مقاله تحقیقی

تغییرات بافت‌شناسی در استخوان تیبیا و مغزاستخوان آن پس از تابش لیزر کم‌توان بر تنه استخوان تیبیای خرگوش

محمد بیات .Ph.D*، مسعود رفیع‌زاده رشید*، محمد رخشان .M.D**، حسین حکمت .M.D*

* مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

** گروه پاتولوژی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

تاریخ وصول: مهر ماه ۸۲، تاریخ پذیرش: آبان ماه ۸۲

چکیده

هدف: بررسی واکنش بافت استخوان متراکم تنه تیبیا و مغز استخوان آن به تابش لیزر کم توان

مواد و روشها: ده خرگوش بالغ نر به‌صورت تصادفی به گروههای شاهد و تجربی تقسیم شدند. لیزر کم توان هلیوم - نئون به یک نقطه ثابت تنه استخوان تیبیای خرگوشهای گروه تجربی یکبار در روز و به‌مدت ۱۴ روز متوالی تابیده شد. دانسیته انرژی لیزر $36J/cm^2$ بود. خرگوشهای گروه شاهد لیزر دریافت نکردند. در انتهای دوره، خرگوشها به‌وسیله کلروفرم کشته شدند و نمونه‌ای که از هر خرگوش تهیه شده بود درون فرمالین سالین، تثبیت و با EDTA دکلسیفیه شد و برای مطالعه به‌وسیله میکروسکوپ نوری آماده گردید. برش‌های حاصل به‌وسیله روش رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین رنگ‌آمیزی و به‌صورت توصیفی و کمی مطالعه شدند.

یافته‌ها: در گروه شاهد استخوان متراکم متشکل از استخوان تیغه‌ای است که حاوی سیستم‌های هاورس منظم است. در گروه تجربی سیستم‌های هاورس نامنظم است و برخی از مجاری هاورس متسع شده‌اند که در آنها فعالیت خونسازی مشاهده شد. در حفره مغز استخوان گروه تجربی سلولهای خونی بیش از گروه شاهد است پریوست گروه تجربی ضخیمتر از گروه شاهد است.

نتیجه‌گیری: تابش لیزر کم‌توان هلیوم - نئون، پریوست تنه استخوان تیبیای خرگوش را ضخیم‌تر و فعالیت خونسازی آنرا افزایش داد.

واژه‌های کلیدی: لیزر، استخوان تیبیا، خونسازی، خرگوش

مقدمه

محققان آثار بیواستیمولیتوری لیزرهای کم‌توان را در زمینه التیام نشان داده‌اند [۴-۱]. تحقیقاتی نیز در خصوص تأثیر تابش لیزرهای کم توان بر بافت استخوانی به‌عمل آمده است. Chekurov برای اولین بار در سال ۱۹۷۱ میلادی اثر مثبت تابش لیزر کم توان را بر ترمیم استخوان گزارش کرد [۵]. به‌دنبال آن تحقیقات دیگری در این زمینه صورت گرفته است که نشان‌دهنده تأثیر مثبت لیزرهای کم توان بر شکستگی و سلولهای استخوانی است. در همین خصوص محققان اعلام کرده‌اند که تابش لیزر از طریق مسیرهای مختلف بیولوژی، ایجاد محیط مساعد برای ترمیم [۶]، تنظیم عملکرد استئوسیتها و تسریع متابولیسم آن [۷]، افزایش سرعت ترمیم در مراحل اولیه شکستگی و افزایش استحکام مکانیکی کال استخوانی موجب تسریع فرآیند التیام شکستگی می‌شود [۸و۹]. همچنین تابش لیزر کم توان موجب فعال شدن سلولهای استئوبلاستی و تسریع بخشی کلسیفیکاسیون [۹]، و تکثیر و تمایز آنها در محیط کشت شد [۱۰و۱۱]. Ninomiya و همکاران لیزر از نوع Nd:YAG را به متافیز استخوان ران موشها تاباندند و تجزیه و تحلیل هیستومورفومتری نمودند. آنها مشاهده کردند تابش لیزر

آدرس مکاتبه: تهران، دانشگاه علوم‌پزشکی شهید بهشتی، گروه علوم تشریح، صندوق‌پستی ۱۹۳۹۵-۴۷۱۹ Email:bayat_m@yahoo.com

موجب شد که میانگین حجم استخوان و رسوب لایه‌های معدنی جدید افزایش معنی‌داری نسبت به گروه شاهد پیدا کند [۱۲].

تحقیقات فوق بخش‌هایی از واکنش بافت استخوان را در پی‌تابش لیزر نشان می‌دهد اما موارد دیگری هست که باید روشن شود؛ از آن جمله می‌توان به واکنش بافت استخوان متراکم به پرتو لیزر هلیوم نئون اشاره کرد که تاکنون بررسی نشده است و این کمبود اطلاعات شاید یکی از دلایل عدم کاربرد لیزر به‌عنوان ابزار درمانی در موارد درمانهای ارتودونتیک حرکات دندان‌ها یا فک، کشیدن دندان و تحریک ترمیم استخوان علیرغم آثار اثبات شده بیواستیمولیتوری و ترمیمی آن است که می‌تواند موجب کوتاه شدن طول دوره درمان شود.

هدف تحقیق حاضر؛ بررسی اثر یک الگوی تابش لیزر کم توان هلیوم - نئون روی بافت استخوان متراکم طبیعی خرگوشهای بالغ طبیعی به‌وسیله روش میکروسکوپی نوری است که در تحقیق Luger و همکاران موجب تسریع التیام شکستگی شده است [۸].

مواد و روشها

۱۰ رأس خرگوش نر بالغ نژاد Dutch که ۳۰۰ ± ۱۹۰۰ گرم وزن داشتند از انستیتو پاستور ایران تهیه و در یک حیوانخانه درون قفسهای انفرادی تمیز نگهداری شدند و دسترسی آزاد به آب و خوراک خرگوش داشتند و با کاهو هم تغذیه شدند. خرگوشها به‌طور تصادفی به دو گروه شاهد و تجربی تقسیم شدند. با تزریق کتامین هیدروکلراید (۲۵mg/kg) و دیازپام (۲/۵mg/kg) به همه خرگوشها، حالت آرامش در آنها ایجاد شد. موی پوست سطح داخلی نیمه دیستال تنه استخوان تیبیای خرگوشها تراشیده شد. لیزر به‌صورت یک بار در روز طی ۱۴ روز متوالی به نقطه‌ای ثابت واقع در ۵/۵ سانتیمتر پایین‌تر از توبروزیته تیبیای اندام خلفی سمت راست خرگوشهای گروه تجربی در حالی که درون نگهدارنده مقید شده بودند تابانده شد. مشخصات لیزر کم توان از این قرار بود؛ لیزر کم توان هلیوم - نئون با طول موج ۶۳۲۸ آنگستروم و انرژی دانسیته $36J/cm^2$ که از دستگاه مولد لیزر با قدرت خروجی ۱۰mW ساخت سازمان انرژی اتمی ایران، تهران تولید شد و در هر جلسه به‌مدت ۶۰ دقیقه به خرگوشها تابانده شد. برای کنترل خروجی دستگاه مولد لیزر، از دستگاه Power meter ساخت آن سازمان استفاده شد. خرگوشهای گروه شاهد شرایط مشابه گروه تجربی را تحمل کردند. فقط دستگاه مولد لیزر خاموش بود. در انتهای دوره تابش لیزر، همه خرگوشها با روش استنشاق کلروفرم در فضای بسته کشته شدند و استخوان تیبیای سمت راست از بدن آنها خارج شد و از نقطه محل تابش در خرگوش‌های گروه تجربی و از نقطه مشابه در گروه شاهد، نمونه برای انجام مطالعه میکروسکوپ نوری تهیه شد. نمونه ابتدا درون محول فرمالین سالین به‌مدت یک هفته قرار گرفت، سپس درون محلول EDTA با pH=۷/۳ به‌مدت ۶ هفته قرار گرفت. در انتهای هر هفته محلول EDTA عوض شد. سپس نمونه پردازش یافته و قالبگیری شد. برشهایی که به ضخامت ۵ میکرون عمود بر محور طویل استخوان تهیه شده بود با روش رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین رنگ شدند و به‌صورت توصیفی مطالعه شدند و ضخامت دیافیز استخوان حد فاصل لبه خارجی پریوست تا لبه داخلی آندوست گروههای شاهد و تجربی به‌وسیله قطعه چشمی مدرج که فاصله بین نقاط آن در بزرگنمایی ۴۰۰ برابر، ۱۲/۵ میکرون بود اندازه‌گیری شد و به‌وسیله Student *t* test آزمون شد.

یافته‌ها

در هر پنج نمونه گروه شاهد موارد زیر دیده شد:

در برشی از مقطع عرضی تنه استخوان تیبیا، استخوان متراکم حاوی تیغه‌های استخوانی است که به‌صورت سیستم‌های هاورس آرایش یافته‌اند (شکل ۱). هر سیستم هاورس متشکل از تعدادی تیغه‌های متحدالمرکز است که بین آنها لاکوناهای محتوی استئوسیت و در مراکز آن یک مجرای هاورس مشاهده می‌شود (شکل ۲). پریوست شامل یک الی دو ردیف سلول و رشته‌های بافت همبندی بین آنها است و در عمق آن هم استخوان زیر پریوستی مشاهده می‌شود (شکل ۲). قسمت اعظم درون حفره مرکزی مغز استخوان را بافت چربی پرکرده است و در باقیمانده آن تعداد اندکی مقاطع عروق خونی

و سلولهای خونی و پیش سازهای آنها که مراکز خونسازی را تشکیل داده‌اند مشاهده می‌شود (شکل ۳).

در هر پنج نمونه گروه تجربی موارد زیر دیده شد:

در مقطع عرضی تنه استخوان تیبیا، سیستم‌های هاورس نامنظم وجود دارد که بین آنها مجاری هاورس متسع شده قرار دارند (شکل ۴) درون این مجاری هاورس، سلولهای خونی و پیش‌سازهای آنها که کانونهای خونسازی را تشکیل داده‌اند مشاهده می‌شود (شکل ۵). به نظر می‌رسد که استئوسیت‌ها نسبت به گروه شاهد هیپرتروفی شده‌اند (شکل ۵). پریوست ضخامت بیشتری نسبت به گروه شاهد پیداکرده است و متشکل از ۳ الی ۴ ردیف سلول و تراکم قابل توجهی از رشته‌های بافت همبندی است (شکل ۶). در حفره مرکزی مغزاستخوان تعداد سلولهای خونی نسبت به گروه شاهد افزایش زیادی یافته است (شکل ۷).

میانگین و انحراف معیار ضخامت دیافیز استخوان در گروه شاهد ۸۱۳/۲۵±۵۶/۸۸ میکرومتر و در گروه تجربی ۸۲۷/۵±۶۵/۷۵ میکرومتر بود و بین دو گروه اختلاف معنی‌داری آماری مشاهده نشد.

بحث

Trelles & Mayayo در مطالعات خود نشان دادند که تابش لیزر به موشهای دچار شکستگی تیبیا موجب افزایش ضخامت پریوست تازه تشکیل شده می‌شود [۷]. تجویز فاکتور رشد شبه انسولینی یک (IGF-I) به موشهای صحرایی ماده موجب افزایش تشکیل استخوان پریوستی در تنه استخوان تیبیا شد [۱۳] در تحقیق حاضر تابش لیزر کم توان با تحریک سلولهای واقع در لایه پریوست استخوان تیبیا، موجب پرولیفراسیون و افزایش تعداد آنها و تشکیل یک لایه پریوستی متشکل از ۴-۳ ردیف سلول شد.

Trelles & Mayayo در بخش دیگری از نتایج خود به فعالیت خون‌سازی در محل کال استخوانی اشاره کردند. اما در تحقیق حاضر در بخشی از مجاری هاورس واقع در استخوان متراکم طبیعی مراکز خونسازی تشکیل شده بود که این می‌تواند نمایانگر پتانسیلی باشد که در بافت استخوان متراکم وجود دارد؛ و در صورت دریافت تحریک مناسب، استخوان به آن واکنش نشان داده و با تحمل تغییرات تجدید ساختاری مناسب در سیستم هاورس، برای افزایش ابعاد مجرای هاورس فضا ایجادکرده و این امکان را فراهم آورده است که بافت استخوان از انرژیی که به آن منتقل شده است حداکثر استفاده راکرده و طی مدت کوتاهی که حدود ۱۶ روز طول می‌کشد، مراکز خونسازی جدیدی را درون بافت استخوانی تولید نماید. با توجه به اینکه در شرایط طبیعی تولید یک سیستم هاورس جدید طی فعالیت تجدید ساختار استخوان بین یک الی سه ماه زمان لازم دارد [۱۴] اهمیت تأثیر لیزر بر فعالیت تجدید ساختاری استخوان که چنین پویایی را به آن داده است، بیشتر آشکار می‌شود.

نکته‌ای که در این میان مطرح است بررسی میزان استحکام استخوان تحت این شرایط است، هر چند که به نظر می‌رسد ضخیم شدگی پریوست و هیپرتروفی استئوسیتها نشانه‌های افزایش فعالیتهای تولیدی سلولهای استئوسیت و در نتیجه افزایش استحکام استخوان هستند اما ضروری است که با اجرای تحقیقات دیگر و انجام آزمایشهای بیومکانیکی و دانسیتومتری بررسی بیشتری انجام شود.

یکی دیگر از یافته‌های جالب تحقیق حاضر، افزایش سلولهای خونی و به طبع آن فعالیت خونسازی در حفره مرکزی مغز استخوان است که با توجه به اینکه خرگوشها از نظر سنی بالغ محسوب می‌شوند، این حفره در خرگوشهای گروه شاهد اغلب از بافت چربی پر شده بود؛ اما در گروه تجربی و تحت تأثیر پرتوی لیزر افزایش سلولهای خونی تجربی در آن دیده شد. این یافته‌ها ممکن است اهمیت بالینی هم داشته باشند. به‌عنوان مثال در آنمی آپلاستیک اکتسابی که در آن حفره مرکزی مغز استخوان به علت شیمی درمانی و موارد دیگر دچار هیپوسلولاریته می‌شود [۱۵] ممکن است تابش لیزر با نتایج مثبتی همراه باشد که البته روشن شدن این موضوع احتیاج به تحقیقات بیشتر دارد.

در تحقیق Tang & Chai مشاهده شد لیزر تأثیر مستقیمی روی سلولهای مختلف دارد؛ از جمله باعث افزایش تعداد ماکروفاژها، افزایش فعالیت فیبروبلاست‌ها، افزایش فعالیت تولیدی کوندروسیت‌ها و ظهور زودهنگام استئوکلاست‌ها

می‌شود.

همچنین باعث افزایش تشکیل مویرگها و رسوب نمک کلسیم می‌گردد. محققان نتیجه گرفتند که لیزر از مسیرهای مختلف باعث تسریع بخشی التیام شکستگی شده است [۶]. Yamada هم براساس یافته‌های یافته‌های تحقیق خود نتیجه گرفت که تابش لیزر سلولهای استئوبلاستیک را از طریق نور فعال می‌کند و رشد و کلسیفیکاسیون آنها را شتاب می‌بخشد [۹].

Ninomiya و همکاران اعلام کردند تحقیقات قبلی نشان داده است که لیزرهایی که پرتو خروجی آنها از نوع ضربانی (Pulse) بافرکانس بالا است امواج صوتی در سطح بافت هدف تولید می‌کنند. آنها تأثیر این نوع لیزر را روی تشکیل استخوان بررسی کردند [۱۲]. آنها بر اساس یافته‌های تحقیق اعلام کردند که تعداد ضربانهای لیزر بیشتر از شدت لیزر، تشکیل استخوان را تحت تأثیر قرار می‌دهد و نتایج تحقیق ایشان نشان داد که تابش لیزر با تعداد ضربان زیاد از نوع Nd:YAG تشکیل استخوان را در متافیز شتاب بخشید و دلیل احتمالی آن القای امواج فشاری به‌وسیله لیزر است. نویسندگان تحقیق حاضر پیشنهاد می‌کنند در تحقیقات دیگر، تراکم ماده معدنی استخوان (Bone Mineral Density) سنجش شود. همچنین دوز یا دانسیته انرژی تام لیزر بیشتری از طریق افزایش نقاط تابش به حیوانات آزمایشگاهی تجویز و تأثیرات احتمالی آن بر کل بافت خونی بدن و تأثیرات دراز مدت احتمالی آن سنجش شود. همچنین با توجه به عمق نفوذ بیشتر لیزرهای گالیوم آلومینیوم آرسنایدر در مقایسه با لیزرهای هلیوم - نئون پیشنهاد می‌شود [۱۶]. تحقیقات دیگری در این زمینه با این نوع لیزرها انجام شود. یکی دیگر از نکات قابل توجه چگونگی ایجاد مجاری هاورس متسع شده و استخوان متراکم و چگونگی استقرار سلولهای خونی و پیش‌سازهای آنها در این مجاری است که در حال حاضر نامعلوم است. احتمالاً با انجام مطالعات بعدی و شکستن دوره ۱۶ روزه مورد بررسی به دوره‌های کوچکتر، بخشهای دیگری از نکات تاریک فعلی روشن خواهد شد.

به‌عنوان نتیجه‌گیری می‌توان اعلام نمود که تابش لیزر کم‌توان هلیوم - نئون به تنه استخوان تیبیای خرگوش‌ها موجب افزایش ضخامت پریوست و اتساع مجاری هاورس و افزایش سلولهای خونی و فعالیت خونسازی در مجاری هاورس متسع و مغز استخوان شد.

تقدیر و تشکر

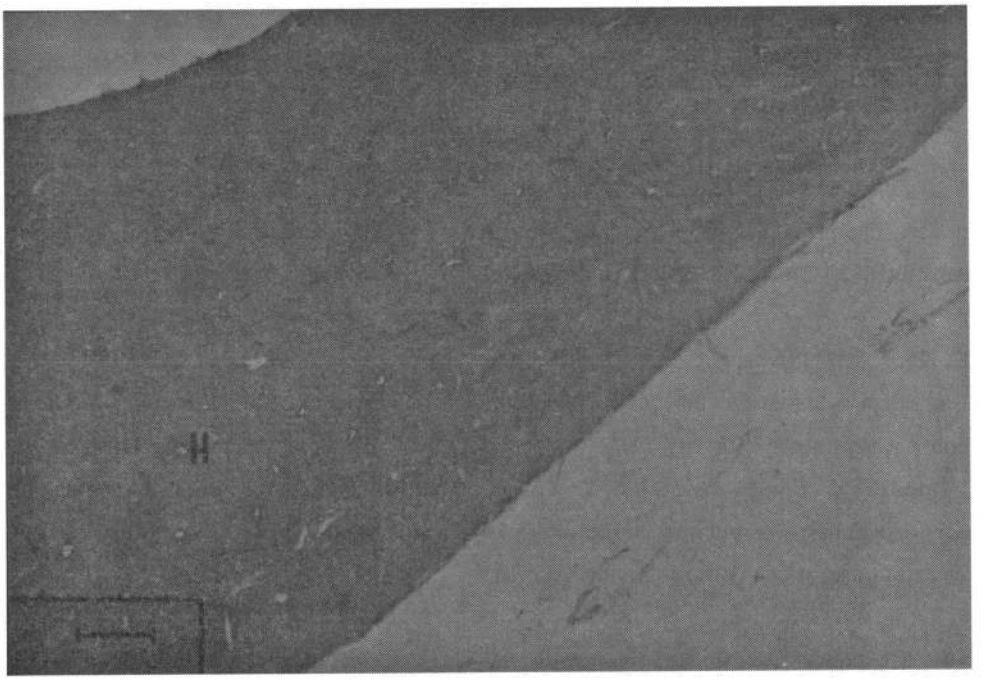
این مقاله بخشی از نتایج طرح تحقیقاتی مصوب دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی است که بدینوسیله از حوزه معاونت محترم پژوهشی آن دانشگاه و مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه متبوع که طرح در آنجا اجرا شده است سپاسگزاری می‌شود.

References

1. **Mester E, Spiry T, Szende E, Totas JG.** Effect of laser rays on wound healing. Am J Surg. 1971; 122: 532-535
2. **Kana JS, Hutschenreiter G, Haina D, Waidelich W.** Effect of Low-power density laser radiation on healing of open skin wounds in rats. Arch Surg. 1981; 116: 293-296
3. **Basford JR, Hallmann HD, Sheffield CG, Mackey GL.** Comparison of cold-quartz ultraviolet, low-energy laser, and occlusion in wound healing in a swine model. Arch Phys Med Rehabil. 1986; 67: 151-154
4. **Mester E, Mester AF, Mester A.** The biomedical effects of laser application. Laser Surg Med. 1985; 5: 31-39
5. **Chekurov PR.** Stimulation of bone regeneration by light from a helium-neon laser in experiments on dogs. Proceedings of an All-union symposium on the biological and antitumor action of laser radiation. Moscow. 1971, p 54
6. **Tang XM, Chai BP.** Effect of Co2 laser irradiation on experimental fracture healing : a transmission electron microscopic study. Laser Surg Med. 1986; 6: 346-352
7. **Trelles MA, Mayayo E.** Bone fracture consolidates faster with low-power laser. Laser Surg Med. 1987; 7: 36-45
8. **Luger ES, Rochkind S, Wollman Y, Kogan G, Dekels.**

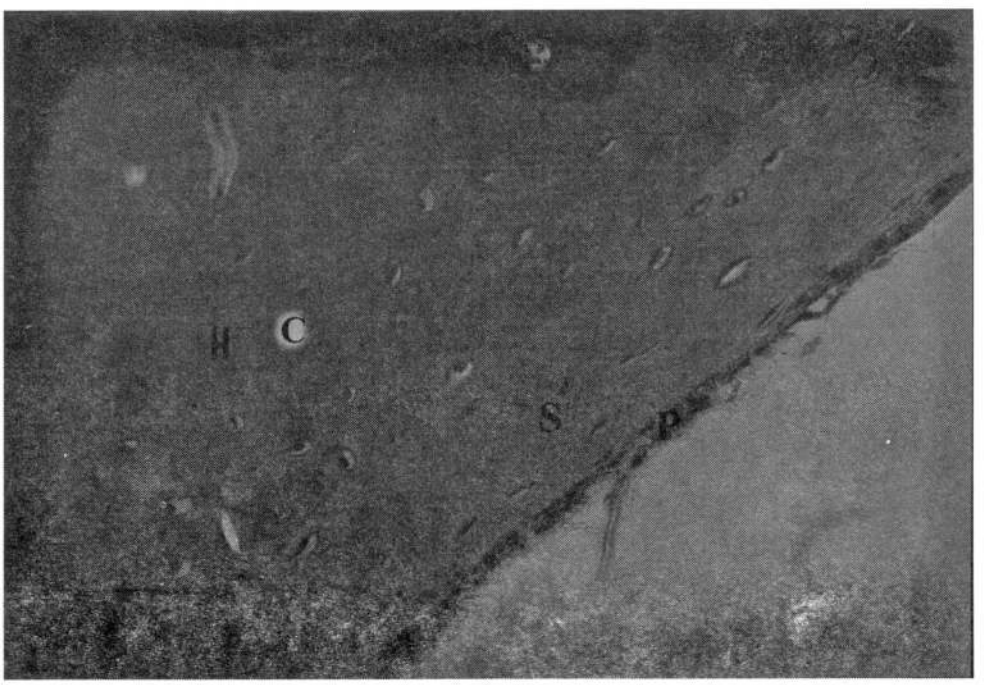
Effect of low-power laser irradiation on the mechanical properties of bone fracture healing in rats. Laser Surg Med. 1998; 22: 97-102

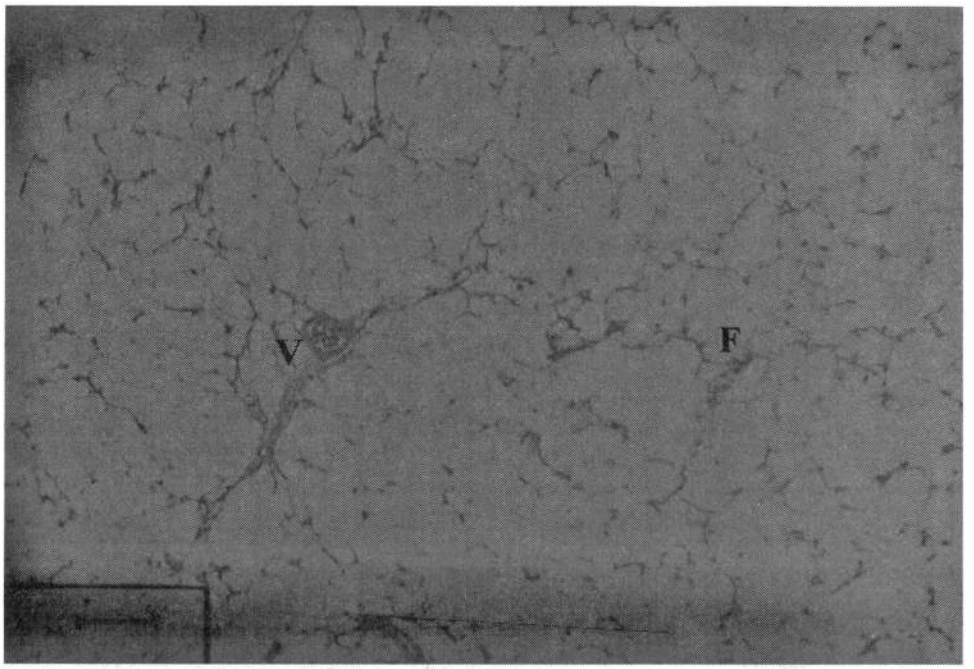
9. **Silva Junior AN, Pinheiro AL, Oliveira MG, Weismann R, Ramalho LM, Nicolau RA.** Computerized morphometric assessment of the effect of low-level laser Therapy on bone repair: an experim ental animal study. J Clin Laser Med Surg. 2002; 20(2): 83-7
10. **Yamada K.** Biological effects of low power laser irradiation on clonal osteoblastic cells (Mc 3T3-EI). J Japan Orthop Assoc. 1991; 65(9): 787-797
11. **Ozawa Y, Shimizu N, Kariya G, Abiko Y.** Low - energy laser irradiation stimulates bone nodule formation at early stage of cell culture in calvarial cells. Bone. 1998; 22(4): 347-354
12. **Ninomiya T, Miyamoto Y, Ito T, Yamashita A, Wakita M, Nishisaka T.** High-intensity pulsed laser irradiation accelerates bone formation in metaphseal trabecular bone in rat femur. J Bone Miner Meta. 2003; 21(2): 67-73
13. **Tobias JH, Chow JW, Chambers TJ.** Opposite effect of insulin-like growth factor-I on the formation of trabecular and cortical bone in adult female rats. Endocrinology. 1992; 131: 2387-2392
14. **Williams PL, Warwich R, Dyson M, Bannister LH.** Gray's Anatomy, 37th edn, Churchill livingstone. London 1989, pp 291-312
15. **Young NS.** Aplastic anemia, myelodysplasia, and related bone marrow failure syndromes. In Bruonwald E, Fauci AS, Kasper DL , Hauser SDL, Longo DL, Jameson JL (eds). Harrison's principles of internal medicine, 15th edn, Mc Graw Hill, New York. 2001, pp 692-706
16. **Saliba EN, Foreman SH.** Low-power lasers in Prentice WE ed, Therapeutic Modalities in Sport Medicine, Times mirror/ mosby College publishing, St Louis. 1990, p 201



شکل ۱. برش عرضی تنه استخوان تیبیا گروه شاهد و سیستمهای هاورس (H). رنگ‌آمیزی: H&E، بزرگنمایی: ۱۰۰×

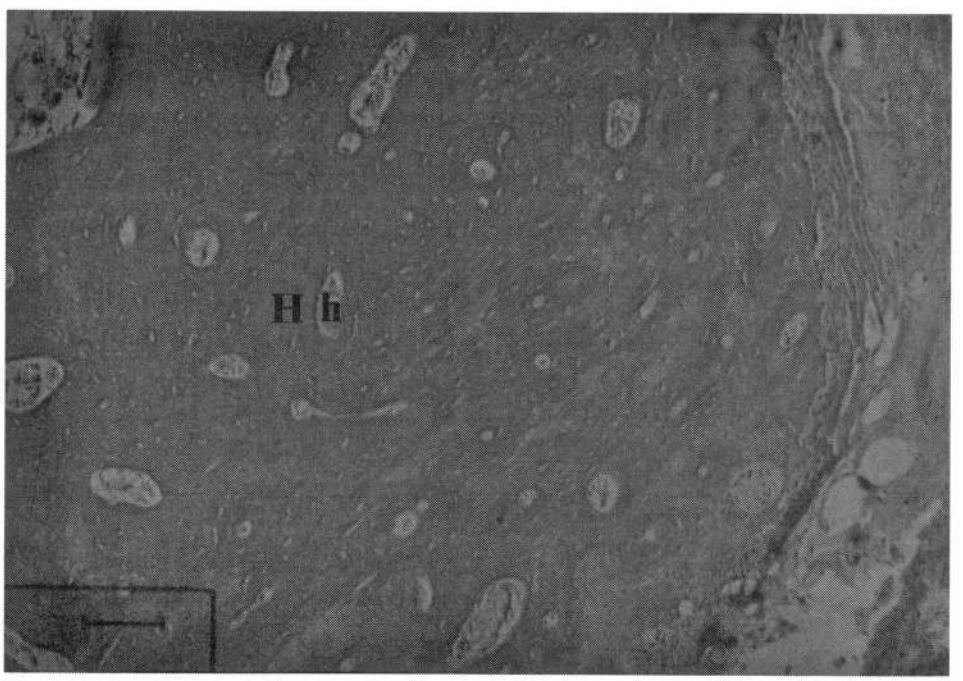
شکل ۲. سیستم‌های هاورس (H)، مجاری هاورس (C)، پریوست (P) و استخوان زیرپوستی (S) در گروه شاهد.
رنگ‌آمیزی: H&E، بزرگنمایی ۴۰۰ ×.

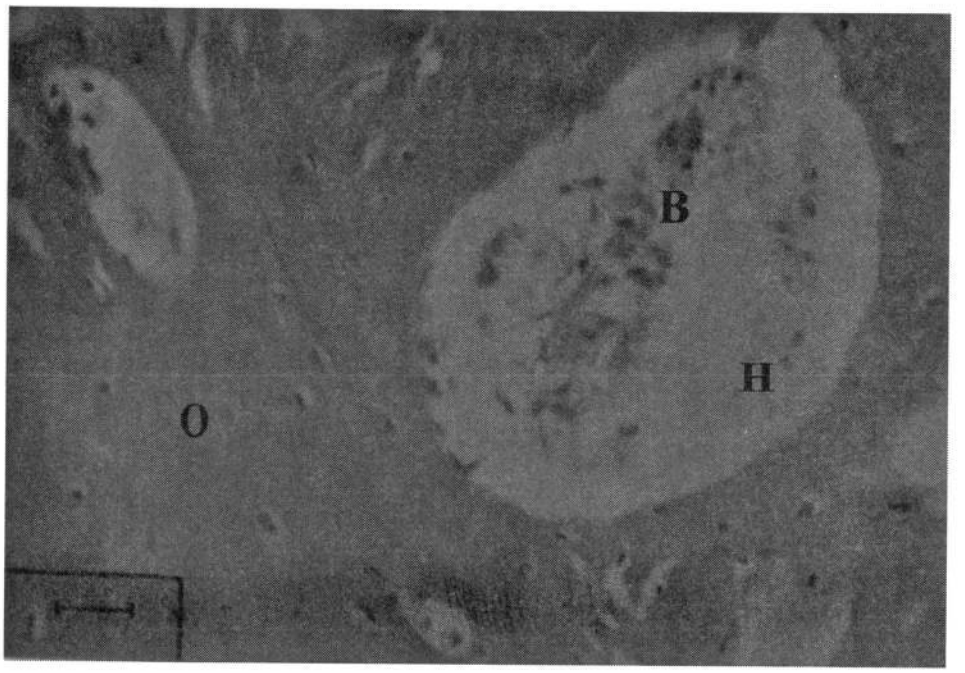




شکل ۳. حفره مرکزی تنه استخوان تیبیای گروه شاهد، قسمت اعظم این حفره به‌وسیله بافت چربی (F) پر شده است و بین آنها تعداد اندکی مقاطع عروق (V) وجود دارد. رنگ‌آمیزی: H&E، بزرگنمایی: ۱۰۰ ×

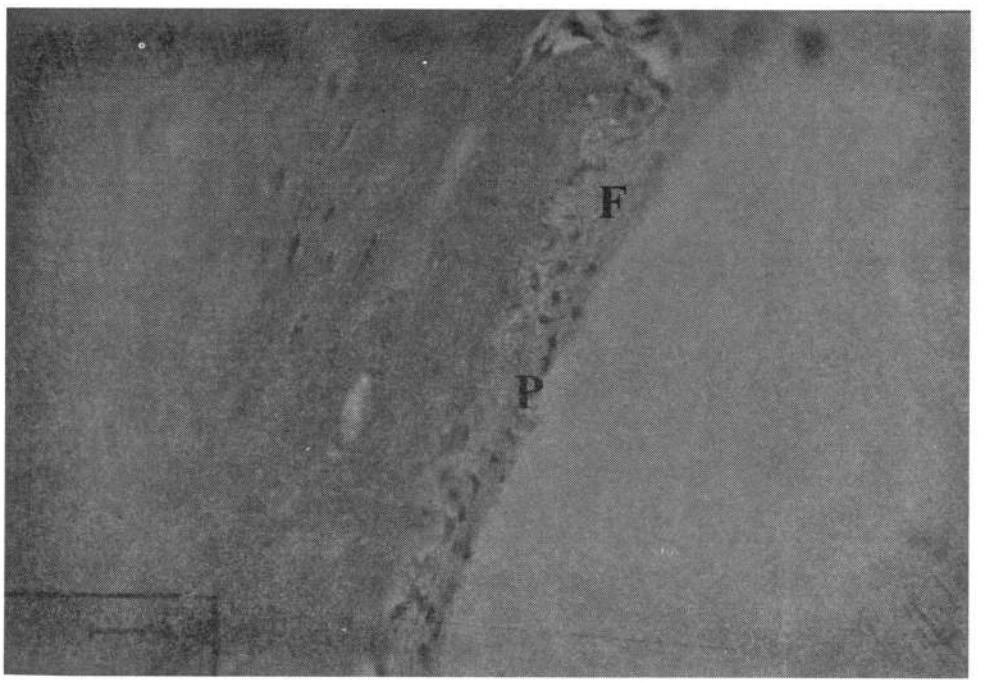
شکل ۴. برش عرضی تنه استخوان تیبیای گروه تجربی، سیستم‌های هاورس نامنظم (H) و مجاری هاورس (h) متسع شده‌اند. رنگ‌آمیزی: H&E، بزرگنمایی: ۱۰۰ ×

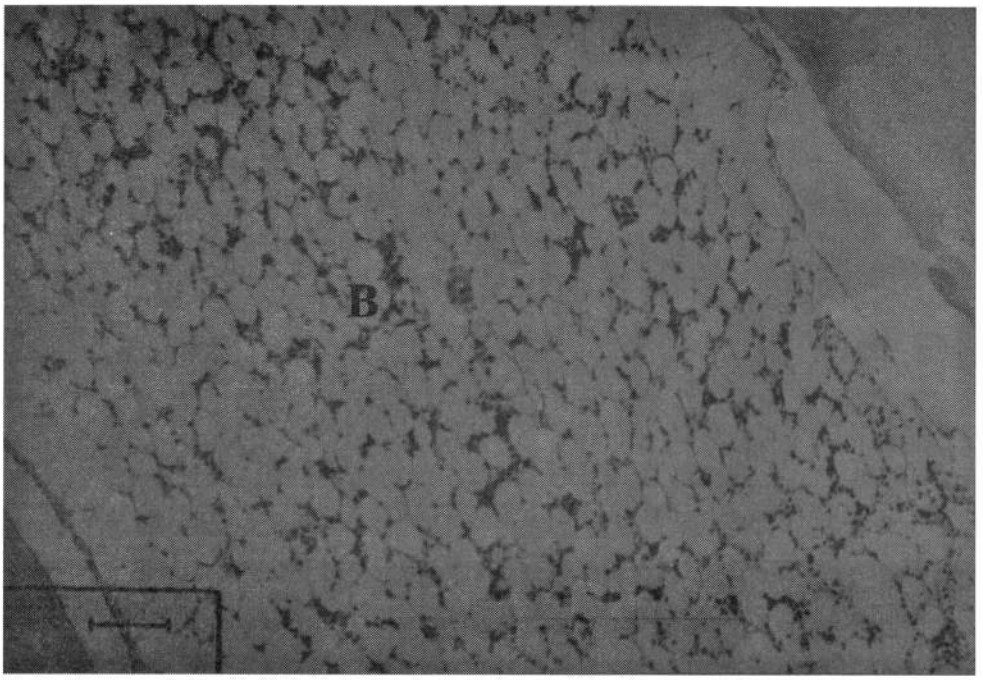




شکل ۵. بزرگنمایی بالاتر یکی از مجاری هاورس متسع شده گروه تجربی (H) که درون آن سلولهای خونی و پیش‌سازهای آنها (B) مشاهده می‌شود. استئوسیتهای هیپرتروفی شده گروه تجربی(O). رنگ‌آمیزی: H&E، بزرگنمایی: ۴۰۰ ×.

شکل ۶. پریوست (P) گروه تجربی، ۴-۳ ردیف سلول و تراکم قابل توجه رشته‌های بافت همبندی (F) مشاهده می‌شود. رنگ‌آمیزی: H&E، بزرگنمایی ۴۰۰ ×.





شکل ۷. حفره مرکزی تنه استخوان تیبیای گروه تجربی، سلولهای خونی (B) به تعداد زیاد بین بافت چربی مشاهده می‌شوند.
رنگ‌آمیزی: H&E، بزرگنمایی: ۱۰۰ ×.