

اندازه‌گیری سیالوپروتئین سرم و بررسی ارتباط آن با تغییرات ساختمانی مینا و عاج دندان

دکتر دردی قوجق* - دکتر صغری واثق قزل قلعه** - دکتر علی زمانیان***

*استادیار گروه آموزشی بیوشیمی و بیوفیزیک دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی بابل

**دندانپزشک

***استادیار گروه آموزشی ترمیمی دانشکده دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی بابل

Title: Measurement of Sialoprotein and its Relationship with Dentin and Enamel Structural Differentiation

Authors: Qujeq D. Assistant Professor*, Vasegh Ghezel Ghaleh S. Dentist, Zamanian A. Assistant Professor*

Address: * Babol University of Medical Sciences

Abstract: Sialoprotein is a phosphorylated skeletal glycoprotein. The function of sialoprotein is still not fully understood. It is possible that this component participate in cell differentiation and the conversion of unmineralized matrix into mineralized structures. The purpose of the present study was to determine the serum sialoprotein concentration in-patient and normal subjects to investigate the relationship between serum sialoprotein and dentin, enamel structural differentiation. The study group consisted of 50 patients, 32 males and 18 females, aged 17-54 (with an average of 32.5 years). The control group consisted of 50 normal volunteers, 26 males and 24 females, age 22-51 (with an average of 39.60 years). The laboratory data of this group were used as a reference. Human blood was obtained from control and patient group. The blood sample was centrifuged at 3000* g for 20 min, the supernatant was discarded. Then each sample was centrifuged for 20 min at 10000 g applied to a sepharose column and eluted with 4 moll Guanidine - HCL at 50 moll tris, pH 7.4 at a flow rate of 0.5 ml/min. The fractions obtained by chromatography was monitored by electrophoresis. Our results showed that sialoprotein control increased in patients serum (18.45+/-3.21 micro gr/L) compared to normal subjects (11.37+/-2.45 micro gr/L).

Key Words: Sialoprotein- Electrophoresis- Chromatography

Journal of Dentistry. Tehran University of Medical Sciences (Vol. 14, No:1, 2001)

چکیده

سیالوپروتئین، یک گلیکوپروتئین اسکلتی فسفریله است که نقش آن بخوبی درک نشده است. ممکن است این گلیکوپروتئین در تمایز سلولی و تبدیل ماتریکس غیر معدنی به ساختمان معدنی در دندان مؤثر باشد. هدف از انجام این تحقیق، اندازه‌گیری مقدار سیالوپروتئین در سرم افراد سالم، که دندان پوسیده ندارند و در بیماران دارای حداقل دو دندان پوسیده و بررسی ارتباط آن با تغییرات ساختمانی مینا و عاج دندان می‌باشد. گروه مطالعه شامل ۵۰ نفر (۳۲ نفر مرد و ۱۸ نفر زن) در سنین ۱۷ تا ۵۴ سال (با متوسط سنی ۳۲/۵ سال) بود. گروه کنترل شامل ۵۰ نفر (۲۶ نفر مرد و ۲۴ نفر زن) در سنین ۲۲ تا ۵۱ سال (با متوسط سنی ۳۹/۶ سال) بود. نتایج آزمایشگاهی گروه اخیر به عنوان مرجع مورد استفاده قرار

گرفته است. برای انجام پژوهش، نمونه خون از افراد مراجعه‌کننده به کلینیک دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی بابل تهیه شد. نمونه خون تهیه شده از هر مورد در دور ۳۰۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ شد و محلول بالایی جدا گردید. نمونه‌های به‌دست آمده به مدت ۲۰ دقیقه در دور ۱۰۰۰۰ سانتریفوژ و سپس محلول رویی به ستون کروماتوگرافی حاوی ژل سفارز انتقال داده شد و با گوانیدین-HCL با غلظت ۴ مول در لیتر و تریس ۰/۱ مولار با $\text{pH}=7/4$ انتقال داده شد و با سرعت ۰/۵ میلی‌لیتر در دقیقه شسته شد. فراکشن‌های به‌دست آمده توسط کروماتوگرافی هر یک از نمونه‌ها به طور مجزا الکتروفورز گردید. نتایج این مطالعه نشان داد که مقدار سیالوپروتئین در سرم افراد دارای دندان پوسیده بیشتر و برابر با $18/45 \pm 3/21$ میکروگرم در لیتر و در سرم گروه کنترل برابر با $11/37 \pm 2/45$ میکروگرم در لیتر می‌باشد.

کلید واژه‌ها: سیالوپروتئین- الکتروفورز- کروماتوگرافی

مجله دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی تهران (دوره ۱۴، شماره ۱، سال ۱۳۸۰)

مقدمه

اهمیت پروتئین‌های غیر کلاژنی فسفریله از جمله سیالوپروتئین در تشکیل و یا حفظ ساختمان استخوان هنوز ناشناخته است؛ اگرچه وزن مولکولی سیالوپروتئین مشخص شده است، اما سایر خصوصیات آن تعیین نشده است.

مشخص شده است که در شرایط پوسیدگی دندانها، افزایش و یا کاهش این گلیکوپروتئین غیرکلاژنی، فسفریله‌شده اسکلتی اهمیت دارد (۱). پروتئین‌های فسفریله غیر کلاژنی از جمله سیالوپروتئین که حاوی مقدار زیادی از سیالیک اسید است، تقریباً ۸ تا ۱۰٪ ماتریکس استخوان پستانداران را تشکیل می‌دهند (۲).

نتایج سایر تحقیقات نشان داده است که مقدار سیالوپروتئین در بیماران مبتلا به پازه استخوانی، هیپرپاراتیروئیدیسم اولیه و ثانویه و نیز در کسانی که نقص کلیوی دارند، افزایش می‌یابد (۳).

نتایج بررسی ارتباط بین نارسایی استخوانی و غلظت سیالوپروتئین، نشان داده است که غلظت سیالوپروتئین افراد با نارسایی استخوانی نسبت به حالت نرمال بالاتر است (۵،۴).

نتایج حاصل از بررسی شرایط فیروز دیسپلازی

استخوان در سندرم مک‌کان‌آلبرایت، نشانگر تغییرات سیالوپروتئین در این سندرم بوده است (۶،۷).

بررسی تغییرات متابولیسم ماتریکس استخوان بعد از ترومای مفصلی و پره‌آرتیکولر نشان داد که غلظت سیالوپروتئین در این موارد در مقایسه با حالت نرمال در مایع مفصلی نسبت به سرم افزایش می‌یابد (۸).

بررسی توانایی سیالوپروتئین در ارتباط با تشکیل بازسازی استخوان نشان داد افزایش $2D_3$ (OH) 25- 1 باعث تجزیه بافت استخوانی می‌شود؛ همچنین دگزامتازون موجب افزایش مقدار سنتز سیالوپروتئین می‌گردد. ممکن است اثرات متفاوت $2D_3$ (OH) 25- 1 بر روی سیالوپروتئین، نشان‌دهنده تحریک و یا مهار بازسازی استخوان باشد (۱۰،۹).

بررسی توانایی تومورونزیس و متاساز پروتئین‌های ماتریکس خارج سلولی و ترکیبات ضدچسبنده در سلول‌های سرطانی نشان داد که ترکیبات سیکلیک سنتتیک می‌توانند خاصیت ضدچسبندگی برای سلول‌های سرطانی استخوانی در بدن موجود زنده داشته باشند (۱۱).

نتایج بررسی سنتز سیالوپروتئین استخوانی از اپی‌تلیوم مینایی نشان داد که بیوسنتز سیالوپروتئین به وسیله

رنگ آمیزی ژل، محلول رنگ بر ژل از نمایندگی شرکت سیگما تهیه شد. سایر ترکیبات و مواد شیمیایی از نمایندگی شرکت مرک تهیه گردید. در همه آزمایشها از آب مقطر دو بار تقطیر و عاری از یون استفاده شد.

تجهیزات شامل کروماتوگرافی ستونی با تجهیزات MPC، سانتریفوژ مدل Clement، الکتروفوروز مدل L4، اسپکتروفتومتر مدل Ceicil، استوانه شیشه‌ای، لوله‌های آزمایش مختلف بود.

گروه مطالعه شامل ۵۰ بیمار (۳۲ نفر مرد و ۱۸ نفر زن) در سنین بین ۱۷ تا ۵۴ سال (با متوسط سنی ۳۲/۵ سال) با داشتن حداقل دو دندان پوسیده، بود. گروه کنترل شامل ۵۰ نفر (۲۶ نفر مرد و ۲۴ نفر زن) در سنین بین ۲۲ تا ۵۱ سال (متوسط سنی ۳۹/۶ سال) بدون پوسیدگی دندان، بود. نتایج آزمایشگاهی گروه اخیر به عنوان مرجع مورد استفاده قرار گرفته است.

نمونه خون افراد مورد مطالعه در کلینیک دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی بابل به مقدار ۳ میلی‌لیتر از هر نفر (گروه کنترل و گروه مطالعه) تهیه شد؛ سپس سرم نمونه‌ها جدا شد و هر یک از لوله‌های آزمایش مجزا در یخچال (دمای ۴ درجه سانتی‌گراد) حداکثر به مدت یک روز ذخیره شد تا در مرحله بعدی آزمایش مورد استفاده قرار گیرد؛ همچنین ۵۰ عدد دندان پوسیده (کانین، پرمولر و مولر) از افراد مورد مطالعه تهیه و سیالوپروتئین قسمت مینا و عاج دندانها تعیین گردید.

نمونه‌های ۲ میلی‌متری به مدت ۳۰ دقیقه در دور ۱۲۰۰۰ سانتی‌رفوژ و ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول رویی آن به ستون کروماتوگرافی حاوی سفارز B ۴ (۱×۵۰ سانتی‌متر) انتقال داده شد و توسط گوانیدین اسید کلریدریک، ۵ و ۵۰ میلی‌مول در لیتر تریس با pH=۷/۲۵ سرعت جریان ۵۰ میلی‌لیتر در ساعت عبور داده شد.

اپی‌تلیوم مینایی باعث القای رشد دندانها می‌شود؛ همچنین سیالوپروتئین در تشکیل مینا و معدنی شدن بعدی آن نقش مهمی دارد. فعال شدن ژن سیالوپروتئین در آمولوبلاستوما با سنتز آن توسط اپی‌تلیوم مینایی و بیوسنتز سیالوپروتئین توسط بافت‌های نتوپلاستیک هماهنگ است و نقش توموروزنزیس آن مشخص شده است (۱۲).

نتایج بررسی مکانیسم دنتینوزنزیس نشان داد که این مکانیسم، کنترل شده است و بطور سریع در فاصله زمانی اندک، پیرامون ادنتوبلاست‌ها اتفاق می‌افتد که مستلزم تشکیل فیبریل‌های کلاژن خارج سلولی برای تغییر موقعیت کریستال‌های آپاتیت- کربنات می‌باشد (۱۳).

نتایج بررسی اثر غلاف هرتویگ بر روی ساخته شدن ریشه نشان داد که سلول‌های اپی‌تلیال در طول سطح ریشه سبب دپوزیشن ماتریکس سمتموم اولیه می‌شود؛ در نتیجه این سلول‌ها نیز شبیه سلول‌های مینا قادر به ایجاد پروتئین‌های مزانشیمال می‌شود (۱۴).

نتایج بررسی پروتئین‌های حاصل از ادنتوبلاست‌ها نشان داد که گلیکوپروتئین با وزن مولکولی ۵۳ KDa منحصراً در عاج وجود دارد و بطور موقت از پره آمولوبلاست‌ها سنتز می‌شود و نیز نشانگر این موضوع است که گلیکوپروتئین در اپی‌تلیوم مزانشیمال در مراحل نهایی رشد دندانها مؤثر است (۱۵).

هدف از انجام این پژوهش اندازه‌گیری سیالوپروتئین در سرم و بررسی ارتباط آن با تغییرات ساختمانی مینا و عاج دندان است.

روش بررسی

استاندارد سیالوپروتئین، گوانیدین-HCl، سرم آلبومین، سفارز (Sepharose)، نیتروسولوز، بافرهای فسفات، تریس، فیلتر محلول‌های مختلف، استات سلولوز، محلول‌های

یافته‌ها

در تصویر شماره ۱ منحنی کالیبراسیون استاندارد سیالوپروتئین نشان داده شده است. برای به‌دست آوردن منحنی، نمونه‌های مختلف با غلظت‌های ۱۸،۱۲،۶،۰ و ۲۸ میکروگرم در لیتر از استاندارد سیالوپروتئین در لوله‌های آزمایش تهیه شد و جذب نوری هر یک از نمونه‌ها با روش بیوشیمیایی در طول موج ۲۸۰ نانومتر اندازه‌گیری و منحنی استاندارد برحسب جذب نوری و غلظت نمونه‌ها رسم گردید. با استفاده از منحنی استاندارد، غلظت سیالوپروتئین هریک از فراکشن‌های جداشده توسط کروماتوگرافی و الکتروفورز اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد که تا حدود ۲۵ میکروگرم در لیتر منحنی به‌دست آمده از این پژوهش به‌صورت خطی است که در حدود مقادیر سیالوپروتئین در نمونه‌های مورد اندازه‌گیری می‌باشد.

بهترین نمونه برای جداسازی سیالوپروتئین، نمونه شماره ۱۲ است که دارای حداکثر جذب نوری می‌باشد (تصویر شماره ۲).

تصویر شماره ۳ نشانگر مقایسه مقدار سیالوپروتئین در سرم گروه کنترل (افراد دارای دندان سالم) با گروه مورد مطالعه (افراد دارای دندان پوسیده) می‌باشد. در این تصویر نشان داده شده است که مقدار سیالوپروتئین سرم در افراد دارای دندان پوسیده، بیشتر است.

بحث

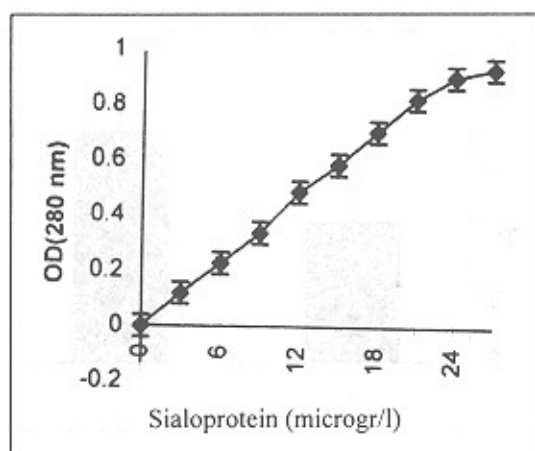
سیالوپروتئین یکی از گلیکوپروتئین‌های غیرکلاژنی فراوان در دندانها و استخوان بدن و نیز یک پروتئین فسفریله شده اسکلتی است و به‌طور اولیه محصول استئوبلاست‌ها می‌باشد. احتمال دارد تغییرات غلظت سیالوپروتئین سرم در استحکام دندانها از طریق اپی‌تلیوم مینا نقش مهمی داشته باشد؛ همچنین سیالوپروتئین در

محلول عبور داده‌شده از ستون کروماتوگرافی فوق در حجم‌های ۱ میلی‌متری در لوله‌های آزمایش شماره‌گذاری شده، جمع‌آوری گردید و در طول موج ۲۸۰ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر جذب نوری هر یک از نمونه‌ها قرائت شد.

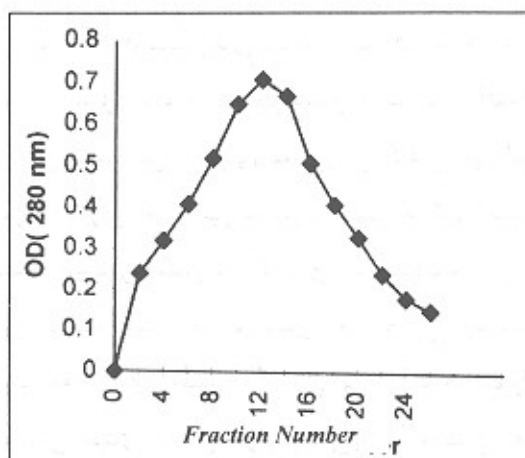
هر یک از نمونه‌های به دست آمده از کروماتوگرافی ستونی به طور جداگانه الکتروفورز گردید؛ به طوری که هر یک از نمونه‌ها با ۹۸۰ میلی‌لیتر از اتانل ۱۰ برابر رقیق شد و پروتئین‌های آن در دمای ۲۰ درجه در مدت ۳ ساعت رسوب داده شد. نمونه‌های به‌دست آمده در دور ۱۰۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ و با اتانل شسته شد؛ سپس هر یک از نمونه‌ها با شرایط زیر الکتروفورز گردید:

هر یک از نمونه‌های سرم و دندان جداگانه شماره‌گذاری و به مدت ۱۰ الی ۱۵ دقیقه در ظرف بافر قرار داده شد و حلال اضافی آن از ژل گرفته شد؛ سپس ژل حاوی نمونه در تانک الکتروفورز قرار داده شد. پاورسویلای در زمان ۲۳ دقیقه و ولتاژ ۲۴۰ ولت تنظیم گردید؛ سپس نمونه‌ها با سمپلر در ژل قرار داده شدند و پس از ۲۳ دقیقه مراحل رنگ‌آمیزی آنها انجام شد و به مدت ۸ تا ۱۰ دقیقه در محلول رنگ‌آمیزی، ۳ دقیقه در محلول تثبیت‌کننده، ۳ دقیقه در محلول رنگ‌بر و ۱ دقیقه در آب مقطر قرار داده شدند؛ پس از آن ۱۵ دقیقه در آون با دمای ۱۰۰-۱۱۰ درجه و ۵ دقیقه با در نیمه باز آون قرار داده شدند و نتایج هر یک از نمونه‌های الکتروفورز شده، مورد بررسی قرار گرفت. مقدار هر یک از فراکشن‌های جداشده توسط اسپکتروفتومتر در طول موج ۲۸۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

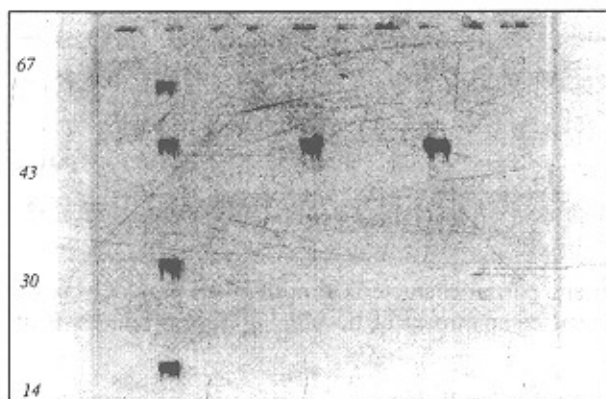
در تحقیق حاضر جهت تجزیه و تحلیل نتایج از آزمون آماری t-test Student استفاده شد؛ اختلاف نتایج حاصل از این بررسی بین دو گروه کنترل و مورد مطالعه معنی‌دار بود ($P < 0.05$).



تصویر شماره ۱- منحنی استاندارد اندازه‌گیری سیالوپروتئین سرم



تصویر شماره ۲- کروماتوگرام حاصل از کروماتوگرافی ستونی سیالوپروتئین سرم



تصویر شماره ۳- الکتروفورز نمونه سیالوپروتئین سرم

مینرالیزاسیون مینا نقش دارد و این موضوع با نقش سیالوپروتئین به عنوان واسطه انتقال سلول‌های استئوبلاستیک به هیدروکسی آپاتیت، مطابقت دارد (۱۲).

سیالوپروتئین در اکتو مزانشیمال مراحل رشد و تکوین دندان‌ها نقش مهمی دارد (۱۴، ۱۵). در تصویر شماره ۱ اندازه‌گیری سیالوپروتئین در این پژوهش نشان داده شده است که تا غلظت ۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر منحنی به صورت خطی است. غلظت سیالوپروتئین سرم نیز در این محدوده قرار دارد؛ بنابراین دارای حساسیت و دقت کافی برای اندازه‌گیری سیالوپروتئین سرم می‌باشد.

در روش کروماتوگرافی ستونی فراکشن شماره ۱۲ کروماتوگرافی ستونی برای جداسازی سیالوپروتئین مناسب است (تصویر شماره ۲)؛ منحنی به دست آمده نشان می‌دهد که در روش کروماتوگرافی توانایی جداسازی مناسبی برای سیالوپروتئین دارد.

در تصویر شماره ۳ الکتروفورز سیالوپروتئین نشان داده شده است که شرایط مناسب (pH، غلظت ژل و زمان الکتروفورز) برای جداسازی و شناسایی سیالوپروتئین به کار گرفته شده است.

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داده که مقدار سیالوپروتئین در سرم افراد دارای دندان پوسیده، نسبت به گروه کنترل (افراد دارای دندان سالم) افزایش می‌یابد و این نتایج با یافته‌های سایر محققان که مقدار سیالوپروتئین را در بیماری‌های مختلف مورد بررسی قرار داده‌اند و افزایش سیالوپروتئین را در این بیماری‌ها گزارش داده‌اند، مطابقت دارد (۱، ۱۲، ۱۳) (تصویر شماره ۴).

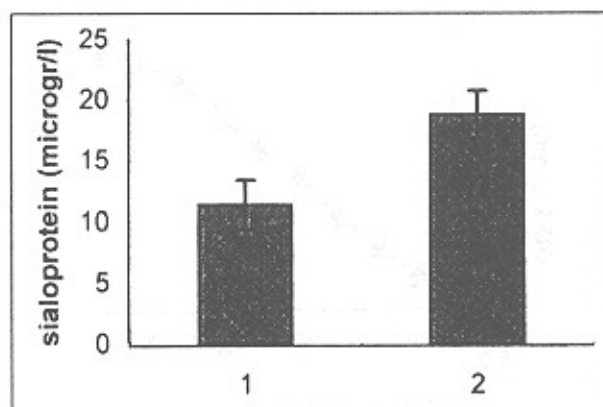
مطالعات مختلف نشان داده است که توزیع سیالوپروتئین در بدن توسط کلیه‌ها کنترل می‌شود و احتمالاً کبد نقش بسیار کمی در متابولیسم این گلیکوپروتئین ایفا می‌نماید (۸).

عاج (بخشی از دندان که با مینا در ناحیه تاج و با سمان در ناحیه ریشه پوشیده شده است)، دارای مواد معدنی کمتری است و توبول‌های عاج، مسیری برای حرکت اسید به داخل آن و خروج مواد معدنی و سیالوپروتئین به شمار می‌روند که از طریق خروج مواد معدنی و سیالوپروتئین باعث کاهش سیالوپروتئین در بخش پوشیده عاج و افزایش آن در سرم می‌گردد. نتایج به‌دست آمده از این پژوهش نیز ضمن تأیید این موضوع، نشانگر افزایش مقدار سیالوپروتئین سرم در بیماری‌هایی که عاج دندان پوشیده دارند، می‌باشد و این نتایج با گزارش سایر محققان مطابقت دارد (۱۵،۱۴،۱۲).

نتایج این مطالعه نشان داد که کاهش سیالوپروتئین مینا و عاج دندان پوشیده با افزایش سیالوپروتئین سرم هماهنگی دارد. این نتایج نشان‌دهنده اهمیت سیالوپروتئین در شرایط پوشیدگی مینا و عاج دندانها می‌باشد که بررسی افزایش و یا کاهش این گلیکوپروتئین غیر کلاژنی و فسفریله شده اسکلتی می‌تواند نشانگر تغییرات ساختمانی مینا و عاج دندانها باشد.

تشکر و قدردانی

در خاتمه از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه و شورای محترم پژوهشی دانشکده دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی بابل تشکر و قدردانی می‌گردد.



تصویر شماره ۴- مقدار سیالوپروتئین در سرم
۱: گروه کنترل (افرادی دارای دندان سالم)
۲: گروه مورد مطالعه (افراد دارای دندان پوشیده)

مینا که از کریستال‌های شدیداً درهم فشرده هیدروکسی آپاتیت تشکیل شده و در طول منشورها سازمان یافته است، در زمان پوشیدگی محتوای معدنی آن کاهش می‌یابد و با پیشرفت میزان پوشیدگی به طرف هسته مرکزی منشورها، احتمالاً سبب رهاشدن و آزادسازی سیالوپروتئین می‌شود و بدین ترتیب مقدار سیالوپروتئین در بخش پوشیده مینا نسبت به مینای طبیعی کاهش و در سرم بیماران با پوشیدگی مینای دندان افزایش می‌یابد که نتایج به‌دست آمده از این پژوهش با این موضوع مطابقت دارد و با گزارش سایر محققان که در بیماری‌های مختلف افزایش غلظت سیالوپروتئین را گزارش داده‌اند، هماهنگ و منطبق است (۱۳،۱۲).

منابع:

- 1- Fisher LW, Whitson SW, Avioli LV, Termine JD. Matrix sialoprotein of developing bone. *J Biol Chem* 1983; 258: 12723-27.
- 2- Fisher LW, Hawkins GR, Tuross N, Termine JD. Purification and partial characterization of small proteoglycans I and II, bone sialoprotein I and II, and osteonectin from the mineral compartment of developing human bone. *J Biol Chem* 1987; 262: 9702-708.
- 3- Karmatschek M, Maier I, Seibel MJ, Woitge HW, Ziegler R, Armbruster F. Improved purification of human bone sialoprotein and development of a homologous radioimmunoassay. *Clin Chem* 1997; 43: 2076-82.
- 4- Peterson IF, Boegard T, Dahlstrom J, Svensson B, Heinegaed D, Saxne T. Bone scan and serum markers of bone and cartilage in patients with knee pain and osteo arthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 1998; 6: 33-39.