

## مطالعه ساختار بافتی و محتویات معدنی عاج ساخته شده با استفاده از ژلاتین ماتریکس استخوانی داخل غضروفی در خرگوش

دکتر علیقلی سبحانی<sup>\*</sup> - علی شجاع کاظمی<sup>\*\*</sup> - دکتر بهروز نیک‌نفس<sup>\*\*\*</sup> - دکتر سعید کاظمی<sup>\*\*\*\*</sup> - فردین فتحی<sup>\*\*\*\*\*</sup>

\* دانشیار گروه آموزشی علوم تشریحی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی تهران

\*\* دانشجوی کارشناسی ارشد علوم تشریحی، دانشگاه تربیت مدرس

\*\*\* استادیار گروه آموزشی علوم تشریحی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی تبریز

\*\*\*\* استادیار گروه آموزشی جنین‌شناسی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی ایران

\*\*\*\*\* دانشجوی دکترای علوم تشریحی، دانشگاه تربیت مدرس

**Title:** An study on histologic structure and mineral components of secondary dentin formed by endochondral bone matrix gelatin (ec bmg) implantation in rabbit.

**Authors:** Sobhani A. Associate Professor\*, Kazemi AS. MS Student\*\*, Niknafs B. Assistant Professor\*\*\*, Kazemi S. Assistant Professor\*\*\*\*, Fathi F. PhD Student\*\*

**Address:** \* Dept. of Anatomy, Faculty of Medicine, Tehran University of Medical Sciences

\*\* Dept. of Anatomy, Tarbiat Modarres University

\*\*\* Dept. of Anatomy, Faculty of Medicine, Tabriz University of Medical Sciences

\*\*\*\* Dept. of Embryology, Iran University of Medical Sciences

**Abstract:** Recently, inductive materials have been used for accelerating pulp cells and differentiation of odontoblast cells for regenerating secondary dentin. Bone Morphogenic Protein (BMP) is one of these materials. Endochondral Bone Matrix Gelatin (Ec BMG) has been used less than others. This study was designed to evaluate dentin formation by Ec BMG in rabbit. Ec BMG was prepared from tibia and femur of 4 Deutsche-Poland rabbits with average ages of 4-6 months. In this research, 12 rabbits were divided randomly to two groups (8 and 4 rabbits, respectively). In the first group, incisive tooth in one side was considered as experimental group and in other side as control group. In experimental group, pulp was exposed and Ec BMG was put in it. But, in control group, after exposing the pulp, tooth was dressed. In the second group, the rabbits were kept like the first group. They were killed in 28 and 60 days period time and their natural dentin was used for comparison of their calcium and phosphor with the first group. The light microscope and scanning electron microscopic study were performed on days of 28 and 60 after operation. Also, new secreted matrix was analyzed for measuring calcium and phosphor on all groups. The histological results on day 28 showed secondary dentin and osteodentin formation in experimental group. The scanning electron microscopic observation on 60th days after operation in experimental group showed mineralized mass on site of Ec BMG implantation. In contrast, in control and second groups, no mineralized mass was observed. Analyzing of new secreted matrix in experimental group showed the high deposition of calcium and phosphate on Ec BMG implantation site. But, the amount of calcium and phosphate in experimental group was the same as the second group. Results of present investigation indicated that, implantation of Ec BMG in pulp cavity could induce pulp cells, secondary dentin and osteodentin in rabbit. So, Ec BMG can be effective in repairing of dentin related defects.

**Key Words:** Secondary dentin formation- Osteodentin- BMG

*Journal of Dentistry. Tehran University of Medical Sciences (Vol. 15, No. 3, 2002)*

## چکیده

اخیراً از مواد القایی به منظور تحریک سلول‌های پالپ و تمایز سلول‌های ادنتوبلاست جهت ساختن مجدد عاج استفاده شده است؛ از جمله می‌توان به Bone Morphogenetic Protein (BMP) اشاره نمود؛ اما به نظر می‌رسد از ژلاتین ماتریکس استخوانی داخل غضروفی («Ec BMG» Endochondral Bone Matrix Gelatin) کمتر استفاده شده است. هدف از این تحقیق بررسی اثر این ماده بر عاج‌سازی ثانویه می‌باشد. به منظور تهیه Ec BMG از استخوان‌های تیبیا و فمور ۴ رأس حیوان آزمایشگاهی خرگوش نر نژاد Deutsche-Poland استفاده شد. در این مطالعه تجربی ۱۲ رأس خرگوش نر به دو گروه ۸تایی (گروه اول) و چهارتایی (گروه دوم) به صورت تصادفی تقسیم شدند. در گروه اول دندان پیشین در یک سمت به عنوان گروه تجربی و در سمت دیگر به عنوان گروه کنترل در نظر گرفته شد. در گروه تجربی پالپ اکسپوز و Ec BMG در آن قرار داده شد؛ سپس دندان پانسمان گردید ولی در گروه کنترل پس از اکسپوز پالپ، دندان پانسمان شد. در گروه دوم خرگوشها مشابه گروه اول نگهداری شدند و در فواصل زمانی ۲۸ و ۶۰ روز کشته شدند و از عاج طبیعی آنها جهت مقایسه عناصر تشکیل‌دهنده کلسیم و فسفر با گروه اول استفاده شد. نمونه‌های به دست آمده در هر دو گروه در روزهای ۲۸ و ۶۰ بعد از ثبوت و آماده‌سازی بافتی با استفاده از میکروسکوپ نوری و SEM مورد مطالعه قرار گرفتند؛ همچنین آنالیز ماتریکس ترش‌حی جدید، جهت ارزیابی تراکم مواد معدنی (کلسیم و فسفر) در همه نمونه‌ها انجام شد. مشاهدات میکروسکوپ نوری نشانگر عاج‌سازی ثانویه و همچنین تشکیل استئودنتین توسط القای Ec BMG در روز ۲۸ بود. بررسیهای SEM در روز ۶۰ در نمونه‌های تجربی توده معدنی شده‌ای را در محل کشت Ec BMG نشان داد؛ در حالی که در نمونه‌های کنترل و نیز در گروه دوم چنین توده‌ای مشاهده نشد و فضای پالپی توسط توده بافتی غیرمینرالیزه اشغال شده بود. آنالیز ماتریکس ترش‌حی جدید در نمونه‌های تجربی حاکی از وجود مقادیر معنی‌داری از کلسیم و فسفر نسبت به نمونه‌های کنترل بود؛ اما میزان کلسیم و فسفر در نمونه‌های تجربی به مقدار این دو عنصر در گروه دوم نزدیک بود. نتایج نشان داد که کشت Ec BMG در داخل پالپ دندان خرگوش سبب القای سلول‌های پالپی، عاج‌سازی ثانویه و تشکیل استئودنتین می‌گردد؛ بنابر این به نظر می‌رسد که استفاده از Ec BMG در ترمیم نقایص مربوط به عاج می‌تواند نقش مؤثری داشته باشد.

کلید واژه‌ها: عاج سازی ثانویه- ژلاتین ماتریکس استخوانی- استئودنتین- خرگوش

مجله دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی تهران (دوره ۱۵، شماره ۳، سال ۱۳۸۱)

## مقدمه

درمانی معمول این‌گونه ضایعات، بافت همبند پالپ تخلیه می‌شود و عروق و اعصاب آن خالی می‌گردند و سپس محل ضایعه توسط مواد مخصوص پر می‌شود. از آنجایی که پالپ دندان، بافتی زنده، فعال و عاملی تعیین‌کننده در درمان نقایص دندانی می‌باشد، حفظ سلامت آن به طور قابل توجهی بر طرح درمان اثر می‌گذارد؛ بنابر این همواره سعی

پیشرفتهای علمی و فنی دهه‌های اخیر به طور گسترده‌ای روشهای ترمیم نقایص دندانی و استخوانی را تحت تأثیر قرار داده است. در بیشتر نقایص دندانی، آسیبهای شدیدی به بافت پالپ دندان و محتویات آن شامل عروق و اعصاب، وارد می‌شود و به همین دلیل در روشهای

(BMP) مطرح بودند، در داخل پالپ دندان سگ کشت دادند و به نتایج مثبتی در زمینه عاج‌سازی دست یافتند (۸). در سال ۱۹۹۵، Rutherford و همکاران نسبت به کشت پروتئین استخوان‌ساز نوع یک (OP/1) در پالپ دندان میمون اقدام و نتایج مثبتی را گزارش کردند (۹).

در سال ۱۹۹۸، Bartold و همکاران در تحقیق خود از هورمون رشد، عامل رشد انسولینی نوع ۱ و BMP‌های نوع ۲ و ۴ استفاده کردند و در بررسی‌های خود به این نتیجه رسیدند که این مواد به عنوان یک واسطه در تشکیل استخوان و عاج عمل می‌کنند (۱۳، ۱۴)؛ اما به نظر می‌رسد تاکنون از Ec BMG که محتوی BMP‌ها می‌باشد، کمتر به منظور القای عاج‌سازی استفاده شده است؛ در حالی که از این ماده به منظور القای استخوان‌سازی استفاده وسیعی صورت گرفته است (۴، ۱۴، ۱۵، ۱۶، ۱۷).

این تحقیق به منظور بررسی توانایی القای عاج‌سازی ثانویه توسط Ec BMG، کشت ژلاتین ماتریکس استخوان‌های داخل غضروفی در داخل پالپ دندان پیشین فک پایین حیوان آزمایشگاهی خرگوش انجام شد و عاج‌سازی ثانویه حاصل از کشت این ماده با استفاده از SEM مورد مطالعه قرار گرفت.

### روش بررسی

این تحقیق در آزمایشگاه آسیب‌شناسی جهاد دانشگاهی دانشگاه علوم پزشکی ایران و طی مراحل زیر انجام شد:

#### الف- تهیه Ec BMG:

Ec BMG مورد استفاده در این پژوهش طبق روش Urist (۱۵) و کارهای قبلی نگارندگان (۱۶، ۱۷) از ۴ رأس خرگوش نر سفید نژاد Deutsche-Poland به ترتیب مراحل زیر تهیه شد:

- استفاده از محلول کلروفورم، متانل به نسبت ۱:۱ به

محققین بر این بوده تا روشی را ابداع نمایند که با حفظ سلامتی پالپ، نقایص دندان‌ی ترمیم گردد؛ به طور کلی فرایند عاج‌سازی در دوران جنینی رخ می‌دهد و این فرایند در دوران پس از تولد به میزان کمی ادامه می‌یابد که البته قادر به ترمیم کامل عاج آسیب‌دیده نخواهد بود (۱، ۲)؛ لذا در مواردی که با نقایص و ضایعات دندان‌ی نظیر از بین رفتن عاج و تخلیه پالپ دندان مواجه هستیم، همواره از مواد مخصوصی به منظور پرکردن محل ضایعه استفاده می‌گردد. در راستای تلاش برای یافتن موادی جهت ترمیم استخوان و عاج، بسیاری از محققین بر روی پدیده‌های القایی تأکید کرده‌اند (۳، ۴، ۵، ۶) و بدین منظور از مواد مختلفی که دارای خاصیت القایی عاج باشند (۱) به منظور پرکردن دندان استفاده و نتایج نویدبخش این بررسی‌ها را ارائه کرده‌اند.

در دهه‌های اخیر به منظور تحریک سلول‌های پالپ دندان و تمایز آنها به سلول‌های ادنتوبلاست و در نهایت ساختن مجدد عاج، از مواد القایی مختلفی استفاده شده که از آن جمله می‌توان به مشتقات کلسیم، ماده زمینه‌ای عاج دمنیرالیزه («DBM» Dentin Bone Matrix) و عوامل تحریک‌کننده رشد اشاره نمود (۷، ۸، ۹، ۱۰، ۱۱، ۱۲).

در این زمینه Tziafas و Kolokuris در سال ۱۹۹۰ اثرات القایی ماتریکس استخوانی دمنیرالیزه («DBM» Demineralized Bone Matrix) را بر روی سلول‌های پالپ دندان سگ مورد بررسی قرار دادند و به این نتیجه رسیدند که این ماده سبب تمایز سلول‌های اکتومزانشیمی پالپ دندان به ادنتوبلاست و نیز ساخته شدن مجدد عاج، پیرامون ماده القایی می‌شود (۷).

در سال ۱۹۹۴، Nakashima و همکاران ابتدا پروتئین‌های موجود در ماتریکس استخوانی و عاج دمنیرالیزه را که دارای ظرفیت القایی بودند، تهیه کردند و سپس این پروتئین‌ها را که با عنوان Bone Morphogenic Protein

حیوانات با استفاده از تزریق داخل عضلانی دیازپام (۲ میلی‌لیتر به ازای هر کیلوگرم وزن بدن) و کتامین (۱ میلی‌لیتر به ازای هر کیلوگرم وزن بدن) بیهوش شدند. به منظور اکسیژن نمودن پالپ دندان، ابتدا اندکی از بافت لثه از روی دندان برداشته شد و خونریزی آن توسط فشار پنبه و گاز استریل کنترل گردید؛ سپس محل عمل، توسط محلول نرمال سالین ضدعفونی شد و توسط هندپیس و فرز الماسی از سطح باکال دندان، پالپ اکسیژن شد. به منظور کاهش گرمای حاصل از چرخش فرز، از نرمال سالین استفاده شد. پس از کنترل خونریزی و استریل نمودن پالپ، در گروه تجربی ذرات Ec BMG به میزان ۲ میلیگرم در داخل پالپ ایمپلنت شد و سپس کانال ایجاد شده توسط مخلوط اوژنول-اکسید روی پوشیده شد. در سمت کنترل، دندانها پس از اکسیژن پالپ، پانسمان شدند. خرگوشها پس از به هوش آمدن به داخل قفسهای بهداشتی منتقل شدند. شرایط آزمایشگاهی تا روز نمونه برداری، به صورت ۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی با دمای ۲۰ درجه سانتیگراد بود و از آب، خوراک (Pellet)، کاه و هویج برای تغذیه خرگوشها استفاده شد.

#### ج- نمونه برداری:

در روزهای ۲۸ و ۶۰ خرگوشها (نیمی از هر گروه) با استفاده از کلروفرم کشته شدند و سپس با برش زدن پوست و کنار زدن بافتهای نرم، استخوانهای فک پایین هر دو طرف توسط قیچی استخوان بر بیرون آورده شد و سپس دندانهای پیشین فک پایین به دقت از داخل حفره آلوئولار خارج گردید. از آنجایی که یکی از دندانها نمونه اصلی و دیگری نمونه کنترل بود، هر یک از نمونهها به طور جداگانه در فیکساتیو فرمالین ۱۰٪ قرار گرفتند و به مدت ۵-۷ روز ثابت شدند. نمونههای مربوط به روز ۲۸، به منظور دکلسیفیکاسیون به مدت ۲۰ روز وارد محلول اسید تری

مدت ۴ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد

- استفاده از محلول اسیدکلریدریک (۰/۶ نرمال) با دو بار تعویض (هر بار ۱۲ ساعت) در دمای ۲ درجه سانتیگراد  
- استفاده از محلول کلرید کلسیم (۲ مولار) با دو بار تعویض (هر بار ۱۲ ساعت) در دمای ۲ درجه سانتیگراد  
- استفاده از محلول Etylen Diamin Tetraacetic Acid (EDTA) نیم مولار به مدت ۴ ساعت در دمای ۲ درجه سانتیگراد  
- استفاده از محلول کلرید لیتیم (۸ مولار) به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲ درجه سانتیگراد  
- استفاده از آب مقطر به مدت ۴ ساعت در دمای ۵۵ درجه سانتیگراد  
تهیه BMG از قطعات استخوانی به دست آمده با استفاده از نیتروژن مایع با ابعاد ۵۰۰-۳۰۰ میکرون لازم به ذکر است که در حد فاصل هر یک از مراحل، قطعات استخوانی با آب مقطر استریل شستشو داده می‌شدند.

#### ب- حجم نمونه و جراحیها:

در این تحقیق، جهت انجام جراحیها ۱۲ رأس خرگوش نر سفید نژاد Deutsche-Poland ۴-۶ ماهه با وزن متوسط ۲-۱/۵ کیلوگرم مورد استفاده قرار گرفت؛ حیوانها به طور تصادفی به دو گروه اول (هشت‌تایی) و دوم (چهارتایی) تقسیم شدند. در گروه اول، دندان پیشین فک پایین سمت راست به عنوان نمونه تجربی و دندان پیشین فک پایین سمت چپ به عنوان نمونه کنترل انتخاب شدند؛ همچنین جهت بررسی محتویات عاج طبیعی از چهار حیوان دیگر (گروه دوم) بدون انجام هیچ‌گونه مداخله‌ای استفاده شد. از حیوانها در شرایط استاندارد یکسان (۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت خاموشی، حرارت ۲۲ درجه سانتیگراد و تغذیه مناسب) نگهداری شد.

عروق خونی و همچنین تشکیلات بافتی مشابه به استئودنتین مشاهده می‌شد؛ به نحوی که سلول‌ها و لاکونا‌های موجود در آن به وضوح قابل مشاهده بودند؛ همچنین عاج‌سازی از محیط به سمت مرکز در حال گسترش بود. ماتریکس ترش‌حی جدید در این روز در حفره پالپ به دو شکل زیر دیده شد (تصویر ۱):

۱) نواحی زیر عاج اولیه توسط نواری از عاج ثانویه اشغال شده بود که هنوز ساختمان عاج اولیه را بروز نمی‌داد؛ نواحی مرکزی حفره پالپ توسط ماتریکسی احاطه شده بود که ساختمان استئودنتین را نشان می‌داد و در آن لاکونا‌های متعددی مشاهده می‌گردید (۱). در این روز در بعضی از نمونه‌ها حتی محل آمپوتاسیون پالپ نیز توسط بافت استئودنتین اشغال شده بود (تصویر ۲).

در نمونه‌های کنترل، در داخل پالپ هیچ‌گونه اثری از تمایز سلول‌های مزانشیمی مشاهده نشد و محل آمپوتاسیون پالپ نیز کاملاً باز بود و هیچ‌گونه اثری از تشکیل بافت ترمیمی در آن مشاهده نگردید (تصویر ۳).

روز ۶۰: مطالعه SEM در این روز در نمونه‌های تجربی، ماتریکس ترش‌حی را در پالپ اکسپوز شده نشان داد که ساختمان غیر یکنواخت و ناهمگنی داشت. این ساختمان در نمونه‌های تجربی محتوی توده‌های کروی شکل بود که به نظر می‌رسید، درون سایر قطعات ماتریکس مینرالیزه شناور باشد؛ همچنین در میان طبقات متعددی، از این تیغه‌های مینرالیزه، لوله‌های باریکی (T) وجود داشتند که به شکل رگه‌هایی تمام ضخامت این تیغه را پیموده بودند و توسط سوراخهایی به سطح باز می‌شدند که این ساختمان ظاهری همچون عاج طبیعی داشت (تصویر ۴).

در نمونه‌های کنترل، ساختمان رشته‌ای (FS) که ظاهر یکنواخت و منظمی داشت، مشاهده گردید که با فواصل زیاد نسبت به یکدیگر واقع شده بودند (تصویر ۵).

کلرواستیک ۵٪ شدند؛ سپس نمونه‌ها آبگیری و در پارافین قالبگیری شدند. از قالب‌های به دست آمده، برش‌های ۶ میکرونی تهیه شد و توسط محلول تری کروم ماسون و نیز همتاکسیلین-اثنین رنگ‌آمیزی شدند.

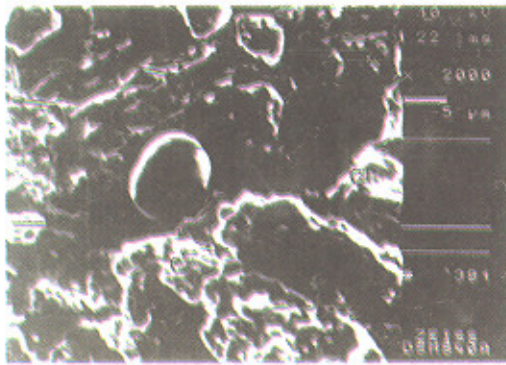
نمونه‌های روز ۶۰ پس از ثابت شدن بدون انجام عمل دکلسیفیکاسیون قالبگیری شدند. در این مرحله هر یک از نمونه‌ها، روی یک گیره فلزی محکم شدند و توسط سمباده شماره ۴۰۰ که روی یک دینام سوار بود، مورد سایش قرار گرفتند؛ به نحوی که یکی از دیواره‌های پالپ با سایش برداشته شد و پالپ دندان به صورت طولی از محل آمپوتاسیون تا فورامن اپیکال اکسپوز گردید.

به منظور پاساژ بافت، نمونه‌های روز ۶۰ به مدت ۴۸ ساعت در Oven ۴۰ درجه سانتیگراد خشک شدند و سپس توسط مخلوطی از چسب مخصوص پودر نقره، روی پیک‌های فلزی مخصوص ثابت گردیدند؛ سپس نمونه‌ها با روکش طلا پوشیده شدند و جهت SEM آماده شدند. برای تهیه میکروگراف‌های SEM و آنالیز شیمیایی، در نمونه‌های روز ۶۰ از دستگاه XL-30 فیلیپس ساخت کشور هلند استفاده شد که با پرتاب الکترون به نمونه و از طریق ویدئو پرینت، عکسبرداری شد؛ همچنین در این نمونه‌ها توسط سیستم EDX، آنالیز شیمیایی بر روی ترکیبات و عناصر تشکیل‌دهنده بافت داخل پالپ دندان در تمام نمونه‌ها انجام شد.

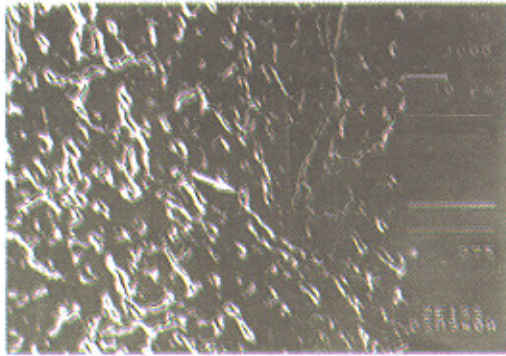
نتایج حاصل از SEM و EDM عاج طبیعی و عاج ثانویه در تمام گروه‌ها با یکدیگر مقایسه شدند.

## یافته‌ها

نتایج به دست آمده از SEM به شرح زیر می‌باشد:  
روز ۲۸: در این روز در گروه تجربی، قطعات BMG در بیشتر نقاط کاملاً جذب شده بود و در محل جذب، مقاطع

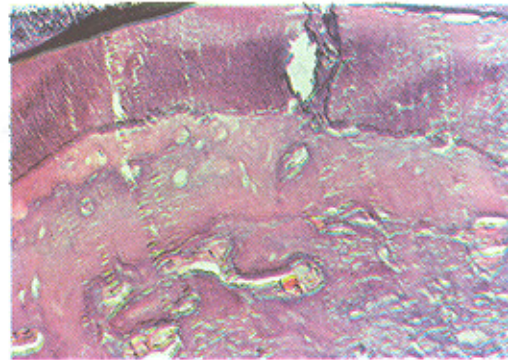


تصویر ۴- تصویر میکروسکوپ الکترونی اسکن از تیغه‌های کریستالی، توپول‌های نامنظم (بیکانه‌های توپر) و همچنین توده‌های کروی شکل حاوی کلسیم و فسفر در نمونه‌های تجربی روز ۶۰؛ بزرگنمایی ۱۰۰۰ برابر

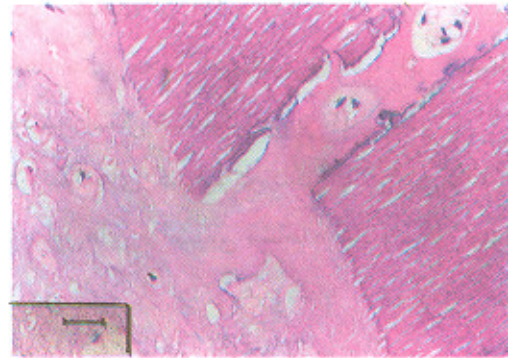


تصویر ۵- تصویر میکروسکوپ الکترونی اسکن از نمونه‌های کنترل در روز ۶۰؛ مینرالیزاسیون اندک رشته‌ای شکل همراه با فضاهای وسیع غیر مینرالیزه در پالپ دندان؛ بزرگنمایی ۵۰۰ برابر

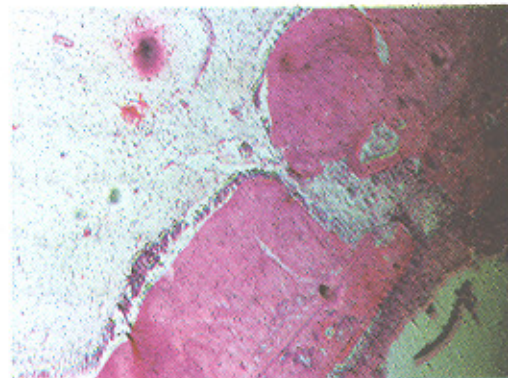
آنالیز شیمیایی که به صورت نقطه‌ای بر روی ماتریکس ترش‌حی جدید درون پالپ نمونه‌های تجربی، پالپ نمونه‌های کنترل و نیز روی دیواره عاجی پالپ طبیعی (گروه دوم) انجام شد، نشان داد که درصد وزنی کلسیم و فسفات (عناصر اصلی سازنده هیدروکسی آپاتیت) در این ماتریکس بسیار نزدیک به درصد وزنی همین عناصر در ساختمان دیواره عاج پالپ طبیعی (گروه دوم) می‌باشد؛ در حالی که درصد وزنی این عناصر در پالپ نمونه‌های کنترل بسیار پایین‌تر بود و تفاوت چشمگیری با عاج طبیعی و نمونه‌های تجربی داشت؛ جزئیات این مسأله بدین شرح



تصویر ۱- تشکیل عاج ثانویه در نواحی حاشیه و استئودنتین در مرکز پالپ در نمونه تجربی در روز ۲۸؛ برخی قطعات جذب نشده BMG نیز در نواحی مرکزی قابل رویت است. رنگ آمیزی: هماتوکسیلین- انوزین؛ بزرگنمایی: ۴۰۰ برابر



تصویر ۲- تشکیل عاج ثانویه (SD) در حاشیه داخلی عاج طبیعی و پر شدن محل نقص (Defect) ایجاد شده با بافت استئودنتین در نمونه‌های تجربی ۲۸ روز بعد از عمل؛ رنگ آمیزی: هماتوکسیلین- انوزین؛ بزرگنمایی ۴۰۰ برابر



تصویر ۳- باز ماندن محل نقص (Defect) و عدم تشکیل بافت عاج ثانویه (SD) و استئودنتین در نمونه‌های کنترل ۲۸ روز بعد از عمل؛ رنگ آمیزی: هماتوکسیلین- انوزین؛ بزرگنمایی ۱۰۰ برابر

است:

(DDM) ضمن تمایز به سلول‌های شبه ادنتوبلاست متحمل یک سری تغییرات سیتولوژیکی می‌شود؛ بدین ترتیب که سلول‌ها بزرگتر و استوانه‌ای‌تر و هسته آنها قاعده‌ای می‌گردد و یک زائده سیتوپلاسمی در رأس سلول‌ها تشکیل می‌شود (۷)؛ نتایج این مطالعه نیز با این که ماده القاکننده، Ec BMG بود، با یافته‌های Moullec مشابهت داشت؛ یعنی هسته یک سری از سلول‌های پالپ استوانه‌ای شده، در قاعده قرار گرفته و به صورت سلول‌های سازنده فعال تمایز یافته بودند.

بر اساس نظریه Schroder در سال ۱۹۸۵، همانگونه که در دوران جنینی، ادنتوبلاست‌های قطبی جوان از سلول‌های پالپ و با تکیه بر یک داربست کلاژنی تمایز می‌یابند، در عاج‌سازی ثانویه نیز سلول‌های پالپی به منظور مهاجرت در زیر سطح عاج به یک داربست کلاژنی نیاز دارند؛ بنابراین به نظر می‌رسد برای استقرار سلول‌های پالپی لازم است این داربست کلاژنی (که می‌تواند از ترشح خود سلول‌های پالپی باشد) فراهم گردد تا با مینرالیزاسیون کلاژن فوق، بافت استئودنتین و یا فیبرو عاج به وجود آید (۱۸). در این مطالعه در روز ۲۸ ماتریکس جدید قسمت اعظم فضای پالپی را پر کرده بود و به تفکیک رشته‌های کلاژن از ماتریکس تازه ترشح یافته با مشکل توأم بود.

در سال ۱۹۸۹ Nakashima گزارش کرد که با گذشت زمان بیشتری از جراحی و کار گذاشتن ماده القایی، مقدار ماتریکس استئودنتین ترشحی کاهش می‌یابد؛ سلول‌های استئودنتین ناپدید می‌شوند و نیز از میزان و اندازه لاکونا‌های موجود در آن کاسته می‌شود؛ وی علت این امر را مینرالیزاسیون ماتریکس استئودنتین ذکر کرده است (۱۸).

در بررسی حاضر نیز در روز ۲۸ مطالعه، ماتریکس استئودنتین جایگزین قطعات Ec BMG شده بود؛ اما در نواحی مجاور عاج پالپ، ماتریکس ترشحی جدید از نوع عاج

۱- در ماتریکس ترشحی جدید در نمونه‌های تجربی، درصد وزنی کلسیم بین ۵۸ تا ۷۰٪ بود که این میزان در عاج طبیعی بین ۶۱ تا ۷۶٪ و در نمونه‌های کنترل بین ۲۵ تا ۳۳٪ می‌باشد؛ این نتایج تفاوت معنی‌داری را بین گروه تجربی و کنترل نشان داد (جدول ۱) ( $P < 0.05$ ).

۲- در صد وزنی فسفات در ماتریکس ترشحی جدید، درون پالپ نمونه‌های تجربی بین ۱۸ تا ۲۴٪، در عاج طبیعی بین ۱۳ تا ۲۵٪ و در نمونه‌های کنترل بین ۱۵ تا ۲۵٪ بود که تفاوت معنی‌داری را بین گروه‌های تجربی و کنترل نشان نداد (جدول ۱).

جدول ۱- مقایسه میانگین درصد وزنی کلسیم و فسفر

تجمع یافته در گروه‌های تجربی، کنترل و نیز

عاج طبیعی در دیواره پالپ

عناصر	گروه تجربی	گروه کنترل	عاج طبیعی
کلسیم	۶۳/۹۹±۵/۱۵	۲۸/۸۰±۳/۶۳	۶۷/۷±۶/۴۱
فسفر	۲۲/۱۹±۱۰/۳۷	۱۷/۷۳±۵/۳۱	۱۹/۲±۵/۰۵

## بحث

نتایج مطالعات قبلی نشان داد که کشت Ec BMG در پالپ دندان حیوان آزمایشگاهی خرگوش، منجر به تحریک سلول‌های پالپی و تمایز آنها به سلول‌های شبه ادنتوبلاست تا روز ۲۱ بعد از عمل می‌گردد (۱۶) و ادامه روند ترمیم با کشت Ec BMG در روزهای ۲۸ و ۶۰ منجر به تشکیل عاج و استئودنتین پالپ می‌شود. مشاهدات انجام شده با استفاده از میکروسکوپ نوری و SEM در این مطالعه نشان داد که کشت Ec BMG حاصل از استخوان‌های بلند (Femur, Tibia) توانایی القای عاج‌سازی هتروئوپیک را در محل کشت دارد.

Moullec در سال ۱۹۷۸ گزارش نمود که سلول‌های اکتومزانشیمی پالپ دندان در نتیجه کشت عاج دمنرالیزه

شده از نمونه‌های تجربی چنین توده‌هایی دیده شدند که برجسته بودن آنها نسبت به سایر قطعات مینرالیزه به وضوح قابل تشخیص بود. این کریستال‌ها ظاهری صاف و یکدست داشتند و فاقد حفره بودند و به صورت توده‌های شناور در میان ماتریکس مینرالیزه در دهانه حفرات وسیع ماتریکس مشاهده شدند. علت صاف بودن سطوح این قطعات شاید مینرالیزاسیون بیشتر آنها باشد که باعث شد تمام حفره‌های موجود در آنها توسط رسوبات معدنی پر گردد.

Alliot-Licht و Nakashima با استفاده از هیدروکسی آپاتیت و BMP جهت ترمیم عاج اقدام نمودند. ایشان با استفاده از میکروگراف‌های SEM تهیه شده از نمونه‌های تجربی در روز ۲۸، ساختمانهای لوله‌ای مشابه عاج ثانویه مشاهده کردند که این لوله‌ها توسط سوراخهای نامنظمی به سطوح ماتریکس باز می‌شدند؛ ایشان همچنین اعلام کردند که تشکیل عاج ثانویه ابتدا در اطراف لوله‌ها رخ می‌دهد (۲۳)؛ در مطالعه حاضر نیز همانند گزارش این محققین، ساختمانهای لوله‌ای مشاهده شدند که ضخامت لایه کریستالی را طی کرده بودند و به سطوح ماتریکس باز می‌شدند؛ این امر می‌تواند نشانه‌های تشکیل عاج ثانویه باشد. دهانه خروجی این لوله‌ها، همان سوراخهای موجود در سطوح ماتریکس مینرالیزه می‌باشد که این امر با بافتهای کریستالی موجود در عاج طبیعی مطابقت می‌نماید و حتی نواحی بین قطعات که از مینرالیزاسیون کمتری برخوردار و تیره‌تر هستند، کاملاً مشابه عاج طبیعی می‌باشند. اصولاً سوراخهای زیاد و نامنظم موجود در سطح کریستال‌ها به همراه لوله‌های موجود در طبقات کریستالی، بیانگر نوع تیبیک عاج ثانویه است و اگر وجود لوله‌ها و سوراخهای سطحی آنها را جزئی از ساختمان عاج لوله‌ای بدانیم، در نمونه‌های کنترلی به دلیل نبودن چنین ساختمانهایی، عاج

بود که اکثراً به صورت نواری، پالپ و استئودنتین ساخته شده در پالپ را محاصره کرده بود. مشاهدات این مطالعه بر خلاف گزارشهای Nakashima بود که از همان ابتدا بر تشکیل استئودنتین تأکید می‌نمود؛ البته وی نیز معتقد بود که با گذشت زمان، تراکم بافت استئودنتین کاهش و میزان عاج افزایش می‌یابد و ماههای سوم تا ششم با مینرالیزاسیون کامل، تمام پالپ توسط عاج لوله‌ای پر می‌گردد (۲۰،۱۹).

مطالعه میکروگراف‌های SEM تهیه شده از ماتریکس ترشحاتی مینرالیزه در نمونه‌های تجربی در روز ۲۸ پس از جراحی توسط Tziafas و Kolokuris در سال ۱۹۹۲ نشان می‌دهد که این ماتریکس مینرالیزه یک ساختمان هموزن است که تعداد اندکی سوراخهای نامنظم در سطح کریستال‌های خود دارد (۲۱)؛ در این مطالعه نیز میکروگراف‌های SEM تهیه شده از ماتریکس مینرالیزه از نمونه‌های تجربی روز ۶۰ پس از جراحی، حاکی از وجود توده‌ای غیر یکنواخت بود که سوراخهای موجود در سطح کریستال‌های آن از نظر تعداد، زیاد و از نظر شکل، نامنظم بودند؛ علت تفاوت در این امر شاید طولانی بودن زمان مطالعه در این تحقیق (۶۰ روز پس از جراحی) نسبت به گزارش قبل باشد که سبب می‌گردد که در مدت ۲ ماه پس از جراحی، مینرالیزاسیون بیشتری در ساختمان ماتریکس ترشحاتی جدید پدید آید و همچنین قطعات کریستالی برجسته‌تر گردند.

بر اساس گزارش Alliot-Licht و همکاران در سال ۱۹۹۴، کریستال‌های هیدروکسی آپاتیت در ماتریکس مینرالیزه همواره به صورت توده‌هایی جدا از سایر قطعات مینرالیزه دیده می‌شوند که ظاهر کروی یا حباب مانند دارند و سطوح آنها می‌تواند حفره‌دار یا صاف باشد (۱۰)؛ در مطالعه حاضر نیز در بسیاری از میکروگراف‌های SEM تهیه



در اطراف قطعات Ec BMG در مطالعه حاضر نشانگر وجود مقادیر فراوانی از دو عنصر کلسیم و فسفات در حفره اکسپوز شده پالپ، در نمونه‌های تجربی بود. لازم به یادآوری است که درصد وزنی این عناصر در نمونه‌های تجربی بسیار نزدیک به عاج طبیعی بود و تفاوت بارزی با نمونه‌های کنترلی داشت که این امر نشانگر موفقیت طرح بود.

### نتیجه‌گیری

نتایج این پژوهش نشان داد که Ec BMG می‌تواند سبب تمایز سلول‌های اکتومزانشیمی پالپ دندان به سلول‌های شبه ادنتوبلاست و در نهایت تولید عاج ثانویه و استئودنتین در محل کشت گردد؛ همچنین هر چه زمان بیشتری از عمل جراحی بگذرد، فضای بیشتری از پالپ توسط بافت منیرالیزه پر می‌گردد؛ بنابر این به نظر می‌رسد که Ec BMG می‌تواند کاربرد کلینیکی داشته باشد و می‌توان از آن برای پرکردن نقایص دندان، استفاده کرد. شاید با مطالعه بیشتر بتوان این ماده را جایگزین مواد مصنوعی کرد که امروزه جهت پرکردن دندان به کار می‌روند.

لوله‌ای تشکیل نمی‌شود و منیرالیزاسیون در داخل پالپ این نمونه‌ها تنها به صورت رگه‌ها و نوارهای باریکی رخ می‌دهد که منشورهای آن برجستگی چندانی ندارند و فضاهای بسیاری در بین این ساختمانها رسته‌ای مشاهده می‌گردند. Nakashima در سال ۱۹۹۴ با تجزیه و تحلیل کمی، میزان عاج تشکیل شده در اطراف ماده القایی و مقایسه آن با نمونه‌های کنترل در روز ۶۰، اعلام نمود که میزان عاج تشکیل شده در نمونه‌های تجربی ۸۰ تا ۸۲٪ و در نمونه‌های کنترل ۴۲٪ می‌باشد (۲۲).

آنالیز مواد معدنی در کلسیفیکاسیون القا شده توسط Ec BMG در بافت عضلانی که با پرتوتابی اشعه ایکس و الکترون پروپ توسط Yamashita در سال ۱۹۹۲ انجام گرفت، نشان داد که رسوبات کلسیفیه کروی در اطراف قطعات BMG حاوی کریستال‌های سوزنی است و میکروآنالیز آنها نشان داد که حداکثر مقدار کلسیم، فسفات، سیلیکون، سولفور و پتاسیم در این رسوبات وجود دارد؛ همچنین ساختمانهای حاوی کلسیم و فسفات دارای باندهای بزرگی از هیدروکسی آپاتیت و فسفات هیدروژن کلسیم بوده‌اند (۲۴، ۲۳)؛ آنالیز شیمیایی ماتریکس ترشحي

### منابع:

- 1- Orban B. Development and growth of teeth oral histology and embryology. 10<sup>th</sup> ed. St. Louis: CV Mosby; 1985: 24.
- 2- Torneck CD, Ten Cate AR. Biology of the dentin-pulp complex. In: Roth GI, Calmes R. (eds): Oral Biology. St. Louis: CV Mosby; 1981: 119-46.
- 3- Glowacki J, Kaban LB, Murray JE, Folkman J, Mulliken JB. Application of the biological principle of induced osteogenesis for craniofacial defects. Lancet. 1981 May 2;1(8227):959-62.
- 4- Saylor KE, Cendiler E. Demineralized perforated bone implants in craniofacial surgery. J Craniofac Surg 1992; 3 (2): 22-62.
- 5- Habel MB. Reconstruction of large congenital cranioorbital defects with a species-specific demineralized bone implant. J Craniofac Surg 1993; 3 (2): 113-18.
- 6- Croenveld EH, Van Den Bergh JP. Mineralization processes demineralized bone matrix grafts in human maxillary sinus floor elevation. J Biomed Mater Res 1999; 48: 393-402.
- 7- Tziafas D, Kolokuris I. Inductive influences of demineralized dentin and bone matrix on pulp cells. An approach of secondary dentinogenesis. J Dent Res 1990; 60: 75-81.
- 8- Nakashima M. Induction of dentin formation on canine amputated pulp by recombinant human bone morphogenetic

- protein (BMP) -2 and -4. *J Dent Res* 1994; 73 (9): 1515-22.
- 9- Rutherford RB, Spanberg L, Tucker M. Transdental stimulation of reparative dentin formation by osteogenic protein-1 in monkeys. *Arch Oral Biol* 1995; 40 (7): 681-83.
- 10- Alliot-Licht B, Jean A, Gregoire M. Comparative effects of calcium hydroxide and hydroxyapatite on the cellular activity of human pulp fibroblasts in vitro. *Arch Oral Biol* 1994; 39 (6): 481-89.
- 11- Horsted P, Sondergad B, Thylstrup A. A retrospective study of direct pulp capping with calcium hydroxide compounds. *Endodon Dent Traumatol* 1985; 1: 29-34.
- 12- Li H, Bartold BM. Growth hormone and insulin-like growth factor 1 induced bone morphogenetic 2 and 4: A mediator role in bone and tooth formation. *Endocrinology* 1998; 139 (9): 3855-61.
- 13- Schroder U. Effect of calcium hydroxide containing pulp capping agents on pulp cells migration, proliferation and differentiation. *J Dent Res* 1985; 64: 541-48.
- 14- Sobhani A, Shoa Kazemi A, Niknafs B, Kazemi S. Effects of bone matrix gelatin (BMG) on pulp cells for evaluation of secondary dentinogenesis. *Kossar* (In press) 2002.
- 15- Urist MB, Iwata H. Morphogenesis in implants of insoluble bone gelatin. *Proc Nat Acad Sci* 1973; 70 (12): 3511-15.
- ۱۶- سبحانی، علیقلی؛ یاماشیتا، کیکوجی؛ حسینی، احمد؛ رضازاده، مجتبی. اثر دیابت آزمایشی در کالسیفیکاسیون بدون سلولی در استخوان سازی جدید با استفاده از ژلاتین ماتریکس استخوان. *مجله پزشکی کوثر*. سال ۱۳۷۷. شماره ۳. صفحات ۱۸۹-۱۸۳.
- ۱۷- سبحانی، علیقلی؛ راجی، احمدرضا؛ رادمهر، بیژن. ارزیابی بافت شناسی استفاده از ژلاتین ماتریکس استخوان در ترمیم نقص استخوان در خرگوش. *مجله باخته*. سال ۱۳۷۹. شماره ۶۰. صفحات ۹۶-۹۱.
- 18- Nakashima. Dentin induction by implant of outolyzed antigen- extracted allogenic (AAA) dentin on amutated puipts of dogs. *Endod Dent Traumatol* 1989; 5: 279-86.
- 19- Nakashima M. An ultrastructural study of the differentiation of mesenchymal cell implant of allogenic matrix on the amputated dental pulp of the dog. *Arch Oral Biol* 1990; 35: 227-81.
- 20- Nakashima M. The induction of reparative dentin in the amputated dental pulp of the dog by bone morphogenetic protein. *Arch Oral Biol* 1990; 35: 493-97.
- 21- Tziafas D, Kolokuris I. Short-term dentinogenic reponse of dog dental pulp tissue after induction demineralized or native dentin or predentine. *Arch Oral Biol* 1992; 37: 119-28.
- 22- Nakashima M. Regulatory role of transforming growth factor- B, bone morphogenetic protein- 2, and protein- 4 on gene expression of extracellular matrix proteins and differentiation of dental pulp cells. *Cell Biol* 1994; 162: 18-28.
- 23- Yamashita K. Ultrastructural observation of calcification preceding bone formation induced by demineralized bone matrix gelatin. *Anat* 1992; 143: 261-67.
- 24- Yamashhita K. Calcification preceding new bone formation induced by demineralized bone matrix gelatin. *Arch Histo. Cytol* 1992; 55: 37-43.