شناسایی و توالی‌یابی باکتری‌های ایجادکننده بیماری‌های پریودنتال و ارتباط آن با پلی‌مورفیسم ژنومی اینترلوکین-۶ با روش Tetra-Arms-PCR

فهیمه میرزاده[۱]،دکترکیومرث امینی[۲#]، دکتر پرویز امینی [۳]

[۱]دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد سیرجان، سیرجان، ایران
[۲]دانشیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی، ساوه، ایران.
[3]دانشیار، گروه پروتز ثابت، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران.
وصول مقاله:۹۷/۵/۱۶ اصلاح نهایی:۹۷/۱۱/۱۳ پذیرش مقاله:۹۷/۱۲/۱

Identification and sequencing of periodontal-causing bacteria and its Relationship with Interleukin-6 Gene Polymorphism by Tetra-Arms-PCR

Fahimeh Mirzadeh[1],Kumarss Amini [*2],Praviz Amini [3]

[1] School of Basic Sciences , Microbiology Dept , Sirjan Branch, Islamic Azad University, Sirjan, Iran.
[2] Associate Professor, Microbiology Dept, School of Basic Sciences, Saveh Branch, Islamic Azad University, Saveh, Iran.
[3] Associate Professor, Prosthodontics School of Dentistry Dept, Kerman University of Medical Sciences Kerman, Kerman ,Iran.

Received: 7 Agust 2018; Accepted: 20 February 2019

Abstract

Background & Aim: Periodontal infections are among the most common oral and tooth diseases and recognized as the main cause of the tooth loss after decay. The purpose of this study was to identify and sequencing of the periodontal-causing bacteria and its relation with interleukin-6 gene polymorphism by Tetra-Arms-PCR method.

Material and methods: In this case-control study, 100 samples (50 periodontal infections and 50 healthy people) were collected under the supervision of a dentist. After genomic DNA extraction using the sinaclon Company Kit, identification of bacterial strains was performed using 16S rRNA gene amplification. Also, after extraction of cellular DNA from blood samples taken, the polymorphism of the genome encoding IL-6 was performed using the Tetra-Arms-PCR method. The sequencing was carried out by the Sanger method and by Bioneer Company, and finally, the MEGA 7 software was scanned to determine the genetic affinity of the phylogeny tree strains.

Results: In the present study, bacteria of *Staphylococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Acroombocator*, *Granulicatla Adiasens*, *Gordonia* and *Kocuria rhizophila* were found in periodontal patients. Also, there was a significant relationship between G/G genotype in -174G/C in periodontal patients compared to control group.($p<0.05$)

Conclusions: The correlation between Polymorphism -174G / C in IL-6 and chronic periodontal disease, suggested that, presence of this gene, might be a risk factor for chronic periodontal disease involvement and also, can be an indicator for susceptibility of the mentioned disease involvement.

Key words: *Periodontal disease, bacterial sequencing, Interleukin-6, PCR, polymorphism*

***Corresponding Author: dr_kumarss_amini@yahoo.com**

J Res Dent Sci. 2019; 16 (1):42-50

#، نویسنده مسئول مکاتبات: دکتر کیومرث امینی تلفن: ۰۸۶۴۲۲۴۱۵۱۱ پست الکترونیک: dr_kumarss_amini@yahoo.com

خلاصه:

سابقه و هدف: عفونت‌های پریودنتال همواره جزو شایع‌ترین بیماری‌های دهان و دندان است و مهم‌ترین علت از دست رفتن دندان‌ها پس از پوسیدگی محسوب می‌گردند. هدف از انجام مطالعه حاضر شناسایی و توالی‌یابی باکتری‌های ایجادکننده بیماری پریودنتال و ارتباط آن با پلی‌مورفیسم ژنومی اینترلوکین-۶ با روش Tertra-Arms-PCR بود.

مواد و روش ها: در این مطالعه مورد-شاهدی، تعداد ۱۰۰ نمونه پلاک فوق لثه‌ای (۵۰ فرد مبتلا به عفونت پریودنتال و ۵۰ فرد سال) زیر نظر پریودنتیست جمع‌آوری گردید. پس از استخراج DNA ژنومی ، شناسایی سویه‌های باکتریایی با استفاده از تکثیر ژن **S** rRNA16 انجام گردید. همچنین پس از استخراج DNA سلولی از نمونه‌های خون اخذشده، پلی‌مورفیسم ژنوم کد کننده IL-6 با استفاده از روش Tertra-Arms-PCR انجام گردید. ترادف‌یابی با استفاده از روش سانگر انجام گردید و درنهایت به منظور تعیین قرابت ژنتیکی سویه‌ها درخت فیلوژنی با استفاده نرم‌افزار **7** MEGA ترسیم گردید.

یافته ها: در پژوهش حاضر در مجموع باکتری‌هایی از جنس استافیلوکوکوس، لاکتوباسیلوس، استرپتوکوکوس، آکروموباکتر، گرانولیکاتلا آدیاسنس، گوردونیا و کوکوریا ریزوفیلا در بیماران پریودنتال یافت شد. همچنین در مقایسه با گروه کنترل، رابطه معنی‌داری بین ژنوتیپ G/G در -G/C۱۷٤ در بیماران پریودنتال مشاهده شد. (P<۰/۰۵)

نتیجه گیری: وجود ارتباط پلی مورفیسم ژن ۱۷۴ اینترلوکین ۶ و پریودنتیت مزمن در جامعه مورد بررسی، وجود این ژن را به عنوان یک عامل خطر در ابتلا به بیماری پریودنتیت مزمن مطرح می کند و می تواند به عنوان یک نشانگر در تعیین استعداد ابتلا به بیماری فوق مطرح باشد.

کلمات کلیدی: بیماری های پریودنتال ، توالی باکتریایی، اینترلوکین-۶، PCR. پلی مورفیسم

مقدمه:

بیماری پریودنتیت (*Periodontitis*) نوع بیماری التهابی است که به علت عفونت و التهاب در لثه و استخوان اطراف دندان‌ها به وجود می‌آید.[۱] بیماری پریودنتال عمدتاً افراد بزرگ‌سال را درگیر می‌کند هرچند انواعی از آن بیشتر در کودکان دیده می‌شوند. شیوع بیماری پریودنتال با افزایش سن افزایش می‌یابد.[۲] طبق یک گزارش، تقریباً ۴۷٪ جمعیت بالای ۳۰ سال و ۷٪ درصد افراد بالای ۶۵ سال در ایالات‌متحده مبتلا به بیماری پریودنتال هستند. این بیماری در مردها (۵۶٪) شایع‌تر از زن‌ها (۳۸٪) می‌باشد.[۳] شیوع بیماری های پریودنتال در افراد فقیر (۶۵٪)، افراد با سطح تحصیلات پایین‌تر از دبیرستان (۶۷٪) و افراد سیگاری (۶۴٪) به‌طور قابل‌توجهی بالاست.[۴]

اولین علت خطر ساز در بیماری‌های پریودنتال تجمع باکتری‌ها در شیار لثه می‌باشد.[۵] میکروب‌های موجود در پلاک‌ها به طور مستقیم و غیرمستقیم درروند تخریب بافت‌های پریودنتال نقش دارند. ترشح آنزیم‌های پروتئولیتیک و بروز عوامل سرکوب‌کننده سیستم ایمنی مانند لیپوپلی‌ساکارید، پروتئازها و لکوتوکسین ازجمله آن‌ها می‌باشد.[۶] در مطالعه مقایسه‌ای بین بافت‌ها و مایع شیار لثه‌ای افراد مبتلا به پریودنتیت با افراد سالم، سایتوکین‌های پیش التهابی، سایتوکین‌ها های تنظیمی، سلول‌های التهابی، نوتروفیل ها، لنفوسیت‌ها و ماکروفاژها در بافت‌های بیمار به مراتب بیشتر از بافت‌های سالم بوده است. مهم‌ترین سایتوکین‌های پیش التهابی IL-1α ، IL-1βو TNF-α می‌باشند که اثرات مشابه و سینرژیک دارند.[۷] پاتوژن‌های پریودنتال معمولاً بخش کوچکی از کل ۶۰۰ گونه باکتریایی شناخته‌شده هستند که می‌توانند بر روی سطوح دندانی و زیر کناره‌های لثه و غشاهای مخاطی دهان کلونیزه شوند. اکثر پاتوژن‌های پریودنتال بی‌هوازی

هستند، اما بیوفیلم می‌تواند زیستگاه هوازی‌های اختیاری، کاپنوفیل‌ها و میکروآئروفیل‌ها باشد و تعداد آن‌ها بستگی به محیط بیوفیلم ایجادشده و پاکت پریودنتال دارد.[۸] برخی گونه‌های باکتریایی که عضو فلور در محیط پریودنتال هستند مانند اکتینومایست‌ها، گونه‌های خاص استرپتوکوکوس و استافیلوکوکوس می‌توانند عفونت‌های فرصت‌طلبی را در صورت اختلال در سیستم ایمنی ایجاد کنند. بااین‌حال پریودنتیت تهاجمی موضعی (*Localized Aggressive Periodontitis*) به‌شدت با حضور آکتینوباسیلوس اکتینومایستم کومیتانس (*Actinobacillus actinomycetem comitans*)و کاپنوسیتوفاگا(*Capnocytophaga*)و ایکنلا کورودنس (*Eikenella corrodens*)مرتبط است (۹). باکتری‌های زیادی در ترکیب میکروبی پریودنتال دیده می‌شوند که مهم‌ترین آن‌ها عبارت‌اند از؛ پرووتلا اینترمدیا(*Proutlla Intermedia*)، تانرلا فورسیتا(*Tanrilla fresita*)، پورفیرومواناس ژنژیوالیس(*Porphyromonas gingivolis*)، کمپیلوباکتریوم رکتوس(*Campylobacter rectus*)، ایکنلا کورودنس(*Eikenla Currendens*)، فوزوباکتریوم نوکلئاتوم(*Fosobacterium nucleotide*)، اگریگاتوباکتراکتینومایستم¬کومیتانس (*Aggregated bacterial actinomycetes*)، پپتواسترپتوکوکوس میکروس(Peptoseptopococcus microscope)، ترپونما دنتیکولا (*Terpina danticula*)و سلنوموناس .(*Selenomonas*)شواهد نسبتاً قوی برای دیگر باکتری‌های ایزوله شده از میکروبیوتای زیرلثه‌ای مانند پرووتلا اینترمدیا(*Proutlla Intermedia*)، پرووتلا نیگرسنس(Campylobacterium rectus)، کمپیلوباکتر رکتوس(Campylobacter rectus)، پپتواسترپتوکوکوس میکروس(*Peptoseptopococcus microscope*)، فوزوباکتریوم نوکلئاتوم(*Fosobacterium nucleotide*)، یوباکتریوم نوداتوم(*Udobacterium Nodatum*)و اسپیروکت‌های مختلف مثل ترپونما دنتیکولا (*Terpina danticula*)جمع‌آوری‌شده، اگرچه نقش اتیولوژی آن‌ها کمتر شناخته‌شده است؛ بنابراین بیماری پریودنتال به عنوان یک عفونت چندمیکروبی در نظر گرفته می‌شود.[۱۰،۱۱]

استعداد ژنتیکی در بیماری پریودنتیت در حقیقت بر پایه تفاوت پاسخ های ایمنی و التهابی در مواجهه با عوامل محیطی استوار است. تولید و ترشح سایتوکاینها که یکی از بازوان ایمنی ذاتی و اکتسابی هستند در همه افراد یکسان نیست. [۴] جهش های تک نوکلئوتیدی (*SNP) Single nucleotide polymorphism*)) شایعترین نوع تغییر در ژنوم هستند. SNP زمانی رخ می دهد که یک نوکلئوتید با نوکلئوتید دیگری جایگزین می شود. *Kornman* و همکاران برای اولین بار به بررسی SNP ژن سایتوکین‌ها در بیماری پریودنتیت پرداختند.[۵] این محققین اعلام کردند که *SNP* ژن IL-1β در جایگاه +۳۹۵۴ و IL-1α در جایگاه ۸۸۹- در بروز بیماری پریودنتیت موثر می باشد. Dihel و همکارانش نیز SNP در IL-β و IL-1α را مرتبط با پریودنتیت بدست آوردند.[۶] تکنیک *Tetra-ARMs PCR (Tetra-primer amplification refractory mutation system–polymerase chain*) به معنی تشخیص وجود تغییرات تک نوکلئوتیدی (*SNP- Single-nucleotide polymorphism*) و پلی‌مورفیسمها در ژنوم به وسیله روش PCR می‌باشد و در این روش مهم‌ترین اصل در تفکیک الل دارای جهش و آلل فاقد جهش تکثیر شدن و یا عدم تکثیر یک توالی در واکنش PCR می‌باشد[۱۲]؛ بنابراین، هدف از مطالعه حاضر، شناسایی و توالی¬یابی باکتری‌های ایجادکننده پریودنتال و بررسی پلی¬مورفیسم ژنی سایتوکین التهابی (IL-6) در افراد مبتلابه پریودنتیت با روش TETRA ARMS-PCR در شهرستان کرمان در سال ۹۷-۹۶ می-باشد.

مواد و روش ها:

این مطالعه از نوع موردی- شاهدی بود. نمونه خون محیطی از ۵۰ بیمار که طبق نظر پزشک متخصص پریودنتیست مبتلا به

بیماری‌های پریودنتال بودند و ۵۰ نفر افراد سالم که سلامت آنها زیر نظر پزشک متخصص پریودنتیست محرز شده بود از مراجعه‌کنندگان به کلینیک دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی کرمان جمع‌آوری شدند. میانگین سنی بیماران ۱/۲۷±۵۲ سال و میانگین سنی افراد گروه کنترل ۰/۳۴±۴۸ سال بود و اختلاف دو گروه از لحاظ آماری معنی دار نبودند (P> ۰/۰۵) به منظور گرفتن نمونه‌های خون از افراد ۵ سی‌سی خون از هر فرد گرفته و در لوله حاوی EDTA ریخته و در دمای منفی ۲۰ درجه سلسیوس نگهداری شد. افراد سالم حین مراجعه برای خون‌گیری از لحاظ سابقه بیماری مورد پرسش قرار گرفتند و پس از اخذ رضایت‌نامه تمامی نمونه‌های خون جمع‌آوری گردید. معیارهای انتخاب افراد عبارت بودند از: (۱) حضور یک سایت با عمق پروبینگ (Probing depth-PD) بیشتر یا مساوی ۶ میلی‌متر (۲) عدم وجود بیماری سیستمیک (۳) عدم درمان با آنتی‌بیوتیک حداقل در ۶ ماه گذشته (۴) ایندکس لثه‌ای بالا (Gingival Index=2-3) (۵) وجود التهاب (۶) خونریزی بعد از پروبینگ بیشتر از ۳ میلی‌متر عمق [۱۱].

نمونه‌برداری از دهان

بعد از برداشت پلاک فوق لثه‌ای، یک کورت استریل پریودنتال را به آرامی داخل پاکت پریودنتال موردبررسی فروبرده و از پلاک زیر لثه‌ای با یک حرکت ضربه‌ای برداشته می‌شد.[۱۴] سپس نمونه‌های پلاک به لوله اپندروف حاوی ۵۰۰ میکرو لیتر بافر TE (10 mM Tris-hydrochloride, 1 mM EDTA, pH 8) انتقال داده شده و سپس توسط ورتکس هموژن گردید و نمونه‌ها تا قبل از آزمایشات بعدی در فریزر ۷۰- درجه سانتی‌گراد ذخیره شدند.

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

برای استخراج DNA از کیت استخراج DNA شرکت سینا کلون با نام CAT NO: PR881612CinnaPure-DNA CinnaPure-DNA (whole blood, serum and plasma),50 Preps استفاده شد و کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از دستگاه نانودراپ (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA) در OD=260/280=1.8-2nm آنالیز گردید. به منظور شناسایی سویه و جنس‌های مختلف باکتریایی از تکثیر قطعه مربوط به ژن ۱۶ S rRAN استفاده شد که پس از تکثیر این قطعه، محصول PCR سکانس شده و پس از BLAST در سایت https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi جنس و گونه باکتری شناسایی گردید.[۱۱] پس از ثبت و سفارش توالی پرایمرها توسط شرکت پیشگام (تهران)، صحت آن‌ها در سایت NCBI و با استفاده از نرم‌افزار BLAST مورد تائید قرار گرفتند. واکنش Tetra-primers Arms PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۰/۵ میکرولیتر PCR master mix 5X (سیناکلون، ایران) حاوی (0.05 Taq DNA polymerase (U/µl، MgCl2 (3 mM) و dNTPs (0.4mM)، یک میکرولیتر از هر یک از پرایمرها (F و R)، ۱ میکرولیتر از DNA الگو (۱۰ نانوگرم) و ۱۱/۵ میکرولیتر آب مقطر استریل با استفاده از گرادیانت ترموسایکلر (اپندورف، آلمان) با دناتوراسیون اولیه در ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه برای ۳۰ سیکل شامل؛ دناتوراسیون در ۹۴ درجه سلسیوس ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگرها در ۵۵ درجه سلسیوس برای ۵۰ ثانیه، بسط در ۷۲ درجه سلسیوس برای ۶۰ ثانیه و یک بسط نهایی ۷۲ درجه سلسیوس برای ۷ دقیقه در نظر گرفته شد.[۱۲] برای مشاهده پلی‌مورفیسم ژنومی، الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱/۵٪ در شرایط ۱۵۰ ولت در بافر ×1 TBE (یک برابر) انجام گردید.

توالی پرایمرهای مورد استفاده

نام پرایمر	توالی پرایمر ('۳→'۵)	طول قطعه
G allele	TTTCCCCCTAGTTGTGTCTTCCG	bp۱۹۹
C allele	TGCAATGTGACGTCCTTTAGCTTG	bp۲۷۵
Outer primer	F= 5'-TGTCAAGACATGCCAAAGTGCT(R= 5'-GGGCAGAATGAGCCTCAGACAT	bp۴۲۶
16s rRNA	F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' R: 5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3'	bp۱۱۰۰

تعیین توالی

پس از مشاهده باند اختصاصی، محصولات PCR به‌دست‌آمده به همراه پرایمرهای مورداستفاده به منظور ترادف‌یابی به شرکت Bioneer کره جنوبی ارسال گردید و نتایج سکانس نمونه‌ها توسط نرم‌افزار Sequencer آنالیز شد. [۱۲]

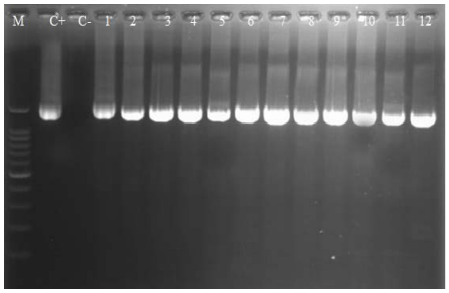
رسم درخت فیلوژنیک

برای بررسی قرابت ژنتیکی باکتری‌های شناسایی‌شده در دهان افراد مبتلا به بیماری‌های پریودنتال درخت فیلوژنی با استفاده نرم‌افزار MEGA 7 و روش نیبرجوئینگ (Neighbor Joining) و بوت استراپ (Boot Strap Method) ۱۰۰۰ ترسم گردید. آنالیز داده‌ها با استفاده از روش T-TEST انجام پذیرفت.

یافته ها:

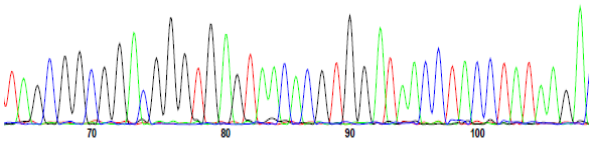
نتایج آزمون PCR

از تعداد۵۰ سوآپ دهانی گرفته‌شده از افراد بیمار تعداد ۱۵ جنس مختلف باکتری پس از تکثیر SrRNA ۱۶ و توالی یابی شناسایی شدند (شکل۱).



شکل۱- نتیجه آزمون تکثیر 16S rRNA. (M؛ DNA size lader 100 bp فرمنتاز، C+، سویه باکتریایی، C-؛ آب مقطر و چاهک‌های شماره ۱ تا ۷ نمونه‌های به‌دست‌آمده از بیماران و ۱۲-۸ نمونه های افراد سالم)

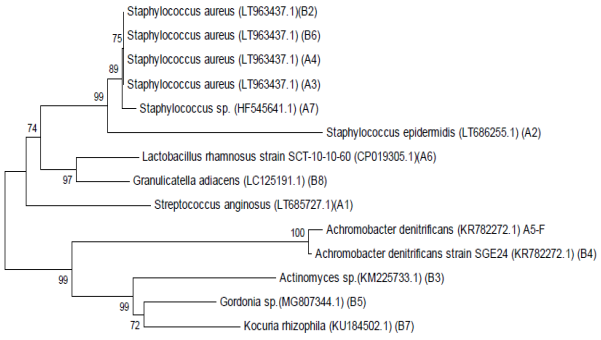
تعیین توالی نتایج حاصل از آمپلی فیکاسیون ژن 16S Rrna به منظور شناسایی ملکولی باکتری‌های دخیل در بیماری‌های پریودنتال نمونه‌های تکثیر یافته از ژن۱۶S rRNA برای سکانس ارسال شد و نتیجه سکانس جهت شناسایی بلاست گردید. نمونه ای از سکانس مربوط به شناسایی سویه های باکتری در شکل ۲ آورده شده است.



شکل ۲- نتیجه سکانس مربوط به شناسایی سویه های باکتری

بررسی قرابت ژنتیکی سویه‌های باکتری

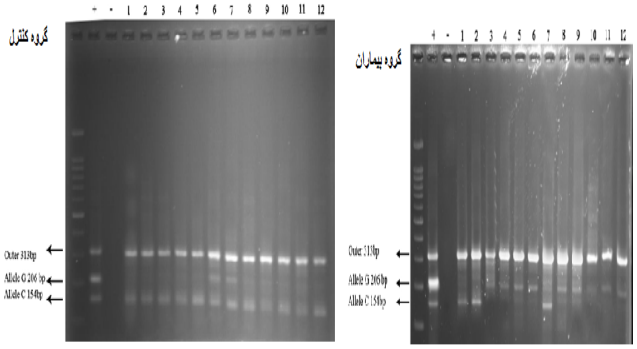
پس از انجام توالی یابی، مقایسه هم‌ردیفی در پایگاه NCBI BlastN انجام شد. شکل ۳ نشان‌دهنده ارتباط فیلوژنی ایزوله‌های مذکور و باکتری‌های مرجع موجود در GenBank می‌باشد. اعداد واقع در محل گره شاخه هادر درخت فیلوژنی نمایانگر درصد Bootstrap confidence levels می‌باشند. پس از بلاست در مجموع باکتری هایی از جنس استافیلوکوکوس، لاکتوباسیلوس، استرپتوکوکوس، آکروموباکتر، گرانولیکاتلا آدیاسنس (Granulicatella adiacens)، گوردونیا (Gordonia) و کوکوریا ریزوفیلا (Kocuria rhizophila) شناسایی گردید.



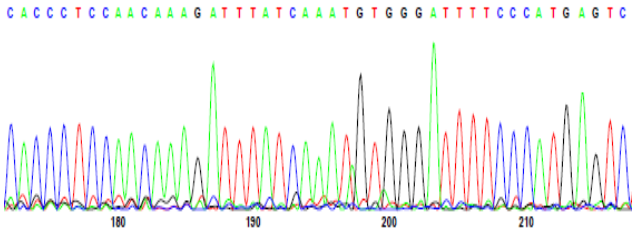
شکل ۳- درخت فیلوژنی، نشان‌دهنده ارتباط بین توالی‌های 16S rRNA ایزوله‌های موردمطالعه

نتایج آزمون Tetra Arms-PCR برای ژن IL-6

نتایج مطالعه در گروه بیمار نشان داد ۳۹ نمونه هموزیگوت برای آلل C، ۹ نمونه هموزیگوت برای آلل G و دو نمونه حالت هتروزیگوت را داشتند. نتایج گروه کنترل نشان داد که ۴۸ نمونه حالت هموزیگوت برای آلل C و ۲ نمونه حالت هتروزیگوت را داشتند (شکل ۴). همچنین نتایج تعیین توالی در شکل ۴ نشان داده شده است.[۵]



شکل ٤. نتیجه آزمون Tetra-Arms PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵٪ (M: DNA size ladder 100 bp فرمنتاز، +C: سویه باکتریایی، C-: آب مقطر و چاهک‌های شماره ۱ تا ۱۲ نمونه‌های به‌دست‌آمده از بیماران و افراد سالم)



شکل ۵- نتیجه سکانس مربوط به ژن IL6

نتایج آنالیز آماری نشان داد که جمعیت مورد مطالعه در تعادل هاردی-واینبرگ(HWP) قرار ندارد.

فرکانس الل‌ها و ژنوتیپ در یک جمعیت از نسلی به نسل دیگر ثابت و در تعادل نیست و ارتباط معنی‌داری بین گروه بیمار با گروه کنترل وجود دارد. نتایج آنالیز آماری در جدول ۱، ۲ و ۳ نشان داده‌شده است. میزان Odd ratio یا OR در بررسی رابطه معناداری SNP موردمطالعه در میان دو گروه ۰/۰۸۲ به دست آمد.

جدول ۱-فرکانس آللی در گروه بیمار (A) و گروه کنترل (B)

آلل	A			B		
	C	G	مجموع	C	G	مجموع
مقدار	۸۰	۲۰	۱۰۰	۹۸	۲	۱۰۰
فراوانی	۰/۸۰۰	۰/۰۲۰	۱	۰/۹۸۰	۰/۰۲۰	۱

جدول ۲- فرکانس ژنوتیپی در گروه بیمار (A) و گروه کنترل (B)

ژنوتیپ	A					B				
	C/C	C/G	G/G	N/N	مجموع	C/C	C/G	G/G	N/N	مجموع
Obs. count	۳۹	۲	۹	۰	۵۰	٤۸	۲	۰	۰	۵۰

جدول ۳- بررسی رابطه معناداری SNP موردمطالعه و بیماری‌های پریودنتال

ID	X^2	P-value	OR	lower CI or OR	Higher CI or OR
IL-6	۱۶/۵۴۷	E-5۴/۷۴۵	۰/۰۸۲	۰/۰۱۹	۰/۳۶

بحث

در این مطالعه، پس از تعیین توالی، باکتری‌هایی از جنس استافیلوکوکوس، لاکتوباسیلوس، استرپتوکوکوس، آکروموباکتر، گرانولیکاتلا آدیاسنس، گوردونیا و کوکوریا ریزوفیلا در بیماران مبتلا به پریودنتیت یافت شدند. همچنین در مقایسه با گروه کنترل، رابطه معنی‌داری بین ژنوتیپ G/G در G/C ۱۷۴- در بیماران پریودنتال مشاهده شد. ($p<۰/۰۵$) در مطالعه ای که باهدف جداسازی گونه‌های اکتینومایسس و تعیین نقش آن‌ها در عفونت پریودنتال انجام شد، صد بیمار مبتلا به عفونت پریودنتال موردبررسی قرار گرفتند که سه نمونه مثبت شامل یک‌گونه اکتینومایسس ویسکوزوس و دو گونه اکتینومایسس نیوزلندی از بیماران با علائم ژنژیویت و پریودنتیت به دست آمد.[۱۳] در مطالعه غلیانی و همکاران استرپتوکوکوس میتیس غالب‌ترین گونه استرپتوکوکوس در پلاک‌های میکروبی در بیماران ژنژیویت بود.[۱۴] قنبری و همکاران مطالعه‌ای به منظور بررسی مولکولی آلودگی به کمپیلوباکتر رکتوس در ضایعات پریودنتال بیماران مراجعه‌کننده به کلینیک دندانپزشکی دانشگاه تهران انجام دادند، نمونه‌گیری از ۴۰ نفر از بیماران انجام شد. یافته‌های این تحقیق ضمن تأیید حضور کمپیلوباکتر رکتوس در درصد قابل‌توجهی از نمونه‌های حاصل از موارد پریودنتیت نشان داد که از روش PCR می‌توان به عنوان روشی سریع و آسان در تشخیص این باکتری در نمونه‌های بالینی بهره برد.[۱۵] در پژوهش حاضر در مجموع باکتری‌هایی از جنس استافیلوکوکوس، لاکتوباسیلوس، استرپتوکوکوس، آکروموباکتر، گرانولیکاتلا آدیاسنس، گوردونا و کوکوریا ریزوفیلا در بیماران یافت شدند که بعضی از این باکتری‌ها در پژوهش‌های دیگر نیز گزارش‌شده‌اند و برخی نیز برای نخستین بار در بیماری‌های پریودنتال گزارش شده اند. در این مطالعه در راستای مطالعه Ghanbari و همکاران روش PCR و تعیین توالی به عنوان روشی بسیار دقیق، سریع و مطمئن به منظور شناسایی هرچه سریع‌تر و دقیق‌تر جنس و سویه باکتری‌های دخیل در بیماری‌های مختلف ازجمله بیماری‌های پریودنتال شناخته شد.[۱۵]

اینترلوکین ۶ سایتوکاین چند عملکردی می‌باشد که در فعالیت‌های مختلفی از قبیل تمایز و فعال‌سازی ماکروفاژ ها و لنفوسیت‌های T، تکامل و تمایز لنفوسیت‌های B، تحریک سنتز کلاژن و گلیکوزآمین‌گلیکان‌ها، تولید فیبروبلاست و تکثیر سلول‌های اپی‌تلیال اثر دارد. علاوه بر نقش باکتری‌ها و دیگر فاکتورهای محیطی در بیماری‌های پریودنتال، شواهد بسیاری مبنی بر نقش عوامل ژنتیکی در این بیماری وجود دارد. جهش در نوکلئوتید ۱۷۴ ژن اینتر لوکین۶ IL-6(174G/C) ،پلی-مورفیسمی است در ناحیه پروموتور ژن که می‌تواند بر روی بیان این اینترلوکین تأثیر بگذارد. مطالعات مختلفی نشان داده‌اند که این پلی‌مورفیسم رابطه معناداری با بیماری‌های پریودنتال دارد.[۱۶] Babel و همکاران در پژوهشی در آلمان درباره تأثیر این پلی‌مورفیسم و تأثیر آن در بیماری‌های پریودنتال رابطه معناداری را پیدا کردند (۱۷). در این مطالعه رابطه معناداری بین پلی‌مورفیسم IL6-174G/C و بیماری‌های مزمن پریودنتال مشاهده شد. در پروموتور ژن IL-6 چهار پلی‌مورفیسم 174G/C-، 572G/C-، 373AnTn- و 579G/C- شناسایی‌شده است که مطالعات نشان می‌دهد پلی-مورفیسم 174G/C- بر روی تولید پروتئین اثرگذار است. Trevilatto و همکاران نیز رابطه معناداری بین پلی‌موفیسم -174G/C و بیماری‌های مزمن پریودنتال در یک جمعیت برزیلی مشاهده کردند. نتایج این محققین نشان داد که ژنوتیپ GG می‌تواند منجر به بیماری‌های پریودنتال شود درحالی‌که آلل C منجر به کاهش بیان IL-6 بعد از دریافت سیگنال‌های تحریک‌کننده التهابی می‌شود و یک نقش حفاظتی در پیشرفت بیماری دارد.[۱۸] در پژوهش حاضر نیز مشاهده شد که رابطه معناداری مابین حضور ژنوتیپ G/G و بیماری‌های پریودنتال وجود دارد. در مطالعه حاضر فرکانس آلل G در افراد بیمار ۲۰ درصد و در افراد سالم ۲ درصد گزارش شد که نشان‌دهنده

رابطه معناداری بین حضور آلل G و بیماری‌های پریودنتال می‌باشد. (P<۰/۰۱)

نتیجه‌گیری

پژوهش حاضر علاوه بر تعیین باکتری‌های مهم در ایجاد و توسعه بیماری پریودنتال به بررسی اثرات پلی‌مورفیسم‌های مختلف ژنتیکی بر روی این بیماری نیز پرداخته است. پلی-مورفیسم در ژن کد کننده IL-6 رابطه معناداری را بین وجود آلل G در موقعیت ۱۷۴- و ژنوتیپ GG را با بیماری‌های مزمن پریودنتال نشان می دهد. بدیهی است که به منظور اطمینان کامل از دخیل بودن این پلی‌مورفیسم در بیماری‌های پریودنتال نیاز به مطالعات گسترده‌تر می‌باشد زیرا که درک اساس ژنتیکی بیماری‌های پریودنتال ممکن است کمک بزرگی در تشخیص و درمان این بیماری‌ها بکند.

تقدیر و تشکر

بدین‌وسیله از تمامی کارکنان کلینیک دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی کرمان و بیماران و افراد سالم مراجعه‌کننده به کلینیک دندانپزشکی و کارکنان محترم آزمایشگاه تحقیقاتی پاسارگاد که ما را در این مجموعه یاری رساندند صمیمانه تقدیر و تشکر به عمل می‌آید.

References:

1. Bissett G. Periodontal disease and systemic health–a summary. Dental Nursing 2018 2; 14(6):296-7.
2. Machado V, Botelho J, Amaral A, Alves R, Proenca L, Mendes JJ,et al. Delgado A. Prevalence of periodontal disease in a Portuguese population. In annals of medicine 2018; 50: s73-s73.
3. Cengiz Mİ, Zengin B, İçen M, Köktürk F. Prevalence of periodontal disease among mine workers of Zonguldak, Kozlu District, Turkey: a cross-sectional study. BMC public health 2018;18(1):361.
4. Ebadian A, Radvar M, Arab H, TavakkolAfshari J, Sargolzaei N, Gharegozloo S, Brook A, Shirkhani M. Analysis of Proinflammatory Cytokines Gene Polymorphisms in Generalized Aggressive Periodontitis (GAgP). Journal of Mashhad Dental School 2009;33(3):231-40.
5. Kornman KS, Crane A, Wang H-Y, di Giovine FS, Newman MG, Pirk FW, et al. The interleukin-1 genotype as a severity factor in adult periodontal disease. J Clin Periodontol 1997; 24(1): 72-7.
6. 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.
7. Albuquerque BN, Araújo MM, Silva TA, Cota LO, Cortelli SC, Costa FO. Periodontal Condition and Immunological Aspects of Individuals Hospitalized in the Intensive Care Unit. Brazilian dental journal 2018;29(3):301-8.
8. McCuaig R, Wong D, Gardiner FW, Rawlinson W, Dahlstrom JE, Robson S. Periodontal pathogens in the placenta and membranes in term and preterm birth. Placenta 2018 ;68:40-3.
9. Oliveira RR, Fermiano D, Feres M, Figueiredo LC, Teles FR, Soares GM, et al. Levels of candidate periodontal pathogens in subgingival biofilm. Journal of dental research 2016;95(6):711-8.
10. Haraszthy VI, Zambon JJ, Trevisan M, Zeid M, Genco RJ. Identification of periodontal pathogens in atheromatous plaques. Journal of periodontology 2000; 71(10):1554-60.
11. Rezaei F, Chalbi M, Moghimi S, Maghareh Abed A, Faghri J. The Prevalence of Anaerobic bacteria in patients with periodontitis Yafteh.2009:10 (2); 13-19.
12. Hashemi M, Moazeni-roodi A, Bahari A, Taheri M. A tetra-primer amplification refractory mutation system–polymerase chain reaction for the detection of rs8099917 IL28B genotype. Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids 2012; 31(1):55-60.
13. Eshraghi S, Salari MH, Kadkhoda Z, Yaghmaei S. Isolation and characterization of oral Actinomyces strain from patients with periodontal disease. Journal of Dental Medicine 2001; 14(3):21-9.
14. Ghalaiani M, Azadeh R, Kasra Kermanshahi MZ. Frequency of *Streptococcus mitis* in microbial plaque associated with gingivitis disease and the effect of β-lactam antibiotics on this bacterium. Journal of Isfahan Dental School 2010; 6(3): 203-206.
15. Ghanbari R, Harzandi N, Abadi, Dolat S. Molecular detection of Campylobacter rectus infection in periodontal lesions referring to dental clinic of Tehran University. Biotechnol Tarbiat Modares Univ 1395; 2(7):20–30.
16. Sanchooli, Tayebeh Heidari, Zahra Mahmoudzadeh-Sagheb, Hamidreza Hashemi M, Rigi-Ladez Mohammadayub. The Relationship between Interleukin-6 -174 G/C Gene Polymorphism and Chronic Periodontitis. Zahedan Univ Med Sci 2012;14(3):13–7.
17. Babel N, Cherepnev G, Babel D, Tropmann A, Hammer M, Volk HD, et al. Analysis of tumor necrosis factor-α, transforming growth factor-β, interleukin-10, IL-6, and interferon-γ gene polymorphisms in patients with chronic periodontitis. Journal of periodontology 2006; 77(12):1978-83.
18. Trevilatto PC, Scarel-Caminaga RM, de Brito Jr RB, De Souza AP, Line SR. Polymorphism at position− 174 of IL-6 gene is associated with susceptibility to chronic periodontitis in a Caucasian Brazilian population. Journal of clinical periodontology 2003; 30(5):438-42.