

## ارزیابی اثرات استفاده از پودر کیتوزان بر ترمیم استخوان در مدل موش صحرایی: ارزیابی رادیولوژیکی و هیستوپاتولوژیکی

### چکیده:

**مقدمه:** درمان بهینه شکستگی‌های پیچیده و نقایص بزرگ استخوانی موضوع مهم حل‌نشده‌ای در ارتوپدی و تخصص‌های مرتبط با آن است. راهکار درمانی استاندارد برای تقویت بازسازی استخوان برای نقیصه‌های کوچک‌تر از ۵ سانتی‌متر، پیوند مستقیم استخوان است. هدف از این مطالعه بررسی رادیولوژیکی و هیستوپاتولوژیکی تأثیر استفاده پودر کیتوزان بر ترمیم استخوان در مدل موش صحرایی است تا با مطالعه روند بهبود و جوش خوردن استخوان، مزایا و معایب این روش معرفی گردد و بتوان در آینده داربست‌هایی با استحکام کافی برای درمان شکستگی‌های این‌چنینی معرفی کرد.

**مواد و روش‌ها:** تعداد ۱۵ موش صحرایی نر در یک محدوده سنی و وزنی انتخاب شدند و به ۳ گروه پنج‌تایی تقسیم شدند. در تمام موش‌ها ۳ میلی‌متر از متافیز استخوان رادیوس برداشته شد. در گروه اول، محل نقیصه، صرفاً بخیه زده شد. در گروه دوم محل نقیصه با اتوگرافت استخوانی جایگزین شد و پوست بخیه زده شد. محل نقیصه در گروه سوم با پودر کیتوزان پر شد. در ادامه در هفته چهارم و هشتم پس از عمل، از محل جراحی عکس رادیوگرافی تهیه شد و بعد از نگهداری از موش‌ها در پایان هفته‌ی هشتم (روز ۵۶)، به روش انسانی معدوم‌سازی شدند و برای بررسی‌های هیستوپاتولوژیکی، نمونه‌برداری صورت گرفت.

**نتایج و بحث:** یافته‌های رادیوگرافی و هیستوپاتولوژیکی بهبود قابل‌توجهی در کیفیت و کمیت استخوان تازه بازسازی‌شده در گروه‌های تحت درمان با کیتوزان را در مقایسه با گروه درمان‌نشده نشان دادند.

**نتیجه‌گیری:** نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد که اثر بازسازی استخوان ناشی از تحریک مکانیکی بافت استخوانی توسط کیتوزان افزایش می‌یابد. **واژگان کلیدی:** کیتوزان، بازسازی استخوان، پیوند استخوان، موش صحرایی

پذیرش مقاله: ۳۲ روز قبل از چاپ

<sup>۱</sup>دکتر فاطمه حیدری، <sup>۱</sup>دکتر امین بیغم صادق، <sup>۲</sup>دکتر احمد عربان، <sup>۱</sup>دکتر عبدالحمید میمنندی پاریزی، <sup>۱</sup>دکتر علیرضا شیخ زاده،

<sup>۱</sup>دکتر علی افضلی، <sup>۱</sup>دکتر مریم عسکری

### مقدمه

استخوان ساختاری کامپوزیتی است که از ترکیبات معدنی و آلی تشکیل شده است. بیشترین ترکیب معدنی آن، فسفات کلسیم است. در حالی که بخش اصلی ترکیب آلی، از کلاژن تشکیل شده است<sup>(۱)</sup>. استخوان‌ها تنها داربست‌های بی‌جان نیستند، بلکه، آنها اندام‌های زنده و پویایی هستند که نقش مهمی در حمایت، حفاظت، حرکت و حتی تولید سلول‌های خونی دارند. استخوان از طریق سختی و استحکام، خود را از سایر بافت‌های همبند متمایز می‌کند. این ویژگی‌های متمایز از ترکیب نمک‌های معدنی در ماتریکسی متشکل از فیبرهای کلاژن، پروتئین‌های غیرکلاژنی و غیره ناشی می‌شوند<sup>(۲)</sup>. نقص استخوان با اندازه بحرانی یک سناریوی بالینی است که در آن استخوان به دلیل تروما، عفونت<sup>۱</sup>، تومور یا دلایل دیگر از بین می‌رود یا بریده می‌شود و نمی‌تواند به طور خودبه‌خود بهبود یابد<sup>(۳)</sup>. مهم‌ترین دلیل ایجاد نقیصه استخوانی، شکستگی استخوان است. شکستگی استخوان آسیب بسیار شایعی در بدن است و فرآیند درمان آن از نظر فیزیولوژیکی پیچیده است و شامل هر دو جنبه بیولوژیکی و مکانیکی می‌باشد<sup>(۴)</sup>. درمان بهینه شکستگی‌های پیچیده و نقایص بزرگ استخوانی موضوع مهم حل‌نشده‌ای در ارتوپدی است. تقریباً ۵ تا ۱۰ درصد از شکستگی‌ها بهبود نمی‌یابند و جوش نمی‌خورند<sup>(۵)</sup>. کیتوزان یک پلی ساکارید طبیعی است که بطور گسترده در پزشکی استفاده می‌شود و از کیتین مشتق شده است. همچنین به عنوان جزو اصلی دیواره‌ی سلولی قارچ‌ها، اسکلت بیرونی سخت‌پوستان، حشرات و فلس ماهی‌ها یافت می‌شود<sup>(۶،۷)</sup>. کیتوزان به دلیل قیمت پایین، خاصیت تطبیق‌پذیری و در دسترس بودن و منابع فراوانی که دارد و خواصی مانند فعالیت ضد میکروبی، خاصیت آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهابی و ضدسرطانی، سمی نبودن، زیست سازگاری بالا، خاصیت بالای سازگاری با خون و فعالیت هموستاتیک بسیار مورد توجه قرار گرفته است<sup>(۷)</sup>.

۱. بخش جراحی و رادیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شیراز، شیراز، ایران  
۲. بخش پاتوبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شیراز، شیراز، ایران

نویسنده مسئول:

دکتر امین بیغم صادق

Email address:

dr.bigham@gmail.com

1 Osteomyelitis

2 Non union

مورد بررسی قرار گیرد. رادیوگرافی از اندام حرکتی قدامی موش‌های صحرانی در روز صفر، ۲۸ و ۵۶ از نمای جانبی تهیه شد. برای ارزیابی و درجه‌بندی رادیوگراف‌های تهیه شده از سیستم درجه‌بندی تغییر شکل یافته Lane و Sandhu به شرح ذیل استفاده شد.

جدول ۱: سیستم درجه‌بندی برای رادیوگراف‌ها به روش تغییر شکل یافته Lane و Sandhu	
درجه بندی	شکل گیری استخوان (Bone formation)
۰	هیچ نشانه‌ای از شکل‌گیری استخوان
۱	شکل‌گیری استخوان و پر شدن ۲۵٪ نقیصه
۲	شکل‌گیری استخوان و پر شدن ۵۰٪ نقیصه
۳	شکل‌گیری استخوان و پر شدن ۷۵٪ نقیصه
۴	شکل‌گیری استخوان و پر شدن ۱۰۰٪ نقیصه
درجه	Union یا جوش خوردگی (فوقانی و تحتانی)
۰	عدم جوش خوردگی
۱	احتمالاً جوش خوردگی
۲	جوش خوردگی کامل
درجه	بازسازی یا Remodeling
۰	هیچ نشانه‌ای از بازسازی
۱	نشانه‌های ضعیف بازسازی
۲	بازسازی کامل

### ارزیابی هیستوپاتولوژیکی

بعد از نگهداری از موش‌ها در پایان هفته‌ی هشتم، به روش انسانی معدوم شدند و برای بررسی‌های هیستوپاتولوژیکی، نمونه‌برداری انجام شد. نمونه‌های بافت بلافاصله جدا به مدت ۳ روز در فرمالین ۱۰ درصد تازه آماده شده، تثبیت شد. پس از ۲۴ ساعت، فرمالین نمونه‌ها تعویض شد. سپس نمونه‌ها در محلول اسید فرمیک-سیترات سدیم ساخته شده از دو محلول جداگانه یعنی (۱۲۵ سی‌سی اسید فرمیک ۹۰ درصد و ۱۲۵ سی‌سی آب مقطر، ۵۰ میلی‌گرم سیترات سدیم و ۲۵۰ سی‌سی آب مقطر) کلسیم زدایی شدند. محلول دکلسیفیکاسیون هر ۳ تا ۴ روز تعویض شد و نمونه‌ها به طور منظم با یک سوزن کوچک جهت اطمینان از حذف مواد معدنی، بررسی شدند. اطمینان از دکلسیفیکاسیون زمانی رخ می‌دهد که سوزن بدون فشار وارد نمونه شود. سپس برای از بین بردن اسید باقیمانده، نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در آب جاری شسته شدند<sup>(۹)</sup>. در ادامه نمونه‌ها در قالب‌های پارافینی قرار داده شدند و با برش ۵ میکرونی و رنگ‌آمیزی هماتوکسین-ئوزین اسلاید هیستوپاتولوژی تهیه شد. در ارزیابی هیستوپاتولوژیکی از روش اسکوربندی التیام استخوان امری استفاده شد<sup>(۱۰)</sup>. در حالی که تعداد استئوبلاست‌ها، استئوسیت‌ها، استئوکلاست‌ها و عدد تراکولار<sup>۱</sup> از نظر بافت‌شناسی در چهار میدان دید در زیر یک

کیتوزان شبیه گلیکوزامینوگلیکان‌ها جزء طبیعی ماتریکس خارج سلولی است که یک ریزمحیط موضعی برای رشد سلولی ایجاد می‌کند و از تکثیر، تمایز و معدنی شدن استئوبلاست‌ها پشتیبانی می‌کند<sup>(۸)</sup>؛ بنابراین هدف از این مطالعه بررسی رادیولوژیک و هیستوپاتولوژیک تأثیر استفاده پودر کیتوزان بر ترمیم استخوان در مدل موش صحرانی است تا با مطالعه کمی و کیفی روند بهبود و جوش خوردن استخوان، مزایا و معایب این روش معرفی گردد و بتوان در آینده داربست‌هایی با استحکام کافی برای درمان شکستگی‌های این‌چنینی معرفی کرد.

### مواد و روش‌ها

مطالعه حاضر در دانشکده دامپزشکی دانشگاه شیراز و بخش جراحی و رادیولوژی در اردیبهشت ۱۴۰۳ انجام گرفت. کیتوزان به شکل پودر تجاری در دسترس می‌باشد.

### حیوانات مورد استفاده و گروه بندی

تعداد ۱۵ موش صحرانی نر بالغ در محدوده وزنی  $20 \pm 20$  گرم در یک قفس به مدت یک ماه به منظور آشنایی با محیط و معاینه کامل به جهت ارزیابی سلامتی نگهداری شدند. موش‌ها در سه گروه تحت عنوان درمان نشده (Sham)، اتوگرافت و درمان شده با پودر کیتوزان قرار گرفتند

### روش جراحی

موش‌ها تحت بییهوشی با ۰/۱ میلی‌لیتر کتامین ۱۰٪ همراه با ۰/۱ میلی‌لیتر آمپول میدازولام قرار گرفتند. موضع جراحی به صورت آسپتیک آماده‌سازی شد. سپس بر روی اندام حرکتی قدامی چپ، در امتداد استخوان رادیوس، شکافی به طول دو برابر عرض نقیصه بر روی پوست زده می‌شود و استخوان رادیوس در معرض دید قرار گرفت. سپس به کمک سوهان و سمباده برقی، در استخوان ۳ میلی‌متر از متافیز استخوان رادیوس همراه با پریوستیومی که آن را احاطه کرده است، برداشته شد. اندازه‌ی این نقیصه دو برابر عرض استخوان در نظر گرفته شد. جهت جلوگیری از نگرز حرارتی، عمل برش استخوانی تحت شستشوی نرمال سالین قرار گرفت. همچنین، لخته‌های خونی ایجاد شده تحت عمل به طور کامل از محل ضایعه برداشته شد تا به عنوان یک داربست جدید برای رشد استخوان عمل نکند. سپس در گروه درمان نشده محل نقیصه خالی بخیه زده شد و گروه دوم با اتوگرافت استخوانی و گروه سوم با پودر کیتوزان پر شد. پس از اتمام کار محل برش بخیه زده شد.

موش‌ها به طور روزانه از نظر استفاده از اندام‌های حرکتی و وزن‌گذاری بر روی اندام حرکتی قدامی، وضعیت عمومی، اشتها و فعالیت فیزیکی تحت نظر قرار گرفتند. هرگونه زخم‌های موضعی، آماس، تورم، سفتی، قرمزی، خونریزی و پرشدن نقیصه استخوانی و یا عدم ترمیم مورد توجه قرار گرفت. در ادامه در طول هشت هفته پس از عمل از محل جراحی عکس رادیوگرافی تهیه شد تا روند ترمیم استخوانی از جهت رادیولوژیکی

1 Trabecular Number - TN

از ۰/۰۵ بود، دوباره با آزمون آماری Mann-Whitney U test مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. در این آزمون اگر مقادیر کمتر از ۰/۰۵ ( $P < ۰/۰۵$ ) بود، از نظر آماری معنی‌دار تلقی شدند. برای انجام تست‌های آماری هم از نرم‌افزار SPSS استفاده شد.

### نتایج

هیچ کدام از موش‌ها در طول دوره تلف نشدند. همه آنها از اشتباهی مناسب و وزن طبیعی برخوردار بودند.

رادیوگرافی‌ها از اندام حرکتی قدامی موش‌های صحرانی در روز صفر، ۲۸ و ۵۶ از نمای جانبی تهیه شد و بر اساس علائم رادیوگرافیکی مشاهده شده در هر تصویر امتیاز داده شد و سپس امتیازات جمع گردید و جمع امتیازات در نظر گرفته شد (شکل ۱ و ۲) داده‌های کیفی به صورت میانه (حداقل-حداکثر) گزارش شدند. از آزمون آماری Kruskal-Wallis H Test و Mann-Whitney U test برای مقایسه آماری داده‌ها استفاده شد (جدول ۳).

آنالیز آماری با کمک Mann-Whitney U Test صورت پذیرفت و گروه درمان‌نشده با گروه اتوگرافت ( $P= ۰/۰۰۸$ )، گروه درمان‌نشده با گروه کیتوزان ( $P= ۰/۰۰۳$ ) اختلاف معناداری داشتند که نشان داد گروه درمان‌نشده از تمامی گروه‌ها به شکل معناداری ضعیف‌تر عمل کرده است.

میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی  $100 \times$  مورد بررسی قرار گرفت. یک آسیب‌شناس باتجربه، ارزیابی محل ضایعه را انجام داد که برای جلوگیری از هرگونه سوگیری نسبت به گروه‌بندی بی‌اطلاع بود.

### جدول ۲: سیستم درجه بندی برای هیستوپاتولوژی به روش امری

درجه بندی	نقیصه
۰	خالی
۱	فقط بافت پیوندی فیبروزی
۲	بافت فیبروزی بیشتر از غضروف
۳	غضروف بیشتر از بافت فیبروزی
۴	فقط غضروف
۵	غضروف بیشتر از استخوان
۶	استخوان بیشتر از غضروف
۷	فقط استخوان

### تجزیه و تحلیل آماری

ابتدا نتایج به‌دست‌آمده به‌وسیله آزمون آماری Kruskal-Wallis H Test (ANOVA) مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. زمانی که ارزش P کمتر



(ج)

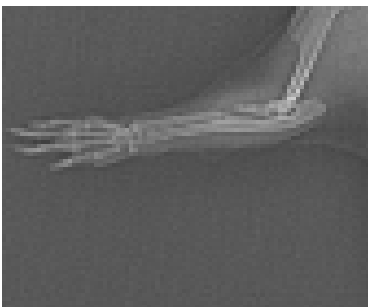


(ب)

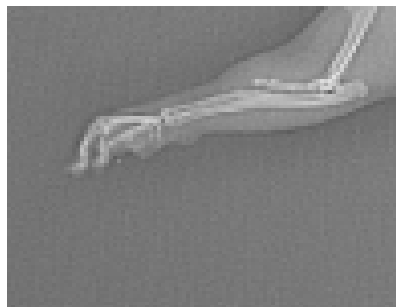


(الف)

شکل ۱: نمای رادیولوژیکی گروه‌ها در روز ۲۸. گروه درمان‌نشده (الف) - گروه اتوگرافت (ب) - گروه درمان‌شده با کیتوزان (ج).



(ج)



(ب)



(الف)

شکل ۲: نمای رادیولوژیکی گروه‌ها در روز ۵۶. گروه درمان‌نشده (الف) - گروه اتوگرافت (ب) - گروه درمان‌شده با کیتوزان (ج).

پیوندی نرم به صورت بی‌نظم در محل نقیصه دیده شد. رگ خونی و کمی غضروف و استخوان در انتهای محل شکستگی تشکیل شده است (شکل ۳). در گروه اتوگرافت، محل ضایعه به مقدار قابل توجهی غضروفی و استخوانی شده است و به نظر می‌رسد استخوان‌سازی بیشتر از طریق فرایند درون‌غشایی بوده است و اغلب بافت پیوندی مستقیمی، به استخوان تبدیل شده است. مقدار زیادی غضروف و بافت پیوندی نرم هم در محل ضایعه مشاهده می‌شود (شکل ۴). در شکل هیستوپاتولوژیک ضایعه در گروه تحت درمان با کیتوزان مقدار کمی استخوان و بافت پیوندی نرم و غضروف تشکیل شده دیده می‌شود (شکل ۵).

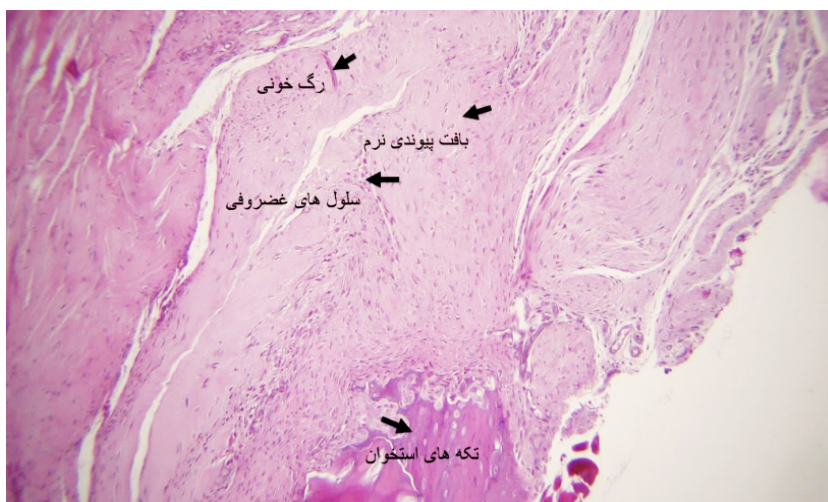
همچنین از نظر آماری گروه اتوگرافت با گروه کیتوزان ( $P= 0/008$ ) اختلاف معناداری داشتند که این نشان می‌دهد که گروه اتوگرافت بهتر عمل کرده است.

آنالیز آماری نشان داد که گروه درمان‌نشده با گروه اتوگرافت ( $P= 0/008$ ) نیز اختلاف معناداری دارد و می‌توان نتیجه گرفت که گروه اتوگرافت از گروه درمان‌نشده بهتر عمل کرده است.

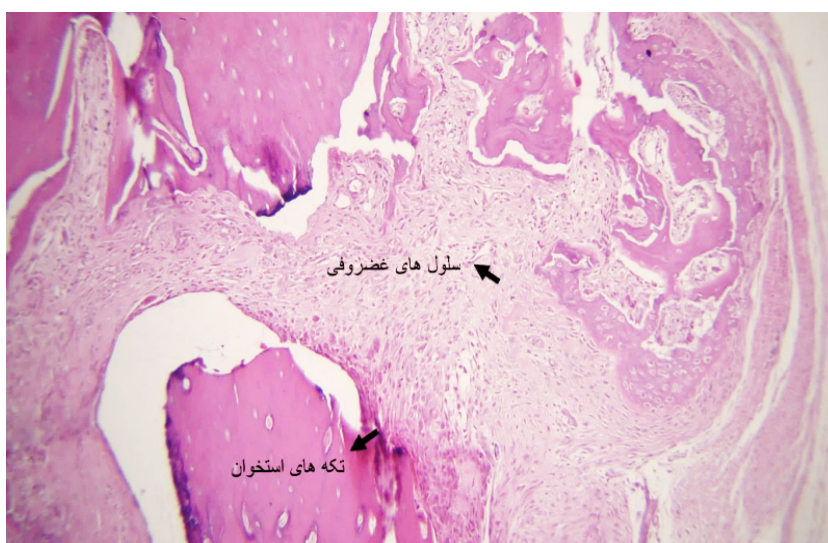
وبالآخره گروه اتوگرافت با گروه کیتوزان ( $P= 0/01$ ) اختلاف معناداری نشان دادند که می‌توان نتیجه گرفت که گروه اتوگرافت بهتر عمل کرده است. در ارزیابی هیستوپاتولوژیک ضایعه در گروه درمان‌نشده، بافت

جدول ۳: مقایسه ارزیابی رادیولوژیکی گروه‌ها در هفته چهارم و هشتم

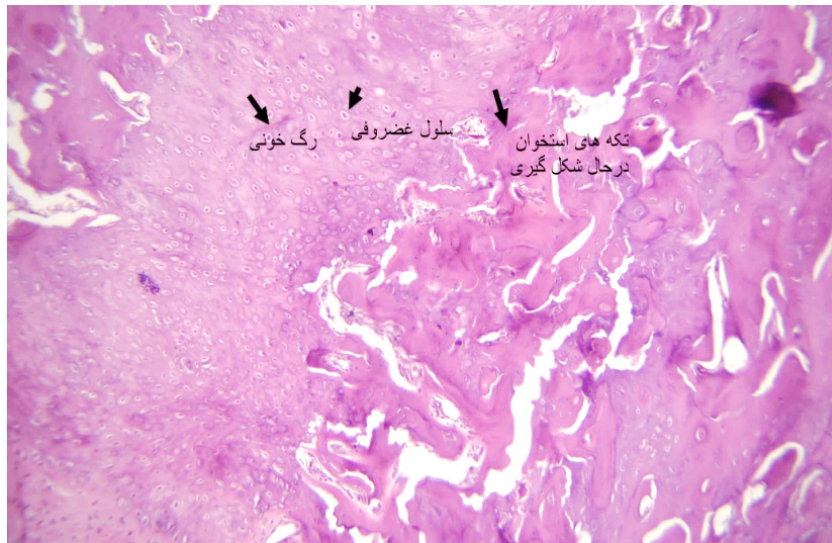
روز/گروه	درمان‌نشده / Median(min-mix)	اتوگرافت / Median(min-max)	کیتوزان / Median(min-max)	aP
روز ۲۸	<sup>b</sup> ۰(۰-۲)	<sup>c</sup> ۴(۴-۶)	۲(۲-۳)	۰/۰۰۱
روز ۵۶	<sup>d</sup> ۳(۲-۴)	<sup>e</sup> ۶(۴-۱۰)	۳(۲-۵)	۰/۰۲



شکل ۳: شکل هیستوپاتولوژیک ضایعه در گروه درمان‌نشده شده ( $H \& E \times 100$ ).



شکل ۴: شکل هیستوپاتولوژیک ضایعه در گروه اتوگرافت ( $H \& E \times 100$ ).



شکل ۵: شکل هیستوپاتولوژیک ضایعه در گروه تحت درمان با کیتوزان (H & E×۱۰۰).

## بحث

طلایی<sup>۱۱</sup> اغلب برای توصیف یک شی یا روشی به کار می‌رود که به‌عنوان بهترین در آن زمینه استفاده می‌شود و باید همه موارد دیگر را با آن مقایسه کرد<sup>(۱۳)</sup>.

در این بررسی، از سه گروه شامل گروه‌های درمان‌نشده، اتوگرافت و گروه‌های درمان شده با کیتوزان استفاده شد. بازه زمانی مورد مطالعه ۵۶ روز در نظر گرفته شد و نتایج حاصل نشان‌دهنده تأثیر مثبت کیتوزان بر ترمیم استخوان بودند. ارزیابی‌های رادیولوژیکی در هفته چهارم و هشتم صورت گرفت و ارزیابی‌های هیستوپاتولوژیکی در پایان هفته هشتم انجام شد.

تصویربرداری ارتوپدی نقش کلیدی در تشخیص‌های بالینی فعلی و پیشرفت بیماری و یا نظارت بر درمان دارد. روش‌هایی مانند رادیوگرافی (اشعه ایکس)، توموگرافی کامپیوتری<sup>۱</sup>، تصویربرداری رزونانس مغناطیسی<sup>۲</sup>، سونوگرافی و مطالعات تصویربرداری هسته‌ای از جمله سینتی گرافی، توموگرافی کامپیوتری گسیل تک فوتون<sup>۳</sup>، توموگرافی گسیل پوزیترون<sup>۴</sup>، پایه‌های اصلی تشخیص‌های مرتبط با استخوان هستند<sup>(۱۴)</sup>.

رنگ‌آمیزی بافت‌شناسی و به دنبال آن هیستومورفومتری راه دیگری برای ارزیابی کالوس شکستگی ارائه می‌دهد که برای تمایز بین انواع بافت (غضروف، بافت پیوندی نرم، میزان استخوانی شدن، بررسی سلول‌های موجود در محل ضایعه، مغز استخوان) بهترین است. این ارزیابی‌ها شامل رنگ‌آمیزی برش‌های نازک با انواع رنگ‌ها است که بسیاری از آنها به‌طور انتخابی ساختارها و انواع بافت‌های خاصی را رنگ می‌کنند و امکان شناسایی ساده و تجزیه‌وتحلیل کامپیوتری با نرم‌افزارها

امروزه یافتن یک بیومتریال ایده‌آل برای درمان نقایص استخوانی بزرگ، جوش خوردگی‌های با تأخیر و عدم جوش خوردگی‌ها، همچنان یک چالش بزرگ برای جراحان ارتوپدی و محققان در سراسر دنیا می‌باشد. مطالعات متعددی در مورد بازسازی استخوان انجام شده است که هر کدام مزایای خاص خود را دارند<sup>(۱۱)</sup>.

مطالعه حاضر به بررسی رادیولوژیکی و هیستوپاتولوژیکی تأثیر استفاده پودر کیتوزان بر ترمیم استخوان در مدل موش صحرائی پرداخته است. این مطالعه بر روی استخوان رادیوس صورت پذیرفت؛ زیرا تنها استخوانی است که می‌توان بدون استفاده از پین یا پیچ و پلاک، یک نقیصه تمام ضخامت در آن ایجاد کرد که به دلیل وجود اتصال بین استخوان زند زیرین با زندزیرین در بخش‌های انتهایی خود می‌باشد.

یافتن یک مدل حیوانی مناسب می‌تواند به‌طور دقیق وقوع شکستگی‌ها را شبیه‌سازی کرده، فرآیندهای طبیعی و غیرطبیعی ترمیم استخوان را شناسایی کرده و روش‌های نوین درمانی را توسعه دهد<sup>(۱۲)</sup>.

جوندگان و خرگوش‌ها در انتخاب گونه‌های جانوری به دلیل مناسب بودن فاکتورهای اقتصادی، محبوبیت بیشتری دارند<sup>(۱۲)</sup>. در این مطالعه از موش صحرائی به عنوان مدل حیوانی و از استخوان رادیوس به عنوان مدل شکستگی استفاده شد.

یکی از نکات حائز اهمیت در این مطالعه، وجود گروه درمانی اتوگرافت می‌باشد که به آن استاندارد طلایی می‌گویند. گروهی که بقیه گروه‌ها با آن مقایسه می‌شوند. در علوم پزشکی و اجتماعی، عبارت "استاندارد

1 Computed Tomography - CT

2 Magnetic Resonance Imaging - MRI

3 Single-Photon Emission Computed Tomography - SPECT

4 Position Emission Tomography - PET

مطالعه ما نشان داد که این نتایج در گروه‌های تحت درمان با ترکیب کیتوزان تقویت می‌شود.

عربان و همکاران مطالعه‌ای به منظور بررسی پتانسیل یک داربست کامپوزیتی متشکل از کیتوزان (CS)، ژلاتین (Gel) و ژل پلاستی (PG) به نام CS-Gel-PG را بر روی نقص استخوان رادیال با اندازه بحرانی دوطرفه در موش صحرایی بررسی کردند. ۸۰ نقص استخوان رادیال به صورت دوطرفه در ۴۰ موش صحرایی اسپراگ-داولی ایجاد شد و به طور تصادفی به هشت گروه شامل درمان نشده، اتوگرافت، CS، Gel، CS-PG، Gel-PG، CS-Gel و CS-Gel-PG تقسیم شدند.

نقایص استخوانی در طول مطالعه از نظر بالینی و رادیولوژیکی مورد ارزیابی قرار گرفت و نمونه‌های استخوانی آن‌ها با استفاده از هیستوپاتولوژی، هیستومورفومتری، سی‌تی‌اسکن، میکروسکوپ الکترونی و آزمایشات بیومکانیکی پس از ۸ هفته مورد ارزیابی قرار گرفت. گروه‌های اتوگرافت و CS-Gel-PG، تشکیل استخوان جدید، تراکم بافت‌های استخوانی و غضروفی، حجم استخوان و عملکرد مکانیکی بالاتری از گروه‌های درمان نشده، CS و Gel-PG نشان دادند<sup>(۱۱)</sup>.

داربست‌های کیتوزان، گزینه‌های احتمالی برای بهبود نقص حیاتی استخوان رادیال هستند، اما مکانیسم‌های افزایش ترمیم استخوان توسط این مواد طبیعی نیاز به بررسی گسترده‌تری دارد. به طور خلاصه، تحقیقات آینده باید بر روی کارایی کیتوزان برای به حداکثر رساندن خواص ضد باکتریایی و استخوان زایی آن در شرایط فیزیولوژیکی و بهبود عملکرد بیولوژیکی آن، متمرکز شود. چنین شواهدی به غلبه بر مشکلات موجود و ارائه دیدگاه جدیدی برای درمان نقایص استخوانی عفونی کمک می‌کند<sup>(۱۲)</sup>.

## نتیجه‌گیری

نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد که اثر بازسازی استخوان ناشی از تحریک مکانیکی بافت استخوانی توسط کیتوزان افزایش می‌یابد. کیتوزان از طریق تقویت تکثیر استئوبلاست‌ها و سلول‌های بنیادی مزانشیمی و محیط کشت استئوژنیک از طریق تمایز سلول‌های بنیادی مشتق از چربی می‌تواند در فرایند ترمیم استخوان بسیار تأثیرگذار باشد. به‌طور کلی، نتایج به دست آمده از این مطالعه نشان داد که می‌توان به مهندسی بافت و استفاده از بیومتریال‌ها به عنوان روش‌های جایگزین پیوندهای استخوانی نگریست. انتخاب یک بیومتریال خوب با در نظر گرفتن در دسترس بودن و قیمت پایین آن، می‌تواند جایگزین انواع اتوگرافت‌ها و آلوگرافت‌ها شود؛ بنابراین، مهندسی بافت در آینده می‌تواند به عنوان روش نوینی برای درمان نقایص استخوانی در نظر گرفته شود.

## قدردانی

بدین‌وسیله مراتب سپاس و قدردانی صمیمانه خود را از همکار عزیز و گرامی، جناب آقای دکتر علیرضا شیخ‌زاده به‌دلیل کمک‌های بی‌دریغ ایشان در به‌ثمر رسیدن این مطالعه ابراز می‌دارم.

را فراهم می‌کنند<sup>(۱۵)</sup>. تمایز بین غضروف و بافت پیوندی نرم از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است؛ زیرا بافت پیوندی نرم که نقص شکستگی را پر می‌کند، ممکن است نشان‌دهنده عدم استخوان‌سازی و یا استخوان‌سازی ضعیف باشد. در حالی که وجود غضروف و استخوان تازه تشکیل شده، عکس آن است و تشکیل بیش‌از‌حد بافت پیوندی نرم، نشانه کلیدی عدم جوش خوردگی است<sup>(۱۶)</sup>.

بررسی نتایج هیستوپاتولوژیکی مطالعه حاضر، نشان داد که گروه کیتوزان به‌طور موثرتری از گروه درمان نشده بهتر عمل کرده است. تشکیل غضروف و استخوان در گروه درمان شده با کیتوزان، بیانگر اثربخشی مطلوب این ماده بر فرایند ترمیم استخوان است. در گروه درمان شده با کیتوزان، کیتوزان موجب ترمیم استخوان به شیوه ثانویه و درون غضروفی شده است. کیتوزان همچنین با ترویج تکثیر سلولی، رگ زایی و تنظیم پاسخ‌های آماسی، نقش مهمی در بهبود دارد<sup>(۱۷)</sup>.

در بررسی‌های هیستوپاتولوژیکی انجام شده در گروه اتوگرافت، بافت پیوندی نرم مشاهده شد. می‌توان گفت بافت پیوندی مستقیماً به استخوان تبدیل شده است. هرچند که مقدار کمی غضروف هم در محل ضایعه دیده شد. به نظر می‌رسد که استخوان‌سازی در گروه اتوگرافت به‌صورت درون غشایی بوده است، نه درون غضروفی؛ به عبارت دیگر ترمیم استخوان به صورت ترمیم اولیه و مستقیم بوده است<sup>(۱۸)</sup>.

در گروه درمان نشده، الگوی نامنظمی از استخوان تشکیل شده بود و برعکس در بررسی‌های این گروه متوجه حضور کم عروق خونی شدیم که نشان‌دهنده فرایند رگ زایی کم در طول ترمیم می‌باشد. به‌طور کلی گروه درمان‌نشده ضعیف‌ترین عملکرد را در ترمیم استخوان در میان درمان شده‌ها داشت.

در مطالعه حاضر، مشخص شد که عروق خونی در مقایسه با گروه درمان‌نشده که محل نقیصه در آن خالی مانده بود، به تعداد بیشتری تشکیل شده بودند که نشان‌دهنده خاصیت رگ زایی کیتوزان می‌باشد. توسعه رگ زایی، پتانسیل استخوان را برای بهبود ترمیم، افزایش می‌دهد<sup>(۱۹)</sup>.

مطالعات آزمایشگاهی نشان داده‌اند که کیتوزان می‌تواند باعث افزایش چسبندگی و تکثیر استئوبلاست‌ها و سلول‌های بنیادی مزانشیمی می‌شود<sup>(۲۰)</sup>.

هو و همکاران مطالعه‌ای برای ارزیابی اثرات داربست‌های نانوالیاف کیتوزان بر بهبود استخوان و مکانیسم‌های احتمالی آنها طراحی کردند. آنها در قسمت قدامی استخوان ران موش‌های نر، نقیصه استخوانی ایجاد کردند و سپس استخوان ران چپ با داربست‌های نانوالیاف کیتوزان پر شد و با استخوان ران راست که به عنوان کنترل در نظر گرفته شده بود، مقایسه شد.

آنالیزهای تصویربرداری نشان داد که داربست‌های نانوالیاف کیتوزان در مقایسه با گروه کنترل، ترمیم استخوان را بهبود می‌بخشد. در واقع داربست‌های نانوالیاف کیتوزان منجر به افزایش قابل توجهی در ضخامت استخوان تراکولار، اما کاهش در فاکتور پارامتر تراکولار می‌شود<sup>(۲۱)</sup>.

## منابع

- 12 Gao H, Huang J, Wei Q, He C. Advances in Animal Models for Studying Bone Fracture Healing. *Bioengineering (Basel)*. 2023;10(2):201. DOI: 10.3390/bioengineering10020201.
- 13 Brodsky S.L, Lichtenstein B. The Gold Standard and the Pyrite Principle: Toward a Supplemental Frame of Reference. *Front Psychol*. 2020;11:562. DOI: 10.3389/fpsyg.2020.00562.
- 14 Math K.R, Berkowitz J.L, Paget S.A, Endo Y. Imaging of Musculoskeletal Infection. *Rheum Dis Clin North Am*. 2016;42(4):769-84. DOI: 10.1016/j.rdc.2016.07.010.
- 15 Knox A.M, McGuire A.C, Natoli R.M, Kacena M.A, Collier C.D. Methodology, selection, and integration of fracture healing assessments in mice. *J Orthop Res*. 2021;39(11):2295-309. DOI: 10.1002/jor.25172.
- 16 Han Z, Bhavsar M, Leppik L, Oliveira K.M.C, Barker J.H. Histological Scoring Method to Assess Bone Healing in Critical Size Bone Defect Models. *Tissue Eng Part C Methods*. 2018;24(5):272-9. DOI: 10.1089/ten.TEC.2017.0497.
- 17 Mawazi SM, Kumar M, Ahmad N, Ge Y, Mahmood S. Recent Applications of Chitosan and Its Derivatives in Antibacterial, Anticancer, Wound Healing, and Tissue Engineering Fields. *Polymers (Basel)*. 2024;16(۱۰)
- 18 Ferraz MP. Bone Grafts in Dental Medicine: An Overview of Autografts, Allografts and Synthetic Materials. *Materials (Basel)*. 2023;16(11):1351. DOI: 10.3390/polym16101351.
- 19 Saran U, Gemini Piperni S, Chatterjee S. Role of angiogenesis in bone repair. *Arch Biochem Biophys*. 2014;561:109-17. DOI: 10.1016/j.abb.2014.07.006.
- 20 Zhao X, Li P, Guo B, Ma P.X. Antibacterial and conductive injectable hydrogels based on quaternized chitosan-graft-polyaniline/oxidized dextran for tissue engineering. *Acta Biomater*. 2015;26:236-48. DOI: 10.1016/j.actbio.2015.08.006.
- 21 Ho M.H, Yao C.J, Liao M.H, Lin P.I, Liu S.H, Chen R.M. Chitosan nanofiber scaffold improves bone healing via stimulating trabecular bone production due to upregulation of the Runx2/osteocalcin/alkaline phosphatase signaling pathway. *Int J Nanomedicine*. 2015;10:5941-54. DOI: 10.2147/IJN.S90669.
- 22 Tian Y, Wu D, Wu D, Cui Y, Ren G, Wang Y, et al. Chitosan-Based Biomaterial Scaffolds for the Repair of Infected Bone Defects. *Front Bioeng Biotechnol*. 2022;10:899760. DOI: 10.3389/fbioe.2022.899760.
- 1 Indurkar A, Choudhary R, Rubenis K, Locs J. Role of carboxylic organic molecules in interfibrillar collagen mineralization. *Front Bioeng Biotechnol*. 2023;11:1150037. DOI: 10.3389/fbioe.2023.1150037.
- 2 Šromová V, Sobola D, Kaspar P. A Brief Review of Bone Cell Function and Importance. *Cells*. 2023; 12(21):2576. doi: 10.3390/cells12212576.
- 3 Huang E.E, Zhang N, Ganio E.A, Shen H, Li X, Ueno M, et al. Differential dynamics of bone graft transplantation and mesenchymal stem cell therapy during bone defect healing in a murine critical size defect. *J Orthop Translat*. 2022;36:64-74. DOI: 10.1016/j.jot.2022.05.010.
- 4 Ghiasi M.S, Chen J, Vaziri A, Rodriguez E.K, Nazarian A. Bone fracture healing in mechanobiological modeling: A review of principles and methods. *Bone Rep*. 2017;6:87-100. DOI: 10.1016/j.bonr.2017.03.002
- 5 Toosi S, Behravan N, Behravan J. Nonunion fractures, mesenchymal stem cells and bone tissue engineering. *J Biomed Mater Res A*. 2018;106(9):2552-62. DOI: 10.1002/jbm.a.36433.
- 6 Einhorn T.A, Gerstenfeld L.C. Fracture healing: mechanisms and interventions. *Nat Rev Rheumatol*. 2015;11(1):45-54. DOI: 10.1038/nrrheum.2014.164.
- 7 Ul-Islam M, Alabbosh K.F, Manan S, Khan S, Ahmad F, Ullah M.W. Chitosan-based nanostructured biomaterials: Synthesis, properties, and biomedical applications. *Adv Ind Eng Poly Res*. 2024;7(1):79-99.
- 8 Pattnaik S, Nethala S, Tripathi A, Saravanan S, Moorthi A, Selvamurugan N. Chitosan scaffolds containing silicon dioxide and zirconia nano particles for bone tissue engineering. *Int J Biol Macromol*. 2011;49(5):1167-72. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2011.09.016.
- 9 Ibrahim L.M, Jassim R.K., Al Gabban A. Biomechanical and histomorphometric analysis of max phase (Ti2AlC) alloy as an implant. *J Res Med Dent Sci*. 2022;10(8):51-7.
- 10 Fadhil E, Dosh R.H, Wally Z.J, Haider J. Histological evaluation of the effects of bone morphogenetic protein 9 and angiopoietin 1 on bone healing. *J Taibah Univ Med Sci*. 2023;18(5):954-63. DOI: 10.1016/j.jtumed.2023.02.005.
- 11 Oryan A, Bigham-Sadegh A, Abbasi-Teshnizi F. Effects of osteogenic medium on healing of the experimental critical bone defect in a rabbit model. *Bone*. 2014;63:53-60. DOI: 10.1016/j.bone.2014.02.010.