مطالعه تغییرات گلیکوز آمینوگلیکان‌های ماتریکس خارج سلولی در روند تکامل پالپ دندان در موش

طیبه کرمانی*- دکتر عبدالرضا وارسته**- دکتر محمدرضا نیک‌روش***- دکتر مهدی مرادی****

*عضو هیأت علمی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی بیرجند

**استادیار گروه آموزشی ایمونولوژی، دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی مشهد

***استادیار گروه آموزشی علوم تشریحی، دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی مشهد

****دندانپزشک

Title: Study of Glycosaminoglycans of Extracellular Matrix (ECM) in Pulp of Developing Tooth

Authors: Kermany T. Ph.D Student*, Varasteh AR. Assistant Professor**, Nicravesh MR. Assistant Professor***, Moradi M. Dentist

Address: *Dept. of Anatomy, Birjand University of Medical Sciences
**Dept. of Immunology, Mashhad University of Medical Sciences
***Dept. of Anatomy, Mashhad University of Medical Sciences

Abstract: Mesenchymal- epithelial interactions during embryogenesis have been shown to be important in the fetal development of many organs. Identification of molecules that modulate these interactions is key to our understanding of the pathological conditions. The major groups of extracellular matrix (ECM) molecules characterized are glycosaminoglycans that candidate for morphogenesis and differentiation of cells and tissues. In this study the molecules of ECM were considered in tooth development, pregnant female mice of balb-c were stained (vaginal plug=0 day) and embryos (E12-E19) and newborns (PN1-PN9) were collected. Tissues were fixed, processed embedded and sectioned. Sections were stained with the following methods: Alcian Blue (pH=1), PAS- Alcian Blue (pH=2.5), Alcian Blue (pH=5.8) prepared with for MgCL2 concentrations (CEC1- CEC4) and toluidin Blue. Non- parametric statistical test (Kruskall- Wallis) showed significant difference between groups from the point of hyaluronic acid, chondroitin sulfate, carboxylated and sulfated glycosaminoglycan in pulp. It seems that the synthesis and secretion of components of ECM is important in morphogenic events and followed by a spatiotemporal pattern and developmentally regulated.

Key words: Exteracellular matrix- Glycosaminoglycans- Pulp

Journal of Dentistry. Tehran University of Medical Sciences (Vol. 13, No:2, 2000)

چکیده

تکامل جنینی بسیاری از ارگان‌ها مستلزم میان‌کنش‌های متعدد سلول‌ها و بافتها با یکدیگر و نیز محیط خارج سلولی می‌باشد و در این میان، روند تکامل دندان، سیستم بیولوژیک مناسب و جالبی را فراهم ساخته است که در آن امکان بررسی میان‌کنش‌های اپی‌تلیالی- مزانشیمی دوطرفه و نیز بررسی دخالت میان‌کنش سلول‌ها با ماتریکس خارج سلولی وجود دارد. با به دست‌آوردن الگوی توزیع مولکول‌های مختلف در ماتریکس خارج سلولی می‌توان نقش بالقوه آنها را در هر

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-11-24]

مرحله تکاملی ارزیابی کرد و جهت تشخیص و پیش‌آگهی بیماریها در شرایط پاتولوژیک مورد استفاده قرارداد. گلیکوزآمینوگلیکان‌ها از جمله اجزای عمده ماتریکس خارج سلولی هستند که در روند مورفوژنز و تمایز طبیعی سلول‌ها و بافتها مطرح می‌باشند؛ بنابراین در این مطالعه تعدادی از این مولکول‌ها جهت ردیابی در پالپ دندان انتخاب شدند. مطالعه برروی موش Balb-c از روز دوازدهم جنینی تا ۹ روز پس از تولد با رنگ‌آمیزیهای هیستوشیمیایی خاص گلیکوزآمینوگلیکان‌ها صورت گرفت و با استفاده از آزمون غیر پارامتری کروسکال- والیس و آزمون دوطرفه Mann-Whitney مورد تجزیه و تحلیل قرارگرفت. درطی روند تکامل پالپ بین گروههای مورد مطالعه از نظر بروز اسید هیالورونیک، کندروایتین سولفات، گلیکوزآمینوگلیکان‌های اسیدی و سولفاته اختلاف معنی‌داری وجود داشت. نتایج نشان داد که تغییر گلیکوزآمینوگلیکان‌های پالپ در تمایز قسمتهای محیطی آن به ادنتوبلاست‌ها حائز اهمیت است؛ به عبارت دیگر، سنتز و ترشح اجزای ماتریکس خارج سلولی در وقایع مورفوژنی اهمیت دارد و از الگوی زمانی- مکانی خاصی تبعیت می‌کند؛ به همین دلیل پیشنهاد می‌شود در مطالعات بعدی با تغییر این ترکیبات در پالپ، تمایز بیشتر ادنتوبلاست‌ها درضایعات عاج مورد توجه قرارگیرد.

کلید واژه‌ها: پالپ- گلیکوزآمینوگلیکان‌ها- ماتریکس خارج سلولی

مجله دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی تهران (دوره ۱۳، شماره دوم، سال ۱۳۷۹)

مقدمه

برای مطالعه تکثیر و تمایز سلولی از سیستم‌های بیولوژیکی مختلفی استفاده شده و در این میان تکامل دندان بهترین فرصت را برای بررسی ارتباط بین فعالیت سلولی و تمایز آن فراهم ساخته است (۳،۲،۱). تکامل دندان مدل مناسبی برای بررسی اطلاعات موقعیتی (Positional Information)، مورفوژنز، تمایز سلولی، تشکیل ماتریکس خارج سلولی (ECM) تخصص یافته و بیومینرالیزاسیون است (۳،۱) که توسط یکسری میان‌کنش‌های اپی‌تلیالی- مزانشیمی دو طرفه کنترل می‌شود (۶،۵،۴،۳)؛ به‌علاوه در دندان امکان بررسی میان‌کنش سلول‌ها با مولکول‌های ماتریکس خارج سلولی و بالعکس نیز وجود دارد (۲). تغییرات ترکیبات ECM در مورفوژنز طبیعی بسیاری از ارگان‌ها گزارش شده است (۱۱،۱۰،۹،۸،۷)؛ لذا می‌توان با به‌دست آوردن الگوی توزیع مولکول‌های مختلف در ECM در ارگان‌های در حال تکامل، نقش بالقوه و احتمالی آنها را در هر مرحله پیش‌بینی کرد و جهت تشخیص و درمان در شرایط پاتولوژیک مورد استفاده قرارداد؛ از این میان می‌توان به گلیکوزآمینو- گلیکان‌های موجود در ماتریکس خارج سلولی اشاره کرد که در مراحل مختلف تکامل از الگوی خاصی تبعیت می‌کند و در موفوژنز و تمایز سلولی طبیعی جهت میان‌کنش‌های متعدد سلول- سلول و سلول – ماتریکس ضروری است؛ اما هنوز نقش آنها بخوبی شناخته نشده است (۱۲)؛ بر این اساس در این مطالعه تعدادی از این گلیکوزآمینوگلیکان‌ها در پالپ دندان (که نقش کلیدی و راهنما را در شکل‌گیری

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-11-24]

اجزای دندان و نیز ترمیم عاج پس از ضایعات ایفا می‌کند)، انتخاب شدند.

روش بررسی

در این مطالعه ۶۰ موش از نژاد Balb-c انتخاب شدند. مشاهده واژینال پلاگ به عنوان روز صفر حاملگی در نظر گرفته شد (Vaginal Plug=0 day). موشهای حامله در شرایط مطلوب از نظر رطوبت (۵۰ تا ۵۵ درجه)، دما (۲۲ درجه سانتی‌گراد)، نور (۱۲ ساعت تاریکی- ۱۲ ساعت روشنایی) و دسترسی به مواد غذایی و آب نگهداری شدند؛ سپس بر اساس روزهای جنینی دوازدهم تا نوزدهم (E12 تا E19) و تا روز نهم پس از تولد (P9)، جنین‌ها و نوزادان موش (پس از بیهوشی عمیق به کمک کلروفرم که منجر به مرگ حیوان شد) در مدت کمتر از نیم ساعت، تشریح شدند. سر جنین‌ها (E12-E16) و فک تحتانی آنها (E17-P9) در فیکساتورهای فرمالین، بوئن به مدت ۲۴ ساعت ثابت (Fix) و پس از آن به روش معمول بافت‌شناسی آماده شد (۱۳). بطور متوسط از هر نمونه ۸ بلوک پارافینی تهیه شد و به کمک میکروتوم روتاری (Leitz 1512) به روش سریال، مقاطع ۵ تا ۷ میکرونی به صورت عرضی، ساژیتال و فرونتال مهیا گردید.

رنگ‌آمیزی مقاطع توسط رنگ‌آمیزیهای هیستوشیمیایی خاص گلیکوزآمینوگلیکان‌ها شامل آلسین‌بلو در pH= ۵/۸ به روش Critical Electrolyte Concentration با چهار غلظت متفاوت از کاتیون Mgcl2 & (CEC1-CEC4)[1]، رنگ‌آمیزی(Periodic Acid Schiff Reaction)P.A.S, AB P=2.5 (Alcain Blue)، آلسین‌بلو pH=1[2] انجام شد(۱۴).

پس از مطالعه و پیگیری اجزای ماتریکس خارج سلولی، درجه‌بندی شدت رنگ‌آمیزی مطابق روش Gong و همکاران (۱۹۹۷) (۱۵) صورت گرفت (جدول شماره ۱).

جدول شماره ۱- راهنمای درجه‌بندی شدت رنگ‌آمیزی برای روشهای هیستوشیمی به روش Gong (۱۹۹۷)

رتبه‌ها	توضیح
۰ (-)	هیچ رنگی ملاحظه نشد.
۱(+)	شدت رنگ‌آمیزی بسیار کم (اندک)
۲(++)	شدت رنگ‌آمیزی کم
۳(+++)	شدت رنگ‌آمیزی متوسط
۴(++++)	شدت رنگ‌آمیزی زیاد
۵(+++++)	شدت رنگ‌آمیزی خیلی زیاد

جداول آماری مربوطه تهیه گردید و از طریق آزمون غیرپارامتری کروسکال- والیس و آزمون دوطرفه Mann-Whitney مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

یافته‌ها

در روند تکامل دندان روزهای جنینی معیار ثابتی نیست و در دندانهای مختلف و حتی جنین‌های یک لیتر(همزاد) ممکن است تفاوتهای چشمگیری ملاحظه شود (۱۶)؛ این مطالعه بر اساس مراحل قراردادی تکامل دندان انجام شد.

- **مرحله جوانه دندانی (Tooth Bud) :E13-E15**

در این مرحله قبل از تشکیل پالپ، بافت اکتومزانشیم (پیش‌ساز پالپ) در اطراف اندام مینایی شدیداً متراکم شد.

۱- رنگ‌آمیزیهای (CEC1-CEC4) به ترتیب ترکیبات اسیدهیالورونیک، کندروایتین سولفات و کراتان سولفات را مشخص می‌سازد.

۲- رنگ‌آمیزیهای P.A.S و آلسین‌بلو pH=2.5 ,pH=1 به ترتیب گلیکوزآمینوگلیکان‌های خنثی، اسیدی و سولفاته را رنگ می‌کند.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-11-24]

واکنش بازوفیلی هسته سلول‌های متراکم، بدون واکنش مشخص در سیتوپلاسم سلول‌ها قابل رؤیت بود.

نتیجه رنگ‌آمیزی با روش CEC1-CEC2 برای اکتومزانشیم مثبت ارزیابی شد؛ اما واکنش آن به CEC3 و CEC4منفی بود.

نتایج حاصله از درجه‌بندی شدت رنگ‌آمیزیها برای اکتومزانشیم (پیش‌ساز پالپ) و نیز پالپ در مراحل تکاملی مختلف در جدول شماره ۲ خلاصه شده است.

➢ **مرحله کلاهکی اولیه (Early Cap Stage) : E15-E16**

در طی این مرحله با پیشرفت روند تکامل و تمایز، بافت اکتومزانشیم به سطح تحتانی اندام مینایی فرو رفت و پالپ (دنتال‌پاپیلا) شکل گرفت.

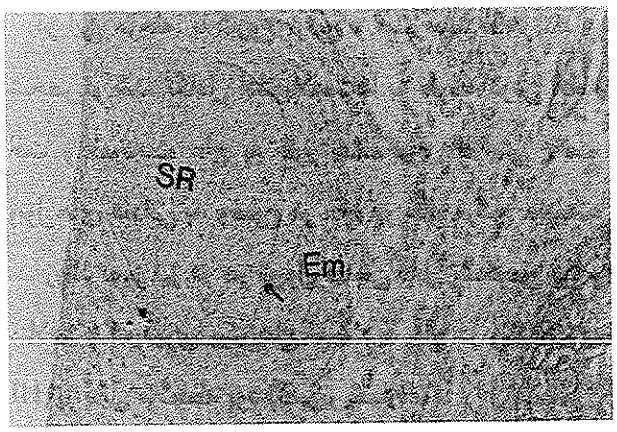
تراکم بافت مزانشیمی در قاعده پالپ (مربوط به ادنتوبلاست‌های آینده) به مراتب بیشتر از سایر جاها بود و به صورت مجموعه‌ای از سلول‌های شدیداً بازوفیل روی هم چیده شده بود. همان‌طور که در جدول شماره ۲ ملاحظه می‌شود، واکنش رنگ‌آمیزی پالپ به CEC1,CEC2,PAS مثبت است.

➢ **مرحله کلاهکی پیشرفته (Late Cap Stage) : E16-E17**

در قاعده اندام مینایی، مزانشیم در محیط پالپ متراکم‌تر شد و در برخی از نمونه‌های مطالعه‌شده در نواحی قاعده Cap، ادنتوبلاست‌ها متمایز گردید. گسترش عروقی وسیع در محیط پالپ در این مرحله تا قبل از ترشح پیش‌عاج (Predentin) مشاهده شد. شدت رنگ‌پذیری پالپ نسبت به ترکیبات اسید هیالورونیک (ECE1) و گلیکوز آمینو گلیکان‌های خنثی (PAS) و سولفاته (آلسین بلو pH=۲/۵) مثبت است (جدول شماره ۲). در تصویر شماره ۱ میزان واکنش رنگ‌پذیری نسبت به ترکیبات اسید هیالورونیک (CEC1) مشاهده می‌شود.

➢ **مرحله‌زنگوله‌ای‌شکل‌اولیه (Early Bell Stage) : E18-E19**

افزایش ارتفاع چشمگیر ادنتوبلاست‌ها در محیط پالپ و شروع ترشح پیش‌عاج در حد فاصل این دو از وقایع قابل ملاحظه در این مرحله بود. تمایز ادنتوبلاست‌ها و ترشح عاج از طرف نواحی مرکزی به سمت گردن ادامه یافت. مزانشیم پالپ در زیر ادنتوبلاست‌ها ظاهر متراکم‌تر و پرسلولی را به خود گرفته بود؛ اما در بخش مرکزی پالپ، عروق خونی فراوان و وسیع بود.



تصویر شماره ۱- مرحله کلاهکی: واکنش اکتومزانشیم (پالپ) (Em)، اپی‌تلیوم ستاره‌ای (SR) و غشاء پایه دندانی (پیکان‌ها) برای اسید هیالورونیک (CEC1, 100×) نشان داده شده است.

استخوان آلوئولار تمایز بیشتری پیدا کرد که می‌تواند نمایانگر نوعی همزمانی از لحاظ تشکیل بافتهای سخت (ترشح عاج و تشکیل ماتریکس) باشد.

واکنش رنگ‌پذیری پالپ در این مرحله تنها نسبت به

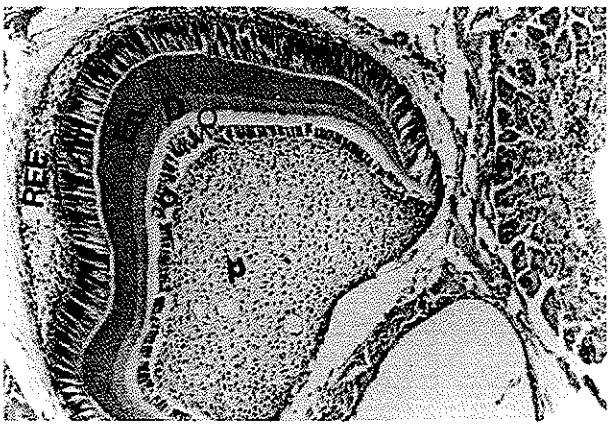
[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-11-24]

CEC1 قابل توجه بود (جدول شماره ۲). در این مرحله واکنش ادنتوبلاست‌ها با شدت بسیار کم به CEC2 پاسخ داد. واکنش عاج و پیش‌عاج به CEC2 متفاوت بود؛ به طوری‌که پیش‌عاج با شدت زیاد و عاج با شدت بسیار کم به این روش پاسخ داد. در CEC3 پیش‌عاج و استخوان آلوئولار با شدت متوسط رنگ شد و در CEC4 تنها استخوان آلوئولار با شدت کم واکنش نشان داد؛ اما در رنگ‌آمیزی PAS، عاج با شدت کم و استخوان آلوئولار با شدت زیاد رنگ شد.

در رنگ‌آمیزی آلسین‌بلو (pH=۱) فقط ناحیه پیش‌عاج در حال ترشح، کمی رنگ شد.

- **مرحله زنگوله‌ای‌شکل پیشرفته(Late Bell Stage) : E19-P9**

در این مرحله، با شروع ترشح و سنتز مینا ظاهر دندان مشخص‌تر شد. تکامل ادنتوبلاست‌ها به طرف گردن ادامه یافت و ضخامت عاج به طور چشمگیری افزایش یافت. توبول‌های دندانی به وضوح در عاج در حال ترشح مشاهده شد. زوائد تومز نیز در هر توبول دندانی قابل تشخیص بود و اختلاف رنگ‌پذیری پیش‌عاج نسبت به عاج در رنگ‌آمیزی HE نیز قابل ملاحظه بود (تصویر شماره ۲).



تصویر شماره ۲- مرحله تشکیل عاج و مینا نشان داده شده است. پالپ (P)، ادنتوبلاست‌ها (Od)، عاج (D)، پیش‌عاج(O) ، آملوبلاست‌ها (Am)، مینا (En) کاملاً مشهود است. بقایای اپیتلیوم مینایی (REE) نیز مشاهده می‌شود (100, H-E×).

واکنش به آلسین‌بلو با روشهای CEC2 و CEC1 در این مرحله نشان داد که پاسخ ادنتوبلاست‌ها و عاج به ترتیب اندک و کم بود؛ اما در ناحیه حد فاصل عاج و پیش‌عاج زیاد بود؛ در حالی که پالپ و ماتریکس استخوان با شدت زیاد رنگ گرفتند (تصویر شماره ۲). ناحیه حد فاصل عاج و پیش‌عاج در CEC2، CEC3 نیز با شدت متوسط رنگ گرفت؛ اما واکنش به CEC4 تنها در ناحیه عاج زیاد بود و در ناحیه پالپ و فولیکول دندانی شدت رنگ کم بود (جدول شماره ۲).

جدول شماره ۲- شدت رنگ‌پذیری پالپ در رنگ‌آمیزیهای مختلف، در مراحل تکاملی دندان

انواع رنگ‌آمیزی / مراحل تکامل	CEC_1	CEC_2	CEC_3	CEC_4	PAS*	آلسین‌بلو pH=۲/۵	آلسین‌بلو pH=۱
مرحله جوانه دندانی	+++	++	–	–	+	–	–
مرحله کلاهکی اولیه	+++	+++	–	–	++	–	–
مرحله کلاهکی پیشرفته	+++	–	–	–	–	+++	–
مرحله زنگوله‌ای شکل اولیه	+++	+	+	–	+	+	+
مرحله زنگوله‌ای شکل پیشرفته	++++	+++	++	++	++	+	+++**

* Periodic Acid Schiff Reaction= PAS

** ابتدا شدت رنگ در محیط پالپ متوسط(+++) و در مرکز اندک (+) بود؛ اما با افزایش سن برشدت رنگ در محیط افزوده شد.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-11-24]

در این مرحله، واکنش رنگ‌آمیزی با آلسین‌بلو (pH=۱) در محیط و مرکز پالپ متفاوت بود.

در ابتدا شدت رنگ در محیط بطور متوسط و در مرکز اندک بود ولی با افزایش سن بر شدت رنگ در محیط افزوده شد.

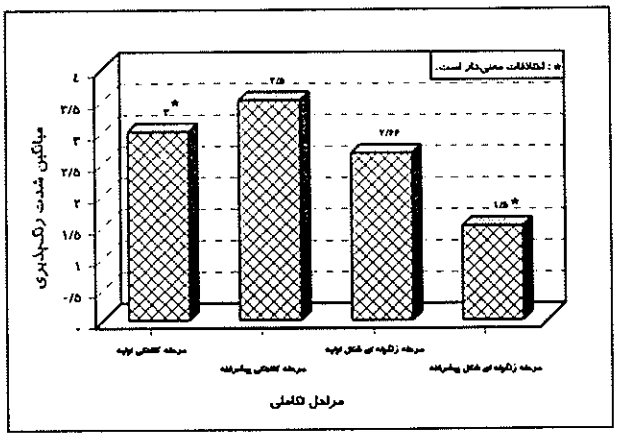
در طی روند تکامل پالپ از نظر بروز اسید هیالورونیک، کندروایتین سولفات، گلیکوزآمینوگلیکان‌های اسیدی و سولفاته بین گروههای مورد مطالعه (به ترتیب با P=۰/۰۱۸، P=۰/۰۲۵ ، P=۰/۰۱۴ ، P=۰/۰۰۸) اختلاف معنی‌داری وجود داشت؛ تجزیه و تحلیل بیشتر اطلاعات با آزمون دوطرفه Mann-Whitney نشان داد که این اختلاف در مراحل مختلف تکاملی بود (جدول و تصویر شماره ۳).

لازم به ذکر است که از نظر میزان گلیکوز آمینوگلیکان‌های خنثی اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد.

بحث

در مراحل اولیه تشکیل دندان در ماتریکس اکتومزانشیم (پیش‌ساز پالپ) وجود اسید هیالورونیک و کندروایتین سولفات مشاهده شد؛ به علاوه در این مطالعه مشخص شد که بین گروههای مورد مطالعه (ECS تا LBS) از نظر میزان اسید هیالورونیک، کندروایتین سولفات و گلیکوز آمینوگلیکان‌های اسیدی و سولفاته در پالپ اختلاف معنی‌داری وجود دارد.

مشخص شده است که اسید هیالورونیک موجب آسان‌شدن مهاجرت سلولی می‌شود(۱۷،۱۵،۹،۸)؛ کندروایتین سولفات نیز باعث تجمع سلولی می‌شود (۱۹،۱۸،۱۰)؛ پس وجود هر دوی آنها در اکتومزانشیم که از سلول‌های در حال مهاجرت ستیغ عصبی منشأ گرفته‌اند و تمایل به تجمع در اطراف اندام مینایی دارند، ضروری به نظر می‌رسد.



تصویر شماره ۳- مقایسه شدت رنگ‌آمیزی پالپ در بین گروههای مختلف مورد مطالعه برای اسید هیالورونیک

در مرحله کلاهکی، از شدت میزان هپاران سولفات و کندروایتین سولفات کاسته شد؛ بدیهی است که با پیشرفت روند تکامل، کم‌کم تمایز سلولی شروع و از غلظت اسید هیالورونیک در ماتریکس کاسته می‌شود که با مطالعات Toole (۱۹۹۷) مطابق است (۲۰)؛ همچنین Mark و همکاران (۱۹۹۰) نیز با استفاده از مونوکلونال آنتی‌بادی وجود کندروایتین ۴ سولفات و ۶ سولفات را در پالپ دندان گزارش کردند (۱۲). کندروایتین سولفات در تمایز سلولی (Cytodifferentiation) (۲۱)، برانگیختن و القاء تراکم سلول‌ها (۲۴،۲۲) نقش دارد؛ همچنین گزارش شده است که عمل تنظیم‌کننده مورفوژنز (Morphogulatory) را در طی مورفوژنز دندان و تمایز سلول‌های دودمان ادنتوبلاستیک بر عهده دارد (۲۱) که همه این موارد وجود کندروایتین سولفات را در پالپ توجیه می‌کند.

Nishiyama و همکاران (۱۹۹۱) در جوانه اندام نیز گزارش کردند که NG2 (یک پروتئوگلیکان حاوی مقادیر

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-11-24]

19- Kaepper PA, Goossens W, Hvizd M, Palmberg PF. Glycosaminoglycans of the human trabecular meshwork in primary open-angle glycoma. Invest Ophtalmology and Visual Science 1996; 37: 1360-66.

20- Toole BP. Hyaluronan in morphogenesis. J Int Med 1997; 242: 35-40.

21- Galbraith DB, Cutler LS, Kollar EJ. The correlation of temporal regulation of glycosaminglycan synthesis with morphogenetic events in mouse tooth development. Arch Oral Biol 1992; 37: 623-28.

22- Ayanoglou CH, Lecolle S, Septier D, Goldberg M. Curprolinic blue visualization of cytosalic and membrane associated glycosaminglycans in the rat junctional epithelium and gingival epithelia. Histochem J 1994; 26: 213-25.

23- Nishiyam A, Dahlin KS, Stallcup WB. The expression of NG2 proteoglycan in the developing rat limb. Dev Biol 1991; 111: 933-44.

24- Kaufman JH. Mouse and human embryonic development: a comparative overview. In: Strachan T, Lindsay S, Wilson DI. Molecular Genetics of Early Human Development. Oxford: Bios Scientific Publishers Ltd; 1997:Chapter 6: 77-110.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-11-24]