مقاله پژوهشی

اندازه‌گیری سیالوپروتئین عاج دندان سالم و پوسیده انسانی

دکتر دردی قوجق* ، دکتر صفری واثق قزل‌قلعه** ، دکتر علی زمانیان**

چکیده

سیالوپروتئین یکی از فراوان‌ترین پروتئین‌های غیرکلاژنی و گلیکوپروتئین فسفریله بدن انسان است. این پروتئین در ساختمان دندان نقش مهمی دارد. هدف از انجام این تحقیق اندازه‌گیری مقدار سیالوپروتئین عاج دندان سالم و پوسیده برای بررسی تغییرات ساختمانی دندان است. در این مطالعه تعداد ۵۰ عدد دندان پوسیده از افراد مورد مطالعه، مراجعه‌کننده به کلینیک، تهیه شد. سپس عاج‌های دندان‌ها جدا، و در نیتروژن مایع قرار داده شدند. برای تهیه هریک از نمونه‌ها، یک گرم از هر عاج دندان به مدت ۳۰ دقیقه، با آب مقطر شسته شد. سپس پودر تهیه شده به یافر حاوی گوانیدین - HCL تریس انتقال داده شد و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۴ درجه در یخچال انکوبه گردید. سوسپانسیون بدست آمده در دور ۳۰۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ شد و محلول رویی جدا گردید. نمونه‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در دور ۱۰۰۰۰ سانتریفوژ و یک میلی‌لیتر محلول رویی آن به ستون کروماتوگرافی حاوی سفارز انتقال داده شد و با محلول گوانیدین - HCL تریس و با سرعت یک میلی‌لیتر در دقیقه شسته شد. فراکشن‌های بدست آمده از کروماتوگرافی هریک به طور مجزا الکتروفورز گردید. مقدار سیالوپروتئین عاج دندان پوسیده برابر با ۱/۴۵ ± ۱۷/۲۳ میکروگرم در لیتر و در عاج دندان سالم برابر با ۴/۲۷ ± ۲۶/۳۹ میکروگرم در لیتر بود. یافته‌های حاصل از این پژوهش نشان داد که میزان سیالوپروتئین در قسمت عاج دندان پوسیده و یا بخش پوسیده دندان مورد مطالعه نسبت به قسمت عاج دندان سالم و یا بخش سالم دندان‌های مورد مطالعه در حدود ۱/۵ برابر کمتر است.

واژه‌های کلیدی : سیالوپروتئین، الکتروفورز، کروماتوگرافی

---

* - دانشیار گروه بیوشیمی و بیوفیزیک دانشکدهٔ پزشکی دانشگاه علوم پزشکی بابل ، نمابر : ۲۲۹۰۱۸۱-۰۱۱ ، E-mail : dqujeq@hotmail.com

** - دانشکده دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی بابل

مقدمه

نقش سیالوپروتئین در تشکیل ساختمان استخوان و یا در حفظ ساختمان آن هنوز ناشناخته است. وزن ملکولی سیالوپروتئین از طریق استفاده از پروتئین متصل به کلسیم تعیین شد، اما سایر خصوصیات آن مشخص نشده است (۱). پروتئین‌های غیرکلاژنی تقریباً ۱۰درصد ماتریکس ارگانیک استخوان پستانداران را تشکیل می‌دهند (۲). سیالوپروتئین، یک گلیکوپروتئین فسفریله شدهٔ اسکلتی است (۳). ارتباط بین نارسایی مفصلی زانو و غلظت سیالوپروتئین بررسی شده است. نتایج نشان داده است که غلظت سیالوپروتئین در افراد با نارسایی استخوان نسبت به افراد بهنجار بالاتر است (۵و۴). فیبروز دیسپلازی استخوان در نشانگان مک‌کان البرایت بررسی شد. نتایج بدست آمده لزوم فیبروز دیسپلازی استخوان را نشان داد (۷و۶). در برخی مطالعات تغییرات سوخت و سازی ماتریکس استخوان بعد از آسیب مفصلی و استئوآرتریت پیش مفصلی را به وسیلهٔ سیالوپروتئین بررسی کرده‌اند. در یکی از این بررسی‌ها مشخص شد که نسبت غلظت سیالوپروتئین در مایع مفصلی و سرم بیشتر از ۱ است (۸). طی یک مطالعهٔ دیگر نقش سیالوپروتئین در ارتباط با تشکیل و بازسازی استخوان مورد بررسی قرار گرفت. نتایج بدست آمده در حضور 1,25-(OH)2D3 تحلیل نسبتاً زیاد بافت و افزایش سنتز سیالوپروتئین با دگزامتازون را نشان داد. البته اثرات متفاوت 1,25-(OH)2D3 روی سیالوپروتئین شاید نشان‌دهندهٔ تحریک بازسازی استخوان باشد (۱۰و۹). همچنین در یک مطالعه که در بارهٔ توانایی توده‌زایی (تومورژنزیس)، متاستاز پروتئین‌های ماتریکس خارج سلولی و ترکیبات ضدچسبنده در سلول‌های سرطانی صورت پذیرفت، معلوم شد که ترکیبات حلقه‌ای مصنوعی خاصیت ضدچسبنده در سلول‌های سرطانی استخوان موجود زنده دارند (۱۱). نتایج یک بررسی دیگر در بارهٔ سنتز سیالوپروتئین استخوانی از اپی‌تلیوم مینایی نشان داد که سنتز سیالوپروتئین به وسیله اپی‌تلیوم مینایی، باعث القاء رشد دندان‌ها شده و سیالوپروتئین، در تشکیل مینا و کانی‌شدگی (مینرالیزیشن) بعدی آن نقش مهمی دارد. سنتز سیالوپروتئین در امیلوبلاستوما با سنتز آن به وسیله اپی‌تلیوم مینایی و سنتز سیالوپروتئین به وسیلهٔ بافت‌های نئوپلاستیک هماهنگ است. هدف از انجام این پژوهش بررسی تغییرات سیالوپروتئین در عاج دندان به منظور ارزیابی تغییر ساختمان دندان در بخش عاج، و همچنین درک مکانیسم اثر سیالوپروتئین در مراحل کانی‌شدن عاج دندان انجام شده است.

وسایل و روش‌ها

مواد شیمیایی مورد نیاز

گوانیدین - HCL، سرم آلبومین، سفارز، نیتروسلولز، بافرهای فسفات، ستون شیشه‌ای، لوله آزمایش مختلف، تریس، فیلتر، محلول‌های مختلف، استات سلولز، محلول‌های رنگ‌آمیزی ژل و محلول رنگ‌بر.

دستگاه‌های مورد استفاده

اسپکتروفتومتر مدل Ceicil، کروماتوگرافی ستونی مدل MPC، سانتریفوژ مدل Clement، الکتروفورز مدل L4.

روش تهیه پودر عاج دندان

دندان‌های مورد مطالعه از کلینیک دندانپزشکی تهیه شدند. ۵۰ عدد دندان کانین، پرمولرومولر از افراد مراجعه کننده در سنین ۵۴-۱۷ سال تهیه شدند. از هر دندان تهیه شده از بخش سالم آن به عنوان کنترل (سالم) و از بخش پوسیده به عنوان تست (نمونه مورد مطالعه) استفاده شد. ابتدا دندان‌های جمع آوری شده که در محلول ساولن نگهداری شده بودند، با آب مقطر شستشو داده، و سپس به وسیلهٔ جریان هوا خشک شدند. برای تهیه پودر عاج، با توربین، و با حداکثر سرعت و حداکثر میزان آب، مینای سطحی دندان‌ها تراشیده شد تا عاج دندان نمایان گردد. پس از اطمینان از برداشت کامل مینا از روی دندان (با توجه به ضخامت مینا در نواحی مختلف دندان و تغییر شکل ساختمانی آن) قسمت باقی‌مانده یا عاج دندان با سوهان تراشیده شد و پودر عاج تهیه گردید.

روش حل کردن پودر عاج دندان

یک گرم از پودر دندان (قسمت عاج) به مدت ۳۰دقیقه در آب مقطر شسته شد. سپس پودر آن خشک گردید و به بافر حاوی

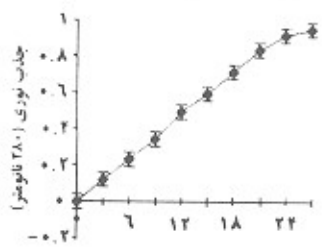
۵۰۰ میلی‌لیتر اسیدکلریدریک - گوانیدین، ۵۰ مول در لیتر و ۴ میلی مول تریس با PH = ۷/۲۵ انتقال داده شد و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. سپس در دور ۳۰۰۰ به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفوژ، و محلول رویی آن جدا شد. پروتئین‌های دندان (قسمت عاج) با محلول EDTA - سدیم ۰/۵ مول در لیتر در ۲ لیتر از بافر گوانیدین - اسیدکلریدریک جدا شد. محلول بدست آمده در دور ۳۰۰۰ به مدت ۳۰ دقیقه مجدداً سانتریفوژ شد. محلول رویی حاصله برای حذف چربی‌های آن از صافی عبور داده شد. این محلول، برای ژل فیلتراسیون در مرحله بعدی مورد استفاده قرار گرفت. محلول کلوئیدی حاصل هریک به صورت جداگانه از ژل سفادکس در کروماتوگرافی ستونی عبور داده شد و محلول عبور داده شده از ستون در ۱۰ لوله آزمایش هرکدام به حجم ۲۰قطره جمع آوری گردید.

روش ژل فیلتراسیون

نمونه‌های ۱۰ میلی‌لیتری از عاج دندان تهیه شده به مدت ۲۰ دقیقه در g × ۱۰۰۰۰ سانتریفوژ و یک میلی‌لیتر از محلول رویی آن به ستون کروماتوگرافی حاوی سفارز با 4B (۱×۵۰ cm) انتقال داده شد و با گوانیدین - اسیدکلریدریک ۵۰ میلی‌مول در لیتر تریس با PH= ۷/۲۵ و سرعت جریان یک میلی‌لیتر در دقیقه عبور داده شد. محلول عبور داده شده از ستون کروماتوگرافی در حجم‌های ۳ میلی‌لیتری در لوله‌های آزمایش شماره گذاری و جمع‌آوری شد و در طول موج ۲۸۰ نانومتر با اسپکتروفتومتر، جذب هریک از لوله‌های آزمایش قرائت گردید.

روش الکتروفورز سیالوپروتئین

هریک از نمونه‌های بدست آمده از کروماتوگرافی، به طور جداگانه الکتروفورز گردید. برای انجام الکتروفورز، هریک از نمونه‌ها، با ۹۸۰ میلی‌لیتر از اتانل، ۱۰ برابر رقیق شد و پروتئین‌های



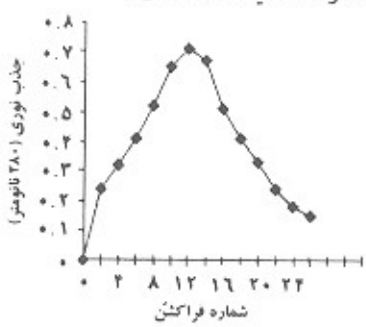
نمودار ۱: منحنی استاندارد اندازه‌گیری سیالوپروتئین

آن در دمای ۲۰-درجه در مدت ۳ ساعت رسوب داده شد. نمونه‌های بدست آمده در g × ۱۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ گردید و سپس با اتانل شسته شد. همه نمونه‌ها با شرایط زیر الکتروفورز شدند.

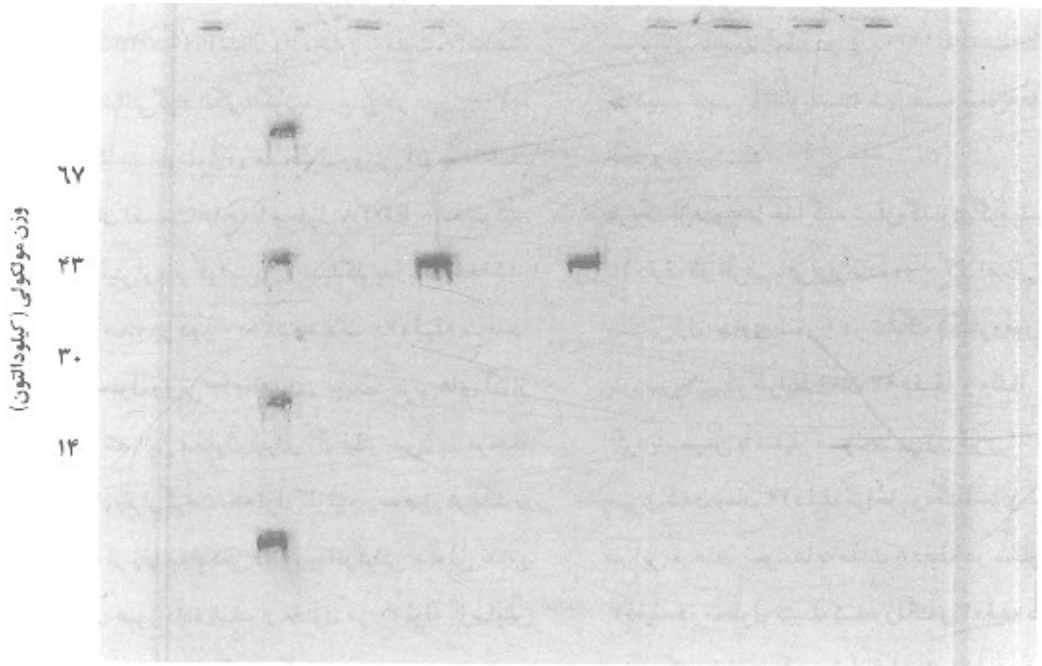
هریک از نمونه‌ها جداگانه شماره‌گذاری گردید و به مدت ۱۰ الی ۱۵ دقیقه در ظرف بافر قرار داده، و حلال اضافی آن از ژل گرفته، سپس ژل حاوی نمونه در تانک الکتروفورز قرار داده شد. پاورسوپلای در شرایط زمان ۲۳ دقیقه و ولتاژ ۲۴۰ ولت تنظیم گردید. سپس با سمپلر نمونه‌ها در ژل قرار داده شدند و پس از سپری شدن زمان ۲۳ دقیقه مراحل رنگ‌آمیزی نمونه‌ها انجام شد. در این مرحله، نمونه‌ها به مدت ۸ دقیقه در محلول رنگ‌آمیزی و ۳ دقیقه در محلول تثبیت‌کننده رنگ و ۳ دقیقه در محلول رنگ‌بر و نیز یک دقیقه در آب مقطر قرار داده شدند. آنگاه، همه آنها، ۱۵ دقیقه در دمای ۱۱۰-۱۰۰ درجه قرار گرفتند و در نهایت ۵ دقیقه نیز با در نیمه‌باز نگه داشته شدند. در پایان، نتایج هریک از نمونه‌های الکتروفورز شده مورد بررسی قرار گرفت. مقدار هریک از فراکشن‌های جداشده با اسپکتروفتومتر اندازه گیری شد.

یافته‌ها

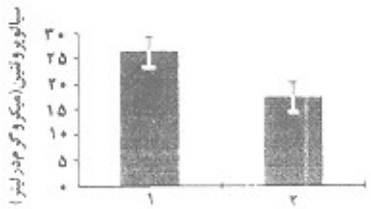
در نمودار ۱ منحنی کالیبراسیون استاندارد اندازه گیری سیالوپروتئین، نشان داده شده است. به طوری که نتایج نشان می‌دهند تا حدود ۲۵ میکروگرم در لیتر منحنی به صورت خطی است. در نمودار ۲ نمونه کروماتوگرافی سیالوپروتئین نشان داده شده است. بهترین نمونه برای جداسازی سیالوپروتئین، نمونه شماره ۱۲ کروماتوگرافی است. در نمودار ۳، نمونه الکتروفورز سیالوپروتئین نشان داده شده است. در نمودار ۴ مقدار سیالوپروتئین در عاج افرادی که دندان سالم دارند با افرادی که دندان پوسیده دارند، مقایسه شده است.



نمودار ۲: کروماتوگرافی سیالوپروتئین



نمودار ۳: الکتروفورز نمونه سیالوپروتئین سرم



نمودار ۴: مقایسه مقدار سیالوپروتئین عاج دندان در بخش سالم (۱) و بخش پوسیده دندان (۲). (مقادیر بر حسب میکروگرم در لیتر و با میانگین ± انحراف استاندارد بیان شده است.)

بحث

سیالوپروتئین علاوه بر استئوکلسین و استئونکتین، پروتئین غیرکلاژنی ماتریکس خارج سلولی استخوان است. آن یک گلیکوپروتئین فسفریله با وزن مولکولی تقریبی ۷۰ تا ۸۰ کیلودالتون است (۲). این پروتئین در استئوبلاست‌ها و استئوسیت‌ها وجود دارد. میزان طبیعی آن برابر با ۳/۷۶ ± ۲۷/۴۱ میکروگرم در لیتر است. برای بررسی بیماری‌های مرتبط با تغییرات آسیب شناختی استخوان، مانند افزایش سریع پوکی‌استخوان، سیالوپروتئین یک نشانگر مناسب به حساب می‌آید (۱۲). سیالوپروتئین سبب تحریک تشکیل هیدروکسی آپاتیت می‌شود و به صورت یک ترکیب چسبنده واسطه‌ای بین سلول‌های سطحی و ترکیبات ماتریکس خارج سلولی عمل می‌کند. این پروتئین در مقایسه با پروتئین‌های غیرکلاژنی دیگر، توزیع بافتی محدودی دارد. سیالوپروتئین در کانی‌شدن بافت همبند نقش دارد و در تشکیل و بازسازی استخوان دخالت می‌کند. این پروتئین به وسیلهٔ سلول‌های استخوان در جریان تشکیل استخوان، سنتز می‌شود. از نمودار ۱ منحنی استاندارد اندازه گیری سیالوپروتئین این پژوهش برمی‌آید که تا غلظت ۲۵ میکروگرم در میلی‌متر، منحنی مزبور به صورت خطی است و حساسیت و دقت کافی برای اندازه گیری سیالوپروتئین عاج دندان را دارد. در نمودار ۲ نشان داده شده است که فراکشن ۱۲ کروماتوگرافی برای جداسازی سیالوپروتئین مناسب است. این منحنی نشان می‌دهد که روش کروماتوگرافی این پژوهش، روشی مناسب برای جداسازی سیالوپروتئین است.

نمودار ۳ الکتروفورز سیالوپروتئین نشان دهنده انتخاب شرایط مناسب برای جداسازی و شناسایی سیالوپروتئین است و فراکشن ۶۷کیلودالتون مربوط به سیالوپروتئین است. یافته‌های این پژوهش با نتایج سایر محققان که وزن مولکولی سیالوپروتئین را

در حدود ۸۰-۶۰ کیلودالتون گزارش داده‌اند منطبق و قابل مقایسه است (۳و۲و۱). یافته‌های این پژوهش نشان داده‌اند که مقدار سیالوپروتئین در قسمت عاج دندان که پوسیدگی دارند نسبت به قسمت‌هایی از عاج که مربوط به دندان سالم هستند کاهش می‌یابد و این یافته‌ها با نتایج سایر محققان که مقدار سیالوپروتئین را در بیماری‌های مختلف مورد بررسی قرار داده‌اند مطابق و قابل مقایسه است (۱۳و۱۲و۱). چون سیالوپروتئین به طور اولیه محصول استئوبلاست‌هاست، یافته‌ها نشان می‌دهند که سیالوپروتئین احتمالاً انعکاسی از فرایندهای مصادف با تشکیل و تحلیل استخوان است. مطالعات مختلف نشان داده‌اند که توزیع سیالوپروتئین به وسیله کلیه کنترل می‌شود و کبد نقش کمی در تنظیم سوخت و ساز این گلیکوپروتئین ایفا می‌کند (۸). سیالوپروتئین در تشکیل مینا و کانی‌شدن (مینرالیزاسیون) آن نقش دارد (۱۳). مطالعات نشان داده‌اند که سیالوپروتئین در تداخل اپی‌تلیوم مزانشیمال در مراحل رشد و تکوین دندان‌ها نقش دارد (۱۵و۱۴). عاج که بخشی از دندان است با مینا در ناحیه تاج و با سیمان در ناحیه ریشه ارتباط دارد، مواد معدنی کمتری دارد و توبول‌های عاج، مسیری برای حرکت اسیدها به داخل آن و راهی برای خروج مواد معدنی و سیالوپروتئین به شمار می‌رود، در نتیجه باعث کاهش سیالوپروتئین در بخش پوسیدهٔ عاج می‌شود و مقدار سیالوپروتئین در سرم نسبت به گروه کنترل افزایش می‌یابد. نتایج بدست آمده از این پژوهش نیز این موضوع را تایید می‌نماید. مقدار سیالوپروتئین عاج دندان پوسیده برابر با ۱/۴۵ ± ۱۷/۲۳ میکروگرم در لیتر و در عاج دندان سالم برابر با ۴/۲۷ ± ۲۶/۳۹ میکروگرم در لیتر است. این نتایج نیز با یافته‌های سایر محققان مطابق است (۱۵و۱۴و۱۲).

تشکر و قدردانی

از حمایت‌های معاونت محترم پژوهشی و شورای محترم پژوهشی دانشکدهٔ دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی بابل برای انجام این پژوهش سپاسگزاری می‌شود.

منابع

1 - Fisher LF, Whitson SW, Avioli LV, Termine JD. Matrix sialolprotein of developing bone. The Jouranl of Biological Chemistry, 1983; 258 (20): 12723-12727.

2 - Fisher LF, Hawkins GR, Tuross N, Termine JD. Purification and partial characterization of small proteoglycans I and II, Bon esialoprotein I and II, and osteonectin from the mineral comartment of developing human bone. The Journal of Biological Chemistry. 1987; 262(2): 9702-9708.

3 - Karmatschek M, Maier I, Seibel MJ, Woitge HW, Ziegler R, Armbruster F. Improved purification of human bone sialoprotein and development of a homologus radioimunoassay. Clinical Chemistry 1997; 43(11): 2076-2082.

4 - Peterson IF, Boegard T, Dahlstrom J, Svensoon B, Heinegard D, Saxne T. Bone scan and serum markers of bone cartilage in patients with knee pain and osteo arthritis. Osteoarthritis Cartilage. 1998; 6(1): 33-39.

5 - Peterson IF, Boegard T, Dahlstrom J, Svensoon B, Heinegard D, Saxne T. Changs in cartilage and bone metabolism identified by serum markers in early osteoarthritis of the knee joint. Br.J.Rheumatol. 1998; 37(1): 46-50.

6 - Kondo H, Ohyam T, Ohya K, Kasugai S. Temporal changes of mRNA expression of matrix proteins and parathyroid hormone and parathyroid hormon - related protein (PTH/PTHrp) receptor in bone development. J Bone Miner Res. 1997; 12(12): 2089-2097.

7 - Riminucci M, Fisher LW, Shenker A, Spiegel AM, Bianco P, Gerhon P. Fibrous dysplasia bone in the mccune. Albright syndrome : abnormalities in bone formaton see comments Am J Pathol. 1997; 151(6): 1587-1600.

8 - Lohmander LS. Incresed concentrations of bone

sialoprotein in joint fluid after knee injury. Ann Rheum Dis. 1996; 55(9): 622-626.

9 - LI.IW.Cheifetz S, McCulloch CA, Smpath KT, Sodek J. Effects of osteogenic protein-1 (op-1, BMP-1) on bone matrix protein expression by fetal rat calvarial cells are differentiation stage specific. J Cell Physiol. 1996; 169 (1) : 115-125.

10- Chen J, Thomas HF, Sodek J. Regulation of bone sialoprotein and osteopontin mRNA exprossion by dexamethasone and 1,25-dihroxy vitamin D_3 in rat bone organ cultures. Connect Tissue Res. 1996; 34(1): 41-57.

11- Van.der.Pluijm G, Vloedgraven HJ, Ivanov B, Robey FA, Grzesik WJ. Bone sialoprotein peptides are potent inhibitors of breast concer cell adhesion to bone. Cancer Res. 1996; 56(8): 1948-1955.

12- Butler WT. Dentin matrix proteins. Eur J Oral Sci. 1998; 106 (1): 204-210.

13- Chen J, Sasaguri KI, Sodek J, Aufdemorte TB, Jaiang H, Thomas HF. Enamel epithelium expresses bone sialoprotein (BSP). Eur J Oral Sci. 1998; 106 (1): 331-336.

14- Bosshardt DD, Nanci A. Immanolocalization of epithelal and mesenchymal matrix constituents in association with inner enamel epthelial cells. J Histochem Cytochem. 1998; 46(2): 135-142.

15- Ritchie HH, Berry JE, Somerman Hanks CT, Bronckers AL, Hotton D, Papagerakis P, Berdal A. But dentin sialoprotein (DSP) transcripts : developmentally - sustained expression in odontoblasts and transient expression in pre-ameloblasts. Eur J Oral Sci. 1997; 105 (1): 405-413.