشی، استخوان متراکم و سیستم‌های هاورسی کاملاً حالت طبیعی را نشان می‌دهد.



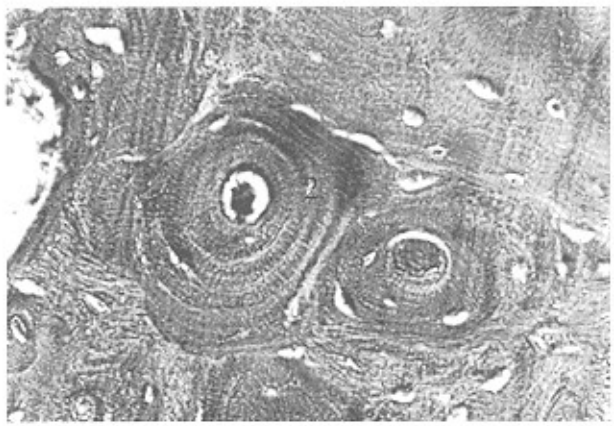
شکل ۲: مقطع عرضی بافت استخوانی درشت‌نی خرگوش کنترل در محل نقص در روز ۶۰ بعد از عمل (نمونه 11C) (رنگ‌آمیزی: هماتوکسیلین ـ آئوزین، بزرگنمایی: ×۱۶۰)
۱) مجاری هاورسی، ۲) سلولهای استئوسیت، ۳) تیغه‌های استخوانی در حال تشکیل

1. Bone vax

با این حال هنوز هم کانالهای هاورسی قطورتر بوده، تیغه‌های استخوانی ضخامت بیشتری نسبت به حالت طبیعی داشته و از تعداد کمتری برخوردار است. همچنین زیاد بودن استئوسیت‌ها نشان دهنده جوان بودن سیستم‌های هاورسی و تازه تشکیل شدن آنها در محل ترمیم است (شکل ۳ و ۴).



شکل ۳: مقطع عرضی بافت استخوانی درشت‌نی خرگوش آزمایشی (حاوی BMG) در روز ۶۰ بعد از عمل در محل ضایعه (نمونه 12B). (رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین - آئوزین، بزرگنمایی: ۱۶۰x)
۱) مجاری هاورسی، ۲) تیغه‌های استخوانی، ۳) سلول‌های استئوسیت



شکل ۴: مقطع عرضی بافت استخوانی درشت‌نی خرگوش آزمایشی (حاوی BMG) در روز ۶۰ بعد از عمل در محل ضایعه (نمونه 5B). (رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین - آئوزین، بزرگنمایی: ۲۲۰x)
۱) مجاری هاورسی، ۲) تیغه‌های استخوانی، ۳) سلولهای استئوسیت

استخوانی حاصله از نمونه‌های آزمایشی (حاوی BMG) نسبت به استخوانهای طبیعی، ۶ عامل مهم که در بخش مواد و روشها به آنها اشاره شد، در استخوانهای متراکم مورد بررسی قرار گرفت که نتیجه آنالیز آماری طبق جدول ۱ به شرح زیر است:

۱) میانگین قطر سیستم هاورسی در نمونه‌های مورد آزمایش (حاوی BMG) ۹۸/۳۴±۱/۵۲۹ و در گروه طبیعی ۸۸/۱۵±۱/۳۴۴ میکرون است که از لحاظ آماری اختلاف معنی داری دارند (P=0.000).

۲) میانگین قطر کانالهای هاورسی در نمونه‌های مورد آزمایش (حاوی BMG) به طور متوسط ۱۴/۷۱±۱/۶۳۷ و در گروه طبیعی ۱۰/۴۵±۰/۲۳۲ است که از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری مشاهده می‌شود (P=0.000).

۳) قطر تیغه‌ها در نمونه‌های مورد آزمایش (حاوی BMG) به طور متوسط ۹/۷۷±۰/۸۰۹ و در گروه طبیعی ۸/۲۹±۰/۱۸۷ که از لحاظ آماری اختلاف معنی داری است (P=0.000).

۴) میانگین تعداد سلولهای استئوسیت در نمونه‌های مورد آزمایش (حاوی BMG) به طور متوسط ۴/۹۷±۰/۶۵۹ و در گروه طبیعی ۳/۶۲±۰/۰۹۹ است که از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری مشاهده می‌شود (P=0.000).

۵) میانگین تعداد تیغه‌ها در نمونه مورد آزمایش (حاوی BMG) ۳/۴۰±/۱۴۷ و در گروه طبیعی ۳/۶۹±۰/۰۹۰ است که از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری وجود دارد (P=0.000).

۶) تعداد سیستم‌های هاورسی در هر میدان میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۱۶۰ میکرون در گروه آزمایشی (حاوی BMG) ۹/۴±۰/۶۴۱ و در گروه طبیعی ۱۳/۳۳±۰/۳۱۳ است که از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری مشاهده می‌شود (P=0.000).

بحث

در شکستگیهای ثابت[1] که جداشدگی در استخوان ایجاد نمی‌شود، نیروهای منتقل‌شونده از بافت استخوانی سالم اتفاق افتاده و لذا میزان و سرعت ترمیم کندتر از شکستگیهای غیرثابت[2] است (۲). استفاده از عوامل تحریک‌کننده استخوانسازی نظیر فاکتور رشد انتقالی (TGF-B)[3] و BMPs می‌تواند در چنین نقصهایی تشکیل بافت استخوانی را تسریع بخشیده و موجب ترمیم کامل این نقایص شود (۲۱، ۲۲، ۲۳).

جدول ۱: مقایسه بین میانگین قطر سیستم، کانال، تیغه‌های هاورسی و تعداد سلولها، تیغه‌ها و سیستم هاورسی

نوع نمونه	قطر هر سیستم هاورسی (میکرون)	قطر هر کانال هاورسی (میکرون)	قطر هر تیغه هاورسی (میکرون)	تعداد سلولها در هر سیستم هاورسی	تعداد تیغه‌ها در هر سیستم هاورسی	تعداد سیستم هاورسی در هر واحد
نمونه‌های BMG	۹۸/۳۴±۱/۵۲۹	۱۴/۷۱±۱/۶۳۷	۳/۴۰±۰/۱۴۷	۴/۹۷±۰/۶۵۹	۹/۷۷±۰/۸۰۹	۹/۴۰±۰/۶۴۱
نمونه‌های طبیعی	۸۸/۱۵±۱/۳۴۴	۱۰/۴۵±۰/۲۳۲	۳/۶۹±۰/۰۹۰	۳/۶۲±۰/۰۹۹	۸/۲۹±۰/۱۸۷	۱۳/۳۳±۰/۳۱۳

یافته‌های آماری

برای تشخیص وضعیت بافت استخوانی متراکم ایجاد شده در محل ترمیم و همین طور برای مقایسه وضعیت بالغ یا نابالغ بودن بافت

1. Stable fracture
2. Unstable fracture
3. Transforming Growth Factor-B

در این مطالعه در نمونه‌های کنترل که از عوامل تحریک‌کننده استخوانسازی استفاده نشده بود، ۴۰ روز بعد از عمل جراحی بافت استخوانی تازه تشکیل شده خیلی ناچیز بود؛ در صورتی که نمونه‌های آزمایشی که در آنها برای تحریک استخوانسازی از BMG استفاده شده بود بافت استخوانی متراکم (سیستم هاورسی) جدید، جوان و فعال مشاهده شد که از علایم آن می‌توان به بالا بودن قطر سیستم هاورسی، قطر تیغه‌های هاورسی و بالا بودن میزان سلولها اشاره کرد. تعدادی از محققین با کارگذاری BMP در شکستگی زند زیرین[1] ۱۹ قلاده سگ، تغییرات بافتی را در ۳ ماه بعد از جراحی بررسی کرده و تسریع روند ترمیم را بدین صورت گزارش نمودند که ابتدا حضور عروق خونی در محل منجر به پیدایش سلولهای استئوبلاست شده و سپس تیغه‌های استخوانی و مغز استخوان در محل مشاهده می‌شود. ایشان چنین بیان داشتند که حضور BMP در محل شکستگی موجب تمایز سلولهای نمایزنیافته دور عروقی[2] شده و منجر به تشکیل سلولهای استئوبلاست می‌شود (۱۳، ۱۶). با توجه به این که در این مطالعه BMG مورد استفاده حاوی BMP است (۷)، می‌توان چنین استنباط کرد که استخوانسازی فعال در نمونه‌های آزمایشی ناشی از همان BMP است.

در نمونه‌های آزمایشی این مطالعه که بعد از ۸ هفته بررسی شد، یک مدل استخوانی متراکم[3] نزدیک به حالت طبیعی مشاهده شد؛ در صورتی که در نمونه‌های شاهد، استخوان متراکم را در دو طرف می‌بینیم که اندکی بافت استخوانی اسفنجی[4] در وسط دارد که توسط رشته‌های کلاژن در بر گرفته شده است. نتایج این مطالعه با یافته‌های Chakkalakal که در ترمیم شکستگی استخوان نازک نی[5] موش از DBM استفاده کرده بود (۲۳، ۲۴) مطابقت دارد. شاید دلیل این تطابق وجود BMP موجود در هر دو ماده BMG و DBM (۲۶، ۲۷) باشد.

در این مطالعه برای مقایسه استخوان متراکم تازه تشکیل شده در نمونه‌های آزمایشی (حاوی BMG) با نمونه‌های استخوان متراکم طبیعی، ۶ عامل شناخته شده موثر که می‌تواند نشان‌دهندهٔ بلوغ و استحکام بافت استخوانی متراکم باشد مورد مطالعه و آنالیز آماری قرار گرفت. این بررسی نشان داد که استخوان متراکم تشکیل شده (در ماه دوم) در نمونه‌های آزمایشی نسبت به نمونه‌های طبیعی دارای سیستم هاورسی، قطر کانالهای هاورسی و ضخامت تیغه‌های استخوانی قطورتر و ضخیم‌تر هستند. همچنین در گروه آزمایشی میانگین تعداد تیغه‌های هاورسی و سیستم هاورسی کمتر و سلولهای استئوسیت بیشتر است. مجموعه این نتایج نشان‌دهندهٔ استخوان متراکم جوان است (۲۸). این نتیجه با توجه به این که در نمونه‌های شاهد حتی سازمان‌بندی ویژه استخوان متراکم در این مدت زمان مشاهده نشده است کاملاً رضایت‌بخش است. با توجه به این که نویسندگان این مقاله در مورد بررسی مورفولوژیکی و آنالیز آماری استخوان تازه تشکیل شده با مشتقات BMG مرجع خاصی را پیدا نکردند، شاید مطالعه نقش BMG در هدایت استخوانسازی از این دیدگاه برای اولین بار باشد. به هر حال نتیجه نهایی این کار را می‌توان به‌صورت زیر جمع‌بندی کرد: نظر به امکان تهیه BMG از استخوان‌های بلند در تمام گونه‌های حیوانی به میزان مورد نیاز و خاصیت القایی مطلوب آنها در استخوانسازی، سهولت نگهداری و حمل آن در درجه حرارت معمولی و بالاخره امکان استفاده از آن به میزان مورد نیاز، می‌توان از BMG به عنوان یک ماده پیوندی در ترمیم نقصهای استخوانی استفاده نمود.

References

1. Carl A: Recombinant bone morphogenetic Proteins: Novel substances for enhencing bone healing. Vet Sur 1993; 24: 408-419
2. Horisalca Y: Subperiosteal implantation of bone morphoyenetic protein absorbed to hydroxiapatite. Clin Orthop Res 1991; 268: 303-312
3. Aspenburg P: BMP-2 for intramuscular bone induction: effect in squirrel monkeys is dependemt on implantation site. Act Orthop Scand 1996; 67(1): 3-6
4. Itoh T: Repair of ulnar Segmental defect by recombinant human bone morphogenetic protein-2 in dogs. J Vet Med Sci 1998; 60(4): 451-458
5. Dupres DM: Bone morphogenetic Protein-2 (13 MP-2) inhibits muscle development and Promotes cartilage Formation in Chick limb bud cultures. Develop Biol 1996; 174: 448-452
6. Lind M: Bone morphogenetic Protein-2 but not bone morphogenetic Proteins-4 and -6 stimulates chemotactic migration of human osteoblast, human marrow osteoblasts and u2- os cells. Bone 1996; 180: 53-57
7. Thomas A: The healing of segmental bone defects induced by demineralized bone matrix. J Bone Joint Sur 1983; 66 A(2): 274-276
8. Okamato Y: Muscle tissue reaction to implantation of bone matria gelatin. Clin Orthop 1991; 263: 242-253
9. Yamashita K: Calcification Proceding new bone formation induced by demineralized bone matrix gelatin. Arch Histol Cytol 1992; 55(1): 31-43
10. Yasko AW: The healing of segmental bone defects, induced by recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2). J Bone Joint Surg 1992; 47- A: 659-671
11. Li F, Weng Ty, Xia Ra, Ma ZR: The clinical application of human bone Matrix gelatin. J Tongi Med

1. Ulna
2. Pericyte
3. Compact bone
4. Cancelleus
5. Fibula

Univ, 1995; 15: 90-94
12. Jin DD: Bone matrix gelatin. Clinical application in 38 cases. Chumg Hua Wai Tsa Chih, 1991; 29: 312-314
13. Olle S: Bone repair induced by bone morphogemetic protein in ulnar defects in dogs. J Bone Joint Surg 1989; 68-B(4), 635-642
14. Hu X: Experimental and clinical investigation of human insoluble bone matrix gelatin. Clin Orthop 1993; 293: 360-365
15. Yamashita K: Ultrastrueture of calcified muscle fibers at the implantation site of demineralized bone matrix gelatin. Int J Exp Path 1993; 74(6): 547-552
16. Horisaka Y: Histological changes of implanted collagen material during bone induetion. J Bio Mat Res 1994; 28: 97-103
۱۷. سبحانی علیقلی، یاماشیتا کیکوجی، احمد حسینی، مجتبی رضازاده: اثر دیابت آزمایشی در کالسیفیکاسیون بدون سلولی در استخوانسازی جدید با استفاده از ژلاتین ماتریکس استخوان. مجله پزشکی کوثر، سال ۱۳۷۷، شماره ۳، صفحات ۱۸۹-۱۸۳
18. Urist MR: Bone formation by autoinduetion. Sciences 1965; 150: 983-989
19. Urist MR: Bone Morphogenesis in implants of insoluble bone gelatin. Proc Natl Acudosci USA 1973; 70: 3511-3515
20. Rubin CT: Morphologic stages in lamelar bone formation stimulated by potent mechanical stimulus. J Bone Min Res 1995; 10(3): 488-495
21. Mathias PG Bostron: Expresion of bone Morphogenetic Proteins in Fracture healing. Clin Orthop Rel Res 1998; 3555: 116-123
22. Mathias Bostron, Josef M Lane: Use of morphogenetic protein-2 in the rabbit ulnar nonunion model. Clin Orthop Rel Res 1996; 273: 272-282
23. Joyce ME, Belander ME: Transforming growth Factor - beta in the regulation of fracture repair. Orthop Clin North Am 1990; 21: 119-209
24. Chakkalakal DA: Mineralization and PH relations ships in healing skeletal defects grafted with demineralized bone matrix. J Biomed Mater Res 1994; 28(12): 1439-1443
25. Chakkalakal DA: Repair of segmental bone defects in the rat: an experimental model at human fracture healing Bone 1999; 25(3): 321-332
26. Douglas J: Respons to demineralized bone matrix implantation in foals and adult horses. Amer J Vet Res 1995; 56(5): 649-659
27. Aspenberg P: Failure of bone induction by bone matrix in adualt monkeys. J Bone Joint Sur 1988; 70-B(4): 625-627
28. Luis Carlos Junqueira: Basic Histolo. 2ed 1998; PP 134-151