



دانشگاه علوم پزشکی اصفهان
دانشکده دندانپزشکی
مرکز تحقیقات پروفسور ترابی نژاد

پایان نامه جهت اخذ دکتری تخصصی
گروه بیماری های دهان، فک و صورت
شماره طرح تحقیقاتی: ۳۹۰۶۲۵

عنوان پایان نامه:

بررسی میزان بیان RANKL/OPG و تغییرات هیستولوژیک در حفره دندانی موش
صحرایی به دنبال تجویز دیکلوفناک و سلکوکسیب

به راهنمایی اساتید ارجمند:

دکتر پریچهر غلیانی
دکتر سید محمد رضوی
دکتر محسن میناییان

نگارش:

دکتر سمیرا حاجی صادقی

فهرست مطالب

عنوان	صفحة
-------	------

چکیده

فصل اول: مقدمه و بیان مسئله

۱	مقدمه و بیان مسئله
۶	هدف کلی
۶	اهداف فرعی
۷	هدف کاربردی
۷	سوالات پژوهشی
۷	فرضیات
۸	تعریف واژه‌ها

فصل دوم: کلیات و مروری بر مقالات

۱۰	ترمیم داخل ساکت
۱۰	استئوکلاست‌ها و تحلیل استخوان
۱۴	NSAIDs
۱۶	Real time PCR
۱۷	TRAP
۱۹	اصول تکنیک ایمونوهیستوشیمی

فصل سوم: مواد و روش‌ها

۲۲	نوع مطالعه
۲۲	جمعیت مورد مطالعه
۲۳	حجم نمونه
۲۳	روش کار
۲۴	تجویز دارو
۲۴	قربانی کردن حیوانات و تهیه‌ی نمونه‌ها

۲۴	جدول متغیرها
۲۵	مراحل آزمایشگاهی
۲۸	بررسی هیستولوژیک، هیستومورفومتریک و ایمونو هیستوشیمیایی
۲۸	مراحل انجام تکنیک Real-time PCR
۳۶	ملاحظات اخلاقی

فصل چهارم: یافته های پژوهش	
۳۷.....	یافته های PCR
۴۱	یافته های هیستولوژیک، هیستومورفومتریک و ایمونو هیستوشیمیایی

فصل پنجم: بحث و نتیجه گیری	
۵۰	بحث
۵۲	نتیجه گیری
۵۲	پیشنهادات
۵۳	خلاصه انگلیسی
۵۴	منابع

فهرست تصاویر

صفحه	عنوان
۱۳	تصویر ۱-۲: مکانیسم عملکرد RANKL/OPG
۲۳	تصویر ۱-۳: هموستان مخصوص کشیدن دندان
۴۷	تصویر ۱-۴: استئوکلاست‌ها در رنگ آمیزی ایمونو‌هیستوشیمیایی (TRAP)
۴۸	تصویر ۲-۴: استخوان‌سازی در رنگ آمیزی H&E
۴۹	تصویر ۲-۴: استئوبلاست‌ها در رنگ آمیزی H&E

فهرست جداول

صفحه	عنوان
۲۴	جدول ۱-۳: جدول متغیرها.....
۳۴	جدول ۲-۳: سکوانس پرایمرهای استفاده شده در این تحقیق.....
۳۹	جدول ۱-۴: میانگین RANKL,OPG در گروههای مورد مطالعه.....
۴۲	جدول ۲-۴: میانگین تعداد استئوکلاستها در گروههای مورد مطالعه.....
۴۴	جدول ۳-۴: میانگین تعداد استئوبلاستها در گروههای مورد مطالعه.....
۴۶	جدول ۴-۴: میانگین درصد استخوان تازه تشکیل شده در گروههای مورد مطالعه.....

فهرست نمودار

صفحه	عنوان
۴۰	نمودار ۱-۴: میانگین RANKL/OPG در گروههای مورد مطالعه
۴۲	نمودار ۲-۴: میانگین تعداد استئوکلاست‌ها در گروههای مورد مطالعه
۴۴	نمودار ۳-۴: میانگین تعداد استئوبلاست‌ها در گروههای مورد مطالعه
۴۶	نمودار ۴-۴: میانگین درصد استخوان تازه تشکیل شده در گروههای مورد مطالعه

بررسی میزان یان RANKL/ OPG و تغیرات هیستولوژیک در حفره دندانی موش صحرایی به دنبال تجویز دیکلوفناک و سلکوکسیب

چکیده:

مقدمه: در قلمرو ارتوپدی، استفاده طولانی از NSAIDs(Non Steroid Anti Inflammatory Drugs) اثرات مهاری روی ترمیم شکستگی و استخوانسازی اطراف ایمپلنت دارد. مکانیسم‌های مختلف NSAIDs بر متابولیسم استخوان کاملاً شناخته شده نیست. هدف از این مطالعه، بررسی اثر درمانی تجویز کوتاه مدت NSAIDs بر ترمیم استخوان به دنبال کشیدن دندان در موش صحرایی به کمک ارزیابی تولید RANK (Receptor activator NF-KB) و OPG (Osteoprotegrin) است.

مواد و روش ها: در این مطالعه تجربی حیوانی، ۴۵ موش صحرایی نر با میانگین سنی ۸-۱۰ هفته انتخاب و به سه گروه تقسیم شدند. دندان مولر سمت راست ماگزیلا هر موش کشیده شد. ۱۵ موش گروه آزمایش، روزانه ۵ mg/kg دیکلوفناک تزریقی به مدت ۷ روز بعد از کشیدن دندان دریافت کردند و ۱۵ موش گروه آزمایش، ۱۵ mg/kg/day سلکو کسیب خوراکی به مدت ۷ روز دریافت کردند. ۱۵ موش گروه کنترل نیز نرمال سالین ۵ ml/kg/day دریافت کردند. ۵ رت از هر گروه در روزهای ۷، ۱۴، ۲۱ بعد از کشیدن دندان، با افزایش دوز بیهوشی قربانی شدند. بیان ژن‌های Realtime-PCR (Polymerase Chain Reaction) به کمک OPG/RANKL شد. همچنین تعداد استئوکلاست‌ها و استئوکلاست‌ها و میزان استخوانسازی بررسی شد و داده‌ها با تست one way ANOVA آنالیز شد.

نتایج: NSAIDs باعث کاهش بیان نسبت RANKL/OPG در دو گروه آزمایش نسبت به گروه کنترل شد. تعداد استئوکلاست‌های گروه کنترل در روز ۷ بیشتر از دیکلوفناک و در روز ۱۴ بیشتر از سلکوکسیب بود. در روز ۲۱ تفاوتی در بین سه گروه دیده نمی‌شود. در روز ۷ تعداد استئوکلاست‌های گروه کنترل بیشتر از گروه‌های دارویی بود. در روز ۱۴ و ۲۱ استخوانسازی جدید در بین گروه‌ها یکسان بود.

نتیجه گیری: تجویز کوتاه مدت NSAIDs اگر چه بر نسبت مدیاتورهای RANKL و OPG اثر می‌گذارد، اما تاثیر بر استخوانسازی، بسیار جزیی و محدود به مراحل اولیه ترمیم است و در نهایت اثر این داروها بر ترمیم حفره دندانی نگران کننده به نظر نمی‌رسد.

کلید واژه ها: استئوکلاست‌ها، ترمیم حفره دندانی، NSAIDs، RANKL، OPG.

Comparative evaluation of expression of RANKL/OPG and histological changes in dental socket of rat after administration of Diclofenac and Celecoxib

Abstract

Introduction: There is extensive experimental and clinical evidence in the orthopedic area that prolonged use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) can hinder long bone fracture healing and new bone formation around implants. The purpose of the present study was to investigate if short time administrations of diclofenac or celecoxib interfere with the osseous wound healing and the RANKL/ OPG balance during the healing of the alveolar process

Methods and materials: In This experimental study, Forty five male Wistar rats ($200 \pm 25\text{g}$, 8-10 weeks old) were used. After extraction of the right maxillary first molar, 15 rats received 5 mg/kg/day of diclofenac and 15 rats received 15 mg/kg/day of celecoxib and 15 rats received normal saline. The animals were sacrificed 7, 14 and 21 days after tooth extraction. New bone formation, number of osteoclasts, number of osteoblasts, OPG and RANKL mRNA expression were determined by histomorphometric analysis, tartrate-resistant acid phosphate staining, and polymerase chain reaction (PCR) respectively. The data were analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test.

Results: The ratio of RANKL/OPG in the control group was higher than diclofenac and celecoxib groups. TRAP immunolabelling of the control group was more than diclofenac group on day 7 and was more than celecoxib group on day 14. On day 21, no significant differences were noted among the three studied groups. On days 7, the osteoblast number in the control group was higher than diclofenac and celecoxib groups. On day 14 and 21, the new bone formation in treated rats was not significantly different from that in control rats.

Conclusion: Althogh Short-term treatments with diclofenac or celecoxib interfere with RANKL/OPG ratio; do not greatly interfere with alveolar bone healing during the experimental period of 21days in rats.

Key words: Osteoclastogenesis Alveolar healing, NSAIDs, OPG, RANKL.

Reference:

1. Amler MH, Johnson PL, Salman I. Histological and histochemical investigation of human alveolar socket healing in undisturbed extraction wounds. *J Am Dent Assoc* 1960; 61:32–44.
2. Devlin H, Sloan P. Early bone healing events in the human extraction socket. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2002; 31:641–645.
3. Bassetti C, Kallenberger A. Influence of chlorhexidine rinsing on the healing of oral mucosa and osseous lesions. *J Clin Periodontol* 1980; 7:443–456.
4. Manolagas SC. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev* 2000; 21(2):115–37.
5. Liu C, Wu Z, Sun HC. The effect of simvastatin on mRNA expression of transforming growth factor-beta1, bone morphogenetic protein-2 and vascular endothelial growth factor in tooth extraction socket. *Int J Oral Sci* 2009; 1(2):90-8.
6. Roax S, Orcel P. Factors that regulate osteoclast differentiation. *Arthritis Res* 2000; 2: 451-456.
7. Lacey DL, Timm SE, Tan HL & et al. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* 1998; 93:165-78.
8. HSU H, Lacey DL, Timms L. TNF receptor family member RANK mediates osteoclast differentiation and activation induced by RANKL. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 1999; 96.
9. Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Lüthy R, Nguyen HQ, et al. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 1997;89(2):309–19.
10. Vuolteenaho K, Moilanen T, Moilanen E. Non-steroidal anti-inflammatory drugs, cyclooxygenase-2 and the bone healing process. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2008; 102:10–14.
11. Fracon RN, Teófilo JM, Satin RB, Lamano T. Prostaglandins and bone: potential risks and benefits related to the use of nonsteroidal

- anti-inflammatory drugs in clinical dentistry. *J Oral Sci*2008;50:247-252.
- 12.Jeffcoat MK, Reddy MS, Haigh S, Buchanan W, Doyle MJ, Meredith MP, et al. A comparison of topical ketorolac, systemic flurbiprofen, and placebo for the inhibition of bone loss in adult periodontitis. *J Periodontol*1995;66:329–338.
- 13.Yugoshi, L. I., Sala, M. A., Brentegani, L. G. and Lamano, Carvalho, T. L.: Histometric study of socket healing after tooth extraction in rats treated with diclofenac. *Braz Dent J*2002;13: 92-6.
- 14.Simon, AM, O'Connor JP.Dose and time-dependent effects of cyclooxygenase-2 inhibition on fracture-healing. *J Bone Joint Surg Am*2007;89:500-11.
- 15.Paquette DW, Lawrence HP, McCombs GB, Wilder R, Binder TA, Troullos E, et al. Pharmacodynamic effects of ketoprofen on crevicular fluid prostanoids in adult periodontitis. *J Clin Periodontol*2000; 27:558–566.
- 16.Trummel CL. Anti inflammatory drugs. In: Yagiela JA, Neidle EA, Dowd FJ. *Pharmacology and therapeutics for dentistry*.4th ed. St. Louis: Mosby, 1998:299-309.
- 17.Marković AB, Todorović L. Postoperative analgesia after lower third molar surgery: contribution of the use of long-acting local anesthetics, low-power laser, and diclofenac. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*2006;102:e4–e8.
- 18.Van der Westhuijzen AJ, Roelofse JA, Grotewass FW, Becker PJ. Randomized double-blind comparison of tiaprofenic acid and diclophenac sodium after third molar surgery. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*1994;78:557–566.
- 19.Bell NH, Hollis BW, Shary JR, Eyre DR, Eastell R, Colwell A, et al. Diclofenac sodium inhibits bone resorption in postmenopausal women. *Am J Med*1994;96:349–353.
- 20.Carlos F, Cobo J, Perillan C, Garcia MA, Arguelles J, Vijande M, et al. Orthodontic tooth movement after different coxib therapies. *Eur J Orthod*2007;29:596–599.

- 21.Krischak GD, Augat P, Blakytny R, Claes L, Kinzl L, Beck A. The non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac reduces appearance of osteoblasts in bone defect healing in rats. Arch Orthop Trauma Surg2007;127:453–8.
- 22.Cengiz Sen, Mehmet Erdem, Taner Gunes, Dogan Koseoglu and Nurper O. Filiz. Effects of diclofenac and tenoxicam on distraction osteogenesis. Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery2007; 127(3):153-159
- 23.Kaspar D, Hedrich CM, Schmidt C, Liedert A, Claes LE, Ignatius AA. Diclofenac inhibits proliferation and matrix formation of osteoblast cells. Unfallchirurg2005;108(1):20-4.
- 24.Alethéia B, Saturnino A, Ramalho J, Cristiane F, Vera C, Patricia R. Effect of Meloxicam and Diclofenac Sodium on Peri-Implant Bone Healing in Rats. Journal of Periodontology2008;79(2):300-6.
- 25.Karakawa1 A,Fukawa Y,Okazaki M, Takahashi K,Sano T. Diclofenac Sodium Inhibits NF κ B Transcription in Osteoclasts. J Dent Res2009;88(11):1042-47.
- 26.Cicconetti A, Bartoli A, Ripair F, Ripair A. Cox2-selective inhibitors: a literature review of analgesic efficacy and safety in oral and maxillofacial surgery. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod2004;97(2):139-46.
- 27.Taketa T, Sakai A, Tanaka S, Nakai K, Menuki K, Yamane H. Selective cyclooxygenase-2 inhibitor prevents reduction of trabecular bone mass in collagen-induced arthritic mice in association with suppression of RANKL/OPG ratio and IL-6 mRNA expression in synovial tissues but not in bone marrow cells. J Bone Miner Metab 2008;26(2):143-51.
- 28.Kolar P, Lach S, Gaber T, Maschmeyer P, Dziurla R, Tripmacher R, et al. Clin Exp Rheumatol. Effects of celecoxib on the expression of osteoprotegerin, energy metabolism and cell viability in cultured human osteoblastic cells 2009;27(1):99-107.

- 29.Zang F, Tanaka H, Kawato T, Kitami S, Nakai K, Motohashi M. Interleukin 17A induces cathepsin K and MMP-19 expression in osteoclasts via celecoxib-blocked prostaglandin E2 in osteoblasts Biochimie2011; 93(2):296-305.
30. Kawashima M, Fujikawa Y, Itonaga I, Takita C, Tsumura H. The effect of selective cyclooxygenase-2 inhibitor on human osteoclast precursors to influence osteoclastogenesis in vitro. Japan College of Rheumatology 2009.
- 31.Teófilo JM, Giovanini GS, Fracon RN, Lamano T. Histometric Study of Alveolar Bone Healing in Rats Treated With the Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drug Nimesulide. Implant Dentistry 2011;20:7-13.
- 32.Fracon RN, Teófilo JM, Moris IC, Lamano T. Treatment with paracetamol, ketorolac or etoricoxib did not hinder alveolar bone healing: a histometric study in rats. J Appl Oral Sci2010;18(6):630-4.
- 33.Gonzalez-Suarez E, Jacob AP, Jones J, Miller R, Roudier-Meyer MP, Erwert R, et al. RANK ligand mediates progestin-induced mammary epithelial proliferation and carcinogenesis. Nature2010;468(7320):103–7.
- 34.Ljusberg J, Wang Y, Lång P, Norgård M, Dodds R, Hultenby K, et al. Proteolytic excision of a repressive loop domain in tartrate-resistant acid phosphatase by cathepsin K in osteoclasts. Biol Chem2005;280(31):28370-81.
- 35.Stashenko P, Dewhirst FE, Peros WJ, Kent RL, Ago JM. Synergistic interactions between interleukin 1, tumor necrosis factor, and lymphotoxin in bone resorption. J Immunol1987;138(5):1464-8.
- 36.Pennica D, Nedwin GE, Hayflick JS. Human tumor necrosis factor: precursor structure, expression and homology to lymphotoxin. Nature. 1984;312:724-9.

37. Epker BN, Frost HM. Correlation of bone resorption and formation with the physical behavior of loaded bone. *J Dent Res* 1965;44:33-41.
38. Rodan GA, Martin TJ. Role of osteoblasts in hormonal control of bone resorption—a hypothesis. *Calcif Tissue Int* 1981;33:349–51
39. D'Amelio P, Isaia G, Isaia GC. The osteoprotegerin/RANK/RANKL system: a bone key to vascular disease. *J Endocrinol Invest* 2009;32(4):6-9.
40. Yasui T, Kadono Y, Nakamura M, Oshima Y, Matsumoto T, Masuda H, et al. *J Bone Miner Res* 2011;26:1447-56.
41. Zhang X, Peng B. Immunolocalization of receptor activator of NF kappa B ligand in rat periapical lesions. *J Endod* 2005; 31: 574–577
42. Kawashima N, Suzuki N, Yang G, Ohi C, Okuhara S, Nakano-Kawanishi H, et al. Kinetics of RANKL, RANK and OPG expressions in experimentally induced rat periapical lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2007;103(5):707-11.
43. Luvizuto ER, Dias SS, Okamoto T, Dornelles RC, Okamoto R. Raloxifene therapy inhibits osteoclastogenesis during the alveolar healing process in rats. *Arch Oral Biol* 2011;56(10):984-90.
44. Wang Y, Huang P, Tang PF, Chan KM, Li G. Alendronate (ALN) combined with osteoprotegerin (OPG) significantly improves mechanical properties of long bone than the single use of ALN or OPG in the ovariectomized rats. *J Orthop Surg Res* 2011 13;6:34.
45. Bartlett, JM, Stirling D. A Short History of the Polymerase Chain Reaction. *PCR Protocols* 2003;226:3–6.
46. Yamamoto T, Nagai H. Ultrastructural localization of tartrate-resistant acid phosphatase activity in rat osteoblasts. *J Electron Microsc*. 1998;47(6):659-63.

- 47.Sahara N, Ashizawa Y, Nakamura K, Deguchi T, Suzuki K. Ultrastructural features of odontoclasts that resorb enamel in human deciduous teeth prior to shedding. *Anat Rec*. 1998;252(2):215-28.
- 48.Hayman AR, Jones SJ, Boyde A, Foster D, Colledge WH, Carlton MB, Evans MJ,et al. Mice lacking tartrate-resistant acid phosphatase (Acp 5) have disrupted endochondral ossification and mild osteopetrosis. *Development* 1996;122(10):3151-62.
- 49.Werner M, Chott A, Fabiano A, Battifora H. Effect of formalin tissue fixation and processing on immunohistochemistry 2000;24(7):1016-9.
- 50.Avrameas S. Enzyme markers: their linkage with proteins and use in immuno-histochemistry. *Histochem J* 1972 Jul;4(4):321-30.
- 51.Ramos-Vara, JA. "Technical Aspects of Immunohistochemistry". *Vet Pathol* 2005;42 (4): 405–426.
- 52.Hsieh YD, Devlin H, Roberts C. Early alveolar ridge osteogenesis following tooth extraction in the rat. *Arch Oral Biol* 1994;39(5):425–8.
- 53.Hsieh YD, Devlin H, McCord F. The effect of ovariectomy on the healing tooth socket of the rat. *Arch Oral Biol* 1995;40(6):529–31.
- 54.Bruzzaniti A, Baron R. Molecular regulation of osteoclast activity. *Rev Endocr Metab Disord* 2006;7:123–139.
- 55.Koch F.P, Merkel C, Ziebart T, Smeets R, Walter C, Al-Nawas B. Influence of bisphosphonates on the osteoblast RANKL and OPG gene expression in vitro. *Clin Oral Invest* 2012;16:79–86.
56. Tanaka H, Mine T, Ogasa H, Taguchi T, Liang C.T. Expression of RANKL/OPG during bone remodeling in vivo. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2011;411:690–694.

- 57.Sen C, Erdem M, Gunes T, Koseoglu D, Filiz NO. Effects of diclofenac and tenoxicam on distraction osteogenesis. Arch Orthop Trauma Surg 2007;127(3):153-9.