

Evaluation of Propolis on Experimental Healing of Ulna Diaphyseal Defects in Rabbit

Hadi Naddaf¹,
Fereydoon Saberi Afshar²,
Babak Mohamadian³,
Abdolvahed Moarebi¹,
Amir Reza Imani⁴,
Soroush Sabiza⁴

¹ Associate Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

² Associate Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Tehran University, Tehran, Iran

³ Associate Professor, Department of Patobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

⁴ Resident in Veterinary Surgery, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

(Received June 28, 2014 ; Accepted April 4, 2015)

Abstract

Background and purpose: Auto-transplantation is the best bone graft substitute, but there are some limitations. Therefore, other methods using synthetic or natural materials are recommended. Propolis is a resinous natural product derived from plant exudates collected by honeybees. It has been extensively used in folk medicine because of its biological and pharmacological activities. The present study was carried out to evaluate the osteogenic properties of propolis on healing of diaphyseal defects in rabbit ulna.

Materials and methods: In this study ten healthy adult male white New Zealand rabbits were used. The animals were randomly divided into control and treatment groups (n=5 per group). Three millimeters defects were created in right diaphysis of ulna in all animals and intramedullary pins were used for bone fixation. In treatment group the defects were filled with propolis but in control group the defects were left unfilled.

Results: Radiological study showed that propolis as a scaffold could somewhat guide the bone growth. Histological section showed moderately differentiated lamellar bone in the cortical part with presence of haversian canal at peripheral cortex, whereas fibrocollagenous tissue and good amount of bone marrow tissue, fat cells and bone vessels were observed in control group. The results showed no significant difference in bone healing between the two groups.

Conclusion: Propolis have biological materials, minerals and amino and organic acid properties, therefore, further studies are required to clarify the efficacy of propolis on bone healing.

Keywords: Propolis, bone defects, radiography, histology, rabbit

زمستان حفظ کنند. علاوه بر این، زنبورها اجساد هم‌نوعان خود یا مهاجمان بزرگ‌تر را که توانایی حمل آن‌ها را به بیرون ندارند توسط این ماده مومیایی می‌کنند. میزان استحصال سالانه بره‌موم از هر کندو در اکثر کتب حدود ۶۰ گرم گزارش شده است. بره‌موم به دلیل دارا بودن مواد بیولوژیک با خواص شایان ذکر (ضد دردی، ضد التهابی و آنتی بیوتیکی) و همچنین مواد معدنی (۲۳ عنصر از ۲۴ عنصر موجود در خون انسان) و اسیدهای آمینه (آرژنین: تنظیم میتوز و دستیابی به بیوستت پروتئین؛ پرولین: تسریع در روند ساخت کلاژن و الاستین)، و اسیدهای آلی خاص می‌تواند به‌عنوان یک جایگزین، بر روی روند ترمیم استخوان موثر باشد (۱۰). مطالعات متعددی در زمینه نقش بره‌موم در ترمیم و تشکیل بافت استخوانی صورت گرفته است. اثر افزایشی بره‌موم بر روند تشکیل استخوان به دنبال استفاده سیتامیک از آن مشخص شده است (۱۱). هم‌چنین به اثرات مفید و وابسته به زمان بره‌موم بر ترمیم استخوان اشاره شده است (۱۲). از جمله مواد موجود در بره‌موم، کافنیک اسید است که نقش موثر آن در بلوغ بافت‌های استخوانی تازه شکل گرفته مورد مطالعه قرار گرفته است (۱۳، ۱۴). تغذیه با جیره غذایی غنی شده با بره‌موم بر ترمیم استخوان نیز موثر بوده است (۱۵). لذا با توجه به مطالعات گذشته و لزوم انجام تحقیقات بیش‌تر برای تأیید اثربخشی بره‌موم بر روند ترمیم استخوان، این مطالعه با هدف بررسی عملکرد بره‌موم بر ترمیم استخوان در نقیصه تجربی درشت نی خرگوش انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

این مطالعه به تأیید و تصویب کمیته حمایت از حیوانات و گروه علوم درمانگاهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز رسیده است. تعداد ۱۰ سر خرگوش نر بالغ نیوزیلندی سفید با دامنه وزن ۲ تا ۳/۱ کیلوگرم به‌طور تصادفی به دو گروه مساوی شاهد و آزمایش تقسیم شدند. بعد از ۱۲ ساعت پرهیز غذایی،

پیوند استخوان بافت زنده‌ای است که به منظور ترمیم نقایص استخوانی از محل اصلی خود به محل صدمه دیده انتقال می‌یابد. انواع پیوندهای استخوانی عبارتند از: اتوگرافت (اتولوگ)، ایزوگرافت (سین‌گرافت)، آلوگرافت و زنوگرافت. با توجه به محدودیت‌های دسترسی به این نوع پیوندها، شیوه‌های دیگری از قبیل کلسیم سولفات، فاکتورهای القاء‌کننده استخوان‌ساز، ماتریکس استخوانی دمنرال (DBM)^۱، پروتئین‌های مورفوژنیک استخوانی، مغز استخوان، کلسیم فسفات، سرامیک‌های خلل و فرج دار مرجانی، تری کلسیم فسفات (TCP)^۲، کلاژن و سوسترهای غیربیولوژیک برای ترمیم نقایص استخوانی مورد استفاده قرار گرفته است (۴-۲). علی‌رغم این که پیوند استخوان اتوژن (خودی) استاندارد طلایی محسوب می‌شود اما حجم آن معمولاً محدود است، برداشت آن سبب طولانی شدن زمان عمل می‌شود، و در مواردی که نیاز به حمایت ساختمانی باشد معمولاً شکل مناسبی ندارد. علاوه بر این، پیوند استخوان اتوژن ممکن است تا ۳۰ درصد عوارضی نظیر درد، ضایعه عروقی، ضایعه عصبی، شکستگی، ضایعه مفصل ساکروایلیاک، نقیصه، اختلال در راه رفتن و عفونت را در پی داشته باشد (۴). بره‌موم یا پروپولیس از دو کلمه Pro به معنی پیش و Polis یعنی شهر تشکیل شده است. بره‌موم رزین یا صمغی چسبناک است که زنبور آن را از غنچه و پوست بعضی از درختان مانند بید، بلوط، کاج و صنوبر تهیه می‌کند. زنبورها مواد استحصال کرده از درختان و غنچه‌ها را با ترشحات غدد موجود در ناحیه شکم خود، بزاق، دانه‌های گرده و موم مخلوط کرده و از آن در جهت ساخت بره‌موم استفاده می‌کنند (۵-۹). این ماده برای اتصال قسمت‌های مختلف کندو به هم توسط زنبورها مورد استفاده قرار می‌گیرد. همچنین زنبورها در فصل پائیز اطراف سوراخ پرواز را با این ماده تنگ می‌کنند تا کندو را از گزند سرمای

1. Demineralization Bone Matrix
2. Tricalcium Phosphate

تمامی حیوانات با دریافت زایلایزین ۲ درصد (۵-۲ میلی گرم/ کیلوگرم، عضلانی) (۱۶) آرام شده و سپس با استفاده از تزریق عضلانی ترکیب آسپروماین ۱ درصد (۵/۰ میلی گرم/ کیلوگرم) (۱۶) و کتامین ۱۰ درصد (۴۰ میلی گرم/ کیلوگرم) (۱۶) بیهوشی القا گردید. در صورت لزوم نگهداری بیهوشی با کتامین ۱۰ درصد (۵۰-۲۰ میلی گرم/ کیلوگرم) (۱۶) انجام می شد. سپس رادیوگرافی با نمای داخلی- جانبی از دست راست تمامی حیوانات انجام شد. پای راست تمامی حیوانات پس از استقرار در حالت گماری خوابیده به چپ، به منظور انجام جراحی آسپتیک موزنی و اسکراب گردید. سپس موضع عمل در ناحیه جانبی استخوان زندزیرین برش داده شد و با کنار زدن تاندون بازکننده مچی زند زیرین، استخوان زنداسفل در معرض قرار گرفت. در ادامه با کنار زدن فاشیا و ضریع از روی آن اقدام به برش استخوان با ارهمویی شماره ۱ شد، درحالی که با استفاده از دو عدد چوب معاینه زبانی که قبلاً استریل شده بودند بافت نرم اطراف از گزند تیغه اره مصون مانده بود. پس از ایجاد نقیصه به طول ۳ میلی متر در بدنه استخوان، جهت تثبیت هرچه بیشتر استخوان زند اسفل، پین گذاری داخل مدولایی با استفاده از پین ۸/۰ انجام شد. در گروه آزمایش، علاوه بر انجام پین گذاری داخل مدولا، نقیصه مزبور با استفاده از ذرات بره موم جمع آوری شده از کندوی زنبور عسل ایرانی استریل شده با اکسید اتیلن، پر شده و کاملاً فشرده و جاسازی گردید. در مرحله بعدی بافت نرم اطراف در یک لایه با نخ کات کوت کرومیک ۳-۰ و پوست با استفاده از نخ نایلون ۳-۰ بخیه شد. سپس ناحیه با استفاده از بانداژ سنگین (رابرت- جونز) پوشانده شده و رادیوگرافی برای ارزیابی جراحی از اندام حرکتی مورد عمل، انجام شد. پس از تزریق یک دوز آنتی بیوتیک جنتامایسین (۲ میلی گرم/ کیلوگرم، عضلانی) (۱۷)، حیوانات را به قفس مربوطه انتقال داده و آنتی بیوتیک هر ۱۲ ساعت و به مدت ۵ روز به آنها تجویز شد. حیوانات به مدت دو هفته از لحاظ روند التیام زخم،

درجه حرارت، ضربان قلب و سایر تظاهرات بالینی تحت مراقبت قرار گرفتند. عکس های رادیولوژی در هفته های ۱، ۳، ۵، ۷، ۱۰، ۱۳ و ۱۷ تهیه شده و توسط متخصص رادیولوژی و به صورت یک سو کور از نظر روند ترمیم نقیصه (جدول شماره ۱)، واکنش پرده ضریع در روند استخوان سازی و التهاب بافت نرم مورد ارزیابی قرار گرفتند. نحوه امتیازدهی به شاخص های رادیوگرافی ذکر شده در جداول شماره ۱، ۲، ۳ به تفکیک بیان شده اند (۱۸).

جدول شماره ۱: معیارهای امتیاز دهنده به روند ترمیم نقیصه

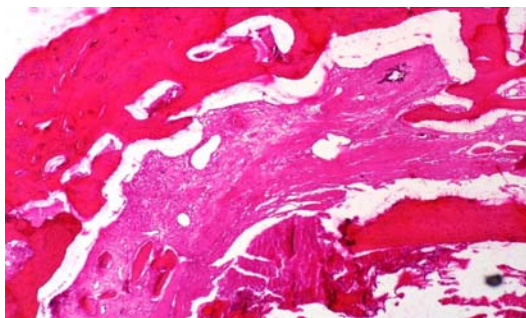
امتیاز	مشاهدات رادیوگرافی
۰	عدم مشاهده واکنش های ترمیمی قابل مشاهده با رادیوگرافی
۱	شروع واکنش های ترمیمی (مشاهده افزایش رادیوآپسی، محتوی لیه های شکستگی و شروع عملیات استخوان سازی از اطراف لیه های شکستگی)
۲	پیشرفت فرایند استخوان سازی و پر شدن ۲۵ درصد نقیصه
۳	پیشرفت فرایند استخوان سازی و پر شدن ۵۰ درصد نقیصه
۴	پیشرفت فرایند استخوان سازی و پر شدن ۷۵ درصد نقیصه
۵	پر شدن کامل نقیصه با استخوان جدید
۶	شروع فرایند بازسازی و بلوغ استخوان

جدول شماره ۲: معیار امتیازبندی شدت واکنش پرده ضریع در روند استخوان سازی

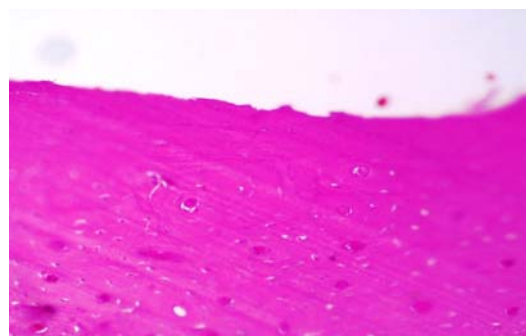
امتیاز	مشاهدات رادیوگرافی
۰	عدم وجود واکنش ضریع
۱	شروع واکنش پرده ضریع (ضعیف)
۲	افزایش استخوان سازی حاصل از ضریع و شروع به ایجاد پل پروتومی (متوسط)
۳	پل زدن پرده ضریع برای جوش خوردن لیه های شکسته

در پایان مطالعه و تحت بیهوشی عمومی حیوانات آسان کشی شده و پس از جداسازی بافت نرم از روی استخوان مورد عمل و خارج ساختن پین استیلی از مدولا، استخوان ها در فرمالین بافر ۱۰ درصد غوطه ور گشته و جهت بررسی هیستوپاتولوژیکی به آزمایشگاه پاتولوژی ارجاع شدند. نمونه ها پس از دکلسیفیه کردن استخوان با روش نیتریک اسید و انجام رنگ آمیزی H&E به صورت کیفی مورد ارزیابی هیستوپاتولوژی قرار گرفتند. از آنجایی که امتیازات خام به دست آمده (پر شدن یا ترمیم نقیصه، واکنش پرده ضریع و واکنش التهابی بافت نرم موضع) از نوع غیر پارامتری (مقیاس رتبه ای) بودند، برای

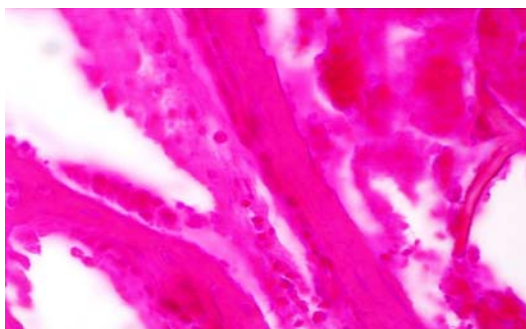
ناحیه‌ای که تیغه‌های مذکور به هم نزدیک شده‌اند مشاهده گردید (تصویر شماره ۳). در ناحیه مدولا بافت همبند متراکمی شامل سلول‌های فیروسیست و رشته‌های کلاژن به همراه یک لایه نازک از تیغه‌های استخوانی (تراپیکول) متحدالمرکز در اطراف پین فلزی مشاهده شد (تصاویر شماره ۵ و ۴). همچنین وجود فیروبلاست و دستجات کلاژن و پیشرفت روند ترمیم نیز قابل مشاهده بود (تصاویر شماره ۶ و ۷).



تصویر شماره ۱: تشکیل بافت استخوان متراکم



تصویر شماره ۲: استوبلاست‌های درون لاکونا



تصویر شماره ۳: استخوان سازی فعال

مقایسه میانگین‌ها در هر سه گروه در کل دوره مطالعه از آزمون کروسکال-والیس^۱ و برای مقایسه روند ترمیم در هفته‌ای متوالی در هر گروه از آزمون من‌ویتنی^۲ استفاده گردید. مقادیر p کم‌تر از ۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

جدول شماره ۳: معیار امتیاز بندی شدت التهاب بافت نرم در ارزیابی رادیوگرافی‌ها

امتیاز	مشاهدات رادیوگرافی
۰	بدون التهاب بافت نرم
۱	التهاب جزئی بافت نرم
۲	التهاب متوسط بافت نرم
۳	التهاب شدید بافت نرم

یافته‌ها

الف) روند میکروسکوپی ترمیم گروه کنترل

در ناحیه کورتکس تشکیل بافت متراکم شامل مجاری هاورس، استوسیت‌های موجود در لاکوناها، و تیغه‌های متحدالمرکز مشاهده شد (تصاویر شماره ۱ و ۲). از ناحیه کورتکس سمت لایه داخلی استخوان متراکم یک‌رديف از سلول‌های استوبلاست که در تماس با تیغه استخوانی مذکور قرار گرفته‌اند و به صورت فعال روند استخوان‌سازی را انجام می‌دهند، مشاهده گردید (تصویر شماره ۳). در ناحیه مدولای گروه شاهد، تیغه‌های استخوانی (تراپیکول) در بستری از بافت همبند مشاهده گردید. لازم به ذکر است در اطراف پین داخل استخوانی تشکیل تیغه‌های استخوانی به خوبی مشاهده شد. این تیغه‌های استخوان در نهایت به هم متصل می‌شوند و فرایند تشکیل استخوان به طور کامل صورت می‌گیرد (تصاویر شماره ۱، ۲ و ۳).

گروه آزمایش

تشکیل استخوان متراکم که نشان دهنده اتصال تراپیکول‌های استخوانی به هم می‌باشد به همراه نفوذ بافت همبند از ناحیه کورتکس به ناحیه مدولا در

1. Kruskal-Wallis
2. Mann-Whitney

نامنظم که باعث ایجاد استخوان‌های متخلخل در ناحیه کورتکس و نفوذ ابتدایی آن‌ها به ناحیه مدولا می‌شود این موضوع را می‌تواند مطرح کند که فرایند ترمیم استخوان در گروه مذکور احتیاج به مدت زمان بیش‌تری دارد.

ب) نتایج رادیوگرافی

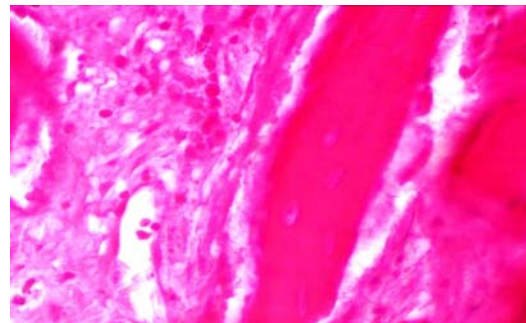
ب-1) نتایج ارزیابی رادیوگراف‌ها

روند ترمیم

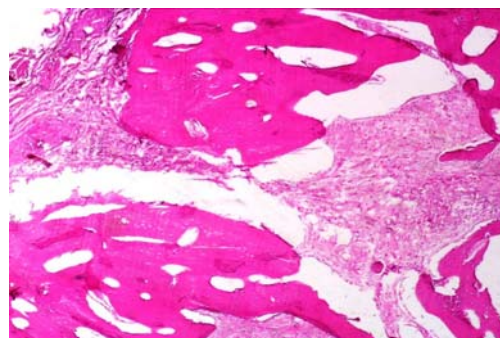
بررسی روند بهبودی یا ترمیم در کل دوره در گروه شاهد حکایت از وجود اختلاف معنی‌دار در روند بهبودی در برخی از هفته‌ها داشت ($p < 0/05$). از هفته اول تا هفته هفتم، افزایش ترمیم استخوان در هفته‌های متوالی نسبت به هفته‌های قبل معنی‌دار بود ($p < 0/05$)، اما از هفته هفتم به بعد تا هفته هفدهم علی‌رغم افزایش ادامه روند ترمیم هیچ اختلاف معنی‌داری در هفته‌های متوالی مشاهده نشد. بررسی روند بهبودی در کل دوره در گروه آزمایش حاکی از وجود اختلاف معنی‌دار در روند بهبودی در برخی از هفته‌ها بود ($p < 0/05$). در هفته‌های متوالی علیرغم ادامه روند بهبودی از هفته اول تا هفته هفدهم فقط اختلاف روند بهبودی در هفته پنجم نسبت به هفته سوم معنی‌دار بود ($p < 0/05$). با توجه به میانگین \pm خطای استاندارد روند ترمیم اسخوانی (جدول شماره ۴)، روند ترمیم در دو گروه تا حدود زیادی مشابه هم می‌باشد اما روند ترمیم در فاصله هفته‌های سوم تا پنجم در گروه آزمایش از شدت بیش‌تری نسبت به گروه شاهد برخوردار است.

واکنش پرده ضریع

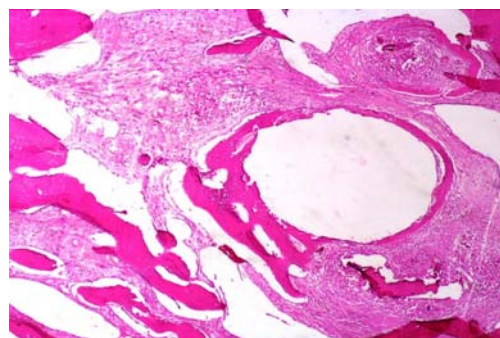
بررسی واکنش پرده ضریع در کل دوره در گروه شاهد بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار در برخی از هفته‌ها بود ($p < 0/05$). این مقایسه حکایت از وجود اختلاف معنی‌دار در فاصله بین هفته‌های یک و سه داشت؛ یعنی این که واکنش پرده ضریع در هفته سوم نسبت به هفته اول از افزایش معنی‌داری برخوردار بوده است ($p < 0/05$).



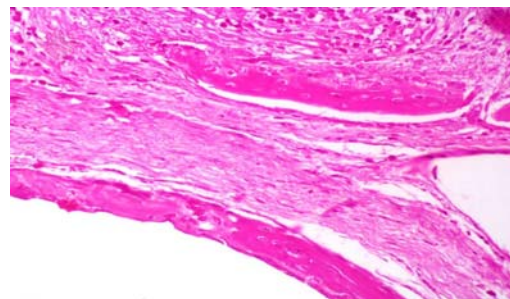
تصویر شماره ۴: تکمیل پروسه ترمیم



تصویر شماره ۵: تشکیل تراپیکول‌های استخوانی در گروه آزمایش



تصویر شماره ۶: وجود فیبروبلاست و دستجات کلاژن



تصویر شماره ۷: پیشرفت روند ترمیم در گروه آزمایش

براساس مشاهدات آسیب‌شناسی، نفوذ بافت همبند از ناحیه کورتکس به ناحیه مدولا و تشکیل تراپیکول‌های

جدول شماره ۴: میانگین \pm انحراف معیار امتیاز رادیوگراف روند ترمیم استخوان، واکنش پرده ضریع و روند التهاب بافت نرم در هفته های مختلف پس از عمل در دو گروه کنترل و آزمایش

هفته	روند ترمیم استخوان			واکنش پرده ضریع			روند التهاب بافت نرم		
	کنترل	آزمایش	سطح معنی داری	کنترل	آزمایش	سطح معنی داری	کنترل	آزمایش	سطح معنی داری
۱	$0 \pm 0/20$	$0/60 \pm 0/24$	۰/۵۱	0 ± 0	$0/4 \pm 0/24$	۰/۱۲	$1/8 \pm 0/49$	$1/4 \pm 0/40$	۰/۵۱
۳	$1/6 \pm 0/24$	$3 \pm 0/31$	۰/۶۵	$1/60 \pm 0/24$	$1/4 \pm 0/67$	۰/۷۴	$1/2 \pm 0/37$	$1/6 \pm 0/40$	۰/۵۷
۵	$2/8 \pm 0/20$	$4 \pm 0/54$	۰/۶۰	$1/8 \pm 0/58$	$1 \pm 0/73$	۰/۹۱	$20 \pm 0/20$	$0/40 \pm 0/40$	۰/۸۸
۷	4 ± 0	$4/5 \pm 0/28$	۰/۵۵	$1 \pm 0/40$	$1/6 \pm 0/67$	۰/۵۲	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
۱۰	$4/5 \pm 0/28$	$4/5 \pm 0/28$	۱	0 ± 0	$0/5 \pm 0/5$	۰/۳۱	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
۱۳	$5/5 \pm 0/25$	$5/5 \pm 0/28$	۰/۴۹	0 ± 0	$0/25 \pm 0/25$	۰/۳۱	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
۱۷	$5/5 \pm 0/28$	$5/5 \pm 0/28$	۰/۴۹	0 ± 0	0 ± 0	۱	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0

* تغییر معنی دار نسبت به هفته قبل در هر دو گروه کنترل و آزمایش.

با هفته سوم به طور معنی داری کاهش یافت ($p < 0/001$). میانگین التهاب بافتی در هفته های اول، سوم و پنجم هیچ گونه اختلاف معنی داری نشان نداد و از هفته هفتم به بعد نتایج کاملاً یکسان بود. میانگین \pm انحراف معیار امتیاز رادیوگراف التهاب بافت نرم در هفته های مختلف پس از عمل جراحی در دو گروه شاهد و آزمایش در جدول شماره ۴ نشان داده شده است.

ب- (۲) تفسیر رادیوگراف ها در هفته های ۱۳، ۱۰، ۷، ۵، ۳، ۱ و ۱۷ گروه شاهد

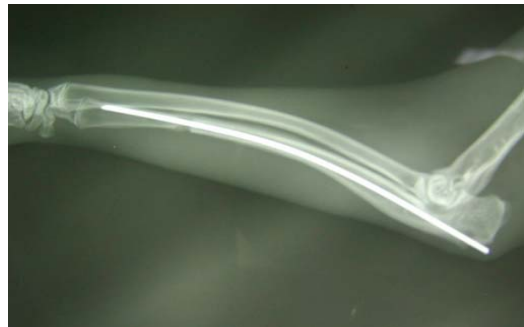
در روز صفر رادیوگراف موضع نقیصه استخوانی کورتیکال هیچ اثری از پرشدگی را نشان نمی داد (تصویر شماره ۸). رادیوگرافی در هفته سوم حداقل واکنش پرده ضریع را نشان داد. به عبارتی، لبه های استخوان کورتیکال در موضع نقیصه صاف شده بود و شکل نقیصه تغییر کرده و از حالت تیزی لبه های استخوانی به حالت گردی تغییر یافته بود که نشانگر آغاز ترمیم استخوان است (تصویر شماره ۹). رادیوگرافی در هفته هفتم نشانگر کاهش اندازه فضای نقیصه بود که دال بر انجام فرایند پاکسازی و استقرار بافت استخوانی جدید است (تصویر شماره ۹). رادیوگرافی در هفته دهم نشان داد که هنوز نقیص استخوانی توسط بافت جدید محو نشده است (تصویر شماره ۱۰). رادیوگرافی در روز ۹۰ حکایت از وجود کم و بیش نقیصه داشت و این که بافت جدید استخوانی تشکیل شده در حال سازمان یافتن در انتهای موضع شکستگی است که به صورت صاف و

این بررسی نشان داد که واکنش پرده ضریع در کل دوره در گروه آزمایش در هیچ یک از هفته ها اختلاف معنی داری نداشت ($p > 0/05$). مقایسه هر دو گروه از نظر واکنش پرده ضریع حاکی از عدم وجود اختلاف معنی دار در تمامی هفته ها بود. میانگین \pm انحراف معیار امتیاز رادیوگراف واکنش پرده ضریع در هفته های مختلف پس از عمل جراحی در دو گروه شاهد و آزمایش در جدول شماره ۴ نشان داده شده است.

التهاب بافت نرم

بررسی واکنش التهاب بافتی در کل دوره در گروه شاهد حاکی از وجود اختلاف معنی دار در برخی از هفته ها بود ($p < 0/001$). این مقایسه نشان دهنده آن است که میزان التهاب در هفته ای متوالی کاهش یافته است به گونه ای که از هفته هفتم به بعد کاهش التهاب مشاهده گردید. هم چنین در هفته اول تا پنجم نیز علی رغم کاهش التهاب تفاوت معنی داری مشاهده نشد. فقط در فاصله بین هفته های سوم تا پنجم کاهش التهاب معنی دار نبود ($p = 0/54$). بررسی واکنش التهاب بافتی در کل دوره در گروه آزمایش نشان از وجود اختلاف معنی دار در برخی از هفته ها داشت. مقایسه التهاب بافتی در هفته های متوالی در گروه آزمایش حاکی از عدم وجود التهاب بافتی از هفته هفتم به بعد می باشد. با این وجود، میزان التهاب بافتی در هفته سوم تا حدودی بیش از هفته اول بود اما این میزان از نظر آماری معنی دار نبود. پس از هفته سوم و در هفته پنجم میزان التهاب بافتی در مقایسه

گرد شدن لبه‌ها قابل مشاهده بود (تصویر شماره ۱۱).



تصویر شماره ۸: نمای رادیوگرافی روز اول گروه کنترل



تصویر شماره ۹: گرد شدن لبه‌های نقیصه



تصویر شماره ۱۰: بوجود آمدن استخوان جدید



تصویر شماره ۱۱: روز ۶۰ رادیوگرافی گروه کنترل

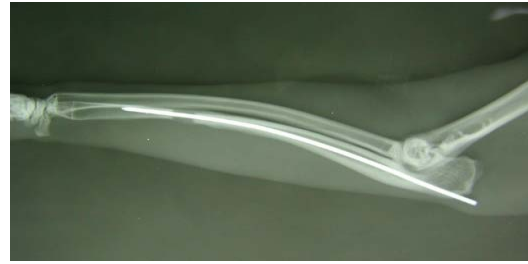
گروه آزمایش

رادیوگرافی در روز صفر (جلوئی - عقبی و جانبی - داخلی) متعاقب جراحی و کاشت پیوند، نقیصه‌ای را در ناحیه میانی بدنه استخوان زند زیرین، با توجه به خاصیت رادیولوستانی بره‌موم در موضع نقیصه، نشان نداد (تصویر شماره ۱۲). رادیوگرافی در روز ۲۱ واکنش شدید پرده ضریع را در اطراف ایمپلنت نشان می‌داد. در عین حال، اندازه فضای نقیصه کاهش یافته بود و صاف شدن لبه‌های استخوان کورتیکال در موضع نقیصه که نشان از تشکیل استخوان جدید داشت قابل مشاهده بود (تصویر شماره ۱۳). رادیوگرافی در روز ۳۰ هیچ اثری از ایمپلنت نشان نداد. فاصله موجود در نقیصه در حال پر شدن بود. ضمن این که در موضع ایمپلنت آثاری از رادیوآپنسیتهی به صورت کانونی مشاهده شد که شاید دال بر روند استخوان‌سازی داخل غشایی باشد. رادیوگرافی در روز ۶۰ حاکی از محو کامل فاصله بین استخوان میزبان و ایمپلنت بود. کالوس در مجاورت کورتکس در موضع نقیصه سازمان یافته و در حال یکپارچه شدن بود. هم‌چنین در مجاورت کانون‌های رادیوآپیک دانسیته‌ای شبیه دانسیته‌ی استخوان میزبان بخود گرفته بود (تصویر شماره ۱۴). رادیوگرافی در روز ۹۰ نشان داد که موضع نقیصه به‌طور کامل استخوان‌سازی شده و پلی از کورتکس در امتداد محور طولی استخوان تشکیل شده است که به‌طور کامل مشاهده شد. آثاری از کالوس در موضع نقیصه دیده نشد که این علامتی مبنی بر کامل شدن فرایند ترمیم است. همچنان هیچ اثری از ایمپلنت در موضع مشاهده نشد (تصویر شماره ۱۵).



تصویر شماره ۱۲: نمای بعد از جراحی گروه آزمایش

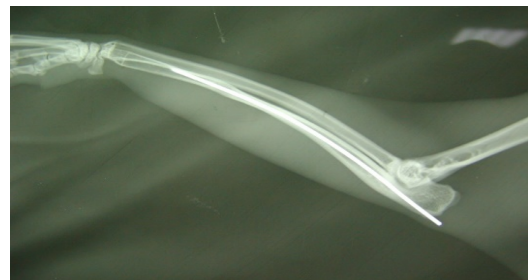
مورد پذیرش قرار گیرند^۴. به نظر می‌رسد بره‌موم به دلیل دارا بودن مواد بیولوژیک با خواص شایان ذکر و همچنین مواد معدنی، اسیدهای آمینه و اسیدهای آلی خاص می‌تواند به‌عنوان یک جایگزین بر روی روند ترمیم موثر باشد. علی‌رغم این که پیوند استخوان اتوژن استاندارد طولایی محسوب می‌شود اما حجم آن معمولاً محدود است، برداشت آن سبب طولانی شدن زمان عمل می‌شود، و در مواردی که نیاز به حمایت ساختمانی باشد معمولاً شکل مناسبی ندارد. علاوه بر این، پیوند استخوان اتوژن ممکن است تا ۳۰ درصد عوارضی نظیر درد، ضایعه عروقی، ضایعه عصبی، شکستگی، ضایعه مفصل ساکروایلیاک، نقیصه، اختلال در راه رفتن و عفونت را در پی داشته باشد^(۴). شناخت ساختار استخوان، بیولوژی و مواد تشکیل‌دهنده آن در چند دهه اخیر سبب طراحی و تولید موادی شده است که برخی از خصوصیات استخوان را تقلید می‌کنند ولی تاکنون هیچ جایگزینی قابلیت این را نداشته است که پیوند استخوان اتوژن را تقلید نماید. نوآوری در این زمینه روز به روز بیش‌تر می‌شود و تجربیات متعددی با مواد مصنوعی جدید، مرجان‌ها، هیدروکسی آپاتیت، پلی‌مرهای صنعتی و مواد مشابه کریستالی که قادر به انجام فاز معدنی در یک استخوان طبیعی هستند انجام شده است که هر یک مزایا و معایب خاص خود را دارا می‌باشند. هم‌چنین از تری کلسیم فسفات که یک ماده با خواص ممتاز از نظر قابلیت جذب و سازگاری بافتی است در پیوندهای جانشین استفاده شده است. این باور وجود دارد که ذرات کوچک و به‌هم پیوستگی آن‌ها در این ماده سبب ارتقاء خواص القا استخوان‌سازی و جذب به‌موقع آن به‌همراه بلوغ استخوان شده است^(۳). مواد هدایت‌کننده رشد استخوان شبیه فاز معدنی استخوان خنثی هستند و این مواد چهارچوب و داربستی را ایجاد می‌کنند که مویرگ‌ها و بافت‌های پری‌واسکولار به همراه سلول‌های



تصویر شماره ۱۳: واکنش شدید ضریع در روز ۲۱ گروه آزمایش



تصویر شماره ۱۴: ایجاد کالوس و کانون‌های رادیوپیک در نقیصه (روز ۶۰ رادیوگراف گروه آزمایش)



تصویر شماره ۱۵: کامل شدن پروسه ترمیم در روز ۹۰ در گروه آزمایش

بحث

هدف از درمان‌های رژنراتیو، بازسازی نسوج از دست‌رفته و ایجاد انساج در حد طبیعی آن‌هاست و در این راه فلسفه استفاده از مواد زیستی، دخالت آن‌ها در فرایند ترمیم توسط یکی از سه مکانیسم استخوان‌سازی، القای استخوان‌سازی و هدایت استخوان‌سازی می‌باشد. مواد پیوندی باید دارای ویژگی‌هایی باشند^(۱۹): از نظر بیولوژیکی قابل قبول باشند^۱، قابل پیشگویی باشند^۲، سهولت کارکرد کلینیکی را داشته باشند^۳، توسط بیمار

4. Patient acceptability

1. Biological acceptability
2. Predictability
3. Clinical feasibility

پیش‌ساز به داخل خلل و فرج آن نفوذ کرده و این فضاها را با استخوان جدید پر می‌کنند (۴). تشکیل استخوان نیاز به یک ساختار فیزیکی سه‌بعدی دارد که استئوبلاست‌ها بتوانند روی آن سوار و متعاقباً عروق‌دار شده و تکثیر یابند. نشان داده شده است که برخی از ایمپلنت‌های سرامیکی و فلزات که متخلخل بوده و قابلیت تحمل زیستی داشته باشند، می‌توانند به عنوان داربست مورد استفاده قرار گیرند. اندازه خلل و فرج در رشد و هدایت استخوان‌سازی مؤثر است. برای رشد استخوان اندازه خلل و فرج باید بین ۱۰۰ تا ۵۰۰ میکرون باشد. اگر اندازه خلل و فرج بین ۴۰ تا ۱۰۰ میکرون باشد، استوئید تشکیل می‌شود. چنانچه اندازه خلل و فرج ۱۰ تا ۴۰ میکرون باشد، بافت فیبروواسکولار رشد می‌کند. متخلخل بودن اندازه سوراخ‌ها به میزان حداقل ۱۰۰ میکرون و وجود فضاها مرتبط به یکدیگر باید از ویژگی‌های ایمپلنت‌ها باشد (۴). از آنجایی که اندازه خلل و فرج بره‌موم در حدود ۲۷ میکرومتر است، به‌نظر می‌رسد که این ماده عمدتاً در رشد بافت فیبروواسکولار مؤثر است. همچنین خلل و فرج با اندازه ۵۰ تا ۱۳۰ نانومتر به‌دلیل کمک در امر انتقال انواع مولکول‌ها (از جمله مولکول‌های ضروری برای تغذیه)، انواع هورمون‌ها، و کمک به تماس بیشتر سلول‌ها برای ترمیم لازم هستند (۱۹). لذا بره‌موم ممکن است به‌عنوان داربست برای سلول‌های استوبلاست و رساندن مولکول‌ها و هورمون‌ها به آن‌ها مؤثر باشد. از طرف دیگر، هنگامی که در بستر محیط، به‌دلیل افزایش عروقی، میزان اکسیژن افزایش یابد، به تشکیل بافت استخوانی در ترمیم نوع ثانویه منجر می‌شود. از آنجایی که در تصاویر رادیوگرافی گروه آزمایش در هفته هفتم کانون‌های رادیوپاک در محل نقیصه مشاهده شد، شاید بتوان گفت که ترمیم ثانویه در محل نقیصه در حال شکل‌گیری بود که این مساله با تبدیل سلول‌های تمایز نیافته به استوبلاست‌ها تحقق یافت. می‌توان به موادی هم‌چون فلاونوئیدها، کورسیتین، دهیدروکسی فلاونوئید ۳ و ۴ و فلاون اشاره نمود که

همگی در بره‌موم موجود هستند و موجب تقویت عروق مویرگی می‌شوند. هم‌چنین مشتقات سینامیک اسید موجود در بره‌موم دارای خاصیت اپیتلیزاسیون است (۱۰). با توجه به موارد فوق شاید بتوان گفت که بره‌موم قادر به تسریع روند آنژیوژنز می‌باشد. یکی از مهم‌ترین مکانیسم‌ها در فرایند ترمیم استخوانی به وجود آمدن التهاب در موضع نقیصه و شکستگی استخوان است که در مرحله اول ترمیم رخ می‌دهد. این مرحله به‌واسطه ترشح انواع پروستاگلاندین‌ها توسط سلول‌های التهابی ماکروفاژها، مونوسیت‌ها، لنفوسیت‌ها و سلول‌های پلی‌مورفونوکلئول‌ها و فیبروبلاست‌ها در موضع ایجاد می‌شود (۲۱). اولین مراحل روند ترمیم تشکیل هماتومی به نام Tag-Tec، التهاب بافتی و واکنش ضریع در محل شکستگی است که سبب هدایت انواع سلول‌های مؤثر در روند ترمیم به محل شکستگی می‌شود. بیش از ۳۰ درصد بره‌موم از موم تشکیل شده است که اثرات منفی این ماده در روند ترمیم استخوان به اثبات رسیده است (۲۲، ۲۳) که شاید به دلیل اختلال در روند تشکیل هماتوم باشد. به‌دلیل وجود انواع مواد ضدالتهاب در بره‌موم، احتمال به تاخیر افتادن التهاب بافتی و واکنش ضریع منطقی به نظر می‌رسد که نتیجه آن اختلال در روند ترمیم است. شاید به‌همین دلیل هیچ‌گونه اختلاف معنی‌داری از لحاظ واکنش ضریع در گروه آزمایش مشاهده نشد. درحالت معمول متعاقب جراحی و شکستگی، بافت نرم مقداری متورم می‌شود. در این مطالعه نیز مقدار کمی تورم مشاهده شد که این تورم در هر دو گروه از هفته اول پس از عمل شروع و تا هفته پنجم ادامه داشت. با این وجود، این افزایش روند تورم معنی‌دار نبود. در تمام جراحی‌های ناحیه نقیصه دو گروه ایمپلنت به خوبی در جای خود مستقر و به‌خوبی در موضع نقیصه توسط حیوان پذیرفته شده بود و در موضع آثار معنی‌داری از التهاب مشاهده نشد. در تمامی حیوانات ترمیم به خوبی و بی‌هیچ حادثه‌ای بدون این که ایمپلنت پس‌زده شود، صورت گرفته بود. این موارد با نتایج

مطالعه هولمز و همکاران که در خصوص تری کلسیم فسفات صورت گرفته بود، مطابقت دارد (۳). لنگشی که دال بر التهاب باشد مشاهده نشد و حیوانات روی عضو وزن گیری می کردند. این یافته با نتایج مطالعات شاکلاکه بر روی استخوان اولنای سگ و سینگ بر روی استخوان اولنای خرگوش مطابقت دارد (۳). این کاهش تورم شاید به دلیل وجود موادی هم چون آکاسین، انواع فلاونوئیدها و استر فنیتل کافئیک اسید^۱ باشد که خاصیت ضدالتهابی آن‌ها به اثبات رسیده است. CAPE ماده ضدالتهاب قدرتمندی است که مکانیسم عمل آن به صورت کاهش پروستاگلاندین E2 و نیتریک اکساید می باشد. هم چنین این ماده به صورت قابل ملاحظه‌ای از ترشح اینت لوکین ۶ جلوگیری به عمل می آورد اما تاثیر چندانی بر ترشح اینتروکین ۲، اینترفرون ۷ و موادی هم چون پینوسمبرین و دینوستروبین ندارد (هر دوی این مواد دارای خاصیت بی حس کننده موضعی هستند که عدم لنگش حیوانات گروه آزمایش شاید به دلیل وجود آن‌ها باشد) (۲۴). ارزیابی رادیوگرافی در حیوانات گروه شاهد نشان داد که مدرک و علامت قابل قبولی از الحاق استخوان در مقایسه با گروه آزمایش وجود نداشت و هیچ گونه برتری زمانی نسبت به یک دیگر نداشتند. هر چند در مراحل ابتدایی، واکنش پرده ضریع در مقیاس حداقل، به صورت صافی لبه‌های استخوان کورتیکال در محل نقیصه مشاهده شد. متعاقباً یک کاهش قابل توجه در اندازه فاصله توسط بافت استخوانی جدید رویت گردید. ساختمان و شکل، گرایش بیش تری به سمت گرد و صاف شدن داشت. این یافته‌ها مشابه یافته‌های بولاندر و بالیان است (۲۵). هر چند که در یافته‌های هیستوپاتولوژی واکنش جذب ایمپلنت به دلیل حضور دیوسل‌ها و ماکروفاژها به اثبات می‌رسد اما در این مطالعه به دلیل خاصیت رادیولوستی بره موم هیچ علامتی که دال بر جذب ایمپلنت باشد مشاهده نگردید. در حالی که رادیودنستی قطعه تری کلسیم فسفات گزارش شده

1. CAPE

است و علت این پدیده شاید به دلیل عدم استقرار املاح کلسیم، فسفر و منیزیم موجود در بره موم به صورت ترکیبات رادیوآپیک باشد که به صورت یونی در بره موم وجود دارند (۳). نقیصه استخوانی در هر دو گروه تقریباً با بافت استخوانی جدید ضمن نشان دادن مراحل از تشکیل و توسعه عروق در کانال‌های هاورسی به خصوص در گروه شاهد و هم چنین تشکیل میزان متغیری از ماده مغز استخوان در فضاهای استخوانی دو گروه، حاکی از رشد و ترمیم یکسان استخوان در هر دو گروه بود. هر چند که در مقطع بافتی هیچ اثری از تکه‌های ایمپلنت مشاهده نشد، اما تأیید تشکیل استخوان متخلخل در زمینه‌ای از بافت همبند شاید گواهی بر استخوان‌سازی به طور ملایم و طبیعی بود. فضای مغز استخوان در گروه آزمایش علایمی از عروق‌سازی با الگوی مرکزی در فضای مجازی ایمپلنت را نشان می‌داد. این مشاهدات با یافته‌های اوچیدا و سینگ که هیدروکسی آپاتیت (HAP) را به ترتیب در نقیصه ایجاد شده در جمجمه رت و زند زیرین خرگوش کاشته بودند، مطابقت دارد.

جراح باید با خواص مکانیکی و بیولوژیکی موادی که با آن‌ها کار می‌کند آشنایی کامل داشته باشد (مانند توانایی تشخیص ترمیم در موضعی که گرفت از آن برداشته شده است) (۲۶). مواد مصنوعی متفاوتی از قبیل فلزات، پلی‌مرها و سرامیک‌ها به عنوان مواد جانشین شونده استخوان مورد مطالعه و ارزیابی قرار گرفته‌اند. این مواد به خوبی بر مشکلات ناشی از پیوند استخوانی در جراحی‌های ترمیمی استخوان فائق آمده‌اند. مواد مصنوعی فعال کننده سلول‌ای استخوانی که در موضع نقیصه کاشته می‌روند ممکن است در بازسازی شکل و فعالیت نقیصه استخوان از طریق ایجاد چهاروی متخلخل برای مشارکت در مراحل ترمیم و رشد استخوانی مؤثر باشند (۲۷). هر چند بره موم واجد خلل و فرج در اندازه‌ای کوچک‌تر از ۳۰ میکرومتر است ولی از آن‌جا که ماده‌ای قابل تحمل برای بدن به شمار می‌رود شاید بتوان گفت که این ماده می‌تواند نقش داربست برای هدایت

سلول‌های پیش‌ساز که از ضریح جدا شده و به سمت نواحی پروکسیمال و دیستال شکستگی می‌روند داشته باشد. بسیاری از ایمپلنت‌ها دارای شایستگی و کفایت فعالیت به صورت هدایت استخوان‌سازی جهت خلق شرایط بازسازی سلول‌های استخوانی و مغز استخوان می‌باشند (۱۹). اخیراً برای فهم و درک جزئیات فرایند ترمیم با مواد و فاکتورهایی که دارای خاصیت بیواکتیو هستند مانند سلول‌های خونی، مواد بیولوژیکی و مصنوعی با خلل فرج به تنهایی یا به همراه هم، مطالعات ویژه‌ای انجام شده است. ژل تهیه شده از پلاکت‌های خونی را می‌توان به فراوانی در درمان نقیصه‌های مختلف بافت‌های سخت استفاده کرد و آن را به عنوان عامل سرعت‌دهنده تشکیل استخوان و بهبود روند ترمیم زخم‌های مزمن در مدیریت زخم‌ها معرفی نمود (۲۸). بره‌موم هم با توجه به دارا بودن انواع موادی که به تفصیل در مورد آن‌ها توضیح داده شد می‌تواند در زمره این مواد قرار گیرد. لنون از یک زیست تجزیه شامل نشاسته ذرت، اتیل و اتیل الکل (SEVAC)، بایواکتیوگلاس، آلبومین سرم خونی گاو و آلفا آمیداز برای پر کردن نقیصه استخوان و بررسی اثر ترمیمی آن در موضع استفاده نمود. او اثبات نمود که این کمپلکس سبب بازسازی استخوان شده است (۲۹). تمیمی و همکاران از ترکیب بروشیت (ماده پیش‌ساز آپاتایت که از گروه فسفات‌های معدنی است) و کلاژن در ترمیم استخوان با موفقیت استفاده کردند (۲۹). ناندی و همکاران ضمن مطالعه در خصوص ارزیابی استفاده از سرامیک متخلخل بتا تری کلسیم فسفات نتیجه‌گیری کردند که کاشت این ماده در موضع نقیصه سبب ارتقاء عملیات استخوان‌سازی و پرشدگی نقیصه از طریق بازسازی استخوانی می‌شود (۲۶). میرازورا در مطالعه‌ای بیان داشت که بره‌موم و ترکیبات موجود در آن به دلیل سرکوب ترکیبات ایکوزانوئید که توسط ماکروفاژها تولید می‌شوند، دارای خاصیت ضدالتهابی است (۳۰). مورد اخیر شاید مدرک دیگری دال بر کاهش التهاب در موضع جراحی باشد. هاگان در

مطالعه‌ای تأثیر بره‌موم را به دلیل خاصیت ضدالتهابی و آنتی‌اکسیدانی در بقاء سلول‌های پوست صدمه دیده به اثبات رسانده است. هاگان بیان می‌دارد که این خاصیت مربوط به CAPE است. بارلی و همکاران تأثیر CAPE موجود در عصاره الکلی بره‌موم را بر توقف روند التهاب حاد و مزمن در بیماری آرتریت به اثبات رسانده‌اند (۳۱). کارل دایل و همکاران تأثیر عصاره بره‌موم را بر آزادسازی مولکول‌های کلیدی عامل وقوع التهاب بیان داشته و اثر محافظتی بره‌موم را بر تبدیل و بلوغ سلول‌های غضروفی انسان به اثبات رسانده‌اند (۳۲). آرژنین و پرولین، از اسیدهای آمینه موجود در بره‌موم، محرک رشد سلول در پستانداران محسوب می‌شوند. گمان می‌رود که آرژنین موجود در بره‌موم توانایی تحریک میتوز و ارتقاء سنتز پروتئین را داشته باشد. پرولین نیز اسید آمینه‌ای است که در ساختمان کلاژن و الاستین به عنوان دو ترکیب مهم در ماتریکس بافت پیوندی شرکت می‌کند. فرولیک اسید موجود در بره‌موم نیز در سنتز کلاژن و الاستین نقش موثری دارد (۳۳).
تأثیر ماهیت متخلخل مواد ایمپلنتی جانشین پیوند در ترمیم استخوانی از طریق برقراری داربست به منظور تسهیل و کمک به استقرار سلول‌های استئوبلاست و استئوکلاست در روی آن و هم‌چنین نقش برجسته اندازه و فاصله ذرات و خلل و فرج ذرات تشکیل‌دهنده مواد ایمپلنت در رشد و هدایت استخوان‌سازی است (۴). لذا با توجه به قوام و اندازه منافذ بین ذرات بره‌موم که حدوداً ۲۷ میکرون است، فرضیه استفاده از این ماده به عنوان یک داربست در دستور کار این پروژه قرار گرفت. فیبرهای کلاژن تیپ یک از مهم‌ترین ارکان مواد آلی استخوانی هستند که از استئوبلاست‌های موضع استخوانی آزاد شده و نقش مؤثری در شروع عملیات استخوان‌سازی دارند (۱). بنابراین، با توجه به اثبات تأثیر اسید آمینه پرولین در ارتقاء تولید کلاژن و الاستین (۶)، دلیلی موجه در استفاده از بره‌موم برای دستیابی به اهداف القاء استخوان‌سازی و استخوان‌سازی وجود

روند ترمیم استخوان به وضوح نشان دهد.

سپاسگزاری

نویسندگان مقاله مراتب تشکر و قدردانی خود را از حوزه معاونت پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز برای تامین هزینه‌های این مطالعه ابراز می‌نمایند.

دارد. علی‌رغم عدم تفاوت معنی دار بین گروه شاهد و آزمایش، با توجه به این که بره‌موم دارای مواد بیولوژیک با خواص شایان ذکر و همچنین مواد معدنی، اسیدهای آمینه و اسیدهای آلی خاص از یک سو و راحتی به کارگیری به عنوان پیوند استخوانی در مقایسه با دیگر انواع پیوندهای استخوانی از سوی دیگر است، مطالعات بیش‌تری نیاز است تا اثربخشی بره‌موم را بر

References

- Olsen BS, Vaesel MT, Sojbjerg JO. Treatment of midshaftclavicular nonunion with plate fixation and autologous bone grafting. *J Shoulder Elbow Surg* 1995; 4(5): 337-344.
- Parikh SN. Bone graft substitutes: Past, present, future. *J Postgrad Med* 2002; 48(2): 142-148.
- Nandi Sk, Ghosh SK, Kundu B, Dipak K, Basu D. Evaluation of new porous B-Tri-calcium phosphate ceramic as bone substitute in goat model. *Small Ruminant Res* 2008; 75(2): 144-153.
- Afshar AR, Mirzatoluee F. Substitute materials for bone grafting. *UMJ* 2003 14(2): 127-133.
- Griffiths Atungulu G, Toshitaka U, Fumihiko T, Daisuke H. Effect of vapors from fractionated samples of propolis on microbial and oxidation damage of rice during storage. *J Food Eng* 2008; 88(3): 341-352.
- Burdock GA. Review of the biological Properties and toxicity of bee Propolis (propolis). *Food Chem Toxicol* 1998; 36(4): 347-363.
- Nirala SK, Bhodauria M. Synergistic effects of ferritin and propolis in modulation of beryllium induced toxicogenic alterations. *Food Chem Toxicol* 2008; 46(9): 3079-3079.
- Mohammadzadeh S, Shariatpanahi M, Hamedi M, Ahmadvaniha R, Samadi N, Ostad SN. Chemical composition, Oral toxicity and antimicrobial activity of Iranian Propolis. *Food Chemistry* 2007; 103(4): 1097-1103.
- V-Benkovic V, knezevic AH, Dikic D, Lisicic I, Orsolcic N, Basic I, et al. Radioprotective effects of propolis and quercetin in γ -irradiated mice evaluated by the alkaline comet assay. *Phytomedicine* 2008; 15(10): 851-858.
- Stangaciu S. A guide to the composition and properties of propolis. *Apiacta* 1998. p. 1-9.
- Altan BA, Kara IM, Nalcaci R, Ozan F, Erdogan SM, Ozkut MM, et al. Systemic propolis stimulates new bone formation at the expanded suture: a histomorphometric study. *Angle Orthod* 2012; 83(2): 286-291.
- Guney A, Karaman I, Oner M, Yerer MB. Effects of propolis on fracture healing: an experimental study. *Phytotherapy Research* 2011; 25(11): 1648-1652.
- Erdem M, Gulabi D, Sen C, Sahin SA, Bozdag E. Effects of caffeic acid phenethyl ester and melatonin on distraction osteogenesis: an experimental study. *Springer Plus* 2014; 3(1): 8.
- Ang ES, Pavlos NJ, Chai LY, Qi M, Cheng TS, Steer JH, et al. Caffeic acidphenethyl ester, an active component of honeybee propolis attenuates osteoclastogenesis and

- bone resorption via the supression of RANKLinducedNF- κ b and NFAT activity. *J Cell Physiol* 2009; 221(3): 642-649.
15. Kleczek K, Majewska K, Makowski W, Michalik D. The effect of diet supplementation with propolis and bee pollen on the physicochemical properties and strength of tibial bones in broiler chickens. *Archiv Tierzucht* 2012; 55(1): 97-103.
 16. Carpenter JW, Mashima TY, Rupiper DJ. *Exotic Animal Formulary*. 2th ed. Philadelphia: WB Saunders; 1996.
 17. Marjani M, SelkGhaffari M, Moridpour R, Veshkini A, An Y. Radiological Evaluation of Rabbit Femoral Defect Healing in Caspian SEASHELL Pellets. *J Mazandaran Univ Med Sci* 2007; 17(61): 105-113.
 18. Baniadam A, Saberiafshar F, Ghadiri AR, KarimiJalalabadi Z. The use of tail vertebra as cortical bone graft in experimentally induced ulnar defects in dogs. *Iran J Vet Surg* 2006; 1(1): 22-30.
 19. Pak Nejad M, Rokn AR, Motahhari P, MirzaTolooei R. Histologic comparison of Bio-Oss and Neo-Oss in bone regeneration of experimental defects on rabbit calvarium. *Journal of Dental Medicine (JDM)* 2006; 19(2): 79-71.
 20. Pek YS, Gao S, Arshad MS, Leck KJ, Ying JY. Porous collagen-apatite nanocomposite foams as bone regeneration scaffolds. *Biomaterials* 2008; 29(32): 4300-4305.
 21. Burehard H. *Biology of Transplatation of bone*. *Orthop Clin North Am* 1978; 18(2): 187-196.
 22. Schmitt JM, Bennett S, Skalla W, Gruskin E, Buck D, Christoforou C, et al. Assessment of an experimental bone wax polymer plus TGF2-B1 implant into calvicular defects. *J Biomed Mater Res* 1998; 41(4): 584-592.
 23. Wang MY, Armstrong Jk, Fisher TC, Meiselman HJ, Mc Comb GJ, Levy ML. Levy Michael. A new, pluoronic- based, Bone hemostatic agent that does not impair osteogenesis. *Neurosurgery* 2001; 49(4): 962-967.
 24. Hu F, Hepburn HR, Li Y, Chen M, Radloff SE, Daya S. Effect of ethanol and water extracts of propolis (bee glue) on acute inflammatory animal models. *J Ethnopharmacol* 2005; 100(14): 276-283.
 25. Bolander ME, Balian G. The use of demineralized bone matrix in the repair of segmental defects. Augmentation with extracted matrix proteins and a comparison with autologus grafts. *J Bone Joint Surg Am* 1986; 68(8): 1264-1274.
 26. Seiler JC, Johanson J. Iliac crest autogenous bone grafing: Donor site complications. *J South Orthop Assoc* 2000; 9(2): 91-97.
 27. Yan SQ, Wang GJ, Shen TY. Effect of Pollen from TyphaAngustata on the osteoinductive potential of demineralized bone matrix in rat calvarial defects. *Clin Orthop Relat Res* 1994; 306: 239-246.
 28. Kazakos K, Lyras DN, Verettas D, Tikeridis K, Tryfonidis M. The use of autologous. PRP gel as an aid in the management of acute trauma wounds. *Injury* 2009; 40(8): 801-805.
 29. Tamimi F, Kumarasami B, Doillon C, Gbureck U, Le Nihouannen D, Cabarcos EL, et al. Burshite-Collagen Composites for bone regeneration. *Acta Biomater* 2008; 4(5): 1315-1321.
 30. Mirzoeva OK, Calder PC. The effect of propolis and its components on eicosanoid production during the inflammatory response. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1996; 55(6): 441-449.

31. Borrelli F, Maffia P, Pinto L, Russo A, Capasso F, Lalenti A. Phytochemical compounds involved in the antiinflammatory effect of propolis extract. *Fitoterapia* 2002; 73(1): 53-63.
32. Cradile V, Panico A, Gentile B, Borrelli F, Russo A. Effect of propolis on humon cartilage and chondrocytes. *Life Sci* 2003; 73(8): 1027-1035.
33. Gabrys J, konecki J, Krol W, Seheller S, Shani J. Free amino acids in bee hive product (propolis) as identified and quantified by gas-liquid chromatography. *Pharmacol Res Commun* 1986; 18(6): 513-518.