بررسی اثر پلی‌مورفیسم ژن سایتوکاین های پیش‌التهابی در بیماری پریودنتیت مهاجم ژنرالیزه

دکتر احمدرضا عبادیان*، دکتر مهرداد رادور#، دکتر حمیدرضا عرب**، دکتر جلیل توکل افشاری***، دکتر ناصر سرگلزایی**، دکتر سلمان قره گزلو****، اعظم بروک*****، مژگان شیرخانی******

*دندانپزشک

** دانشیار گروه پریودانتیکس دانشکده دندانپزشکی و مرکز تحقیقات دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی مشهد

*** دانشیار مرکز تحقیقات ایمونولوژی پژوهشکده بوعلی دانشگاه علوم پزشکی مشهد

**** دستیار تخصصی گروه اندودانتیکس دانشکده دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی مشهد

***** دانشجوی فوق لیسانس بیوشیمی پژوهشکده بوعلی دانشگاه علوم پزشکی مشهد

****** پریودنتیست

تاریخ ارائه مقاله : ۸۸/۴/۱۶ – تاریخ پذیرش : ۸۸/۶/۲۷

Analysis of Proinflammatory Cytokines Gene Polymorphisms in Generalized Aggressive Periodontitis (GAgP)

AhmadReza Ebadian*, Mehrdad Radvar#, HamidReza Arab**, Jalil TavakkolAfshari***, Naser Sargolzaei**, Salman Gharegozloo****, Azam Brook*****, Mojhgan Shirkhani******

** Dentist*

*** Associate Professor, Dep of Periodontology, School of Dentistry and Dental Research Center of Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran.*

**** Associate Professor, Immunology Research Centre, Bu-Ali Research Institute, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran.*

***** Postgraduate Student, Dep of Endodontics, School of Dentistry, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran.*

****** Postgraduate Student, Master of Science in Biochemistry, Bu-Ali Research Institute, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran.*

******* Periodontist*

Received: 7 July 2009; Accepted: 18 September 2009

Introduction: GAgP is a multifactorial disease, which occurs in presence of bacteria and is influenced by genetic and environmental factors; leading to periodontal tissue dysfunction among subjects younger than 30 years. Proinflammatory cytokines are involved in immune response to periodontal pathogens through associating in inflammation phenomenon. It is supposed that gene polymorphisms of cytokines play a role in immune response and therefore in periodontal pathogenesis. In this study we assessed the gene polymorphisms of most important proinflammatory cytokines: Interleukin (IL)-1β +3954 C/T, IL-1α -889 C/T & Tumor necrosis factor-α (TNF-α) -308 G/A.

Materials & Methods: In this case-control study approved by ethical committee of Mashhad University of Medical Sciences, after obtaining arm venous blood samples from patients (n=65) and healthy individuals (n=60) referring to Mashhad dental school, the DNA was extracted in Bu-Ali Research Institute. Restriction fragment length polymorphism-polymerase chain reaction (PCR-RFLP) procedure was performed for determining polymorphisms. Data were analyzed by SPSS software V.15.

Results: IL1β: CT, CC & TT genotypes in patients were 39.6%, 60.4% & 0.0% and in healthy individuals 41.7%, 50% & 8.3%, respectively. IL1α: CT, CC & TT genotypes in patients were 44.6%, 46.2% & 9.2% and in healthy individuals were 46.5%, 51.2% & 2.3%, respectively. TNFα: GA, GG & AA genotypes in patients were 44.8%, 41.4% & 13.8% and in healthy individuals were 46.7%, 50% & 3.3%, respectively. None of the differences was statistically significant.

Conclusion: The lack of any association between the IL-1α, IL-1β, TNF-α polymorphisms and GAgP in the population presented here, brings into doubt the usefulness of these candidate genes as markers of susceptibility to this form of periodontitis.

Key words: Periodontitis, cytokine, IL-1α, IL-1β, TNF-α, polymorphism.

 # Corresponding Author: radvarm@mums.ac.ir

J Mash Dent Sch 2009; 33(3): 231-40.

 # مولف مسؤول، آدرس : مشهد، میدان پارک، دانشکده دندانپزشکی، گروه پریودانتیکس، تلفن: ۱۵- ۸۸۲۹۵۰۱-۰۵۱۱

E-mail: radvarm@mums.ac.ir

چکیده

مقدمه: پریودنتیت مهاجم یک بیماری چند عاملی است که در حضور باکتری ها و تحت تأثیر فاکتورهای محیطی و ژنتیکی ایجاد می شود و باعث کاهش عملکرد بافت های نگهدارنده دندان در سنین زیر سی سال می شود. سایتوکاین‌های پیش التهابی با شرکت در پدیده التهاب در پاسخ ایمنی فرد به پاتوژن های پریودنتال نقش دارند. پیشنهاد شده است پلی‌مورفیسم ژن سایتوکاین‌ها می تواند در پاسخ ایمنی فرد و در نتیجه در پاتوژنز پریودنتال مؤثر باشد. این مطالعه به بررسی ارتباط پلی‌مورفیسم ژن IL-1β+3954C/T، IL-1α-889C/T و TNF-α-308G/A به عنوان مهمترین سایتوکاین‌های پیش التهابی در پریودنتیت مهاجم می پردازد.

مواد و روش ها: در این مطالعه مورد- شاهدی که مسائل اخلاقی آن مورد تایید و تصویب کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی مشهد قرار گرفت، بعد از گرفتن نمونه خون وریدی از بازوی بیماران (تعداد=٦٥) و افراد سالم (تعداد=٦٠) مراجعه کننده به دانشکده دندانپزشکی مشهد، DNA آنها در پژوهشکده بوعلی استخراج گردید و توسط تکنیک PCR-RFLP پلی‌مورفیسم ژن آنها تعیین گردید. داده ها توسط نرم افزار SPSS با ویرایش ۱۵ مورد آنالیز قرار گرفت.

یافته ها: IL-1β: ژنوتایپ CT، CC و TT در بیماران به ترتیب ٣٩/٦ ٪، ٦٠/٤٪ و ٠٪ و در افراد سالم به ترتیب ٤١/٧٪ ؛ ٥٠٪ و ٨/٣٠٪ بدست آمد. IL-1α : ژنوتایپ CT، CC و TT در بیماران به ترتیب ٤٤/٦٪ و ٤٦/٢٪ و ٩/٢٪ و در افراد سالم به ترتیب ٤٦/٥٪، ٥١/٢٪ و ٢/٣٪ حاصل شد. TNF-α: ژنوتایپ GA، GG و AA در بیماران به ترتیب ٤٤/٨٪، ٤١/٤٪ و ١٣/٨٪ و در افراد سالم به ترتیب ٤٦/٧٪، ٥٠٪ و ٣/٣٪ بدست آمد. بین دو گروه هیچ اختلاف آماری معنی داری مشاهده نشد.

نتیجه گیری: عدم ارتباط بین پلی‌مورفیسم های IL1α، IL1β و TNFα با بیماری پریودنتیت مهاجم در جامعه مورد مطالعه ما، استفاده از این ژن ها را به عنوان ریسک مارکر، در پریودنتیت مهاجم، مورد تردید قرار می دهد.

واژه های کلیدی: پریودنتیت، سایتوکاین، IL1α، IL1β، TNFα و پلی‌مورفیسم.

مجله دانشکده دندانپزشکی مشهد / سال ۱۳۸۸ دوره ۳۳ / شماره ۳ : ۴۰-۲۳۱.

مقدمه

پریودنتیت یک بیماری چند عاملی می باشد که توسط پلاک میکروبی آغاز می شود ولی گسترش و شدت آن بستگی به فاکتورهای محیطی، بیماری های اکتسابی و استعداد ژنتیکی دارد. تخریب بافت های نگهدارنده دندان، لقی دندان و از دست رفتن آن از مهمترین عوارض این بیماری به شمار می رود.[۱]

میکروب های پلاک و جرم هم بطور مستقیم و هم غیرمستقیم در روند تخریب بافت‌های پریودنتال نقش دارند. ترشح آنزیم های پروتئولیتیک و بروز عوامل سرکوب کننده ایمنی اثر مستقیم آنهاست. همچنین عوامل پاتوژن میکروب ها مانند لیپوپلی ساکارید (Lypo poly sacarid ,LPS) باعث تحریک پاسخ ایمنی میزبان می شود که اثر غیرمستقیم آنهاست و منجر به تحریک سنتز سایتوکاین‌های پیش التهابی، تجزیه بافت همبند و تحلیل استخوان می شود.[۲]

در مطالعات مقایسه ای بین بافت ها و مایع شیار لثه‌ای افراد مبتلا به پریودنتیت با افراد سالم، سایتوکاین‌های پیش‌التهابی، سایتوکاین‌های تنظیمی، سلول های التهابی، نوتروفیل ها، لنفوسیت ها و ماکروفاژها در بافت های بیمار به مراتب بیشتر از بافت های نرمال بوده است.[۳-۵]

سایتوکاین‌ها میانجی های پپتیدی هستند که در تنظیم پاسخ های ایمونولوژیکی، پاسخ های التهابی موضعی – سیستمیک و پاسخ های ترمیمی، در مقابل عوامل مهاجم دخالت می کنند. آنها اثر خود را از طریق تحریک تکثیر و تمایز سلول ها و یا ممانعت از تکثیر و تمایز آنها ایفا می‌کنند.[۶]

مهمترین سایتوکاین‌های پیش التهابی IL-1α، IL-1β و TNF-α می باشند که اثرات مشابه و سینرژیک دارند. سایتو کاین‌های پیش التهابی سنتز مولکول اتصال به اندوتلیوم برروی سلول‌های التهابی مانند نوتروفیل، مونوسیت و فیبروبلاست را افزایش می دهند و باعث

وازودیلاتاسیون، کموتاکسی و التهاب در ناحیه می‌گردند.[۷و۸]

TNF-α مهمترین پاسخ میزبان در برابر جزء فعال باکتری های گرم منفی (LPS یا همان اندوتوکسین) می‌باشد که بیشتر توسط فاگوسیت های تک هسته ای تولید می شود و توسط تحریک انترفرون گاما، IL-1 و IL-17 افزایش می یابد. لنفوسیت T فعال شده بوسیله آنتی‌ژن، Natural killer cells (NK) فعال شده، ماست سل فعال شده نیز آنرا تولید می کنند. TNF-α علاوه بر فعال‌سازی کموتاکسی سلول های التهابی، باعث تحریک سنتز IL-6، IL-1 و IL-8 شده و در افزایش تولید فرآورده‌های لنفوسیت های B و T نقش دارد. TNF-α همچنین در ایجاد تب، تنظیم سیستم انعقادی و سرکوب تقسیم سلول های بنیادی مغز استخوان مؤثر می باشد.[۲و۹]

IL-1 که در قدیم به آن فاکتور فعال کننده استئوکلاست می گفتند سه نوع مختلف دارد: IL-1β، IL-1α و IL-1 Receptor antagonist (IL1 RN). IL-1α و IL-1β همانند TNF-α واسطه التهابی سیستم ایمنی هستند. IL-1β بیشتر توسط مونوسیت ها و IL-1α بیشتر توسط کراتینوسیت ها و دندرتیک سل ها تولید می شوند و تحت تأثیر LPS و T لنفوسیت فعال شده افزایش می یابند. IL-1 باعث تکثیرو تمایز لنفوسیت های B و T می شود و تولید آنتی بادی و سایتوکاین آنها را افزایش می دهد. IL-1 با تاثیر بر فیبروبلاست، سلول های اندوتلیال و کندروسیت‌ها باعث افزایش سنتز Prostaglandin E2 (PGE2) و کلاژناز می شوند. همچنین با تحریک سلول های مغزی و کبدی باعث ایجاد تب و افزایش پروتئین های فاز حاد می‌شوند. IL-1 و TNF-α از طریق تحریک سنتز اسید آراشیدونیک باعث افزایش غلظت PGE2 و فعال شدن استئوکلاست‌ها می شوند. در نتیجه در روند تخریب استخوان شرکت دارند، البته قدرت تخریب IL-1β چندبرابر IL-1α و هر دوی آنها چند برابر TNF-α می‌باشد.[۷و۱۰] IL-1 و TNF-α با مداخله در تنظیم بیان مولکول های HLA در ارائه آنتی ژن و ترشح آنتی بادی نیز مؤثر هستند.[۱۱]

Assum و همکارانش اثر مخرب IL-1 و TNF-α در پریودنتیت را بوسیله آزمایش بر روی میمون ها ثابت کردند. آنها با کمک لیگاچور، پریودنتیت تجربی ایجاد کرده، سپس در عده مشخصی از آنها، آنتاگونیستهای IL-1 و TNF-α را بکار بردند و نتیجه گرفتند مهاجرت سلول‌های التهابی به مجاورت استخوان ۸۰ درصد کاهش و تحلیل استخوان ۶۰ درصد کاهش یافت.[۱۲] Salvi و همکارانش مقدار IL-1 در بافت های پریودنتیت جوانان را بیشتر از پرودنتیت بزرگسالان و همچنین بیشتر از ژنژیویت و حالت سلامت بدست آوردند.[۱۳]

بحث استعداد ژنتیکی در بیماری پریودنتیت در حقیقت بر پایه تفاوت پاسخ های ایمنی و التهابی در مواجهه با عوامل محیطی استوار است. به عنوان نمونه تولید سایتوکاین‌ها که یکی از بازوان ایمنی ذاتی و اکتسابی هستند در همه افراد یکسان نیست. Bain و همکارانش سنتز سایتوکاین‌های پیش التهابی را در جنس مؤنث بیشتر از مذکر بدست آوردند.[۱۴] مطالعات متعدد دیگری بیانگر تأثیر پلی‌مورفیسم ژن سازنده سایتوکاین‌ها بر میزان ترشح آنها می باشند.[۱۵-۲۰]

Single nucleotid polymorphism (SNP) شایعترین نوع تغییر در ژنوم می باشد. SNP هنگامی رخ می دهد که یک نوکلئوتید (C/T/G/A) توسط نوکلئوتید دیگر جایگزین گردد. اگر این تغییر در ناحیه کد کننده یک پپتید باشد و منجر به افزایش یا کاهش ساخت آن شود، به آن SNP فانکشنال می گویند.

Kornman و همکارانش برای اولین باربه بررسی SNP ژن سایتوکان ها در بیماری پریودنتیت پرداختند. آنها

مشخص کردند SNP ژن IL-1β در جایگاه +۳۹۵٤ و IL-1α در جایگاه ۸۸۹- در بروز بیماری پریودنتیت مؤثر می باشد.[۲۱] Dihel و همکارانش نیز SNP در IL-1β و IL-1α را مرتبط با پریودنتیت بدست آوردند.[۲۲] این در حالی است که Hodge و همکارانش هیچ رابطه ای بین SNP ژن IL-1 و بیماری پریودنتیت نیافتند.[۲۳] رابطه بین SNP ژن TNF-α در جایگاه ۳۰۸- و پریودنتیت نیز بوسیله مطالعات دیگری بررسی شده است که در اکثر آنها رابطه معنی‌داری حاصل نشده است.[۲٦-۲٤]

تاکنون مطالعه ای در جامعه ایران در خصوص ارتباط پلی‌مورفیسم ژن این سایتوکاین‌ها با بیماری پریودنتیت مهاجم انجام نپذیرفته است. لذا ما در این پژوهش به بررسی اثر SNP ژن IL-1β در جایگاه ۳۹۵٤+ تبدیل نوکلئوتید C به T (IL-1β +3954 C/T)، IL-1α -889 C/T و TNFα -308 G/A بر بروز پریودنتیت در جامعه ایرانی خراسانی پرداختیم.

مواد و روش ها

این پژوهش مورد - شاهدی با همکاری بخش پریودنتولوژی دانشکده دندانپزشکی مشهد و پژوهشکده بوعلی مشهد با اخذ تأییدیه کمیته اخلاق دانشگاه و رضایت نامه از افراد شرکت کننده در مطالعه انجام پذیرفت. از بین مراجعین به بخش پریودانتیکس دانشکده دندانپزشکی مشهد، افراد غیر سیگاری و سن کمتر از ۳۵ سال گزینش شدند. وجود بیماری پریودنتیت مهاجم ژنرالیزه و یا سالم بودن مراجعه کنندگان به بخش پریودنتولوژی توسط پریودنتیست و بر پایه معاینات کلینیکی، تاریخچه پزشکی- دندانپزشکی، عمق شیار لثه تعیین گردید. معیارهای بیماری عبارت بودند از عدم اتصال نسوج (Attachment loss, AL)، لقی دندان و رادیوگرافی و معیار اختصاصی وجود AL≥ ۵ میلی متر در ۸ دندان دایمی که ۳ دندان انسیزور یا مولر اول. متوسط سن بیماران و افراد سالم به ترتیب ۲۷/٤۵ و ۲۹/۷۵ بوده است. از ٦۵ بیمار، ٤۲ نفر مونث (٦۵/٤٪) و ۲۳ نفر مذکر (۳۵/٤٪) بوده اند همچنین از ٦۰ فرد سالم ۳۷ نفر مونث (٦۱/٦٪) و ۲۳ نفر مذکر (۳۸/٤٪) بوده اند.

تعیین ژنوتایپ: پس از انتخاب افراد سالم و مبتلایان به GAgP توسط پریودنتولوژیست، ۱۰ سی سی نمونه خون از ورید بازوی افراد در آزمایشگاه دانشکده، گرفته شد. لوله های نمونه خون حاوی EDTA ۱۰ درصد بود و پس از وارد کردن خون به درون لوله، با تکان های متوالی خون و EDTA مخلوط شد تا از انعقاد خون جلوگیری شود. بلافاصله نمونه ها درون بسته های حاوی یخ به بخش ایمونوژنتیک پژوهشکده منتقل گردید. DNA نیز بدون تاخیر به روش Salting out توسط کیت مخصوص استخراج DNA (بیوژن-مشهد) و مطابق دستورالعمل شرکت سازنده استخراج گردید. PCR توسط دستگاه ترموسایکلر (Corbet – استرالیا) در میکروتیوب‌های حاوی ۲۰ میکرولیتر از معرف ها بدین شرح انجام پذیرفت: ۰/۵ واحد Taq DNA پلی مراز، ۰/۲ میلی مولار از هر dNTP، ۵۰۰ میکرومول از هر پرایمر، ۱۵۰-۱۰۰ نانوگرم از نمونه DNA و بافر X10 PCR (۱۰ واحد Tris Hcl، ۵۰ واحد Kcl و ۱۰۵ واحد Mgcl2 که واحد آن میلی مولار بر لیتر mML^{-1} است).

جهت تعیین ژنوتایپ، جایگاه پلی مورفیسم مورد نظر، بوسیله تکنیک PCR مشتمل بر دماها و سیکل های متعدد (جدول ۱) و پرایمرهای مخصوص (جدول ۲) تکثیر گردید. جهت اثبات صحت عملکرد PCR (وجود باند در جایگاه پیش بینی شده) محصولات PCR توسط اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی شدند. سپس درون ژل آگارز ۱/۵ درصد عمل الکتروفورز انجام گرفت. آنگاه وجود و یا عدم وجود باند توسط اشعه UV (دستگاه، Gel-documentation آلمان) تایید گردید. با حصول

اطمینان از تکثیر شدن جایگاه مدنظر، وجود و یا عدم وجود SNP با بکار بردن آنزیم های هضم کننده بررسی گردید (جدول ۲). لذا بر روی نمونه های حاصل از اثر آنزیم ها، درون ژل پلی‌آکریل آمید ۱۷ درصد، عمل الکتروفورز انجام گردید. رنگ آمیزی نیترات نقره جهت نمایان شدن باندها بکار رفت.

توضیح اینکه عدم رؤیت باند PCR برخی نمونه ها، حتی پس از تکرار، منجر به حذف آنها گردید. در نتیجه تعداد نمونه ها در بررسی سه SNP، یکسان بدست نیامد.

آنالیز داده ها: تفاوت فراوانی ژنوتایپ‌ها و آلل‌ها در دو گروه بیمار و سالم توسط تست های Chi-square و Exact (نرم افزار SPSS با ویرایش ۱۵) مشخص گردید.

یافته ها

آنزیم های هضم کننده Nco1 و Taq1 مورد استفاده در این پروژه، هنگامی عمل برش را انجام می دهند که پلی‌مورفیسم رخ نداده باشد؛ در نتیجه ژنوتایپ‌های پلی‌مورفیک (IL-1β (TT، (IL-1α (TT و (TNF-α (AA بدون برش باقی می مانند و ژنوتایپ‌های غیر پلی‌مورفیک برش می خورند. ژنوتایپ‌های CC و GG دو برش می‌خورند و ژنوتایپ‌های CT و GA سه برش می خورند (تصاویر ۱ و ۲ و ۳).

جدول ۱ : شرایط PCR

IL-1β	2 cycles: 95°C, 2 min;68°C,1min;72°C,1min. 35 cycles: 95°C, 2 min; 60°C, 1 min; 72°C ,1min. 94°C ,1min;68°C,1min;72°C, 5 min
IL-1α	95°C, 4 min. 34 cycles: 95°C,30sec; 60°C,30 sec; 72°C, 30 sec. 72°C,5min
TNF-α	95°C, 2 min. 39 cycles; 95°C, 1 min; 62°C, 1 min; 72°C, 1 min. 72°C, 5 min

جدول ۲ : پرایمرها و آنزیم ها

سایتوکاین SNP	توالی پرایمر		آنزیم	جایگاه برش آنزیم
IL-1β C/T +3954	SENCE ANTISENCE	5'-GTTGTCATCAGACTTTGACC-3' 5'-TTCAGTTCATATGGACCAGA-3'	Taq 1	T/CGA
IL-1α C/T -889	SENCE ANTISENCE	5'-AAGCTTGTTCTACCACCTGAACTAGGC-3' 5'-TTACATATGAGCCTTCCATG-3'	Nco 1	C/CATGG
TNF-α G/A -308	SENCE ANTISENCE	5'-TCC TCC CTG CTC CGA TTC CG-3' 5'-AGG CAA TAG GTT TTG AGG GCC AT-3'	Nco 1	C/CATGG G/GTACC

فراوانی ژنوتایپ‌ها و آلل‌ها:

IL-1β: جدول ۳ نشان دهنده فراوانی آلل‌های C و T همچنین ژنوتایپ‌های CT، CC و TT در بیماران پریودنتیت و افراد سالم می باشد. تفاوت معنی‌داری بین دو گروه دیده نشد.

در مقایسه فراوانی آلل‌ها بین گروه های بیمار و سالم، تست x^2 تفاوت معنی‌داری نشان نداد (P=۰/۱۲۱).

در مقایسه فراوانی ژنوتایپ‌ها در دو گروه نیز، تست Exact تفاوت معنی‌داری نشان نداد (P=۰/۰۹۵).

IL-1α : جدول ٤ نشان دهنده فراوانی آلل‌های C و T همچنین ژنوتایپ‌های CT، CC و TT در بیماران پریودنتیت و افراد سالم می باشد. تفاوت معنی‌داری بین دو گروه دیده نشد.

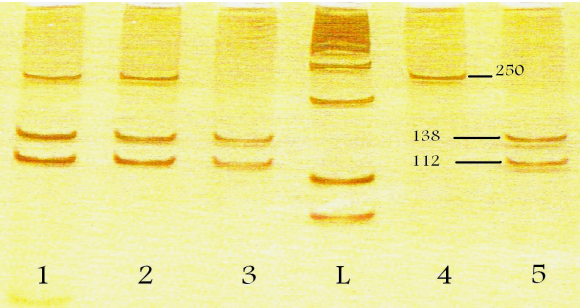
در مقایسه فراوانی آلل‌ها بین گروه های بیمار و سالم، تست x^2 تفاوت معنی‌داری نشان نداد (P=۰/۳٤٦).

در مقایسه فراوانی ژنوتایپ‌ها در دو گروه نیز، تست Exact تفاوت معنی‌داری نشان نداد (P=۰/۳۸۸).

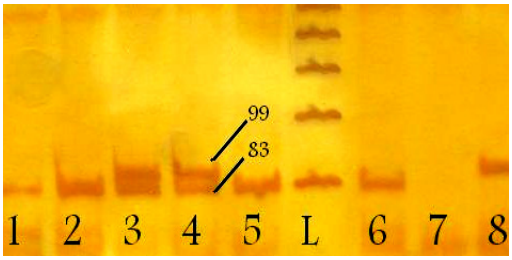
TNF-α: جدول ٥ نشان دهنده فراوانی آلل‌های G و A همچنین ژنوتایپ‌های GG، GA و AA در بیماران پریودنتیت و افراد سالم می باشد. تفاوت معنی‌داری بین دو گروه دیده نشد.

در مقایسه فراوانی آلل‌ها بین گروه های بیمار و سالم، تست x^2 تفاوت معنی‌داری نشان نداد (P=۰/۱۱٤).

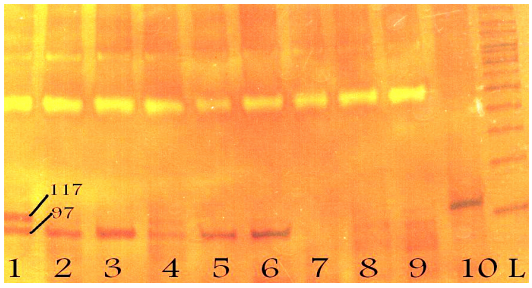
در مقایسه فراوانی ژنوتایپ‌ها در دو گروه نیز، تست Exact تفاوت معنی‌داری نشان نداد (P=۰/۱۱٦).



تصویر ۱ : نتیجه اثرآنزیم Taq1 بر محصولات PCR در IL-1β
(عدم برش TT : نمونه 4)(برش هموزایگوت CC: نمونه های 3 و 5)
(برش هتروزایگوت CT : نمونه های 1 و 2)



تصویر ۲ : نتیجه اثر آنزیم *Nco1* بر محصولات PCR در IL-1α
(عدم برش TT : نمونه 8)(برش هموزایگوت CC : نمونه های 1،2،5 و6)(برش هتروزایگوت CT: نمونه های 3 و4)(نمونه 7 : failed)
(توضیح: باند سوم برش هترو بدلیل کوچکی سایز (16 BP) قابل تشخیص نمی باشد)(Ladder : L)



تصویر ۳ : نتیجه اثرآنزیم *Nco1* بر محصولات PCR در TNF-α
(عدم برش AA : نمونه 10)(برش هموزایگوت GG : نمونه های 2، 3، 5و 6 برش هتروزایگوت)(GA : نمونه های 1و4)(نمونه های 7، 8 و 9 : failed)(توضیح: باند سوم برش هترو بدلیل کوچکی سایز (20 bP) قابل تشخیص نمی باشد)(Ladder : L)

جدول ۳ : فراوانی آلل‌ها و ژنوتایپ‌های IL-1β در بیماران (تعداد=۵۳) و افراد سالم (تعداد=۴۸)

	آلل C (درصد) تعداد	آلل T (درصد) تعداد	ژنوتایپ CC (درصد) تعداد	ژنوتایپ CT (درصد) تعداد	ژنوتایپ TT (درصد) تعداد	کل
پریودنتیت	۸۵ (۵۵/۶)	۲۱ (۴۲/۹)	۳۲ (۶۰/۴)	۲۱ (۳۹/۶)	۰ (۰/۰)	۵۳ (۱۰۰)
سالم	۶۸ (۴۴/۴)	۲۸ (۵۷/۱)	۲۴ (۵۰/۰)	۲۰ (۴۱/۷)	۴ (۸/۳)	۴۸ (۱۰۰)
کل	۱۵۳ (۱۰۰)	۴۹ (۱۰۰)				

جدول ۴ : فراوانی آلل‌ها و ژنوتایپ‌های IL-1α در بیماران (تعداد=۶۵) و افراد سالم (تعداد=۴۳)

	آلل C (درصد) تعداد	آلل T (درصد) تعداد	ژنوتایپ CC (درصد) تعداد	ژنوتایپ CT (درصد) تعداد	ژنوتایپ TT (درصد) تعداد	کل
پریودنتیت	۸۹ (۵۸/۲)	۴۱ (۶۵/۱)	۳۰ (۴۶/۲)	۲۹ (۴۴/۶)	۶ (۹/۲)	۶۵ (۱۰۰)
سالم	۶۴ (۴۱/۸)	۲۲ (۳۴/۹)	۲۲ (۵۱/۲)	۲۰ (۴۶/۵)	۱ (۲/۳)	۴۳ (۱۰۰)
کل	۱۵۳ (۱۰۰)	۴۹ (۱۰۰)				

جدول ۵ : فراوانی آلل‌ها و ژنوتایپ‌های TNF-α در بیماران (تعداد=۵۸) و افراد سالم (تعداد=۶۰)

	آلل C (درصد) تعداد	آلل T (درصد) تعداد	ژنوتایپ CC (درصد) تعداد	ژنوتایپ CT (درصد) تعداد	ژنوتایپ TT (درصد) تعداد	کل
پریودنتیت	۷۴ (۴۵/۶)	۴۲ (۵۶/۷)	۲۴ (۴۱/۴)	۲۶ (۴۴/۸)	۸ (۱۳/۸)	۵۸ (۱۰۰)
سالم	۸۸ (۵۴/۴)	۳۲ (۴۳/۳)	۳۰ (۵۰/۰)	۲۸ (۴۶/۷)	۲ (۳/۳)	۶۰ (۱۰۰)
کل	۱۶۲ (۱۰۰)	۷۴ (۱۰۰)				

بحث

تخریب پریودنتال توسط تحریکات باکتریائی آغاز می‌شود و زمینه گسترش آن بستگی به نحوه پاسخ ایمنی میزبان دارد. التهاب یک پاسخ ایمنی طبیعی نسبت به هجمه میکروبی می باشد که نقش مهمی در پاتوژنز پریودنتیت بازی می کند. سایتوکاین‌ها بازوان اصلی پدیده التهاب به شمار می روند. در بافت های مبتلا به پریودنتیت هم سایتوکاین‌های التهابی مانند IL-1α، IL-1β و TNF-α هم سایتوکاین‌های تنظیمی مانند IL-1RN، IL-10 و Trans forming growth factor β (TGF - β) به مراتب

بیشتر از بافت نرمال گزارش شده است.[۳۰-۲۷]

اخیراً توجه پژوهشگران به نقش ژنتیک در استعداد ابتلا به بیماری های التهابی معطوف گشته است.[۳۱] درخصوص پریودنتیت برخی مطالعات وجود پلی‌مورفیسم ژن سایتوکاین‌ها را با شدت بیماری مرتبط دانسته اند. Kornman و همکارانش بین پلی‌مورفیسم IL-1α و IL1-β و پریودنتیت مزمن را بطه معنی‌داری بدست آوردند.[۲۱] McGuire و همکارانش از دست رفتن دندان را در افراد با پلی‌مورفیسم IL-1β ۲/۷ برابر افراد بدون پلی‌مورفیسم گزارش کردند، همچنین این میزان را در افراد پلی‌مورفیک که سیگاری شدید بودند ۷.۷ بدست آوردند.[۳۲] Papapnoa و همکارانش بین پلی‌مورفیسم IL-1β و میزان از دست رفتن دندان رابطه معنی‌داری یافتند.[۳۳] Meisel و همکارانش نیز بین پلی‌مورفیسم IL-1β و میزان از دست رفتن دندان رابطه آماری پیدا کردند.[۳٤] Soga و همکارانش بین پلی‌مورفیسم های چندگانه TNF-α و پریودنتیت شدید بالغین ارتباط آماری بدست آوردند.[۳۵] Akmana و همکارانش بین پلی‌مورفیسم TNF-α-1031T/C و پریودنتیت در مبتلایان به سندرم بهجت رابطه معنی‌داری بدست آوردند.[۳٦] Wagner و همکارانش نیز پلی‌مورفیسم‌های IL-1β (3954 +) و (889-) IL-1α را با پریودنتیت مزمن مرتبط دانستند.[۳۷]

علیرغم مطالعاتی که رابطه مثبتی بین وقوع پلی‌مورفیسم و بیماری پریودنتیت نشان داده اند، ما در مطالعه خود بین پلی‌مورفیسم های IL1β +3954 C/T، C/T IL1α -889 وTNFα -509 G/A و پریودنتیت مهاجم، چه از لحاظ ژنوتایپ چه از لحاظ آلل‌ها، ارتباط آماری بدست نیاوردیم. البته مطالعاتی در دسترس هستند که نتایج ما را تایید می کنند. در بررسی Armitage و همکارانش پلی‌مورفیسم های IL-1α و IL-1β در پریودنتیت و افراد سالم تفاوتی نداشتند.[۳۸] Gore و همکارانش تفاوتی بین پلی‌مورفیسم IL-1 در گروه پریودنتیت بالغین و گروه سالم نیافتند.[۲۸] Hodge و همکارانش نیز تفاوت آماری پلی‌مورفیسم های IL-1α و IL-1β را بین گروه پریودنتیت زودرس و سالم بدست نیاوردند.[۲۳] Kinane و همکارانش بین گروه پریودنتیت مهاجم و گروه کنترل برای پلی‌مورفیسم TNF-α تفاوتی مشاهده نکردند.[۲٤] Galbraith و همکارانش نیز بین گروه پریودنتیت مزمن و سالم برای پلی‌مورفیسم TNF-α تفاوتی بدست نیاوردند.[۲۵] همچنین Sakellari و همکارانش بین پلی‌مورفیسم های IL-1α و IL-1β وTNF-α و پریودنتیت مهاجم رابطه ای بدست نیاوردند.[۳۹]

مهمترین عامل تفاوت در نتایج این مطالعات می تواند به علت اختلاف نژادها باشد. Nikolopoulos و همکارانش به مقایسه ۵۳ مطالعه مختلف که SNP ها را در بیماری پریودنتیت تا سال ۲۰۰۷ بررسی کرده اند، پرداختند. نکته بااهمیت این بررسی این است که علیرغم مشابه نبودن نتایج مطالعات، درصد فراوانی آلل‌ها و ژنوتایپ‌های بیماران در هیچ جمعیتی مشابه جمعیت دیگر نبوده است. جالبتر اینکه در مقایسه فراوانی آلل‌ها و ژنوتایپ‌ها در افراد سالم نیز هیچ تشابهی در جوامع مختلف بدست نیامد.[٤۰]

نتیجه گیری

با توجه به تفاوت فراوانی آلل‌های کد کننده ژن سایتوکاین‌ها در جوامع مختلف و فقدان بررسی ارتباط این فراوانی با بیماری پریودنتیت در جامعه ما، این پژوهش به انجام رسید و نتیجه گرفته شد که در جامعه ایرانی – خراسانی پلی‌مورفیسم های IL1β C/T 3954+، IL1α -889 C/T و TNF-α G/A-308 را نمی توان به عنوان مارکرهایی جهت تعیین استعداد ژنتیکی ابتلا به پریودنتیت مهاجم بیان کرد.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از استاد ارجمند جناب آقای دکتر محمود تمیزی جهت راهنمایی های ارزشمندشان قدردانی می گردد. همچنین از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مشهد که از این طرح حمایت مالی نمودند، تقدیر می گردد.

منابع

1. Kinane DF, Shiba H, Hart TC. The genetic basis of periodontitis. Periodontol 2000. 2005; 39: 91-117.
2. Stashenko P. Molecular pathogenesis of periodontal disease. Soc Microbiol 1994; 5(7): 171-81.
3. McFarlane CG, Reynolds JJ, Meikle MC. The release of interleukin-1 beta, tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamina by cultured peripheral blood mononuclear cells from patients with periodontitis. J Periodont Res 1990; 25(4): 207-14.
4. Iwasaki LR, Chandler JR, Marx DB, Pandey JP, Nickel JC. IL-1 gene polymorphisms, secretion in gingival crevicular fluid, and speed of human orthodontic tooth movement. Orthod Craniofac Res 2009; 12(2): 129-40.
5. Teles RP, Sakellari D, Konstantinidis A, Socransky SS, Haffajee AD.Application of the checkerboard immunoblotting technique to the quantification of host biomarkers in gingival crevicular fluid. J Periodontol 2009; 80(3): 447-56.
6. Dutra WO, Moreira PR, Souza PE, Gollob KJ, Gomez RS. Implications of cytokine gene polymorphisms on the orchestration of the immune response: Lessons learned from oral diseases. Cytokine Growth Factor Rev 2009; 20(3): 223-32.
7. Takahashi K, Takingawa M, Takashiba S, Nagai A, Miyamoto M, Kurihara H, et al: Role of cytokine in the induction of adhesion molecules on cultured human gingival fibroblasts. J Periodontol 1994; 65(3): 230-5.
8. Sorensen LK, Havemose-Poulsen A, Bendtzen K, Holmstrup P. Aggressive periodontitis and chronic arthritis: Blood mononuclear cell gene expression and plasma protein levels of cytokines and cytokine inhibitors. J Periodontol 2009; 80(2); 282-9.
9. Mariette X. Anti-cytokines in the treatment of inflammation. Rev Prat 2003; 53(5): 507-11.
10. Langdahl BL, Lokke E, Carstens M, Stenkjaer LL, Eriksen EF. Osteoporotic fractures are associated with an 86-base pair repeat polymorphism in the interleukin-1-receptor antagonist gene but not with polymorphisms in the interleukin-1 beta gene. J Bone Miner Res 2000; 15(3): 402-14.
11. Hayashi J, Saito I, Ishikawa I, Miyasaka N. Effects of cytokines and periodontopathic bacteria on the leukocyte function-associated antigen intercellular adhesion molecule 1 pathway in gingival fibroblasts in adult periodontitis. Infect Immun 1994; 62(12): 5205-12.
12. Assuma R, Oates T, Cochran D, Amar S, Graves DT. 1L-1 and TNF antagonists inhibit the inflammatory response and bone loss in experimental periodontitis. J Immunol 1998; 160(1): 403-9.
13. Salvi GE, Brown CE, Fujihashi K, Kilyono H, Smith FW, Beck JD, et al. Inflammatory mediators of the terminal dentition in adult and early onset periodontitis. J Periodont Res 1998; 33(4): 212-25.
14. Bain JL, Lester SR, Henry WD, Bishop CM, Turnage AA, Naftel JP, Johnson RB. Comparative gender differences in local and systemic concentrations of pro-inflammatory cytokines in rats with experimental periodontitis. J Periodontal Res 2009; 44(1): 133-40.
15. Wilson AG, Symons JA, McDowell TL, McDevitt HO, Duff GW. Effects of a polymorphism hi TNF_a promoter on transitional activation. Proc Natl Acad Sci USA 1997; 94(7): 3195-9.
16. Turner DM, Williams DM, Sankaran D, Lazarus M, Sinnott PJ, Hutchinson IV. An investigation of polymorphism in the interleukin-10 gene promoter. Eur J Immunogenet 1997; 24(1): 1-8.
17. Hoffmann SC, Stanley EM, Darrin Cox E, Craighead N, DiMercurio BS, KoziolDE, Harlan DM, Kirk AD, Blair PJ. Association of cytokine polymorphic inheritance and in vitro cytokine production in anti-CD3/CD28-stimulated peripheral blood lymphocytes. Transplantation 2001; 72(8): 1444-50.
18. Brett PM, Zygogianni P, Griffiths GS, Tomaz M, Parkar M, D'Aiuto F, Tonetti M. Functional gene polymorphisms in aggressive and chronic periodontitis. J Dent Res 2005; 84(12): 1149-53.
19. Kinane DF, Hart TC. Genes and gene polmorphisms associated with periodontal disease. Crit Rev Oral Biol Med 2003; 14(6): 430-49.
20. Loos BG, van der Velden U, Laine ML. Genetics and periodontitis. Ned Tijdschr Tandheelkd 2008; 115(2): 87-92.
21. Kornman KS, Crane A, Wang H-Y, di Giovine FS, Newman MG, Pirk FW, et al. The interleukin-1 genotype as a severity factor in adult periodontal disease. J Clin Periodontol 1997; 24(1): 72-7.
22. Diehl SR, Wang Y, Brooks CN, Burmeister JA, Califano JV, Wang S, et al. Linkage disequilibrium of interleukin-1 genetic polymorphisms with early-onset periodontitis. J Periodontol 1999; 70(4): 418-30.

23. Hodge PJ, Riggio MP, Kinane DF. Failure to detect an association with IL-1 genotypes in European Caucasians with generalised earlyonset periodontitis. J Clin Periodontol 2001; 28(5): 430-6.
24. Kinane DF, Hodge P, Eskdale J, Ellis R, Gallagher G. Analysis of genetic polymorphisms at the interleukin-10 and tumour necrosis factor loci in early-onset periodontitis. J Periodontal Res 1999; 34(7): 379-86
25. Galbraith GMP, Steed RB, Sanders JJ, Pandey JP. Tumor necrosis factor alpha production by oral leukocytes: Influence of tumor necrosis factor genotype. J Periodontol 1998; 69(4): 428-33.
26. Craandijk J, van Krugten MV, Verweij CL, Van der Velden U, Loos BG.Tumor necrosis factor-alpha gene polymorphisms in relation to periodontitis. J Clin Periodontol 2002; 29(1): 28-34.
27. Shapira L, Schlesinger M, Bimstein E.Possible autosomal-dominant inheritance of prepubertal periodontitis in an extended kindred.J Clin Periodontol 1997; 24(6): 388-93.
28. Gore EA, Sanders JJ, Pandey JP, Palesch Y, Galbraith GM.Interleukin-1beta+3953 allele 2: Association with disease status in adult periodontitis. J Clin Periodontol 1998; 25(10): 781-5.
29. Engebretson SP, Grbic JT, Singer R, Lamster IB. GCF IL-1beta profiles in periodontal disease. J Clin Periodontol 2002; 29(1): 48-53.
30. Reinhardt RA, Masada MP, Kaldahl WB, Du Bois LM, Kornman KS, Choi JI, et al. Gingival fluid IL-1 and IL-6 levels in refractory periodontitis. J Clin Periodontol 1993; 20(3): 225-31.
31. Tracey KJ, Warren HS. Human genetics: An inflammatory issue. Nature 2004; 429(6987): 35-7.
32. McGuire MK, Nunn ME. Prognosis versus actual outcome. IV the effectiveness of clinical parameters and IL-1 genotype in accurately predicting prognoses and tooth survival. J Periodontol 1999; 70(1): 49-56.
33. Papapanou PN, Neiderud AM, Sandros J, Dahlen G. Interleukin-1 gene polymorphism and periodontal status. A Case-Control Study. J Clin Periodontol 2001; 28(5): 389-96.
34. Meisel P, Siegemund A, Dombrowa S, Sawaf H, Fanghaenel J, Kocher T. Smoking and polymorphisms of the interleukin-1 gene cluster (IL-1 a, IL-1 β, and IL-1RN) in patients with periodontal disease. J Periodontol 2002; 73(1): 27-32.
35. Soga Y, Nishimura F, Ohyama H, Maeda H, Takashiba S, Murayama Y. Tumor necrosis factor-alpha gene (TNF-alpha) -1031/-863, -857 single-nucleotide polymorphisms (SNPs) are associated with severe adult periodontitis in Japanese. J Clin Periodontol 2003; 30(6): 524-31.
36. Akman A, Sallakci N, Kacaroglu H, Tosun O, Yavuzer U, Alpsoy E, et al. Relationship between periodontal findings and the TNF-alpha Gene 1031T/C polymorphism in Turkish patients with Behçet's disease. J Euro Acad Dermatol Venereol 2008; 22(8): 950-7.
37. Wagner J, Kaminski WE, Aslanidis C, Moder D, Hiller KA ,Christgau M, et al. Prevalence of OPG and IL-1 gene polymorphisms in chronic periodontitis. J Clin Periodontol 2007; 34(10): 823-7.
38. Armitage GC, Wu Y, Wang HY, Sorell J, di Giovine FS, Duff GW. Low prevalence of a periodontitis-associated interleukin-1 composite genotype in individuals of Chinese heritage. J Periodontol 2000; 71(2): 164-71.
39. Sakellari D, Katsares V, Georgiadou M, Kouvatsi A, Arsenakis M, Konstantinidis A. No correlation of five gene polymorphisms with periodontal conditions in a Greek population. J Clin Periodontol 2006; 33(11): 765-70.
40. Nikolopoulos GK, Dimou NL, Hamodrakas SJ, Bagos PG. Cytokine gene polymorphisms in periodontal disease: A meta-analysis of 53 studies including 4178 cases and 4590 controls. J Clin Periodontol 2008; 35(9): 754–67.