

بررسی تأثیر غشاء کیتوسان بر ترمیم نقائص استخوانی در جمجمه (کالواریای) خرگوش

دکتر محمدرضا کریمی^۱، امین قندهاری مطلق^{۲*}، دکتر فرهود نجفی^۳، دکتر فاطمه شاهسواری^۴، دکتر احمد اصغری^۵

۱-دانشیار گروه پرودونتیکس، دانشکده ی دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی آزاد اسلامی تهران، ایران
۲- دندانپزشک

۳-دانشیار گروه رزین ها و افزودنی ها، پژوهشکده پوششهای سطح و فناوریهای نوین، پژوهشگاه رنگ دانشگاه تهران، ایران

۴-دانشیار گروه آسیب شناسی دهان، فک و صورت، دانشکده ی دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی آزاد اسلامی تهران، ایران

۵- دانشیار گروه علوم درمانگاهی دانشکده ی دامپزشکی، واحد علوم تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

وصول مقاله: ۱۴۰۳/۱۷/۱۶ اصلاح نهایی: ۱۴۰۳/۸/۲۰ پذیرش مقاله: ۱۴۰۳/۹/۲۰

Evaluation of the effect of chitosan membrane on the repair of bone defects in rabbit skull (calvaria) (In-vivo)

Mohammadreza Karimi¹, Amin Ghandehari Motlagh^{2*}, Farhood Najafi³, Fatemeh Shahsavari⁴, Ahmad Asghari⁵

1: Associate professor, Periodontology Dept, Faculty of Dentistry, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran

2. Dentist

3. Associate Professor, Resin and additives Dept, faculty of Surface coating and novel technologies, Rang Institute, Tehran University, Tehran, Iran

4. Associate professor, Dept of Oral & Maxillofacial Pathology, Faculty of Dentistry, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

5. Associate Professor, Clinical Science Dept, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Received: Sep 2024

Accepted: Dec 2024

Abstract:

Background and Aim: In periodontal and implant regenerative treatments, the lack of bone healing presents serious issues. The Guided Bone Regeneration (GBR) method, is one of the most reliable methods for restoring these defects.

Material and Methods: In this experimental Study, Defect with a diameter of 8 mm were created in the skulls of 18 New Zealand white rabbits. The chitosan membranes, were placed in the created defects in a clockwise manner, and one defect was left without a membrane as the control group. At intervals of 4 weeks and 8 weeks, the rabbits were sacrificed, and histological specimens were taken from the holes. These samples were examined histologically for new bone formation, the amount of inflammation and reviewed using statistical analyses.

Results: The rate of new bone formation in the fourth week was 7.50% in the chitosan group and 4.66% in the control group. In the eighth week, these values were 14.03% and 10.39%, respectively. No significant difference in bone formation was observed between the chitosan membrane group and the control group at both intervals ($P > 0.05$). Inflammation levels in the eighth week were higher compared to the fourth week. a significant difference in inflammation intensity was observed between the fourth and eighth weeks ($P < 0.001$). Additionally, a significant difference between the control group in the fourth week and the chitosan group was observed ($P < 0.001$).

Conclusion: In order to bone formation and absence of necrosis, the membrane examined in this study has relatively suitable properties for bone regeneration and repair of bone defects.

Key words: Bone-defects, Chitosan, Guided-bone-regeneration(GBR)

*Corresponding Author: dr.aminghm@gmail.com

J Res Dent Sci. 2024; 21(4): 251-258

خلاصه:

سابقه و هدف: در درمان‌های بازسازی پرپودنتال و ایمپلنت، عدم ترمیم استخوان مشکلات جدی را به همراه دارد و روش بازسازی هدایت شده استخوان (GBR)، یکی از متداول روش‌ها برای بازسازی این نقایص است.

مواد و روش‌ها: این تحقیق به روش تجربی و حیوانی انجام گرفت. در جمجه ی ۱۸ خرگوش سفید نیوزلندی حفراتی با قطر ۸ میلی متر ایجاد شد. غشاءهای کیتوسان در حفرات ایجاد شده به صورت ساعت گرد قرار گرفتند. در فواصل زمانی ۴ هفته و ۸ هفته خرگوش‌ها قربانی شده و از حفرات نمونه‌های هیستولوژیک تهیه شد و از لحاظ تشکل استخوان جدید، مقدار آماس مورد بررسی قرار گرفتند. برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم افزار SPSS ورژن ۲۶ استفاده شد. از آزمون Repeated Medium Anova برای متغیرهای کمی و پیوسته استفاده شد، و جهت مقایسه متغیرهای رتبه‌ای (با توجه به توزیع داده‌ها) از آزمون‌های غیرپارامتری Friedman و به منظور مقایسه‌های دو به دو گروه‌ها از روش Pairwas Comparison استفاده شد.

یافته‌ها: میزان تشکیل استخوان جدید در هفته ی چهارم، گروه کیتوسان ۷/۵۰ و گروه کنترل ۴/۶۶ و در هفته ی هشتم به ترتیب، ۱۴/۰۳ و ۱۰/۳۹ در درصد بدست آمد. و اختلاف معناداری در استخوان سازی بین گروه دارای غشاء کیتوسان و گروه کنترل در هر دو زمان مشاهده نشد ($P < 0.05$). میزان آماس در هفته ی هشتم نسبت به هفته ی چهارم از مقدار بیشتری برخوردار بود. اختلاف معناداری در شدت التهاب بین هفته ی چهارم و هفته ی هشتم مشاهده شد ($P < 0.001$). هم چنین، اختلاف معناداری بین گروه کنترل در هفته ی چهارم با گروه کیتوسان مشاهده شد ($P < 0.001$).

نتیجه گیری: با توجه به میزان استخوان سازی و عدم نکروز بافتی و مشاهده نشدن عدم ترمیم بافتی، غشاء مورد بررسی در این تحقیق، دارای خواص نسبتاً مناسبی جهت بازسازی و ترمیم استخوان است.

کلمات کلیدی: نقایص استخوانی، کیتوسان، بازسازی هدایت شده استخوان

مقدمه:

می‌باشد. کیتوسان دارای خواص ضد میکروبی و سازگاری زیستی می‌باشد و توسط فعالیت آنزیمی هیدرولیز می‌شود^(۷، ۸). همچنین دارای خواص ترمیمی برای زخم‌ها است^(۹). این خواص می‌تواند در تولید نوعی از غشاء قابل جذب از این بیوپلیمر مفید باشد^(۸، ۱۰). از این رو انتظار می رود انجام این مطالعه از اهمیت بالایی برخوردار باشد. انجام این تحقیق به این سوال پاسخ داده می شود که آیا استفاده از غشاءهای مشتق از کیتوسان در ترمیم نقایص استخوانی و درمان‌های Guided Bone Regeneration (GBR) با جلوگیری از تکثیر فیبروبلاست‌ها در ناحیه نقص استخوان باعث تسهیل درمان‌های نقایص استخوانی می‌گردد یا خیر .

مواد و روش‌ها:

در این مطالعه با کد اخلاق (IR.IAU.DENTAL.REC.۱۴۰۱.۱۰۰۰) از ۱۸ راس خرگوش سفید نیوزلندی از جنس نر، بالغ و با وزنی در حدود ۳-۲/۵ کیلوگرم که براساس آزمایشات بالینی سالم بودند، استفاده شد و هم چنین ۲۰ غشاء کیتوسان ساخته شد و در نقایص استخوانی خرگوش مورد استفاده قرار گرفتند.

مدیریت و درمان نقایص استخوانی مشکل کلینیکی مهم در حوزه ی پرپودانتیکس و درمان ایمپلنت‌های دهانی است^(۱، ۲). ترمیم و ساخته شدن استخوان آلوئول در نواحی با تخریب وسیع استخوانی الزامی است و درمان‌های Regenerative مختلف را باید برای بازسازی استخوان جدید به کاربرد، چرا که عدم ترمیم این نواقص مشکلات جدی درمانی را می‌تواند برای بازسازی پرپودنتال و درمان‌های ایمپلنت ایجاد کند^(۳). امروزه، بازسازی هدایت شده استخوان یا (GBR) برای بهبودی استخوان آلوئول استفاده می‌شود که اساس درمان آن شامل قرار دادن یک غشاء به منظور ایزوله کردن نقص استخوان پرپودنتال از بافت همبند لته است^(۴، ۵). تا ضمن حفظ لخته و فضا در اطراف نقص استخوانی، دسترسی سلول‌های سازنده استخوان فراهم شده و سلول‌های سایر بافت‌ها نتوانند به محل نقص حرکت کنند^(۶). اگر جهت بازسازی نقایص استخوانی اقدام نشود روند تحلیل استخوان ادامه پیدا کرده و امکان ترمیم ضایعات وسیع تر ضعیف تر شده و نیاز به درمان‌های پیچیده تر و پرهزینه تر خواهد بود،

کیتوسان یک پلیمرکربوهیدراتی است که از کیتین مشتق می‌شود. کیتین فراوان ترین بیوپلیمرطبیعی پس از سلولز

ساخت غشاء:

کیتوسان با وزن مولکولی ۱۰۰۰۰-۳۰۰۰۰ (Acros Organic)، متاکریلیک اسید (مرک، آلمان)، ۲-هیدرکسی متاکریلات (مرک، آلمان) و آمونیوم پری سولفات (مرک، آلمان) از پژوهشگاه رنگ (وابسته به وزارت علوم و فناوری ایران) تهیه شد. در یک بالن سه دهانه متصل به جو ازت و همزن مکانیکی و سیستم رفلاکس و قیف افزودن مواد اولیه، ۲۷۵ میلی لیتر آب مقطر ریخته شد، سپس ۲/۷۵ گرم متاکریلیک اسید به بالن افزوده شد و دما به ۵۰ درجه سانتی گراد رسانده شد. سپس ۵ گرم کیتوسان کم کم به محلول افزوده شد و به مدت ۲ ساعت با همزن مکانیکی همزده شد. در مرحله بعد ۳۵ گرم هیدروکسی اتیل متاکریلات به محلول افزوده شد و دمای محلول به ۶۵ درجه سانتی گرا رسانده شد. از طریق قیف متصل به بالن محلول آغازگر رادیکالی شامل ۱ گرم آمونیوم پرسولفات در ۲۵ میلی لیتر آب مقطر کم کم به محتویات بالن افزوده شد و برای ۴ ساعت تحت جو ازت با همزن مکانیکی همزده شد. محصول حاصل یک کوپلیمر اکریلیک امولشن گرفات شده به زنجیره کیتوسان بود که در قالب‌های طراحی شده ریخته شد و پس از خشک شدن به عنوان غشا مورد آزمایش قرار گرفت.

استرالیزاسیون توسط اشعه ی گاما:

غشاءها پس از آنکه در کاغدهای اتوکلاو بسته بندی شدند، توسط مرکز پرتونگاری سازمان انرژی اتمی (تهران، ایران) در دستگاه گاماسل، که یک منبع تابش کبالت ۶۰ است، به مدت ۶ ساعت با حداقل دوز جذبی 17Kgr و حداکثر دوز جذبی ۱۸.۸Kgr به منظور استرالیزاسیون تابش دهی شدند.

مطالعه ی حیوانی:

خرگوش‌ها از بخش تکثیر و نگهداری حیوانات آزمایشگاهی (موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی-حصارک کرچ) تهیه و در قفس‌های مخصوص نگهداری شدند. به منظور پرهیز از استرس و سازگار شدن حیوانات با محیط هیچگونه آزمایشی به مدت یک هفته روی خرگوش‌ها صورت نگرفت و تمامی حیوانات تحت شرایط محیطی و تغذیه ای یکسان (دما، رطوبت، نور، نوع جیره غذایی و تعداد دفعات

غذای یکسان) نگهداری شدند و در چرخه روشنایی/تاریکی ۱۲ ساعت نگهداری شدند و تحت درمان ضدانگلی قرار گرفتند. تغذیه خرگوش با استفاده از پلیت آماده مخصوص حیوانات آزمایشگاهی صورت انجام گرفت و آب نیز به صورت آزاد در اختیار حیوانات قرار گرفت. پروتکل این مطالعه مطابق با اصول اخلاقی مورد تایید کمیته‌های بین المللی حمایت از حقوق حیوانات آزمایشگاهی انجام شد.

حیوانات ۶ ساعت قبل از جراحی تحت شرایط NPO غذایی (بدون غذا) نگهداری شدند و ۲ ساعت قبل از جراحی از آشامیدن آب ممانعت شدند. جهت ایجاد بیهوشی مخلوطی از داروهای کتامین هیدروکلراید (۴۰ mg/kg) و زایلازین (۵ mg/kg) بصورت عضلانی استفاده شد. پس از شروع بیهوشی حیوانات بر روی میز جراحی قرار داده شدند موهای ناحیه کالوارיום به دقت پاک سازی شد و با استفاده از بتادین اسکراب ۷/۵٪ (بتادین قهوه ای) به مدت ۵ دقیقه اسکراب شد. سپس ناحیه مورد نظر توسط محلول بتادین ۱۰٪ (بتادین سبز) مجدداً ضدعفونی شد و با استفاده از شان ایزوله شد. در این مرحله با استفاده از تیغه شماره ۱۵ یک برش قدامی-خلفی (کرانیوکاودال) به طور حدود ۵ سانتی متر در خط میانی کالوارיום و تا حد امکان منطبق بر محل External Saggital Crest ایجاد شد و پوست به همراه پریوست توسط الواتور پریوست (Glicjman periostal Elevator) از روی استخوان کنار زده شد. سپس با مشاهده دو سوچور (عرضی و ساژیتال) بر روی جمجمه حدود استخوان فرونتال و پاریتال مشخص شد. آنگاه با استفاده از هندپیس زاویه دار با دور ۲۰۰۰ دور در دقیقه و با فرز گرد (ترفاین) به قطر ۸ میلی متر، دو حفره یک شکل و هم اندازه به قطر ۸ میلی متر بر روی استخوان‌های فرونتال و پاریتال ایجاد شد. عمق تمامی حفرات تا روی پرده منژ رسید به طوری که نرمی پرده منژ توسط پروب کاملاً قابل لمس بود. در هنگام دریل کردن از سرم فیزیولوژی استفاده شد تا از گرم شدن بیش از اندازه استخوان جلوگیری شود^(۱۱).

استخوان کالواریوم که شامل استخوان‌های فرونتال و پاریتالال به صورتی که نقصیه‌های استخوانی ایجاد شده را شامل شود، جداسازی شد و به فرمالین ۱۰ درصد انتقال داده شد.

مطالعه ی هیستولوژیک:

نمونه‌های جمع آوری شده در فرمالین ده درصد بافر شده به مدت دو هفته قرار داده شدند. سپس جهت کلسیم زدایی نمونه‌ها داخل EDTA با غلظت ده درصد به مدت ۲ ماه قرار داده شدند و در طی این مدت محلول روزانه تعویض شد. میزان کلسیم زدایی نیز به صورت دستی کنترل شد تا نمونه‌ها به مقدار کافی نرم شوند. پس از آن نمونه‌ها داخل دستگاه تیشو پروسور قرار داده شدند، سپس بلوک تهیه شد و با ضخامت ۴ میکرون برش انجام شد که حداقل یک برش در بخش مرکزی دیفکت ایجاد شده در نظر گرفته شد. پس از آن نمونه‌ها به روش H&E رنگ آمیزی شدند. از لام‌های تهیه شده تحت بزرگنمایی ۴۰X در زیر میکروسکوپ نوری (Olympus CX3) فتوگرافی انجام شد، (دوربین Sony DSC HX-1) و درصد استخوان تازه تشکیل شده توسط نرم افزار Axio Vison بر حسب میلی متر اندازه گیری و نسبت به کل حفره (۸ میلی متر) بر حسب درصد محاسبه شد. همچنین مقدار سلول‌های آماسی (۰: عدم وجود آماس (کمتر از ۱۰۰ سلول آماسی)، ۱- آماس خفیف (۱۰۰ تا ۵۰۰ سلول آماسی)، ۲- آماس متوسط (۵۰۰ تا ۱۰۰۰ سلول آماسی) و ۳- آماس شدید (بیش از ۱۰۰۰ سلول آماسی)^(۱۲)، بررسی شد.

در نهایت داده‌ها با آزمون Repeated Medium ANOVA و به دنبال آن با آزمون Friedman و جهت مقایسه‌های دو به دو گروه‌ها از روش Pairwise Comparison مورد بررسی قرار گرفتند.

یافته‌ها:

مطالعه ی هیستولوژیک:

در هفته ی چهارم، در گروه کیتوسان، بافت همبند فیبروزه (واجد فیبروبلاست و فیبروست و رشته‌های کلاژن)، همراه با تجمعات گسترده ی سلول‌های التهابی به صورت کانونی و کانون‌های بزرگ و وسیع (سلول‌ها عموماً از نوع پلی

از نظر موقعیت در تمام حیوانات یک عدد از حفرات در استخوان فرونتال و یک عدد دیگر در استخوان پاریتالال ایجاد شد. حفرات به شرح زیر پر شدند:

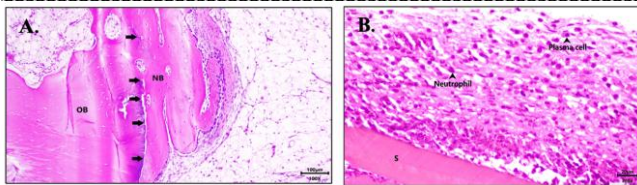
۱- حفره ی خالی (کنترل)

۲- حفره ی خالی پوشیده شده توسط غشاء کیتوسان

مواد به آرامی و بدون فشار در حفرات گذاشته شد تا پارتیکل‌های آنها وارد فضای منتر نشوند. علیرغم اینکه موقعیت حفرات ایجاد شده در تمام نمونه‌ها یکسان بود ولی ترتیب پر شدن هر یک از حفرات به طور تصادفی تعیین شد. موقعیت قرار گرفتن مواد به صورت چرخشی و در جهت حرکت عقربه‌های ساعت تعیین شد و بدین ترتیب سعی شد تا تأثیر احتمالی موقعیت نقیصه بر نتایج مطالعه به حداقل ممکن برسد. غشاء مورد مطالعه به مدت سی دقیقه در نرمال سالین استریل مرطوب شد و پس از قرار دادن غشاء در محل مورد نظر پیوست با نخ بخیه قابل جذب ویکریل ۴-۰ و به صورت سرتاسری ساده بخیه شد. سپس پوست کالواریوم با نخ بخیه نایلون ۳-۰ و به صورت تک ساده بخیه شد. ناحیه عمل مجدداً توسط محلول بتادین ضد عفونی شد و حیوان برای برگشت از بیهوشی به یک محل گرم منتقل شد تا پس از هوشیاری کامل به محل نگهداری خود بازگردانده شود.

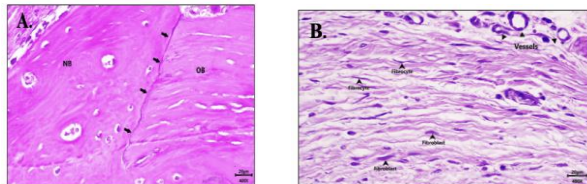
در طی دوره پس از جراحی از داروی ضد درد پتدین به مدت ۳ روز و سفازولین به مدت ۵ روز، استفاده شد و هر دو به صورت عضلانی برای حیوانات تزریق شد تا درد پس از عمل را برطرف کرده و از ایجاد عفونت احتمالی جلوگیری نماید. هر روز یکبار حضور ورم یا التهاب احتمالی در ناحیه، باز شدن بخیه‌ها و حضور ترشحات یا عفونت‌های احتمالی موضع بررسی شد. بخیه‌های پوست ۱۲ روز بعد از عمل کشیده شدند.

حیوانات در فواصل زمانی چهار هفته (۹ خرگوش) و هشت هفته (۹ خرگوش) به کمک تزریق مقادیر کشنده داروی لیدوکائین ۱۰ درصد معدوم شدند. پس از اطمینان از مرگ حیوان، پوست ناحیه کالواریوم با استفاده از تیغه بیستوری به صورت کامل جداسازی و با استفاده از اره استخوان بر کالبد گشایی با ایجاد ۴ برش بر روی استخوان کالواریوم قطعه ای



شکل ۲- گروه کنترل در چهار هفته ی اول

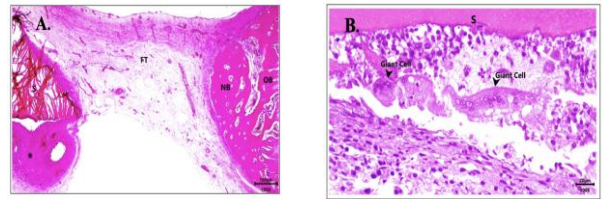
A: استخوان تازه تشکیل شده (NB) در امتداد استخوان قدیمی (OB) از لبه ی نقیصه (فلش سیاه رنگ). B: بافت همبند فیبروزه (FT) واجد فیبروپلاست، فیبروسیت، رشته‌های کلاژن و عروق خونی



شکل ۳- گروه کیتوسان در چهار هفته ی دوم

A: استخوان تازه تشکیل (NB) در امتداد استخوان قدیمی (OB) از لبه ی نقیصه (فلش سیاه رنگ). B: واکنش التهابی اطراف غشاء، سلول‌های التهابی در اطراف غشاء کیتوسان (S) در این تصویر نوتروفیل و پلاسماسل و لنفوسیت دیده می‌شود.

در هفته ی هشتم، گروه کیتوسان، بافت همبند فیبروزه (واجد فیبروپلاست و فیبروسیت و رشته‌های کلاژن)، همراه با تجمعات گسترده ی سلول‌های التهابی (سلول‌ها عموماً از نوع پلی مورفونوکلئر (نوتروفیل)، ماکروفاژ و جاینت سل) قطعات غشاء کیتوسان را در بر گرفتند. التهاب مزمن فعال و گرانولوماتوز چرکی به میزان متوسط تا شدید در تعدادی از نمونه‌های این گروه قابل مشاهده بود. بازسازی استخوان فقط در لبه‌های نقیصه و ملحق به محل برش استخوان قدیمی انجام شده و در هیچ یک از نمونه ها، استخوان تازه تشکیل در مرکز نقیصه و بدون اتصال به استخوان قدیمی، دیده نشد. (شکل ۳)



شکل ۱- گروه غشاء کیتوسان در چهار هفته ی اول

مورفونوکلئر (نوتروفیل)، ماکروفاژ و جاینت سل) قطعات غشاء کیتوسانی را در بر گرفته اند. بازسازی استخوان فقط در لبه‌های نقیصه و ملحق به محل برش استخوان قدیمی با وسعتی بیش از گروه کنترل انجام شده و در هیچ یک از نمونه‌های این گروه، استخوان تازه تشکیل در مرکز نقیصه و بدون اتصال به استخوان قدیمی، دیده نشد. (شکل ۱)

A: استخوان تازه تشکیل شده (NB) در امتداد استخوان قدیمی (OB)، بافت همبند (FT) و کانون‌های گسترده ی التهاب (علامت ستاره) قطعات کیتوسان (S) را در بر گرفته اند. B: واکنش التهابی اطراف غشاء (S)، سلول‌های التهابی در اطراف غشاء (S): ماکروفاژهای تک هسته ای، لنفوسیت و جاینت سل‌های چند هسته ای که نشان از واکنش جسم خارجی

در هفته ی چهارم، در گروه کنترل، بافت همبند فیبروزه ادماتوز بوده همراه با فیبروپلاست و فیبروسیت و رشته‌های کلاژن که به صورت محدود متراکم و منظم شده اند، مشاهده گردید. در برخی نمونه‌های گروه کنترل، تجمعاتی کانونی از سلول‌های التهابی دیده شد که ممکن است، به دلیل عدم رعایت اصول آسپسی در جراحی ایجاد نقیصه است. در هیچ یک از نمونه‌های گروه کنترل، استخوان تازه تشکیل در مرکز نقیصه و بدون اتصال و الحاق به لبه ها، دیده نشد. تشکیل تیغه های استخوانی و بازسازی استخوان فقط در لبه‌های نقیصه و ملحق به محل برش استخوان قدیمی انجام شده بود. (شکل ۲)

کیتوسان ۶ مورد آماس خفیف و ۳ مورد آماس متوسط (بین ۱۰۰ الی ۵۰۰ لنفوسیت) مشاهده شد. (جدول ۲)

جدول ۲- شدت آماس گروه های کیتوسان و کنترل در فواصل زمانی ۴ و ۸ هفته

P-value	هفته هشتم				هفته چهارم			
	۰	۱	۲	۳	۰	۱	۲	۳
$P < 0.001$	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
گروه های	نمونه				نمونه			
	۰	۱	۴	۴	۰	۳	۶	۰
کیتوسان	۰	۲	۲	۵	۰	۰	۰	۹
کنترل	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰

0: No Inflammation (Less than 100 lymphocytes), ۱: Mild Inflammation (100-500 lymphocytes), ۲: Moderate Inflammation (500-1000 lymphocytes) ۳: Severe Inflammation (More than 1000 lymphocytes)

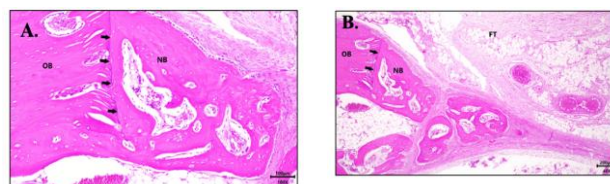
در حالی که در گروه کنترل در تمامی ۹ مورد کمتر از ۱۰۰ سلول آماسی مشاهده شد اما، در هفته ی هشتم، ۵ مورد بدون آماس و ۲ مورد آماس خفیف و متوسط مشاهده شد، و آزمون Friedman نشان داد که این اختلاف در شدت التهاب بین هفته ی چهارم و هفته ی هشتم از لحاظ آماری معنادار است ($P < 0.001$).

بحث:

در این مطالعه، تأثیر غشاء کیتوسان، بر روی بازسازی نقایص استخوانی در جمجمه خرگوشها مورد ارزیابی قرار گرفت. یافته ها نشان دادند که استفاده از غشاهای مبتنی بر کیتوسان در ترمیم نقایص استخوانی در جمجمه خرگوش تداخل نداشته و میزان التهاب در محل آسیب از حد متوسط به سمت شدید با گذشت زمان افزایش یافته است.

در تحقیقات پزشکی، استفاده از مدل حیوانی خرگوش به چندین علت رایج است. این علل شامل نگهداری آسان، سرعت بالای تکامل استخوانی که طی شش ماه به بلوغ کامل می رسد، می شود. همچنین، حفره های ایجاد شده در جمجمه خرگوش مدل مناسبی برای پیوند استخوان و ارزیابی بازسازی استخوان محسوب می شوند، زیرا این حفره ها دارای مقادیر مناسبی از مغز استخوان هستند. (۱۴، ۱۳)

در هفته ی هشتم در گروه کنترل، بافت همبند فیبروزه ادماتوز بوده و همراه با فیبروبلاست و فیبروست و رشته های کلاژن منظم تر و متراکم تر از گروه کنترل یک ماهه مشاهده شد. التهاب ملایم لنفوپلاسماسیتیک در تعدادی از نمونه های این گروه مشاهده شد. در هیچ یک از نمونه های گروه کنترل، استخوان تازه تشکیل در مرکز نقیصه و بدون اتصال و الحاق به لبه ها، دیده نشد. تیغه های استخوانی تازه تشکیل در این گروه، فقط در لبه های نقیصه و ملحق به محل برش استخوان قدیمی انجام گردیده است. (شکل ۴)



شکل ۴- گروه کنترل در چهار هفته ی دوم

A: استخوان تازه تشکیل (NB) در امتداد استخوان قدیمی (OB) از لبه ی نقیصه (فش سیاه رنگ). B: استخوان تازه تشکیل (NB) در امتداد استخوان قدیمی (OB)، بافت همبند (FT)، دو لبه را به هم متصل میکند

بیشترین میانگین متوسط استخوان سازی در هفته ی چهارم و هفته ی هشتم به ترتیب ۷/۵۰ و ۱۴/۰۳ درصد در گروه غشاء کیتوسان مشاهده شد و در گروه کنترل در فواصل زمانی چهار و هشت هفته ای به ترتیب ۴/۶۶ و ۱۰/۳۹ درصد مشاهده شد. (جدول ۱)

جدول ۱- میانگین استخوان سازی گروه های کیتوسان و کنترل در فواصل زمانی ۴ و ۸ هفته

گروه های مورد مطالعه	هفته ی چهارم %	هفته ی هشتم %
تعداد (MD±SD)	تعداد (MD±SD)	تعداد (MD±SD)
کیتوسان	۷/۵۰±۱/۹۱	۱۴/۰۳±۵/۴۶۶
کنترل	۴/۶۶±۱/۵۳۴	۱۰/۳۹±۱/۹۸

اما، بر اساس آزمون Repeated Medium ANOVA اختلاف معنای داری در استخوان سازی بین گروه کیتوسان و گروه کنترل در هر دو زمان مشاهده نشد ($P > 0.05$). شدت آماس در هفته ی هشتم نسبت به هفته ی چهارم از شدت بیشتری برخوردار بود، در حالی که، در هفته ی چهارم، گروه

Single یا Double layer، بر میزان استخوان سازی در نقائص استخوانی موش، گزارش شد، که در ۸ هفته پودر استخوان حیوانی به همراه غشاء کلاژنی Single layer، بیشترین میزان استخوان سازی را داشته است.^(۲۱)

شدت التهاب

در مطالعه‌ی حاضر، در هر دو مقطع زمانی ۴ هفته و ۸ هفته در گروه‌های دارای غشاء، آماس درجه ۲ در اکثریت نمونه‌ها و در تعداد کمی از نمونه‌ها آماس درجه ۳، یعنی بیش از ۱۰۰۰ سلول آماس مشاهده شد.^(۲۲)

اما در هفته‌ی هشتم در تمام گروه‌های دارای غشاء شدت آماس کاهش یافته بود و این مسئله بیانگر تاثیر مداخله‌ی جراحی و روند ترمیم (خونریزی و ایجاد واسطه‌های آماسی) در هفته‌های اول باشد که به مرور زمان کاهش یافته است.

در مطالعه‌ای که به منظور مقایسه‌ی دو غشاء بر روی موش‌ها به مدت ۲ و ۴ و ۱۲ هفته و توسط Van Leeuwen و همکاران انجام شد، روند کاهش آماس در انتهای هفته‌های ۴ و ۱۲ مشاهده شد^(۱۸). که این افزایش سلول‌های آماسی در ابتدای فرآیند ترمیم و کاهش آن در انتهای فرآیند ترمیم از لحاظ هستیولوژی و هستیوشیمیایی اثبات شده است.^(۲۲)

نتیجه گیری:

با توجه به عدم وجود نکروز بافتی، هم چنین مشاهده نشدن خروج چرک و عدم بهبودی زخم، به نظر می‌رسد که غشاء مشتق از کیتوسان در این تحقیق دارای خواص زیست سازگاری و سرعت جذب مناسبی می‌باشد.

غشاء مورد بررسی در این تحقیق، دارای خواص نسبتاً مناسبی جهت باز سازی و ترمیم استخوان و نقایص استخوانی هستند.

علاوه بر این، خرگوش‌ها در مقایسه با موش‌ها دارای مجموعه‌ای بزرگتری هستند، که این امکان را فراهم می‌آورد تا تعداد بیشتری حفره در آن‌ها ایجاد شود. این ویژگی به کاهش زمان، هزینه و خطاهای مشاهده‌ای کمک می‌کند. فرآیند بازسازی استخوان و ریمادلینگ استخوان در خرگوش تقریباً سه برابر سریع‌تر از انسان است، و بنابراین یک دوره ترمیمی دو تا چهار هفته‌ای برای ارزیابی واکنش اولیه به ترمیم و هشت هفته‌ای برای ترمیم نهایی مناسب است.^(۱۷-۱۴) اندازه‌ی بحرانی نقص (CSD) در خرگوش، ۱۵ میلی‌متر گزارش شده است.^(۱۸) ولی نقایص با قطر ۸ میلی‌متر برای ارزیابی تشکیل استخوان در جمجمه‌ی خرگوش مناسب است چرا که bridging استخوانی تا ۱۶ هفته در خرگوش‌های سفید نیوزلندی رخ می‌دهد.^(۱۹)

تشکیل استخوان جدید

بیشترین میانگین تشکیل استخوان جدید در گروه کنترل پس از چهار هفته و هشت هفته به ترتیب ۴/۶۶ درصد و ۱۰/۳۹ درصد بود که تفاوت قابل توجهی با دیگر گروه کیتوسان نداشت، درصد، غشاء کیتوسان ۷/۵۰ درصد و ۱۴/۰۳ بود که اختلاف معنی داری با گروه کنترل نداشتند.

خوشخون‌ژاد و همکاران میزان استخوان سازی در حفره‌های ۸ میلی‌متری در جمجمه‌ی خرگوش را که برای مطالعه‌ی مواد زونگرفت Bio-Oss و غشاء Bio-Guide ایجاد کرده بودند، در ماه اول و دوم به ترتیب، ۱۰ و ۱۵ درصد برای گروه کنترل، گروه زونگرفت به تنهایی ۱۷ و ۲۲ درصد، گروه غشاء همراه گرفت ۱۷ و ۲۲ درصد و ۱۰ و ۱۶ درصد برای گروه غشاء به تنهایی اعلام کردند^(۱۱) مقادیر استخوان سازی مشابه تحقیق حاضر بوده و گرفت استخوانی در تشکیل استخوان جدید نقش داشته است. در مطالعه‌ی ای که توسط، De Olivera و همکاران، بر روی ۹۶ موش به فواصل زمانی ۳۰ و ۶۰ روز به منظور، بررسی غشاء‌های قابل جذب کلاژنی و همراه با هیدروکسی آپاتیت انجام شد، نشان داده شد که در فاصله‌ی زمانی ۶۰ روزه، غشاء کلاژنی خوک بیشتری استخوان سازی را داشته است.^(۲۰) Abou Fadel R و همکاران، در مطالعه‌ی ای، با هدف بررسی و مقایسه‌ی تاثیر غشاء‌های کلاژنی layer

References:

1. Song JM, Shin SH, Kim YD, Lee JY, Baek YJ, Yoon SY, et al. Comparative study of chitosan/fibroin-hydroxyapatite and collagen membranes for guided bone regeneration in rat calvarial defects: micro-computed tomography analysis. *Int J Oral Sci.* 2014; 6 (2): 87-93.
 2. Crowley C, Wong JM, Fisher DM, Khan WS. A systematic review on preclinical and clinical studies on the use of scaffolds for bone repair in skeletal defects. *Curr Stem Cell Res Ther.* 2013; 8 (3): 243-52.
 3. Giannobile W, Rios H, Lang N. Bone as a tissue. In: Lindhe J, Lang N, Karring T. *Clinical Periodontology and Implant Dentistry.* Fifth ed. Oxford: Blackwell Munksgaard, 2008. P:86.
 4. Ku Y, Shim IK, Lee JY, Park YJ, Rhee SH, Nam SH, et al. Chitosan/poly(L-lactic acid) multilayered membrane for guided tissue regeneration. *J Biomed Mater Res A.* 2009; 90 (3): 766-72.
 5. Zhang K, Zhao M, Cai L, Wang Z-k, Sun Y-f, Hu Q-l. Preparation of chitosan/hydroxyapatite guided membrane used for periodontal tissue regeneration. *Chinese Journal of Polymer Science.* 2010; 28 (4): 555-61.
 6. Greenstein G, Caton JG. Biodegradable barriers and guided tissue regeneration. *Periodontol* 2000. 1993; 1: 36-45.
 7. Sagnella S, Mai-Ngam K. Chitosan based surfactant polymers designed to improve blood compatibility on biomaterials. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2005; 42 (2): 147-55.
 8. Mao S, Shuai X, Unger F, Wittmar M, Xie X, Kissel T. Synthesis, characterization and cytotoxicity of poly(ethylene glycol)-graft-trimethyl chitosan block copolymers. *Biomaterials.* 2005; 26 (32): 6343-56.
 9. Reynolds B, Leveque T, Buxton R. Wound healing III: Artificial maturation of arrested regenerate with an acetylated amino sugar. *The American Surgeon.* 1960; 26: 113-7.
 10. Xu Y, Du Y, Huang R, Gao L. Preparation and modification of N-(2-hydroxyl) propyl-3-trimethyl ammonium chitosan chloride nanoparticle as a protein carrier. *Biomaterials.* 2003; 24 (27): 5015-22.
 11. Khoshkhoonejad AA, Miremadi A, Rokn AR, Edslami B, Dehghan M, Kalbasi H. Effect of GBR in Combination with Deproteinized Bovine Bone Mineral on the healing of Calvarial Defects in Rabbits. *J of Dent, The Uni Med Sci.* 2006(3):77-86
 12. Rokn AR, Khodadoostan MA, Reza Rasouli Ghahroudi AA, Motahary P, Kharrazi Fard MJ, Bruyn HD, et al. Bone formation with two types of grafting materials: a histologic and histomorphometric study. *Open Dent J.* 2011; 5: 96-104.
 13. Castañeda S, Largo R, Calvo E, Rodríguez-Salvanés F, Marcos ME, Díaz-Curiel M, Herrero-Beaumont G. Bone mineral measurements of subchondral and trabecular bone in healthy and osteoporotic rabbits. *Skeletal Radiol.* 2006 Jan;35(1):34-41. doi: 10.1007/s00256-005-0022-z. Epub 2005 Oct 25. PMID: 16247642.
 14. Tian C, Wong BL, Hornung L, Houry JC, Miller L, Bange J, Rybalsky I, Rutter MM. Bone health measures in glucocorticoid-treated ambulatory boys with Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord.* 2016 Nov;26(11):760-767. doi: 10.1016/j.nmd.2016.08.011. Epub 2016 Aug 22. PMID: 27614576.
 15. Songfeng Xu, Kaili Lin, Zhen Wang, Jiang Chang, Lin Wang, Jianxi Lu, Congqin Ning, Reconstruction of calvarial defect of rabbits using porous calcium silicate bioactive ceramics. *Biomaterials.* 2008;29:2588-96.
 16. Na KH, Lee HJ, Lee JE, Park JB. Regeneration of Rabbit Calvarial Defects with Combination of Stem Cells and Enamel Matrix Derivative: A Microcomputed Tomography and Histological Evaluation Comparing Two- and Three-Dimensional Cell Constructs. *Medicina (Kaunas).* 2024 Mar 8;60(3):451. doi: 10.3390/medicina60030451. PMID: 38541178;
 17. Cavalcanti SC, Pereira CL, Mazzonetto R, de Moraes M, Moreira RW. Histological and histomorphometric analyses of calcium phosphate cement in rabbit calvaria. *J Craniomaxillofac Surg.* 2008 Sep;36(6):354-9. doi: 10.1016/j.jcms.2008.02.005. Epub 2008 Apr 21. PMID: 18424059.
 18. Morimoto A, Porfirio Xavier S, Ricardo Silva E, Morinaga K, Botticelli D, Nakajima Y, Baba S. Critical-sized marginal defects around implants in the rabbit mandible. *Oral Maxillofac Surg.* 2024 Apr 12. doi: 10.1007/s10006-024-01233-2. Epub ahead of print. PMID: 38605114.
 19. Sadeghi R, Najafi M, Semyari H, Mashhadiabbas F. Histologic and histomorphometric evaluation of bone regeneration using nanocrystalline hydroxyapatite and human freeze-dried bone graft : An experimental study in rabbit. *J Orofac Orthop.* 2017 Mar;78(2):144-152. English. doi: 10.1007/s00056-016-0067-8. Epub 2017 Jan 27. PMID: 28130564.
 20. De Oliveira JCS, Baggio AMP, Benetti LP, Delamura IF, Ramos EU, Bizelli VF, Bassi APF. Application of Tissue Engineering in Manufacturing Absorbable Membranes to Improve the Osteopromoting Potential of Collagen. *Bioengineering (Basel).* 2022 Dec 21;10(1):15. doi: 10.3390/bioengineering10010015. PMID: 36671587; PMCID: PMC9855111.
- بیسیس
21. Abou Fadel R, Samarani R, Chakar C. Guided bone regeneration in calvarial critical size bony defect using a double-layer resorbable collagen membrane covering a xenograft: a histological and histomorphometric study in rats. *Oral Maxillofac Surg.* 2018 Jun;22(2):203-213. doi: 10.1007/s10006-018-0694-x. Epub 2018 Apr 14. PMID: 29654386.
 22. Van Leeuwen AC, Van Kooten TG, Grijpma DW, Bos RR. In vivo behaviour of a biodegradable poly(trimethylene carbonate) barrier membrane: a histological study in rats. *J Mater Sci Mater Med.* 2012 Aug;23(8):1951-9. doi: 10.1007/s10856-012-4663-x. Epub 2012 May 9. PMID: 22569734; PMCID: PMC3400755.