



Influence of Strontium Substitution on Osteogenesis of Bioglass/Gelatin Scaffold in Critically Sized rabbit Calvarial Defects

ARTICLE INFO

Article Type

Original Research

Authors

Adeli Mehr A.¹ MA,
Baheiraei N.^{*2} PhD,
Eyni H.¹ MSc

How to cite this article

Adeli Mehr A, Baheiraei N, Eyni H. Influence of Strontium Substitution on Osteogenesis of Bioglass/Gelatin Scaffold in Critically Sized rabbit Calvarial Defects. Pathobiology Research. 2019;22(3):141-147.

¹Anatomical Sciences Department, Medical Sciences Faculty, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
²Hematology Department, Medical Sciences Faculty, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

*Correspondence

Address: Tarbiat Modares University, Nasr Bridge, Jalal-Al-Ahmad Highway, Tehran, Iran. Postal Code: 1411713116
Phone: +98 (21) 82884853
Fax: +98 (21) 82884853
n.baheiraei@modares.ac.ir

Article History

Received: June 7, 2018
Accepted: July 2, 2019
ePublished: August 21, 2019

ABSTRACT

Aims Growing experiments show that biomaterials that have a bioactive glass (BG) indicate encouraging effects on bone tissue repair. Strontium-substituted BGs (BG/Sr) have been confirmed to improve bone formation while preventing bone resorption by osteoclasts.

Materials and Methods This study aimed to evaluate the potential of strontium substitution on bioglass/gelatin (Gel) osteogenesis in critically sized rabbit calvarial defects. Defects were treated with Gel-BG or Gel-BG/Sr scaffolds and one defect was left unfilled as a control. Bone regeneration and mineralization process were evaluated by hematoxylin and eosin, Masson's trichrome and Alizarin Red staining after 4 and 8 weeks post-implantation.

Findings Based on the histological findings, newly formed bone area in scaffolds containing BG/Sr was greater than that without Sr after 8 weeks.

Conclusion Our results specified that BG/Sr containing scaffolds could better increase bone regeneration than those without Sr and could be considered as a bone graft in bone tissue engineering.

Keywords Tissue Engineering; Bioactive; Strontium; Osteogenesis

CITATION LINKS

[1] Bone-graft substitutes: Facts ... [2] A review of materials, fabrication methods ... [3] Bone tissue engineering via nanostructured ... [4] Regeneration of trabecular bone ... [5] Effects of proliferation and differentiation ... [6] Preparation and characterization ... [7] Recent advances in bioglass applications ... [8] Biodegradable ceramic-polymer composites ... [9] Bioglass: A novel biocompatible ... [10] The effects of strontium-substituted bioactive ... [11] Controlled bioactivity in zinc-doped sol-gel ... [12] Zinc bioglasses regulate mineralization ... [13] In vitro bioactivity of melt-derived glass ... [14] Influence of silver on the structure ... [15] Trace element nutrition and bone ... [16] Effects of metal ions on osteoblast-like cell ... [17] Mechanisms of action and therapeutic ... [18] Strontium ranelate: A physiological ... [19] Strontium distribution and interactions ... [20] Preliminary work on the antibacterial ... [21] Osteoprecursor cell response to strontium ... [22] Mg- and/or Sr-doped tricalcium phosphate ... [23] Bioactive glass stimulates the secretion ... [24] Bioactive glass nanoparticles: From synthesis ... [25] Development of macroporous nanocomposite ... [26] Fabrication and in vitro evaluation ... [27] Novel biodegradable chitosan-gelatin/nano-bioactive ... [28] Natural-origin polymers as carriers and ... [29] The effects of strontium incorporation ... [30] Bone tissue engineering: Recent advances ... [31] 45S5 Bioglass-derived glass-ceramic ... [32] How strontium ranelate, via opposite effects ... [33] Effects of long-term strontium ranelate ... [34] What about strontium ranelate in ... [35] Influence of single and binary doping of ... [36] In vivo and clinical application of strontium ... [37] Nanogel-based scaffolds fabricated for bone ... [38] Three-dimensional printed strontium ... [39] TGF- β /BMP signaling and other molecular ... [40] Strontium enhances osteogenic differentiation ... [41] Stimulation of strontium-doped calcium ... [42] Promoting in vivo early angiogenesis with sub ... [43] Strontium- and cobalt-substituted bioactive ...

بررسی اثر جایگزینی استرانسیوم بر استخوان‌سازی داربست ژلاتین/ شیشه زیست‌فعال در ضایعه بحرانی ایجادشده در جمجمه خرگوش

علی عادل‌مهر MA

گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

نفسیه بحیرانی PhD

گروه هماتولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

حسین عینی MSc

گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

چکیده

اهداف: مطالعات زیادی نشان‌دهنده این مطلب است که متريال‌های حاوی شیشه‌های زیست‌فعال (BG) خواص امیدوارکننده‌ای در ترمیم بافت استخوان دارند، همچنین شیشه‌های زیست‌فعال جایگزین شده با استرانسیوم می‌توانند تشکیل استخوان را بهبود بخشیده و در عین حال از بازجذب استخوان توسط استئوکلاست‌ها جلوگیری کنند.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه، اثر جایگزینی استرانسیوم در ساختار شیشه زیست‌فعال (BG/Sr)، به‌کارگرفته‌شده به‌همراه ژلاتین، بر بهبود استخوان‌سازی در ضایعه بحرانی ایجادشده در جمجمه خرگوش بررسی شد. در جمجمه هر حیوان سه ضایعه بحرانی (قطر ۸ میلی‌متر) ایجاد شد و ضایعات با داربست‌های حاوی Gel-BG/Sr و BG پر شدند. یک ضایعه نیز به‌عنوان کنترل بدون داربست بررسی شد. بازسازی استخوان و فرآیند مینرالیزاسیون با انجام رنگ‌آمیزی‌های هماتوکسیلین/اوتوژین، مسون‌تری کروم و آلیزارین‌رد ۴ و ۸ هفته پس از کارگذاری داربست‌ها بررسی شد.

یافته‌ها: براساس یافته‌های بافت‌شناسی، میزان استخوان جدید تشکیل‌شده در داربست‌های حاوی BG/Sr بیشتر از داربست‌های فاقد Sr بعد از ۸ هفته بود.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه تاییدکننده آن است که داربست‌های حاوی شیشه‌های زیست‌فعال دارای استرانسیوم می‌توانند اثرات بهتری در بازسازی استخوان نسبت به نمونه مشابه فاقد استرانسیوم داشته و بنابراین می‌توانند جایگزین مناسبی در مهندسی بافت استخوان باشند.

کلیدواژه‌ها: مهندسی بافت، زیست‌فعال، استرانسیوم، استخوان‌سازی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۳/۱۷

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۴/۱۱

*نویسنده مسئول: n.baheiraei@modares.ac.ir

مقدمه

آسیب‌های استخوانی یکی از شایع‌ترین علت‌های موربیدیتی و ناتوانی در بیماران سالمند است که منجر به کاهش سلامت عمومی و کیفیت زندگی آنها می‌شود. نیاز فوری به بازسازی استخوان نه فقط به‌علت شکستگی‌های ناشی از پوکی استخوان بلکه به‌علت تروما، نقص‌های استخوانی مادرزادی، بیماری‌های اسکلتی و نقص‌های ناشی از خروج تومورها است [1-3]. شایع‌ترین درمان در جایگزینی استخوان پیوند خودی (اتوگرفت) است که معمولاً از استخوان ایلایک استخراج شده و در محل ضایعه کاشته می‌شود، اما، این پروسه گران بوده و معمولاً میزان نمونه‌ای که می‌توان استخراج کرد محدود است، ضمن این که می‌تواند همراه با درد مزمن در محل استخراج و ایجاد عفونت باشد. آلوگرفت، شایع‌ترین جایگزین اتوگرفت است که از فرد دیگری گرفته می‌شود. از معایب این روش نیز خطر انتقال عفونت و برانگیختن پاسخ ایمنی است. مشکلات مربوط به کاشتنی‌های استخوانی منجر به رویکرد تهیه جایگزین‌هایی برای گرفت‌های استخوانی شده است و بنابراین امروزه رویکرد درمانی دیگری به نام مهندسی بافت در حال توسعه است [4]. مهندسی بافت به‌کاربردن ترکیبی از سلول‌ها، مواد مهندسی و عوامل شیمیایی

مناسب برای ترمیم، بهبود یا جایگزینی عملکرد بافت‌های ناکارآمد یا از کارافتاده است. در این رویکرد، نخست یک داربست متخلخل و زیست‌تخریب‌پذیر ساخته و سپس سلول‌های بافت مورد نظر روی آن کشت داده می‌شود. با کنترل شرایط فیزیولوژیکی در خارج از بدن، بافت اولیه روی داربست تشکیل شده و پس از کاشت در داخل بدن، با تشکیل بافت جدید، داربست تخریب می‌شود. از مزایای مهندسی بافت، کاهش تعداد عمل‌های جراحی مورد نیاز و بهبود سریع‌تر بیمار است [5, 6]. شیشه‌های زیست‌فعال (BGs)، دسته مهمی از سرامیک‌ها هستند که قادرند با ایجاد پیوند شیمیایی قوی پاسخ زیستی مناسبی در فصل مشترک استخوان و بافت نشان دهند و از این رو کاربردهای وسیعی در پزشکی دارند [7]. از طریق دستکاری ساختار و شیمی این شیشه‌ها می‌توان به طیف وسیعی از خواص زیستی و شیمیایی دست یافت [8]. از مزایای این شیشه‌ها نسبت به سایر سرامیک‌های زیست‌فعال و شیشه سرامیک‌ها، می‌توان به امکان کنترل محدوده خواص شیمیایی و سرعت ایجاد پیوند با بافت اشاره کرد. شیشه‌های زیست‌فعال ترکیباتی شیشه‌ای هستند که قابلیت بازجذب و متابولیزه‌شدن توسط بدن و تشکیل استخوان و شبیه‌سازی رشد استخوان را در خارج از بدن دارند و می‌توانند هم با بافت‌های نرم و هم با بافت‌های سخت پیوند برقرار کنند [9]. یون‌های فلزی مختلفی مانند استرانسیوم [10]، روی [11, 12]، منیزیم [13]، نقره [14] و غیره در داخل شیشه‌های زیست‌فعال دوپ شده‌اند تا بتوانند با تغییر غلظت یون‌های داخل سلولی پاسخ‌های زیستی خاصی را القا نمایند. این یون‌ها قادر هستند مانند کوفاکتور آزمیمی عمل کرده و بر مسیرهای پیام‌دهی سلولی اثر گذارند [15, 16]. از میان یون‌های نام‌برده‌شده، استرانسیوم (Sr) اثرات قابل توجهی را در تشکیل بافت استخوان دارد اثر عمده این یون در بهبود تشکیل استخوان و جلوگیری از بازجذب استخوانی است [17, 18]. به‌علت شباهت شیمیایی به کلسیم، استرانسیوم می‌تواند در ساختار کریستالی هیدروکسی‌آپاتیت استخوانی با کلسیم مبادله شود [19]. همچنین، Sr دارای خواص ضد میکروبی بوده [20] و چسبندگی سطحی زیست‌مواد را افزایش می‌دهد [21]. استرانسیوم به‌همراه بایوگلاس علاوه بر افزایش استحکام مکانیکی که بسیار روی خواص بیولوژیکی موثر است، روی خواص دیگری همچون تمایز به سلول‌های استئوبلاستی و چسبندگی سلولی نیز اثرگذار است، به‌عنوان مثال، مشخص شده که ورود استرانسیوم در بایوگلاس به‌همراه بتاتری‌کلسیم فسفات موجب افزایش تمایز سلول‌های استئوبلاستی و چسبندگی سلولی نسبت به هنگام عدم استفاده از استرانسیوم، شده است [22]. از دیگر مزایای استرانسیوم در ساختار داربست‌ها، می‌توان به افزایش عروقی‌زایی آن از طریق افزایش فاکتورهای پیش‌ساز عروقی اشاره کرد [23].

یکی از محدودیت‌های استفاده از شیشه‌های زیست‌فعال به‌تنهایی، سختی پایین شکست در آنها است که استفاده این شیشه‌ها را در نواحی تحت فشار محدود می‌کند. به‌کارگیری این شیشه‌ها به‌همراه پلیمرها می‌تواند موجب بهبود خواص مکانیکی، زیست‌فعالی و انعطاف‌پذیری کامپوزیت ایجادشده شود [24]. یکی از موادی که به‌همراه شیشه‌های زیست‌فعال در تهیه داربست‌هایی با خواص برتر مکانیکی و زیست‌فعالی در مهندسی بافت استخوان استفاده می‌شود، ژلاتین است [25-27]. این بیوپلیمر دارای توالی‌های اسید آمینه‌هایی مانند گلیسین، پرولین و هیدروکسی‌پرولین است که نگرانی ما را در مورد ایمونوژن بودن کلاژن را برطرف می‌کند. این پلیمر طبیعی، همچنین، باعث بهبود چسبندگی سلول‌ها شده و می‌تواند بازسازی بافتی را در محیط درون‌تنی بهبود بخشد [28].

به شکل دایره‌هایی به قطر ۸ میلی‌متر و ضخامت یک میلی‌متر برش داده شدند و به ترتیب در ضایعات جایگزین شدند (سمت راست: Gel/BG-Sr و سمت چپ: Gel/BG وسط: حفره خالی؛ کنترل). سپس پرئوستیوم و ماهیچه به حالت اول برگردانده و پوست با نخ بخیه ۴-۰ بخیه زده و با اسپری تتراسایکلین ضد عفونی شد. بعد از عمل جراحی به حیوانات آموکسی‌سیلین (۱/۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم داخل عضلانی) تزریق و در قفس تمیزی به حیوان‌خانه منتقل شدند و تحت مراقبت دقیق تا بهبودی کامل قرار گرفتند. برای کنترل درد، کتورولاک ترومتامین (کره) به مدت سه روز تجویز شد.

تست‌های هیستوپاتولوژی: خرگوش‌ها در داخل قفس در دمای مناسب و شرایط غذایی مناسب نگهداری شدند. در زمان‌های ۴ و ۸ هفته، حیوانات با دوز بالای ماده بی‌هوشی کشته شده و جمجمه‌های آنها به منظور بررسی‌های هیستوپاتولوژی خارج شد. پیش از خارج کردن جمجمه‌ها، مشاهدات ماکروسکوپی از نظر تغییرات در شکل ظاهری داربست‌ها و میزان التهاب و استخوان‌سازی انجام شده، ثبت شد. سپس، نمونه‌ها در فرمالین ۱۰٪ فیکس شدند و برای انجام تست‌های هیستوپاتولوژی در داخل نیتریک‌اسید ۱۰٪ (دو هفته و تست با نوک سرنگ) قرار داده شدند. در پایان هر زمان تعیین شده، نمونه‌ها بعد از دکلسیفیکشن، به آزمایشگاه هیستوپاتولوژی ارسال و مراحل قرارگیری در پارافین و آماده‌سازی بافتی و برش‌زدن (به ضخامت ۵ میکرون) انجام شد. نمونه‌های برش داده شده توسط رنگ‌های هماتوکسیلین-ئوزین (H&E)، تری کروم‌ماسون و آزارین رنگ‌آمیزی و سپس با میکروسکپ نوری لام‌ها بررسی و عکس‌برداری شدند. حداقل سه برش از هر داربست زیر میکروسکپ نوری مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها

SEM تهیه شده از داربست‌ها ساختار متخلخل به هم پیوسته در هر دو داربست با میانگن قطری ۱۰۰ تا ۳۰۰ میکرومتر را نشان داد (شکل ۱). افزایش Sr باعث کاهش قابل توجه سایز تخلخل داربست‌های سنتزی شد به طوری که میانگن قطر تخلخل‌ها از ۱۲±۲۱۵ میکرومتر برای Gel-BG/Sr به ۱۶±۱۵۴ میکرومتر رسید (شکل ۱).

به منظور بررسی استخوان‌سازی، مشاهدات ماکروسکوپی و بررسی‌های هیستولوژی صورت گرفت. تصاویر ماکروسکوپی گرفته شده از نمونه‌ها در زمان‌های ۴ و ۸ هفته‌ای در شکل ۲ نمایش داده شده است. اسکار فیبروزی کل ناحیه آسیب را پوشانده است و در ناحیه ضایعه ایجاد شده فرو رفتگی، التهاب یا وجود عفونت مشاهده نشد. ضایعه پر شده با داربست Gel-BG/Sr کاملاً با بافت اطراف یکی شده بود و به سخت حد مرزی بین داربست و استخوان اطراف قابل تشخیص بود (شکل ۲).

مشاهده لام‌های تهیه شده با رنگ‌آمیزی H&E اطلاعات زیر را نشان داد (شکل ۳). چهار هفته بعد از جراحی، در نمونه کنترل، حد فاصل بین دو انتهای استخوان توسط بافت فیبروزی نازکی پوشیده شده بود و استخوان‌سازی مشاهده نشد. در گروه Gel-BG/Sr، چهار هفته پس از قراردادن داربست در حفره ایجاد شده در جمجمه، در کناره‌های نزدیک به دو انتهای داربست، در مجاورت استخوان سالم، تشکیل استخوان نابالغ مشاهده می‌شود. تشکیل تیغه‌های استخوانی از حاشیه به مرکز و از طرف دیگر وجود عروق خونی و نفوذ سلول به داخل داربست نیز مشاهده می‌شود. باقی‌مانده داربست Gel-BG/Sr که توسط بافت همبند محاصره شده است در حد فاصله ضایعه دیده می‌شود. در گروه Gel-BG، چهار هفته پس از قراردادن

گروه ما، اخیراً در تحقیقی داربست زیست‌فعال حاوی کلاژن/شیشه زیست‌فعال را به روش فریزدرایر تهیه کرده و کلیه خواص فیزیکی، شیمیایی و بیولوژیکی داربست را بررسی کردند. همچنین، برتری خواص آنژیوتنز داربست حاوی استرانسیوم نیز به اثبات رسید [29]. در ادامه این تحقیق، قابلیت استخوان‌سازی داربست مشابه در مدل ضایعه استخوانی جمجمه رت بررسی و نتایج با نمونه فاقد استرانسیوم مقایسه شد. تا آنجایی که توسط نویسندگان جست‌وجو شد تاکنون بررسی استخوان‌سازی داربستی مشابه ترکیب و روش ساخت ذکر شده در مدل حیوانی خرگوش صورت نگرفته است.

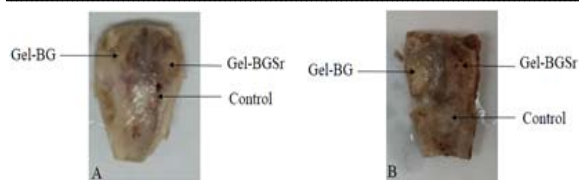
مواد و روش‌ها

ساخت داربست ژلاتین/شیشه زیست‌فعال به روش خشکاندن انجمادی: ساخت داربست مشابه پروتوکول قبلی انجام شد [29]. به طور خلاصه، ژلاتین ۵٪ وزنی/حجمی؛ سیگما آلدریج؛ آلمان) در آب دیونیزه حل و پس از اطمینان از خلالت کامل به این محلول شیشه زیست‌فعال 45s5 و شیشه زیست‌فعال حاوی ۵٪ وزنی استرانسیوم جایگزین شده با کلسیم (مدزیست؛ ایران) اضافه شد. درصد اضافه کردن شیشه‌ها به ژلاتین، براساس نتایج حاصله از مطالعه قبل ذکر شده، ۱۵٪ وزنی/حجمی محاسبه شد. بعد از گذشت حدود یک ساعت، محلول یکنواخت ایجاد شده درون قالب‌ها ریخته شد و تحت انجماد تدریجی (دمای ۲۰°C- برای ۵ ساعت و ۸۰°C- برای ۱۲ ساعت) قرار گرفتند. سپس، ساخت داربست‌ها با قرارگیری در دستگاه فریزدرایر مدل Alpha 1-4 LDplus (Martin Christ؛ آلمان) به مدت ۴۸ ساعت تکمیل شد. به منظور کراس‌لینک کردن، داربست‌ها در محلول EDC-NHS (سیگما آلدریج؛ آلمان) با غلظت ۲۵/۰ میلی‌مولار در اتانول ۹۰٪ به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفتند و بعد از چندبار شست‌وشو با آب دیونیزه مجدداً در داخل دستگاه فریزدرایر برای خشک شدن گذاشته شدند. داربست‌های ساخته شده، با عناوین Gel-BG/Sr و Gel-BG به ترتیب برای نمونه‌های بدون استرانسیوم و همراه استرانسیوم نامگذاری شدند.

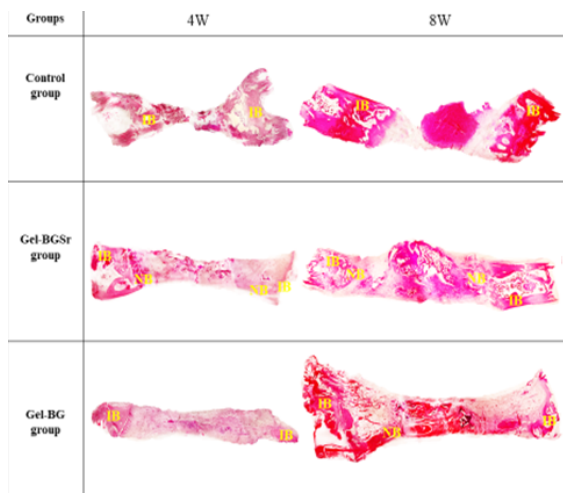
ارزیابی‌های لازمه به شرح زیر انجام شد:

آزمون میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM): به منظور بررسی مورفولوژی و ارتباط تخلخل‌های داربست ساخته شده، آزمون SEM مدل XL30 (فیلیپس؛ هلند) روی هر دو داربست ساخته شده انجام شد. قبل از انجام این آزمون، نمونه‌ها با طلا پوشش‌دهی شدند.

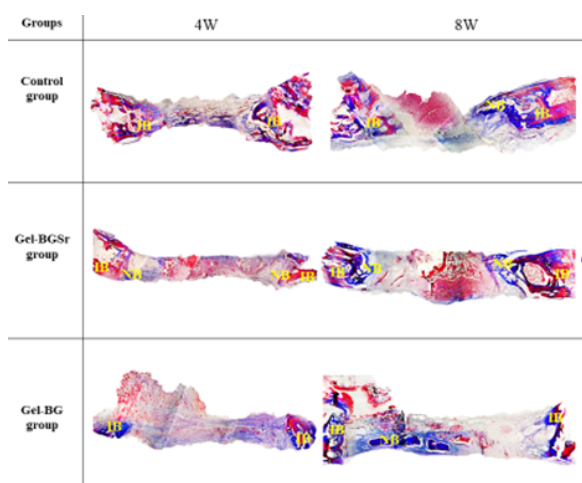
بررسی استخوان‌سازی: تمامی آزمایش‌ها مطابق با دستورالعمل کمیته اخلاق پزشکی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس اجرا شد. تحقیق حاضر، روی هشت سر خرگوش نر بالغ سفید نیوزلندی به وزن تقریباً ۲-۲/۵ کیلوگرم انجام شد (تعداد ۴ خرگوش برای هر دوره زمانی مورد آزمایش). خرگوش‌ها در حیوان‌خانه تحت شرایط استاندارد دسترسی به آب و مواد غذایی و چرخه ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی و در دمای ۲۵°C-۲۰°C نگهداری شدند. حیوانات توسط ماده بی‌هوشی کتامین (۱۰٪؛ Alfasan؛ هلند) به مقدار ۹۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم و زایلازین (۲٪؛ Alfasan؛ هلند) به مقدار ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به صورت داخل صفاقی بی‌هوش شدند. پس از تراشیدن موی جمجمه حیوان، پوست ناحیه توسط بتادین و الکل تمیز شد. پس از ثابت نگه داشتن دست و پای حیوان توسط مکان‌های مشخص شده روی تخت عمل جراحی، برشی در پوست (میان جمجمه) ایجاد شد، فاسیا به آرامی کنار زده شد تا جمجمه خرگوش کاملاً نمایان شود. سپس با استفاده از Trephine (قطر ۸ میلی‌متر) سه ضایعه در کالواریا ایجاد شد. با توجه به سایز بحرانی برای ترمیم استخوان در کالواریا خرگوش، داربست‌های ساخته شده



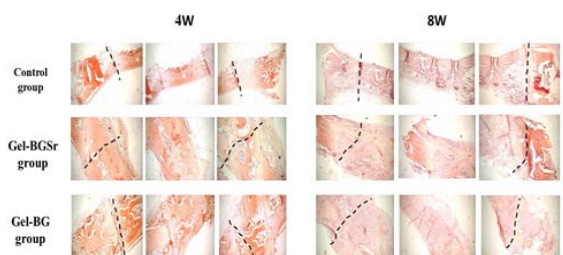
شکل ۲) نمای ماکروسکوپیک جمجمه، نشان‌دهنده ضایعات ایجادشده در داربست‌های Gel-BG/Sr و Gel-BG و ضایعه پرنشده (کنترل) بعد از ۴ هفته (A) و ۸ هفته (B)



شکل ۳) یافته‌های بافت‌شناسی حاصل از رنگ‌آمیزی H&E در داربست‌های Gel-BG/Sr و Gel-BG و گروه کنترل، ۴ و ۸ هفته بعد از کارگذاری داربست‌ها؛ IB: استخوان سالم، NB: استخوان جدید



شکل ۴) یافته‌های بافت‌شناسی حاصل از رنگ‌آمیزی مسن‌تر کروم در داربست‌های Gel-BG/Sr و Gel-BG و گروه کنترل، ۴ و ۸ هفته بعد از کارگذاری داربست‌ها؛ IB: استخوان سالم، NB: استخوان جدید

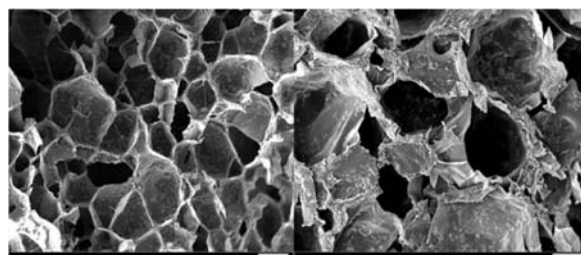


شکل ۵) یافته‌های بافت‌شناسی حاصل از رنگ‌آمیزی آلفازین‌رد در داربست‌های Gel-BG/Sr و Gel-BG و گروه کنترل، ۴ و ۸ هفته بعد از کارگذاری داربست‌ها؛ خط‌چین‌ها فاصله بین استخوان موجود و داربست را نشان می‌دهد.

داربست در حفره ایجادشده در جمجمه، نفوذ تیغه‌های استخوانی به مرکز نسبت به داربست Gel-BG/Sr بسیار ناچیز بوده و از طرف دیگر وجود عروق خونی مشهود است. باقی‌مانده داربست Gel-BG توسط بافت همبند محاصره شده است در حد فاصله ضایعه دیده می‌شود. در نمونه کنترل ۸ هفته پس از جراحی حد فاصل بین دو انتهای استخوان، توسط بافت فیبروزی نازکی پوشیده شده است و تشکیل استخوان نابالغ مشهود بود. در گروه Gel-BG/Sr در کناره‌های نزدیک به دو انتهای داربست که در مجاورت استخوان سالم قرار دارد استخوان‌سازی نسبت به هفته ۴ چشمگیر بوده است و از طرف دیگر وجود عروق خونی و نفوذ سلول به داخل داربست مشاهده می‌شود و تشکیل تیغه‌های استخوانی از حاشیه به مرکز است. باقی‌مانده داربست Gel-BG/Sr که توسط بافت همبند محاصره شده است در حد فاصله ضایعه دیده می‌شود. در گروه Gel-BG، ۸ هفته پس از قراردادن داربست در حفره ایجادشده در جمجمه، نفوذ تیغه‌های استخوانی به مرکز نسبت به داربست Gel-BG/Sr بسیار ناچیز بوده است ولی نسبت به هم‌گروهی خود در ۸ هفته بیشتر است و از طرف دیگر وجود عروق خونی مشهود است. باقی‌مانده داربست Gel-BG که توسط بافت همبند محاصره شده است در حد فاصله ضایعه مشاهده می‌شود (شکل ۳).

مشاهده لام‌های تهیه‌شده با رنگ‌آمیزی مسون‌تری کروم اطلاعات زیر را نشان داد (شکل ۴). در ۴ هفته، تشکیل استخوان نابالغ فقط در محل قرارگیری داربست Gel-BG/Sr مشاهده شد که به دنبال آن تشکیل استخوان در زمان‌های بعدی نیز در این گروه ادامه یافت. در گروه کنترل نیز بافت فیبروزی مشاهده و تشکیل استخوان فقط در حاشیه‌های محل ایجاد ضایعه دیده شد. این در حالی بود که در گروه‌های تحت درمان با داربست، استخوان‌سازی نه تنها در هر دو طرف محل ضایعه بلکه در اطراف داربست‌ها نیز مشاهده شد. تشکیل استخوان جدید در داربست Gel-BG/Sr کاملاً واضح‌تر نسبت به گروه Gel-BG مشاهده شد که با مشاهده رسوب کلاژن بالغ در محل تشکیل استخوان جدید به تایید رسید (شکل ۴).

رنگ‌آمیزی آلفازین‌رد نیز جهت مشاهده مراحل مینرالیزاسیون بافت تشکیل‌شده در زمان‌های مشخص انجام شد. شکل ۵ شروع تشکیل استخوان نابالغ را در داربست Gel-BG/Sr در ۴ هفته نشان می‌دهد که به دنبال آن تشکیل استخوان جدید و ایجاد پل استخوانی در ۸ و ۱۲ هفته ادامه یافت. اما در گروه کنترل تشکیل استخوان فقط در حاشیه‌ها مشاهده شد و سایر نواحی توسط بافت فیبروز پوشیده شده بود. داربست‌های گروه Gel-BG، نیز، استخوان‌سازی کمتری را نسبت به داربست دیگر نشان دادند و بقیه ضایعه با بافت فیبروز پوشانده شده بود. یافته‌های حاصل از این مطالعه نشان‌دهنده آن است که کاشت داربست Gel-BG/Sr می‌تواند استخوان‌سازی را به‌طور موثرتری نسبت به داربست مشابه فاقد استرانسیوم در مدل خرگوشی ایجاد کند (شکل ۵).



شکل ۶) تصاویر میکروسکوپ الکترونی داربست‌های تهیه‌شده: (A) Gel-BG، (B) Gel-BG/Sr

مقایسه شد. در بررسی‌های درون‌تنی، با قراردادن داربست‌ها در ضایعه جمجمه رت، مشاهده شد که داربست حاوی Sr قابلیت تشکیل عروق جدید و استخوان‌سازی بیشتری نسبت به نمونه کنترل فاقد Sr دارد و بنابراین این داربست پتانسیل به‌کارگیری در بازسازی نقایص استخوانی را دارد[38].

مطالعات نشان داده است که Sr می‌تواند موجب کاهش بیان سیتوکاین اینترلوکین-6 (IL-6) شود. این سیتوکاین، یک محرک پیش‌التهابی است که موجب فراخواندن استئوکلاست‌ها و بازجذب استخوانی می‌شود. همچنین، Sr می‌تواند باعث افزایش بیان ژن‌ها و پروتئین‌های دخیل در تشکیل استخوان و بازسازی آن مانند استئوکالسن و BMP شود[39]. بررسی‌های برون‌تنی نشان داده‌اند که یون‌های Sr می‌توانند تکثیر و تمایز سلول‌های پیش‌ساز استخوانی را به‌علت استئوبلاست‌ها از طریق فعال‌کردن ریسپتورهای غشایی مربوط به کلسیم (CaSR) و مسیر پیام‌دهی Wnt/β-catenin کاتنین اعمال کنند[40]. همچنین، آزاد شدن استرانسیوم از داربست مهندسی‌شده می‌تواند موجب تحریک آزاد شدن فاکتورهای پیش‌ساز عروقی مانند VEGF، BFGF، ماتریکس ماتالوپروتئاز-۲ (MMP-۲) (2) شود[41]. بعضی مطالعات هم نشان داده‌اند که یون‌های Sr می‌توانند استئوبلاست‌ها را وادار به ترشح سیتوکاین‌های عروقی کنند[38].

نشان داده شده است که ورود Sr در داخل میکروسفرهای BG می‌تواند از طریق بهبود عروق‌زایی زود هنگام موجب تقویت بازسازی بافتی و همچنین تشکیل استخوان شود[42]. این کار از طریق تبدیل فنوتایپ ماکروفاژهای نوع MI به MII و بیان میزان بالایی از فاکتورهای رشد BB مشتق‌شده از پلاکت‌ها (PDGF-BB) انجام می‌گیرد. استفاده از Sr به‌همراه سایر یون‌ها در ساختار BG، همچنین در بسیاری از مطالعات مورد بررسی قرار گرفته است. به‌عنوان مثال، کارگران و همکاران، اثربخشی به‌کارگیری همزمان Sr و Co در ساختار BG را مورد مطالعه قرار دادند. نمونه‌های تهیه‌شده به‌همراه سلول‌های پری‌واسکولار بند ناف انسانی (HUCPVCS) در ضایعه رانی ایجادشده در خرگوش کار گذاشته شده و به‌مدت ۱۲ هفته بررسی شدند. نتایج این مطالعه نشان‌دهنده تسریع و بهبود معنی‌دار عروق‌زایی و استخوان‌سازی در ضایعه پرشده با نمونه BG حاوی هر دو یون به‌همراه سلول بود[43].

در این مطالعه محدودیتی مشاهده نشد. پیشنهاد می‌شود در مطالعات آینده بررسی استخوان‌سازی تا پایان ۱۲ هفته صورت پذیرد.

نتیجه‌گیری

جایگزینی استرانسیوم با کلسیم در ساختار شیشه زیست‌فعال می‌تواند موجب بهبود استخوان‌سازی شده و بنابراین به نظر استراتژی خوبی به‌منظور ساخت متریال‌هایی برای بازسازی استخوان است. لازم به ذکر است که فهم دقیق مکانیزم‌های دربرگیرنده تعاملات مولکولی با یون‌های آزادشده از شیشه زیست‌فعال و اثر آنها روی محیط فیزیولوژیکی می‌تواند به ما کمک کند که شیشه‌ای را طراحی کنیم که متناسب با خاصیت بافت مورد مطالعه باشد.

تشکر و قدردانی: مودی از طرف نویسندگان گزارش نشده است.

تاییدیه اخلاقی: در این پژوهش اصول کار با حیوانات مطابق قوانین پژوهش دانشگاه تربیت مدرس با شناسه IR.MODARES.REC.1398.070 انجام شد.

استئوپروز، بیماری که با پایین‌آمدن دانسیته معدنی استخوان به‌وجود می‌آید، تاکنون ۲۰۰ میلیون نفر را در جهان کنونی گرفتار کرده است و تقریباً نصف جمعیت جهان در طول زندگی خود حداقل یک شکستگی استخوان را تجربه می‌کنند. چاقی، آنومالی‌های ژنتیکی، افزایش میزان تصادفات و افزایش سن جمعیت، همگی عواملی هستند که باعث آسیب‌های استخوانی در جهان می‌شوند[30]. اگرچه استفاده از اتوگرافت‌ها به‌عنوان استاندارد طلایی در درمان ضایعات استخوانی در نظر گرفته می‌شوند، اما محدودیت‌های ناشی از دسترسی محدود و مرگ‌ومیر ناشی از عمل جراحی برای استخراج پیوند باعث شده است نتوان همیشه از این روش درمانی استفاده کرد. آلوگرافت‌ها نیز، همچنین، باعث برانگیختن پاسخ ایمنی و انتقال بیماری می‌شوند. مطالعات مهندسی بافت، به‌عنوان روش درمانی نوین، روی ساخت داربست‌ها برای فراهم‌آوردن ساختار سه‌بعدی برای حمایت سلول‌های استخوانی و همچنین تحریک تمایز استئوبلاست‌ها برای تشکیل استخوان تمرکز دارند[4].

از میان موادی که در ساخت داربست‌های مهندسی‌شده برای استخوان به کار گرفته می‌شوند، شیشه‌های زیست‌فعال، بر پایه سیلیکات یا فسفات، بیومتریال‌های زیست‌فعال معدنی هستند که به‌طور گسترده‌ای مورد توجه قرار گرفته‌اند[31]. این شیشه‌ها دارای قابلیت بالای زیست‌فعالی بوده که می‌توانند هم با بافت‌های نرم و هم با بافت‌های سخت پیوند برقرار کنند[9]. قرارگیری Sr در داخل شیشه زیست‌فعال می‌تواند همزمان تشکیل استخوان را تحریک و بازجذب آن را مهار کند[32]. همچنین، داروی استرانسیوم‌رنلات می‌تواند وقوع شکستگی‌ها را در بیماران مسن دارای استئوپروز کاهش دهد[33] و در کلینیک هم مدت‌زمان زیادی است که در درمان استئوپروز در خانم‌های منوپوز استفاده می‌شود[34]. در مطالعه کنونی، فرض بر این بود که قراردادن ۵٪ وزنی یون استرانسیوم در داخل شبکه سیلیکاتی شیشه زیست‌فعال می‌تواند اثر افزایشی تحریک‌کننده روی میزان زیست‌فعالی و عروق‌زایی و استخوان‌سازی شیشه زیست‌فعال داشته باشد. مطالعات نشان داده‌اند که جایگزینی ۵٪ استرانسیوم در داخل شیشه زیست‌فعال می‌تواند تکثیر، فعالیت ALP و بیان کلاژن نوع I و تشکیل استخوان را در سلول‌های استئوبلاستی موش افزایش بدهد[30]. بیومتریال‌های حاوی Sr می‌توانند باعث افزایش تشکیل و/یا بازسازی استخوان شوند. فلز Sr تحت تاثیر گذشت زمان و با غلظت مناسب اثر خود را اعمال می‌کند[35, 36]. افزودن Sr به‌تنهایی یا به‌همراه سایر یون‌ها مانند Li به داربست متخلخل تهیه‌شده از BG، همچنین نشان داده شده است که خاصیت استخوان‌سازی و بازسازی استخوان را در ضایعه ران خرگوش افزایش می‌دهد[35]. در مطالعه‌ای که توسط ژانگ و همکاران انجام شد، نانوژل PIB که کاندیدای مناسبی برای درمان‌های پزشکی بازساختی است اما فاقد خاصیت زیست‌فعالی و استئوکاندکتیویته است، با شیشه زیست‌فعال مزومتخلخل حاوی استرانسیوم (Sr-MBG) برای درمان ضایعه ایجادشده در ران رت مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که افزودن Sr-MBG قابلیت استخوان‌سازی را به میزان معنی‌داری نسبت به گروه کنترل افزایش می‌دهد. همچنین این اثر، هنگامی که سلول‌های استئوبلاست به هیدروژل کامپوزیتی افزوده می‌شود، بهبود می‌یابد[37]. در مطالعه‌ای دیگر توسط ژائو و همکاران، داربست مزومتخلخل BG-Sr با روش پرینت سه‌بعدی ساخته شده و خاصیت استخوان‌سازی و عروق‌زایی این داربست نسبت به نمونه فاقد Sr

osteoblast-like cell metabolism and differentiation. *J Biomed Mater Res*. 1997;34(1):29-37.

17- Marie PJ, Ammann P, Boivin G, Rey C. Mechanisms of action and therapeutic potential of strontium in bone. *Calcif Tissue Int*. 2001;69(3):121-9.

18- Marie PJ. Strontium ranelate: A physiological approach for optimizing bone formation and resorption. *Bone*. 2006;38(2 Suppl 1):S10-4.

19- Boivin G, Deloffre P, Perrat B, Panczer G, Boudeulle M, Mauras Y, et al. Strontium distribution and interactions with bone mineral in monkey iliac bone after strontium salt (S 12911) administration. *J Bone Miner Res*. 1996;11(9):1302-11.

20- Guida A, Towler MR, Wall JG, Hill RG, Eramo S. Preliminary work on the antibacterial effect of strontium in glass ionomer cements. *J Mater Sci Lett*. 2003;22(20):1401-3.

21- Xue W, Moore JL, Hosick HL, Bose S, Bandyopadhyay A, Lu WW, et al. Osteoprecursor cell response to strontium-containing hydroxyapatite ceramics. *J Biomed Mater Res A*. 2006;79(4):804-14.

22- Bellucci D, Sola A, Cacciotti I, Bartoli C, Gazzarri M, Bianco A, et al. Mg- and/or Sr-doped tricalcium phosphate/bioactive glass composites: Synthesis, microstructure and biological responsiveness. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2014;42:312-24.

23- Day RM. Bioactive glass stimulates the secretion of angiogenic growth factors and angiogenesis in vitro. *Tissue Eng*. 2005;11(5-6):768-77.

24- Vichery C, Nedelec JM. Bioactive glass nanoparticles: From synthesis to materials design for biomedical applications. *Materials (Basel)*. 2016;9(4):pii:E288.

25- Mozafari M, Moztarzadeh F, Rabiee M, Azami M, Maleknia S, Tahriri MR, et al. Development of macroporous nanocomposite scaffolds of gelatin/bioactive glass prepared through layer solvent casting combined with lamination technique for bone tissue engineering. *Ceram Int*. 2010;36(8):2431-9.

26- Nadeem D, Kiamehr M, Yang X, Su B. Fabrication and in vitro evaluation of a sponge-like bioactive-glass/gelatin composite scaffold for bone tissue engineering. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2013;33(5):2669-78.

27- Peter M, Binulal NS, Nair SV, Selvamurugan N, Tamura H, Jayakumar R. Novel biodegradable chitosan-gelatin/nano-bioactive glass ceramic composite scaffolds for alveolar bone tissue engineering. *Chem Eng J*. 2010;158(2):353-61.

28- Malafaya PB, Silva GA, Reis RL. Natural-origin polymers as carriers and scaffolds for biomolecules and cell delivery in tissue engineering applications. *Adv Drug Deliv Rev*. 2007;59(4-5):207-33.

29- Zare Jalise S, Baheiraei N, Bagheri F. The effects of strontium incorporation on a novel gelatin/bioactive glass bone graft: In vitro and in vivo characterization. *Ceram Int*. 2018;44(12):14217-27.

30- Amini AR, Laurencin CT, Nukavarapu SP. Bone tissue engineering: Recent advances and challenges. *Crit Rev Biomed Eng*. 2012;40(5):363-408.

31- Chen QZ, Thompson ID, Boccaccini AR. 45S5 Bioglass-derived glass-ceramic scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*. 2006;27(11):2414-25.

32- Marie PJ, Felsenberg D, Brandi ML. How strontium ranelate, via opposite effects on bone resorption and formation, prevents osteoporosis. *Osteoporos Int*. 2011;22(6):1659-67.

33- Reginster JY, Felsenberg D, Boonen S, Diez-Perez A,

تعارض منافع: نویسندگان اعلام می‌دارند هیچ‌گونه تعارض منافعی وجود ندارد.

سهم نویسندگان: علی عادل‌مهر (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/پژوهشگر اصلی (۳۰٪)؛ نفیسه بحیرائی (نویسنده دوم)، پژوهشگر اصلی/نگارنده بحث (۵۵٪)؛ حسین عینی (نویسنده سوم)، پژوهشگر کمکی/تحلیلگر آماری (۱۵٪)

منابع مالی: پژوهش حاضر تحت حمایت مالی منبع خاصی نبوده است.

منابع

- Greenwald AS, Boden SD, Goldberg VM, Khan Y, Laurencin CT, Rosier RN, et al. Bone-graft substitutes: Facts, fictions, and applications. *J Bone Joint Surg Am*. 2001;83-A Suppl 2 Pt 2:98-103.
- Stevens B, Yang Y, Mohandas A, Stucker B, Nguyen KT. A review of materials, fabrication methods, and strategies used to enhance bone regeneration in engineered bone tissues. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2008;85(2):573-82.
- Wang P, Zhao L, Liu J, Weir MD, Zhou X, Xu HH. Bone tissue engineering via nanostructured calcium phosphate biomaterials and stem cells. *Bone Res*. 2014;2:14017.
- Jones JR, Hench LL. Regeneration of trabecular bone using porous ceramics. *Curr Opin Solid State Mater Sci*. 2003;7(4-5):301-7.
- Arahira T, Todo M. Effects of proliferation and differentiation of mesenchymal stem cells on compressive mechanical behavior of collagen/ β -TCP composite scaffold. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2014;39:218-30.
- Zou C, Weng W, Deng X, Cheng K, Liu X, Du P, et al. Preparation and characterization of porous beta-tricalcium phosphate/collagen composites with an integrated structure. *Biomaterials*. 2005;26(26):5276-84.
- Baheiraei N, Zare Jalise S, Sanei SA. Recent advances in bioglass applications for bone tissue engineering. *Pathobiol Res*. 2017;20(2):1-22. [Persian]
- Dziadek M, Stodolak-Zych E, Cholewa-Kowalska K. Biodegradable ceramic-polymer composites for biomedical applications: A review. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2017;71:1175-91.
- Krishnan V, Lakshmi T. Bioglass: A novel biocompatible innovation. *J Adv Pharm Technol Res*. 2013;4(2):78-83.
- Gentleman E, Fredholm YC, Jell G, Lotfibakhshaei N, O'Donnell MD, Hill RG, et al. The effects of strontium-substituted bioactive glasses on osteoblasts and osteoclasts in vitro. *Biomaterials*. 2010;31(14):3949-56.
- Courthéoux L, Lao J, Nedelec JM, Jallot E. Controlled bioactivity in zinc-doped sol-gel-derived binary bioactive glasses. *J Phys Chem C*. 2008;112(35):13663-7.
- Huang M, Hill RG, Rawlinson SCF. Zinc bioglasses regulate mineralization in human dental pulp stem cells. *Dent Mater*. 2017;33(5):543-52.
- Dietrich E, Oudadesse H, Lucas-Girot A, Mami M. In vitro bioactivity of melt-derived glass 46S6 doped with magnesium. *J Biomed Mater Res A*. 2009;88(4):1087-96.
- Mariappan CR, Ranga N. Influence of silver on the structure, dielectric and antibacterial effect of silver doped bioglass-ceramic nanoparticles. *Ceram Int*. 2017;43(2):2196-201.
- Beattie JH, Avenell A. Trace element nutrition and bone metabolism. *Nutr Res Rev*. 1992;5(1):167-88.
- Sun ZL, Wataha JC, Hanks CT. Effects of metal ions on

39- Rahman MS, Akhtar N, Jamil HM, Banik RS, Asaduzzaman SM. TGF- β /BMP signaling and other molecular events: Regulation of osteoblastogenesis and bone formation. *Bone Res.* 2015;3:15005.

40- Yang F, Yang D, Tu J, Zheng Q, Cai L, Wang L. Strontium enhances osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells and in vivo bone formation by activating Wnt/catenin signaling. *Stem Cells.* 2011;29(6):981-91.

41- Wang X, Wang Y, Li L, Gu Z, Xie H, Yu X. Stimulation of strontium-doped calcium polyphosphate for bone tissue engineering to protein secretion and mRNA expression of the angiogenic growth factors from endothelial cells in vitro. *Ceram Int.* 2014;40(5):6999-7005.

42- Zhao F, Lei B, Li X, Mo Y, Wang R, Chen D, et al. Promoting in vivo early angiogenesis with sub-micrometer strontium-contained bioactive microspheres through modulating macrophage phenotypes. *Biomaterials.* 2018;178:36-47.

43- Kargozar S, Lotfibakhshaiesh N, Ai J, Mozafari M, Brouki Milan P, Hamzehlou S, et al. Strontium- and cobalt-substituted bioactive glasses seeded with human umbilical cord perivascular cells to promote bone regeneration via enhanced osteogenic and angiogenic activities. *Acta Biomaterialia.* 2017;58:502-14.

Rizzoli R, Brandi ML, et al. Effects of long-term strontium ranelate treatment on the risk of nonvertebral and vertebral fractures in postmenopausal osteoporosis: Results of a five-year, randomized, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum.* 2008;58(6):1687-95.

34- Tenti S, Cheleschi S, Guidelli GM, Galeazzi M, Fioravanti A. What about strontium ranelate in osteoarthritis? Doubts and securities. *Mod Rheumatol.* 2014;24(6):881-4.

35- Khan PK, Mahato A, Kundu B, Nandi SK, Mukherjee P, Datta S, et al. Influence of single and binary doping of strontium and lithium on in vivo biological properties of bioactive glass scaffolds. *Sci Rep.* 2016;6:32964.

36- Neves N, Linhares D, Costa G, Ribeiro CC, Barbosa MA. In vivo and clinical application of strontium-enriched biomaterials for bone regeneration: A systematic review. *Bone Joint Res.* 2017;6(6):366-75.

37- Zhang Q, Chen X, Geng S, Wei L, Miron RJ, Zhao Y, et al. Nanogel-based scaffolds fabricated for bone regeneration with mesoporous bioactive glass and strontium: In vitro and in vivo characterization. *J Biomed Mater Res A.* 2017;105(4):1175-83.

38- Zhao S, Zhang J, Zhu M, Zhang Y, Liu Z, Tao C, et al. Three-dimensional printed strontium-containing mesoporous bioactive glass scaffolds for repairing rat critical-sized calvarial defects. *Acta Biomaterialia.*