Archive of SID

تحقیقی

اثرفنی توئین و سیکلوسپورین بر آنزیم های بافت همبند در فیبروبلاست های بالغین و کودکان

سورنا وهبی[۱]، شیلان صلاح[۲]، بهاره ناظمی سلمان[۳]، فاطمه نقره کار[۴]، امیر علی اسدی[۵]

۱. دانشیار بخش پریودونتیکس، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
۲. استادیار بخش بیماریهای دهان دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان
۳. استادیار بخش کودکان، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان
۴. دندانپزشک
۵. دانشجوی دندانپزشکی، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

چکیده

زمینه و هدف: افزایش حجم لثه یک اثر جانبی معمول در افراد مصرف کننده داروهای ضد صرع، سرکوبگر ایمنی و بلوک کننده‌های کانال کلسیمی است. سیکلوسپورین وفنی توئین از مهمترین داروهای مرتبط با افزایش حجم لثه ای هستند. فیبروبلاست های لثه ای در تولید آنزیم های مشخص بعد از مصرف داروهای مرتبط با افزایش حجم لثه نقش بارزی دارند. مطالعات گذشته شیوع بالاتر افزایش حجم لثه ای در کودکان و بالغین را نشان داده اند. هدف این مطالعه، مقایسه فیبروبلاست های طبیعی لثه انسان در مجاورت سیکلوسپورین یا فنی توئین و مقایسه میزان تولید سطوح مشخصی از آنزیم های موثر در افزایش حجم لثه ای می باشد.

روش بررسی: نمونه ها از بیوپسی لثه ای هفت فرد بالغ و هفت کودک فراهم و در دو محیط کشت داده شدند با رشد سلول های فیبروبلاست، آنها در معرض سیکلوسپورین یا فنی توئین قرار گرفتند. واکنش زنجیره ای پلیمراز معکوس (RT-PCR) به منظور اطمینان از سطوح تولید شده R-EGF، کاتسپین B، L- لیزیل اکسیداز، COL1، TGFβ1، MMP-1,2، TIMP1 انجام شد.

یافته ها: با توجه به آنالیز های RT-PCR، TGFβ1 و TIMP، کاتسپین B و EGF مقدار قابل مقایسه‌ای در بالغین و گروه‌های کودکان نشان دادند. TGFβ1 تنها مدیاتور ایجاد شده توسط هر دو دارو در بالغین و کودکان بود. فنی توئین باعث تولید TIMP شدو سیکلوسپورین ژن کاتسپین B را در هر دو گروه سنی القا کرد.

نتیجه‌گیری: سطوح مختلفی از آنزیم‌ها بعد از درمان فیبروبلاست‌های لثه‌ای بالغین و کودکان با فنی‌توئین یا سیکلوسپورین می‌تواند دلیل شدت افزایش حجم لثه‌ای بیشتر در کودکان باشد. مطالعات بیشتری در مورد پاتوژنز افزایش حجم لثه‌ای در گروه‌های مختلف سنی نیاز است انجام شود.

واژه‌های کلیدی: سیکلوسپورین، فیبروبلاست، فنی توئین

وصول مقاله:۱۳۹۴/۱۰/۱۷ پذیرش مقاله: ۱۳۹۵/۲/۲۸

نویسنده مسئول: دکتر بهاره ناظمی سلمان ایمیل Dr.b.nazemi@gmail.com

مقدمه:

افزایش حجم لثه ای مرتبط با دارو ممکن است بعد از مصرف برخی داروهای ضد صرع، سرکوبگر ایمنی و بلوک کننده‌های کانال کلسیم رخ دهد. دشواری در صحبت کردن، تأخیر رویش دندان‌ها و مشکلات زیبایی

www.SID.ir

Archive of SID

مصرف کنندگان این داروها را درگیرمی نماید (۱, ۲). بیشترین داروهایی که باعث افزایش حجم لثه ای می شوند به ترتیب فنی توئین، سیکلوسپورین و نیفیدیپین هستند (۳).

هایپرپلازی فیبروتیک لثه به عنوان نتیجه ای از افزایش حجم التهابی بافت همبند یا هایپرپلازی اپیتلیوم لثه ای شناخته شده است (٤). مدت و دوز داروی مصرف شده علاوه بر پتانسیل ژنتیکی و فاکتورهای محیطی، میزان التهاب، فیبروز و سلولاریتی ناحیه درگیر شده را تحت تاثیر قرار می دهند. سن بیمار و میزان پلاک دندانی نیز از فاکتورهای بسیار مهم و مرتبط با هایپرپلازی لثه ای ایجاد شده توسط دارو است (٥). مطالعات اپیدمیولوژیک، ارتباط و شدت بیشتری از هایپرپلازی القا شده توسط دارو را در بچه ها، به خصوص در پسران، نوجوانان و نواحی قدامی فک نشان داده اند (٦). Saymour و همکاران گزارش کرده اند که هایپر پلازی لثه ای القا شده توسط سیکلوسپورین در بچه ها در مقایسه با بالغین بیشتر است هر چند هایپر پلازی مرتبط با بتا بلاکرهای کلسیم که بیشتر توسط بالغین مصرف می شود، به ندرت در کودکان دیده شده است (۷).

پاتوژنز هایپرپلازی لثه ای همچنان مبهم و عود ممکن است ۳ تا ٦ ماه بعد از جراحی رخ دهد (۲, ٥, ۸). مطالعات گذشته مکانیسم های مختلفی را مرتبط با هایپرپلازی لثه ای ایجادشده توسط دارو مانند عملکرد متفاوت فیبروبلاست ها، تولید سایتوکاین ها از جمله IL-6, IL-8, IL-1β, TGF-β1, PGE2, ذخیره پروتئین های ماتریکس خارج سلولی مانند کلاژن و عدم تعادل بین فرآیندهای تولید و تخریب در بافت همبند، افزایش تولید گلیکوزآمینوگلیکان‌ها و اختلالات عملکردی در ترشح آنزیم های مرتبط با ماتریکس خارج سلولی مانند متالوپروتئینازو بازدارنده های بافتی پیشنهاد کرده اند (٦, ۸-۱۰). آنزیم های مختلفی در فرآیند متابولیسم کلاژن و ماتریکس خارج سلولی حضور دارند. متالوپروتئینازها آنزیم های اولیه مرتبط با تخریب و ازکارافتادگی ماتریکس بافت همبند هستند و بخصوص در پروسه های فیزیولوژیک و پاتولوژیک متابولیسم کلاژن تایپ I موثراند. فعالیت این آنزیم ها بوسیله بیان ژن در مراحل رونویسی و ترجمه و کارایی آنها بوسیله TIMP یا مهار کننده‌های بافتی که به عنوان آنتاگونیست MMP نقش ایفا می کنند القا می‌شود (۱۱).

در یک مطالعه تازه منتشر شده توسط وهبی و همکارانش (٤)، نشان داده شد که عدم وجود تنظیمی برای فرآیند پروتئولیتیک و تناوب مسیرتخریب کلاژن، منجر به تجمع کلاژن می شود. برای نمونه، فنی توبین و سیکلوسپورین هردو باعث افزایش تولید الاستین توسط فیبروبلاست‌های لثه‌ای به هنگام ارزیابی با PCR شدند.

در مطالعه ی دیگری که در سال ۲۰۱٤ توسط وهبی و همکارانش بر روی تولید انزیم های فیبروبلاست لثه بر اثر فنی توئین صورت گرفته است مشخص گردیده که تفاوت در میزان تولید لیزیل اکسیداز و الاستین در

www.SID.ir

Archive of SID

بزرگسالان و کودکان معنی دار است و تفاوت در گروه های سنی میتواند با این موضوع مرتبط باشد (۱۲).

مطالعات همچنین ثابت کرده اند که طی تغییرات فیبروژنیک موضعی سایتوکاینهایی مانند TNF-α و TGFβ و اینترلوکین‌های مختلف در پاسخ به برخی داروها تولید میشود و عدم تعادل سایتوکاین، می تواند به عنوان عاملی موثر در هایپرپلازی لثه ای القا شده توسط دارو تلقی شود. TNF-α یک سایتوکاین پیش التهابی مهم در وضعیت های التهاب مزمن لثه ای است که باعث تحریک تکثیر فیبروبلاستها و مانع فاگوسیتوز کلاژن بوسیله فیبروبلاست های لثه ای می شود. همچنین مانع سنتز کلاژن شده و تولید ماتریکس متالوپروتئینازها را که ماتریکس لثه‌ای را تخریب می‌کنند افزایش می‌دهد (۱۳).

در مطالعه ای که در سال ۲۰۱٤ توسط ناظمی سلمان انجام شد مشخص گردید که تولید واسطه های التهابی (از جمله IL8،IL1β, PGE2, IL6, TGFβ) در اثر فنی توئین توسط فیبروبلاستهای لثه کودکان بیشتر از بالغین است (۱). مشخص شده که طبیعت ضایعات التهابی در کودکان با بالغین متفاوت است (۱۲). بر اساس تئوری Gillet، لنفوسیت B تمایز نیافته مسئول بیشتر فرآیندهای التهابی انفیلتراتیو است؛ بنابراین ضایعات کلینیکی پیشرفت نمی کنند و ممکن است ترکیب یکسانی از سلول های انفیلتراتیو در ضایعات نهفته بالغین حضور داشته باشند (۱٤, ۱۵). بر اساس نظریه Longhurst (۱٦) و Seymour (۱۷) سلول های انفیلتراتیو به طور غالب شامل T-Cells هستند و با شروع فرآیندهای تخریبی در زخم‌ها، سلول‌های انفیلتره به سلول‌های B یا پلاسماسل تمایز می‌یابند.

فنی توئین و سیکلوسپورین به مدت طولانی برای اهداف درمانی در بیماران با بیماری دستگاه عصبی مرکزی (۱۸) صرع، انتقال عضو و بیماری های مرتبط با ایمنی، بخصوص در بچه ها استفاده می‌شده است. فیبروبلاست‌ها سلول های اصلی درگیر در هایپرپلازی لثه ای ایجاد شده توسط فنی توپین و سیکلوسپورین هستند. آنها مسئول تولید مدیاتورهای التهابی، ماتریکس خارج سلولی و تنظیم متابولیسم کلاژن می باشند (۱۹). در مورد شیوع غیر یکسان هایپرپلازی لثه ای در کودکان و بالغین و مکانیسم ناشناخته عملکردی فنی توپین و مدیاتور های التهابی در دو گروه اطلاعات اندکی وجود دارد. هدف از این مطالعه، مقایسه فعالیت فیبروبلاست های طبیعی لثه کودکان و بزرگسالان در مجاورت سیکلوسپورین یا فنی توپین و مقایسه میزان تولید سطوح مشخصی از آنزیم های موثر در افزایش حجم لثه ای می باشد.

روش بررسی

این مطالعه یک مطالعه ی in vitro (آزمایشگاهی) بوده و در سال ۱۳۹۰ در دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی با کد اخلاق ۱۰۹ انجام شد

www.SID.ir

Archive of SID

نمونه ها از بیوپسی لثه ای ۷ بیمار بالغ بین سنین ۳۵ تا ۴۲ سال که برای جراحی افزایش طول تاج ارجاع شده بودند، جمع‌آوری شد. بیماران سیستمیک یا پریودنتال از مطالعه خارج شدند. نمونه های بچه ها شامل بافت اضافی به دست آمده در طی روند خارج کردن دندان نهفته در ۷ کودک بین سنین ۷ تا ۱۱ سال بود و مجوز اخلاقی از کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی اتخاذ شد.

مرحله آزمایشگاهی کشت سلولی و PCR

هر نمونه لثه ای به DMEM با ۱۰٪ سرم جنین گاوی، ۵۰ واحد / میلی‌لیتر استریتومایسین و ۵۰ واحد/ میلی‌لیتر پنی‌سیلین ارسال شد. سپس محیط‌های کشت در ۳۰ و ۵٪ CO_2 انکوبه و برای اطمینان از عدم آلودگی در محیط کشت، در صورت نیاز، محیط کشت جدید افزوده شد. فیبروبلاست‌ها تکثیر، آغشته به تریپسین و به بقیه محیط‌های کشت منتقل شد تا نسل چهارم سلول‌ها بتوانند در آزمایش استفاده شوند. بعد از شمارش سلول ها، تعداد مشخصی از سلول ها در محیط های کشت قرار گرفت و بعد از ۷۲ ساعت محیط های کشت، به گروه های آزمایشی و کنترل تقسیم شد. محیط های کشت آزمایشی،۲۰ میلیگرم/ میلی‌لیتر فنی تویین یا ۸۰۰ میلیگرم/میلی لیتر سیکلوسپورین دریافت کردند. سلول های فیبروبلاست گروه های آزمایشی و کنترل از فلاسک جدا و سپس در بافر RNA نگه داری شدند.

RNA فیبرو بلاست های لثه ای، با استفاده از Mini RNA Assay ،Kit استخراج شدند. واکنش RT به صورت ذیل انجام گرفت: ترکیب واکنش شامل ۱ میلی‌مول Mgc 12، 2/0 میلی مول dNTP بافر RT، 5/0 میکروگرم الیگوپرایمر dT، 200 واحد MmuLV ترنسکرپیتاز معکوس و تا ۲۰ میکرولیتر آب Depc تا واکنش حجم نهایی مراحل پرایمرهای RT-PCR (جدول ۱) و برنامه حرارتی PCR (جدول ۲) انجام گیرد.

واکنش‌های PCR در نهایت با حجم ۳۰ میکرولیتر شامل ۵ میکرولیتر از cDNA، 2/0 میلی‌مول از مخلوط dNTP و ۱ pmol از هر پرایمر و ۱/۲۵ واحد از Taq DNA Polymerase انجام شد. محصولات بدست آمده با ۲٪ ژل آگاروز الکتروفورز آنالیز شد و بوسیله SyBR به رنگ سبز درآمد. کمی سازی باندهای PCR بوسیله gene tools و نرم افزار Fire Reader که روی دستگاه UVITECH به عنوان دستور استفاده سوار شده‌بود، محاسبه شد. محصولات PCR پس از ۳۵ سیکل آنالیزگردید.

آنالیز آماری

آنالیز آماری با استفاده از Kruskal Wallis آنالیز یک طرفه واریانس ادامه یافته بوسیله U-Mann- Whitney تست مقایسه‌ای چندگونه انجام شد. اثر سن روی هر گروه داروی ضد صرع بوسیله تست U-Mann-Whitney انجام گرفت. میزان خطای آلفای کمتر از ۰/۰۵ به عنوان معنی دار انتخاب شد.

www.SID.ir

Archive of SID

یافته ها

در شروع ۹ فرد بالغ و ۸ کودک وارد مطالعه شدند که به دنبال از دست دادن برخی نمونه ها به خاطر مشکلات آزمایشگاهی وکلینیکی، ۱٤ نمونه شامل ۷ نمونه از کودکان و ۷ نمونه از بالغین به منظور اطمینان از کارایی فیبروبلاست های لثه ای، در تولید آنزیم های مشخص استفاده شد. با توجه به آنالیز های RT-PCR، TGFβ1 و TIMP، کاتسپینB و EGF، مقدار قابل مقایسه‌ای در بالغین و گروه‌های کودکان نشان دادند. **القای آنزیم ها توسط سیکلوسپورین در گروه بالغین**

وجود سیکلوسپورین در گروه بالغین منجر به کاهش میزان بیان TIMP، TGFβ1 کاتسپینB، الاستین و EGF شد که نقش مهمی در تغییر و تبدیل لثه ای و افزایش میزان بیان لیزیل اکسیداز در مقایسه با میزان یافت شده گروه شاهد دارند (جدول ۱).

القای آنزیم ها توسط سیکلوسپورین در گروه کودکان

سیکلوسپورین در گروه کودکان باعث کاهش میزان تولید MMP1، TIMP و افزایش میزان تولید در TGFβ1 و کاتسپین B در مقایسه با مقادیر گروه کنترل شد (جدول۱). در مقایسه ی القا آنزیمی در کودکان و بزرگسالان TGFβ1 میزان افزایش یافته در کودکان و کاهش یافته در بالغین نشان داد و در دو گروه میزان تولید TIMP کاهش داشت (نمودار ۱).

القای آنزیم ها توسط فنی توین در گروه بالغین

فنی توئین، میزان تولید TGFβ1، کاتسپینB و لیزیل اکسیداز را افزایش و میزان تولید الاستین و EGF را در گروه بالغین در مقایسه با مقدار گروه کنترل کاهش داد (جدول ۱).

القای آنزیم ها توسط فنی توین در گروه کودکان

EGF در مقادیر مشخص افزایش یافته و MMP1، کاتسپین B و TIMP در مقایسه با مقادیر در گروه های شاهد به طور معنی دار کاهش یافت. (جدول ۱) همچنین در نمودار ۲ القای آنزیم ها توسط سیکلوسپورین در گروه بالغین و کودکان مقایسه شده است.

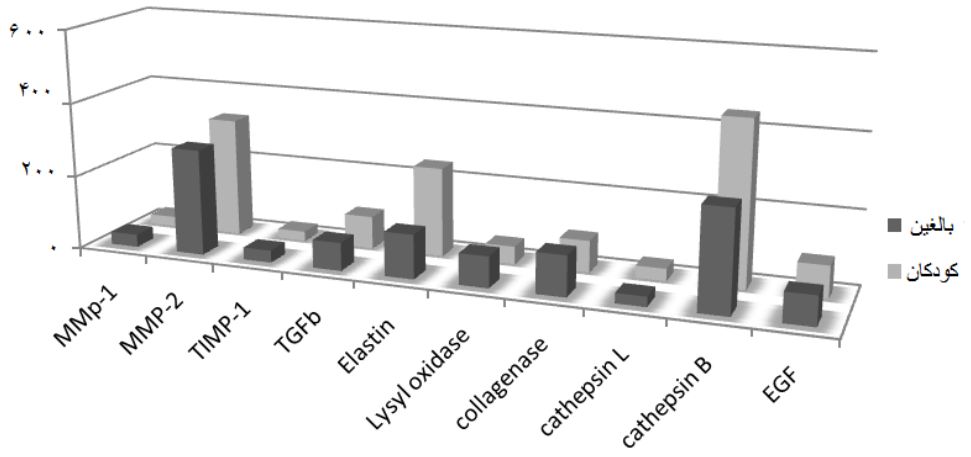
بحث:

این مطالعه نشان داد که بعد از قرار گیری فیبروبلاست‌های لثه‌ای بالغین و کودکان در معرض فنی‌توین یا سیکلوسپورین سطوح متفاوت تولید آنزیم‌ها می‌تواند دلیل شدت افزایش حجم لثه‌ای بیشتر در کودکان باشد.

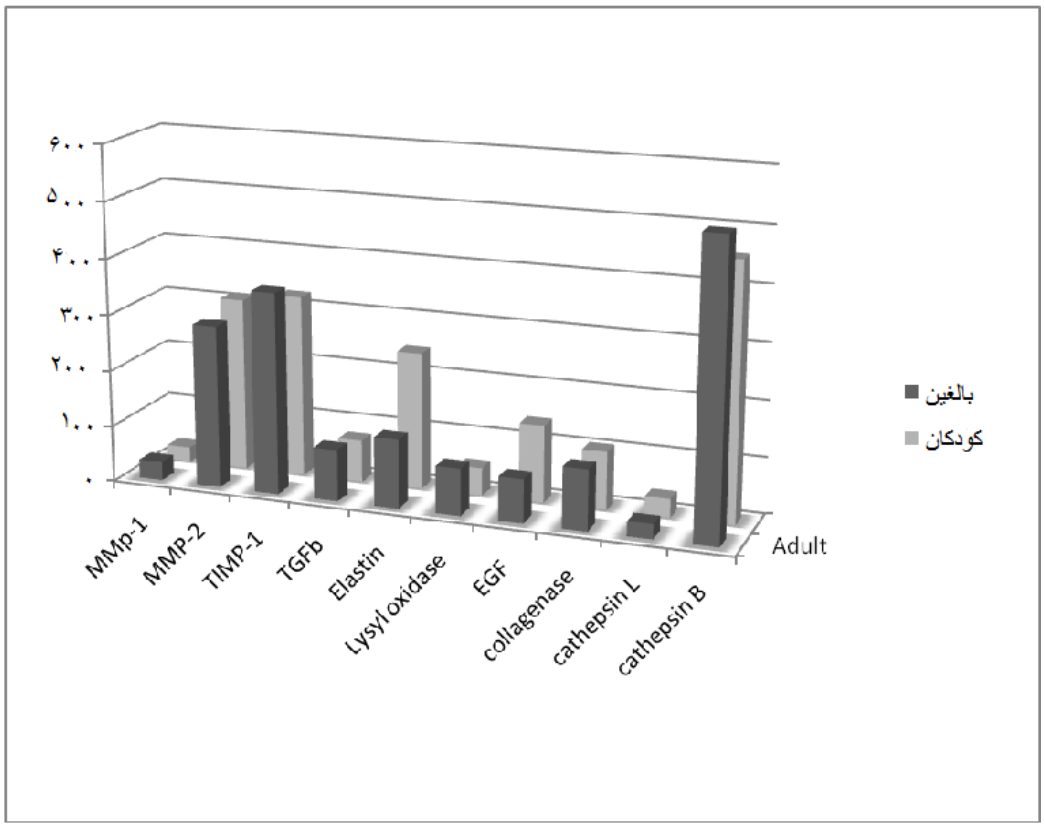
این پژوهش روی نمونه های بافت لثه ای بالغین و کودکان انجام گرفت که با فنی توین یا سیکلوسپورین درمان شده بودند. نتایج بدست آمده نشان داد که TIMP در حضور سیکلوسپورین در مقادیر پایینتری تولید می شود. همچنین نمونه های کودکان که فنی توین یا سیکلوسپورین دریافت کردند، میزان پایین تر TIMP را نشان دادند. نمونه های تحقیق حاضر بعد از ٤٨ ساعت قرار گرفتن در معرض داروها، مورد مطالعه قرار گرفتند.

www.SID.ir

Archive of SID



نمودار ۱: مقایسه اثر سیکلوسپورین روی تولید آنزیم های بافت همبند بوسیله فیبروبلاست های لثه ای بالغین و کودکان



نمودار ۲. مقایسه اثر فنی توئین روی تولید آنزیم های بافت همبند بوسیله فیبروبلاست های لثه ای بالغین و کودکان

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱. القای آنزیم های بافت همبند بوسیله سیکلوسپورین و فنی توئین توسط فیبروبلاست های مرتبط گزارش شده اند P value لثه ای بالغین (رنگ آبی) و کودکان (رنگ قرمز). داده ها بر اساس میانگین، انحراف معیار و* تفاوت معنی دار بین سیکلوسپورین، فنی توئین و گروه کنترل (P<0.05)

	آنزیم های بافت همبند	سیکلوسپورین	کنترل	P value	فنی توئین	کنترل	P value
بالغین	MMP-1	34.22±21.56	33.43± 20.47	.866	32.95± 20.47	33.43 ±20.47	.866
	MMP-2	287.32± 46.18	311.31 ± 40.73	.332	288.88± 54.02	311.31± 40.73	.332
	TIMP-1	32.95± 20.47	345.72 ± 37.79	.000*	358.005 ±13.80	345.72± 37.79	.398
	TGF-b	75.70 ± 21.19	48.29 ±28.54	.042*	91.87± 44.44	48.29± 28.54	.010*
	Elastin	119.53 ±63.59	161.03 ± 74.85	.042*	122.47 ±58.56	161.03± 74.85	.038*
	Lysyl oxidase	84.28± 9.96	60.02 ±7.13	.002*	83.55± 1175	60.02± 7.13	.002*
	EGF	78.99 10.68	54.905 ± 25.71	.012*	77.73± 12.13	54.905± 25.71	.038*
	collagenase	109.405 ±21.41	90.63 ±34.85	.486	107.60± 21.81	90.63± 34.85	.486
	Cathepsin L	26.68 ±1.78	27.52± 2.04	.305	26.37± 2.37	27.52± 2.04	.305
	Cathepsin B	271.81± 94.93	373.17 ± 110.17	.114	519.69 ±194.63	373.17± 110.17	.038*
کودکان	MMP-1	28.28 ±10.52	38.43 ±11.60	0.38*	26.92± 8.97	38.43± 11.60	.038*
	MMP-2	323.47 ±148.48	212.51 ± 171.39	.322	309.18± 178.34	212.51± 171.39	.322
	TIMP-1	26.92± 8.97	242.33 ±98.65	.000*	324.02± 87.49	242.33± 98.65	.038*
	TGF-b	89.54± 42.99	59.51± 24.51	.038*	75.28± 24.51	59.51± 24.51	.038*
	Elastin	242.26± 45.52	219.35 ± 28.61	.217	243.84± 24.38	219.35± 28.61	.217
	Lysyl oxidase	49.34± 22.07	43.59± 22.73	.486	49.83± 22.73	43.59± 22.73	.486
	EGF	88.75 ±34.51	74.77 ±29.91	.100	138.25 ±60.42	74.77± 29.91	.100
	collagenase	86.87 ±47.51	84.90± 61.93	.332	104.14 ±77.07	84.90 ±61.93	.322
	Cathepsin L	34.46± 4.59	38.68± 11.52	.143	33.44± 4.75	38.68± 11.52	.143
	Cathepsin B	443.04 ±169.98	373.17 ± 110.17	.012*	454.52± 105.86	373.17± 110.17	.002*

www.SID.ir

Archive of SID

Hyland (۲۰) و Yamada (۱۹) نیز اثر مهاری سیکلوسپورین روی TIMP را ۲٤ ساعت بعد گزارش کردند ولی هیچ تفاوتی در میزان بیان، بعد از ٤۸ و ۷۲ ساعت پیدا نکردند. Gagliano (۲۱) تغییرات مشخصی در TIMP بوسیله سیکلوسپورین پیدا نکرد ولی در مطالعه Cotrim (۲۲) افزایش معنی داری از بیان TIMP بوسیله سیکلوسپورین یافت شد. Yamaguchi (۲۳) و همکاران کاهش TIMP را بعد از قرار گرفتن طولانی مدت در معرض سیکلوسپورین A یافتند. در یک مطالعه بوسیله Kato (۲٤) نشان داده شد که فنی توئین، القای TIMP را در یک دز وابسته به زمان القا می‌کند.

بر اساس نتایج مطالعه حاضر، در گروه اطفال میزان MMP1 بوسیله هر دو داروی سیکلوسپورین و فنی توئین کاهش یافت ولی تفاوت معنی داری در گروه بالغین یافت نشد. به طور مشابه در یک مطالعه بوسیله Gagliano (۲۱) میزان MMP1,2 تغییرات معنی‌داری بعد از درمان با سیکلوسپورین A نداشت. در مطالعه Yamaguchi (۲۳) اثر طولانی مدت اکسپوژر به سیکلوسپورین A بیان MMP1 را تغییر نداد.Hyland (۲۰) نشان داد اثرات ممانعتی سیکلوسپورین روی MMP1 وابسته به یک دز و زمان است. Yamada (۱۹) نیز میزان کاهش یافته‌ای از MMP1 بعد از درمان با سیکلوسپورین یا فنی توئین و Kato(۲٤) کاهش میزان MMP1, 2, 3 را پس از درمان با فنی توئین گزارش کردند. به نظر می‌رسد که اثرات مهاری سیکلوسپورین و فنی توئین روی MMP1 و TIMP، فرآیند تخریب کلاژن را در فیبروبلاست‌های لثه‌ای سرکوب می‌کند که منجر به افزایش حجم لثه می‌شود.

در این پژوهش سیکلوسپورین در گروه بالغین منجر به کاهش تولید TGFβ1 شد، در حالی که در گروه کودکان میزان آن را افزایش داد. agliano (۲۱) میزان افزایش یافته‌ای از بیان ژن TGFβ1 را ۷۲ ساعت پس از درمان با سیکلوسپورین گزارش کرد.Cotrim (۲۲) نیز میزان بالاتری از TGFβ1 را هنگامی که فیبروبلاست های لثه ای انسان با سیکلوسپورین درمان شدند، نشان داد. در یک مطالعه دیگر بوسیله Cotrim (۲) نشان داده شد که اگر تولید TGFβ1 در فیبروبلاست های نرمال لثه درمان شده با سیکلوسپورین A خنثی شود، اثر تکثیری سیکلوسپورین A روی سلول های فیبروبلاست منع خواهد شد، شاید بدین دلیل که تحریکات درون ریز TGFβ1 باعث تکثیر فیبروبلاست های نرمال لثه ای درمان شده با سیکلوسپورین A می‌شود. در مطالعه حاضر، فنی توئین میزان TGFβ1 را در گروه بالغین، افزایش داد. این با نتایج Gonzalez موافق است که افزایش قابل توجهی در TGFβ1 بعد از درمان با فنی توئین را نشان داده است. اهمیت افزایش TGFβ1 از این جهت است که مطالعات مختلف اثر تنظیمی TGFβ1 را روی میزان بیان MMP1 و TIMP نیز نشان دادند

www.SID.ir

Archive of SID

(۲۵). در یک مطالعه بوسیله Cotrim (۲۲) نشان داده شده که میزان افزایش یافته TGFβ1 ، تولید MP1,2 را کاهش می‌دهد، شاید بدین دلیل که هر چه قابلیت‌های تخریب فیبروبلاست‌های لثه‌ای ضعیف‌تر می‌شود، رسوب پروتئین بالاتری در ماتریکس خارج سلولی ایجاد شده که منجر به هایپرپلازی لثه‌ای می‌شود.

در مطالعه حاضر، سطوح پائینتری از EGF بعد از درمان با هر دو داروی سیکلوسپورین و فنی توین در گروه بالغین مشاهده شد. به بیان دیگر گروه کودکان افزایش EFG را در حضور دو دارو نشان دادند. نتایج ما با یک مطالعه بوسیله Modéer (۲۶) که همچنین کاهش متابولیسم گیرنده EFG را بعد از درمان با فنی توین نشان داد، در توافق است. کاهش میزان EFG بدست آمده در مطالعه کنونی بعد از درمان با سیکلوسپورین A، با نتایج Chin و همکاران (۲۷) در تضاد است زیرا آنها دریافتند سطوح EFG بوسیله همان دارو افزایش می‌یابد. هر چند مطالعه آنها روی رده سلولی سرطانی اپیدرموئید دهانی و روی لثه بی دندانی موش‌ها و نه روی فیبروبلاست های لثه‌ای انسان انجام شد. Buduneli (۲۸) میزان افزایش بیان گیرنده EFG را از بیوپسی های لثه ای بیمارانی که سیکلوسپورین A دریافت کرده بودند به روش آنالیز هیستوشیمیایی گزارش کرد.

مطالعه حاضر کاهش کاتپسین B در گروه بالغین و افزایش آن را در گروه سلول های کودکان درمان شده با سیکلوسپورین نشان داد. در حالی که فنی توین باعث میزان بالاتری در گروه بالغین و مقدار پایین تری از کاتپسین B در گروه کودکان شد .Yamaguchi(۲۳) پی برد که اکسپوژر طولانی به سیکلوسپورین A، میزان تولید کاتسپین B و L را سرکوب می کند. شاید بدین دلیل که در صورت تخریب کمتر پروتئین بوسیله کاتپسین B و L هایپرپلازی لثه مرتبط با سیکلوسپورین A می تواند ایجاد شود. Yamada(۱۹) اثرات سیکلوسپورین و فنی توین را روی کاتسپین B و L بررسی کرد و نشان داد که تولید کاتسپین L کاهش یافته ولی میزان کاتسپین B بعد از درمان با هر دو دارو بدون تغییر ماند. همچنین نشان داد که در در صورت وجود فنی توین وسیکلوسپورین A قابلیت تخریب کاتسپین L در ماتریکس خارج سلولی کاهش می‌یابد. در مطالعه پورعباس (۲۹) وهمکاران مشخص گردید که فنی توین در محیط invitro نیز مانند invivo قادر به افزایش پرولیفرانسیون سلول های فیبروپلاست لثه ای بوده و این اثر فنی توین روی سلول های فیبروپلاست PDL وجود دارد.

بر اساس نتایج مطالعه حاضر و مطالعات قبل سیکلوسپورین و فنی توین تنقش عملکردی کاتسپین B و L را کم می کنند که منجر به تجمع پروتئین های

www.SID.ir

Archive of SID

ماتریکس خارج سلولی و القای افزایش حجم لثه می شوند.

همه بیماران مصرف کننده سیکلوسپورین، فنی تویین یا نیفدیپین دچار عارضه افزایش حجم لثه نمی شوند. مطالعات گذشته به نقش فاکتورهای ژنتیک روی پاتوژنز هایپرپلازی لثه در کودکان و نوجوانان اشاره می کند (۳۰). تفاوت ها با نتایج مطالعه حاضر می تواند ناشی از ناهمگونی فیبروبلاست ها، تفاوت گروه های سنی، منابع تهیه فیبروبلاست ها، بیوپسی های لثه ای موجود و تعداد نمونه های آماده شده در هر مطالعه باشد. مطالعه حاضر روی آنزیم های مختلفی که می توانند در هایپرپلازی لثه نقش داشته باشند، انجام شد. درمرور مطالعات تا سال ۲۰۱۲ میلادی، اثر فنی تویین و سیکلوسپورین برتولید آنزیم های بافت همبند توسط فیبروبلاست های لثه به طور کامل بررسی شده بود.

افزایش حجم لثه به طور جدی‌تری کودکان را بیشتر از بالغین گرفتار می‌کند. پروتئین های باند شونده پلاسمایی مرتبط با فنی تویین، می تواند به عنوان فاکتور القا کننده باشد ولی ارتباط خطی بین مدت و دز دارو با سطوح پروتئین های پلاسما وجود ندارد. اتصال پروتئین ها به فنی تویین دارو را در بافت ها با تمایل بالایی برای فنی تویین همانند فیبروبلاست های لثه‌ای پخش خواهد کرد (۷). پلاک دندانی بخصوص در بچه ها عامل دیگر بالابرنده شدت و شیوع افزایش حجم لثه است (۳۱).

در مطالعه حاضر برای اولین بار، اثرات فنی تویین و سیکلوسپورین روی تولید آنزیم های مختلف بوسیله فیبروبلاست های لثه ای کودکان اندازه گیری شد. وجود نتایج متضاد در مورد برخی آنزیم ها در گروه بالغین، مطالعات بیشتر را روی کودکان در آینده ارزشمند می نماید.

نتیجه گیری

مطالعه حاضر روی فیبروبلاست های لثه ای بالغین و کودکان انجام شد و میزان بیان آنزیم هایی را که به نظر می رسد در افزایش حجم لثه نقش دارند بررسی کرد. کودکان و نوجوانان تمایل بالاتری به پاسخ به داروهای باعث افزایش حجم لثه دارند TGFβ تنها مدیاتور ایجاد شده توسط هر دو دارو در بالغین و کودکان بود. فنی تویین باعث تولید TIMP شد و سیکلوسپورین ژن کاتسپین B را در هر دو گروه سنی القا کرد. تا زمانی که این داروها بتوانند با جایگزین‌های با آسیب کمتر جایگزین شوند، موضوعات مرتبط با افزایش حجم لثه همچنان باقی می‌مانند. مطالعات بیشتر باید متابولیسم ماتریکس خارج سلولی در واکنش‌های تداخل دارویی، سایتوکاین های متفاوت و فاکتورهای رشد مرتبط با افزایش حجم لثه را کشف کند. یافته های حاضر بر فیبروبلاست های لثه ای کودکان ازم است بوسیله مطالعات آینده مورد تأیید واقع شود.

www.SID.ir

Archive of SID

References

1.Nazemisalman B VS, Bandehpour M, Aryankia A. Phenytoin Effects on Inflammatory Mediator's Production by Gingival Fibroblasts,
A Comparative Study in Children and Adult. OHDM. 2014;13(847-853).
2.Corrêa JD, Queiroz-Junior CM, Costa JE, Teixeira AL, Silva TA. Phenytoin-induced gingival overgrowth: a review of the molecular, immune, and inflammatory features. ISRN dentistry. 2011;2011.
3.Kanno CM, Oliveira JA, Garcia JF, Castro AL, Crivelini MM. Effects of cyclosporin, phenytoin, and nifedipine on the synthesis and degradation of gingival collagen in tufted capuchin monkeys (Cebus apella): histochemical and MMP-1 and-2 and collagen I gene expression analyses. Journal of periodontology. 2008;79(1):114-22.
4.Vahabi S, Salman BN, Rezazadeh F, Namdari M. Effects of cyclosporine and phenytoin on biomarker expressions in gingival fibroblasts of children and adults: an in vitro study. Journal of basic and clinical physiology and pharmacology. 2014;25(2):167-73.
5.Carranza F.A TH, Newman M. clinical periodontology. 10th ED, Philadelphia: W.B Saunders. Co. 2007; Chap 18, 63. 270-272, 920-922.: Elsevier health sciences; 2007.
6.Nazemi Salman B VS, Ebrahimi Movaghar S, Mahjour F. Proliferative and inductive effects of Cyclosporine a on gingival
fibroblast of child and adult. Dental Research Journal. 2013;10(1):52-8.
7.Seymour R, Ellis J, Thomason J. Risk factors for drug-induced gingival overgrowth. Journal of clinical periodontology. 2000;27(4):217-23.
8.González OA, González JM. Morphological and phenotypic differences in fibroblasts obtained from gingival overgrowth secondary to phenytoin: A pilot study. Revista Odontológica Mexicana. 2009;13(1):17-23.
9.Vahabi s AR. cytotoxic effect of colorhexidine on L929 fibroblasts of rats. journal of qazvin university of medical sciences. 2007;11(1):7-11.
10.Vahabi S, Moslemi M, Nazemisalman B, Yadegari Z. Phenytoin Effects on Proliferation and Induction of IL1β and PGE2 in Pediatric and Adults' Gingival Fibroblasts. Open Journal of Stomatology. 2014;4(09):452.
11.Angel P, Baumann I, Stein B, Delius H, Rahmsdorf HJ, Herrlich P. 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate induction of the human collagenase gene is mediated by an inducible enhancer element located in the 5'-flanking region. Molecular and Cellular Biology. 1987;7(6):2256-66.
12.Vahabi S NB, Vahid Golpaigani M, Ahmadi A. Effect of Phenytoin and Age on Gingival Fibroblast Enzymes. Journal of Dentistry, Tehran University of Medical Sciences. 2014;11(3):270-81.
13.Sugarman BJ, Aggarwal BB, Hass PE, Figari IS, Palladino MA, Shepard HM. Recombinant human tumor necrosis factor-alpha: effects on proliferation of normal and transformed cells in vitro. Science. 1985;230(4728):943-5.
14.Gillett R, Cruchley A, Johnson NW. The nature of the inflammatory infiltrates in childhood gingivitis, juvenile periodontitis and adult periodontitis: immunocytochemical studies using a monoclonal antibody to HLA Dr. Journal of clinical periodontology. 1986;13(4):281-8.
15.vahabi S km, Rezazadeh F,Nazemi slaman M. Evaluating the relationship between must cells and periodontitis journal of qazvin university of medical sciences 2013;17(2):50-6.

www.SID.ir

Archive of SID

16.Longhurst P, Johnson NW, Hopps RM. Differences in lymphocyte and plasma cell densities in inflamed gingiva from adults and young children. Journal of periodontology. 1977;48(11):705-10.
17.Seymour G, Crouch M, Powell R, Brooks D, Beckman I, Zola H, et al. The identification of lymphoid cell subpopulations in sections of human lymphoid tissue and gingivitis in children using monoclonal antibodies. Journal of periodontal research. 1982;17(3):247-56.
18.Shaw J, Hughes C, Lagan K, Bell P. The clinical effect of topical phenytoin on wound healing: a systematic review. British Journal of Dermatology. 2007;157(5):997-1004.
19.Yamada H, Nishimura F, Naruishi K, Chou H-H, Takashiba S, Albright GM, et al. Phenytoin and cyclosporin A suppress the expression of MMP-1, TIMP-1, and cathepsin L, but not cathepsin B in cultured gingival fibroblasts. Journal of periodontology. 2000;71(6):955-60.
20.Hyland PL, Traynor PS, Myrillas TT, Marley JJ, Linden GJ, Winter P, et al. The effects of cyclosporin on the collagenolytic activity of gingival fibroblasts. Journal of periodontology. 2003;74(4):437-45.
21.Gagliano N, Moscheni C, Dellavia C, Torri C, Stabellini G, Ferrario VF, et al. Effect of cyclosporin A on human gingival fibroblast collagen turnover in relation to the development of gingival overgrowth: an in vitro study. Biomedicine & pharmacotherapy. 2004;58(4):231-8.
22.Cotrim P, De Andrade C, Martelli-Junior H, Graner E, Sauk JJ, Coletta R. Expression of matrix metalloproteinases in cyclosporin-treated gingival fibroblasts is regulated by transforming growth factor (TGF)-β1 autocrine stimulation. Journal of periodontology. 2002;73(11):1313-22.
23.Yamaguchi M, Naruishi K, Yamada-Naruishi H, Omori K, Nishimura F, Takashiba S. Long-term cyclosporin A exposure suppresses cathepsin-B and-L activity in gingival fibroblasts. Journal of periodontal research. 2004;39(5):320-6.
24.Kato T, Okahashi N, Kawai S, Kato T, Inaba H, Morisaki I, et al. Impaired degradation of matrix collagen in human gingival fibroblasts by the antiepileptic drug phenytoin. Journal of periodontology. 2005;76(6):941-50.
25.Cotrim P, Martelli-Junior H, Graner E, Sauk JJ, Coletta R. Cyclosporin A induces proliferation in human gingival fibroblasts via induction of transforming growth factor-β1. Journal of periodontology. 2003;74(11):1625-33.
26.Modeer T, Mendez C, Dahllöf G, Anduren I, Andersson G. Effect of phenytoin medication on the metabolism of epidermal growth factor receptor in cultured gingival fibroblasts. Journal of periodontal research. 1990;25(2):120-7.
27.Chin Y-T, Chen Y-T, Tu H-P, Shen E-C, Chiang C-Y, Gau C-H, et al. Upregulation of the expression of epidermal growth factor and its receptor in gingiva upon cyclosporin A treatment. Journal of periodontology. 2006;77(4):647-56.
28.Buduneli N, Sağol Ö, Atilla G, Duman S, Holmstrup P. Immunohistochemical analysis of epidermal growth factor receptor in cyclosporin A-induced gingival overgrowth. Acta Odontologica Scandinavica. 2001;59(6):367-71.
29. pourabbas R, Niknafs B, Shirmohammadi A. The effect of phenytoin on the ability of proliferation of periodontal and gingival ligament fibroblasts in cell culture media. Medical Journal of Tabriz University of Medical Sciences. 2007;28(3):45-8.
30.Barclay S, Thomason J, Idle J, Seymour R. The incidence and severity of nifedipine-induced gingival overgrowth. Journal of clinical periodontology. 1992;19(5):311-4.
31.Doufexi A, Mina M, Ioannidou E. Gingival overgrowth in children: epidemiology, pathogenesis, and complications. A literature review. Journal of periodontology. 2005;76(1):3-10.

www.SID.ir