



٢١١١٥

دانشگاه علوم پزشکی شیراز

دانشکده دندانپزشکی

پایان نامه جهت دریافت درجه دکترای دندانپزشکی

عنوان:

بررسی و مقایسه استریولوژیک (محاسبه کمی) تاثیر سیکلوسپورین بر روی استخوان

آلوئول و لیگامان پریدنتال در رتهای نر و ماده

اساتید راهنما:

دکتر فرین کیانی

استادیار بخش پریدنتولوژی

دکتر علی نورافشان

دانشیار گروه آناتومی دانشکده پزشکی شیراز

نگارش:

لیلا رنجبر عمرانی

علیرضا محمدی

آزاده ادراکی

مهرماه ۸۴

۱۵ ۳۳ ۲ ۴

۱۷۱۲۸

اطلاعات درک عمومی
تسلیت درک عمومی

من آن موجدم که آرامش ندارم

به آسانی سر سازش ندارم

همیشه در گریز و در گذارم

نمی مانم به یک جا، بی قرارم

سفر یعنی من و گستاخی من

همیشه رفتن و هرگز نماندن

هزاران ساحل و نادیده دیدن

به پرسش های بی پاسخ رسیدن

سرکار خانم دکتر کیانی

جناب آقای دکتر نورافشان

با امید به اینکه در مراحل بعدی نیز سعادت یاریگری و پشتیبانیتان را

داشته باشیم، با قلبی آکنده از سپاس و قدردانی، این پایان نامه را تقدیمتان

می کنیم تا گوشه ناچیزی از زحماتتان را پاسخ گفته باشیم.

این پایان نامه پیشکش ناچیزی است به سنگ صبور دردهایمان،

پدر و مادر مهربانمان. می خواستیم زیباترین کلام را به یاری بگیریم تا

صمیمانه ترین تشکراتمان را تقدیمتان کنیم، ذهنمان یاری نکرده پنداشتیم که

ساده نوشتن چون ساده زیستن زیباست، پس ساده و بی تکلف می گوئیم قدرتان

همه مهربانی ها و خوبی هایتان هستیم.

در کنار شما بودن بزرگترین آرزوی ماست.

تقدیم به هیات محترم داوران

به پاس حضورشان



با تشکر و قدردانی از راهنمایی های اساتید محترم:

- جناب آقای دکتر عمرانی

- جناب آقای دکتر عطاران

- سرکار خانم دکتر امیدخدا

- جناب آقای دکتر مصباح

- سرکار خانم دکتر بهمن پور

- جناب آقای دکتر نام آور

با سپاس از دوستان عزیزمان:

- مهندس وهاب زنگنه

- دکتر مهدی مرادی

- خانم فهیمه عرب پور

- دکتر مهدی رویین پیکر

- دکتر علی دهقانی

- دکتر میلاد معتمدی

- آقای عزیزی

- مهندس سحرستوده

- آقای هادی افشین فر

- کارکنان و اساتید محترم بخش تشریح دانشکده پزشکی

- کارکنان و مسئولین محترم خانه حیوانات

- مسئولین محترم بخش تحقیقات بیمارستان نمازی

به نام خدا

«ارزیابی پایان نامه»

پایان نامه شماره ۹۵۵

با یاری خداوند مهربان، جلسه دفاع از پایان نامه لیلا رنجبر عمرانی، علیرضا

محمدی و آزاده ادراکی در رشته دندانپزشکی تحت عنوان:

بررسی و مقایسه استریولوژیک (محاسبه کمی) تأثیر سیکلوسپورین بر روی استخوان

آلوئول و لیگامان پریدنتال در رتهای نر و ماده

با حضور استاد راهنما و استاد مشاور و هیات داوران در محل دانشکده دندانپزشکی شیراز

در تاریخ ۱۱/۸/۸۶ تشکیل شد و از پایان نامه دفاع گردید و با نمره ۱۰۰٪ و درجه

عالی... مورد تصویب قرار گرفت.

اسامی هیات داوران:

۱-

۲-

۳-

۴-

۵-

۶-

فهرست مطالب

شماره صفحه

عنوان

چکیده

۱..... مقدمه

فصل اول

هیستولوژی نرمال استخوان و پریدنشیوم

۳..... استخوان

۴..... سلولهای استخوانی

۴..... استئوبلاست

۵..... استئوسیت

۵..... استئوکلاست

۷..... ماتریکس استخوانی

۸..... مغز استخوان

۹..... پریوست و اندوست

۱۰..... قالبگیری مجدد استخوان

۱۱..... لیگامان پریدنتال

۱۴..... سیستم دندانی در رتها

۱۵..... پریدنتال لیگامان در چونندگان

فصل دوم

آشنایی با داروی سیکلوسپورین

۱۶..... خواص شیمیایی

۱۷..... اشکال دارویی

۱۸..... مکانیزم عمل

۲۰..... موارد مصرف

۲۳..... نحوه تجویز و دوز موثر در انسان

۲۴..... نحوه تجویز و دوز موثر در حیوانات

۲۵..... فارماکوکینتیک

۲۷..... عوارض جانبی

۳۰..... عوامل موثر بر روی عوارض جانبی

۳۱..... تاثیر سن

۳۱..... تاثیر مدت زمان درمان

۳۲..... تاثیر موقعیت آئوئول

۳۲..... تاثیر دوز

۳۲..... تاثیر جنسیت

۳۳	تاثیر همراهی با سایر داروها
۳۴	تداخلات دارویی

فصل سوم

اثرات داروی سیکلوسپورین بر روی استخوان و پریدنشیوم

۳۶	اثرات CSA بر روی استخوان در موجودات زنده
۳۹	اثرات CSA بر روی استخوان در محیط آزمایشگاه
۴۱	اثرات CSA بر روی پریدنشیوم
۴۱	مکانیزم عمل CSA بر روی استخوان
۴۴	اثر CSA بر روی مارکرهای موثر در ریمادلینگ استخوان
۴۴	اثر بر روی کلسیم سرم
۴۶	اثر بر روی BGP
۴۷	اثر بر روی میزان PTH
۴۹	اثر بر روی $1,25(OH)_2D_3$
۴۹	اثر CSA بر روی برخی عناصر دیگر در سرم و ادرار
۵۰	تاثیرات وابسته به جنس CSA بر روی استخوان رت
۵۱	علل اختلاف تاثیرات CSA در دو جنس و اثر آن بر روی هورمونهای جنسی

فصل چهارم

مروری بر متون و مقالات

۵۷	مروری بر مقالات
----	-----------------

فصل پنجم

مواد و روش

۸۵	حیوان آزمایشگاهی و تعیین گروهها
۸۵	دوز و نحوه دادن دارو و روغن زیتون
۸۷	تشریح و جدا کردن مندیبل
۸۹	مرحله دکلسیفیکاسیون
۸۹	مرحله گردش بافتی و بلوک گیری
۹۱	مرحله برش بافتی
۹۱	مرحله رنگ آمیزی
۹۱	محلولهای رنگ آمیزی
۹۲	روش رنگ آمیزی
۹۴	نتایج رنگ آمیزی
۹۷	مطالعه حجمی
۹۷	تکنیک کاوالیری
۱۰۰	روش محاسبه دانسیته حجمی
۱۰۱	روش محاسبه حجم مطلق

۱۰۱.....	روش محاسبه تعداد سلولها
۱۰۲.....	روش محاسبه تعداد مطلق سلولها
۱۰۲.....	بررسی آماری

فصل ششم

یافته ها و نتایج آماری

۱۰۸.....	نتایج حاصل از آزمایشات در این تحقیق
۱۰۸.....	تعیین میانگین حجم کل مندیل
۱۰۸.....	تعیین میانگین حجم مطلق استخوان
۱۰۹.....	تعیین میانگین حجم مطلق حفرات
۱۰۹.....	میانگین تعداد کل استئوبلاستها در مندیل
۱۰۹.....	میانگین تعداد کل استئوکلاستها در مندیل
۱۱۰.....	میانگین حجم کل PDL
۱۱۰.....	میانگین حجم مطلق الیاف کلاژن در PDL
۱۱۰.....	میانگین تعداد کل فیروپلاستها در PDL
۱۱۰.....	میانگین غلظت سیکلوسپورین در خون
۱۱۰.....	میانگین غلظت آلکالین فسفاتاز در خون
۱۱۱.....	میانگین غلظت کلسیم در خون

جدول

۱۱۱.....	جدول شماره (۶-۱)
۱۱۲.....	جدول شماره (۶-۲)
۱۱۳.....	جدول شماره (۶-۳)

نمودارها

۱۱۴.....	نمودار شماره (۶-۱)
۱۱۵.....	نمودار شماره (۶-۲)
۱۱۶.....	نمودار شماره (۶-۳)
۱۱۷.....	نمودار شماره (۶-۴)
۱۱۸.....	نمودار شماره (۶-۵)
۱۱۹.....	نمودار شماره (۶-۶)
۱۲۰.....	نمودار شماره (۶-۷)
۱۲۱.....	نمودار شماره (۶-۸)

فصل هفتم

۱۲۲.....	بحث و نتیجه گیری
۱۴۸.....	چکیده انگلیسی (Abstract)
۱۵۱.....	منابع

چکیده:

مقدمه: سیکلوسپورین یک داروی سرکوب کننده سیستم ایمنی است که مهمترین مورد مصرف آن در جلوگیری از پس زدن اعضای پیوند شده می باشد. این دارو، همچنین برای درمان بیماریهای مختلف خود ایمنی (Autoimmune) کاربرد دارد. شواهد زیادی وجود دارد که تاثیر سیکلوسپورین بر متابولیسم استخوان را نشان می دهد. هدف از این مطالعه ارزیابی اثرات درمان با سیکلوسپورین بر استخوان آلوئول و PDL در رت‌ها، در ارتباط با جنسیت بود.

مواد و روش: تعداد ۲۷ رت از نژاد Charles River (۱۵ راس ماده با وزن تقریبی ۲۰۰ gr، ۱۲ راس نر با وزن تقریبی ۲۷۰ gr) بطور اتفاقی در چهار گروه تقسیم شدند: ماده (۷ راس گروه کنترل، ۸ راس گروه آزمایش).

نر (۷ راس گروه کنترل، ۵ راس گروه آزمایش).

پس از خون گیری جهت انجام آزمایشات (Ca) Alkaline, calcium (Alkp) ، phosphatase (Cr) ، creatinine (CSA) و cyclosporine ، رت‌های گروه آزمایش به مدت شش هفته، روزانه داروی سیکلوسپورین را با دوز ۱۵mg/kg بصورت Gasteric feeding دریافت کردند. رت‌های گروه آزمایش هفته ای دوبار وزن می شدند و دوز دارو بر اساس وزنشان اصلاح می شد.

بعد از گذشت این مدت، قبل از تشریح، رتها مجدداً وزن شدند و خون‌گیری از آنها انجام شد. پس از تشریح، مندیبیل آنها خارج شد و بعد از تثبیت، دکسیفیکاسیون و پاساژ بافتها، بلوک‌گیری و برش به ضخامت‌های ۶ و ۲۰ میکرون انجام شد و لامهای تهیه شده با Heiden Hain Azan رنگ آمیزی شدند و مطالعه میکروسکوپی آغاز گردید.

برای محاسبه حجم کل استخوان مندیبیل و پرئودنتال لیگامنت از تکنیک کوالیری و برای محاسبه دانسیته حجمی هر ناحیه، از تکنیک شمارش نقطه‌ای (point-counting) استفاده گردید و برای تعیین حجم مطلق هر ناحیه، دانسیته حجمی آن ناحیه در حجم کل مندیبیل و یا حجم کل پرئودنتال لیگامنت ضرب شد.

برای شمارش تعداد سلولهای استئوبلاست، استئوکلاست و فیبروبلاست از تکنیک Disector استفاده شد، در این روش Unbiased Counting Frame بکار برده شد و در نهایت برای محاسبه تعداد مطلق سلولها در یک بافت، تعداد شمارش شده آنها در حجم کل بافت مورد نظر ضرب شد.

برای محاسبه حجم کلاژن از Point-Grid test system استفاده شد و برای بدست آوردن حجم مطلق آن، دانسیته حجمی کلاژن در حجم کل PDL ضرب شد.

نتایج: نتایج حاصل از این مطالعه نشان دادند که حجم کل مندیبل ($P < 0.03$) ، حجم مطلق استخوان ($P < 0.05$) ، حجم مطلق حفرات ($P < 0.03$) و تعداد کل استئوبلاستها ($P < 0.04$) در رتهای نر گروه آزمایش نسبت به گروه کنترل، بطور معنی داری کاهش یافته بود. تعداد کل استئوکلاستها در رتهای نر گروه آزمایش، افزایش پیدا کرده بودند ولی این افزایش از نظر آماری معنی دار نبود. در رتهای ماده هیچکدام از این متغیرها در گروه آزمایش نسبت به گروه کنترل تفاوت معنی داری را نشان ندادند.

تغییرات حجم کل PDL، تعداد فیبروبلاست و کلاژن در PDL نیز، در رتهای ماده و نر از نظر آماری معنی دار نبودند.

تستهای بیوشیمی آلکالین فسفاتاز و کلسیم نیز از نظر آماری تفاوت معنی داری نشان ندادند، ولیکن غلظت سیکلوسپورین در خون رتهای نر گروه آزمایش نسبت به رتهای ماده گروه آزمایش بطور معنی داری افزایش پیدا کرده بود ($P < 0.003$).

نتیجه گیری: با توجه به یافته های این مطالعه تجربی، می توان نتیجه گرفت که اثرات اسکلتی سیکلوسپورین در رتها وابسته به جنس است، به این معنی که سیکلوسپورین در رتهای نر سبب کاهش در تعداد استئوبلاستها می شود و در نتیجه عدم تعادل بین شکل گیری و تشکیل استخوان و تحلیل استخوان به وجود آمده و نهایتاً Osteopenia ایجاد می شود.

مقدمه:

امروزه با پیشرفت علم پزشکی تحویلی عظیم در جراحی های پیوند اعضا رخ داده است و سالانه به تعداد افرادی که تحت عمل های پیوند اعضا قرار می گیرند افزوده می شود و بر اساس نیاز این بیماران، از رژیم های دارویی مختلفی استفاده می شود. یکی از داروهایی که در بیماران پیوندی استفاده فراوانی دارد سیکلوسپورین (CSA) می باشد. این دارو یک ماده سرکوب کننده سیستم ایمنی است که مصرف آن تنها منحصر به بیماران پیوندی نیست بلکه در طیف وسیعی از بیماریهای اتوایمیون که امروزه درصد قابل توجهی از بیماریهای سیستمیک را تشکیل می دهند، کاربرد دارد. با توجه به استفاده روز افزون سیکلوسپورین در درمان بیماریهای مختلف و بخصوص در موارد پس از جراحی پیوند اعضا، عوارض جانبی این دارو نیاز به دقت نظر و بررسی بیشتری دارد. نقش این دارو بر روی مسمومیت کلیه، افزایش فشارخون، پرمویی، افزایش حجم و رشد بیش از حد لثه، ثابت شده است، ولیکن تاثیر آن بر روی استخوان و پریودنشیوم نامشخص و نیاز به بررسی و تحقیق بیشتری دارد. بخصوص در مواردیکه مصرف این دارو همزمان با بیماری پریودنتیت در فرد باشد احتمال تحلیل استخوان و تشدید پریودنتیت وجود دارد، که در صورت اثبات این مسئله چنین بیمارانی نیاز به ملاحظات پریودنتال بیشتری از هر دو جنبه پیشگیری و درمانی

دارند. در عین حال اگر هورمونهای جنسی (بخصوص هورمونهای جنسی ماده) بتوانند تاثیر این دارو بر روی بافت استخوان را تعدیل و یا برعکس نمایند، شاید بتوان با استفاده از نقش و تاثیر هورمونهای جنسی عوارض جانبی این دارو را تا حدی کنترل نمود. با توجه به مطالبی که ذکر گردید، هدف از این تحقیق بررسی CSA بر روی استخوان آلوئول و PDL سالم در رت می باشد. در عین حال با در نظر گرفتن متغیر جنسیت، نقش هورمونهای جنسی نر و ماده در میزان و نوع تاثیر این دارو بر روی دو بافت ذکر شده، مورد بررسی قرار می گیرد. با توجه به نتایج این تحقیق، در مطالعات آینده می توان تاثیر سیکلوسپورین بر روی پرئودنشیوم و استخوان آلوئول را با در نظر گرفتن متغیرهای بیشتری مورد بررسی قرار داد.

فصل اول:

هستولوژی نرمال استخوان و پریودنشیوم

Normal Histology of Bone &
Periodontium

استخوان :

استخوان، یک بافت همبند ویژه است که از ماده کلسیفیه بین سلولی بنام ماتریکس استخوانی و ۳ نوع سلول مختلف تشکیل شده است: (۱) استئوسیت ها که در لاکوناها واقع در ماتریکس یافت می شوند. (۲) استئوبلاستها: که اجزای آلی ماتریکس را می سازند. (۳) استئوکلاستها: سلولهای غول آسای چند هسته ای که در فرآیند جذب و قالب گیری مجدد (remodeling) بافت استخوانی عمل می کنند. (۴۳)

از استئوسیت ها یکسری زواید به داخل کانالیکول هایی که از لاکونا جدا می شوند، خارج می شود. این کانالیکول ها یک سیستم آناستوموز دهنده را در سراسر ماتریکس بین سلولی به وجود می آورند که از طریق این سیستم اکسیژن و مواد غذایی به وسیله خون به استئوسیت ها می رسد و محصولات متابولیک زاید آنها دفع می شود. (۴۴) به دلیل سخت بودن، برش استخوان با میکروتوم دشوار است، بنابراین از تکنیک های خاصی برای مطالعه آن باید استفاده نمود. روش رایجی که مطالعه سلولها و ماتریکس آلی را میسر می سازد، بر اساس دکلسیفیکاسیون استخوان توسط ثابت سازهای استاندارد است. مواد معدنی توسط غوطه ور کردن در یک ماده چنگال زننده (chelating) کلسیم (مثل اسید اتیلن دی آمین تترا استیک EDTA) برداشته میشود. سپس

بافت دکلسیفیه تحت عمل embedding (قابگیری) قرار گرفته، برش زده شده و رنگ آمیزی می شود. (۴۳)

سلولهای استخوانی:

استئوبلاستها: استئوبلاستها در تولید ماتریکس آلی استخوان قبل از اینکه معدنی شدن رخ دهد شرکت می کنند. ماتریکس آلی استخوان استئوئید نام دارد، (۴۵) که شامل فایبرهای کلاژن و ماتریکس پروتئوگلیکانی و گلیکوپروتئینی است. این ماتریکس توسط مواد معدنی مثل کلسیم و فسفر، معدنی می شود و بلورهای هیدروکسی آپاتیت تشکیل می گردد. (۲۸) البته رسوب اجزای غیر آلی استخوان وابسته به حضور استئوبلاستهای زنده است. (۴۳)

این سلولها از سلولهای فولیکول که pluri potent هستند، تمایز می یابند. (۴۴) استئوبلاستها سلولهایی کشیده با سیتوپلاسم بازوفیل، دستگاه گلژی وسیع، هسته و هستک های مشخص هستند. وجود این مشخصات در استئوبلاستها سرعت بالای تولید پروتئین و پروتئوگلیکان را توسط این سلولها منعکس می کند. (۴۵) این سلولها در سطوح بافت استخوانی، کنار به کنار یکدیگر قرار می گیرند، به گونه ای که شبیه اپی تلیوم ساده می شوند. وقتی این سلولها فعالانه مشغول ساخت ماتریکس می شوند، شکل مکعبی تا استوانه ای و سیتوپلاسم بازوفیل

پیدا می کنند و وقتی سازندگی در این سلولها کاهش می یابد، این سلولها مسطح می شوند و بازوفیلی سیتوپلاسم کاهش می یابد. این سلولها برای هورمون پاراتیروئید رسپتور دارند و وقتی که توسط این هورمون فعال می شوند سیتوکائینی را بنام «فاکتور فعال کننده استئوکلاست» تولید می کنند.^(۴۳) رسوب کلسیم در ارتباط با وزیکول های متصل به غشایی است که در غشا پلاسمایی استئوبلاستها وجود دارند. به این وزیکول ها، وزیکول های ماتریکسی می گویند. این وزیکول ها شامل آکالین فسفاتاز و سایر فسفاتازها هستند که در خنثی سازی اثر مهاری پیرو فسفات نقش دارند.^(۴۵)

استئوسیت ها: برخی از استئوبلاستها در استئوئید به دام می افتند، که به آنها استئوسیت می گویند.^(۲۸) فقط یک استئوسیت در هر لاکونا یافت می شود. استئوسیت ها پهن، بادامی شکل، دارای شبکه اندوپلاسمیک خشن و دستگاه گلژی کمتر نسبت به استئوبلاستها و کروماتین هسته ای متراکم تر می باشند. این سلولها فعالانه در حفظ ماتریکس استخوانی دخالت دارند. متعاقب مرگ استئوسیت ها، ماتریکس جذب می گردد.^(۴۳)

استئوکلاستها: این سلولها درون حفراتی که در اثر تحلیل استخوان ایجاد شده اند به نام لاکونا های Howship یافت می شوند.^(۴۵) این سلولها بزرگ، پرانشعاب و متحرک هستند. بخشهای متسع جسم سلولی دارای ۵ تا ۵۰ یا تعداد بیشتری