بررسی نقش سلول های ماکروفاژ در التهابات کانال دندانی

دکتر سیامک صندوقچیان[#1] ، دکتر هایده مبین [1] ، دکتر لیلا سادات حاتم نژاد[2]

۱- گروه میکروبیولوژی، واحد تبریز ،دانشگاه آزاد اسلامی،تبریز، ایران

۲- استادیار گروه اندودنتیکس، دانشکده دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز

خلاصه:

سابقه و هدف: پالپیت یک بیماری التهابی دندانی است که با تجمع مدیاتورهای التهابی مانند سیتوکائین ها کموکائین ها شناخته می شود که بیشتر بدلیل عفونتهای باکتریایی استرپتوکوک می‌باشد. هدف از این مطالعه تعیین میزان بیان IL36γ بر روی سلول های ماکروفاژی استخراج شده از بافت ملتهب پالپ دندان و بررسی عوامل افزایش دهنده التهاب پالپ دندان بوسیله IL36γ میباشد. **مواد و روش ها:** در این مطالعه مورد- شاهدی از ۲۵بیمار نمونه های بافت پالپ سالم از دندان عقل کشیده شده ونمونه های بافت ملتهب از دندان های دارای پالپیت برگشت ناپذیر حین پالپکتومی بدست آمد. سلولهای ماکروفاژ بعد از استخراج بوسیله پروتئین‌های TLR4 بصورت تایمر تحریک شده و با تریزول mRNA سلولی استخراج شدند و سپس با استفاده از دستگاه Real Time PCR میزان IL36γ در سلولهای ماکروفاژ تحریک شده مورد بررسی قرار گرفت. بررسی آماری با استفاده از آزمون one way ANOV و آزمون تعقیبی TUKEY انجام شد.

یافته ها: نتایج نشان داد که میزان سایتوکایین در بافت ملتهب بیشتر از بافت سالم پالپ بوده (۴۳/۰۹ و۱۸/۲۱ pg/ml) همچنین نتایج استخراج mRNA سلولهای کشت شده بعد از تحریک با TLR4 نشان داد که بعد از ۱۲ ساعت تحریک با TLR4 میزان بیان IL36 γ افزایش چشمگیری نسبت به سایر ساعات داشت. (P<۰/۰۰۱)

نتیجه گیری: به نظر می رسد در موارد التهاب پالپ دندان IL36γ از سلول های ماکروفاژی تحریک شده تولید می شود.

واژه های کلیدی: رسپتور ایمنی ذاتی, پالپیت و اینتر لوکین ۳۶ گاما

وصول مقاله: ۹۵/۵/۳۰ اصلاح نهایی: ۹۵/۱۲/۱۶ پذیرش مقاله: ۹۵/۱۲/۱۸

مقدمه:

پالپیت یک بیماری التهابی بافت پالپی دندانی است که با تجمع مدیاتورهای التهابی مانند سیتوکائین ها و کموکائین ها شناخته می شود که بیشتر بدلیل عفونتهای باکتریایی استرپتوکوک می‌باشد.[1] استرپتوکوک موتانس، گونه‌ای از استرپتوکوک است که فلور نرمال دهان و سیستم تنفسی فوقانی در انسان می‌باشد. این باکتری به عنوان بیماریزای فرصت طلب شناخته می‌شود و در صورت راهیابی به جریان خون، موجب سپتی سمی در بیماران مبتلا به نوتروپنی می‌شود.[2] استرپتوکوک موتانس در حضور سوکروز در محیط کشت، کپسول تولید می‌کند. سایتوکائین‌ها و کموکائین‌ها باعث بیان و تحریک یکسری عوامل سلولی می شود که نقش فعالی در پروسه های تخریب و ترمیم بافت پالپی دارند. [3] IL-36جزسایتوکایین های است که عملکردی شبیه IL-1 دارد و مهمترین عملکرد آن در کنترل پاسخهای Th-17 می‌باشد. [4] IL-36α و IL-36β نقش مهمی را در التهابات ایجاد نمی کنند ولی مطالعات قبلی نشان داده است که IL-36γ بر روی التهابات نقش عمده ای دارد ولی نقش آن در التهابات دندانی مطالعه نشده است. [4] مطالعات اخیر نشان داده است که IL-36γ با رسپتورهای ایمنی ذاتی بخصوص رسپتورهای Toll Like ارتباط داشته و می‌تواند بوسیله آنها بیان گردد. این گیرنده‌ها شبیه به پروتئینی هستند که توسط ژن Drosophila Toll کد می‌شوند.[5] گیرنده‌های شبه زنگوله‌ای عمدتا بر روی سلولهای سیستم ایمنی ذاتی بیان می‌شوند. البته این گیرنده‌ها در بافت‌های پریودنتال نیز شناسایی شده‌اند. پاتوژنها از طریق اتصال به اینتگرین و با تکثیر خود و در حالیکه از مکانیسم‌های

نویسنده مسئول مکاتبات: دکتر سیامک صندوقچیان تلفن:۰۴۱۳۳۸۶۷۸۰۷ پست الکترونیک: dr.sandoghchian@iaut.ac.ir

حفاظتی میزبان پنهان مانده اند، سلولهای اپیتلیال لثه را مورد تهاجم قرار دهند. [۶] گیرنده های شبه زنگوله ای موجود بر سلولهای اپیتلیال لثه میتوانند ریز ساختارهایی که به فراوانی در پاتوژنها وجود دارند، را شناسایی کنند.[۷] هدف از این مطالعه بررسی میزان بیان IL36γ بر روی سلول های ماکروفاژی استخراج شده از بافتهای التهابی کانال دندانی و بررسی عوامل افزایش دهنده التهاب در کانال دندانی بوسیله IL36γ بود.

مواد و روش‌ها:

تحقیق با طراحی مورد- شاهدی انجام گرفت. گروه مورد افراد مبتلا به پالپیت و گروه شاهد افراد سالم بودند. مطالعه فوق در کمیته اخلاق دانشکده مطرح و با کد IR.IAU.TABRIZ.REC.1395.4 مورد تائید قرار گرفت.

نمونه های بافتی از داخل کانال دندانی بعد از گرفتن رضایت نامه از ۲۵ بیمار که به کلینیک دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز مراجعه کرده بودند انجام شد. نمونه های بافتی سالم از دندان عقل حذف شده بدست آمدونمونه های بافت ملتهب از دندان های دارای پالپیت برگشت ناپذیر حین پالپکتومی بدست امد. نمونه های بافتی پالپی کاملاً بصورت آسپیتک استخراج شده و در محلول بافر Hanks در تیوبهای پلاستیکی ۱۰ میلی متری قرار داده شد. نمونه ها برای تشخیص عامل باکتریایی به آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه آزاد تبریز فرستاده شده و از نظر باکتری استرپتوکوکوس موتانس کشت داده شد. بیماران مبتلا به دیابت، هپاتیت، بیماری‌های اتوایمیون نظیر لوپوس اریتروماتوز سیستمیک و آرتریت روماتوئید و نیز بیماران دارای ضایعات اندودنتیک و بیمارانی که تحت درمان ارتودنتیک قرار گرفته بودند و در نهایت بیمارانی که طی دو هفته گذشته آنتی‌بیوتیک مصرف نموده بودند، از مطالعه خارج شدند. به منظور کاهش التهاب و دستکاری بیش از حد، بیمارانی انتخاب شدند که یک ایمپلنت تک دندانی خلفی دریافت کرده و دندان متناظر ایمپلنت در سمت مقابل دهان هیچ رستوریشن مستقیم یا غیر مستقیم و درمان ترمیمی با آمالگام نداشت. بیماران سیگاری و نیز نمونه هایی که از دهان شویه های گوناگون مصرف می کردند از مطالعه حذف شدند. برای نمونه های سالم بخاطر رعایت اصول اخلاق پزشکی و پژوهشی بافت دندان های عقلی که کشیده شدند استفاده شد.[۳]

بافت در داخل محیط کشت Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM) توسط کاتر جراحی شماره ۱۰ به چند قطعه بریده شد و ذرات بریده شده به همراه آنزیم کلاژناز ۱۰ درصد وارد فالکون شدند و به مدت ۸ ساعت داخل یخچال قرار گرفته و پس از سانتریفوژ و جدا شدن آنزیمها و بافت های لیز شده محتوی فالکون در زیر هود وارد فلاسک کوچکی شدند. سلول ها ی ماکروفاژ توسط فلوسایتومتری و با مارکر CD14 شمارش شدند. [۳،۴]

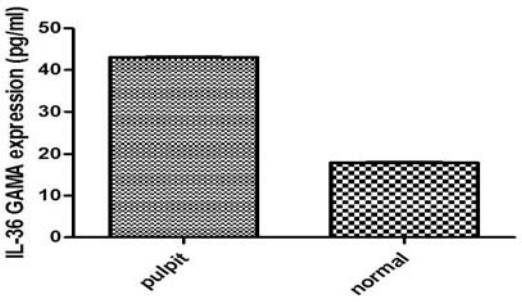
سلولها بوسیله پروتئین های TLR4 بصورت تایمر بمدت ۲ ، ۴ ، ۸ و ۱۲ و ۲۴ ساعت تحریک شده و بعد از استفاده از روش تریزول (mRNA) سلولی استخراج شده و سپس با استفاده از دستگاه Real Time PCR میزان Th17 , IL36γ در سلولهای ماکروفاژ تحریک شده مورد بررسی قرار گرفتند.

در مطالعه حاضر میزان سایتوکایین IL36 γ در مایع سوپرناتانت کشت سلولی بوسیله کیت شرکت ebioscinece طبق راهنمای کیت، مورد سنجش قرار گرفت. بعد از پارافینه شدن سلولها، نمونه ها در داخل بافر بلوکه کننده به مدت یک ساعت قرار داده شد و آنتی بادی اولیه anti-IL17 , anti-CD_4 به مدت ۲ ساعت در دمای اطاق بر روی نمونه ها قرار گرفت بعد از شستشو، آنتی بادی ثانویه بمدت یک ساعت اضافه شد و بعد از انکوبه کردن و شستشو، مقدار ۵۰μL از hochest روی اسلایدها ریخته و با میکروسکوپ ایمونوفلورسانس بررسی گردید. [۳] جهت آنالیز داده های مطالعه از نسخه SPSS=17 استفاده شد. مقایسه دو به دو گروه‌ها با آزمون تعقیبی و جهت مقایسه میزان زمان تحریک سلول‌ها از آزمون one way ANOVA وتست تعقیبی

TUKEY استفاده شد. برای اندازه گیری الایزا از نرم افزار curve export استفاده گردید.

یافته ها:

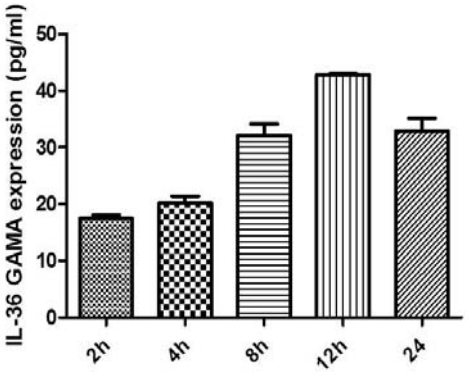
نتایج نشان داد که میزان سایتوکایین در گروه بیمار بیشتر از قسمت سالم بافت بوده (۴۳/۰۹ و۱۸/۲۱ پیکوگرم بر میلی‌لیتر) (نمودار۱)



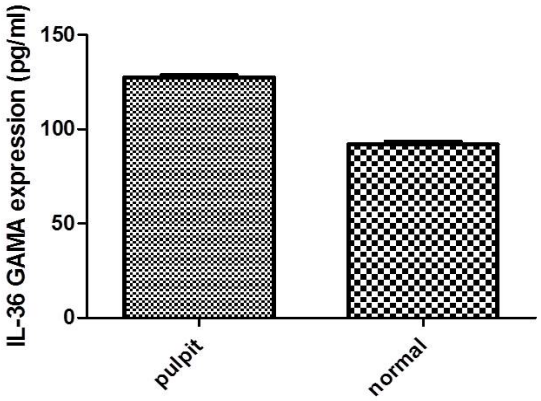
نمودار ۱- میزان سایتو کایین IL36Y بر حسب گروه های مورد مطالعه

همچنین نتایج استخراج mRNA سلولهای کشت شده بعد از تحریک با TLR4نشان داد که بعد از ۱۲ ساعت تحریک با TLR4میزان بیان IL36 γ افزایش چشمگیری نسبت به سایر ساعات داشت. (P <۰/۰۰۱) (نمودار ۲)

این نتیجه نشان‌دهنده وجود رابطه‌ای بین TLR4 که لیگاندش lps می‌باشد را با سایتوکایین های پیش التهابی نشان داد. نتایج الایزا نشان داد که میزان IL36 γ در سوپرناتانت سلولهای کشت شده قسمت پالپیت بیشتر از قسمت سالم بافت میباشد که حاکی از نفوذ سلولهای التهابی و سایتوکایین های التهابی به بافت مذکور می‌باشد. (نمودار ۳)

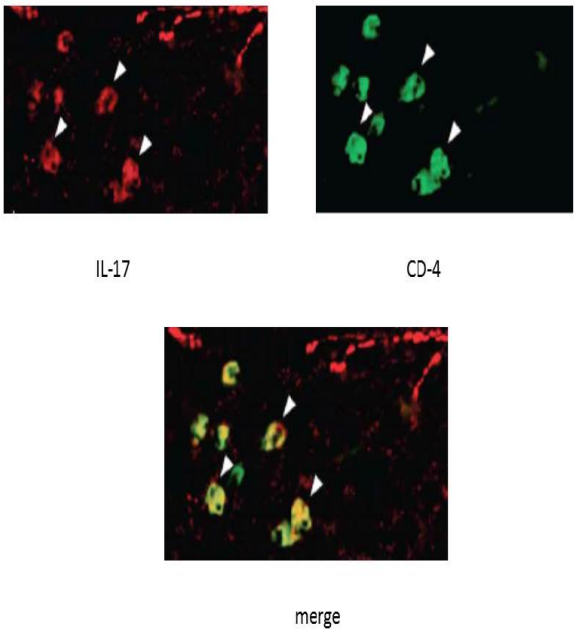


نمودار ۲- میزان IL36 بر حسب زمان پیگیری

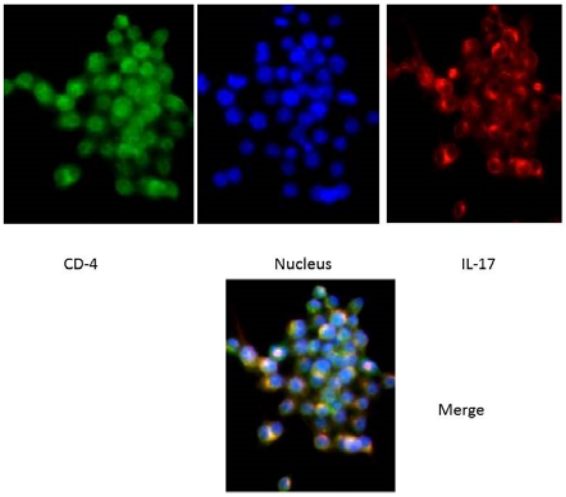


نمودار ۳- میزان بیان IL-36 گاما بر اساس الایزا

برای بررسی نفوذ سایتوکاینهای التهابی و همچنین برای نشان دادن وجود مکانیسم التهاب در پالپیت از آنتی بادی های نشان دار IL-17, CD4 بروش ایمونوفلورسانس استفاده شد. نمودار ۳ نشان میدهد که میزان نفوذ TH17 در بافت پالپیت نسبت به بافت سالم اطراف آن بیشتر میباشد همچنین این روند در کشت سلول نیز انجام گرفت که همان نتیجه را نشان داد.(شکل ۱ و ۲)



شکل ۱ - میزان نفوذ TH17 در بافت پالپیت نسبت به بافت سالم



شکل ۲- نفوذ IL-17 به سلولهای تحت درمان

بحث:

پالپ دندان، بافت همبند بسیار پویائی است که به تحریکات خارجی به شکل‌های مختلفی پاسخ می‌دهد.[۸] نقش سلول‌های موجود در پالپ و گردش خون بسیار با اهمیت است.[۹] سلول‌های T، حدود ۷۰-۶۰ درصد لنفوسیت‌های گردش خون را تشکیل می‌دهند که به زیرگروه های +CD4و +CD۸ تقسیم می‌شوند. سلول‌های $TCD4^{+}$، تحت عنوان T-helper و سلول‌های $T\ CD8^{+}$، تحت عنوانc T-cytotoxic نامیده شده‌اند.[۱۰] اخیراً زیرگروه جدیدی از سلول‌های CD4+T کشف شده‌اند، که بسیاری ازنارسایی‌ها و تناقضات مربوط به مدل Th1/Th2 را برطرف می‌سازد و با توجه به سایتوکین التهابی ویژه آن به نام IL17، از آن تحت عنوان Th17 یاد می‌شود. [۱۱] در مورد عملکرد آن که حفاظتی است یا تخریبی هنوز ابهاماتی وجود دارد. با این همه بسیاری از مطالعات، اثر تخریبی و زیانبار Th17 و خصوصاً IL17 را در بیماری‌های خود ایمنی التهابی آشکار ساخته اند. [۱۲] عملکرد اصلی IL17 تقویت پاسخ ایمنی با تحریک و ترشح کموکین‌ها و سایتوکین‌ها و مارکرهای سطح سلولی است. این اینترلوکین در آغاز و ماندگاری پاسخ ایمنی نقش محوری دارد. [۱۳] عامل رشدی تغییر شکل دهنده (TGFβو IL6) برای آغاز عملکرد IL17 ضروری است، در حالی که IL23 باعث افزایش عملکرد IL17 می‌شود. [۱۴] پالپ دندان با سلول های سیستم ایمنی بدن مجهز شده است .التهاب پالپ مزمن به احتمال زیاد توسط آنتی ژن های باکتری که از طریق توبولهای عاجی به پالپ منتشرشده است بوجود می‌آید. TLR4 در لایه سلولی دندان و مناطقی که با عروق خونی در سطوح مختلف دندان در تماسند و دندانهای سالم تحت تاثیر پوسیدگی بیان می شود. TLR4 را می توان با تحریکات از LPS و عصاره استرپتوکوکوس موتانس افزایش داد. [۱۵] Yu Suna با مطالعه در مورد اثر IL36 بر روی التهابات ریه به این نتیجه رسید که این سایتوکایین سلولهای پیش التهابی را فعال می‌کند.[۱۶] در مطالعه دیگری مشخص شد که انواع سلول های ایمنی بدن در طول پوسیدگی دندان تغییر می‌یابد.[۱۷]

در مطالعه دیگری استدلال شد که آنتی ژن های مرتبط با عوامل بیماری زای پوسیدگی ترجیحا ممکن است در طول حمله پوسیدگی انواع مختلف سلول های ایمنی بدن استخراج شود.[۱۸] در تحقیقی دیگر مشخص شد که در ضایعات پوسیدگی دندانی، به احتمال زیاد تغییر از استرپتوکوک موتانس در پوسیدگی کم عمق به لاکتوباسیلوس کازئی در ضایعات عمیق پوسیده اتفاق میافتد.[۱۹]

جدول ۱ - بررسی نقش رسپتورهای ایمنی، التهاب کانال دندانی

شاخص های / گروه ها	پالپیت	پالپ سالم	Pvalue
رسپتورهای ایمنی			
سایتوکایین36-IL گاما	۴۳/۰۹±۳/۲	۱۸/۲۱± ۱/۰۹	P<۰/۰۰۱
الفا IL-36	۲۳/۰۱± ۱/۴	۲۱/۲۱± ۱/۰۶	P>۰/۰۰۵
بتا IL-36	۱۳/۰۱± ۱/۸	۱۲/۲۱± ۱/۰۷	P>۰/۰۰۵

مطالعات بر روی IL-36γ نشان داده است که TLR4 می‌تواند IL-36γ را زیاد کند. به طور کلی عوامل متعددی در پاتوژنز ضایعات پالپی نقش دارند. [۱۶-۱۹] موسوی و همکاران در

سال ۲۰۰۶ وجود Natural Killer Cell (NKC) ها را در پالپ ملتهب اثبات کردند، در حالی که در پالپ نرمال این سلول‌ها یافت نشده بودند.[۲۰] افزایش IL17 هم تائیدی دیگر بر این ادعاست که در پالپ ملتهب، عوامل پاتوژنیک و پیش التهابی افزایش معنی‌داری پیدا می‌کنند. با توجه به مطالعات گذشته و مطالعه حاضر مشخص شد که در پالپیت، رسپتورهای سیستم ایمنی نقش فعالی در افزایش سایتوکاین‌های پیش التهابی و التهابی شده و به طبع آن میتوانند باعث افزایش IL-36 گاما را نیز بکنند با توجه به مطالعات قبلی IL-36 الفا و بتا نقشی در التهابات ندارند. این مطالعه اولین مطالعه‌ای میباشد که نقش رسپتورهای ایمنی را در التهابات کانال دندانی نشان می‌دهد.

نتیجه گیری: در موارد التهاب کانال دندانی IL36γ از سلول های ماکروفاژی تحریک شده، تولید می شود.TLR4 بر روی بیان رسپتور IL36γ نقش دارد.اثر TLR4بر روی بیان رسپتور IL36γ بر روی سلول های ماکروفاژی پالپ دندان در زمانهای مختلف یکسان نیست.

سپاسگذاری: این مقاله از طرح تحقیقاتی با بودجه پژوهشی و حمایت مالی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز به انجام رسیده استخراج شده است.

References:

1.Karapanou V, Kempuraj D, Theoharides TC. Interleukin-8 is increased in gingival crevicular fluid from patients with acute pulpitis. J Endod 2008; 34(2): 148-51

2. Ricucci D, Loghin S, Siqueira JF Jr. Correlation between clinical and histologic pulp diagnoses. J Endod 2014; 40(12): 1932-39

. 3.Allareddy V, Rampa S, Lee MK, Allareddy V, Nalliah RP. Hospital-based emergency department visits involving dental conditions: profile and predictors of poor outcomes and resource utilization. J Am Dent Assoc 2014; 145(4): 331-7

4. Hughes RM. Strategies for cancer gene therapy. *J surg Onco*l. 2004; 85(1):28-35.

5. Eshghyar N, Asgari M, Rahrotaban S, Monshizadeh R. The immunohistochemical study of angiogenesis in normal oral mucosa and oral lichen planus by CD34 and DC105 markers. J Res Dent Sci 2016, 13(1): 36-42

6. Kowalczyk DW,Wysocki PJ,Mackiewicz A. Cancer immunotherapy using cells modified with cytokine genes. *Acta biochim Pol* 2003; 50(3); 613-24.

7.Zarour HM, Ferrone S. Cancer immunotherapy: Progress and challenges in the clinical setting. *Eur J Immuno*l 2011;41(6);1510-5.

8.Wold WS, Toth K.Adenovirus vectors for gene therapy, vaccination and cancer gene therapy. *Curr Gene Ther* 2013; 13(6): 421-33.

9. Bhatia S1, Menezes ME, Das SK, Emdad L, Dasgupta S, Wang XY,etal. Innovative approaches for enhancing cancer gene therapy. *Discov Med* 2013; 15(84):309-17.

10. Zehnder M, Rechenberg DK, Bostanci N, Sisman F, Attin T. Comparison of vehicles to collect dentinal fluid for molecular analysis. J Dent. 2014; 42: 1027±1032

11. Azmudeh F , Hajikhani SH, Alizadeh SA. Evaluation of the hydroalcoholic chamomile extract antifungal activity on Candida albicans-Invitro Study. J Res Dent Sci 2016, 13(4): 210-215

12. Lakkis FG, Baddoura FK, Cruet EN, Parekh KR, Fukunaga M, Munger KA. Anti-inflammatory lymphokine mRNA expression in antibody-induced glomerulonephritis. Kidney Int 1996: 49(1), 117-26.

13.Rashidi Meibodi F, Kazeronizadeh N, Karimi Nasab M, The average number of candida albicans colonies in gingival crevicular fluid in patients with chronic periodontitis. J Res Dent Sci 2016, 13(1): 30-35

14. Hempel L, Korholz D, Bonig H, Schneider M, Klein-Vehne A, Packeisen J, etal.Interleukin-10 directly inhibits the interleukin-6 production in T-cells. Scand J Immunol 1995;41(5):462-6.

15. Rechenberg DK, Bostanci N, Zehnder M, Belibasakis GN. Periapical fluid RANKL and IL-8 are differentially regulated in pulpitis and apical periodontitis. Cytokine 2014; 69(1): 116-9

16. Yu Suna, Mozaffariana A, Heather A, Huyen Dinha A, Esther S, Truebloodb J, Townea E. IL-36 induces inflammation and collagen deposition in the lung. *Cytokine*. 2013: 63; (3); 303

17. Matsushima K, Ohbayashi E, Takeuchi H, Hosoya S, Abiko Y, Yamazaki M. Stimulation of interleukin-production in human dental pulp cells by peptidoglycan from Lactobacillus casei. J Endod 1998; 24(4):252-5

18.Barral-Netto M1, Barral A, Brownell CE, Skeiky YA, Ellingsworth LR, Twardzik DR,etal. Transforming growth factor-beta in leishmanial infection: a parasite escape mechanism. Science 1992;257(5069):545-8

19.Barton BE, Jackson JV. Protective role of interleukin-6 in the lipopolysaccharide-galactosamine septic shock model. Infect Immun 1993;61(4):1496-9.

20. Prabhu A, Michalowicz BS, Mathur A. Detection of local and systemic cytokines in adult periodontitis. J Periodontol 1996;67(5):515-22