

بروز ژن OPN متعاقب تحلیل استخوان ناشی از حرکات ارتودنتیک دندانی در موشهای صحرایی نر

دکتر مسعود سیفی^۱ - دکتر مریم جسری^۲

۱- دانشیار گروه آموزشی ارتودنسی دانشکده دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی.

۲- دندانپزشک.

چکیده

زمینه و هدف: ژن OPN نقش مهمی در تحلیل استخوان دارد. با در نظر قرار دادن نقش این ژن در تحلیل استخوان فرضیه احتمال افزایش تظاهر این گلیکوپروتئین در جریان تحلیل استخوان ناشی از حرکات دندانی موش نر مطرح شد. این مطالعه با هدف تعیین بروز ژن OPN در تحلیل استخوان ناشی از حرکات ارتودنتیک دندانی در موش نر انجام گردید.

روش بررسی: در یک مطالعه تجربی به منظور ایجاد حرکت مزیال دندانها دستگاه ارتودنسی ثابت، یک *Closed coil spring* بر روی مولر اول چپ فک بالای ۱۳ موش صحرایی نر هشت هفته‌ای *Wistar* قرار گرفت. دندانهای مولر راست فک بالای جانوران که درمان ارتودنسی دریافت نکرده بودند به عنوان گروه کنترل در نظر گرفته شد. حیوانات پس از ۲۱ روز کشته شدند. مواد حاصل از تراش استخوان سطح مزیال جانوران برای آزمایشات PCR ارسال شد. داده‌ها با آزمون *McNemar* با استفاده از نرم‌افزار *SPSS* ویرایش ۱۱/۵ و خطای آماری نوع اول ۰/۰۵ تحت تحلیلهای آماری قرار گرفتند.

یافته‌ها: تحلیل دانسیته *mRNA* کد کننده ژن OPN بر روی ژل الکتروفورز، افزایش معنی‌داری را در تظاهر این ژن در سمت مزیال (تحلیلی) گروه آزمایش نشان داد ($P < 0/001$). صحت بررسیهای PCR با استفاده از ژن *GAPDH* تأیید شد. نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه مؤید آن است که در شرایط کنترل شده مطالعه، بروز ژن OPN در تحلیل استخوان ناشی از حرکات دندانی افزایش می‌یابد.

کلید واژه‌ها: ژن OPN - تحلیل استخوان - حرکات ارتودنتیک دندانی - موش صحرایی نر.

پذیرش مقاله: ۱۳۸۷/۵/۲۱

اصلاح نهایی: ۱۳۸۷/۳/۲۳

وصول مقاله: ۱۳۸۶/۸/۱۲

نویسنده مسئول: گروه آموزشی ارتودنسی دانشکده دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی e.mail:seifimassoud@gmail.com

مقدمه

شناخت ویژگیهای تمایز، بلوغ و عملکرد این سلول‌ها در سطح مولکولی می‌تواند اهمیت بسیار زیادی داشته باشد. استئوپونتین (*Osteopontin*)، که محصول تظاهر ژن OPN است یک گلیکوپروتئین غیرکلاژنیزه فسفوریله شده و یکی از پروتئین‌های ساختاری خارج سلولی مهم است که در بخش ارگانیک استخوان یافت می‌شود. (۵)، این پروتئین اسیدی بوده و به هیدروکسی آپاتیت کریستال‌های معدنی استخوان باند و سنتز آن به وسیله حضور کلسیتریول، که خود واسطه اتصال استئوکلاست‌ها از طریق ناحیه روشن به ماتریس

تحلیل استخوان به عنوان یکی از عوارض مهم درمانهای ارتودنسی مطرح می‌باشد و علی‌رغم تلاشهای محققان، عوامل مؤثر بر این پدیده به طور کامل شناخته شده نیستند، با این وجود محققان به نقش و تأثیر درمانهای ارتودنتیک بر بروز این پدیده اشاره کرده‌اند. (۱-۲)

استئوکلاست‌ها، سلول‌های چند هسته‌ای غول آسایی هستند که در روند تحلیل استخوان با حذف کردن ماتریکس معدنی آن حائز نقش مهمی می‌باشند. (۳-۴)، محققان بسیاری این سلول‌ها را در محل تحلیل فعال استخوان نشان داده‌اند، لذا

روش بررسی

در این مطالعه تجربی تعداد ۱۳ عدد موش نر Albino از نژاد Wistar هشت هفته‌ای با متوسط وزن بدن دویست گرم (210 ± 20) = محدوده وزنی) به طور تصادفی انتخاب شدند، در این مطالعه، در هر جانور، مولر اول سمت چپ فک بالا که دستگاه ارتودنسی روی آن نصب شد، گروه مورد و مولر اول سمت راست جانور که دستگاهی بر روی آن نصب نشد، برای دندان سمت چپ همان جانور، گروه شاهد داخلی را تشکیل می‌دهد. به منظور از بین بردن تأثیرات شرایط محیطی و متغیرهای مداخله‌گر ناشی از محیط نظیر تغذیه و نور و غیره، نمونه‌ها در تمام دوره آزمایش در محیط کاملاً یکسان نگهداری شدند. پیش از انجام مطالعه، تأییدیه کمیته اخلاق دانشگاه گرفته شد و در طول آزمایش نمونه‌ها بر طبق قوانین مصوب کمیته نگهداری و استفاده از حیوانات آزمایشگاهی نگهداری و از روشها و اعمالی که منجر به صدمه جسمی شدیدی در حیوان می‌شد، اجتناب شده است. به منظور نصب دستگاهها، جانوران در روز صفر با تزریق مخلوط داروی کتامین، (ساخت کارخانه Alfasan-Holand، به سفارش سازمان دامپزشکی ایران) به میزان پنجاه میلی‌گرم برکیلوگرم و ۰/۱ سی‌سی داروی Chlorpromazine (ساخت کارخانه تهران شیمی) به روش داخل صفاقی تحت بیهوشی عمومی قرار گرفتند. پس از کدگذاری جانوران فاصله موجود بین دندان مولر اول و دوم از طریق یک Gauge اندازه‌گیری و ثبت شد. یک قطعه سیم لیگاچور استیل ضدزنگ به قطر ۰/۰۰۸ اینچ از ناحیه سرویکال سطح تماس دو دندان مولر اول و دوم چپ فک بالای جانور رد شده و فنر با مشخصات (0.002×0.008 اینچ - طول = ۱۲ میلی‌متر) از جنس نیکل تایتانیوم از طریق حلقه انتهایی آن به مزیا دندان مولر اول سمت چپ فک بالای جانور متصل شد. سر دیگر فنر از طریق حلقه انتهایی آن به وسیله قطعه دیگری از سیم لیگاچور ضدزنگ و با تابیده شدن سیم لیگاچور به ناحیه یک سوم سرویکال دندانهای اینسیزورفک بالای جانور متصل و ثابت شد. شکل و آناتومی دندانهای اینسیزور جانور، آنها را برای این کار مناسب می‌سازد. به منظور تثبیت سیم روی دندانها و جلوگیری از آسیب به مخاط جانوران، انتهای آزاد سیم لیگاچور به وسیله کامپوزیت No-Mix (ساخت

استخوان است، تحریک می‌شود. از مطالعه موشهای فاقد استئوپونتین و مقایسه آنها با موشهای معمولی به این نتیجه رسیده‌اند که این موشها دارای کریستال‌های معدنی بزرگتر و معدنی‌تری هستند. (۶)، نتایج مطالعات حاکی از آن است که بروز ژن OPN نقش بسیار مهمی در تمایز و عملکرد استئوکلاست‌ها دارد. در مطالعه‌ای که Dodds بر روی لاکونا‌های تحلیلی انسان انجام داد، نشان داده شد که استئوکلاست‌ها و سطح تحلیل رفته استخوان در رنگ‌آمیزی با Tartrate - Resistant Acid Phosphate (TRAP) برای استئوپونتین مثبت بوده‌اند، این یافته قویاً مؤید نقش مهم استئوپونتین مترشحه از استئوکلاست‌ها در فرآیند تحلیل استخوان است. (۷)

در مطالعه‌ی Franzén با استفاده از موشهایی که به صورت ژنتیکی فاقد مولکول استئوپونتین بودند نشان داده شد که اگر چه حجم استخوان در این جانوران تغییر پیدا نکرده بود اما طول حاشیه‌ی چین‌دار (Ruffled border) استئوکلاست در استخوانهای این جانوران در مقایسه با جانوران طبیعی کوتاهتر بود که این مطلب نشانگر فعالیت کلاستیک کاهش یافته‌ی استئوکلاست‌هاست. (۸)

در مطالعه Ihara، با استفاده از موشهای فاقد استئوپونتین نشان داده شد که تعداد سلول‌های Trap positive در برابر اثر هورمون‌های پاراتیروئید افزایش پیدا نمی‌کند و در نتیجه تحلیل استخوان ناشی از عمل هورمون‌های پاراتیروئید رخ نمی‌دهد که این مطلب نیز مؤید نقش استئوپونتین در عملکرد تحلیلی استئوکلاست‌هاست. (۹)، برخلاف اینکه نتایج بسیاری از مطالعات انجام شده، حاکی از این مطلب هستند که استئوپونتین برای اتصال استئوکلاست‌ها به استخوان و عملکرد تحلیلی این مولکول‌ها ضروری است، از آنجا که هنوز محققان به بررسی بروز این ژن در تحلیل استخوان ناشی از نیروهای ارتودنتیک نپرداخته‌اند، این سؤال که آیا استئوپونتین در تحلیل استخوان ناشی از حرکات ارتودنتیک دندانها مؤثر است یا خیر بی‌جواب مانده است.

برای پاسخ به این سؤال و با در نظر داشتن نتایج حاصل از بررسیهای محققان گذشته، این مطالعه با هدف تعیین ارتباط بروز ژن OPN با تحلیل استخوان ناشی از حرکات ارتودنتیک دندان در موشهای صحرایی انجام شد.

کارخانه Dentaurum (آلمان) پوشانده شد. هر فنر قادر به وارد کردن نیرویی معادل شصت گرم نیرو بود که توسط نیروسنج به هنگام نصب اندازه‌گیری گردید. دندانهای سمت چپ فک بالایی جانور به عنوان گروه آزمایش و دندانهای سمت مقابل که هیچ درمانی دریافت نکرده بودند به عنوان گروه شاهد در نظر گرفته شدند.

پس از نصب وسیله، حیوانات به محل نگهداری منتقل شدند و در تمام مدت آزمایش (۲۱ روز) در شرایط محیطی و تغذیه‌ای یکسان نگهداری گردیدند. با استفاده از دسیکاتور محتوی کلروفورم اشباع شده، جانوران در روز ۲۱ کشته شدند. فک بالا بلافاصله کاملاً از سر جانور جداسازی و فاصله بین دندانهای مولر اول و دوم مجدداً اندازه‌گیری و به منظور مقایسه جهت تعیین میزان حرکت دندانی ایجاد شده، ثبت شد. از آنجا که حرکت دندانی بدون تحلیل استخوان آلوئول نگهدارنده دندان امکان‌پذیر نمی‌باشد، میزان حرکت دندانی و اختلاف فاصله بین دندانهای مولر اول و دوم جانوران پیش و پس از انجام مطالعه، معادل میزان حرکت دندانی و در نتیجه میزان تحلیل استخوان در نظر گرفته شد. بافت استخوان سمت مزیال دندانهای مولر اول گروه مورد و شاهد جانوران به وسیله فرز و دیسک‌های ظریف جداسازی و برای انجام آزمایشهای PCR ارسال گردید.

بافت استخوان جداسازی شده از سطح مزیال دندانهای مولر اول فک بالا گروه مورد و شاهد، درلوله‌های سرم فیزیولوژی به صورت Snap-frozen در برودت ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. نمونه‌ها در ابتدا با استفاده از نیتروژن مایع و به صورت مکانیکی هموژن شدند. محلول حاصل سپس به درون پتری دیش‌های یک بار مصرف تبخیر شده و سپس به میزان یک میلی‌لیتر بر گرم بافر (Fermentas, Lithuania) به RNase^{PLUS} به مخلوط اضافه شده و سپس به مدت پنج دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد. به منظور هموژن کردن بیشتر مخلوط از یک ماشین اولتراسونیک هموژن کننده (Ningbo Scintz Biotechnology Co, China) به مدت ۱۵ دقیقه استفاده شد.

در ادامه ششصد میلی‌لیتر کلروفورم، به ازای هر شش میکروگرم از ماده اضافه شده و مخلوط به لوله‌های سانتریفیوژ منتقل شد. لوله‌های سانتریفیوژ به مدت ۱۵ ثانیه تکان داده شده و سه دقیقه در دمای اتاق نگهداری شدند. نمونه‌ها سپس در

دمای چهار درجه سانتی‌گراد دوازده هزارگرم و به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. مرحله بالایی مخلوط به لوله‌های اپندورف منتقل و به ازای هر میلی‌لیتر از ماده ۱/۵ میلی‌گرم الکل ایزوپروپیل اضافه شد. نمونه‌ها سپس به مدت ده دقیقه انکوبه شده و پس از همین مدت با اتانول ۷۰٪ شسته شده و رسوبات آن به مدت دودقیقه در دوازده هزارگرم سانتریفیوژ شدند. RNA رسوب شده سپس در هفتادو پنج هزارگرم به مدت پنج دقیقه در دمای چهار درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ و سپس بر روی یخ خالی شده و برای پنج دقیقه با هوا در دمای اتاق خشک شد. با استفاده از آنزیم ترانسکریپتاز معکوس (Super-Script II; Bibco, Wickliffe, Ohio)، دو میکرولیتر پرایمرهای هگزامر، cDNA سنتز (در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت) و با استفاده از DNA پلیمرز (Amplitaq® DNA polymerase applied biosystems, USA -CA) بافر PCR (Applied biosystems)، پرایمرهای اختصاصی OPN و GAPDH (Sigma Aldrich, India)، کلریدکلسیم (Perkin Elmer/Cetus) و در شرایط زیر آمپلیفای شد. سی ثانیه برای دناتوراسیون در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، سی ثانیه برای آنیلینگ در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد و سی ثانیه برای طویل کردن در دمای ۷۲ درجه برای سی سیکل.

محصولات PCR سپس بر روی ژل آگارز ۲٪ الکتروفورز و به وسیله اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی و مورد بررسیهای دانسیتومتریک قرار گرفت.

میزان حرکت دندانی در تمامی نمونه‌های با استفاده از میزان تغییر ایجاد شده در فاصله بین مولرهای اول و دوم اندازه‌گیری و میزان تظاهر mRNA با تعریف یکا به صورت صفر، یک، دو، سه به ترتیب هیچ، کم، متوسط و زیاد به صورت Single practitioner و Assistant observer اندازه‌گیری و ثبت شد. داده‌ها با آزمون McNemar با استفاده از نرم‌افزار SPSS ویرایش ۱۱/۵ و با در نظر گرفتن خطای نوع اول آماری برابر ۰/۰۵ تحت تحلیلهای آماری قرار گرفتند.

یافته‌ها

افزایش وزن ۱۰٪-۱۲٪ در نمونه‌ها در جریان تحقیق مؤید آن است که دستگاههای ارتودنسی به کاررفته موجب تداخل با تغذیه نمونه‌ها نشده و نمونه‌ها دارای رشد و افزایش وزن

استئوکلستیک سلول‌های استئوکلست شرکت می‌کند. (۱۲) از نتایج سایر مطالعات که به بررسی بروز استئوپونتین در شرایط پاتولوژیک پرداخته‌اند چنین بر می‌آید که نقش این مولکول در استئوکلستوز در شرایط پاتولوژیک حائز اهمیت است. زنجیره استئوکلستوز که با واسطه هورمون‌های پاراتیروئید و RANKL فعال می‌شود در غیاب استئوپونتین به راه نمی‌افتد. (۹)

نتایج مطالعات Ishijima حاکی از آن است که حضور استئوپونتین برای قابلیت پاسخ گویی استخوان به نیروهای مکانیکی ضروری است (۱۳) و موش‌های فاقد استئوپونتین با آزمایش‌های سه بُعدی در مقابل تحلیل استخوان ناشی از فشار مکانیکی مقاومت می‌کنند. (۱۴)

بررسی نتایج مطالعات فوق در خصوص نقش استئوپونتین در تحلیل استخوان فیزیولوژیک و پاتولوژیک و همچنین تحت فشارهای مکانیکی با نتایج مطالعه حاضر که به بررسی بروز ژن OPN در پاسخ به فشارهای مکانیکی حاصل از حرکات ارتودنتیک دندان می‌پردازد، مطابقت دارد. در مطالعه حاضر، برای کاهش احتمال ترومای اوکلوزال، شیوه به کاررفته توسط Ashizawa (۱۵) تغییر یافته و به جای استفاده از صفحه فلزی قرار گرفته شده بر روی سطح اوکلوزال مولر اول، از سیم لیگچور برای اتصال فتر و متعاقب آن، حرکت ارتودنتیک دندان استفاده شد.

نتایج حاصل از این مطالعه، مؤید این مطلب بودند که شیوه به کاررفته برای ایجاد حرکت دندان در ایجاد این حرکت مؤثر است. این مطلب با یافته‌های Low (۱۶) و سیفی (۱۷) مطابقت دارد. ارزیابی آماری نتایج حاصل از اندازه‌گیری حرکت دندان حاکی از آن بودند که این شیوه با ایجاد حرکت دندان باعث ایجاد تحلیل استخوان معنی‌داری در گروه آزمایش در مقایسه با گروه کنترل می‌گردد که این مطلب با یافته‌های Chan نیز همخوانی دارد. (۱۸)

با توجه به این نکته که تا کنون کسی به بررسی تأثیر بروز ژن OPN بر تحلیل استخوان ناشی از حرکات ارتودنتیک دندان نپرداخته است، هیچ مطالعه‌ای نقیض یا مؤید یافته‌های حاصل از این بررسی وجود ندارد، با این وجود نتایج سایر محققان که به بررسی تأثیر این پروتئین بر تحلیل استخوان پرداخته‌اند، با نتایج حاصل از این بررسی مطابقت دارد. شیوه به کاررفته برای خارج سازی و تکثیر OPN mRNA از طریق ردیابی اختصاصی GAPDH به عنوان ژن کنترلگر

طبیعی بوده‌اند. اطلاعات و نتایج حاصل از بررسی‌های آماری میانگین و انحراف معیار حرکت دندان در نمونه‌های مربوط به گروه آزمایش حاکی از آن هستند که در نمونه‌های گروه آزمایش حداکثر حرکت دندان ۰/۹۵ میلی‌متر، حداقل ۰/۸۰ میلی‌متر، با میانگین ۰/۸۶ میلی‌متر و انحراف معیار داده‌ها ۰/۰۷ محاسبه شده است. (جدول ۱) با توجه به جابه‌جایی دندانها و تحلیل استخوان در سمت اعمال نیرو، تحلیل استخوان متناسب و معادل با جابه‌جایی دندان صورت گرفته است.

جدول ۱: میزان حرکت دندان گزارش شده در گروه آزمایش

انحراف معیار	۰/۰۷ میلی‌متر
میانگین	۰/۸۶ میلی‌متر
حداقل حرکت دندان	۰/۸۰ میلی‌متر
حداکثر حرکت دندان	۰/۹۵ میلی‌متر

بر اساس یافته‌های آزمایش RT-PCR، OPN mRNA در تمام نمونه‌های گروه آزمایش قابل ردیابی بوده و در هیچ یک از نمونه‌های گروه کنترل دیده نشدند. نتایج آماری حاصل از بررسی ژل آگارز تهیه شده از الکتروفورز نمونه‌های گروه دو برای ردیابی OPN mRNA و مقایسه نتایج دو گروه مورد و شاهد با استفاده از آزمون McNemar حاکی از معنی‌دار بودن اختلاف بروز mRNA این ژن در گروه مورد و شاهد است. ($P < 0.01$)

بحث

حرکات ارتودنتیک دندانها و عوارض جانبی ناگزیر آنها نظیر تحلیل استخوان از دیدگاه‌های متفاوتی مورد بحث قرار گرفته‌اند.

Rittlin و Liaw چنین باور دارند که استئوپونتین در روند رشد و تمایز استئوکلست‌ها در استخوان طبیعی نقش چندانی ایفا نمی‌کند زیرا تعداد و گسترش این سلول‌ها در جانورانی که به صورت ژنتیکی فاقد استئوپونتین بوده‌اند تفاوت چندانی با جانوران معمولی نداشته است. (۱۰-۱۱)، با این وجود دانشمندان چون Standal که پس از Rittlin و Liaw به بررسی این مولکول پرداختند چنین باور دارند که استئوپونتین، در روند هم‌مستاز فیزیولوژیک استخوان با کاهش میزان رسوب مواد معدنی و افزایش فعالیت

ایجاد حرکت دندان مؤثر است و حرکت دندانی ایجاد شده بدون تحلیل استخوان امکان پذیر نمی باشد. OPN mRNA در جریان تحلیل استخوان ناشی از حرکات ارتودنتیک دندانهای موش نر، تظاهر می یابد و این تظاهر به صورت معنی داری از گروه شاهد بیشتر است. این یافته مؤید نقش OPN در تحلیل استخوان ناشی از حرکات دندانی است.

تأیید شد. OPN mRNA در مقایسه با گروه کنترل افزایش معنی داری داشت. در واقع این مولکول در هیچ یک از ۱۳ نمونه گروه کنترل قابل ردیابی نبود و در تمام نمونه های گروه آزمایش که نیروهای ارتودنسی به دندانهایشان وارد شده بود، بروز متوسط تا بالایی داشت.

نتیجه گیری

شیوه به کار رفته در این مطالعه (NiTi closed coil) در

REFERENCES

1. Nelson PA, Artun J. Alveolar bone loss of maxillary anterior teeth in adult orthodontic patients. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 1997 Mar;111(3):328-34.
2. Janson G, Bombonatti R, Brandão AG, Henriques JF, de Freitas MR. Comparative radiographic evaluation of the alveolar bone crest after orthodontic treatment. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2003 Aug;124(2):157-64.
3. Zhao H, Patrick Ross F. Mechanisms of osteoclastic secretion. *Ann N Y Acad Sci*. 2007 Nov;1116:238-44.
4. Kirstein B, Chambers TJ, Fuller K. Secretion of tartrate-resistant acid phosphatase by osteoclasts correlates with resorptive behavior. *J Cell Biochem*. 2006 Aug ;98(5):1085-94.
5. You J, Reilly GC, Zhen X, Yellowley CE, Chen Q, Donahue HJ, Jacobs CR. Osteopontin gene regulation by oscillatory fluid flow via intracellular calcium mobilization and activation of mitogen-activated protein kinase in MC3T3-E1 osteoblasts. *J Biol Chem*. 2001 Apr;276(16):13365-71.
6. Shapses SA, Cifuentes M, Spevak L, Chowdhury H, Brittingham J, Boskey AL, Denhardt DT. Osteopontin facilitates bone resorption, decreasing bone mineral crystallinity and content during calcium deficiency. *Calcif Tissue Int*. 2003 Jul;73(1):86-92.
7. Dodds RA, Connor JR, James IE, Rykaczewski EL, Appelbaum E, Dul E, Gowen M. Human osteoclasts, not osteoblasts, deposit osteopontin onto resorption surfaces: An in vitro and ex vivo study of remodeling bone. *J Bone Miner Res*. 1995 Nov;10(11):1666-80.
8. Franzén A, Hulténby K, Reinholt FP, Önerfjord P, Heinegård D. Altered osteoclast development and function in osteopontin deficient mice. *J Orthop Res*. 2008 May;26(5):721-8.
9. Ihara H, Denhardt DT, Furuya K, Yamashita T, Muguruma Y, Tsuji K, Hruska KA, Higashio K, Enomoto S, Nifuji A, Rittling SR, Noda M. Parathyroid hormone-induced bone resorption does not occur in the absence of osteopontin. *J Biol Chem*. 2001 Apr ;276(16):13065-71.
10. Rittling SR, Matsumoto HN, McKee MD, Nanci A, An XR, Novick KE, Kowalski AJ, Noda M, Denhardt DT. Mice lacking osteopontin show normal development and bone structure but display altered osteoclast formation in vitro. *J Bone Miner Res*. 1998 Jul;13(7):1101-11.
11. Liaw L, Birk DE, Ballas CB, Whitsitt JS, Davidson JM, Hogan BL. Altered wound healing in mice lacking a functional osteopontin gene (spp1). *J Clin Invest*. 1998 Apr;101(7):1468-78.

12. Standal T, Borset M, Sundan A. Role of osteopontin in adhesion, migration, cell survival and bone remodeling. *Exp Oncol*. 2004 Sep;26(3):179-84.
13. Ishijima M, Tsuji K, Rittling SR, Yamashita T, Kurosawa H, Denhardt DT, Nifuji A, Ezura Y, Noda M. Osteopontin is required for mechanical stress-dependent signals to bone marrow cells. *J Endocrinol*. 2007 May;193(2):235-43.
14. Ishijima M, Tsuji K, Rittling SR, Yamashita T, Kurosawa H, Denhardt DT, Nifuji A, Noda M. Resistance to unloading-induced three-dimensional bone loss in osteopontin-deficient mice. *J Bone Miner Res*. 2002 Apr;17(4): 661-7.
15. Ashizawa Y, Sahara N. Quantitative evaluation of newly formed bone in the alveolar wall surrounding the root during the initial stage of experimental tooth movement in the rat. *Arch Oral Biol*. 1998 Jun;43(6):473-84.
16. Low E, Zoellner H, Kharbanda OP, Darendeliler MA. Expression of mRNA for osteoprotegerin and receptor activator of nuclear factor kappa beta ligand (RANKL) during root resorption induced by the application of heavy orthodontic forces on rat molars. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2005 Oct;128(4):497-503.
17. Seifi M, Eslami B, Saffar AS. The effect of prostaglandin E2 and calcium gluconate on orthodontic tooth movement and root resorption in rats. *Eur J Orthod*. 2003 Apr;25(2):199-204.
18. Chan E, Darendeliler MA. Physical properties of root cementum: Part 5. Volumetric analysis of root resorption craters after application of light and heavy orthodontic forces. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2005 Feb;127(2):186-95.