بررسی تأثیر ابتلا به پریودنتیت مزمن بر میزان بیان ژن TLR-2 و TLR-4 در بافت لثه ای

کاظم فاطمی*، مهرداد رادور، عبدالرحیم رضایی***، حمیدرضا عرب**، هوشنگ رفعت پناه***، حسن آذان گو خیاوی****، یلدا دادپور*****#**

* استادیار گروه پریودانتیکس، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد

** دانشیار پریودانتیکس، مرکز تحقیقات دندانپزشکی، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد

*** دانشیار گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد

**** استادیار گروه پروتزهای دندانی، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، واحد بین الملل

***** استادیار گروه پریودانتیکس، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، واحد بین الملل

تاریخ ارائه مقاله : ۹۰/۲/۲۵ - تاریخ پذیرش : ۹۰/۷/۳

Evaluation of the Effects of Chronic Periodontitis on TLR-2 and TLR-4 Gene Expression in Gingival Tissues

Kazem Fatemi*, Mehrdad Radvar, AbdolRahim Rezaee***, HamidReza Arab**, Hooshang RafaatPanah***, Hassan AzangooKhiavi****, Yalda Dadpour*****#**

** Assistant Professor, Dept of Periodontics, School of Dentistry, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran.*

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

**** Associate Professor, Dept of Immunology, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran.*

***** Assistant Professor, Dept of Prosthodontics, School of Dentistry, International Campus of Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.*

****** Assistant Professor, Dept of Periodontics, School of Dentistry, International Campus of Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.*

Received: 15 May 2011; Accepted: 25 September 2011

Introduction: In periodontal diseases, pathogen discrimination by the immune system is an essential factor for triggering host responses. The Toll-like receptor family is responsible for recognition of evolutionarily conserved microbial structures like bacterial lipopolysaccharide (LPS) and activates signaling pathways that eventually lead to immune responses. The aim of the present study was to use real-time PCR to compare TLR-2 and TLR-4 gene expression levels in diseased sites and healthy sites of gingival tissue from periodontitis patients.

Materials & Methods: Gingival biopsies were harvested from healthy sites (BOP- and PD≤3mm) and diseased sites (BOP+ and PD≥5mm) of 20 patients with moderate to severe chronic periodontitis. RNA was extracted from all gingival biopsies. Real-time PCR was performed to evaluate relative quantities of TLR-2 and TLR-4 mRNA. Statistical analyses were done using the Paired Wilcoxon test (2 related sample tests).

Results: The relative expression levels of both TLR-2 and TLR-4 were significantly higher at diseased sites (2.41±2.06 and 1.25±1.16) than at healthy sites (0.91±1.04 and 0.41±0.60) ($P \leq 0.01$).

Conclusion: Periodontal disease can significantly increase TLR-2 and TLR-4 gene expression in gingival tissues.

Key words: Chronic periodontitis, TLR-2, TLR-4, Real-time PCR.

 # Corresponding Author: yaldadadpour@yahoo.com

J Mash Dent Sch 2012; 35(4): 297-306.

 # مولف مسؤول،نشانی: تهران، دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده دندانپزشکی، واحد بین الملل، گروه پریودانتیکس، تلفن: ۰۹۱۵۵۰۲۳۸۱۲

E-mail: yaldadadpour@yahoo.com

چکیده

مقدمه: در عفونت‌های پریودنتال پیش نیاز شروع پاسخ‌های میزبان، شناخت پاتوژن‌ها توسط سیستم ایمنی میزبان می‌باشد. خانواده رسپتورهای Toll-like (TLRs)، مسئول شناسایی ساختارهای حفظ شده میکروبیال نظیر لیپوپلی ساکارید (LPS) باکتری‌ها می‌باشند و مسیرهای سیگنال دهنده را که در نهایت منجر به پاسخ‌های ایمنی می‌شود، فعال می‌کنند. هدف از مطالعهٔ حاضر، ارزیابی مقایسه میزان بروز TLR-2 و TLR-4 توسط تکنیک Real-time PCR در بافت لثه‌ای سالم و دچار پریودنتیت مزمن بود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه کارآزمایی بالینی، که به تصویب کمیته اخلاق رسیده است، بیوپسی‌های لثه از ۲۰ فرد مبتلا به پریودنتیت متوسط تا شدید جمع آوری شد. از هر نفر، ۲ نمونهٔ بیوپسی یکی از سایت سالم (PD≤۳mm و BOP منفی) و یکی از سایت بیمار (PD≥۵mm و BOP مثبت) برداشته شد. RNA استخراج شده از بیوپسی‌ها پس از ساخت cDNA، تحت آنالیز واکنش زنجیره پلیمراز کمی یا PCR کمی قرار گرفتند تا مقادیر نسبی TLR-2 mRNA و TLR-4 در نمونه‌ها مشخص شود. سپس مقادیر نسبی به دست آمده از دو ژن در گروه‌های مختلف، توسط آنالیز آماری ویلکاکسون زوجی با یکدیگر مقایسه شدند.

یافته‌ها: سطوح نسبی بیان ژن‌های TLR-2 و TLR-4 در سایت‌های بیمار (به ترتیب ۲/۰۶±۲/۴۱ و ۱/۱۶±۱/۲۵) نسبت به سایت‌های سالم (به ترتیب ۱/۰۴±۰/۹۱ و ۰/۶۰±۰/۴۱)، به طور معنی‌داری افزایش پیدا کرده بود ($P<0/01$).

نتیجه گیری: نتایج این مطالعه پیشنهاد کنندهٔ این مطلب می‌باشد که بیماری پریودنتال به طور معنی‌داری سبب افزایش بیان ژن TLR-2 و TLR-4 در بافت‌های لثه‌ای می‌گردد.

واژه‌های کلیدی: پریودنتیت مزمن، TLR-2، TLR-4، واکنش زنجیره پلیمراز کمی.

مجله دانشکده دندانپزشکی مشهد / سال ۱۳۹۰ دوره ۳۵ / شماره ۴ : ۳۰۶-۲۹۷ .

مقدمه

عقیده بر این است که در بیماری‌های پریودنتال یک عدم تعادلِ رابطهٔ میزبان-میکروب در ضایعات مخرب درگیر کننده بافت‌های پریودنتال وجود دارد که ممکن است این عدم تعادل منحصر به اشخاص مستعد به بیماری‌های پریودنتال و یا سایت‌های بیمار یک شخص مبتلا به پریودنتیت باشد.

پریودنتیت توسط محیط میکروبی ناحیهٔ زیر لثه آغاز می‌شود و واسطه‌های (مدیاتورهای) تخریب بافت همبندی، متعاقب پاسخ میزبان به عفونت بیماری‌زا ایجاد می‌شوند. در واقع در یک میزبان مستعد، عوامل بیماری‌زای میکروبی می‌توانند با تحریک آزادسازی آنزیم‌ها و سایتوکاین‌های التهابی (Proinflammatory) میزبان منجر به تخریب بافت پریودنتال شوند.[۱]

دفاع ایمنی علیه باکتری‌های پاتوژن پریودنتال متشکل از ایمنی ذاتی و اکتسابی می‌باشد. این دو گروه پاسخ متفاوت، طی بیماری پریودنتال، به طور متوالی فعال شده و در نهایت حذف پاتوژن میکروبی را مورد هدف قرار می‌دهند. سیستم ایمنی در بدن جهت شروع (Trigger) پاسخ‌های التهابی به تهاجم میکروبیال از خانواده‌ای از رسپتورهای تشخیص الگو به نام Toll–like receptor استفاده می‌کند. در واقع، در سیستم ایمنی ذاتی رسپتورهای Toll-like تهاجم میکرو ارگانیسم‌ها را حس کرده و پاسخ‌های ایمنی را جهت پاک کردن این پاتوژن‌ها تحریک و آغاز می‌کنند. این مسأله می‌تواند پیشنهادکننده نقش بسیار مهم این رسپتورها در شروع و پیشرفت پریودنتیت در سایت‌های مبتلا باشد.[۲]

رسپتورهای Toll-Like پس از اتصال به PAMP (Pathogen Associated Molecular Pattern) باکتری‌ها، اطلاعات را از طریق مسیر سیگنال‌دهنده داخل سلولی به سلول منتقل کرده و به این ترتیب سلول‌های ایمنی ذاتی را فعال می‌کنند. همچنین پاسخ‌های ایمنی ذاتی با واسطه TLRها نقش مهمی در تکامل و جهت‌دهی به سیستم ایمنی Adaptive دارند.[۳]

TLRها به طور غالب بر روی سلول‌های سیستم ایمنی ذاتی (سلول‌های دخیل در خط اول دفاع) وجود دارند که شامل نوتروفیل‌ها، مونوسیت/ماکروفاژ و نیز سلول‌های اپی‌تلیال است. این سلول‌ها که نقش مهمی در شناسایی و کشتن میکروارگانیسم‌ها بر عهده دارند TLRهای متفاوتی را بروز می‌دهند که سبب القاء پاسخ‌های ایمنی متفاوتی به یک پاتوژن خاص می‌شوند.[٦-٤] همچنین آنالیزهای DNA Microarray نشان داده است که سطوح بیان TLRها در فیبروبلاست‌های لثه‌ای[۷] و لیگامان پریودنتال[۸] در بیماران مبتلا به پریودنتیت نسبت به افراد سالم افزایش می‌یابد، به طوری که پس از تحریک فیبروبلاست‌های لثه‌ای با لیپوپلی‌ساکارید P.gingivalis بروز این فاکتورها بیشتر می‌شود.

تاکنون ۱۳ رسپتور Toll-like در انسان شناخته شده است. اعضاء مختلف خانواده TLRها مسوؤل شناسایی انواع مختلف PAMP می‌باشند و تا حدودی پاسخ‌های ایمنی ذاتی را اختصاصی می‌کنند. به عنوان مثال باکتری‌های گرم منفی (gr^-) از طریق لیپوپلی‌ساکارید خود، قادر به فعال کردن TLR-4 می‌باشند و باکتری‌های (gr^+) نیز از طریق Lipoteichoic acid قادر به فعال‌سازی TLR-2 می‌باشند.[۹و۲]

از این خانواده مطالعات بیشتر بر روی TLR-4 و TLR-2 تمرکز یافته‌اند، چرا که این دو رسپتور مسئول تشخیص باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی (به ترتیب) درگیر در بیماری‌های پریودنتال می‌باشند و تغییر در میزان بیان ژن این دو رسپتور بر کیفیت آماس و التهاب در بیماری پریودنتال می‌تواند تاثیرگذار باشد. به عنوان مثال Kikkert و همکارانش در مطالعه‌ای در این زمینه نشان دادند که باکتری‌های P.gingivalis، T.forsythia، P.intermedia، P.nigrescense و F.nucleatum قادر به تحریک TLR-2 می‌باشند و باکتری A.a[1] و V.purvula قادر به تحریک TLR-2 و TLR-4 هستند و نتیجه‌گیری شد که در بیماری مزمن پریودنتیت باکتری‌های گرم منفی از طریق TLR-2 و TLR-4 قادر به تحریک تولید سایتوکاین‌ها پیش التهابی نظیر IL-1B و TNF و به دنبال آن القاء تحلیل استخوان آلوئول و تولید ماتریکس متالوپروتئینازها می‌باشند. همچنین سایتوکاین‌های تولید شده سبب تحریک تکامل افتراقی پاسخ‌های Th-1 یا Th-2 می‌شوند. در واقع تحریک مداوم TLR-2 توسط باکتری‌های پریودنتال نقش مهمی در پاسخ ایمنی در جهت Th-2 دارد، درحالی‌که تحریک TLR-4 سبب افزایش تولید سایتوکاین‌های مرتبط با پاسخ Th-1 نظیر IL-12 و Inf γ شده که در پریودنتیت مهاجم که باکتری A.a در آن نقش مهمی دارد، یافت می‌شوند.[۱۰]

Yamaguchi R در مطالعه‌ای جدید، به بررسی اثر پلاک بالای لثه بر تولید سایتوکاین‌های التهابی توسط القاء تحریک TLR-2 و TLR-4 در سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی پرداخت و بیان کرد که سطوح سایتوکاین‌های تولید شده (شامل TNF-α، IL-6 و IL-8) در ارتباط با توانایی پلاک در القاء مسیر TLR-4 می‌باشد و با بکار بردن آنتاگونیست TLR-4، تولید سایتوکاین‌ها نیز مهار می‌شود.[۱۱]

بنابراین با توجه به نقش گیرنده‌های Toll-like در سیستم ایمنی ذاتی به عنوان عامل آغازگر تولید و ترشح سایتوکاین‌ها، ما در تحقیق حاضر بر آن شدیم که جهت بررسی ارتباط موضعی و سیستمیک تحریک این رسپتورها با تخریب پریودنتال، میزان بروز ژن‌های TLR-2 و TLR-4 در بافت لثه‌ای بیمار و سالم افراد مبتلا به پریودنتیت مزمن را مقایسه نماییم.

1. Aggregatibacter actinomycetemconitans

مواد و روش‌ها

این مطالعه کارآزمایی بالینی که به تایید کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی مشهد رسیده است، بر روی ۲۰ بیمار مراجعه کننده به کلینیک‌های تخصصی پریودنتولوژی در سطح شهر مشهد به خصوص بخش پریودنتولوژی کلینیک ویژه دانشکده دندانپزشکی مشهد انجام شد. این افراد از نژاد ایرانی خراسان بودند. بیماران شامل ۱۲ زن و ۸ مرد و در محدوده سنی ٦٥-۳۵ سال بودند. تمامی این اشخاص مبتلا به پریودنتیت مزمن متوسط تا شدید ژنرالیزه به همراه خونریزی هنگام پروبینگ و تحلیل استخوان رادیوگرافیک و غیر سیگاری بودند.

معیارهای خروج افراد از مطالعه به این صورت بود:

- بیماری سیستمیکی که بر روی شرایط پریودنتال تأثیرگذار بوده و یا نیاز به پروفیلاکسی آنتی‌بیوتیکی قبل از درمان‌های جراحی داشته باشد.
- استفادهٔ سیستمیک یا موضعی (زیر لثه‌ای) از مواد ضدمیکروبی یا داروهای ضدالتهاب در ٦ ماه گذشته.
- بارداری، شیردهی یا استفاده از داروهای ضدبارداری در خانم‌های مورد مطالعه.
- وجود ضایعات و تغییرات اندودنتیک در دندان‌های مورد مطالعه.
- بیماران مبتلا به پریودنتیت مهاجم
- عدم سابقه استعمال سیگار

در همهٔ بیماران ابتدا عمق پروبینگ و خونریزی حین پرابینگ (BOP) بررسی شد. سایت‌های مورد نظر بیوپسی انتخاب شده، سپس بی‌حسی موضعی تا حد امکان دور از ناحیه مورد نظر داده شد؛ در مرحله بعد کاملاً مطابق با طرح انسیژن در نظر گرفته شده برای درمان بیمار، بیوپسی ابتدا از نواحی مورد نظر برداشته شد و بعد از برداشتن بیوپسی‌ها، بقیه انسیژن تکمیل گردید. از هر شخص مبتلا به پریودنتیت مزمن متوسط تا شدید، دو نمونه بافتی برداشته شد. یکی از نواحی دارای عمق پروبینگ کمتر از ۵mm و BOP^+ و یکی دیگر از نواحی دارای عمق پروبینگ کمتر از ۳mm و BOP^-، در سکستانت مورد جراحی انتخاب شد و در صورت عدم وجود سایت سالم در سکستانت تحت جراحی، بیوپسی از پاپی سالم در طی جلسات آینده تهیه می‌گردید. به منظور استانداردسازی نمونه‌ها، کلیه بیوپسی‌ها از پاپی فاسیال برداشته شد به طوری که قاعده برش در فاصله‌ای حدود ٤ تا ٥ میلی متر از نوک پاپی قرار داشت.

نمونه‌های بافتی از لحظه برداشت تا زمان استخراج RNA، برای ایجاد پایداری بیشتر، در محلول RNA later (Qiagen، آلمان) نگهداری شدند. پس از آن، استخراج RNA از نمونه‌های بافتی توسط کیت RNeasy Mini Kit (Qiagen، آلمان) و طبق دستور العمل آن انجام شد.

در مرحله بعد جهت انجام Real time PCR از RNA استخراج شده موجود، cDNA با استفاده از کیت (Fermantase, Germany) ساخته شد. برای سنتز cDNA میزان RNA یکسان (۱μ) به کار رفت.

در تکنیک‌های PCR نیاز به یک جفت الیگونوکلوتید به نام پرایمر (سکانس‌های کوتاه DNA تک رشته) می‌باشد و هر کدام از این پرایمرها مکمل یک انتهای سکانس مشخص شده بر روی DNA هدف می‌باشد. پرایمرهای Real time PCR به صورت کاملاً اختصاصی و مکمل ناحیه مورد نظر DNA هدف طراحی میگردند.

مراحل هر سیکل PCR عبارتند از:

۱- مرحله Denaturation: در این مرحله DNA هدف بر اثـر حرارت (بالای ۹۰ درجه سانتیگـراد) از هـم باز و

تک رشته‌ای می‌شود.

۲- مرحله Annealing: در این مرحله با کاهش حرارت سیستم (۶۰-۵۰ درجه سانتیگراد)، پرایمرها در محل مناسب روی رشته مکمل متصل می‌شوند.

۳- مرحله Extension: در این مرحله که دمای آن برای فعالیت آنزیم DNA پلیمراز مطلوب می‌باشد (حدود ۷۲ درجه سانتیگراد)، آنزیم با شروع همانندسازی از محل پرایمرها، همانند سازی DNA هدف را کامل می‌کند.

در Real-time PCR میزان DNA تکثیر شده هم‌زمان با پیشرفت واکنش در زمان واقعی اندازه گیری می‌شود.

دو نوع پرایمر برای ژن‌هایTLR-2 و TLR-4 سفارش داده شد (طوبی نگین، ایران)، این پرایمرها از مقالات معتبر انتخاب گردید[۱۴-۱۲]، توالی پرایمرهای انتخابی در جدول آمده است. آزمایش Real-time PCR روی نمونه‌های cDNA بااستفاده از TAKARA Syber Green SuperMix Universal (Japan) و دستگاه Rotor- Gene 6000 (Corbett, Australia) انجام شد. برای اطمینان از دقت تعیین کمی بیان یا حضور هر ژن، از مقایسه مقدار محصول PCR آن با مقدار یک ژن مرجع با بیان پایدار استفاده می‌شود (Normalized) که در این مطالعه از ژن بتا-دو میکروگلوبولین به عنوان رفرنس استفاده شد. سپس آنالیز نسبی بیان ژن‌ها به کمک روش منحنی استاندارد انجام گرفت. سپس برای تعیین دقیق میزان بیان ژن همانطور که قبلاً گفته شد میزان نسبی cDNA بدست آمده (Gene of interest) ژن هدف بر میزان نسبی cDNA ژن مرجع (House keeping gene) در همان نمونه تقسیم می‌شود تا تفاوت‌های احتمالی در کیفیت یا مقدار cDNA در نمونه‌های مختلف نرمال گردد. چرا که بیان ژن رفرنس در تمام نمونه‌ها به میزان ثابتی می‌باشد. سپس مقادیر به دست آمده از نمونه‌های جمعیتی متفاوت با روش‌های آماری با هم مقایسه می‌شوند. جهت مقایسه و بررسی ارتباط بین گروه‌ها ابتدا نحوه توزیع داده‌ها تعیین گردید. برای بررسی توزیع داده‌ها از آزمون کولموگروف-اسمیرنوف استفاده شد.

برای مقایسه داده‌هایی که از توزیع غیرنرمال برخوردار بودند، تست ویلکاکسون زوجی به کار گرفته شد. اختلاف بین داده‌ها زمانی از لحاظ آماری معنی دار تلقی شد که P کمتر از ۰/۰۵ بود.

یافته‌ها

در این مطالعه از ۲۰ فرد غیرسیگاری مبتلا به پریودنتیت مزمن متوسط تا شدید (۸ زن و ۱۲ مرد) با متوسط سنی ۷/۳±۴۵/۳ سال (۴۰-۴۷ سال)، دو نمونه بافتی یکی از سایت‌های سالم و دیگری از سایت بیمار (۴۰ نمونهٔ بافتی) به دست آمد. در سایت‌های سالم که فاقد خونریزی حین پروبینگ بودند، متوسط عمق پاکت ۰/۸±۱/۸ میلی متر و در سایت‌های بیمار که خونریزی حین پروبینگ داشتند، متوسط عمق پاکت ۰/۹±۶/۵ میلی‌متر بود.

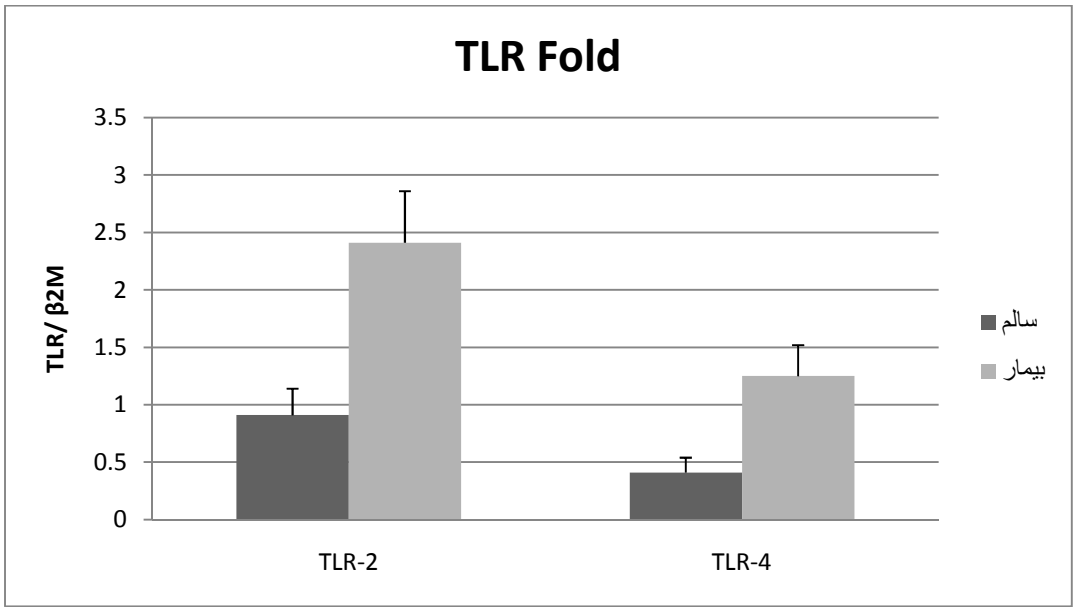
میزان بیان نسبی ژن TLR-2 در نمونه‌های سالم ۱/۰۴±۰/۹ و در نمونه‌های بیمار ۲/۰۶±۲/۴ بود، همچنین میزان بیان نسبی ژن TLR-4 در نمونه‌های سالم ۰/۶±۰/۴ و در نمونه‌های بیمار ۱/۱۶±۱/۲ بود (جدول۱).

آزمون ویلکاکسون زوجی برای بررسی معنی‌داری اختلاف بین سایت‌های بیمار و سالم نشان داد که میزان بیان نسبی هر دو ژن TLR-2 (P=۰/۰۰۴) و TLR-4 (P=۰/۰۲) در سایت‌های بیمار افزایش معنا داری نسبت به سایت‌های سالم داشته است (آماره آزمون برای ژن TLR-2، z= -۲/۳۷ و برای ژن TLR-4، z= -۲/۸۷ بود). به طوری که میزان بیان نسبی ژن TLR-2 در سایت‌های بیمار نسبت به سایت‌های سالم تقریباً ۲/۵ برابر و میزان

بیان نسبی ژن TLR-4 در سایت‌های بیمار نسبت به سایت‌های سالم تقریباً ۳ برابر شده بود. (نمودار ۱)

جدول ۱ : میزان نسبی بیان ژنی TLR-2 و TLR-4 (میانگین و انحراف معیار) در گروه‌های مختلف مورد مطالعه

متغیر	تعداد	میانگین	انحراف معیار
Tlr-2 fold سایت سالم	۲۰	۰/۹٦	۱/۰٤
Tlr-2 fold سایت بیمار	۲۰	۲/٤٦	۲/۰۲
Tlr-4 fold سایت سالم	۲۰	۰/٤۷	۰/٦۸
Tlr-4 fold سایت بیمار	۲۰	۱/۲۵	۱/۱۹



نمودار ۱ : مقایسه اختلاف بیان ژنی TLR-2 و TLR-4 بین سایت‌های بیمار و سالم (Mean± SD)

بحث

بیماری پریودنتال یکی از شایع‌ترین بیماری‌های التهابی است که به درجات مختلف و با گذشت زمان به دلیل مواجهه مداوم سیستم دفاعی بدن با پاتوژن‌های خارجی یا همزیست حفره دهان به وجود می‌آید.

تقریباً در تمام انواع بیماری‌های پریودنتال دو عامل باکتری‌های پاتوژن و پاسخ میزبان، نقش‌های کلیدی در شروع و پیشرفت این بیماری‌ها دارند.

کیفیت پاسخ‌های میزبان به عوامل محرک، تعیین کننده پیشرفت یا توسعهٔ بیماری می‌باشد و میزان پیشرفت بیماری پریودنتال به تداخلات پیچیده باکتری‌های پریودنتوپاتیک و سلول‌های سیستم ایمنی وابسته می‌باشد. شواهد کلینیکی و اپیدمیولوژیک مؤید این مطلب است که از مجموع افرادی که به ژنژیویت مبتلا هستند، تنها درصد کوچکی به اشکال شدید و مخرب بیماری پریودنتال مبتلا خواهند شد[۱۵] و این شواهد بر این موضوع دلالت می‌کند که می‌بایست تفاوت‌های فردی، ژنتیکی و محیطی متفاوتی در پروسه پریودنتیت نقش داشته باشد.

یکی از یافته‌های جدید در ارتباط با مکانیسم پاسخ ایمنی میزبان به محصولات باکتریال و ایجاد التهاب در بیماری‌های پریودنتال، شناسایی خانواده گیرنده‌های Toll-like می‌باشد. پیش‌نیاز شروع پاسخ‌های میزبان در بیماری‌های پریودنتال، شناخت پاتوژن‌ها توسط سیستم ایمنی میزبان می‌باشد. مشخص شده است که سلول‌های دخیل در سیستم ایمنی ذاتی با داشتن رسپتورهای Toll-like (TLRS) قادر به شناسایی انواع باکتری‌های پاتوژن می‌باشند که در مرحله بعد، TLRs با فعال کردن مسیر سیگنال‌دهنده، باعث ایجاد پاسخ ایمنی و تولید واسطه‌های التهابی و سایتوکاین‌های مختلف شده و در نتیجه تخریب بافت پریودنشیوم را القا می‌کنند.[۲و۳]

در مطالعه حال حاضر ما سایت‌های سالم و بیمار را در افراد مبتلا به پریودنتیت مزمن، از لحاظ میزان بیان ژن TLR-2 و TLR-4 که به ترتیب PAMP باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی را شناسایی می‌کنند، مورد مقایسه قرار دادیم.

در این مطالعه بیوپسی‌های لثه توسط تکنیک دقیق و جدید Real time PCR تحت آنالیز قرار گرفتند. با این تکنیک ما قادر به اندازه‌گیری کمی میزان بیان ژن‌هایی با بروز اندک در بافت‌ها می‌باشیم. به این ترتیب این مطالعه این امکان را فراهم می‌آورد تا میزان TLR-2 و TLR-4 تولید شده در موضع را به طور دقیق‌تری ارزیابی نماییم.

جهت غلبه بر تفاوت‌های زیاد در سایت‌های مختلف لثه، تلاش زیادی جهت انتخاب گروه‌های مطالعه و سایت مورد بیوپسی با توجه به معیارهای خروج و ورود مطالعه انجام شد. در اکثر مطالعات انجام شده برای مقایسه بافت‌های سالم و بیمار، گروه‌های تست و کنترل جداگانه در نظر گرفته شده است[۱۶]، اما در مطالعه حال حاضر برای مقایسه بیان ژن TLR-2 و TLR-4، از بافت‌های لثه‌ای سالم و بیمار از دو سایت مختلف در هر بیمار مبتلا به پریودنتیت نیز نمونه برداری شد. به این معنی که در هر شخص مبتلا، بافت برداشته شده از یکی از سایت‌های سالم به عنوان کنترل در نظر گرفته شده است، تا به این ترتیب تاثیر التهاب هم به صورت موضعی و هم به صورت سیستمیک در بافت‌های لثه‌ای در فرد دارای بیماری پریودنتال بررسی شود.

آنالیز اطلاعات به دست آمده، بیانگر بروز کم این ژن‌ها (TLR-4,TLR-2) در تمام بیوپسی‌های لثه‌ای سالم و بیمار بود. بروز کمتر و نسبتاً ثابت این دو ژن در سایت‌های سالم افراد مبتلا به پریودنتیت نسبت به بـافت‌های لثه‌ای بیمار در همان افراد می‌تواند تأیید کننده

Site specific بودن بیماری پریودنتیت مزمن باشد.

طبق نتایج بدست آمده، بیان هر دو ژن TLR-2 و TLR-4 در سایت‌های بیمار با عمق پروبینگ بیش از ٤ میلی متر و BOP مثبت نسبت به سایت‌های سالم لثه، افزایش معنی‌داری نشان داد که پیشنهاد کننده این مطلب است که تداخل باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی در موضع با این رسپتورها و افزایش فعال‌سازی آنها در بیماری پریودنتیت مزمن، می‌تواند منجر به تخریب بافت‌های پریودنتال از طریق Triggering این رسپتورها و به دنبال آن فعال کردن مسیرهای مختلف التهاب و آماس باشد. این نتیجه با نتایج مطالعات تقریباً مشابه در این زمینه همخوانی دارد. از جمله مطالعات به چند مطالعه زیر می‌توان اشاره نمود:

Sarah و همکارانش در یک مطالعه در مورد نحوه بروز TLRs در بیماری‌های پریودنتال با استفاده از تکنیک RT-PCR نشان دادند که TLR-2 و TLR-4 هر دو در نمونه‌های لثه افراد سالم بروز دارند و در نمونه‌های افراد مبتلا به پریودنتیت مزمن بروز هر دو TLR نسبت به نمونه‌های سالم و ژنژیویت افزایش داشته است و میزان بروز TLR-4 نسبت به TLR-2 بیشتر است.[١٦] در مطالعه حاضر نیز میزان افزایش TLR-4 که حدوداً سه برابر شده بود از میزان افزایش TLR-2 که حدوداً دو برابر شده بود، بیشتر بود که با توجه به اینکه باکتری‌های -gr از طریق لیپوپلی سکارید خود، قادر به فعال کردن TLR-4 می‌باشند و باکتری‌های +gr نیز از طریق Lipoteichoic acid قادر به فعال‌سازی TLR-2 می‌باشند، چنین یافته‌ای می‌تواند نشان‌دهنده نقش فعال‌تر باکتری‌های گرم منفی نسبت به باکتری‌های گرم مثبت در تخریب اتصالات لثه بیمار مبتلا به پریودنتیت مزمن پیشرفته باشد.

Yoshioka و همکارانش نیز در مطالعه ای، به بررسی تعیین اثر تحریک کنندگی پلاک فوق لثه‌ای بر القاء فعالیت TLR-2 و TLR-4 پرداختند و این طور نتیجه‌گیری کردند که اثر القاءکنندگی پلاک بر تحریک TLR-4 با Plaque score و BOP دندان‌هایی که نمونهٔ پلاک از آنها برداشته شد رابطه مستقیم دارد و اثر پلاک بر تحریک فعالیت TLR-2 با عمق پروبینگ و سطح چسبندگی کلینیکی رابطه منفی دارد.[١٧] در این مطالعه علایم کلینیکی افزایش تخریب پریودنتال با کاهش فعالیت TLR-2 همراه بود که توسط مطالعه ما تایید نگردید. مطالعات نشان داده‌اند که مونوسیت‌های جدا شده از بیماران مبتلا به پریودنتیت، سایتوکاین‌های مربوط به پاسخ‌های ایمنی Th-2 را تولید می‌کنند و بنابراین پیشنهاد شده است که این پاسخ‌ها در پریودنتیت مزمن از اهمیت زیادی برخوردارند، با توجه به این که تحریک TLR-2 پاسخ‌های Th-2 را تقویت می‌کند به نظر می‌رسد افزایش بروز TLR-2 همراه با افزایش عمق پروبینگ توجیه منطقی بیشتری داشته باشد.

Beklen در مطالعه‌ای با تحریک سلول‌های اپی‌تلیال دهان با لیگاندهای TLR-2 و TLR-5 که بروز آنها در اپی‌تلیوم نیز نشان داده شده است، افزایش قابل توجه تولید IL-1B و TNF-α را نشان داد و نتیجه گیری کرد که چنین تداخل لیگاند-رسپتور و به دنبال آن تحریک عوامل پیش التهابی در کلینیک می‌تواند به معنای افزایش ژنژیویت و پریودنتیت باشد.[١٨]

همانطور که ذکر شد اغلب مطالعات در این زمینه نقش باکتری‌های مختلف را بر رده‌های سلولی مختلف به صورت *in vitro* نشان داده اند، در حالی که در مطالعه حاضر تاثیر بیماری بر بافت‌های ساپورتینگ دندان شامل انواع سلول‌ها که با یکدیگر در تقابل بسیاری هستند به صورت کلی و کلینیکی بررسی شده است و ارزش بیشتری نسبت به مطالعات آزمایشگاهی دارد.

در این مطالعه ما جهت حذف اثر جنسیت در نتایج تلاش کردیم که تعداد زنان و مردان تفاوت معنی‌داری با یکدیگر نداشته باشند و در مطالعات آینده بهتر است تعداد بیوپسی بیشتری بدست آید تا از لحاظ جنسیتی بین زن و مرد از نظر میزان بروز این ژن‌ها نیز مقایسه صورت گیرد.

نتیجه گیری

در این تحقیق بروز ژن‌های TLR-2 و TLR-4 در بافت لثه‌ای در مناطق دچار التهاب پیشرفته پریودنتال افزایش داشت که می‌تواند نشانگر تحریک این رسپتورها توسط باکتری‌های دخیل در پریودنتیت مزمن باشد که منجر به تشدید واکنش‌های التهابی در آن ناحیه می‌گردد.

تشکر و قدردانی

با تشکر از زحمات بی دریغ پرسنل گروه ایمونولوژی که در طراحی و اجرای آزمایش‌های مولکولی و Real time-PCR به ما کمک فراوانی نمودند. همچنین از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مشهد جهت حمایت‌های مالی در راستای انجام این طرح قدردانی می‌گردد.

منابع

1. Kirkwood LK, Taba M, Rossa C, Preshaw PM, Giannobile WV. Molecular biology of the host-microbe interaction in periodontal diseases. In: Newman M, Takei H, Klokkevold P, Carranza F. Carranza's Clinical Periodontology. 10th ed. Philadelphia: W.B. Saunders Co; 2006. P. 259-75.
2. Akira S, Kawou T. Toll-like receptor signalling. Arthritis Res Ther 2005; 7(1): 12-9.
3. Iwasaki A, Medzhitov R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. Nat Immunol 2004; 5(10): 987-95.
4. Hayashi F, Means TK, Luster AD. Toll-like receptors stimulate human neutrophil function. Blood 2003; 102(7): 2660-9.
5. Kusumoto Y, Hirano H, Saitoh K, Yamada S, Takedachi M, Nozaki T, et al. Human gingival epithelial cells produce chemotactic factors interleukin-8 and monocyte chemoattractant protein-1 after stimulation with Porphyromonas gingivalis via Toll-like receptor 2. J Periodontol 2004; 75(3): 370-9.
6. Mori Y, Yoshimura A, Ukai T, Lien E, Espevik T, Hara Y. Immunohistochemical localization of Toll-like receptors 2 and 4 in gingival tissue from patients with periodontitis. Oral Microbiol Immunol 2003; 18(1): 54-8.
7. Wang PL, Ohura K, Fujii T, Oido-Mori M, Kowashi Y, Kikuchi M, et al. DNA microarray analysis of human gingival fibroblasts from healthy and inflammatory gingival tissues. Biochem Biophys Res Commun 2003; 305(4): 970-3.
8. Hatakeyama J, Tamai R, Sugiyama A, Akashi S, Sugawara S, Takada H. Contrasting responses of human gingival and periodontal ligament fibroblasts to bacterial cell-surface components through the CD14/toll-like receptor system. Oral Microbiol Immunol 2003; 18(1): 14-23.
9. Sarir H, Mortaz E, Karimi K, Kraneveld AD, Rahman I, Caldenhoven E, et al. Cigarette smoke regulates the expression of TLR4 and IL-8 production by human macrophages. J Inflamm 2009; 6: 12.
10. Kikkert R, Laine ML, Aarden LA, Van Winkelhoff AJ. Activation of toll-like receptors 2 and 4 by gram-negative periodontal bacteria. Oral Microbiol Immunol 2007; 22(3): 145-51.
11. Yamaguchi R, Yoshimura A, Yoshioka H, Kaneko T, Hara Y. Ability of supragingival plaque to induce toll-like receptor 4-mediated stimulation is associated with cytokine production by peripheral blood mononuclear cells. J Periodontol 2009; 80(3): 512-20.
12. Vogel S, Fitzgerald K, Fenton M. TLRs: Differential adapter utilization by Toll-like receptors mediates TLR-specific patterns of gene expression. Mol Interv 2003; 3(8): 466-77.

13. Zarember KA, Godowski PJ. Tissue Expression of Human Toll-Like receptors and differential regulation of Toll-Like receptor mRNAs in leukocytes in response to microbes, their products, and cytokines. J Immunol 2002; 168(2): 554-61.
14. Winder A, Wohlford-Lenane C, Scheetz T, Nardy B, Manzel L, Look D, et al. Differential effects of cytokines and corticosteroids on Toll-like receptor 2 expression and activity in human airway epithelia. Respir Res 2009; 10: 96.
15. Löe H, Anerud A, Boysen H, Morrison E. Natural history of periodontal disease in man. Rapid moderate and no loss of attachment in Sri Lankan laborers 14 to 46 years of age. J Clin Periodontol 1986; 13(5): 431-45.
16. Sarah S, Tamilselvan S, Kamatchiammal S, Suresh R. Expression of Toll-like receptor 2 and 4 in gingivitis and chronic periodontitis. Int J Dent Res 2006; 17(3): 114-6.
17. Yoshioka H, Yoshimura A, Kaneko T, Golenbock DT, Hara Y. Analysis of the activity to induce Toll-like Receptor (TLR) 2- And TLR4-mediated stimulation of supragingival plaque. J Periodontol 2008; 79(5): 920-8.
18. Beklen A, Sorsa T, Konttinen YT. Toll-like receptors 2 and 5 in human gingival epithelial cells co-operate with T-cell cytokine interleukin-17. Oral Microbiol Immunol 2009; 24(1): 38-42.