

بررسی اثر پلی مورفیسم ژن سایتوکاین های پیش التهابی در بیماری پریودنتیت مهاجم ژنرالیزه

دکتر احمد رضا عبادیان*، دکتر مهرداد رادور**، دکتر حمید رضا عرب***، دکتر جلیل توکل افشاری****، دکتر ناصر سرگلزایی**،
دکتر سلمان قره گزولو*****، اعظم بروک*****، مزگان شیرخانی*****

*دندانپزشک

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

*** دانشیار مرکز تحقیقات ایمنولوژی 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)-1 β +3954 C/T, IL-1 α -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: IL1 β : CT, CC & TT genotypes in patients were 39.6%, 60.4% & 0.0% and in healthy individuals 41.7%, 50% & 8.3%, respectively. IL1 α : 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. TNF α : 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-1 α , IL-1 β , 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-1 α , IL-1 β , TNF- α , polymorphism.

Corresponding Author: radvarm@mums.ac.ir

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

چکیده

مقدمه: پریدنتیت 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. سایتوکاین های پیش التهابی با شرکت در پدیده التهاب در پاسخ ایمنی فرد به پاتوژن های پریدنتال نقش دارند. پیشنهاد شده است پلی مورفیسم ژن سایتوکاین ها می تواند در پاسخ ایمنی فرد و در نتیجه در پاتوژن پریدنتال مؤثر باشد. این مطالعه به بررسی ارتباط پلی مورفیسم ژن $TNF-\alpha-308G/A$ و $IL-1\alpha-889C/T$ ، $IL-1\beta+3954C/T$ با پریدنتیت 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=65) و افراد سالم (تعداد=60) مراجعه کننده به دانشکده دندانپزشکی مشهد، DNA آنها در پژوهشکده بوعلی استخراج گردید و توسط تکنیک PCR-RFLP پلی مورفیسم ژن آنها تعیین گردید. داده ها توسط نرم افزار SPSS با ویرایش ۱۵ مورد آنالیز قرار گرفت.

یافته ها: $IL-1\beta$: ژنوتایپ CT، CC و TT در بیماران به ترتیب ۳۹/۶٪، ۶۰/۴٪ و ۰٪ و در افراد سالم به ترتیب ۴۱/۷٪، ۵۰٪ و ۸/۳۰٪ بدست آمد. $IL-1\alpha$: ژنوتایپ CT، CC و TT در بیماران به ترتیب ۴۴/۶٪، ۴۶/۲٪ و ۹/۲٪ و در افراد سالم به ترتیب ۴۶/۵٪، ۵۱/۲٪ و ۲/۳٪ حاصل شد. $TNF-\alpha$: ژنوتایپ GA، GG و AA در بیماران به ترتیب ۴۴/۸٪، ۴۱/۴٪ و ۱۳/۸٪ و در افراد سالم به ترتیب ۴۶/۷٪، ۵۰٪ و ۳/۳٪ بدست آمد. بین دو گروه هیچ اختلاف آماری معنی داری مشاهده نشد.

نتیجه گیری: عدم ارتباط بین پلی مورفیسم های $IL1\alpha$ ، $IL1\beta$ و $TNF\alpha$ با بیماری پریدنتیت مهاجم در جامعه مورد مطالعه ما، استفاده از این ژن ها را به عنوان ریسک مارکر، در پریدنتیت مهاجم، مورد تردید قرار می دهد.
واژه های کلیدی: پریدنتیت، سایتوکاین، $IL1\alpha$ ، $IL1\beta$ و $TNF\alpha$ و پلی مورفیسم.
مجله دانشکده دندانپزشکی مشهد / سال ۱۳۸۸ دوره ۳۳ / شماره ۳: ۴۰-۲۳۱.

مقدمه

در مطالعات مقایسه ای بین بافت ها و مایع شیار لتهای افراد مبتلا به پریدنتیت با افراد سالم، سایتوکاین های پیش التهابی، سایتوکاین های 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)

سایتوکاین ها میانجی های پپتیدی هستند که در تنظیم پاسخ های ایمنولوژیکی، 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 می کنند.^(۶)

مهمترین سایتوکاین های پیش التهابی $IL-1\alpha$ ، $IL-1\beta$ و $TNF-\alpha$ می باشند که اثرات مشابه و سینرژیک دارند. سایتوکاین های پیش التهابی سنتز مولکول اتصال به اندوتلیوم بر روی سلول های التهابی مانند نوتروفیل، مونوسیت و فیبروبلاست را افزایش می دهند و باعث

پریدنتیت 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 بافت های پریدنتال نقش دارند. ترشح آنزیم های پروتئولیتیک و بروز عوامل سرکوب کننده ایمنی اثر مستقیم آنهاست. همچنین عوامل پاتوژن میکروب ها مانند لیپولی ساکارید (Lypo poly (LPS), sacarid باعث تحریک پاسخ ایمنی میزبان می شود که اثر غیرمستقیم آنهاست و منجر به تحریک سنتز سایتوکاین های پیش التهابی، تجزیه بافت همبند و تحلیل استخوان می شود.^(۲)

چند برابر IL-1 α و هر دوی آنها چند برابر TNF- α می‌باشد.^(۷۱۰) 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 پرودنتیت را بوسیله آزمایش بر روی میمون ها ثابت کردند. آنها با کمک لیگاجور، پرودنتیت 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 پرودنتیت جوانان را بیشتر از پرودنتیت بزرگسالان و همچنین بیشتر از ژنژیویت و حالت سلامت بدست آوردند.^(۱۳)

بحث استعداد ژنتیکی در بیماری پرودنتیت در حقیقت بر پایه تفاوت پاسخ های ایمنی و التهابی در مواجهه با عوامل محیطی استوار است. به عنوان نمونه تولید سایتوکاین ها که یکی از بازوان ایمنی ذاتی و اکتسابی هستند در همه افراد یکسان نیست. Bain و همکارانش سنتز سایتوکاین های پیش التهابی را در جنس مؤنث بیشتر از مذکر بدست آوردند.^(۱۴) مطالعات متعدد دیگری بیانگر تأثیر پلی مورفیسم ژن سازنده سایتوکاین ها 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 بار به بررسی SNP ژن سایتوکاین ها در بیماری پرودنتیت پرداختند. آنها

وازودیلاتاسیون، کموناکسی و التهاب در ناحیه می گردند.^(۷۱۸)

TNF- α مهمترین پاسخ میزبان در برابر جزء فعال باکتری های گرم منفی (LPS یا همان اندوتوکسین) می باشد 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 آنتی ژن، Natural killer cells (NK) فعال شده، ماست سل فعال شده نیز آنرا تولید می کنند. TNF- α علاوه بر فعال سازی کموناکسی سلول های التهابی، باعث تحریک سنتز IL-6، IL-1، IL-8 شده و در افزایش تولید فرآورده های 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.^(۷۱۹)

IL-1 که در قدیم به آن فاکتور فعال کننده استوکلاست می گفتند سه نوع مختلف دارد: IL-1 β ، IL-1 α و IL-1 Receptor antagonist (IL1 RN). IL-1 α و IL-1 β همانند TNF- α واسطه التهابی سیستم ایمنی هستند. IL-1 β بیشتر توسط مونوسیت ها و IL-1 α 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 تکثیر و تمایز لنفوسیت های B و T می شود و تولید آنتی بادی و سایتوکاین آنها را افزایش می دهد. IL-1 با تأثیر بر فیبروبلاست، سلول های اندوتلیال و کندروسیت ها 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 می شوند. IL-1 و TNF- α از طریق تحریک سنتز اسید آراشیدونیک باعث افزایش غلظت PGE2 و فعال شدن استوکلاست ها می شوند. در نتیجه در روند تخریب استخوان شرکت دارند، البته قدرت تخریب IL-1 β

سن بیماران و افراد سالم به ترتیب ۲۷/۴۵ و ۲۹/۷۵ بوده است. از ۶۵ بیمار، ۴۲ نفر مونث (۶۵/۴٪) و ۲۳ نفر مذکر (۳۵/۴٪) بوده اند همچنین از ۶۰ فرد سالم ۳۷ نفر مونث (۶۱/۶٪) و ۲۳ نفر مذکر (۳۸/۴٪) بوده اند.

تعیین ژنوتایپ: پس از انتخاب افراد سالم و مبتلایان به GagP توسط پرپودنتولوژیست، 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 ایمونونژنتیک پژوهشگاه 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 میکروتیوب های 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 PCR X10 (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 باندها 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 باندها توسط اشعه UV (دستگاه، Gel-documentation آلمان) تایید گردید. با حصول

مشخص کردند SNP ژن IL-1 β در جایگاه +۳۹۵۴ و IL-1 α در جایگاه -۸۸۹ در بروز بیماری پرپودنتیت مؤثر می باشد.^(۲۱) Dihel و همکارانش نیز SNP در IL-1 β و IL-1 α را مرتبط با پرپودنتیت بدست آوردند.^(۲۲) این در حالی است که Hodge و همکارانش هیچ رابطه ای بین SNP ژن IL-1 و بیماری پرپودنتیت نیافتند.^(۲۳) رابطه بین SNP ژن TNF- α در جایگاه -۳۰۸ و پرپودنتیت نیز بوسیله مطالعات دیگری بررسی شده است که در اکثر آنها رابطه معنی داری حاصل نشده است.^(۲۴-۲۶)

تاکنون مطالعه ای در جامعه ایران در خصوص ارتباط پلی مورفیسم ژن این سایتوکاین ها با بیماری پرپودنتیت مهاجم انجام پذیرفته است. لذا ما در این پژوهش به بررسی اثر SNP ژن IL-1 β در جایگاه +۳۹۵۴ تبدیل نوکلئوتید C به T (IL-1 β +3954 C/T)، IL-1 α -889 C/T و TNF α -308 G/A بر بروز پرپودنتیت در جامعه ایرانی خراسانی پرداختیم.

مواد و روش ها

این پژوهش مورد - شاهدهی با همکاری بخش پرپودنتولوژی دانشکده دندانپزشکی مشهد و پژوهشگاه بوعلی مشهد با اخذ تأییدیه کمیته اخلاق دانشگاه و رضایت نامه از افراد شرکت کننده در مطالعه انجام پذیرفت. از بین مراجعین به بخش پرپودنتیکس دانشکده دندانپزشکی مشهد، افراد غیر سیگاری و سن کمتر از ۳۵ سال گزینش شدند. وجود بیماری پرپودنتیت مهاجم ژنرالیزه و یا سالم بودن مراجعه کنندگان به بخش پرپودنتولوژی توسط پرپودنتیست 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 $AL \leq 5$ میلی متر در ۸ دندان دایمی که ۳ دندان انسیزور یا مولر اول. متوسط

یافته ها

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

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 پلی آکریل آمید ۱۷ درصد، عمل الکتروفورز انجام گردید. رنگ آمیزی نترات نقره جهت نمایان شدن باندها بکار رفت.

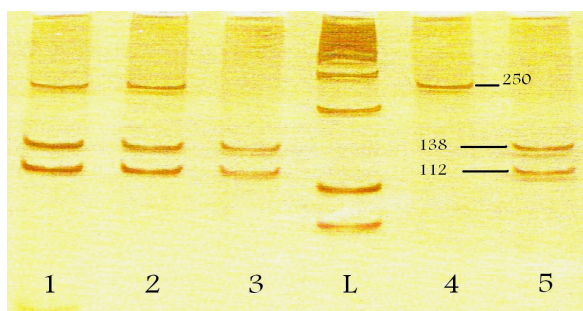
توضیح اینکه عدم رؤیت باند PCR برخی نمونه ها، حتی پس از تکرار، منجر به حذف آنها گردید. در نتیجه تعداد نمونه ها در بررسی سه SNP، یکسان بدست نیامد. آنالیز داده ها: تفاوت فراوانی ژنوتایپ ها و آلل ها در دو گروه بیمار و سالم توسط تست های Chi-square و Exact (نرم افزار SPSS با ویرایش ۱۵) مشخص گردید.

جدول ۱: شرایط PCR

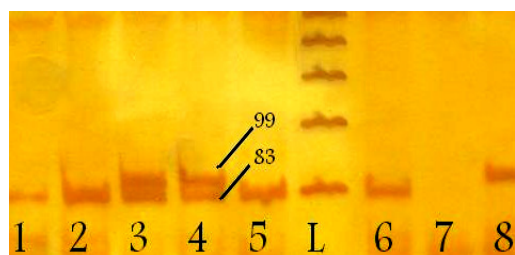
IL-1 β	2 cycles: 95°C, 2 min; 68°C, 1 min; 72°C, 1 min. 35 cycles: 95°C, 2 min; 60°C, 1 min; 72°C, 1 min. 94°C, 1 min; 68°C, 1 min; 72°C, 5 min
IL-1 α	95°C, 4 min. 34 cycles: 95°C, 30 sec; 60°C, 30 sec; 72°C, 30 sec. 72°C, 5 min
TNF- α	95°C, 2 min. 39 cycles; 95°C, 1 min; 62°C, 1 min; 72°C, 1 min. 72°C,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

جدول ۲: پرایمرها و آنزیم ها

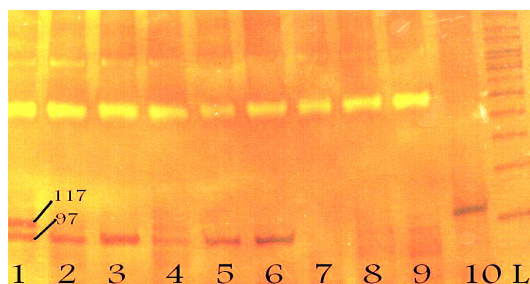
سایتوکاین SNP	توالی پرایمر	آنزیم	جایگاه برش آنزیم
IL-1 β C/T +3954	SENCE ANTISENCE 5'-GTTGTCATCAGACTTTGACC-3' 5'-TTCAGTTCATATGGACCAGA-3'	Taq 1	T/CGA
IL-1 α C/T -889	SENCE ANTISENCE 5'-AAGCTTGTTCTACCACCTGAACTAGGC-3' 5'-TTACATATGAGCCTTCCATG-3'	Nco 1	C/CATGG
TNF- α G/A -308	SENCE ANTISENCE 5'-TCC TCC CTG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



تصویر ۱: نتیجه اثر آنزیم TaqI بر محصولات PCR در IL-1 β (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 NcoI بر محصولات PCR در IL-1 α (عدم برش TT: نمونه 8) (برش هموزایگوت CC: نمونه های 1، 2، 5) (برش هتروزایگوت CT: نمونه های 3 و 4) (نمونه 7: failed) (توضیح: باند سوم برش هترو بدلیل کوچکی سایز (16 BP) قابل تشخیص نمی باشد) (Ladder: L)



تصویر ۳: نتیجه اثر آنزیم NcoI بر محصولات PCR در TNF- α (عدم برش AA: نمونه 10) (برش هموزایگوت GG: نمونه های 2، 3، 5 و 6 برش هتروزایگوت) (GA: نمونه های 1 و 4) (نمونه های 7، 8 و 9: failed) (توضیح: باند سوم برش هترو بدلیل کوچکی سایز (20 bp) قابل تشخیص نمی باشد) (Ladder: L)

فراوانی ژنوتایپها و آللها:

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

در مقایسه فراوانی آللها بین گروه های بیمار و سالم، تست χ^2 تفاوت معنی داری نشان نداد ($P=0/121$). در مقایسه فراوانی ژنوتایپها در دو گروه نیز، تست Exact تفاوت معنی داری نشان نداد ($P=0/095$).

IL-1 α : جدول ۴ نشان دهنده فراوانی آلل های C و T همچنین ژنوتایپهای CT، CC و TT در بیماران پریدنتیت و افراد سالم می باشد. تفاوت معنی داری بین دو گروه دیده نشد.

در مقایسه فراوانی آللها بین گروه های بیمار و سالم، تست χ^2 تفاوت معنی داری نشان نداد ($P=0/346$). در مقایسه فراوانی ژنوتایپها در دو گروه نیز، تست Exact تفاوت معنی داری نشان نداد ($P=0/388$).

TNF- α : جدول ۵ نشان دهنده فراوانی آلل های G و A همچنین ژنوتایپهای GG، GA و AA در بیماران پریدنتیت و افراد سالم می باشد. تفاوت معنی داری بین دو گروه دیده نشد.

در مقایسه فراوانی آللها بین گروه های بیمار و سالم، تست χ^2 تفاوت معنی داری نشان نداد ($P=0/114$). در مقایسه فراوانی ژنوتایپها در دو گروه نیز، تست Exact تفاوت معنی داری نشان نداد ($P=0/116$).

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

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

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

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

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

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

بحث

پریودنتیت بازی می‌کند. سایتوکاین‌ها بازوان اصلی پدیده التهاب به شمار می‌روند. در بافت‌های مبتلا به پریودنتیت هم سایتوکاین‌های التهابی مانند IL-1 α , IL-1 β و TNF- α هم سایتوکاین‌های تنظیمی مانند IL-1RN, IL-10 و IL-13 (TGF- β) به مراتب

تخریب پریودنتال توسط تحرکات باکتریایی آغاز می‌شود و زمینه گسترش آن بستگی به نحوه پاسخ ایمنی میزبان دارد. التهاب یک پاسخ ایمنی طبیعی نسبت به حجمه میکروبی می‌باشد که نقش مهمی در پاتوژنز

بیشتر از بافت نرمال گزارش شده است. (۳۰-۳۷)

اخیراً توجه پژوهشگران به نقش ژنتیک در استعداد ابتلا به بیماری های التهابی معطوف گشته است. (۳۱)

درخصوص پریدونتیت برخی مطالعات وجود پلی مورفیسم ژن سایتوکاین ها را با شدت بیماری مرتبط دانسته اند. Kornman و همکارانش بین پلی مورفیسم $IL-1\alpha$ و $IL-1\beta$ و پریدونتیت مزمن را بطنه معنی داری بدست آوردند. (۳۱)

McGuire و همکارانش از دست رفتن دندان را در افراد با پلی مورفیسم $IL-1\beta$ ۲/۷ برابر افراد بدون پلی مورفیسم گزارش کردند، همچنین این میزان را در افراد پلی مورفیک که سیگاری شدید بودند ۷.۷ بدست آوردند. (۳۲)

Papapnoa و همکارانش بین پلی مورفیسم $IL-1\beta$ و میزان از دست رفتن دندان رابطه معنی داری یافتند. (۳۳) Meisel و همکارانش نیز بین پلی مورفیسم $IL-1\beta$ و میزان از دست رفتن دندان رابطه آماری پیدا کردند. (۳۴) Soga و همکارانش بین پلی مورفیسم های چندگانه $TNF-\alpha$ و پریدونتیت شدید بالغین ارتباط آماری بدست آوردند. (۳۵)

Akmana و همکارانش بین پلی مورفیسم $TNF-\alpha-1031T/C$ و پریدونتیت در مبتلایان به سندرم بهجت رابطه معنی داری بدست آوردند. (۳۶) Wagner و همکارانش نیز پلی مورفیسم های $IL-1\beta$ (+ 3954) و $IL-1\alpha$ (-889) را با پریدونتیت مزمن مرتبط دانستند. (۳۷)

علیرغم مطالعاتی که رابطه مثبتی بین وقوع پلی مورفیسم و بیماری پریدونتیت نشان داده اند، ما در مطالعه خود بین پلی مورفیسم های $IL1\beta$ +3954 C/T، $IL1\alpha$ -889 و $TNF\alpha$ -509 G/A و پریدونتیت مهاجم، چه از لحاظ ژنوتایپ چه از لحاظ آلل ها، ارتباط آماری بدست نیاوردیم. البته مطالعاتی در دسترس هستند که نتایج ما را تایید می کنند. در بررسی Armitage و همکارانش پلی مورفیسم های $IL-1\alpha$ و $IL-1\beta$ در پریدونتیت و افراد سالم تفاوتی نداشتند. (۳۸) Gore و همکارانش تفاوتی بین

پلی مورفیسم $IL-1$ در گروه پریدونتیت بالغین و گروه سالم نیافتند. (۳۸) Hodge و همکارانش نیز تفاوت آماری پلی مورفیسم های $IL-1\alpha$ و $IL-1\beta$ را بین گروه پریدونتیت زودرس و سالم بدست نیاوردند. (۳۳) Kinane و همکارانش بین گروه پریدونتیت مهاجم و گروه کنترل برای پلی مورفیسم $TNF-\alpha$ تفاوتی مشاهده نکردند. (۳۴)

Galbraith و همکارانش نیز بین گروه پریدونتیت مزمن و سالم برای پلی مورفیسم $TNF-\alpha$ تفاوتی بدست نیاوردند. (۳۵) Sakellari و همکارانش بین پلی مورفیسم های $IL-1\alpha$ و $IL-1\beta$ و $TNF-\alpha$ و پریدونتیت 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 پریدونتیت تا سال ۲۰۰۷ بررسی کرده اند، پرداختند. نکته بااهمیت این بررسی این است که علیرغم مشابه نبودن نتایج مطالعات، درصد فراوانی آلل ها و ژنوتایپ های بیماران در هیچ جمعیتی مشابه جمعیت دیگر نبوده است. جالبتر اینکه در مقایسه فراوانی آلل ها و ژنوتایپ ها در افراد سالم نیز هیچ تشابهی در جوامع مختلف بدست نیامد. (۴۰)

نتیجه گیری

با توجه به تفاوت فراوانی آلل های کد کننده ژن سایتوکاین ها در جوامع مختلف و فقدان بررسی ارتباط این فراوانی با بیماری پریدونتیت در جامعه ما، این پژوهش به انجام رسید و نتیجه گرفته شد که در جامعه ایرانی - خراسانی پلی مورفیسم های $IL1\beta$ C/T +3954، $IL1\alpha$ -889 C/T و $TNF-\alpha$ G/A-308 را نمی توان به عنوان مارکرهایی جهت تعیین استعداد ژنتیکی ابتلا به پریدونتیت مهاجم بیان کرد.

تشکر و قدردانی

می‌گردد. همچنین از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مشهد که از این طرح حمایت مالی نمودند، تقدیر می‌گردد.

بدینوسیله از استاد ارجمند جناب آقای دکتر محمود تمیزی جهت راهنمایی های ارزشمندشان قدردانی می‌گردد.

منابع

- Kinane DF, Shiba H, Hart TC. The genetic basis of periodontitis. *Periodontol* 2000. 2005; 39: 91-117.
- Stashenko P. Molecular pathogenesis of periodontal disease. *Soc Microbiol* 1994; 5(7): 171-81.
- McFarlane CG, Reynolds JJ, Meikle MC. The release of interleukin-1 beta, tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma by cultured peripheral blood mononuclear cells from patients with periodontitis. *J Periodont Res* 1990; 25(4): 207-14.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Mariette X. Anti-cytokines in the treatment of inflammation. *Rev Prat* 2003; 53(5): 507-11.
- 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.
- 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.
- Assuma R, Oates T, Cochran D, Amar S, Graves DT. IL-1 and TNF antagonists inhibit the inflammatory response and bone loss in experimental periodontitis. *J Immunol* 1998; 160(1): 403-9.
- 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.
- 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.
- Wilson AG, Symons JA, McDowell TL, McDevitt HO, Duff GW. Effects of a polymorphism in the TNF_a promoter on transitional activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94(7): 3195-9.
- 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.
- Hoffmann SC, Stanley EM, Darrin Cox E, Craighead N, DiMercurio BS, Koziol DE, 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.
- 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.
- Kinane DF, Hart TC. Genes and gene polymorphisms associated with periodontal disease. *Crit Rev Oral Biol Med* 2003; 14(6): 430-49.
- Loos BG, van der Velden U, Laine ML. Genetics and periodontitis. *Ned Tijdschr Tandheelkd* 2008; 115(2): 87-92.
- Komman 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.
- 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 Periodontol 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, Korman 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.