

## بررسی رابطه میان میزان بیان ژن های TLR2 و TLR4 در بافت لثه با پرئودنتیت مهاجم

سمیرا حسین پور جاهد نیا<sup>۱</sup>، فرشید یگانه<sup>۲</sup>، آرام محمدی<sup>۲</sup>، آذرنوش آریان کیا<sup>۳</sup>، آزینا محمدبیگی<sup>۱</sup>، ماندانا ستاری<sup>۲\*</sup>

۱. گروه ایمنولوژی، شعبه بین الملل، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
۲. گروه ایمنولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
۳. دستیار تخصصی پرئودنتیکس دانشکده دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

\* مسئول مکاتبات: تلفن: ۰۹۱۲۲۴۶۶۴۹۰ و ۰۲۳۸۷۲۵۴۵، نمابر: ۰۲۲۴۳۹۹۷۰، پست الکترونیک: [mandana.sattari@gmail.com](mailto:mandana.sattari@gmail.com)

تاریخ پذیرش: ۹۶/۶/۲۴

تاریخ دریافت: ۹۶/۴/۱۸

### چکیده

اگر چه بیماری پرئودنتیت توسط باکتری ها آغاز می شود، اما پاسخ های سیستم ایمنی میزبان نیز در تخریب و آسیب بافت های پرئودنتال نقش موثری دارند. اکثر میکروارگانسیم های پرئودنتوپاتیک، گرم منفی می باشند که از طریق لیپوپلی- ساکارید (LPS) خود، قادر به تحریک سلول های ایمنی از طریق اتصال به TLR4 می باشند. البته LPS مربوط به *P.gingivalis* که از مهمترین باکتری های ایجاد کننده بیماری پرئودنتال می باشد، قادر به اتصال به TLR2 نیز می باشد. از آنجایی که اطلاعات کامل و دقیقی در مورد ارتباط میان TLRها با بیماری های پرئودنتال، به ویژه پرئودنتیت مهاجم، در اختیار نمی باشد، لذا هدف از این تحقیق را بر پایه تعیین رابطه میان بیان TLR2 و TLR4 با پرئودنتیت مهاجم، بنا نمودیم. نمونه های بافت لثه از ۱۰ نفر افراد دارای لثه سالم از لحاظ بالینی و ۲۰ نفر مبتلا به پرئودنتیت مهاجم جمع آوری شدند. بعد از هوموژنیزه کردن نمونه های بافتی، استخراج انجام پذیرفت و جهت بیان ژن TLR2 و TLR4 از تکنیک Real-time PCR استفاده شد. در موارد پرئودنتیت مهاجم به بیان بالاتر TLR2 و TLR4 در مقایسه با موارد سالم، برخورد شد ( $P < 0.05$ ). البته در موارد پرئودنتیت مهاجم با میزان CAL و PD مساوی یا بالاتر از ۵ میلی متر، در مقایسه با موارد پایین تر از ۵ میلی متر، هیچ افزایشی در میزان بیان TLR2 و TLR4 ملاحظه نشد. بر اساس یافته های حاصل از این تحقیق چنین نتیجه گیری می شود که افزایش بیان TLR2 و TLR4 در پرئودنتیت مهاجم می تواند به اثرات تحریکی باکتری های پرئودنتوپاتیک مربوط باشد.

**واژگان کلیدی:** بیماری پرئودنتال، پرئودنتیت مهاجم، ایمنی ذاتی، TLR2، TLR4

### مقدمه

پرئودنتوپاتیک، دارای چندین فاکتور ویروالانس هستند نظیر فمبیره، سیستمین پروتئیناز، لیپوپلی ساکارید (LPS) و هماگلوتینین که یکی از مهمترین آنها LPS می باشد (۸-۱۴).

یکی از مهمترین خانواده از رسپتورها که باعث تحریک دفاع ذاتی می شوند، PRPs<sup>۱</sup> هستند که TLRها متعلق به این خانواده می باشند، یک سری از تحقیقات به بررسی

با وجود آنکه باکتری های پرئودنتوپاتیک به عنوان عوامل ایجاد کننده پرئودنتیت در نظر گرفته می شوند، اما پیشرفت بعدی و شدت بیماری، توسط پاسخ های دفاعی میزبان تعیین می شوند. اعتقاد بر این است که این بیماری به سبب برهم خوردن بالانس میان پلاک باکتریال و پاسخ های ایمنی ایجاد می شود (۱-۷). باکتری های

<sup>1</sup> Pattern recognition receptors

شوند (۲۰). Watanabe و همکاران در سال ۲۰۱۱ گزارش کردند که از دست رفتن عملکرد TLR4 تا حدودی باعث محافظت در برابر از دست رفتن استخوان آلوئول می شود (۲۲). Becerik و همکاران در سال ۲۰۱۱ اظهار داشتند که بیان TLR4 و CD14 غشایی به نظر می رسد که با بیماری پریودنتال همراهی داشته باشد (۲۳).

Swaminathan و همکاران در سال ۲۰۱۳ ملاحظه نمودند که تحریک توسط لیگاندهای اختصاصی TLR4 یا TLR2 باعث القای ترشح سایتوکاینها و افزایش بیان mRNA مربوط به TLR2 و TLR4 در مورد بیماران مبتلا به پریودنتیت می شود (۲۴). با توجه به مطالب فوق، هدف از انجام این تحقیق را بر پایه تعیین رابطه میان TLR2 و TLR4 با بررسی میزان CAL<sup>۲</sup> و PD<sup>۳</sup> در نمونه های پریودنتیت مهاجم بیماران مراجعه کننده به بخش پریودنتیکس دانشکده دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی در سالهای ۹۲-۱۳۹۱ بنا نمودیم.

#### مواد و روش ها

##### نحوه انتخاب نمونه ها

افرادی که وارد مطالعه شدند همگی ایرانی و بالاتر از ۱۸ سال و غیرسیگاری بودند و قبل از جراحی داروی ضدالتهابی مصرف نکرده و در طی سال های ۹۲-۱۳۹۱ به بخش پریودنتیکس دانشکده دندانپزشکی شهید بهشتی و درمانگاههای تابعه مراجعه کرده بودند. تمامی افراد فرم رضایتنامه آگاهانه را جهت شرکت در مطالعه تکمیل کردند. افراد سالم افرادی بودند که در بخشی از دهان خود نیاز به جراحی افزایش طول تاج کلینیکی داشتند و لثه افراد در ناحیه جراحی فاقد<sup>۴</sup> BOP، همچنین این افراد فاقد سابقه ابتلا به پریودنتیت بودند. به تمامی این افراد پس از برداشتن تمامی محرکهای موضعی شامل جرم، پلاک، پانسمان زیر لثه‌ای، پوسیدگی و احتمالاً روکش موقت، آموزش بهداشت دهان داده شد و از آنها خواسته شد تا حداقل در طی یک هفته پیش از جراحی مراقبتهای شدید دندانی شامل مسواک زدن به روش Modified Stillman روزی ۳ بار و استفاده از نخ دندان روزی یکبار را انجام دهند.

نقش این رسپتورها به عنوان مهمترین رسپتورهایی که در شناسایی باکتری های پریودنتوپاتیک معطوف شد. تحریک سلول های ایمنی توسط فرآورده های باکتریال توسط TLRs (Toll-like receptors) صورت می گیرد که بر سطح انواع مختلف سلول های ایمنی حضور دارند و نقش بسیار مهمی در امر شناسایی باکتری ها توسط سیستم ایمنی دارند (۱۵). تاکنون چند نوع از TLR ها و مولکول های مکمل آنها مشخص شده اند، به عنوان مثال، TLR4 قادر به شناسایی LPS باکتری های دستگاه گوارش و برخی از پروتئین های ویرال و باکتریال می باشد (۱۶،۱۷).

برخی شواهد بیانگر این مطلب بوده اند که پیام رسانی از طریق TLR4 باعث القای پاسخ های TH1 (T Helper) و پیام رسانی از طریق TLR2 باعث برتری یافتن پاسخ های TH2 می شود. البته برخی تحقیقات دیگر به وابستگی پاسخ های TH2 به TLR4 اشاره نموده اند که در تناقض با یکدیگر می باشند (۱۸). لذا نقش پیام رسانی از طریق TLR4 همچنان جای بحث و بررسی بیشتر دارد.

با عنایت به اینکه اکثر باکتری های پریودنتوپاتیک، از جمله باکتری های گرم منفی می باشند، لذا قادر به تحریک TLR4 می باشند. البته TLR2 نیز صرفاً قادر به شناسایی LPS مربوط به *Porphyromonas gingivalis* می باشد، بدین خاطر این احتمال می رود که در امر پاتوژنز بیماری های پریودنتال، پیام رسانی از طریق TLR4 که مهمترین TLR برای شناسایی LPS باکتری های پریودنتوپاتیک است، شاید نقش مهمتری داشته باشد. اما نتایج حاصل از مطالعاتی که در این زمینه انجام شده با تناقضاتی رو به رو بوده است. به عنوان مثال، در مواردی به ارتباط مثبت میان TLR4 با بیماری های پریودنتال (۱۹) و در مواردی به ارتباط قوی تر TLR2 و بیماری پریودنتال اشاره شده است (۲۰).

Emingil و همکاران در سال ۲۰۰۷ تفاوت قابل ملاحظه ای را از لحاظ انتشار ژنوتایپ های TLR2 و TLR4 بین بیماران مبتلا به پریودنتیت مهاجم جنرالیزه و افراد سالم ملاحظه نکردند (۲۱).

Kikkert و همکاران در سال ۲۰۰۷ اظهار داشتند که باکتری های پریودنتوپاتیک عمدتاً باعث القای TLR2 می

<sup>4</sup> Bleeding on probing

<sup>2</sup> clinical attachment level

<sup>3</sup> Probing Depth

کورتیکواستروئیدها و داروهای سایتوتوکسیک) در یک ماه گذشته، سابقه آلرژی، سابقه درمان ارتودنسی و مصرف آنتی بیوتیک در طی چند ماه گذشته. همچنین، نمونه گیری از اطراف دندانهای عقل، دندانهای دارای تداخلات اکلوزالی سنگین، دندانهای دارای ضایعه توأم اندوپریو (درگیری پالپ دندان مرتبط با پاکت پرپودنتال) یا پری کرونیت و اطراف ضایعاتپاتولوژیک نظیر زخم، کیست، آبسه و تومور انجام نگرفت.

برای مبتلایان به پرپودنتیت مهاجم، درمان فاز اول بیماری پرپودنتال شامل جرم گیری فوق و زیر لثه ای و تسطیح ریشه دندان حداقل یک ماه قبل از نمونه برداری انجام گردید.

معیارهای خروج افراد عبارت بودند از ابتلا به هرگونه بیماری سیستمیک شناخته شده، مصرف هرگونه داروی موثر بر شرایط پرپودنتال (شامل داروهای افزایش دهنده حجم لثه نظیر مسدودکننده های کانال کلسیم)، مصرف داروهای سرکوب کننده ایمنی (سیکلوسپورین A

جدول ۱- توزیع فراوانی دو جنس (بر حسب درصد) و میانگین  $\pm$  انحراف معیار سن (سال) در ۲ گروه مورد مطالعه، میانگین  $\pm$  انحراف معیار میانگین CAL (بر حسب میلی متر)، میانگین PD (بر حسب میلی متر).

جنسیت (%)		متغیرها				
مرد	زن	حداکثر PD	حداکثر CAL	میانگین PD	میانگین CAL	سن
۲۰	۸۰	-	-	-	-	۳۲/۷ $\pm$ ۸/۶۳
۳۰	۷۰	۶/۸۹ $\pm$ ۲/۴۵	۷/۵۶ $\pm$ ۲/۶۸	۶/۰۹ $\pm$ ۱/۹۴	۶/۸۰ $\pm$ ۱/۸	۳۰/۶۷ $\pm$ ۱۱/۴

نگه داری شدند. نسبت میزان بافت به RNA Later باید حدوداً به ازای هر 100mg بافت، ۱ml از محلول در نظر گرفته شود.

هوموژنیزه کردن بافت: در این مرحله نمونه های فریز شده در -20 درجه سانتیگراد از فریز خارج گردیده. محلول RNA later روی بافت خارج شده به صورتی که بافت عاری از محلول RNA later شد. مراحل هوموژنیزه کردن بافت و استخراج Total RNA انجام گرفت. که کلیه مراحل بر اساس پروتکل کیت انجام شد. سپس جهت سنجش کیفی RNA تخلیص شده از روش ژل الکتروفورز (Gel- electrophoresis) در آگاروز 2٪ استفاده شد.

#### ساخت cDNA

برای سنتز cDNA از کیت Thermo Scientific Revertaid First Strand cDNA Synthesis Kit (loT00124704) استفاده شد. که این کیت سیستم کاملی برای سنتز موثری از زنجیره نخست cDNA از mRNA الگو می باشد. بدنبال سنتز cDNA، cDNA را در ۲۰- تا زمان انجام Real-time PCR نگه داری شد.

با انجام آزمون آماری Mann Whitney U، مشخص شد که ۲ گروه مورد مطالعه از لحاظ سن مشابه یکدیگر (Match) می باشند. در مورد فراوانی دو جنس نیز، با انجام آزمون Chi square مشخص شد که دو گروه از لحاظ توزیع دو جنس، مشابه یکدیگر هستند.

تمامی آزمایشات بروی نمونه های بافت لثه صورت گرفت که می بایست در جریان جراحی پرپودنتال خارج شوند و سپس به دور انداخته شوند، لذا خطری را متوجه افراد مورد مطالعه نمی سازد. شایان ذکر است که لزوم انجام جراحی پرپودنتال برای درمان بیماری، قبلاً توسط پرپودنتیست تأیید شده است. لذا انجام این تحقیق با روند درمانی بیماران هیچگونه تداخلی نداشته است.

#### هوموژنیزه کردن بافت و استخراج RNA

نمونه ها داخل کرایوتیوب های حاوی محلول RNA Later گذاشته شد. در این تحقیق نمونه ها ۲۴ ساعت در RNA Later داخل یخچال ۴°C نگه داری شدند. تا RNA later کاملاً درون بافت نفوذ کند و سپس به -20°C منتقل شدند. و تا زمان جمع آوری تمام نمونه ها در -20°C

افزار Beacon designer بر اساس شرایط ذکر شده توسط شرکت Corbet طراحی پرایمرهای مستقیم (Forward) و معکوس (Reverse) انجام شد (جدول ۲).

### تجزیه و تحلیل داده ها

برای تجزیه و تحلیل اطلاعات مربوط به میزان بیان TLR2 و TLR4 و مقایسه آن بین دو گروه مورد مطالعه، در ابتدا از نرم افزار Rest استفاده شد، اما با توجه به پراکندگی زیاد از حد داده ها، جواب های این نرم افزار قابل استناد نبود، بدین خاطر با در دست داشتن Ct (Cyclic threshold) و Efficiency نمونه ها و با در نظر گرفتن نتایج، Serial dilution، جهت آنالیز داده های حاصله از نرم افزارهای Rest-Rg و SPSS 16.00 استفاده گردید.

### نتایج

پس از به دست آوردن داده های مربوط به Ct و Efficiency در مورد ژن های مورد نظر (Beta actin, TLR4, TLR2)، در گروه های مورد مطالعه، اقدام به تعیین برخی شاخص های توصیفی آماری در دو گروه سالم و پرپودنتیت مهاجم پرداخته شده است. در جداول ۳، بیان ژن های TLR4 و TLR2 در گروه پرپودنتیت مهاجم با گروه سالم مقایسه شده است. بر اساس این جدول، به افزایش قابل توجه بیان TLR2 در گروه پرپودنتیت مهاجم در مقایسه با گروه سالم برخورد می شود ( $P < 0.05$ ).

### سنجش کمی ریبو نوکلئیک اسید

در این روش با استفاده از دستگاه Photometr Bio مقادیر کمی نمونه ها اندازه گیری شد. این دستگاه اطلاعاتی در مورد جذب نوری در طول موج های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر به ما می دهد. طول موج ۲۶۰ نانومتر مربوط به RNA و DNA و طول موج ۲۸۰ نانومتر مربوط به آلودگی به پروتئین است. برای انجام کار ۵ لاند آب مقطر داخل covet دستگاه ریخته شد و دکمه Blank زده شد. سپس ۵ لاند از RNA تخلیص شده داخل کورت ریخته شد و دکمه Sample زده شود در نهایت در خوانش دستگاه غلظت RNA مورد نظر برابر با ۱/۷۸ تعیین گردید.

### Real-time PCR

cDNA به کار رفته جهت آزمایش Real-Time-PCR می بایستی دارای غلظت مشخص و یکسان باشد، زیرا Real-time PCR یک تکنیک کمی و یا نیمه کمی است. در این مرحله مانند تعیین غلظت و کیفیت mRNA، غلظت های cDNA در دستگاه nano drop خوانده شد. لازم به ذکر است که تهیه رقت های مختلف از cDNA های نمونه کنترل و بیمار جهت رسم منحنی استاندارد، با توجه به بررسی نسبی داده های Real-time PCR، تنها برای تعیین صحت و کارآمدی Real-time PCR صورت گرفت.

### طراحی پرایمر

توالی ژن Beta actin به عنوان ژن رفرانس از بانک ژنی سایت <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> و توسط نرم

جدول ۲- توالی پرایمرها

نام پرایمر	توالی
TLR4-forward	5'- TTCTTCTAACTTCCTCTCCTGTGA -3'
TLR4-Reverse	5'- AGCGGCAACCTTAGCATTC -3'
TLR2-forward	5'-AGCACTGGACAATGCCACAT-3'
TLR2-Reverse	5'-ACCATGCGGTCAACAAGACA-3'
Beta actin-Forward	5'-CCTGGGCATGGAGTCCTGT-3'
Beta actin-Reverse	5'-ATCTCCTTCTGCATCCTGTGCG-3'

جدول ۳- مقایسه گروه پرپودنتیت مهاجم با گروه سالم از نظر بیان TLR2 و TLR4 (گروه سالم به عنوان مبنا در نظر گرفته شده است).

نتایج	[TLR2]
افزایش بیان ژن هدف	1.113۰۰
کاهش بیان ژن هدف	-
نتایج	[TLR4]
افزایش بیان ژن هدف	1.304۰۰
کاهش بیان ژن هدف	-

دلیل یافته های مختلف به دست آمده در مورد پرپودنتیت مهاجم احتمالاً به علل مختلف مربوط باشد، از جمله وجود اشکال پلی مرف یا اثرات القا شده توسط باکتری هایی که نقش مهمی در پاتوژنز پرپودنتیت مهاجم دارند (نظیر *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*) *A.a.* به عبارت دیگر شاید برخی عوامل باعث القای مرگ سلول های TLR2+ و یا TLR4+ شوند و موجب شوند تا با وجود آنکه در موارد پرپودنتیت مهاجم، به افزایش بیان TLR2 و TLR4 برخورد می شود، در موارد واجد تخریب شدیدتر بافت (CAL و PD مساوی یا بالاتر از ۵ میلی متر)، حتی کاهش بیان هر دو آنها ملاحظه شود. Fatemi و در سال ۲۰۱۳ گزارش کردند که *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* به عنوان یکی از مهمترین باکتری های پرپودنتوپاتیک، در صورت آلوده نمودن کشت سلول های THP1 باعث افزایش بیان TLR2 بر سطح سلول های مزبور شده که مرگ این سلول ها را با فعال کردن p38 و تولید TNF- $\alpha$ ، از طریق فاگوسیتوز یا اپوپتوز به دنبال دارد (۲۷). همانگونه که در قسمت قبل نیز اشاره شده، شاید در تحقیق ما دلیل کاهش بیان TLR2 در مواردی از پرپودنتیت مهاجم که CAL و PD مساوی یا بالاتر از ۵ میلی متر دارند، بدین خاطر باشد که سلول های عرضه کننده TLR2 قبلاً از بین رفته یا در حال از بین رفتن هستند.

Jin و همکاران در سال ۲۰۱۳، اظهار داشتند که در موارد پرپودنتیت مزمن، به افزایش بیان TLR2 و TLR4 برخورد می شود (۲۸).

در مطالعه ای که Paavai Ilango و همکاران در سال ۲۰۱۶ روی بیماری های پرپودنتال انجام دادند به این نتیجه رسیدند که ارتباط معناداری وجود دارد بین بیان TLR4 در گروه مبتلایان به پرپودنتیت مزمن p

بر اساس جدول فوق، به افزایش قابل توجه بیان TLR4 نیز در گروه پرپودنتیت مهاجم در مقایسه با گروه سالم برخورد می شود ( $P < 0.05$ ). اما با تقسیم کردن گروه بیمار، بر اساس دارا بودن CAL یا PD مساوی یا بالاتر از ۵ میلی متر و یا کوچکتر از ۵ میلی متر به دو زیر گروه، نه تنها به بیان بالاتر TLR2 و TLR4 در موارد واجد CAL و PD مساوی یا بالاتر از ۵ میلی متر برخورد نشد بلکه حتی کاهش ملاحظه شد که البته از نظر آماری معنی دار نبود.

#### بحث

با انجام این تحقیق مشخص شد که در موارد پرپودنتیت مهاجم، بیان TLR2 و TLR4 بالا می رود، که در تمام موارد، افزایش بیان TLR4 به مراتب بالاتر از افزایش TLR2 بوده است ( $P < 0.05$ ). اما این افزایش بیان با میزان بالای CAL و یا PD فاقد همبستگی بود.

Jin و همکاران در سال ۲۰۱۱ نشان دادند که از دست رفتن عملکرد TLR4 تا حدودی باعث محافظت در برابر از دست رفتن استخوان آلوئول می شود (۲۵).

Becerik و همکاران در سال ۲۰۱۱ اذعان داشتند که بیان TLR4 به نظر می رسد که با بیماری پرپودنتال (پرپودنتیت مزمن و پرپودنتیت مهاجم) همراهی داشته باشد (۲۳). همانگونه که مشخص است بین یافته های ما و تحقیق فوق، مشابهت زیادی وجود دارد، چرا که در تحقیق ما نیز در پرپودنتیت مهاجم، بیان TLR4 به طور معنی داری بالاتر از موارد سالم بود. Artner و همکاران در سال ۲۰۱۱ گزارش کردند که مقاومت به پرپودنتیت مهاجم با هاپلوتایپ Ins-C-T در جمعیت ژاپنی همبستگی مستقیم دارد و اظهار داشتند که شاید پلی مرفیسم در الهای دیگر TLR2 در ارتباط با استعداد ابتلا به این بیماری باشند (۲۶).

ارتباط مستقیمی با TLR4 ندارد (۲۹). احتمالاً با شدت یافتن بیماری و تخریب بیشتر سلولهای موجود در بافتها؛ پریدونتال، شاید حتی به کاهش بیان TLR2 و TLR4 برخورد شود. در صورت اثبات فرضیات فوق، بتوان تضعیف بیان TLR2 و TLR4 در مراحل اولیه بیماری کمک به درمان این بیماران و جلوگیری از شکست درما نمود. البته جهت اطمینان از این فرضیات، نیاز به انجام تحقیقات بیشتر می باشد.

### تقدیر و تشکر

این مقاله برگرفته از پایان نامه کارشناسی ارشد ایمونولوژی شعبه بین الملل دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی می باشند. با سپاس فراوان از تمامی اساتید دستیاران بخش پریدونتیکس دانشکده دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی که بدون لطف آنان جمع آوری نمونه ها ناممکن بود و دانشجویان کارشناسی ارشد ایمونولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی به ویژه سرکار خانم سیریا شهنواز که در انجام این تحقیق یاری رسان ما بودند. با تشکر ویژه از تمام بیماران که در امر انجام این تحقیق همکاری نمودند.

value=0.004، در حالی که این ارتباط با بیان TLR2 به صورت ناچیز عنوان شد. (P value=0.085) (۳۰).

در مطالعه ای که John Ruby و همکاران در سال ۲۰۱۷ بر روی باکتری *Treponema denticol* که میکروارگانیسمی است که در شیار لثه و پاکت های پریدونتال زندگی می کند به این نتیجه رسیدند که در اثر اتصال فلاژل این باکتری به TLR2 به عنوان گیرنده ایمنی ذاتی پاسخ های التهابی و ترشح سایتوکاین های التهابی مانند: IL-6 و TNF- $\alpha$  افزایش می یابد که در نهایت منجر به پریدونتیت می گردد (۳۱).

در تحقیق ما نیز با وجود آنکه روی پریدونتیت مهاجم انجام شده، به افزایش بیان هر دو گیرنده برخورد شد که می تواند بازتابی از اثرات تحریکی حاصل از باکتری های پریدونتوپاتیک باشد. بر اساس یافته های حاصل از این تحقیق چنین نتیجه گیری می شود که با عنایت به اینکه غالب باکتری های پریدونتوپاتیک، گرم منفی بوده و لذا دارای LPS می باشند، بنابراین باعث تحریک سلولهای ایمنی، به ویژه سلولهای دفاع ذاتی از طریق TLR2 و TLR4 می گردند که در افزایش بیان TLR2 به ویژه *P.gingivalis* نقش دارد، کما اینکه مشخص شده که تعداد *P.gingivalis* در ارتباط مستقیم با بیان TLR2 است و

### منابع مورد استفاده

- Birkedal-Hansen, H., 1993. Role of cytokines and inflammatory mediators in tissue destruction. *J Periodontal Res* 28: 500-510.
- Kornman, K. S., Page, R. C., Tonetti, M. S., 2000. The host response to the microbial challenge in periodontitis: assembling the players. *Periodonto* 114: 33-53.
- Seymour, G. J., 1987. Possible mechanisms involved in the immune-regulation of chronic inflammatory periodontal disease. *J Dent Res* 66: 2-9.
- Seymour, G. J., Gemmell, E., Reinhardt, R. A., 1993. Immuno-pathogenesis of chronic inflammatory periodontal disease: cellular and molecular mechanisms. *J Periodont Res* 28: 478-486.
- Gemmell, E., Marshall, R. I., Seymour, G. J., 2000. Cytokines and prostaglandins in immune homeostasis and tissue in periodontal disease. *Periodontology* 14: 112-143.
- Genco, R. J., 1992. Host responses in periodontal diseases: current concepts. *J Periodontol* 63: 338-55.
- Williams, R. C., 1990. Periodontal disease. *N Engl J Med* 322: 373-82.
- Lamont, R. J., Jenkinson, H. F., 1998. Life below the gum line: pathogenic mechanisms of *Porphyromonas gingivalis*. *Microbiol Mol Biol Rev* 62: 1244-1263.
- Duncan, M. J., Nakao, S., Skobe, Z., Xie, H., 1993. Interactions of *Porphyromonas gingivalis* with epithelial cells. *Infect Immun* 61: 2260-2265.
- Hirose, K., Isogai, E., Mizugai, H., Ueda, I., 1996. Adhesion of *Porphyromonas gingivalis* fimbriae to human gingival cell line Ca9-22. *Oral Microbiol Immunol* 11: 402-406.
- Kuramitsu, H.K., 1998. Proteases of *porphyromonas gingivalis*: what don't they do? *Oral Microbiol Immunol* 13: 263-270.
- Oleksy, A., Banbula, A., Bugno, M., Travis, J., 2002. Proteolysis of interleukin-6 receptor (IL-6R) by *Porphyromonas gingivalis* cysteine proteases (gingipains) inhibits interleukin-6-mediated cell activation. *Microb Pathog* 32: 173-181.

13. Potempa, J., Banbula, A., Travis, J., 2000. Role of bacterial proteinases in matrix destruction and modulation of host responses. *Periodontol* 4: 153-192.
14. Zhang, J., Dong, H., Kashket, S., Duncan, M. J., 1999. IL-8 degradation by *Porphyromonas gingivalis* proteases. *Microb Pathog* 26: 275-280.
15. Gerold, G., Zychlinsky, A., de Diego, J. L., 2007. What is the role of Toll-like receptors in bacterial infections? *Semin Immunol* 19(1): 41-7.
16. Jin, M. S., Lee, J. O., 2008. Structures of the toll-like receptor family and its ligand complexes. *Immunity* 29(2): 182-91.
17. Oliveira-Nascimento, L., Massari, P., Wetzler, L. M., 2012. The role of TLR2 in infection and immunity. *Front Immuno* 13: 1-17.
18. Re, F., Strominger, J. L., 2001. Toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 differentially activate human dendritic cells. *J Biol Chem* 276: 37692-37699.
19. Wang, P. L., Ohura, K., 2002. *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide signaling in gingival fibroblasts-CD14 and Toll-like receptors. *Crit Rev Oral Biol Med* 13(2): 132-42.
20. Kikkert, R., Laine, M. L., Aarden, L. A., Van Winkelhoff, A. J., 2007. Activation of toll-like receptors 2 and 4 by gram-negative periodontal bacteria. *Oral Microbiol Immunol* 22(3): 145-51.
21. Emingil, G., Berdeli, A., Baylas, H., Saygan, B. H., Gürkan, A., Köse, T., 2007. Toll-like receptor 2 and 4 gene polymorphisms in generalized aggressive periodontitis. *J Periodontol* 78(10): 1968-77.
22. Watanabe, K., Iizuka, T., Adeleke, A., Pham, L., Shlimon, A., Yasin, M., 2011. Involvement of toll-like receptor 4 in alveolar bone loss and glucose homeostasis in experimental periodontitis. *J Periodontal Res* 46(1): 21-30.
23. Becerik, S., Özsan, N., Gürkan, A., Öztürk, V., Atilla, G., Emingil, G., 2011. Toll like receptor 4 and membrane-bound CD14 expressions in gingivitis, periodontitis and CsA-induced gingival overgrowth. *Arch Oral Bio* 156(5): 456-65.
24. Swaminathan, V., Prakasam, S., Puri, V., Srinivasan, M., 2013. Role of salivary epithelial toll-like receptors 2 and 4 in modulating innate immune responses in chronic periodontitis. *J Periodontal Res* 48(6): 757-65.
25. Jin, B., Sun, T., Yu, X. H., Yang, Y. X., Yeo, A. E., 2012. The effects of TLR activation on T-cell development and differentiation. *Clin Dev Immunol* 2012: 836485.
26. Artner, D., Oblak, A., Ittig, S., Garate, J. A., Horvat, S., Arrieumerlou, C., 2013. Conformationally constrained lipid A mimetics for exploration of structural basis of TLR4/MD-2 activation by lipopolysaccharide. *ACS Chem Biol* 8(11): 2423-32.
27. Fatemi, K., Radvar, M., Rezaee, A., Rafatpanah, H., Dadpour, Y., Radvar, N., 2013. Comparison of relative TLR-2 and TLR-4 expression level of disease and healthy gingival tissue of smoking and non-smoking patients and periodontally healthy control patients. *Aust Dent J* 58(3): 315-20.
28. Jin, M. S., Kim, S. E., Heo, J. Y., Lee, M. E., Kim, H. M., Paik, S. G., Lee H., Lee J. O., 2007. Crystal structure of the TLR1-TLR2 heterodimer induced by binding of a triacylated lipopeptide. *Cell* 130(6):1071-82.
29. Wara-aswapati, N., Chayasadam, A., Surarit, R., Pitiphat, W., Boch, J. A., Nagasawa, T., Ishikawa, I., Izumi, Y., 2013. Induction of toll-like receptor expression by *Porphyromonas gingivalis*. *J Periodontol* 84(7): 1010-8.
30. Ilango, p., Mahalingam, A., Parthasarathy, H., Katamreddy V., Subbareddy, V., 2016. Evaluation of TLR2 and 4 in Chronic Periodontitis. *J Clin Diagn Res.* 10(6): 86-89.
31. Ruby, J., Martin, M., Passineau M. J., Godovikova V., Fenno J. C., Wu H., 2017. Activation of the Innate Immune System by *Treponema denticola* Periplasmic Flagella through Toll-Like Receptor 2. *Infect Immun* 19: 11.