بررسی هیستولوژیک و هیستومورفومتریک تأثیر لاکتوفرین و Porous bovine bone mineral (Bio-Oss) بر ترمیم حفرات ایجاد شده در کالواریوم خرگوش

دکتر مژگان پاکنژاد+[۱]- دکتر امیر رضا رکن[۱]- دکتر علی اکبر صبور یراقی[۲]- فلورا الهامی[۳]

۱- عضو مرکز تحقیقات دندانپزشکی و دانشیار گروه آموزشی پریودنتیکس، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی تهران

۲- استادیار گروه آموزشی تغذیه و بیوشیمی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی تهران

۳- دانشجوی دندانپزشکی، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی تهران

Histologic and histomorphometric study on the effects of lactoferrin and porous bovine bone mineral (Bio-Oss) on the regeneration of bone defects made on rabbit calvarium

Paknejad M[1], Rokn A[1], Sabur A[2], Elhami F[3]

1- Associate Professor, Dental Research Center/Department of Periodontics, School of Dentistry, Tehran University of Medical Sciences

2- Assistant Professor, Department of Nutrition and Biochemistry, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences

3- Dental Student, School of Dentistry, Tehran University of Medical Sciences

Background and Aims: Nowadays reconstruction of alveolar defects has become one of dentists' problems especially in areas which are going to get dental implants. Inorganic bovine bone mineral (Bio-Oss) is one of the most popular graft materials that acts as a structure for migration of osteoblasts. If migration, proliferation, and differentiation of osteoblasts can be promoted by a material, it would be possible to reconstruct more amount of bone in a shorter period of time. Milk contains vital proteins that regulate bone growth. One of these important proteins is lactoferrin. The aim of this study was to examine the effect of added bovine lactoferrin to Bio-Oss on osteogenesis.

Materials and Methods: Two doses of 50 and 500 µg/ml of lactoferrin were prepared. Ten New Zealand white rabbits were selected for this study. Four 6-mm symmetrical detects were created in each rabbit's calvarium. Two of these sites were filled with Bio-Oss that was wetted with two doses of lactoferrin. Third detect was filled with Bio-Oss alone and the forth one was left empty as control group. After 4 weeks histologic and histomorphometric analysis was performed. Data were analyzed by Cochrane Q and Friedman test.

Results: There was no sign of obvious inflammation in any of four groups. Also there was no difference among four groups in terms of vitality, type of new bone, and foreign body reaction. However, amount of bone formation in control group was significantly lower compared with the other 3 groups ($P<0.05$). Although lactoferrin containing groups showed little increase in bone formation especially in higher concentration, there was not statistically significant difference among the three test groups ($P=0.1$). Amount of remaining biomaterial also was lower in lactoferrin containing groups compared with the Bio-Oss group but the differences were not significant ($P=0.392$).

Conclusion: Although there was no significant difference among the test groups, it seems that the added lactoferrin increases bone formation. Furthermore, because of possible washout of the lactoferrin from the defects, it would be helpful to find and evaluate a proper carrier agent for lactoferrin to see its real effects.

Key Words: Bone regeneration; Lactoferrin; Osteogenesis

Journal of Dental Medicine-Tehran University of Medical Sciences 2010:23(3);167-147

+ مؤلف مسؤول: نشانی: تهران- انتهای کارگر شمالی بعد از انرژی اتمی- دانشکده دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران- گروه آموزشی پریودنتیکس

تلفن: ۰۹۱۲۲۱۹۱۷۹۵ نشانی الکترونیک: mpaknejad@tums.ac.ir

[Downloaded from jdm.tums.ac.ir on 2024-11-25]

چکیده

زمینه و هدف: ترمیم ضایعات استخوانی به ویژه در نواحی که قرار است تحت درمان ایمپلنت قرار گیرند یکی از مشکلات دندانپزشکان امروز است. Bovine bone mineral (Bio-Oss) یکی از موفق‌ترین مواد پیوندی است که به عنوان داربستی برای مهاجرت استئوبلاست‌ها عمل می‌کند. در صورتی که بتوان با استفاده از ماده‌ای مهاجرت، تکثیر و تمایز استئوبلاست‌ها را تسریع کرد، امکان بازسازی حجم بیشتری از استخوان ممکن خواهد شد. شیر حاوی پروتیین‌هایی است که رشد استخوان را تنظیم می‌کند و یکی از مهمترین این پروتیین‌ها لاکتوفرین است. هدف از اجرای این مطالعه بررسی تأثیر اضافه کردن لاکتوفرین گاوی به Bio-Oss بر استخوان‌سازی در کالواریوم خرگوش بود.

روش بررسی: لاکتوفرین در دو غلظت ۵۰۰ و ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر آماده شد. ۱۰ عدد خرگوش سفید نیوزلندی برای مطالعه در نظر گرفته شدند. ۴ حفره مشابه به قطر ۶ میلی‌متر در استخوان کالواریوم نمونه‌ها ایجاد شد و سپس در دو عدد ازحفره‌ها Bio-Oss با ۷۰ میکرولیتر لاکتوفرین با دو غلظت ذکر شده پر شد، در حفره سوم Bio-Oss به تنهایی قرار داده شد و حفره چهارم به عنوان کنترل خالی گذاشته شد. این حفرات پس از ۴ هفته مورد بررسی هیستولوژیک و هیستومورفومتری قرار گرفتند. داده‌ها توسط آزمون Cochrane Q و Friedman آنالیز شدند.

یافته‌ها: در مطالعه حاضر التهاب مشهودی در گروه‌های مورد مطالعه مشاهده نشد. همچنین در واکنش جسم خارجی، نوع و وایتالیتی استخوان نیز تفاوتی بین گروه‌ها وجود نداشت. اما در مورد میزان استخوان ساخته شده گروه کنترل از سایر گروه‌ها به طور معنی‌داری کمتر بود (P<۰/۰۵). در بین سه گروه دیگر گروه‌های حاوی لاکتوفرین استخوان‌سازی بهتری داشتند هرچند این تفاوت از لحاظ آماری معنی‌دار نبود (P=۰/۱). با این حال به نظر می‌رسد اضافه کردن لاکتوفرین به Bio-Oss باعث افزایش مختصری در استخوان‌سازی شده که این اثر در غلظت بالاتر بیشتر بوده است. در مورد میزان متریال باقی مانده نیز بین ۳ گروه اختلاف معنی‌داری وجود نداشت (P=۰/۳۹۲)، هر چند در گروه‌های حاوی لاکتوفرین این میزان کمتر از گروه Bio-Oss تنها بود.

نتیجه‌گیری: هرچند تفاوت معنی‌داری بین گروه‌ها دیده نشد ولی این طور به نظر می‌رسد که اضافه کردن لاکتوفرین باعث افزایش مختصری در استخوان‌سازی شده است. همچنین به دلیل احتمال شکسته شدن لاکتوفرین از حفره، یافتن ماده‌ای حامل برای لاکتوفرین می‌تواند در شناسایی اثرات این ماده کمک کننده باشد.

کلید واژه‌ها: بازسازی استخوان؛ لاکتوفرین؛ استخوان سازی

وصول: ۸۹/۰۲/۱۵ اصلاح نهایی: ۸۹/۰۸/۱۹ تأیید چاپ: ۸۹/۰۹/۰۱

مقدمه

عدم حضور استخوان کافی در نواحی که قرار است تحت درمان ایمپلنت‌های دندانی قرار گیرند در بسیاری از مواقع دندانپزشکان را با مشکل مواجه می‌کند، به طوری که این مسئله می‌تواند در بقای ایمپلنت‌ها نیز تأثیر منفی داشته باشد. سالهاست که جهت باز سازی استخوان از دست رفته در اثر ضایعات پریودنتال، تروماها و ضایعات پاتولوژیک همچنین برای Alveolar augmentation و Sinus lifting (بالا بردن کف سینوس) جهت بهبود شرایط برای قرار گرفتن ایمپلنت‌های دندانی از مواد پیوندی استخوان استفاده می‌شود. Bovine bone mineral با نام تجاری Bio-Oss (Geistlich Pharma AG CH-6110 Wolhusen, Switzerland) که یکی از موفق‌ترین مواد پیوندی به شمار می‌آید، به سهولت در دسترس بوده و کاربرد زیادی دارد. این ترکیب Non vital به عنوان داربستی برای رشد سلول‌های پیش ساز استئوبلاستی به داخل ضایعه عمل می‌کند (۱).

در صورتی که بتوان با عوامل القا کننده رشدی، مهاجرت، تکثیر و تمایز استئوبلاست‌ها را تسریع کرد، رشد استخوان نیز تسهیل شده و امکان بازسازی حجم بیشتری از استخوان در زمانی کوتاه‌تر فراهم خواهد شد که می‌تواند منجر به کوتاه‌تر شدن دوره درمان شود. تا کنون از عوامل رشدی متعددی نظیر Bone morphogenic proteins به عنوان مواد Osteoinductive استفاده شده است. اما با توجه به هزینه بالا جهت استخراج این مواد و قابل پیش‌بینی نبودن اثرات آنها، این مواد به طور رایج در کلینیک به کار برده نمی‌شوند. از طرفی شیر، ماده‌ای است غنی که حاوی ترکیبات تنظیم کننده رشد بسیاری است و در رشد اسکلتال نقش مهمی دارد. یکی از ترکیبات مهم موجود در شیر، لاکتوفرین است. لاکتوفرین گلیکوپروتئینی Iron-bond است که در شیر انسان و سایر پستانداران غلظت بالایی دارد. همچنین در اشک، بزاق، مایع سینوویال و سایر مایعات بدن نیز موجود است (۲). در پلاسمای خون در شرایط التهاب با غلظت بالا دیده می‌شود که گفته شده از نوتروفیل‌ها ترشح می‌گردد (۳). حضور لاکتوفرین در مایعات

[Downloaded from jdm.tums.ac.ir on 2024-11-25]

مختلف بدن می‌تواند نشانگر نقش آهن در ایمنی غیر اختصاصی باشد (۴). همچنین نشان داده شده که لاکتوفرین اثرات آنتی میکروبیال نیز دارد و می‌تواند باعث تخریب باکتری‌های متعددی شود (۷-۵). یکی از مکانیسم‌های آنتی باکتریال آن به جذب آهن از محیط بر می‌گردد (۸). لاکتوفرین در پروسه التهاب هم نقش مهمی دارد. همچنین می‌تواند با مهار مهاجرت سلول‌های لانگرهانس، میزان واکنش التهابی را کاهش دهد و لذا در تنظیم سیستم ایمنی هم نقش دارد (۹،۱۰).

لاکتوفرین در استخوان سازی مؤثر است، هر چند مکانیسم اثر آن دقیقاً معلوم نشده، ولی مطالعات نشان داده که لاکتوفرین باعث افزایش تکثیر و تمایز استئوبلاست‌ها و مهار رشد استئوکلاست‌ها می‌شود (۱۱). اینطور به نظر می‌رسد که لاکتوفرین می‌تواند همانند عوامل رشدی دیگر دراستخوان سازی مؤثر باشد و کیفیت و کمیت ترمیم استخوان را بهبود بخشد. از جنبه کاربردی نیز جداسازی لاکتوفرین از پروتئین شیر در مقایسه با سایر عوامل رشدی بسیار ساده‌تر و ارزان‌تر بوده و به دلیل تولید کارخانه‌ای گسترده به آسانی در دسترس است.

مطالعات in vitro انجام شده نشان داده که تکثیر سلول‌های استئوبلاست در مجاورت لاکتوفرین افزایش می‌یابد، به طوری که در غلظت ۱۰ µg/ml لاکتوفرین، تقسیم هسته دو برابر شده و در غلظت ۱۰۰۰ µg/ml به پنج برابر می‌رسد (۱۲). این استخوان سازی ارتباطی به آهن‌دار بودن یا نبودن لاکتوفرین ندارد (۱۳). همچنین مطالعه بر روی تمایز و فعالیت استئوبلاست‌ها نشان داد در غلظت ۱۰۰ µg/ml و بالاتر لاکتوفرین، سطح مینرالیزاسیون افزایش داشته است و در تعداد ثابت استئوبلاست‌ها نیز تأثیر لاکتوفرین بر ساخت ماتریکس خارج سلولی افزایش می‌یابد (۱۲،۱۴).

به علاوه نشان داده شده لاکتوفرین باعث افزایش طول عمر استئوبلاست‌ها نیز می‌شود و آپوپتوز استئوبلاست‌ها در حضور لاکتوفرین کاهش می‌یابد به طوری که در حضور غلظت ۵۰ µg/ml لاکتوفرین، این میزان به کمتر از ۵۰٪ می‌رسد و وابسته به دوز کاهش می‌یابد (۱۲،۱۵).

همچنین دیده شده لاکتوفرین گاوی در in vitro فعالیت استئوکلاست‌ها را کاهش می‌دهد (۱۶). تشکیل استئوکلاست‌های جدید نیز به طور معنی‌داری کاهش می‌یابد به طوری که در غلظت ۱۰۰ µg/ml لاکتوفرین، تشکیل استئوکلاست‌ها متوقف می‌شود. ولی لاکتوفرین تأثیری بر استئوکلاست‌های بالغ ندارد (۱۲). در مطالعات in vivo دیده شد که تزریق روزانه لاکتوفرین در Hemicalvaria موش‌های نر باعث افزایش ضخامت استخوان در سمت مورد نظر می‌شود. به ویژه در غلظت ۴ mg/ml این ضخامت ۴ برابر گروه کنترل بوده است (۱۲).

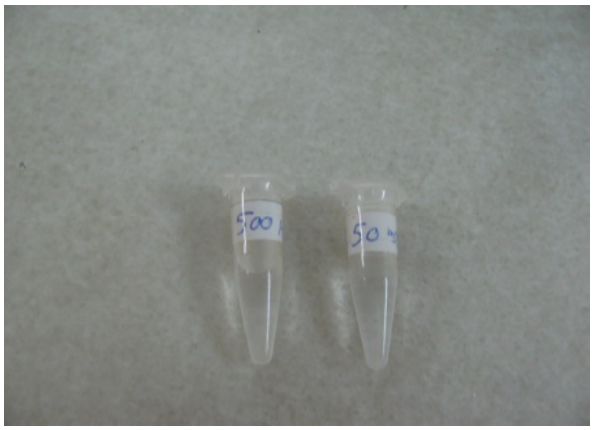
لاکتوفرین به صورت خوراکی نیز بر میزان دانسیتی استخوان اثر دارد به طوری که در Ratهای Ovariectomized شده که به مدت ۲۷ هفته رژیم لاکتوفرین با غلظت‌های مختلف گرفتند، دانسیتی استخوان افزایش وابسته به دوز داشته است (۱۷).

از نظر امنیت خوراکی و حساسیت‌زایی نیز ترکیبات و پروتئین‌های مهم شیر (شامل لاکتوفرین) مورد مطالعه قرار گرفته‌اند و هیچ اثر سوئی دیده نشده است، همچنین این ترکیبات ریسک آلرژی پایینی دارند (۱۸،۱۹).

هدف از انجام این مطالعه تعیین تأثیر ترکیب لاکتوفرین و Bio-Oss بر استخوان سازی در کالواریوم خرگوش بود که با بررسی هیستولوژیک و هیستومورفومتریک صورت گرفت.

روش بررسی

لاکتوفرین مورد نظر از کارخانه Sigma خریداری شده و قبل از جراحی لاکتوفرین مورد نیاز در در بخش تغذیه و بیوشیمی دانشکده بهداشت به صورت محلول در سرم در آمده وغلظت‌های مورد نظر (۵۰ µg/ml و۵۰۰) در حجم مورد نیاز آماده شدند (لاکتوفرین بدون آهن) (شکل۱).



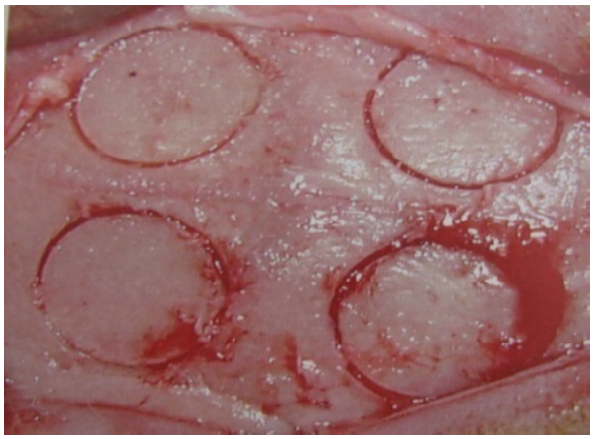
شکل ۱- ترکیبات آماده شده برای روز جراحی

[Downloaded from jdm.tums.ac.ir on 2024-11-25]

۱۰ خرگوش با وزن متوسط ۲/۵ کیلوگرم از نـژاد سـفید نیوزلنـدی تهیه شده از یک ماه قبـل از جراحـی در شـرایط مشـابه و اسـتاندارد و تحت رژیم غذایی یکسان قرار گرفتند.

جراحی

خرگوش‌هـا بـه وسـیله مخلـوطی از Xylasine ۲٪ و Ketamin ۱۰٪ بیهوش شدند. ناحیه کالواریوم با بتادین اسکراب شده، موهای ناحیه بـا تیغ ریش تراش بـه دقـت تراشـیده شـد. یـک بـرش قـدامی- خلفـی (کرانیوکوئدال) به طول ۱۰ سـانتیمتر ایجـاد و پوسـت و پریوسـت بـه وسیله یک الواتور پریوست کنار زده شـد. بـا فـرز Trephine بـه قطـر ۶ میلی‌متـر، ۴ سـوراخ یـک شـکل و یـک انـدازه در ناحیـه عمـل در کالواریوم ایجاد گردید (دو حفـره در اسـتخوان فرونتـال و دو حفـره در استخوان پریتال) (شکل۲).



شکل ۲- ایجاد نقص های هم اندازه

سـوراخ‌هـا بـه آرامـی همـراه بـا External irrigation بـا سـرم فیزیولوژیک ایجاد شـدند. بـرای اسـتاندارد کـردن محـل سـوراخ‌هـا از لندمارک‌های آناتومیک استفاده شد که عبارتند از: زایـده پـس سـری و سوچور کرانیوکائودال. برای پر کردن حفره‌هـا در حفـره اول Bio-Oss (۰/۲۵-۱mm) بـا ۷۰ میکرولیتـر لاکتـوفرین بـا غلظـت ۵۰۰ µg/ml مخلوط شده، قرار داده شد (حجم مورد نظر با اسـتفاده از Sampler بـا سر استریل برداشته شده و با Bio-Oss مخلوط شـد) (شـکل۳). حفـره دوم توسـط Bio-Oss کـه بـا ۷۰ میکرولیتـر لاکتـوفرین بـا غلظـت ۵۰ µg/ml مخلوط شده بـود پـر شـد و در حفـره سـوم Bio-Oss بـه تنهایی قرار داده شد و حفره چهارم به عنوان کنترل خالی گذاشـته شـد (شکل۴). ترتیب پر کردن هر یک از چهار حفره بدین صورت بود که در نمونه اول محل ترکیبات مورد استفاده به طور تصادفی تعیین شـد و در نمونه‌های بعدی موقعیت آنها به صورت چرخش ساعتگرد تغییـر کـرد. برای اجتناب از هرگونه اشتباه برای هر نمونه یک جدول تهیـه گردیـد که در آن اطلاعات مربوط به هر نمونه آورده شد. پس ازقرار دادن مواد در حفرات مورد نظر، پریوست با بخیه Vicryl ۴/۰ و پوست کـالواریوم با نخ بخیه نایلون۳/۰ سوچور شد.

شکل ۳- برداشتن ۷۰ میکرولیتر لاکتوفرین با Sampler

شکل ٤- پر شدن نقص ها توسط مواد مورد نظر

مراحل هیستولوژی

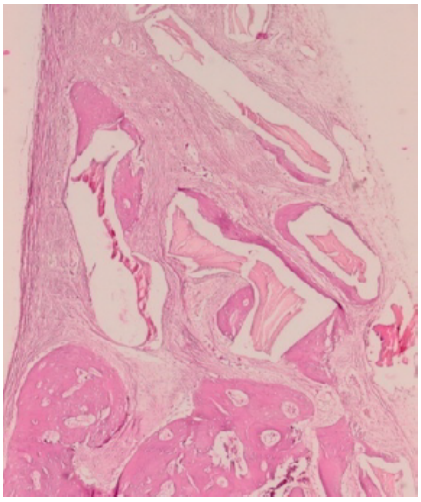
پس از دوره ترمیم ۱ ماهه تمام نمونـه‌هـا بـا تزریـق ۲ میلـی‌لیتـر محلول تیوپنتال بدون درد Sacrifice شدند. بخش پیشانی جمجمـه از بقیه قسمت‌ها جدا شد. نمونه‌ها به صورت جداگانـه در داخـل فرمـالین ۱۰٪ به مدت ۲ هفته نگهداری شدند تا ثبات کامل صورت گیرد.

سپس نمونه‌ها توسط محلول اسید نیتریک دکلسیفیه شدند (جهـت

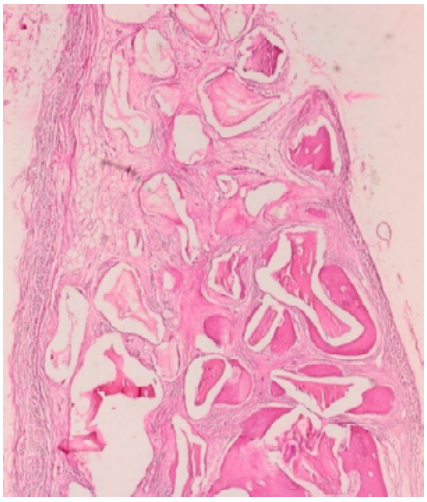
[Downloaded from jdm.tums.ac.ir on 2024-11-25]

تسهیل برش با میکروتوم).

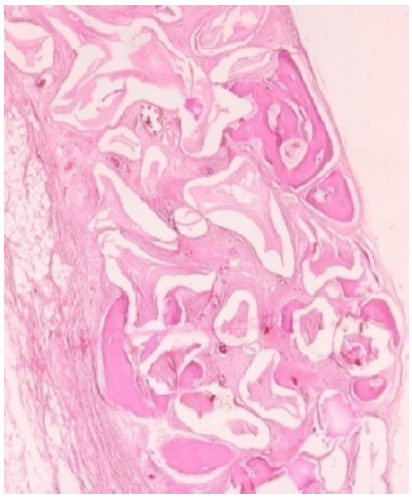
هر نقص به حاشیه ۱ میلی‌متر پاس داده شد و سپس با برشی عمودی به صورت قدامی خلفی به دو نیمه تقسیم شد. لبه برش خورده که معرف قسمت میانی نقص می‌باشد توسط Indian ink علامت‌گذاری شده، پس از دهیدراته شدن توسط اتانول ۷۰ تا ۹۹٪ از سمت علامت‌گذاری شده داخل بلوک‌های پارافین قرار داده شد (Embedding). از هر بلوک پارافین ۱۰ برش (Step section) توسط رنگ هماتوکسیلین ائوزین (H&E) رنگ‌آمیزی (Staining) صورت گرفت و نمونه‌ها توسط پاتولوژیست با میکروسکوپ نوری Olympus-BX51 مورد ارزیابی قرار گرفتند (شکل‌های ۸-۵).



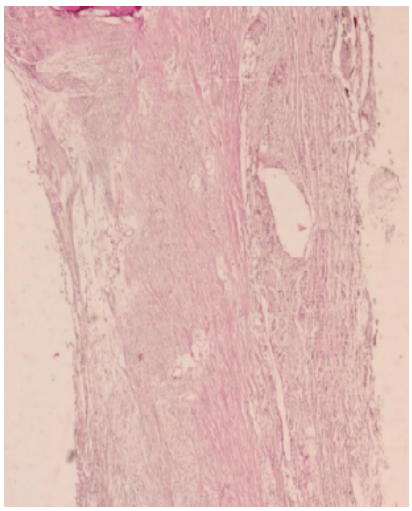
شکل ۵- استخوان‌سازی درگروه Bio-Oss، لاکتوفرین ۵۰ µg/ml (بزرگنمایی ۲۰X)



شکل ٦- استخوان‌سازی گروه در Bio-Oss و لاکتوفرین ۵۰۰ µg/ml (بزرگنمایی۲۰X)



شکل ۷- استخوان سازی درگروه Bio-Oss (بزرگنمایی ۲۰X)



شکل ۸- استخوان سازی درگروه کنترل (بزرگنمایی ۲۰X)

در هیستولوژی، وایتالیتی استخوان، میزان و وجود یا عدم وجود واکنش جسم خارجی بررسی شد. وایتالیتی استخوان بر اساس وجود سلول‌های استئوسیت زنده داخل لاکوناهای ترابکولار استخوانی تعیین می‌شود و متغیر کیفی اسمی می‌باشد (+ Vital، – Nonvital). برای بررسی هیستومورفومتری میزان استخوان ساخته شده و بیومتریال باقیمانده نیز تصاویر حاصل از تمام مقاطع آماده شده از هر نقص با فرمت JPEG به محیط نرم افزاری فتوشاپ (Photoshop cs4) وارد شدند. با دستور Histogram تعداد Pixel این مناطق محاسبه و ثبت شد.

آنالیز آماری

در نهایت داده‌ها وارد محیط نرم‌افزاری SPSS شدند و متغیرهای

[Downloaded from jdm.tums.ac.ir on 2024-11-25]

کیفی توسط آزمون Cochrane Q و متغیرهای کمی با آزمون Friedman آنالیز شدند.

یافته‌ها

تنها در یکی از نمونه‌های Bio-Oss و لاکتوفرین با غلظت ۵۰۰ µg/ml، التهاب خفیف و در یکی از نقص‌های Bio-Oss به تنهایی، التهاب متوسط مشاهده شد. بقیه نواحی بدون واکنش التهابی ارزیابی شدند. جدول ۱ به صورت توصیفی فراوانی میزان التهاب را در هر یک از گروه‌های مورد بررسی نشان می‌دهد.

تنها واکنش جسم خارجی مشاهده شده واکنش به نخ بخیه ویکریل بود که خارج از محدوده نقص بوده و به علت عدم ارتباط با استخوان‌سازی حفره و کار ما مطرح نمی‌شود.

همچنین تمامی گروه‌ها استخوان ساخته شده در Woven و لاملار مشاهده شد. در کل این استخوان ترکیبی از نوع Woven و لاملار ۳۸/۹٪ و یا لاملار به تنهایی ۶۱/۱٪ بود. میزان استخوان ساخته شده و متریال باقی مانده نیز با هیستومورفومتری محاسبه شد که این مقادیر در جداول ۲ و ۳ قابل رویت است.

میزان التهاب، واکنش جسم خارجی و نوع و وایتالیتی استخوان بین گروه‌های مختلف هیچ اختلاف معنی‌داری نداشت (P>۰/۰۵).

میزان استخوان ساخته شده نیز تنها در گروه کنترل به طور معنی‌داری از سایر گروه‌ها کمتر بود (P<۰/۰۵) و در گروه‌های ترکیبی Bio-Oss–لاکتوفرین ۵۰۰ µg/ml بیشتر از بقیه گروه‌ها بود و به دنبال آن گروه‌های Bio-Oss– لاکتوفرین ۵۰ µg/ml و Bio-Oss بودند ولی به دلیل دامنه وسیع داده‌ها تفاوت معنی‌داری بین سه گروه دیگر مشاهده نشد (P=۰/۱).

میزان متریال باقیمانده نیز بین ۳ گروه حاوی Bio-Oss بررسی شد. متریال باقیمانده در هر ۳ گروه وجود داشت، این میزان در گروه Bio-Oss از سایر گروه‌ها بیشتر بود و دو گروه دیگر داده‌های بسیار نزدیک به هم داشتند ولی در کل تفاوت بین سه گروه از نظر آماری معنی‌دار نبودند (P=۰/۳۹۲).

جدول ۱- میزان التهاب موجود در هر یک از گروه های مورد مطالعه

میزان التهاب / گروه مورد مطالعه	فاقد التهاب	التهاب خفیف	التهاب متوسط	التهاب شدید
Bio-Oss–لاکتوفرین ۵۰۰ µg/ml	۹	۱	۰	۰
Bio-Oss–لاکتوفرین ۵۰ µg/ml	۹	۰	۰	۰
Bio-Oss	۹	۰	۱	۰
کنترل	۱۰	۰	۰	۰

جدول ۲- میانگین و انحراف معیار درصد استخوان ساخته شده بر حسب تعداد Pixel در هر یک از نمونه های مورد مطالعه

گروه مورد مطالعه	میانگین	انحراف معیار
Bio-Oss–لاکتوفرین ۵۰۰ µg/ml	٪ ۱۶/۳۸۹	٪۱/۸۶۲
Bio-Oss–لاکتوفرین ۵۰µg/ml	٪ ۱۵/۶۴۶	٪۱/۹۳۷
Bio-Oss	٪ ۱۴/۹۲۸	٪۱/۳۷۶
کنترل	٪ ۱۳/۴۳۸	٪۲/۳۱۲

جدول ۳- میانگین و انحراف معیار درصد متریال باقیمانده بر حسب تعداد Pixel در هر یک از نمونه های مورد مطالعه

گروه مورد مطالعه	میانگین	انحراف معیار
Bio-Oss–لاکتوفرین ۵۰۰g/ml	٪۱۲/۵۰۴	٪۱/۵۸۸
Bio-Oss– لاکتوفرین ۵۰g/ml	٪۱۱/۹۱۳	٪۱/۳۲۲
Bio-Oss	٪۱۴/۷۹۷	٪۱/۵۰۳

[Downloaded from jdm.tums.ac.ir on 2024-11-25]

بحث و نتیجه‌گیری

اضافه کردن لاکتوفرین به Bio-Oss به میزان اندک باعث افزایش استخوان‌سازی شد. مطالعات in vitro که در این زمینه صورت گرفته نشان داده‌اند که اضافه کردن لاکتوفرین به محیط کشت استئوبلاست‌ها باعث افزایش معنی‌دار تکثیر و تمایز این سلول‌ها می‌شود. همچنین آپوپتوز استئوبلاست‌ها نیز ۵۰-۷۰٪ کاهش می‌یابد. حتی در صورت ثابت بودن تعداد استئوبلاست‌ها، کلسیفیکاسیون ماتریکس خارج سلولی این سلول‌ها در مجاورت لاکتوفرین افزایش معنی‌داری داشته است. علاوه بر این با اضافه کردن غلظت‌های مختلف µg/ml ۱۰۰۰-۱۰ لاکتوفرین به محیط کشت استئوکلاست‌ها، Resorption این سلول‌ها به صورت وابسته به دوز کاهش می‌یابد، حتی استئوکلاستوژنز نیز در غلظت µg/ml ۱۰۰ متوقف می‌شود (۱۲،۱۵،۱۶).

در مطالعه in vivo دیده شد که تزریق روزانه لاکتوفرین در Hemicalvaria موش‌های نر نیز باعث افزایش ضخامت استخوان در سمت مورد نظر می‌شود (۱۲). همچنین در Ratهایی که به مدت ۲۷ هفته لاکتوفرین خوراکی گرفتند، دانسیتی استخوان افزایش وابسته به دوز داشته است (۱۷).

مطالعاتی که در زمینه لاکتوفرین صورت گرفته، بر اثرات مثبت آن براستخوان و استخوان‌سازی تأکید می‌کنند. با این حال ما تفاوت معنی‌داری مشاهده نکردیم و تفاوت موجود در نتایج تحقیق ما با سایر مطالعات می‌تواند به علت تفاوت در روش اجرای تحقیق باشد. بیشتر مطالعات روی لاکتوفرین به صورت in vitro بوده است و در دو مطالعه in vivo نیز لاکتوفرین یا به صورت روزانه در ناحیه تزریق می‌شد و یا تأثیر سیستمیک لاکتوفرین خوراکی بر استخوان‌ها مورد بررسی قرار گرفت، که کاملاً متفاوت با اهداف و روش اجرای ما بوده و مطالعه‌ای مشابه نیز وجود ندارد. همینطور در این مطالعات نتایج پس از مدت کوتاه (مثلاً ۵ روز در مطالعه Cornish و همکاران (۱۲) مورد بررسی قرار گرفتند در حالیکه در مطالعه ما نمونه‌ها پس از ۴ هفته تهیه شدند و این احتمال وجود دارد که طی زمان اثر استخوان‌سازی لاکتوفرین تحت تأثیر Bio-Oss قرار گرفته باشد و مشهود نشود.

یکی از دلایل دیگر که این تفاوت را توجیه می‌کند احتمال شسته شدن لاکتوفرین از ناحیه است که به علت مایع بودن لاکتوفرین و پایدار نبودن مخلوط لاکتوفرین و Bio-Oss محتمل به نظر می‌رسد و باعث می‌شود اثرات استخوان‌سازی لاکتوفرین در ناحیه مورد بررسی به وضوح مشاهده نشود. همچنین در این مطالعه تنها دو دوز لاکتوفرین مورد بررسی قرار گرفت. گرچه این افزایش معنی‌دار نبود ولی شاید در صورت افزایش دوز بتوان نتایج بهتری گرفت.

Bio-Oss خود ماده‌ای با زیست سازگاری مناسب است که طی پدیده Remodeling می‌تواند جذب شده و با استخوان طبیعی جایگزین شود، از این رو با اندازه‌گیری میزان بیومتریال باقی مانده می‌توان میزان جذب و Remodeling آن را مقایسه کرد. در مورد جذب بیومتریال نیز ظاهراً اضافه کردن لاکتوفرین به Bio-Oss توانسته بر سرعت جذب این بیومتریال (هر چند اندک) بیفزاید، به ویژه در گروه لاکتوفرین با غلظت بالا که این درصد از همه بیشتر بوده است. هرچند این تفاوت معنی‌دار نبود.

درمطالعات متعدد انجام شده در مورد Bio-Oss نیز التهاب گزارش نشده است (۲۲-۲۰). از طرفی لاکتوفرین نقش مؤثری در فعالیت سلول‌های ایمنی و کاهش التهاب دارد (۲۵-۲۳). بر این اساس انتظار می‌رود بین گروه‌ها تفاوتی دیده شود ولی نتایج یکسان بین گروه‌ها می‌تواند ناشی از زمان ترمیم طولانی بوده باشد که در این مدت ۴ هفته پروسه التهاب کاهش یافته و مانع از مشاهده اثرات لاکتوفرین شده است.

از آنجا که در این مطالعه به دلیل محدود بودن بودجه تحقیقاتی، تنها دو دوز از لاکتوفرین مورد تحقیق قرار گرفت توصیه می‌شود مطالعات دیگری در دوزهای متفاوت نیز صورت گیرد. هر چند به نظر می‌رسد شسته شدن لاکتوفرین باعث شده اثرات این ماده مشاهده نشود. به همین دلیل یافتن ترکیبی Carrier برای آن می‌تواند باعث پایداری طولانی‌تر و مشاهده دقیق‌تر اثرات لاکتوفرین باشد. همینطور در این مطالعه تنها زمان ترمیم یک ماهه بررسی شد که برای بررسی بیشتر روی اثرات این مواد توصیه می‌شود این مطالعه در زمان‌های ترمیم متوالی‌تر نیز انجام گیرد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از مرکز تحقیقات دانشکده دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی تهران تشکر و قدردانی می‌شود.

[Downloaded from jdm.tums.ac.ir on 2024-11-25]

منابع:

1- Newman MG, Takei H, Carranza FA, Klokkevold PR. CARRAZA'S Clinical periodontology. 10th ed. St Louis: WB Saunders; 2006.

2- Steijns JM, Van Hooijdonk AC. Occurrence, structure, biochemical properties and technological characteristics of lactoferrin. Br J Nutr. 2000;84(1):81-8.

3- Britigan BE, Serody JS, Cohen MS. The role of lactoferrin as an anti-inflammatory molecule. Adv Exp Med Biol. 1994;357(6):143-56.

4- Brock JH. The physiology of lactoferrin. Biochem Cell Biol. 2002;80:1-6.

5- Yamauchi K, Tomita M, Giehl TJ, Ellison RT 3rd. Antibacterial activity of lactoferrin and a pepsin-derived lactoferrin peptide fragment. Infect Immun. 1993;61(2):719-28.

6- Farnaud S, Evans RW. Lactoferin- a multifunctional protein with antimicrobial properties. Mol Immunol. 2003;40(7):395-405.

7- Dial EJ, Lichtenberger LM. Effect of lactoferrin on Helicobacter felis induced gastritis. Biochem Cell Biol. 2002;80(1):113-7.

8- Lonnerdal B, Iyer S. Lactoferrin: molecular structure and biological function. Annu Rev Nutr. 1995;15:93-110.

9- Caccavo D, Sebastiani GD, Di Monoce C, Guido F, Galeazzi M, Ferri GM, et al. Increased levels of lactoferrin in synovial fluid but not in serum from patients with rheumatoid arthritis. Int J Clin Lab Res. 1999;29(1):30-5.

10- Kimber I, Cumberbatch M, Dearman RJ, Headon DR, Bhushan M, Griffiths CE. Lactoferrin: influences on langerhans cells, epidermal cytokines, and cutaneous inflammation. Biochem Cell Biol. 2002;80(1):103-7.

11- Noat D, Grey A, Reid IR, Cornish J. Lactorerrin- A novel bone growth factor. Clin Med Res. 2005;3(2):93-101.

12- Cornish J, Callon KE, Naot D, Palmano KP, Banovic T, Bava U, et al. Lactoferrin is a potent regulator of bone cell activity and increases bone formation in vivo. Endocrinology. 2004;145(9):4366-74.

13- Cornish J, Palmano K, Callon KE, Watson M, Lin JM, Valenti P, et al. Lactoferrin and bone; structure-activity relationships. Biochem Cell Biol. 2006;84(3):297-302.

14- Takayama Y, Mizumachi K. Effect of bovine lactoferrin on extracellular matrix calcification by human osteoblast-like cells. Biosci Biotechnol Biochem. 2008;72(1):226-30.

15- Grey A, Zhu Q, Watson M, Callon K, Cornish J. Lactoferrin potently inhibits osteoblast apoptosis, via an LRP1-independent pathway. Mol Cell Endocrinol. 2006;251(1-2):96-102.

16- Lorget F, Clough J, Oliveira M, Daury MC, Sabokbar A, Offord E. Lactoferrin reduces in vitro osteoclast differentiation and resorbing activity. Biochem Biophys Res Commun. 2002;296(2):261-6.

17- Blais A, Malet A, Mikogami T, Martin-Rouas C, Tome D. Oral bovine lactoferrin improves bone status of ovareictomized mice. AM J Physiol Endocrinol Metab. 2009;296(6):1281-8.

18- Kruger CL, Marano KM, Morita Y, Takada Y, Kawakami H, Kobayashi T, et al. Safety evaluation of milk basic protein fraction. Food Chem Toxicol. 2007;45(7):1301-7.

19- Goodman RE, Taylor SL, Yamamura J, Kobayashi T, Kawakami H, Kruger CL, et al. Assessment of the potential allergenicity of Milk Basic Protein fraction. Food Chem Toxicol. 2007;45(10):1787-94.

20- Tamimi FM, Torres J, Tresguerres I, Clemente C, Lopez-Cabarcos E, Blanco LJ. Bone augmentation in rabbit calvariae: comparative study between Bio-Oss and a novel βTCP/DCPT granulate. J Clin Periodontol. 2006;33(12):922-8.

21- Piattelli M, Favero GA, Scarano A, Orsini G, Piattelli A. Bone reaction to anorganic bovine bone(Bio-Oss) used in sinus augmentation procedures: a histologic long-term report of 20 cases in humans. Int J Oral Maxillofac Implants. 1999;14(6):835-40.

22- Merkx MA, Maltha JC, Freihofer HP. Incorporation of composite bone implants in the facial skeleton. Clin Oral Imp Res. 2000;11(5):422-9.

23- Togawa J, Nagase H, Tanaka K, Inamori M, Nakajima A, Ueno N, et al. Oral administration of lactoferrin reduces colitis in rats via modulation of the immune system and correction of cytokine imbalance. J Gastroenterol Hepatol. 2002;17(12):1291-8.

24- Dhennin-Duthille I, Masson M, Damiens E, Fillebeen C, Spik G, Mazurier J. Lactoferrin upregulates the expression of CD4 antigen through the stimulation of the mitogen-activated protein kinase in the human lymphoblastic T Jurkat cell line. J cell Biochem. 2000;79(4):583-93.

25- Shimizu K, Matsuzawa H, Okada K, Tazume S, Dosako S, Kawasaki Y, et al. Lactoferrin-mediated protection of the host from murine cytomegalovirus infection by a T-cell dependant augmentation of natural killer cell activity. Arch Virol. 1996;141(10):1875-89.

[Downloaded from jdm.tums.ac.ir on 2024-11-25]