Archive of SID

تحریک پذیری سلولهای منوسیت خون محیطی افراد مبتلا به پریودنتیت مهاجم از طریق مقایسه میزان اینترلوکین ٦ ترشح شده، قبل و پس از تحریک با لیپوپلی ساکارید باکتری اشریشیاکلی

[1] دکتر مهرداد رادور ، [2] دکتر جلیل توکل افشاری، *[3] دکتر محبوبه نقیب زاده بجستان ، [4] دکتر محمدرضا ناصح

تاریخ دریافت : ۸۳/۸/۲۰
تاریخ پذیرش : ۸۴/۷/۱۴

چکیده

مقدمه

نتایج مطالعات قبلی پیشنهاد می‌کنند که در بیماری پریودنتیت مهاجم (Aggressive periodontitis)پاسخ بیش از حد شدید منوسیتها به فراورده های پلاک دندانی خصوصاً اندوتوکسین باکتریهای گرم منفی و ترشح سطوح بالای سایتوکین های پیش التهابی ممکن است در پاتوژنز این بیماری نقش داشته باشند. با هدف ارزیابی این فرضیه، ما در این پژوهش اینترلوکین۶ (IL-6) ترشح شده توسط منوسیتهای خون محیطی بیماران مبتلا به پریودنتیت مهاجم وافراد سالم را قبل و پس از تحریک با لیپوپلی ساکارید باکتری اشریشیا کلی (Escherichia coli LPS) ارزیابی نموده ایم.

مواد و روشها

در این مطالعه، ۱۵ بیمار مبتلا به پریودنتیت مهاجم بررسی و با ۱۵ فرد سالم از نظر پریودنتالی مقایسه شدند به این ترتیب که پس از جدا کردن سلولهای لایه منونوکلئر خون محیطی افراد، سلولهای منوسیت از این لایه جدا شده و کشت داده شدند. پاسخ منوسیتها به لیپوپلی ساکارید E-coli (۰/۱µg/ml)، قبل از تحریک با LPS و ۶ ساعت پس از آن در این افراد با اندازه گیری میزان ترشح IL-6 تعیین شد. سطح IL-6 در سوپرناتانت(مایع رویی) توسط آزمایش ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) اندازه گیری شد. جهت مقایسه داده ها از تستهای آماری ویلکاکسون و من ویتنی استفاده گردید.

نتایج

در این مطالعه، در میزان ترشح پایه IL-6 ، قبل از تحریک با لیپوپلی ساکارید، تفاوت معنی داری بین گروه بیماران و گروه کنترل به دست نیامد (p= ۰/۵) ولیکن پس از تحریک با LPS، تفاوت بین گروه بیماران و کنترل در حد نزدیک به معنی دار بودن قرار گرفت (p= ۰/۰۷). هنگامی که مقایسه بین دو گروه براساس میزان افزایش تحریک پذیری در اثر اضافه شدن LPS انجام شد، آنگاه گروه بیماران به طور معنی داری افزایش بیشتری در تحریک پذیری منوسیت ها در مقایسه با گروه کنترل نشان دادند (p= ۰/۰۲۹).

نتیجه‌گیری

یافته های این مطالعه نشان می‌دهند که افزایش پاسخ دهی ماکروفاژها، ممکن است عامل مهمی در پاتوژنز بیماری پریودنتیت مهاجم باشد. افزایش سنتز سایتوکاینها توسط منوسیتها در محل عفونت در پاسخ به حداقل تعداد باکتری می‌تواند موجب اثرات معنی‌دار موضعی و سیستمیک شود. یک پاسخ ایمنی بیش از حد می‌تواند اساس توجیه برای تخریب بافتی شدید، تحلیل استخوان و الگوی فامیلی ودیگر مشاهدات ایمونولوژیکی همراه با این بیماری باشد. مطالعات بعدی برای بررسی پاسخ منوسیتها پس از درمان نیاز است تا نقش این پدیده را در پاتوژنز پریودنتایتیس مشخص کند.

کلمات کلیدی: پریودنتیت مهاجم، منوسیت، اینترلوکین ۶، لیپوپلی ساکارید.

۱- دانشیار گروه پریودونتولوژی، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد
۲- دانشیار مرکز تحقیقات ایمونولوژی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد
۳- دندانپزشک عمومی
* نویسنده مسئول، تلفن: ۸۷۹٤۸۳۵- ۰۵۱۱، mb_naghibzedeh@yahoo.com
٤- متخصص بیماریها و جراحی لثه

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

پریودنتایتیس بیماری التهابی بافتهای پشتیبان دندان است که توسط میکروارگانیسمهای خاصی ایجاد می‌گردد و با تخریب وسیع لیگامان پریودنتال و استخوان آلوئولار و تحلیل لثه همراه است. پریودنتایتیس یک بیماری چند عاملی با عوامل اتیولوژیکی بالقوه می‌باشد (۱). این بیماری از شیوع بالایی برخوردار است، ولی نوع شدید آن به نام پریودنتیت مهاجم تنها در ۷-۱۴٪ جمعیت وجود دارد (۲) که در سنین جوانی و معمولا در افراد زیر ۳۰ سال، انساج پریودنتال را مبتلا می‌کند و فرد به سرعت دچار تخریب استخوان نگهدارنده دندان می‌شود و شدت این تخریب با سطح پلاک در بیمار هماهنگی ندارد. سیر سریع پیشرفت بیماری وجه افتراق این بیماری از نوع مزمن آن است. این بیماری یک الگوی فامیلیال از خود نشان می‌دهد و این‌سابقه فامیلی، ویژگی ژنتیکی بودن را برای آن محتمل می‌سازد.

یافته‌های جدید نشان می‌دهند که پلاک میکروبی یک فاکتور لازم برای شروع بیماری است ولی برای توضیح وجود و عدم وجود یا شدت بیماری کافی نیست و به نظر می‌رسد که کیفیت پاسخ ایمنی میزبان، که تحت تأثیر فاکتور ژنتیک است، شدت و میزان گسترش تظاهرات بیماری را مشخص می‌کند (۱).

سلولهای ایمنی میزبان در پاسخ به باکتریهای عفونت‌زا، واسطه‌های آماسی ترشح می‌کنند که منجر به تخریب بافتهای پریودنتال می‌شود (۳). امروزه نقش سلولهای منوسیت در ترشح سایتوکاین‌ها پس از تحریک با محصولات پلاک دندانی به عنوان یکی از مسیرهای بالقوه برای ایجاد استعداد برای ابتلا به این نوع بیماری پریودنتال مطرح شده و مطالعات چندی در این رابطه انجام شده است.

در مطالعه‌ای Shapira و Offenbacher به بررسی میزان ترشح PGE2 و IL-1β و IL-6 و TNFα مترشحه از سلولهای منونوکلئر چسبنده پس از تحریک با غلظتهای مختلف لیپوپلی ساکاریدباکتری E-coli در بیماران مبتلا به EOP (Early Onset Periodontitis) پرداختند. در این تحقیق مشخص شد که قبل از تحریک با LPS ، همچنین پس از تحریک، میزان‌ترشح PGE2 در بیماران درمقایسه با گروه نرمال بالاتر بود حال آنکه میزان IL-1 β ، IL-6 و TNFα تفاوت مشخصی نداشت (۳).

در مطالعه دیگری که توسط Salvi و همکاران انجام گرفت، واسطه‌های التهابی در دو گروه از بیماران که درگروه اول به دلیل بیماریهای پریودنتال پیشرفته بزرگسالان (Adult periodontitis terminal dentition) (AP-TD) و در گروه دوم به دلیل پریودنتایتیس با شروع زودرس (EOP-TD) نیاز به کشیدن کامل دندان‌ها داشتند، بررسی شد. نتایج نشان دادندکه IL-1β، PGE2 و TNFα مترشحه از منوسیتهای تحریک شده با LPS در هر دوگروه AP-TD و EOP-TD به طور معنی‌داری بالاتر از گروه کنترل بود. در نهایت از این داده‌ها این طور نتیجه‌گیری کردند که منبع اصلی واسطه‌های پیش التهابی فعالیت مونوسیتها است. علاوه بر این مونوسیتهای خون محیطی که با LPS تحریک شده‌اند، سطح بیشتری از مدیاتورهای آماسی را در بیماران TD نشان می‌دهند (۴).

Offenbacher و Salvi در سال ۱۹۹۹ به بررسی نقش پاسخ مونوسیتی به لیپوپلی ساکارید در ارتباط با بیماریهای پریودنتال پرداختند. در این تحقیق، میزان ترشح پایه PGE2 از مونوسیت در محیط غیر تحریک شده با LPS و همچنین پس از تحریک با LPS در بیماران EOP به طور معنی‌داری بالاتر از نمونه‌های سالم و یا بیماران AP بود و لیکن تفاوت معنی‌داری در سطح PGE2 مترشحه در گروه کنترل با بیماران AP مشاهده نشد. این محققین نتیجه گرفتند که در این داده‌ها ترشح بالاتر PGE2 تا حد زیادی وابسته به تفاوت در ترشح پایه است. همچنین سطوح پایین‌تر LPS که پایین‌تر از آستانه تحریک گروه کنترل و یا AP هستند، باعث تحریک ترشح PGE2 در این نمونه‌ها می‌شوند(۱).

Mahanoda و همکارانش در سال ۲۰۰۴ پاسخ دهی بیش از حد منوسیتها به لیپوپلی ساکارید پورفیرومونا جینجیوالیس در بیماران مبتلا به پریودنتیت مهاجم را با افراد سالم مقایسه نمودند. این محققین تفاوت معنی‌داری بین میزان ترشح PGE2 وIL-1β در دو گروه مشاهده نکردند(۵).

Nagasawa و همکارانش در سال ۲۰۰۴ تغییرات منوسیت‌ها را از طریق میزان بروز CD45RA (که بر روی منوسیتهای تحریک شده بروز می یابد) و میزان IL-6 ترشح شده در پاسخ به LPS باکتری E-Coli در بیماران مبتلا به

www.SID.ir

Archive of SID

پریودنتیت مهاجم و افراد سالم مقایسه نمودند. نتایج نشان داد که در بیماران، این پارامترها به طور معنی داری بیشتر از افراد سالم بود که نشان دهنده فعالیت بیش از حد منوسیت ها در این بیماران می باشد (۶).

در نهایت با توجه به مطالعات انجام شده، سایتوکاینهای متعددی در انواع بیماری‌های پریودنتال مورد بررسی قرار گرفته و لیکن نتایج به دست آمده تنها درمورد PGE2 مشابه هستند و درباره سایر سایتوکاینها نتایج متفاوتی گزارش شده است. همچنین، IL-6 سایتوکاینی است که بخش بزرگی از پاسخ التهابی را کنترل می‌کند (۷) و نیز قادر به تخریب بافت همبند و فعال کردن استئوکلاستها و در نتیجه تحلیل استخوان می‌باشد (۴، ۸) و در نتیجه نقش مهمی در پاتوژنز پریودنتیت مهاجم دارد و لیکن، بررسی‌های انجام شده بر روی IL-6 به گستردگی IL-1 و PGE2 نیست. همچنین با توجه به این تئوری که افراد مبتلا به پریودنتیت مهاجم دارای منوسیت‌هایی هستند که در مقابل کوچکترین‌تجمع لیپوپلی‌ساکارید باکتری، پاسخ بیش از حد شدیدی به صورت ترشح مقادیر فراوان سایتوکاین‌های پیش التهابی نشان می‌دهند، در این مطالعه بر آن شدیم تا سلولهای منوسیت خون محیطی افراد مبتلا به پریودنتیت مهاجم را با افراد سالم، از نظر میزان تولید IL-6 پس از تحریک با لیپوپلی ساکارید باکتری E-coli مقایسه کنیم. چنانچه این تئوری اثبات شود، اولا گامی در راه روشن شدن مکانیسم پاتوژنز بیماری پریودنتال برداشته خواهد شد. ثانیا از نتایج عملی کار فوق این امکان فراهم می‌شود که از تست تحریک‌پذیری منوسیت‌ها به عنوان یک تست تشخیصی برای افراد مستعد، قبل از ابتلا به پریودنتیت مهاجم استفاده شود، به طوری که با روش‌های پیشگیرانه بتوان به موقع از بروز بیماری جلوگیری به عمل آورد.

مواد و روش کار

این مطالعه به صورت تحلیلی موردی – شاهدی (Case-Control) و جهت بررسی ارتباط احتمالی بین ابتلا به بیماری پریودنتیت مهاجم با پاسخ‌دهی بیش از حد منوسیت‌های خون محیطی مبتلایان به این بیماری انجام گرفت. گروه مورد (case) در این مطالعه شامل ۱۵ بیمار مبتلا به بیماری پریودنتیت مهاجم و گروه شاهد (control) شامل ۱۵ نفر از افراد سالم بودند. افراد گروه مورد طی یک نمونه گیری غیر تصادفی آسان از میان مراجعه کنندگان به دانشکده دندانپزشکی مشهد و پس از تشخیص بیماری انتخاب شدند.

تشخیص بیماری بر اساس علایم بالینی و رادیوگرافیک بیماری و وجود یک تاریخچه خانوادگی مثبت صورت گرفت. علایم بالینی شامل سرعت زیاد پیشرفت بیماری، عدم وجود پلاک و جرم زیاد، از دست دادن چسبندگی لثه (Attachment loss) و تخریب استخوان می‌باشد. همچنین سن کم بیمار (افراد جوان در سنین بلوغ و یا بعد از آن) از دیگر مشخصات این بیماری است (۹). تمامی این علائم و همچنین سابقه پزشکی بیمار در پرسشنامه‌ای که به این منظور تدوین شده بود، به طور کامل ثبت گردید.

همچنین نتیجه معاینات پریودنتال شامل اندازه گیری عمق پاکت (Pocket Depth) (برحسب mm) برای هر فرد ثبت شد (پاکت پریودنتالی عبارت است از سالکوس لثه‌ای مجاور دندان که بر اثر روندی پاتولوژیک عمیق شده است و یکی از علائم مهم کلینیکی بیماری پریودنتال به شمار می‌رود و با اندازه گیری عمق آن شدت بیماری را می‌توان سنجید).

افرادی که از نظر سابقه پزشکی دچار بیماریهای سیستمیک مرتبط با سیستم ایمنی بودند، (به طور مثال ابتلا به هرگونه بیماری عفونی یا ایمنی یا اندوکرینی نظیر دیابت) و افراد سیگاری که می‌توانستند در نتیجه تحقیق به عنوان عامل مخدوش کننده اثر کنند، از مطالعه حذف شدند. گروه شاهد نیز شامل افرادی بودند که چه از نظر پریودنتالی و چه از نظر سیستمیک سالم تلقی می شدند.

پس از ثبت اطلاعات مقدماتی و جلب همکاری افراد و کسب رضایت کتبی، ml ۱۵ خون وریدی از افراد گروه مورد و شاهد گرفته شد. خون وریدی بلافاصله داخل لوله حاوی ماده ضد انعقاد EDTA 10% (Ethylen Diamine Tetraacetic Acid) ریخته شد و در کمتر از یک ساعت به لابراتوار منتقل شد و در آنجا منوسیتهای خون محیطی به روش زیر جدا شدند.

www.SID.ir

Archive of SID

جداسازی لایه منونوکلئراز خون: ۱- در۳ لوله استریل جداگانه، هر ml ۵ خون با ml ۵ نرمال سالین سرد یا Hanks رقیق شد. عمل اختلاط به آرامی انجام شد به طوری که خون لیز نگردد. ۲- در ۶ لوله استریل، ml ۳ فایکول ریخته شد. ۳- ml ۵ خون رقیق شده به لوله‌ها اضافه شد. این عمل به آرامی و با دقت انجام شد تا خون روی فایکول بماند و با هم مخلوط نشوند.۴- لوله حاوی فایکول و خون به مدت ۲۰ دقیقه در rpm ۲۰۰۰ سانتریفوژ شد. ۵- لایه مونونوکلئر به آرامی با استفاده از نمونه بردار(سمپلر) برداشته و به یک لوله سانتریفوژ استریل منتقل شد. ۶- معادل حجم لایه مونونوکلئر، نرمال سالین سرد اضافه و به مدت ۵ دقیقه در rpm ۱۵۰۰ سانتریفوژ شد. ۷- مایع روی سلولهای پک شده بیرون ریخته شد و مقدار ml ۱ نرمال سالین به سلولها اضافه شد و بار دیگر در rpm/5min ۱۵۰۰ سانتریفوژ شد. ۸- زنده بودن سلولها مورد ارزیابی قرار گرفت و سلولها شمارش شدند.

جداسازی سلولهای منوسیت از لایه مونونوکلئر: منوسیت‌ها بر اساس قابلیت چسبندگی به سطح شیشه‌ای از دیگر جمعیت سلولی خون جدا می‌شوند، به این صورت که پس از جداسازی سلولهای منونوکلئراز خون ، این سلولها در یک پلیت شیشه‌ای (Petridish) به شعاع cm ۵ محتوی ml ۳ محیط کشت RPMI-1640 (GIBCO51 800-027 Irland) و در دمای ۳۷ °C و غلظت ٪۵ CO_2، به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شدند که این زمان، برای چسبیدن منوسیت‌ها به سطح شیشه‌ای مناسب بود.

پس از ۲۴ ساعت، با خالی کردن محیط کشت و چندین بار شستشوی پلیت با سرم فیزیولوژی، سلولهای غیرچسبنده از محیط خارج شدند. در هر بار شستشو، سرم فیزیولوژی به آرامی روی پلیت، پیپت شد تا حداکثر سلولهای غیرچسبنده خارج شوند. پس از تکرار مراحل شستشو، تنها منوسیت‌ها به سطح پلیت چسبیده مانده بودند. مجددا ml ۳ محیط کشت ولرم RPMI-1640 به پلیت اضافه شده و به مدت ۱۰-۱۵ دقیقه در انکوباتور ۳۷°C قرار داده شد. با پیپت کردن و تخلیه نمودن مکرر محیط کشت روی سطح پلیت، منوسیت ها از سطح جدا شده و سپس به مدت ۱۰ دقیقه در rpm ۱۰۰۰ سانتریفوژ شدند (۱۰). در مرحله بعدی سلولها با استفاده از روش رنگ آمیزی تریپان بلو و مشاهده زیر میکروسکوپ شمارش شدند. تعداد سلول موردنظر۱۶۰۰۰۰ در ml ۱ بود که به روش مذکور تایین شد.

افزودن LPS **مربوط به باکتری** *Escherichia coli* **به سلولها:** برای به دست آوردن غلظت مناسب LPS که بیشترین تحریک را در سلولهای منوسیت ایجادکند، طی یک آزمایش مقدماتی، چند غلظت مختلف از LPS (با توجه به مطالعات قبلی) انتخاب و در چند فرد مختلف آزمایش گردید. نتایج نشان داد که بیشترین مقدار IL-6 در تحریک با غلظت ۰/۱µg/ml از LPS در محیط کشت به دست می آید. لذا از این غلظت برای مطالعه اصلی استفاده شد. به این صورت که در دو خانه از پلیت‌کشت شش خانه (NUNC، دانمارک) میزانی از محیط کشت و سلول مخلوط شد به طوری که تعداد سلول در هر ml از محیط کشت ۱۶۰۰۰۰ شود. خانه اولی به عنوان کنترل استفاده شد و به خانه دومیLPS (سیگما،آمریکا) با غلظت ۰/۱µg/ml به محیط کشت اضافه شد.

پس از ۶ ساعت، µl ۵۰۰ از مایع رویی (supernatant) محیط کشت برداشته و در ویال پلاستیکی ریخته شد و تا هنگام انجام آزمایش الیزا در فریزر ۲۰ °C - نگهداری گردید.

تعیین مقادیر کمی IL-6 **در سوپرناتانت به دست آمده توسط آزمایش الایزا:** مطالعات اولیه نشان داد که Cut off point کیت الایزا (BenderMed System,Vienna, Austeria) در محدوده بالایی آن برای اندازه‌گیری غلظت IL-6 مناسب نبود لذا مطالعات اولیه همگی مقادیری بیش از حداکثر مقدار قابل ثبت را نشان دادند. چنین نتایجی باعث شد تا اقدام به‌رقیق کردن مایع سوپرناتانت قبل از انجام تست ELISA کنیم.

نتایج این سری از مطالعات نشان داد که در رقت ۰/۱مایع سوپرناتانت، تمام نمونه‌ها (چه نمونه فردسالم و چه فرد بیمار) دارای میزانی از IL-6 می باشندکه در محدوده طیف قابل تشخیص به وسیله‌کیت الایزا است. لذا قبل از شروع آزمایش الایزا، تمام نمونه‌ها به میزان ۰/۱رقیق شدند.

پس از انجام تست الایزا، بسته به میزان IL-6 موجود در نمونه، محصولی رنگی تولید می‌شودکه میزان جذب نوری آن توسط اسپکتروفوتومتر با طول موج ۴۵۰nm اندازه‌گیری می‌شود و با

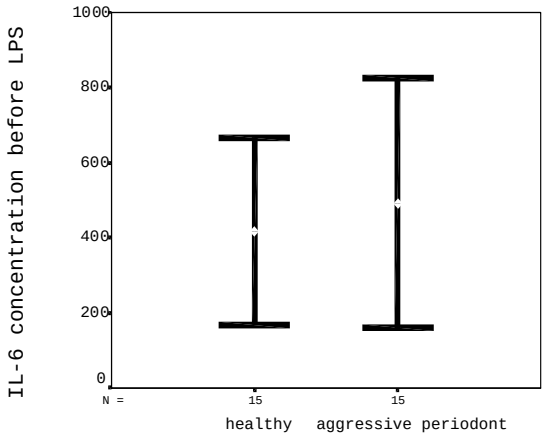
www.SID.ir

Archive of SID

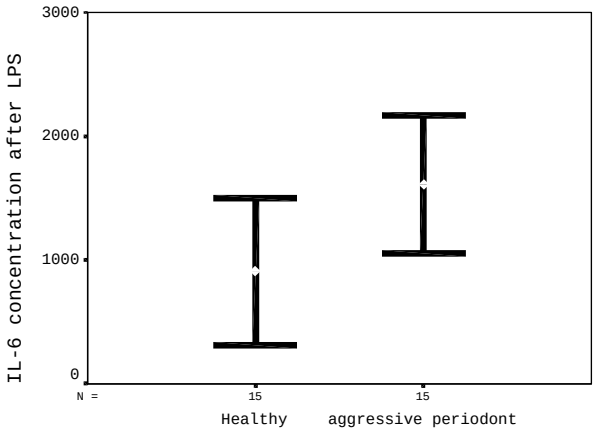
توجه به آن، غلظت IL-6 موجود در نمونه بر حسب (pg/ml) تعیین می‌شود. در نهایت، با استفاده از نرم افزار آماری ۱۱/۵ SPSS و در سطح اطمینان ۹۵٪ (p=۰/۰۵) میزان IL-6 به دست آمده در دوگروه مورد و شاهد، قبل از تحریک با LPS و پس از تحریک با LPS، با استفاده از آزمون آماری Mann Withney U test مقایسه گردید. همچنین میزان غلظت IL-6 در گروه بیماران در دو نوبت قبل و پس از تحریک با LPS و نیز در گروه افراد سالم در دو نوبت، قبل و پس از تحریک با LPS، به طور مجزا با آزمون Willcoxon مقایسه شد. در بررسی ارتباط بین پارامترهای کلینیکی (میانگین عمق پاکت، درصد پاکتهای بیشتر از ۳، درصد پاکتهای بیشتر از ۴ و درصد پاکتهای بیشتر از ۵) و غلظت IL-6 ازآزمون Spearman correlation استفاده گردید.

نتایج

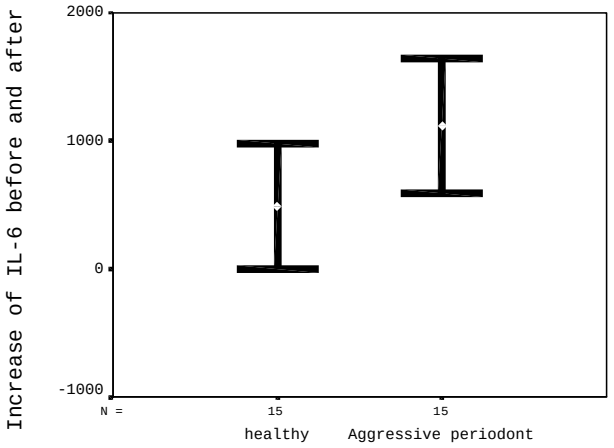
در این مطالعه غلظت IL-6 در دو گروه بیماران (۱۵ بیمار مبتلا به پریودنتیت مهاجم) و افراد سالم (۱۵ فرد سالم از نظر پریودنتالی و سیستمیک)، قبل و پس از تحریک با LPS اندازه‌گیری شد. نحوه توزیع غلظت IL-6 در گروه بیماران (مورد) و گروه افراد سالم (شاهد)، قبل و پس از تحریک با LPS و همچنین میزان افزایش غلظت IL-6 در اثر اضافه شدن LPS ، درنمودارهای ۱-۳ آورده شده است.



نمودار ۱ : غلظت‌های IL-6(pg/ml) قبل از تحریک با LPS در دو گروه بیماران و افراد سالم.



نمودار ۲ : غلظت‌های IL-6 (pg/ml) پس از تحریک با LPS در دو گروه بیماران و افراد سالم



نمودار ۳ : میزان افزایش غلظت IL-6 (pg/ml) در اثر تحریک با LPS در دو گروه بیماران و افراد سالم.

در مقایسه میانگین غلظتهای IL-6 (ترشح پایه) بین دو گروه افراد بیمار و گروه شاهد، قبل از تحریک با LPS در سطح اطمینان ٪۹۵، تفاوت معنی‌داری به دست نیامد (power> ٪۸۰ ,p= ۰/۵) (جدول ۱). در مقایسه غلظت IL-6 بین دو گروه افراد بیمار و سالم، پس از تحریک باLPS، نتیجه در حد نزدیک به معنی‌داری قرار گرفت (p=۰/۰۷) (جدول ۱). هنگامی که مقایسه بین دو گروه براساس میزان افزایش غلظت IL-6 در اثر اضافه‌شدن LPS انجام شد، گروه بیماران به طور معنی‌داری افزایش بیشتری در غلظت IL-6 در مقایسه با گروه شاهد نشان داد (p=۰/۰۲۹) (جدول۱).

www.SID.ir

Archive of SID

همچنین تفاوت میزان غلظت IL-6 در گروه بیماران در دو نوبت قبل و پس از تحریک با LPS و نیز در گروه افراد سالم در دو نوبت، قبل و پس از تحریک با LPS از نظر آماری معنی‌دار بود، در گروه بیماران p= ۰/۰۰۱ و در گروه افراد شاهد p= ۰/۰۰۴ به دست آمد.

در بررسی ارتباط بین پارامترهای کلینیکی (میانگین عمق پاکت، درصد پاکتهای بیشتر از ۳، درصد پاکتهای بیشتر از ۴ و درصد پاکتهای بیشتر از ۵) و غلظت IL-6 ارتباط معنی‌داری به دست نیامد (جدول۲).

جدول ۱: مقایسه غلظت بین دو گروه بیماران و افراد سالم در سه حالت: ۱) قبل از تحریک با LPS ۲) پس از تحریک باLPS ۳) میزان افزایش پس از تحریک با LPS.

میزان افزایش پس از تحریک با LPS	پس از تحریک با LPS	قبل از تحریک با LPS	غلظت IL-6 مترشحه از منوسیتهای خون محیطی در محیط کشت (pg/ml)
۲۲۸/۹۴ ± ۴۹۰/۱۱	۹۰۸±۲۷۵/۳۱	میانگین ± انحراف معیار	گروه سالم
۹۴/۱۶	۴۱۲/۵۴	۴۱۷/۹۸ ±۱۱۵/۹۶	N=۱۵
		۲۸۵/۶۳: میانه	
۱۱۱۸/۴±۲۴۶/۱۵	۱۶۱۱/۳±۲۵۷/۴۱	۴۹۲/۹±۱۵۵	گروه بیمار
۷۸۲	۱۶۹۸/۶۱	۱۷۱/۵۹	N=۱۵
p = ۰/۰۲۹	p = ۰/۰۷	p = ۰/۵	p-value

جدول۲: رابطه بین پارامترهای کلینیکی و غلظت IL-6 (r: ضریب همبستگی Spearman) .

میزان افزایش IL-6 قبل و پس از تحریک با LPS	IL-6 پس از تحریک با LPS	IL-6 قبل از تحریک با LPS	
r = ۰/۱۵۴	r = ۰/۰۶	r = ۰/۰۳	Mean PD
p =۰/۶۱۶	p =۰/۸۴	p = ۰/۹۱	
r =۰/۴۶	r =-۰/۵	r =۰/۲۳	٪PD≥ ۳
p =۰/۱	p =۰/۰۴	p =۰/۴۳	
r = -۰/۲۳	r =۰/۰۲۲	r = ۰/۱۴	٪PD≥ ۴
p = ۰/۴۸	p =۰/۹	p = ۰/۶۲	
r = -۰/۱۳	r = ۰/۰۵۵	r = -۰/۰۰۶	٪PD≥ ۵
p = ۰/۶۶	p =۰/۸	p = ۰/۹۸	

بحث و نتیجه‌گیری

بیماری پریودنتیت مهاجم نوع شدید ومهاجم بیماری پریودنتال است که در آن با تخریب شدید و سریع بافتهای پریودنتال و استخوان در سنین پایین مواجه هستیم. با توجه به نقش سایتوکاینها، به عنوان یک مدیاتور قوی در پاسخ التهابی و در روند تخریب پریودنشیوم واستخوان در این بیماری و با توجه به اینکه منوسیتها از مهمترین سلولهای ترشح کننده سیتوکاینها می‌باشند (۱۲،۱۱)، این فرضیه در میان محققین مطرح شد که منوسیتهای این بیماران دارای ویژگی تحریک پذیری بیش از حد می‌باشند. در این مطالعه، جهت بررسی ویژگی تحریک‌پذیری بیش از حد منوسیتها، IL-6 که از مهمترین سیتوکاینهای مترشحه از منوسیتها است به عنوان شاخص میزان تحریک شدگی منوسیتها در نظر گرفتیم.

در این مطالعه، در میزان ترشح پایه IL-6 ، قبل از تحریک با لیپوپلی‌ساکارید، تفاوت معنی‌داری بین گروه بیمار و سالم به دست نیامد ولی پس از تحریک با LPS ، تفاوت بین گروه شاهد و آزمون در حد نزدیک به معنی‌دار بودن قرار گرفت. وقتی که مقایسه بین دو گروه بر اساس میزان افزایش تحریک‌پذیری در اثر اضافه شدن LPS انجام شد، آنگاه گروه

www.SID.ir

Archive of SID

آزمون به طور معنی‌داری افزایش بیشتری در تحریک‌پذیری منوسیت‌ها در مقایسه با گروه شاهد نشان دادند.

این یافته‌ها با مطالعه Salvi و همکارانش همخوانی دارد (۴). همچنین Offenbacher و Salvi نیز نتایج مشابهی را با ارزیابی PGE2 گزارش کرده‌اند (۱). در حالی که برخی مطالعات دیگر مانند Shapira و Offenbacher (۳) Fokkema (۱۲) و Takahashi (۱۳) تفاوت معنی‌داری را در میزان IL-6 قبل و پس از تحریک با LPS بین نمونه‌های بیمار و سالم مشاهده نکردند، ولی این تفاوت را در مورد PGE2 ذکر کرده اند. در هر صورت علت این تفاوتها در نتایج ممکن است مربوط باشد به اینکه:

۱- در این مطالعه نژاد ایرانی مورد بررسی قرار گرفت که تا کنون گزارشی در این مورد منتشر نشده است و ممکن است تفاوتهای بین نژادی در قابلیت ترشح این مدیاتورها، وجود داشته باشد.

۲- برخی از محققین، تقسیم‌بندی دقیقی در مورد بیماریهای پریودنتال انجام نداده‌اند (۱۳) ولی در مطالعه حاضر، سعی بر آن بوده است که بیماری پریودنتال از نوع مهاجم و شدید آن انتخاب شوند.

۳- در نهایت، اینکه ما سعی کردیم جنبه‌های مختلف آزمایش نظیر غلظت مناسب LPS و غیره را با انجام مطالعات مقدماتی بهینه سازیم مثلا بیشترین تحریک‌کنندگی LPS در غلظت ۰/۱ به دست آمد ولی همه محققین از این غلظت استفاده نکرده‌اند. این‌تفاوت‌های جزئی در متدولوژی نیز ممکن است تفاوت در نتایج را تا حدی توضیح دهد.

یافته‌های دیگر این مطالعه در بررسی احتمال وجود ارتباط بین شدت ضایعه ومیزان IL-6 ترشح شده، نشان داد که همراهی معنی‌داری بین پیشرفت ضایعه با توجه‌به شاخص‌های کلینیکی مثل عمق پاکت و میزان IL-6 ترشح شده از منوسیتهای خون محیطی، وجود ندارد. که این یافته نیز با مطالعه Urquia و همکارانش که روی IL-1α انجام شده بود همخوانی دارد (۱۴). ممکن است که بتوان چنین فرضیه‌ای را مطرح نمود که هیپراکتیو بودن مونوسیت‌ها فرد را مستعد به‌پریودنتایتیس مهاجم می‌سازد ولی وقتی بیماری ایجاد شد شدت آن تحت تأثیر عوامل‌دیگر نظیر مقدار پلاک و فاکتورهای محیطی دیگر و نیز مدت زمان ابتلا به بیماری و ریسک فاکتورهای محیطی و ژنتیکی دیگر قرار می‌گیرد.

در نهایت، یافته‌های این مطالعه و دیگر مطالعات مدارکی هستند دال بر اینکه، بیماران مبتلا به پریودنتیت مهاجم، دارای افزایش ترشح منوسیتیک هستند که زمینه را برای یک عکس‌العمل سیستمیک بیش از حد در پاسخ به چالش LPS مهیا می‌کند. در نتیجه، این یافته‌ها پیشنهاد می‌کنند که افزایش پاسخ‌دهی ماکروفاژها، ممکن‌است عامل مهمی در پاتوژنز این بیماری باشد چرا که افزایش سنتز سایتوکاین توسط منوسیت‌ها در محل عفونت در پاسخ به حداقل تعداد باکتری می‌تواند در دو طیف موضعی و سیستمیک اثرگذار باشد، افزایش سایتوکاین به صورت موضعی می‌تواند باعث افزایش تخریب استخوان و تخریب بافتی شود، همچنین افزایش سیستمیک سایتوکاین باعث تحریک نوتروفیل‌ها، افزایش تکثیر لنفوسیت‌ها و افزایش‌سنتز آنتی‌بادیها می‌شود. بنابراین یک پاسخ ایمنی بیش از حد می‌تواند اساس توجیه برای تخریب بافتی شدید، تحلیل استخوان و الگوی فامیلی و دیگر مشاهدات ایمونولوژیکی همراه با این بیماری باشد. تجربیات کلینیکی نیز با فرضیات فوق همخوانی‌دارد. بیماران دارای پریودونتیت مهاجم اکثرا به خوبی بیماران مبتلا به پریودونتیت مزمن به درمانهای غیرجراحی و جراحی پریودنتال پاسخ می‌دهند. اما اغلب مشاهده می‌شود که میل به عود بیماری در این دسته از بیماران در صورتی که کنترل پلاک بیمار ضعیف‌تر از حالت ایده‌آل باشد محتمل‌تر از سایر بیماران است.، یعنی اینکه در این بیماران بافتهای پریودنتال سالم به مقادیر اندک پلاک بیش از حد پاسخ می‌دهند و در نتیجه آماس و تخریب استخوان مجدد را نشان می‌دهند. در حالی که در غیاب پلاک، پاسخ بافتها در حد فیزیولوژیک و عاری از آماس است، که این مطلب با مشاهده ما همخوانی‌دارد، چرا که فعالیت منوسیتهای بیماران ما در غیاب LPS فرقی با افراد سالم نداشت ولی حضور LPS منوسیتهای بیماران را با شدت بیشتری در مقایسه با افراد سالم تحریک نمود.

لیکن نکته‌ای که هنوز به درستی مشخص نشده است این است که تفاوتهای بین فردی در ترشح سایتوکاین می‌تواند از یک طرف نتیجه تفاوتهای ذاتی بین منوسیت‌های افراد بیمار و

www.SID.ir

Archive of SID

سالم برای ترشح مقادیر متفاوت سایتوکاین باشد. از طرف دیگر ممکن است به دلیل حادث شدن این بیماری و وابسته به برانگیختگی داخل بدن توسط عفونت پریودونتال اتفاق بیفتد با توجه به این یافته که میزان ترشح پایه یعنی قبل از تحریک با LPS در دو گروه افراد بیمار و سالم تفاوت معنی‌داری ندارد و تفاوت بین قبل و پس از تحریک با LPS در دو گروه معنی‌دار شده است، این فرض که تفاوتهای بین منوسیتها ذاتی هستند، تقویت می‌شود زیرا این یافته‌ها حکایت از این دارند که منوسیت‌های گروه سالم و بیمار هر دو از یک حالت غیر تحریک شده به طور مساوی برخوردار هستند. پیشنهاد می شود این مطالعه روی منوسیت افراد مبتلا به پریودنتایتیس مهاجم پس از درمان تکرار شود و با قبل درمان مقایسه شود. درمان، میزان باکتری را کم می‌کند و در نتیجه منبع اصلی تحریک سلول از بین می‌رود. در صورتی که این روند برای یک گروه از بیماران مبتلا به پریودنتایتیس مزمن نیز انجام شود، تأثیر درمان و کم شدن پلاک باکتریایی قابل مقایسه خواهد بود. چنانچه پس از درمان و در غیاب عفونت پریودنتال و سایر عفونتها نیز، پاسخ‌دهی بیش‌از حد منوسیت‌ها در افراد مبتلا به پریودنتیت مهاجم مشاهده شود، می‌توان با قاطعیت بیشتری این فرضیه را که منوسیت خون محیطی این افراد به طور ذاتی و ژنتیکی بیش فعال است، مطرح کرد.

تقدیر و تشکر

این طرح تحقیقاتی با تصویب معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مشهد به انجام رسیده است. از حمایت و کمکهای مالی آن معاونت محترم صمیمانه تشکر می‌نماییم، هچمنین از همکاری سرکار خانم بروک و سرکار خانم سیفی در پژوهشکده بوعلی تشکر و قدردانی می گردد.

www.SID.ir

Archive of SID

References

1. Offenbacher S., Salvi G. E., 1999, Induction of prostaglandin release from macrophages by bacterial endotoxin, Clin. Infect. Dis., 28: 505-13.
2. Papapanou P. N., 1996, periodontal disease: epidemiology, Ann. Periodontol. 1: 1-36.
3. Shapira L., Soskolne W. A., Sela M. N., Offenbacher S., Barak V., 1994, The secretion of PGE2, IL-1 beta, IL-6, and TNF alpha by adherent mononuclear cells from early onset periodontitis patients, J. Periodontol., 62: 139-46.
4. Salvi G. E., Brown C. E., Fujihashi K., Kiyono H., Smith F. W., Beck J. D., Offenbacher S., 1998, Inflammatory mediators of the terminal dentition in adult and early onset periodontitis, J. Periodontal. Res., 33: 212-25.
5. Mahanonda R., Sa-Ard-Iam N., Charatkulangkun O., Promsudthi A., Schifferle R. E., Yongvanichit K., Pichyangkul S., 2004, Monocyte activation by Porphyromonas gingivalis LPS in aggressive periodontitis with the use of whole-blood cultures, J. Dent. Res., 83: 540-5.
6. Nagasawa T., Kobayashi H., Aramaki M., Kiji M., Oda S., Izumi Y., 2004, Expression of CD14, CD16 and CD45RA on monocytes from periodontitis patients, J. Periodontal. Res., 39: 72-8.
7. Fabio Rossano, Antonietta Rizzo, Maria Rosaria Sanges, Gabriella Cipollaro de L'Ero, Maria Antonietta Tufano, 1993, Human monocytes and gingival fibroblasts release tumor necrosis factor-α,interleukin-1α and interleukin-6 in response to particulate and soluble fractions of *Prevotella melaninogenica* and *Fusobacterium nucleatum*, Int. J. Clin. Lab. Res., 23:165-168.
8. Baqui A. A., Meiller T. F., Chon J. J., Turng B. F., Falker W. A. J., 1998, Interleukin-6 production by human monocytes treated with granulocyte-macrophage colony-stimulated factor in the presence of lipopolysaccharide of oral microorganisms, Microbiol. Immunol., 13:173-180.
9. Novak M. J., Classification of disease and conditions affecting the periodontitis In: Newman M. G., Takei H. H., Caranza F. A., (eds.), Textbook of Clinical Peiodentology, 9th ed., Philadelphia, Saunders, 2002:70-71.
10. Lefkovits I., Immunology Methods Manual, California, Academic Press,1997:2090-2091.
11. Lindemann R. A., Kinder Haake S. A., Kjeldsen M., Avanessian A. B., 1996, Effect of oral bacteria on peripheral blood leukocyte interleukin-6 and soluble interleukin-6 receptor production, Oral Microbiol. Immunol., 11: 332-6.
12. Fokkema S. J., Loos B. G., Slegte C., van der Velden U., 2002, A type 2 response in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated whole blood cell cultures from periodontitis patients, Clin. Exp. Immunol., 127: 374-8.
13. Takahashi K., Takashiba S., Nagai A., Takigawa M., Myoukai F., Kurihara H., Murayama Y., 1994, Assessment of interleukin-6 in the pathogenesis of periodontal disease, J. Periodontol., 65: 147-53.
14. Urquia M., Rodriguez-Archilla A., Palacios-Cordoba A., Asencio R., Ferrer J. M., 1995, Induction of interleukin-1 alpha production by Porphyromonas gingivalis in mononuclear blood cell cultures from periodontitis patients, Bull. Group. Int. Rech. Sci. Stomatol. Odontol., 38: 51-6.

www.SID.ir