

## بررسی مقایسه‌ای هیستولوژیک و هیستومورفومتریک

### اثر بخشی Biostite® در Surgical Defect

دکتر امیررضا رکن\* - دکتر مؤگان پاک‌نژاد\* - دکتر بهنام اسلامی\*\* - دکتر ابوالفضل صفیری\*\*\*

\*استادیار گروه آموزشی پرودنتیکس دانشکده دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی تهران

\*\*استادیار گروه آموزشی آسیب‌شناسی دهان، فک و صورت دانشکده دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی شهید بهشتی

\*\*\*پرودنتیست

**Title:** A comparative histologic and histomorphometric investigation on Biostite in surgical defects

**Authors:** Rokne AR. Assistant Professor\*, Paknejad M. Assistant Professor\*, Eslami B. Assistant Professor\*\*, Safiri A. Periodontist.

**Address:** \*Dept. of Periodontology, Faculty of Dentistry, Tehran University of Medical Sciences

\*\*Dept. of Oral Pathology, Faculty of Dentistry, Shahid Beheshti University of Medical Sciences

**Statement of Problem:** The goal of bone regenerative therapy is to reconstruct the damaged tissues to initial condition, which seems so important in periodontology and implantology. In such therapies, different biomaterials, with some advantages and disadvantages, may be used.

**Purpose:** The aim of this research was to evaluate the quality, bone trabecular density and thickness of newly forming bone as well as foreign body reaction against Biostite®, in comparison with the control group.

**Material and Methods:** In this experimental study the total number of 5 sheep was operated with general anesthesia. At first 10 standard defects were created in 5×5×5mm on the left and right edentulous mandibular ridge. Five defects were randomly treated by Biostite®, the remaining five were considered as controls. After six months, the sheep were sacrificed and the separated defect areas with intact margin were placed in 10% formaline and prepared for histologic and histomorphometric study. To analyze the data, Mann-Whitney U test was used.

**Results:** The mean percentage of new bone formation in Biostite® group was statistically more than the control group ( $P < 0.05$ ). Newly formed bone was vital in both groups which was a combination of lamellar and woven types, however, the thickness and density of new bone in biostite® group was more than the controls. Foreign body reaction was observed in Biostite® group.

**Conclusion:** It is suggested that Biostite® synthetic material can be useful in bone regenerative therapies.

**Keywords:** Bone reconstruction; Biostite; Histomorphometric; Sheep

*Journal of Dentistry. Tehran University of Medical Sciences (Vol. 16; No.3; 2003)*

#### چکیده

**بیان مسأله:** بازسازی استخوان به منظور بازگرداندن نسوج از دست رفته به وضعیت پیشین آنها قبل از شروع تخریب انجام می‌شود. اهمیت این روش درمانی در زمینه درمان لثه و ایمپلنت کاملاً محسوس است. در این درمانها ممکن است از مواد پیوندی استفاده شود که هر یک از این مواد دارای مزایا و معایبی هستند.

**هدف:** مطالعه حاضر با هدف بررسی ماهیت نسوج تشکیل شده در ارتباط با کاربرد ماده پیوندی Biostite® و مقایسه میزان بازسازی

استخوان و ضخامت و تراکم تراپیکولای استخوان ساخته شده انجام شد؛ همچنین بروز واکنش جسم خارجی در ارتباط با کاربرد این ماده پیوندی نیز مورد بررسی قرار گرفت.

**روش بررسی:** در این مطالعه تجربی تعداد ۵ رأس گوسفند مورد بررسی قرار گرفتند. نمونه‌های انتخاب شده با بیهوشی عمومی مورد عمل جراحی قرار گرفتند و در ناحیه بی‌دندانی فک پایین در سمت چپ و راست در مجموع ۱۰ ضایعه استخوانی به ابعاد ۵×۵×۵ میلی‌متر ایجاد گردید. در پنج ضایعه به صورت تصادفی از ماده پیوندی Biostite® (گروه مورد) و پنج ضایعه دیگر به عنوان گروه شاهد در نظر گرفته شدند. پس از گذشت شش ماه از زمان جراحی، نمونه‌ها کشته شدند و محل جراحی با حاشیه سالم به صورت برشهای مجزا و در فرمالین ۱۰٪ قرار داده شد. مقاطع بافت‌شناختی از محل ضایعات تهیه و پس از رنگ آمیزی مورد بررسیهای بافت‌شناختی و هیستومورفومتريک قرار گرفتند. اطلاعات به دست آمده با استفاده از آزمون آماری Mann-Whitney U تجزیه و تحلیل گردید.

**یافته‌ها:** میانگین درصد استخوان ساخته شده در گروه مورد نسبت به گروه شاهد بیشتر و این اختلاف از نظر آماری معنی‌دار بود ( $P < 0.05$ ). استخوان ساخته شده در هر دو گروه زنده و ترکیبی از Lamellar Bone و Woven بود ولی ضخامت و تراکم استخوان ساخته شده در گروه مورد نسبت به گروه شاهد بیشتر بود. بروز واکنش جسم خارجی در ارتباط با کاربرد ماده پیوندی Biostite® مشاهده شد.

**نتیجه‌گیری:** با توجه به محدودیتهای این مطالعه، استفاده از ماده پیوندی سنتتیک Biostite می‌تواند در درمانهای بازسازی استخوان سودمند باشد.

**کلید واژه‌ها:** بازسای استخوان - Biostite - بافت‌شناختی (هیستولوژیک) - هیستومورفومتريک - گوسفند

مجله دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی تهران (دوره ۱۶، شماره ۳، سال ۱۳۸۲)

## مقدمه

بافت‌شناختی، رسوب سمان جدید و تشکیل استخوان و ایفای کلاژن جهت‌دار و فانکشنال را نشان داد؛ ضخامت سمان بیشتر از گروه شاهد بود و ضایعات کاملاً بسته شده بود. مقدار Biostite® باقیمانده بسیار کم و تشکیل چسبندگی نوین (New Attachment) بوضوح قابل رؤیت بود (۱).

در مطالعه Benque و همکاران وجود کلاژن در Biostite® موجب آسانتر شدن کاربرد آن و جذب بهتر ذرات هیدروکسی آپاتیت (HA) شد (۲).

Serre و همکاران در یک مطالعه In-vitro اثر Biostite® را در تولید ماتریکس کلاژنی کلسیفیه، مشابه بافت استخوانی مشاهده کردند؛ محققان این خاصیت را در مورد کلاژن اسفنجی و هیدروکسی آپاتیت مشاهده کردند (۳).

Alpaslan و همکاران واکنش انساج و تشکیل استخوان

به هنگام استفاده از مواد پیوندی در درمان بازسازی استخوان، ممکن است سؤالاتی نظیر میزان بازسازی، ماهیت و خصوصیات نسوج تشکیل شده، مدت زمان لازم برای بازسازی (Healing Period) و تحلیل (Resorption) ماده پیوندی، ذهن جراح را به خود مشغول کند؛ برای پاسخ به این سؤالات انجام مطالعات هیستولوژیک (بافت‌شناختی) و هیستومورفومتريک ضروری می‌باشد.

Benque و Brunel، Biostite® را برای درمان ضایعات پریدنتال تجربی در سگها مورد استفاده قرار دادند. این محققان پس از ۴ ماه علامتی از التهاب در ناحیه مشاهده نکردند؛ ماده از محیط عمل خارج نشده و شاخصهای بالینی Clinical Attachment Level و عمق پاکت‌ها بهبود یافته بود. رادیوگرافی نشانگر بهبود استخوان بود. بررسی

سمت چپ و پنج ضایعه در سمت راست استخوان فک پایین ایجاد شد؛ سپس به صورت تصادفی پنج ضایعه در گروه مورد و بقیه در گروه شاهد مورد بررسی قرار گرفتند. برای درمان ضایعات مورد نظر در گروه مورد از ماده پیوندی Biostite® استفاده شد ولی در گروه شاهد از هیچ ماده پیوندی استفاده نشد. در پایان عمل جراحی، بخیه فلپ با نخ قابل جذب و با پوشش کامل محل جراحی انجام شد. پس از خاتمه عمل حیوانات به Recovery و پس از پایدار شدن وضعیت آنها، به محل مراقبت و نگهداری منتقل گردیدند. دستورات بعد از جراحی شامل تزریق وریدی یک گرم آمپی‌سیلین در روز به مدت چهار روز (میزان اولیه ضمن جراحی از طریق سرم تجویز گردید) و شستشوی ناحیه جراحی با کلرهگزیدین ۰/۲٪ روزی ۲ بار به مدت دو هفته بود. پس از گذشت شش ماه از زمان جراحی، حیوانات کشته شدند و با استفاده از دستگاه Non Stop و دیسکت مخصوص، از ناحیه عمل، با حاشیه استخوان سالم برش انجام شد. قطعات استخوانی ابتدا برای ثبوت به مدت یک هفته در داخل فرمالین ۱۰٪ بافر شدند؛ سپس برای دکلسیفیکاسیون در داخل اسیدفرمیک ۱۰٪ به مدت ۲ هفته قرار گرفتند. بعد از دکلسیفیکاسیون استخوان، نمونه‌ها برای آگیری در درجات صعودی الکل تا الکل ابلوت، سپس برای شفاف شدن در متیل سالیسیلات به صورت Over Night قرار گرفتند؛ پس از این مرحله نمونه‌ها در داخل پارافین غوطه‌ور شدند و از آنها برشهایی با ضخامت پنج میکرون تهیه گردید؛ این برشها شامل محل ضایعه با حاشیه استخوان سالم اطراف بود. تعداد ۱۵ برش از محل هر ضایعه تهیه و به روش روتین هماتوکسیلین آئوزین و تولوئیدین بلو رنگ‌آمیزی شدند. مقاطع بافتی آماده شده توسط میکروسکوپ‌های نوری Zeiss و Nikon با بزرگنمایی‌های متفاوت (۴۰۰، ۱۰۰، ۲۵۰، ۴۰ و ۲۵ برابر) مورد مطالعه و بررسی قرار گرفتند. متغیرهای مورد مطالعه شامل میانگین درصد استخوان

جدید را نسبت به ایمپلنت نمودن Subperiosteal ماده پیوندی Biostite® در خوکه‌ها، پس از گذشت ۳۰، ۶۰ و ۹۰ روز از زمان جراحی مورد بررسی قرار دادند؛ در این بررسی هیچ‌گونه اثری از تشکیل استخوان مشاهده نشد؛ در حالی که ذرات HA توسط بافت همبندی فیروز احاطه شده بودند (۴). Benque و همکاران (۵،۲)، Kilic و همکاران (۶) و Milano و Melsen (۷) در مطالعه خود به مزایای کاربرد توأم ممبران و Biostite® اشاره کرده‌اند. مطالعه حاضر با هدف بررسی مقایسه‌ای بافت‌شناختی و هیستومورفومتریک اثربخشی ماده پیوندی Biostite در بازسازی استخوان انجام شد.

### روش بررسی

در این مطالعه مداخله‌ای و تجربی، تعداد ۵ رأس گوسفند که از نظر سن، جنس، وزن و نژاد یکسان بودند، توسط دامپزشک انتخاب شدند. نمونه‌ها از نظر سیستمیک کاملاً سالم بودند. با هماهنگی بین انستیتوکانسر بیمارستان امام خمینی «ره» (محل جراحی نمونه‌ها) و مرکز تحقیقات و سرم‌سازی رازی (محل تهیه و نگهداری نمونه‌ها) عمل جراحی با بیهوشی عمومی انجام شد؛ به این منظور ابتدا ۰/۱ میلی‌گرم Zylazin Hcl (Rumpun) به ازای هر کیلوگرم، و پس از آن ۱۰ میلی‌لیتر کتامین ۱۰۰، از طریق ورید تزریق گردید. برش کرسنال در ریج بی‌دندانی، حد فاصل دندانهای قدامی و خلفی فک پایین ایجاد گردید و فلپ به صورت Full Thickness بلند شد و استخوان فک پایین در ناحیه مورد نظر در دید و دسترسی قرار گرفت. پس از اندازه‌گیری دقیق از دیستال آخرین دندان قدامی و از مزیال اولین دندان خلفی و از رأس لبه استخوان فک پایین (در ناحیه بی‌دندانی حد فاصل دندانهای قدامی و خلفی) و ثبت آنها، محل ایجاد ضایعه استخوانی تعیین و توسط موتور جراحی و فرز روند، ضایعه‌ای به ابعاد ۵×۵×۵ میلی‌متر ایجاد گردید. پنج ضایعه در

اطلاعات به دست آمده با استفاده از آزمون آماری Mann-Whitney U تجزیه و تحلیل گردید.

### یافته‌ها

میانگین درصد استخوان ساخته شده  $19 \pm 1\%$  در گروه شاهد به دست آمد. ضخامت تراپیکولای استخوانی ساخته شده در محل ضایعات در این گروه بر اساس متغیرهای مذکور از نوع درجه ۳ تعیین گردید.

استخوان ساخته شده در محل ضایعات این گروه بر اساس متغیرهای ذکر شده همگی از نوع درجه ۲ بود. در هیچ یک از ضایعات گروه شاهد واکنش جسم خارجی مشاهده نشد و استخوان ساخته شده ضایعات در این گروه زنده بوده است. مطالعات هیستومورفومتري میانگین درصد استخوان ساخته شده را در گروه مورد  $4/18 \pm 27/66\%$  نشان داد؛ چنانچه میزان HA موجود در مقاطع بافت‌شناختی همراه استخوان ساخته شده محاسبه گردد، میانگین درصد استخوان ساخته شده به  $14/01 \pm 64/99\%$  افزایش خواهد یافت. ضخامت تراپیکولای استخوانی ساخته شده در این گروه در  $60\%$  موارد از نوع درجه ۳ و در بقیه موارد از نوع درجه ۲ بود. در گروه Biostite نوع استخوان ساخته شده همگی از نوع درجه ۲ بود؛ همچنین در تمامی مقاطع بافت‌شناختی، استخوان ساخته شده در محل ضایعات زنده بود.

اختلاف میانگین درصد استخوان ساخته‌شده بین دو مورد (بدون محاسبه ذرات HA) و شاهد معنی‌دار بود ( $P < 0.05$ )؛ البته در گروه مورد، میانگین درصد استخوان ساخته شده بیشتر بود.

### بحث و نتیجه‌گیری

تاکنون مطالعات بافت‌شناختی محدودی در مورد ماده پیوندی Biostite® بر روی انسان انجام شده است. در مطالعات انجام شده مشخص گردید که HA دارای

ساخته شده، ضخامت تراپیکولای استخوان، نوع استخوان ساخته شده، حیات استخوان و بروز واکنش جسم خارجی بود. درصد استخوان بازسازی‌شده بر اساس مطالعات هیستومورفومتریک و با استفاده از برنامه نرم‌افزارهای Photograb TM- 300Z SH-3Z Version 2.1 Fugix و Photoshop تعیین گردید.

ابتدا با استفاده از دوربین دیجیتالی Nikon مدل HC-300zi از مقاطع تهیه شده از محل هر ضایعه (حداقل ۱۵ برش از هر دیفکت) با بزرگنمایی ۴۰ برابر، عکسبرداری شد؛ سپس توسط نرم‌افزارهای مورد استفاده، درصد استخوان ساخته شده در هر گروه تعیین و میانگین آنها محاسبه گردید. ضخامت تراپیکولای استخوان در محل ضایعه ترمیم شده توسط (Olympus Co.) Eye Piece Micrometer اندازه‌گیری و سه درجه زیر برای آنها در نظر گرفته شد:

درجه ۱: ضخامت تراپیکولای استخوانی بیش از ۶۰ میکرون (ضخیم)

درجه ۲: ضخامت تراپیکولای استخوانی بین ۲۰ تا ۶۰ میکرون (متوسط)

درجه ۳: ضخامت تراپیکولای استخوانی بین ۱ تا ۲۰ میکرون (نازک)

نوع استخوان ساخته شده بر اساس بررسی ترتیب الیاف کلاژن استخوان توسط نورپلاریزه تعیین گردید و در سه درجه زیر طبقه‌بندی شد.

درجه ۱: وجود استخوان لاملار (Lamellar) به تنهایی

درجه ۲: وجود استخوان لاملار (Lamellar) و Woven به طور توأم

درجه ۳: وجود استخوان Woven به تنهایی

حیات استخوان بر اساس وجود سلول‌های استئوسیت زنده در داخل لاکوناها تراپیکولای استخوانی و واکنش جسم خارجی نیز با توجه وجود سلول زانت جسم خارجی در واکنش گرانولوماتوز تعیین شد.

که این اختلاف از نظر آماری معنی‌دار بود ( $P < 0.05$ ). چنانچه در گروه مورد، ذرات هیدروکسی آپاتیت در اندازه‌گیری هیستومورفومتریک لحاظ گردد، میزان بازسازی به  $14/01 \pm 64/99\%$  افزایش می‌یابد.

ضخامت تراپکولای استخوان ساخته شده در گروه شاهد همگی از نوع درجه ۳ (ضخامت تراپکولایین ۱ تا ۲۰ میکرون)، در گروه مورد (در ۴۰٪ موارد) از نوع درجه ۲ (بین ۲۰ تا ۶۰ میکرون) و در سایر موارد (۶۰٪) بین ۱ تا ۲۰ میکرون بود. نوع استخوان ساخته شده در دو گروه مورد مطالعه ترکیبی از نوع Woven Bone و Lamellar بود.

در این مطالعه بررسی‌های بافت‌شناختی گروه مورد حاکی از تشکیل بافت فیروز اطراف ذرات HA در قسمتهای سطحی و تشکیل استخوان زنده در اطراف ذرات HA در قسمتهای عمقی‌تر ضایعات بود؛ همچنین ژانت‌سل ناشی از واکنش جسم خارجی در گروه مورد مشاهده شد.

هر چند از نظر کلینیکی تفاوتی بین محل ضایعات ترمیم شده گروه مورد و شاهد مشاهده نشد ولی از نظر بافت‌شناختی تفاوت‌هایی مشاهده شد. در گروه شاهد فضاهای مغز استخوان وسیع و تراپکولای استخوانی نازک بود؛ در حالی که در گروه مورد، فضاهای مغز استخوان کمتر و تراکم استخوان ساخته‌شده، بیشتر بود. استفاده از ماده پیوندی سنتتیک Biostite می‌تواند در درمان‌های بازسازی استخوان سودمند باشد.

### تشکر و قدردانی

این تحقیق با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی تهران به انجام رسید که بدین وسیله تشکر و قدردانی می‌گردد. همچنین از آقای دکتر فیروز آرزندگان و آقای دکتر سعید امانپور و نیز از خدمات مرکز تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی و انستیتو کانسر بیمارستان امام خمینی قدردانی می‌شود.

خاصیت استئوکاندکتیو و استئوفیلیک و فاقد خاصیت استئوژنیک می‌باشد؛ همچنین مشخص گردید ذرات HA بندرت تحلیل می‌یابند (۵). در مطالعات بافت‌شناختی انجام‌شده در مورد مواد پیوندی واجد HA، اثر و نتیجه به یکی از دو صورت زیر مشاهده شده است (۵):

الف- کپسوله شدن توسط بافت فیروزه

ب- یکپارچگی ذرات HA با بافت استخوانی اطراف

نتایج چند مطالعه بافت‌شناختی بر روی حیوانات، نشانگر سازگاری بافتی و واکنش مناسب ذرات HA با نسوج سخت و نرم اطراف بوده است. ثبات ذرات HA داخل ماده زمینه‌ای یا ماتریکس کلاژنی در Biostite جهت رشد استخوان مطلوب می‌باشد؛ زیرا بازسازی استخوان نسبت به حرکات خفیف (Micromotion) حساس می‌باشد (۵).

Benque و همکاران در یک مطالعه بافت‌شناختی چنین نتیجه گرفتند که ترکیب کلاژن و هیدروکسی آپاتیت زیست‌سازگار است و به طور کامل با نسوج میزبان یکپارچگی پیدا می‌نماید و با ایجاد چسبندگی نوین همراه می‌باشد (۲).

Alpaslan و همکاران در یک مطالعه بافت‌شناختی، از ماده پیوندی Biostite برای درمان Surgical Defects در ناحیه کرانیوم خوک‌ها استفاده کردند؛ پس از سه ماه اثری از تشکیل استخوان مشاهده نشد و ذرات HA توسط بافت فیروز کپسوله شده بودند (۴).

Marshall برای افزایش ارتفاع (Augmentation) ریج آلوئول از کلاژن HA استفاده کرد. مشاهدات بافت‌شناختی نشانگر احاطه شدن ذرات HA توسط بافت همبند فیروز متراکم و ایجاد بافت استخوانی کمی بود (۸).

Benque و همکاران (۱۹۹۹) در مطالعه خود تشکیل استخوان متراکم و اسفنجی را در ارتباط با کاربرد Biostite مشاهده نمودند (۵).

در این مطالعه میانگین درصد استخوان ساخته شده در گروه شاهد  $1 \pm 19\%$  و در گروه مورد  $4/18 \pm 27/66\%$  بود

## منابع:

- 1- Benque EP, Brunel G. Etude Histologique Apress Implantation D'une Association Hydroxyapatite- collagen Dans Lesions Periodontales. Ches Chein Beagle. J Periodontol 1992; 11(1): 67-74
- 2- Benque E, Zahedi S, Brocard D, Oscaby F, Justumus P, Brunel G. Combined collagen membrane and hydroxyapatite/collagen chondroitin-sulfate spacer placement in the treatment of 2-wall intrabony defects in chronic adult and rapidly progressive periodontitis patients. J Clin Periodontol 1997 Aug;24 (8):550-6.
- 3-Serre CM, Papillard M, Chavassieux P, Bovin G. In vitro Induction of a calcifying Matrix by Biomaterials Constituted of collagen And/Or Hydroxyapatite : An ultrastructural comparison of Three Types of Biomaterial 1993; 14(2): 97-106.
- 3- Serre CM, Papillard M, Chavassieux P, Boivin G. In vitro induction of a calcifying matrix by biomaterials constituted of collagen and/or hydroxyapatite: an ultrastructural comparison of three types of biomaterials. Biomaterials 1993; 14(2): 97-106.
- 4- Alpaslan C, Alpaslan G, Oygur T. Bone reaction to subperiosteally implanted hydroxyapatite/ collagen/ glycosaminoglycans and coral in the guinea pig. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1994 Apr;77(4):335-40.
- 5- Benque E, Zahedi S, Brocard D, Marin P, Brunel G, Elharar F. Tomodensitometric and histologic evaluation of the combined use of a collagen membrane and a hydroxyapatite spacer for guided bone regeneration: a clinical report. Int J Oral Maxillofac Implants 1999 Mar-Apr;14(2):258-64.
- 6- Kilic AR, Efeoglu E, Yilmax S. Guided tissue regeneration in conjunction with hydroxyapatite collagen grafts for intrabony defect. A clinical and radiological evaluation. J Clin Periodontol 1997 Jun; 24 (6): 237.
- 7- Milano F, Melsen B. Guided regeneration using bioresorbable membranes: what is the limit in the treatment of combined periapical and marginal lesions. Int J Periodontics Restorative Dent 1997 Oct; 17 (5): 416-25.
- 8- Marshall SG. The combined use of endosseous dental implant and collagen, hydroxyapatite augmentation procedures for reconstruction, augmentation of the edentulous and atrophic mandible: a preliminary report. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 1989; 68: 217-25.