

بررسی تغییرات هیستوپاتولوژیک به دنبال تجویز موضعی فیبرین غنی از پلاکت در جراحی برداشت سر و گردن استخوان فمور در خرگوش

گلدوزان، ک.^۱، مسلمی، ح.م.^{۲*}، جواهری وایقان، ع.^۳، احمدی همدانی، م.^۴.

پذیرش: ۱۴۰۰/۰۵/۲۴

دریافت: ۱۴۰۰/۰۱/۲۸

خلاصه

هدف از انجام این مطالعه بررسی تغییرات هیستوپاتولوژیک به دنبال تجویز فیبرین غنی از پلاکت موضعی (PRF) در محل برداشت سر و گردن استخوان فمور در خرگوش بوده است. در این مطالعه تعداد ۲۰ سر خرگوش سفید نیوزیلندی تحت جراحی برداشت سر و گردن استخوان فمور (FHO) قرار گرفتند. سپس در گروه درمانی محل برش با PRF خودی پر گردید. حیوانات در بازه‌های زمانی دو و چهار هفته‌گی آرام‌کشی شده و استخوان فمور از ناحیه‌ی راسی به طول ۲ سانتی متر همراه با بافت‌های ترمیمی اطراف ناحیه جدا شد و پس از تهیه‌ی مقاطع میکروسکوپی، نمونه‌ها با هماتوکسیلین-ائوزین و ماسون تری کروم رنگ آمیزی شدند. در ادامه در کلیه‌ی نمونه‌ها میزان تشکیل بافت‌های جوانه‌گوشتی، غضروف و استخوان مورد بررسی قرار گرفت. یافته‌ها نشان داد که در گروه درمان شده با PRF، نسبت تشکیل بافت‌های غضروفی و استخوانی به بافت جوانه‌ی گوشتی در مقایسه با گروه کنترل بطور معناداری بیشتر بوده است که نشانگر سرعت بیشتر ترمیم در ناحیه‌ی آسیب دیده است. همچنین در گروه درمانی، تشکیل بافت‌های غضروف و استخوان در روند ترمیم از نظم بیشتری برخوردار بود. نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که استفاده از فیبرین غنی از پلاکت می‌تواند باعث تسریع در روند ترمیم بافت استخوانی بریده شده در راس استخوان فمور در خرگوش گردد. در نتیجه به نظر می‌رسد بتوان روش استفاده از PRF را به عنوان یک روش درمانی جهت تسریع در ترمیم استخوان در این موارد پیشنهاد نمود.

واژه‌های کلیدی: فیبرین غنی از پلاکت، برداشت سر و گردن فمور، خرگوش

۱. دانش آموخته دکتری عمومی دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه سمنان، سمنان، ایران.
۲. استادیار گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه سمنان، سمنان، ایران.
۳. استادیار گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه سمنان، سمنان، ایران.
۴. دانشیار گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه سمنان، سمنان، ایران.

*نویسنده مسئول : h.moslemi@semnan.ac.ir

جداسازی گلبول‌های قرمز و مایع شفاف رویی، شامل پلازما و لکوسیت‌ها می‌شود. بسیاری از سلول‌ها به همراه پلاکت‌ها در یک ماتریکس فیبرینی به دام می‌افتند که در فرآیند بازسازی بافت‌ها موثرند (Choukroun و همکاران، ۲۰۰۶؛ Dohan Ehrenfest و همکاران، ۲۰۱۰؛ Martin و همکاران، ۲۰۰۵). این ترکیب دارای مقادیر زیادی از عوامل رشد شامل فاکتور رشد تغییرشکل دهنده‌ی بتا ($TGF-\beta$)، فاکتور رشد فیبروبلاستی (FGF) و فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (VEGF) است که آنها را در طی هفت روز آزاد می‌کند. همچنین شامل مقادیری از سیتوکین‌های $IL-1b$ ، $IL-6$ و $TNF-\alpha$ می‌باشد. فیبرین موجود در PRF، همراه با سایر اجزای بیوشیمیایی آن، اثرات سینرژیک در فرآیند التیام را ایفا می‌کند. اگرچه نتایج به دست آمده از PRF در درمان‌های مختلف بسیار موفقیت آمیز بوده، اما هنوز هم مطالعات بیشتری لازم است (Bansal و همکاران، ۲۰۱۷؛ Borie و همکاران، ۲۰۱۵).

از آنجایی که در شرایط کنونی، انجام جراحی FHO معمول‌ترین روش در درمان بیماری هیپ‌دیسپلازی می‌باشد، بنابراین استفاده از ترکیبات محرک جهت تقویت و تسریع رشد بافت جبرانی در محل برداشت استخوان می‌تواند منجر به بازگشت وضعیت حرکتی نرمال در حیوان و تسریع در ایجاد مفصل کاذب در محل گردد. لذا در این تحقیق با مطالعه‌ی تجربی جراحی برداشت سر و گردن استخوان ران در خرگوش و بکارگیری فیبرین غنی از پلاکت در موضع، سرعت تشکیل مفصل کاذب و بافت فیبروز در فرآیند التیام مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش کار مدل حیوانی

در این مطالعه از ۲۰ سر خرگوش سفید ماده با وزن $0.5 \pm$ ۲ کیلوگرم و در دو گروه درمان شده با PRF خودی و گروه کنترل (نرمال سالین)، هرکدام ده قطعه، استفاده شد. به منظور پرهیز از استرس و سازگار شدن حیوانات با محیط، هیچگونه آزمایشی به مدت دو هفته روی آنها صورت نگرفت و تمامی حیوانات تحت شرایط محیطی و تغذیه‌ای یکسان نگهداری شدند. تغذیه خرگوش‌ها با استفاده از پلت آماده‌ی مخصوص حیوانات آزمایشگاهی صورت گرفت و آب

برداشت سر و گردن استخوان فمور، درمان جراحی انتخابی در موارد تروماتیک یا آسیب‌های مزمن در مفصل لگن است. این جراحی علاوه بر توقف روند پیشروی عارضه، پس از ایجاد بافت فیبروزی در سطح استخوان ران، باعث بهبود علائم بالینی و از بین رفتن درد نیز می‌گردد. آرتروپلاستی مفصل ران در بسیاری موارد از جمله دیسپلازی، استئوآرتریت مفصل، شکستگی سر استخوان ران و دررفتگی‌های مفصل ران کاربرد دارد. همچنین در مواردی که استفاده از پروتز در مواقع از بین رفتن حفره استابولوم و سر و گردن استخوان ران با شکست مواجه شده و نیز در موارد نکرور سر و گردن استخوان ران کاربرد دارد. به همین دلیل، اغلب جراحان، برداشت سر و گردن استخوان ران را به عنوان یک روش نهایی در نظر می‌گیرند (DeCamp و همکاران، ۲۰۱۶).

توده عضلانی اطراف مفصل یکی از متغیرها در تخمین نتایج این روش درمانی است. بیماران بعد از جراحی FHO درجات کمی از کوتاهی اندام و اختلالات حرکتی را نشان می‌دهند. هرچند این حیوانات با انجام توانبخشی مستمر می‌توانند به زندگی فعال خود برگردند. پس از این جراحی، تشکیل بافت فیبروزه در محل بریده شده‌ی استخوان، مفصل کاذبی را تشکیل می‌دهد. این عمل با درد و التهاب در ناحیه‌ی مفصل لگنی-رانی همراه است. با محدود کردن تماس استخوانی بین ران و لگن، در هنگامی که بافت اسکار در حال تشکیل شدن است، کنترل درد انجام می‌شود. هرچند انجام ورزش و فیزیوتراپی روزانه با درد همراه است ولی تاثیر بسزایی در تسریع بهبودی و تشکیل بافت فیبروز دارد (Griffin و همکاران، ۲۰۱۲).

فرآورده‌های غنی از پلاکت به دو دسته‌ی کلی نسل اول یا پلاسمای غنی از پلاکت (Platele Rich Plasma, PRP) و نسل دوم یا فیبرین غنی از پلاکت (Rich Fibrin, PRF) تقسیم می‌شوند. PRF یک ماده‌ی مبتنی بر فیبرین است که باعث غنی شدن فیبرین با پلاکت‌ها و عوامل رشد می‌شود. پلیمر شدن آهسته در حین سانتریفیوژ، ساختار فیبرینی و ژلاتینی، سهولت آماده سازی و عدم نیاز به ترومبین گاوی و کلرید کلسیم جهت فعال سازی آن، باعث می‌شود که PRF نسبت به PRP برتری داشته باشد (Pradeep و همکاران، ۲۰۱۲). در فرآیند تهیه فیبرین غنی از پلاکت، سانتریفیوژ با سرعت بالا منجر به

نیز بصورت آزاد در اختیار حیوانات قرار داده شد. پروتکل این مطالعه مطابق اصول اخلاقی مورد تأیید کمیته‌ی پژوهش دانشکده‌ی دامپزشکی دانشگاه سمنان (کد: E-97-10) انجام گردید.

نحوه‌ی تهیه PRF

به صورت جداگانه از قلب هر خرگوش مقدار ۶ سی سی خون اخذ و در لوله‌های آزمایش شیشه‌ای فاقد ماده ضد انعقاد ریخته شد. نمونه‌ها تحت سانتریفیوژ با دور ۳۰۰۰ در دقیقه و به مدت ۱۰ دقیقه قرار گرفتند. پس از اتمام سانتریفیوژ، سه لایه‌ی مشخص شامل پلاسما در بالا، لخته‌ی فیبرینی حاوی پلاکت‌ها و گلبول‌های سفید در وسط و گلبول‌های قرمز در پایین مشاهده شد (نگاره‌ی ۱، الف). در ادامه لخته‌ی PRF ایجاد شده توسط پنس استریل جدا شده و مورد استفاده قرار گرفت (نگاره‌ی ۱، ب).

روش جراحی

در روز جراحی، پس از کارگذاری کاتتر وریدی در سیاهرگ جانبی گوش، الفای بیهوشی با ترکیب دو داروی کتامین هیدروکلراید (ساخت شرکت آلفاسان هلند) با دوز mg/kg ۶۰ و زایلازین هیدروکلراید (ساخت شرکت آلفاسان هلند) با دوز mg/kg ۵ انجام گردید. همچنین به منظور ایجاد بی‌دردی حین جراحی، میزان $0/5$ سی سی لیدوکائین ۲٪ در محل لامبوساکرال تزریق شد.

در ادامه آماده سازی اسپتیک و شان گذاری در ران پای راست انجام گرفت. پس از شروع بیهوشی، برای دسترسی به مفصل لگنی، با استفاده از رهیافت قدامی-جانبی، برشی به طول ۱۰ سانتی متر در پوست داده شد. پس از کنار زدن عضلات دو سر ران و کشنده‌ی نیام پهن و برش عضله‌ی پهن بیرونی، کپسول مفصل رانی مشخص گردید. پس از برش کپسول مفصلی و جهت دسترسی به سر و گردن استخوان ران، رباط گرد بریده شد. در ادامه و با استفاده از استخوان بر، برش را از زیر تروکانتر بزرگ به سمت گردن فمور روی یک خط ادامه و کورتکس داخلی فمور بدون برجای گذاشتن زاویه تیز، از وسط قطع گردید. محل جراحی با نرمال سالین استریل به خوبی شستشو داده شد. در ادامه و در گروه درمان (۱۰ خرگوش)، PRF خودی را در محل برداشت شده استخوانی قرار دادیم و در گروه کنترل در موضع جراحی نرمال سالین قرار داده شد. سپس کپسول مفصلی باقی مانده در اطراف استابولوم با نخ بخیه ویکریل

۴-۰ بخیه شد. در نهایت عضلات و پوست به روش معمول بخیه گردید. حیوانات برای برگشت از بیهوشی به یک محل گرم منتقل شده و پس از هوشیاری کامل به محل نگهداری خود بازگردانده شدند. در طی دوره پس از جراحی از داروی انزوفلوکساسین (ساخت شرکت عرفان دارو) به میزان mg/kg ۱۵ بصورت زیر جلدی و به مدت ۵ روز استفاده شد. هر روز یکبار موضع از نظر حضور تورم یا التهاب احتمالی در ناحیه، باز شدن بخیه‌ها و حضور ترشحات یا عفونت‌های احتمالی بررسی گردید. بخیه‌های پوست ۱۰ روز بعد از عمل برداشته شدند.

نمونه گیری و ارزیابی هیستوپاتولوژی

از هر گروه تعداد ۵ خرگوش، در بازه‌های زمانی ۲ و ۴ هفته آسان کشی شدند. پس از باز کردن موضع، قسمت انتهایی استخوان فمور به همراه بافت ترمیمی به وسیله قیچی استخوان بر جدا گردید. کلیه نمونه‌ها در فرمالین ۱۰٪ قرار داده شدند. نمونه‌ها جهت تهیه‌ی مقاطع بافتی به آزمایشگاه پاتولوژی ارسال و پس از رنگ آمیزی H&E و ماسون-تری کروم مورد بررسی قرار گرفتند. جهت اندازه‌گیری سطح بافت‌های ترمیمی ابتدا با استفاده از دستگاه اسکنر لام (Opticlub H850) از مقاطع میکروسکوپی رنگ‌آمیزی شده با ماسون تری کروم اسکن با بزرگنمایی ۵۰ برابر تهیه شده و سپس با استفاده از نرم‌افزار Axiovision LE Nikon، همزمان با مشاهده‌ی میکروسکوپی (ECLIPSE E100)، میزان تشکیل هر بافت در هر نمونه بر مبنای تعداد واحد (پیکسل) اشغال شده در تصویر توسط بافت مورد نظر به طور جداگانه اندازه‌گیری و ثبت شد. سپس نسبت تشکیل بافت‌های جوانه‌ی گوشتی به غضروف، جوانه‌ی گوشتی به استخوان و غضروف به استخوان در هر نمونه محاسبه شد. ارتباط بین نتایج این محاسبات به عنوان داده‌های خام با استفاده از نرم افزار Sigma Stat و آزمون T-Test مورد ارزیابی آماری قرار گرفت.

نتایج

در بررسی نمونه‌های بافتی در روزهای ۱۴ و ۲۸ در تمام نمونه‌ها در رنگ آمیزی با هماتوکسیلین و اتوزین آثار تشکیل بافتهای جوانه گوشتی، غضروف و استخوان قابل مشاهده بود. در هیچکدام از نمونه‌ها آثاری از بروز التهاب

ناشی از عفونت احتمالی یا تحریک پاتولوژیک ناشی از سایر عوامل مشاهده نشد. در تمام نمونه‌ها ترتیب غالب در بروز ترمیم عبارت بود از تشکیل توده‌ی قابل توجهی از جوانه‌ی گوشتی که توده‌ی غضروفی را که مراحل مختلف تشکیل و بلوغ را نشان می‌داد احاطه کرده و در ادامه نیز تشکیل و گسترش ترابکول‌های استخوانی از بخش‌های بالغ توده‌ی غضروفی به سمت مغز استخوان مشاهده شد. بر این اساس در روز چهاردهم در گروه کنترل و در مقایسه با گروه درمانی میزان ادم بیشتر و تعداد عروق خونی کمتر بود. در حالیکه ضخامت و سازماندهی بیشتر رشته‌های کلاژن همراه با تعداد زیادی فیبروبلاست در گروه درمان نسبت به گروه کنترل مشاهده شد (نگاره‌ی ۲). همچنین در گروه درمانی میزان تشکیل بافت غضروفی و بافت استخوانی نظم و توالی بیشتری را در مقایسه با گروه کنترل نشان داد (نگاره‌ی ۳) در روز بیست و هشتم و در گروه کنترل، در تبدیل بافت جوانه‌ی گوشتی به غضروف و تشکیل تیغه‌های استخوانی نظم کمتری دیده می‌شود. در حالیکه در گروه درمانی افزایش تبدیل بافت جوانه‌ی گوشتی به غضروف و ایجاد تیغه‌های استخوانی ضخیم مشاهده می‌شود (نگاره‌ی ۴). همچنین در گروه کنترل، ضخامت تیغه‌های استخوانی و میزان کلسیفیکاسیون در مقایسه با گروه درمانی بسیار کمتر می‌باشد. همچنین در گروه درمانی، سطح اشغال مغز استخوان توسط تیغه‌های استخوانی و همچنین ضخامت تیغه‌ها مشخص‌تر می‌باشد (نگاره‌ی ۵). بطور کلی در مقایسه‌ی بین گروه کنترل و گروه درمانی، حجم بافتی

مربوط به مراحل ابتدایی ترمیم شامل ادم بافت بینابینی، تشکیل عروق خونی جدید، تشکیل رشته‌های کلاژن به صورت رشته‌های باریک در گروه کنترل بیشتر بود. همچنین در نمونه‌های رنگ آمیزی شده با ماسون‌تری کروم در گروه درمانی ضخامت رشته‌های کلاژن و میزان همسوئی بین این رشته‌ها و سازمان‌یابی آنها در مناطق متناظر با گروه کنترل واضح‌تر بود.

همچنین مقایسه‌ی کمی نتایج در روزهای مورد مطالعه نشان داد که نسبت تشکیل بافت غضروفی و بافت استخوانی به کل بافت ترمیمی در گروه درمان شده با PRF به‌طور معناداری بالاتر از گروه کنترل بود ($p \leq 0.05$). بر این اساس میزان تشکیل بافت جوانه‌ی گوشتی به کل بافت ترمیمی در گروه کنترل به‌صورت معناداری بیشتر از گروه درمان شده با PRF بود ($p \leq 0.05$) (نمودار شماره‌ی ۱ و ۲). همچنین نسبت تشکیل بافت جوانه‌ی گوشتی به غضروف و نسبت تشکیل بافت جوانه‌ی گوشتی به استخوان در روزهای مورد مطالعه، در گروه کنترل بطور معناداری بیشتر از گروه درمان شده با PRF بود ($p \leq 0.05$). در نسبت تشکیل غضروف به استخوان بین دو گروه مورد مطالعه اختلاف آماری معناداری مشاهده نشد ($p > 0.05$). اگرچه بالاتر بودن نسبت تشکیل غضروف به استخوان در گروه کنترل نسبت به گروه درمانی، بیانگر پیشرفت بیشتر التیام در گروه درمان شده با PRF است (نمودار شماره‌ی ۳ و ۴).

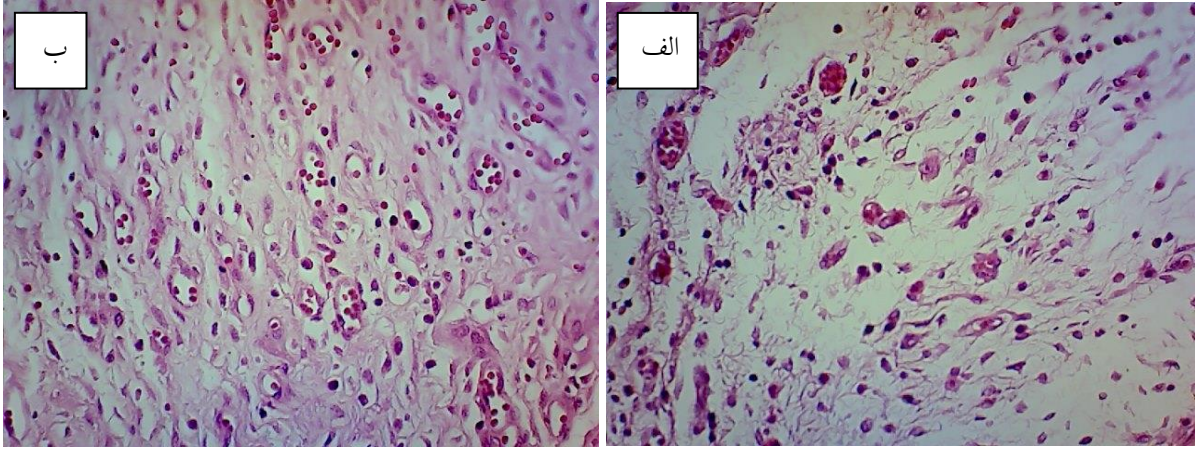


ب

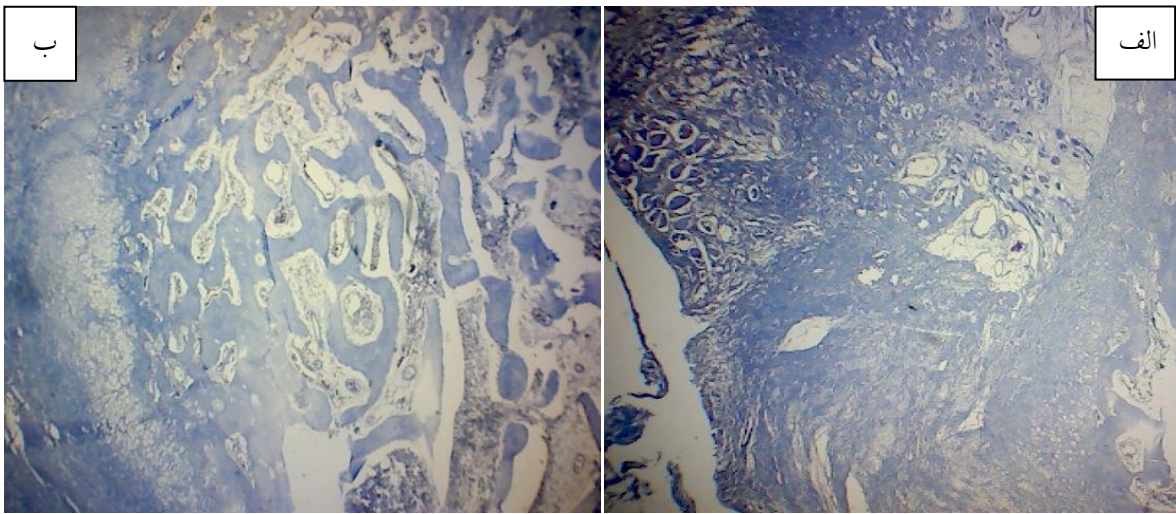


الف

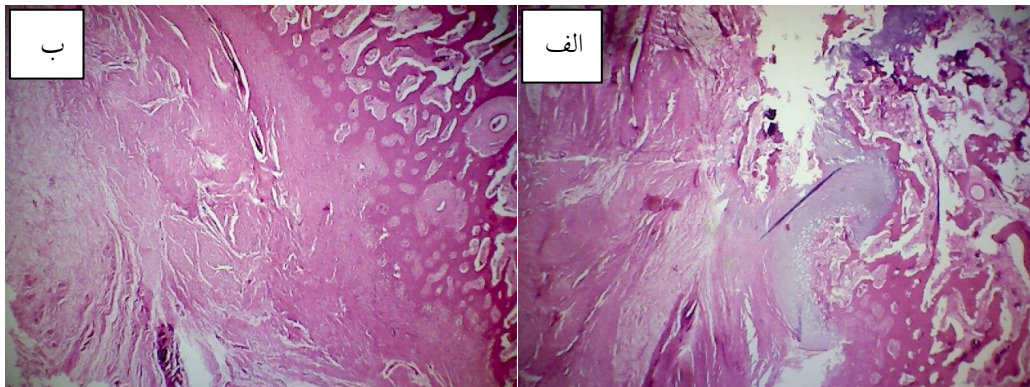
نگاره‌ی ۱: الف) لایه‌های مختلف حاصل از سانتریفیوژ خون، ب) نمونه PRF تهیه شده



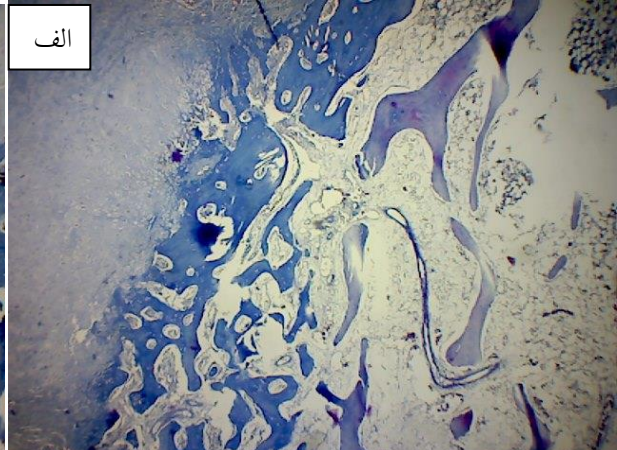
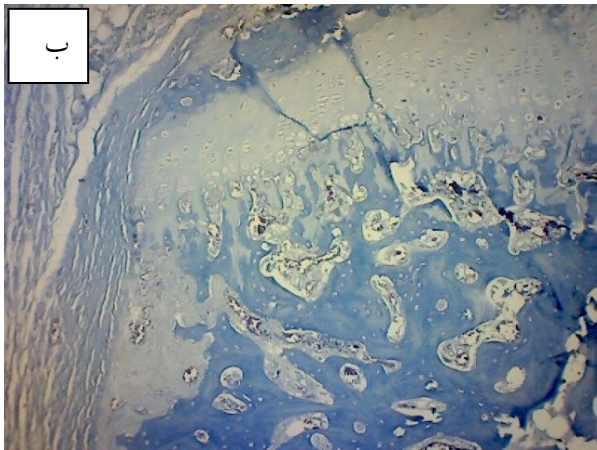
نگاره‌ی ۲- نمای ریزبینی محل جراحی و مقایسه‌ی دو گروه در روز ۱۴ (الف) در گروه کنترل، ادم قابل توجه و حضور عروق پرخون و رشته‌های باریک کلاژن با سازمان‌یابی ناچیز در جوانه‌ی گوشتی و تعداد عروق خونی کمتر دیده می‌شود. (ب) در گروه درمانی PRF، حضور ادم کمتر همراه با ضخامت و سازمان‌دهی بیشتر رشته‌های کلاژن، حضور تعداد زیادی فیبروبلاست و تعداد عروق خونی بیشتر مشاهده می‌شود. رنگ آمیزی H&E، بزرگنمایی $400\times$



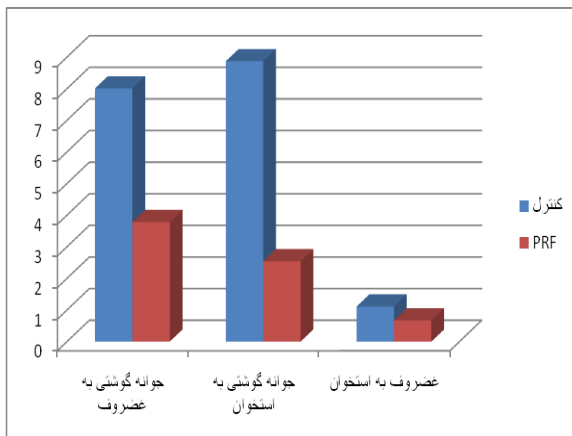
نگاره‌ی ۳- نمای ریزبینی محل جراحی و مقایسه‌ی دو گروه در روز ۱۴ (الف) در گروه کنترل حضور کانون بی‌نظم غضروفی در داخل بافت جوانه‌ی گوشتی و حضور کانون غضروفی در بین تراپیکول‌های استخوانی مشاهده می‌شود. (ب) در گروه درمانی PRF، تشکیل بافت غضروفی و به دنبال آن تشکیل بافت استخوانی از توالی و نظم بیشتری برخوردار می‌باشد. رنگ‌آمیزی ماسون تری کروم بزرگ نمایی $100\times$.



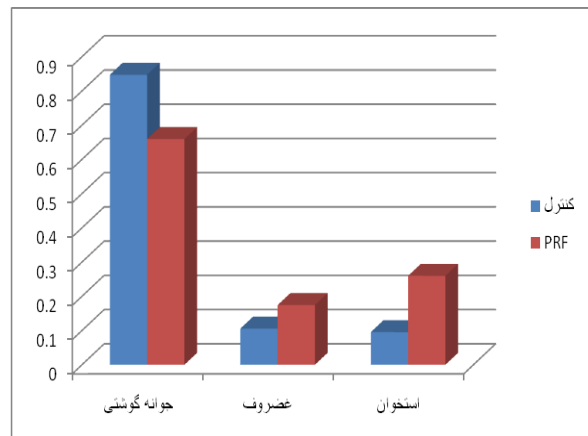
نگاره‌ی ۴- نمای ریزبینی محل جراحی و مقایسه‌ی دو گروه در روز ۲۸ (الف) در گروه کنترل، نظم و سازماندهی کمتر در تبدیل بافت جوانه‌ی گوشتی به غضروف و بدشکلی در ساخت و تشکیل تیغه‌های استخوانی دیده می‌شود. (ب) در گروه درمانی PRF، نظم و سازماندهی بیشتر در تبدیل بافت جوانه‌ی گوشتی به غضروف و ایجاد تیغه‌های استخوانی منظم با ضخامت قابل توجه مشاهده می‌شود. رنگ آمیزی H&E، بزرگنمایی $400\times$.



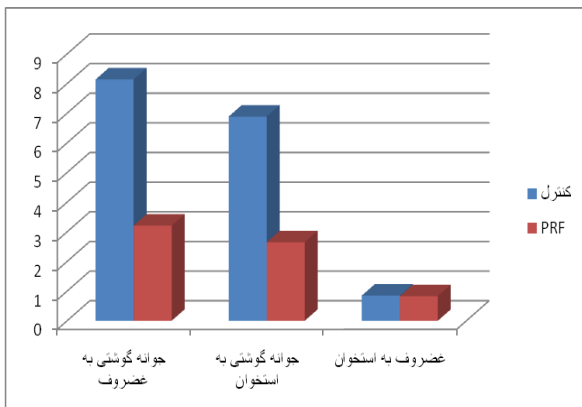
نگاره ۵- نمای ریزبینی محل جراحی و مقایسه‌ی دو گروه در روز ۲۸ (الف) در گروه کنترل، ضخامت کم تیغه‌های استخوانی و کلسیفیکاسیون ناچیز در آنها دیده می‌شود. به طور کلی تراکول‌های استخوان سطح کمی از مغز استخوان را اشغال کرده‌اند. (ب) در گروه درمانی PRF، افزایش ضخامت تیغه‌های استخوانی و شروع کلسیفیکاسیون بلافاصله بعد از تشکیل مشاهده می‌شود. گستردگی اشغال مغز استخوان توسط تیغه‌های استخوانی و همچنین ضخامت تیغه‌ها در این گروه بارزتر می‌باشد. رنگ آمیزی ماسون تری کروم بزرگ نمایی $\times 100$.



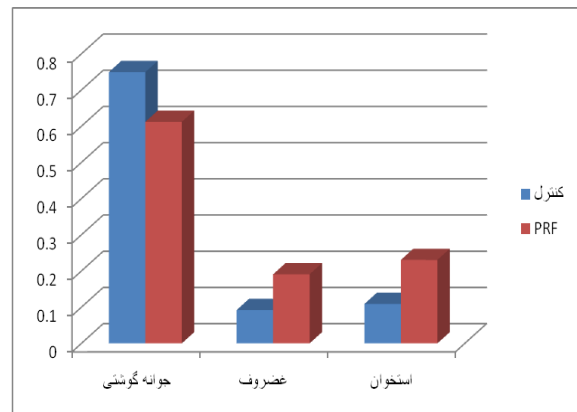
نمودار شماره ۲: نسبت تشکیل بافت‌های جوانه گوشتی به غضروف، جوانه گوشتی به استخوان و غضروف به استخوان در گروه‌های مورد مطالعه در روز چهاردهم



نمودار شماره ۱: نسبت تشکیل بافت‌های جوانه گوشتی، غضروف و استخوان به کل بافت ترمیمی در گروه‌های مورد مطالعه در روز چهاردهم



نمودار شماره ۴: نسبت تشکیل بافت‌های جوانه گوشتی به غضروف، جوانه گوشتی به استخوان و غضروف به استخوان در گروه‌های مورد مطالعه در روز بیست و هشتم



نمودار شماره ۳: نسبت تشکیل بافت‌های جوانه گوشتی، غضروف و استخوان به کل بافت ترمیمی در گروه‌های مورد مطالعه در روز بیست و هشتم

بحث

پلاکت‌ها یکی از ترکیبات کلیدی و مهم در فازهای اولیه‌ی بازسازی بافت هستند که در هموستازی و توده‌ای شدن فیبرین‌ها نقش دارند (Guo و همکاران، ۲۰۱۰). از اواسط دهه‌ی ۹۰ به جمع‌آوری دوزهای فرافیزیولوژیکی پلاکت توسط سانتریفیوژ پرداخته شد. همبستگی مثبت بین تعداد پلاکت‌ها و روند بازسازی در التیام بافت‌ها وجود دارد. در واقع، مشخص شده است که ترکیبات ساده مواد پیوندی استخوان و خون، باعث افزایش رگزایی و شکل‌گیری استخوان جدید می‌شوند (Barbeck و همکاران، ۲۰۱۵).

در مطالعه‌ی حاضر بین نمونه‌های دو گروه اختلاف قابل توجهی قابل مشاهده بود که نشان از تاثیر PRF در روند ترمیم دارد. بطوریکه در گروه کنترل در روند تولید غضروف و استخوان نظم مناسبی حاکم نبود. در حالیکه در نمونه‌های گروه درمانی هیچکدام از این بی‌نظمی‌ها مشاهده نشد. پلاکت‌ها در طی روند التهاب از طریق آزادسازی واسطه‌هایی مانند سروتونین و اینترلوکین نقش تعیین‌کننده‌ای در تنظیم حضور و فعالیت سلولهای التهابی و واسطه‌های شیمیایی التهاب بازی می‌کنند. با توجه به قرارگرفتن تعداد بسیار زیادی از پلاکت‌ها در موضع شکستگی و حضور مقادیر بسیار بالایی از واسطه‌های شیمیایی ناشی از پلاکت‌ها به صورت اولیه در موضع در گروه درمانی در مقایسه با گروه کنترل، به شکل منطقی انتظار می‌رود در روال انجام فعالیت‌های التهابی و به دنبال آن روند ترمیم بافتی (بازسازی استخوان) نوعی تنظیم جدید و تسریع صورت گیرد. نتایج این تحقیق به طور کلی دلالت بر تاثیر پلاکت‌ها در تسریع روند ترمیم استخوان و کاهش حجم بافت گرانوله و همزمان افزایش سرعت بلوغ و افزایش حجم بافت‌های غضروفی و استخوانی دارد. ماکروفاژها و نوتروفیل‌های موجود در PRF، اولین سلول‌هایی هستند که در جراحات‌ها پدیدار می‌شوند. بنابراین، استفاده از PRF در جراحی‌ها، تعداد آنها را در مراحل اولیه بهبود افزایش می‌دهد و در فاگوسیت کردن زواید، میکروب‌ها و بافت‌های مرده و کمک به بازسازی بافت، از طریق آزادسازی سیتوکین‌ها و فاکتورهای رشد، نقش اساسی ایفا می‌کند.

نتایج این مطالعه بیانگر تشکیل بافت‌های جوانه‌ی گوشتی، غضروف و استخوان بود که نشان دهنده سلامت و فعال بودن بافت تحت مطالعه است. همچنین در هیچکدام از نمونه‌ها آثاری از بروز التهاب و تحریک پاتولوژیک مشاهده

نشد. بر این اساس در تمامی نمونه‌ها ترتیب غالب در بروز ترمیم عبارت بود از تشکیل توده‌ی قابل توجهی از بافت جوانه‌ی گوشتی که بافت غضروفی را که مراحل مختلف تشکیل و بلوغ را نشان می‌داد احاطه کرده و در ادامه نیز تشکیل و گسترش تراکول‌های استخوانی از بخش‌های بالغ توده غضروفی به سمت مغز استخوان مشاهده می‌شد. با وجود شباهت در روند کلی ترمیم، از نظر بافت‌شناسی تفاوت‌هایی بین دو گروه مورد مطالعه قابل مشاهده بود. در گروه کنترل میزان ادم بافت بینابینی، تشکیل عروق خونی جدید، تشکیل رشته‌های باریک کلاژن بیشتر بود که بیانگر مراحل ابتدایی ترمیم در این گروه می‌باشد. در حالیکه در گروه درمانی PRF، بافت جوانه‌ی گوشتی تشکیل شده با وجود حجم کمتر، به علت پلیمریزاسیون بیشتر رشته‌های کلاژن، بلوغ بیشتری از خود نشان داد. همچنین در نمونه‌های این گروه میزان ادم و حضور عروق تازه تشکیل کمتر از گروه کنترل بود. همچنین مشخص گردید که گستردگی اشغال مغز استخوان توسط تیغه‌های استخوانی و ضخامت تیغه‌ها در گروه درمانی در مقایسه با گروه کنترل بیشتر می‌باشد که تمامی موارد بیانگر تاثیر مثبت PRF در مقایسه با گروه کنترل متعاقب جراحی برداشت سر و گردن استخوان ران می‌باشد.

Sunitha Raja و همکاران در سال ۲۰۰۸ بیان داشتند که PRF یک ماتریس فیبرینی غنی از پلاکت-لکوسیت اتولوگ است که دارای ساختار تترامولکولار متشکل از سیتوکین‌ها، پلاکت‌ها و سلول‌های بنیادی می‌باشد، و به عنوان یک داربست زیست تخریب‌پذیر قادر به هدایت سلول‌های اپیتلیال به سطح خود است. نامبردگان همچنین بیان نمودند که این ترکیب، پتانسیل بسیار زیادی برای افزایش اتصال سلول‌ها و تحریک تکثیر و تمایز سلول‌های استئوبلاست را دارد (Sunitha Raja و همکاران، ۲۰۰۸).

Joseph و همکاران در سال ۲۰۱۴، Kim و همکاران در سال ۲۰۱۴ و Kumar و همکاران در سال ۲۰۱۶ در مطالعات خود نشان دادند که PRF دارای پتانسیل بسیار زیاد برای بازسازی استخوان و بافت‌های نرم، بدون واکنش-های التهابی است و می‌تواند به تنهایی یا در ترکیب با گرفت‌های استخوانی برای تقویت هموستازی، رشد استخوان و بلوغ سلول‌ها استفاده شود (Joseph و

همکاران، ۲۰۱۴؛ Kim و همکاران، ۲۰۱۴؛ Kumar و همکاران، ۲۰۱۶).

همچنین Chang و همکاران در سال ۲۰۱۰ مشخص نمودند PRF بیان ژن P-ERK را افزایش داده و از این طریق باعث تحریک تولید osteoprotegerin (OPG) شده که OPG نیز منجر به تولید و تمایز سلول‌های استئوبلاست می‌شود (Chang و همکاران، ۲۰۱۰). Chang و همکاران در سال ۲۰۱۱ و Diss و همکاران در سال ۲۰۰۸ گزارش نمودند که PRF به طور مستقیم آنژیوژنز را تحریک می‌نماید. همچنین بیان داشتند که این ماده از طریق تنظیم تولید OPG و آلکالین فسفاتاز دارای خاصیت القای استخوان‌سازی و هدایت استخوانی می‌باشد (Chang و همکاران، ۲۰۱۱؛ Diss و همکاران، ۲۰۰۸).

Kiran و همکاران در سال ۲۰۱۱ بیان داشتند که پلاکت‌ها حاوی فاکتورهای رشدی هستند که منجر به افزایش تولید کلاژن، میتوز سلولی، رشد عروق خونی، فراخواندن سلول‌های دیگر برای مهاجرت به محل آسیب و القای تمایز سلولی می‌شوند. اثرات PRF روی بازسازی استخوان توسط فاکتورهای رشدی مانند فاکتور رشد اندوتلیال عروقی، فاکتور رشد فیروبلاستی و فاکتور رشد تغییر شکل دهنده‌ی بتا اعمال می‌شود (Kiran و همکاران، ۲۰۱۱).

فاکتور رشد تغییر شکل دهنده‌ی بتا ($TGF-\beta$) توسط استئوبلاست‌ها تولید می‌شود و بدین ترتیب بیان پروتئین‌های ماتریکس استخوان را تحریک می‌نماید. همچنین تحلیل رفتن ماتریس توسط آنزیم‌هایی مثل متالوپروتیناز را کاهش می‌دهد. $TGF-\beta$ تمایز و تزاید سلول‌های استئوبلاست را افزایش داده و مانع از شکل‌گیری پیش‌سازهای استئوکلاست و در غلظت‌های بالاتر اثر مهاری روی استئوکلاست‌ها دارد. مشخص شده است که در ترمیم شکستگی استخوان، رهاسازی $TGF-\beta$ افزایش می‌یابد (Thor و همکاران، ۲۰۱۷).

مطالعات مختلف نشان داده‌اند که فاکتور رشد فیروبلاستی (FGF) نقش اساسی در تکامل سیستم‌های عروقی، عصبی و اسکلتی دارد و همچنین منجر به تحریک بافتی، تشکیل غضروف و بهبود بافت‌های آسیب دیده می‌شود. سلول‌های هدف آن نیز شامل سلول‌های مزانشیمی، اپیتلیال و همچنین کندروسیت‌ها و استئوبلاست‌ها هستند.

این فاکتور رشد به تسریع روند تشکیل فیبروز در موضع جراحی کمک نموده و با توجه به افزایش رگ‌زایی، می‌تواند منجر به التیام سریع‌تر گردد (Thor و همکاران، ۲۰۱۷؛ Sharma و همکاران، ۲۰۱۱).

همچنین فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (VEGF) مهاجرت و تزاید سلول‌های اندوتلیال و نفوذپذیری عروق خونی را افزایش داده و با تحریک سلول‌های اندوتلیال مهاجرت سلولی را بیشتر می‌نماید (Thor و همکاران، ۲۰۱۷).

بنابراین هر چقدر مراحل التیام کوتاهتر باشد و حجم بافت‌های اولیه التیامی شامل بافت جوانه‌ی گوشتی و بافت غضروفی در مقایسه با حجم بافت نهایی کمتر باشد، نشان دهنده‌ی سریع‌تر بودن فرآیند التیام و در نتیجه صرف زمان و هزینه‌ی کمتر می‌باشد. نتایج به دست آمده از این مطالعه بیانگر تاثیر مثبت PRF در فرآیند التیام می‌باشد که این روند با توجه به قرار گرفتن تعداد بسیار زیادی از پلاکت‌ها در موضع شکستگی و در نتیجه حضور مقادیر بسیار بالایی از واسطه‌های شیمیایی ناشی از حضور پلاکت‌ها بصورت اولیه در گروه PRF، تسریع در روند التیام را توجیه پذیر می‌سازد.

از نتایج حاصل از این مطالعه با وجود فاکتورهای رشد می‌توان استنباط کرد که استفاده از فیبرین غنی از پلاکت در جراحی‌های اورتوپدی می‌تواند منجر به افزایش میزان واکنش‌های استخوانی در محل جراحی شده و نیز باعث بهبود سریع‌تر استخوان متعاقب جراحی شود. همچنین با دارا بودن سلول‌های میزبان، ماتریس فیبرینی سه بعدی و مجموعه‌ای از فاکتورهای رشد و نقش آن‌ها در رگ‌زایی و تسریع روند التیام، می‌توان بیان داشت که PRF می‌تواند روند بهبودی و تشکیل مفصل کاذب را در بیماران کاندید جراحی برداشت سر و گردن استخوان ران تسریع نماید. سپاسگزاری

در پایان از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه سمنان و مسئولین محترم دانشکده‌ی دامپزشکی جهت فراهم نمودن امکان انجام این تحقیق تشکر و قدردانی می‌گردد.

سپاسگزاری

در پایان از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه سمنان و مسئولین محترم دانشکده‌ی دامپزشکی جهت فراهم نمودن امکان انجام این تحقیق تشکر و قدردانی می‌گردد.



Histopathological evaluation of topical autologous platelet-rich fibrin in femoral head and neck osteotomy in rabbits

Goldouzan, K.¹, Moslemi, H.R.^{2*}, Javaheri Vayeghan, A.³, Ahmadi-Hamedani, M.⁴.

Received: 17.04.2021

Accepted: 15.08.2021

Abstract

This study evaluated the histopathological changes following topical administration of PRF in femoral head and neck osteotomy (FHO) in rabbits. 20 New Zealand white rabbits underwent FHO. In the treated group, surgical site filled with PRF. After two and four weeks, all animals were euthanised and femur with the repair tissues around it was cut approximately 2 cm far from the head of femur. For microscopic study, some slides were prepared from samples through serial sectioning and were stained with H&E and Mason Trichrome. Qualitative changes such as granulation tissues, cartilage and bone formation were observed and noted. The results of this study shows that in PRF treated group, ratio of cartilage tissue formation to granulation tissue as well as formation of bone to granulation tissue is significantly more than these parameters in control group. This result indicates to faster healing on the damaged area in treated group. Also in this Group cartilage and bone tissues formation in the healing process was more orderly. The results indicate that the use of PRF has been able to accelerate healing of bone tissue that is cut at the head of the rabbit's femur. So it seems that the use of PRF as a treatment protocol to accelerate the healing period of bone tissue in these cases could be suggested.

Key words: Platelet-rich fibrin, femoral head and neck osteotomy, Rabbit

1. DMV Graduated, Faculty of Veterinary Medicine Semnan University, Semnan, Iran.

2. Assistant Prof., Veterinary Surgery, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine Semnan University, Semnan, Iran.

3. Assistant Prof., Veterinary Pathology, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine Semnan University, Semnan, Iran.

4. Associate Prof., Veterinary Clinical Pathology, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine Semnan University, Semnan, Iran.

*Corresponding author: h.moslemi@semnan.ac.ir

- Bansal**, S., Garg, A., Khurana, R., Chhabra, P. 2017. Platelet-rich fibrin or platelet-rich plasma – which one is better? an opinion. *Indian Journal of Dental Sciences*. **9(5)**, 49-52.
- Barbeck**, M., Najman, S., Stojanovic, S., Mitic, Z., Zivkovic, J.M., Choukroun, J., Predrag, K., Sader, R., Kirkpatrick, C.J., Ghanaati, S. 2015. Addition of blood to a phyogenic bone substitute leads to increased in vivo vascularization. *Biomedical Materials*. **10(5)**, 1-15.
- Borie**, E., Olivi, D.G., Orsi, I.A., Garlet, K., Weber, B., Beltran, V. 2015. Platelet-rich fibrin application in dentistry: a literature review. *International Journal of Clinical Experimental Medicine*. **15(5)**, 7922-7929.
- Chang**, I.C., Tsai, C.H., Chang, Y.C. 2010. Platelet-rich fibrin modulates the expression of extracellular signal-regulated protein kinase and osteoprotegerin in human osteoblasts. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. **95(1)**, 327–332.
- Chang**, Y.C., Zhao, J.H. 2011. Effects of platelet-rich fibrin on human periodontal ligament fibroblasts and application for periodontal infrabony defects. *Australian Dental Journal*. **56**, 365–371.
- Choukroun**, J., Diss, A., Simonpieri, A., Girard, M.O., Schoeffler, C., Dohan, S.L., Dohan, A.J.J., Mouhyi, J., Dohan, D.M. 2006. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part IV: clinical effects on tissue healing. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology*. **101(3)**, 56-60.
- DeCamp**, C.E., Johnston, S.A., Dejardin, L.M., Schaefer, S.L. 2016. Brinker, Piermattei and Flo's Handbook of Small Animal Orthopedics and Fracture Repair. 5th ed. Elsevier Publishing, USA. 508-515.
- Diss**, A., Dohan, D.M., Mouhyi, J., Mahler, P. 2008. Osteotome sinus floor elevation using Choukroun's platelet-rich fibrin as grafting material: a 1-year prospective pilot study with microthreaded implants. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology*. **105(5)**, 572-579.
- Dohan Ehrenfest**, D.M., Del Corso, M. Diss, A., Mouhyi, J., Charrier, J.B. 2010. Three-dimensional architecture and cell composition of a Choukroun's platelet-rich fibrin clot and membrane. *Journal of Periodontology*. **81(4)**, 546-555.
- Griffin**, X.L. Wallace, D., Parsons, N., Costa, M.L. 2012. Platelet rich therapies for long bone healing in adults (Review). *Cochrane Database of Systematic Reviews*. **11(7)**, 1-21.
- Guo**, S., Dipietro, L.A. 2010. Factors affecting wound healing. *Journal of Dental Research*. **89(3)**, 219–229.
- Joseph**, V.R., Sam, G., Amol, N.V. 2014. Clinical evaluation of autologous platelet rich fibrin in horizontal alveolar bony defects. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. **8(11)**, 43–47.
- Kim**, T.H., Kim, S.H., Sandor, G.K., Kim, Y.D. 2014. Comparison of platelet-rich plasma (PRP), platelet-rich fibrin (PRF), and concentrated growth factor (CGF) in rabbit-skull defect healing. *Archives of Oral Biology*. **59(5)**, 550-558.
- Kiran**, N.K., Mukunda, K.S., Tilak Raj, T.N. 2011. Platelet concentrates: A promising innovation in dentistry. *International Journal of Dental Sciences and Research*. **2**, 50–61.

Kumar, K.R., Genmorgan, K., Abdul Rahman, S.M., Rajan, M.A., Kumar, T.A., Prasad, V.S. 2016. Role of plasma-rich fibrin in oral surgery. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences.* **8(1)**, 36-38.

Martin, P., Leibovich, S.J. 2005. Inflammatory cells during wound repair: the good, the bad and the ugly. *Trends in Cell Biology.* **15(11)**, 599-607.

Pradeep, A.R., Rao, N.S., Agarwal, E., Bajaj, P., Kumari, M., Naik, S.B. 2012. Comparative evaluation of autologous platelet-rich fibrin and platelet-rich plasma in the treatment of 3-wall intrabony defects in chronic periodontitis: a randomized controlled clinical trial. *Journal of Periodontology.* **83(12)**, 1499-1507.

Sharma, A., Pradeep, A.R. 2011. Autologous platelet-rich fibrin in the treatment of mandibular degree II furcation defects: a randomized clinical trial. *Journal of Periodontology.* **82(10)**, 1396-1403.

Sunitha Raja, V., Munirathnam Naidu, E. 2008. Platelet-rich fibrin: evolution of a second-generation platelet concentrate. *Indian Journal of Dental Research.* **19(1)**, 42-46.

Thor, A., Hong, J., Zelin, G., Sennerby, L. Rasmusson, L. 2017. Correlation of platelet growth factor release in jawbone defect repair–astudy in the dog mandible. *The International Journal of Oral Maxillofacial Implants.* **15(5)**, 759-768.