مقاله تحقیقی

بررسی رابطه میان میزان بیان ژن های TLR2 و TLR4در بافت لثه با پریودنتیت مهاجم

سمیرا حسین پور جاهد نیا[1]، فرشید یگانه[2]، آرام محمدی[2]، آذرنوش آریان کیا [3]، آزیتا محمدبیگی[1]، ماندانا ستاری[2،*]

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

* **مسئول مکاتبات:** تلفن: ۰۹۱۲۲۴۶۶۴۹۰ و ۲۳۸۷۲۵۴۵، نمابر: ۲۲۴۳۹۹۷۰، پست الکترونیک:mandana.sattari@gmail.com

تاریخ دریافت: ۹۶/۴/۱۸ تاریخ پذیرش: ۹۶/۶/۲۴

چکیده

اگر چه بیماری پریودنتیت توسط باکتری ها آغاز می شود، اما پاسخ های سیستم ایمنی میزبان نیز در تخریب و آسیب بافت های پریودنتال نقش موثری دارند. اکثر میکروارگانیسم های پریودنتوپاتیک، 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 پریودنتال 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 پریودنتال، به ویژه پریودتیت مهاجم، در اختیار نمی باشد، لذا هدف از این تحقیق را بر پایه تعیین رابطه میان بیان TLR2 و TLR4 با پریودنتیت مهاجم، بنا نمودیم. نمونه های بافت لثه از ۱۰ نفر افراد دارای لثهٔ سالم از لحاظ بالینی و ۲۰ نفر مبتلا به پریودنتیت 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 پریودنتیت مهاجم به بیان بالاتر TLR4 و TLR2 در مقایسه با موارد سالم، برخورد شد ($P<0.05$). البته در موارد پریودنتیت 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 پریودنتیت مهاجم می تواند به اثرات تحریکی باکتری های پریودنتوپاتیک مربوط باشد.

واژگان کلیدی: بیماری پریودنتال، پریودنتیت مهاجم، ایمنی ذاتی، TLR2، TLR4

مقدمه

با وجود آنکه باکتری های پریودنتوپاتیک به عنوان عوامل ایجاد کنندهٔ پریودنتیت 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 پریودنتوپاتیک، دارای چندین فاکتور ویرولانس هستند نظیر فمبریه، سیستئین 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،[1] PRPs هستند که TLRها متعلق به این خانواده می باشند، یک سری از تحقیقات به بررسی

[1] Pattern recognition receptors

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 Helper1) 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 ۲۰۰۷تفاوت 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 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 پایهٔ تعیین رابطه میان TLR2 و TLR4 با بررسی میزان CAL[۲] و PD[۳] در نمونه های پریودنتیت مهاجم بیماران مراجعه کننده به بخش پریودنتیکس دانشکده دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی در سالهای ۹۲- ۱۳۹۱بنا 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 BOP[۴]، 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.

[2] clinical attachment level
[3] Probing Depth
[4] Bleeding on probing

برای مبتلایان به پریودنتیت مهاجم، درمان فاز اول بیماری پریودنتال 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 پریودنتال (شامل داروهای افزایش دهنده حجم لثه نظیر مسدودکننده‌های کانال کلسیم)، مصرف داروهای سرکوب کننده ایمنی (سیکلوسپورین A 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 پریودنتال) یا پری کرونیت و اطراف ضایعاتپاتولوژیک نظیر زخم، کیست، آبسه و تومور انجام نگرفت.

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

متغیرها / گروهها	سن	میانگین CAL	میانگین PD	حداکثر CAL	حداکثر PD	جنسیت (٪)	
						زن	مرد
لثه سالم	۳۲/۷ ± ۸/۶۳	-	-	-	-	۸۰	۲۰
پریودنتیت مهاجم	۳۰/۶۷ ± ۱۱/۴	۶/۸۰ ± ۱/۸	۶/۰۹ ± ۱/۹۴	۷/۵۶ ± ۲/۶۸	۶/۸۹ ± ۲/۴۵	۷۰	۳۰

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 نمونه‌های بافت لثه صورت گرفت که می بایست در جریان جراحی پریودنتال خارج شوند و سپس به دور انداخته شوند، لذا خطری را متوجه افراد مورد مطالعه نمی‌سازد. شایان ذکر است که لزوم انجام جراحی پریودنتال برای درمان بیماری، قبلا توسط پریودنتیست تأیید شده است. لذا انجام این تحقیق با روند درمانی بیماران هیچگونه تداخلی نداشته است.

هوموژنیزه کردن بافت و استخراج RNA

نمونه‌ها 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 کاملا" درون بافت نفوذ کند و سپس به -20°C منتقل شدند. و تا زمان جمع آوری تمام نمونه ها در -20°C نگه داری شدند . نسبت میزان بافت به RNA Later باید حدوداً به ازای هر 100mgبافت، ۱ml از محلول در نظر گرفته شود.

هوموژنیزه کردن بافت: در این مرحله نمونه‌های فریزشده در 20- درجه سانتیگراد از فریز خارج گردیده. محلول RNAlater روی بافت خارج شده به صورتی که بافت عاری از محلول RNAlater 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 می‌باشد. بدنبال سنتزcDNA، cDNA را در۲۰- تا زمان انجام Real-time PCR نگه داری شد.

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 لاندا آب مقطر داخل covet دستگاه ریخته شد و دکمه Blank زده شد.سپس ۵ لاندا از RNA تخلیص شده داخل کوت ریخته شدو دکمه Sample زده شدودر 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 با 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 کارامدی 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 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 وتحلیل 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 زیاده 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, TLR2, TLR4)، در گروه های مورد مطالعه، اقدام به تعیین برخی شاخص های توصیفی آماری در دو گروه سالم و پریودنتیت مهاجم پرداخته شده است. در جداول ۳، بیان ژن های TLR2 و TLR4 در گروه پریودنتیت مهاجم با گروه سالم مقایسه شده است. بر اساس این جدول، به افزایش قابل توجه بیان TLR2 در گروه پریودنتیت مهاجم در مقایسه با گروه سالم برخورد می شود ($P<0.05$).

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-ACCATTGCGGTCACAAGACA-3’
Beta actin-Forward	5’-CCTGGGCATGGAGTCCTGT-3’
Beta actin-Reverse	5’-ATCTCCTTCTGCATCCTGTCG-3’

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

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

بر اساس جدول فوق، به افزایش قابل توجه بیان TLR4نیز در گروه پریودنتیت 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 پریودنتیت 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 پریودنتال (پریودنتیت مزمن و پریودنتیت 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 پریودنتیت مهاجم، بیان TLR4 به طور معنی داری بالاتر از موارد سالم بود. Artner و همکاران در سال۲۰۱۱ گزارش کردند که مقاومت به پریودنتیت مهاجم با هاپلوتایپ Ins-C-T در جمعیت ژاپنی همبستگی مستقیم دارد و اظهار داشتند که شاید پلی مرفیسم در اللهای دیگر TLR2 در ارتباط با استعداد ابتلا به این بیماری باشند (۲۶).

دلیل یافته های مختلف به دست آمده در مورد پریودنتیت مهاجم احتمالا به علل مختلف مربوط باشد، از جمله وجود اشکال پلی مرف یا اثرات القا شده توسط باکتری هایی که نقش مهمی در پاتوژنز پریودنتیت مهاجم دارند (*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 پریودنتیت 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 *Aggrigatibacter actinomycetemcomitans* به عنوان یکی از مهمترین باکتری های پریودنتوپاتیک، 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-α ، 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 پریودنتیت مهاجم که CAL و PD مساوی یا بالاتر از ۵ میلی متر دارند، بدین خاطر باشد که سلول های عرضه کنندهٔ TLR2 قبلاً از بین رفته یا در حال از بین رفتن هستند.

Jin و همکاران در سال ۲۰۱۳، اظهار داشتند که در موارد پریودنتیت 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 پریودنتال انجام دادند به این نتیجه رسیدند که ارتباط معناداری وجود دارد بین بیان TLR4 در گروه مبتلایان به پریودنتیت مزمن p

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 برروی باکتری Treponema denticol که میکروارگانیسمی است که درشیار لثه و پاکت های پریودنتال 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-α افزایش می یابد که در نهایت منجر به پریودنتیت می گردد (۳۱).

در تحقیق ما نیز با وجود آنکه روی پریودنتیت مهاجم انجام شده، به افزایش بیان هر دو گیرنده برخورد شد که می تواند بازتابی از اثرات تحریکی حاصل از باکتری های پریودنتوپاتیک باشد. بر اساس یافته های حاصل از این تحقیق چنین نتیجه گیری می شود که با عنایت به اینکه غالب باکتری های پریودنتوپاتیک، 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 ارتباط مستقیمی با TLR4 ندارد (۲۹).احتمالاً با شدت یافتن بیماری و تخریب بیشتر سلولهای موجود در بافتها پریودنتال، شاید حتی به کاهش بیان TLR2 و LR4 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 انجا تحقیقات بیشتر می باشد.

تقدیر و تشکر

این مقاله برگرفته از پایان نامه کارشناسی ارش ایمونولوژی شعبه بین الملل دانشگاه علوم پزشکی شهی بهشتی می باشند.با سپاس فراوان از تمامی اساتید دستیاران بخش پریودنتیکس دانشکده دندانپزشک دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی که بدون لطف آنا جمع آوری نمونه ها ناممکن بود و دانشجویان کارشناس ارشد ایمونولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشک شهید بهشتی به ویژه سرکار خانم سریرا شهنواز که د انجام این تحقیق یاری رسان ما بودند.با تشکر ویژه از تمام بیمارانی که در امر انجام این تحقیق همکاری نمودند.

منابع مورد استفاده

7. Williams, R. C., 1990. Periodontal disease. N Engl J Med 322: 373-82.
8. Lamont, R. J., Jenkinson, H. F., 1998. Life below the gum line: pathogenic mechanisms of Porphyromonas gingivalis. Microbiol Mol Biol Rev 62: 1244-1263.
9. Duncan, M. J., Nakao, S., Skobe, Z., Xie, H., 1993. Interactions of Porphyromonas gingivalis with epithelial cells. Infect Immun 61: 2260-2265.
10. Hirose, K., Isogai, E., Mizugai, H., Ueda, I., 1996. Adhesion of Porphyromonas gingivalis fimbriae to human gingival cell line Ca9-22. Oral MicrobiolImmunol 11: 402-406.
11. Kuramitsu, H.K., 1998. Proteases of porphyromonas gingivalis: what don't they do? Oral Microbiol Immunol 13: 263-270.
12. Oleksy, A., Banbula, A., Bugno, M., Travis, J., 2002. Proteolysis of interleukin-6 receptor (IL-6R) by Porphyromonas gingivalis cysteine roteinases (gingipains) inhibits interleukin-6-mediated cell activation. Microb Pathog 32: 173-181.
. 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 l14: 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 Periodon 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.

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 l3: 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 l56(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 tri-acylated lipopeptide. Cell 130(6):1071-82.
29. Wara-aswapati, N., Chayasadom, 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.