G.Ü. Dişhek. Fak. Der.
Cilt V. Sayı 1, Sayfa 109 - 116, 1988

JUVENİL PERİODONTİTİSLİ HASTALARDA LENFOSİT KEMOTAKSİSİ

Ezel YAVUZYILMAZ* Fügen ERSOY**
Özden SANAL*** Merih BAYKARA****

GİRİŞ

Klinik olarak birinci daimi molar ve kesici dişlerde vertikal, küvet şeklinde alveoler kemik kaybı, cep oluşumu ve dişlerin yer değiştirmesi ile tanımlanan juvenil periodontitis, etyolojisi kesin olarak aydınlatılmamış, genetik olabileceği öne sürülen bir hastalıktır (1, 9). Hastalığın etyolojisine açıklık getirmek için mikrobiyoloji ile ilgili yapılan çalışmalarda, subgingival floranın, diğer periodontal hastalıklarda belirlenen floradan farklı olduğu saptanmıştır. Özellikle Actinobacillus actinomycetemcomitans (A.a.), Bacteroides gingivalis, Capnocytophaga gibi gram - mikroorganizmaların hakim olduğu belirtilmiştir (13, 14). İmmün sistemle ilgili yapılan çalışmalar sonucu ise sistemik olarak en önemli bulgunun, periferik kan nötrofillerindeki fonksiyonel defekler olduğu bildirilmiştir. Kemotaksis ve fagositoz düşüklüğü olarak saptanan bu defeklerin periodontal dokuların direncini azalttığı belirtilmiştir (3, 4, 18, 19).

Son yıllarda yapılan çalışmalar, nötrofillerde olduğu gibi lenfositlerin de enfeksiyon bölgesine gelme hızının, enfeksiyonun önlenmesinde büyük önem taşıdığını göstermiştir (20, 23). Lenfositlerin migrasyonunu ve trafiğini düzenleyen mekanizma kısmen anlaşılmıştır. Lenfositler kandan antijen içeren dokulara gitmektedir. Gecikmiş tip hipersensitive reaksiyonlarında lenfositlerin o bölgeye toplanmasını sağlayan kemotaktik bir faktörün olabileceği ve hücre trafiğinin kemotaktik cevapla düzenlendiği düşünülmüştür (7, 21). Wilkinson ve ark. (22) invitro blastik transformasyona uğramış insan lenfositleri-

(*) H.Ü. Dişhek. Fak. Periodontolopi Anabilim Dalı, Öğr. gör. Dr. Dt.
(**) H.Ü. Tıp Fak. Pediatri Anabilim Dalı, Öğr. Üyesi, Prof. Dr.
(***) H.Ü. Tıp Fak. Pediatri Anabilim Dalı, Öğr. Üyesi, Doç. Dr.
(****) H.Ü. Dişhek. Fak. Periodontoloji Anabilim Dalı, Araş. Gör., Dt.

nin kazein ve endotoksinle aktive seruma doğru hareket ettiğini göstermişlerdir. Ayrıca gecikmiş tip hipersensitivite reaksiyonlarında, lenfositlerin bölgeye toplanmasını sağlayan, lenfosit kemotaktik faktörleri tanımlanmıştır (12).

Literatürde juvenil periodontitisli hastalarda lenfosit kemoktaksisin incelendiği bir araştırmaya rastlanmamıştır. Çalışmamız, immün sistemin çeşitli parametrelerinde defekler olduğu bildirilen juvenil periodontitisli hastalarda lenfosit kemotaksisini araştırmak amacıyla planlanmıştır.

YÖNTEM VE GEREÇLER

Araştırmamız, sistemik açıdan sağlıklı yaşları 15 - 23 arasında değişen 15'i kız, 2'si erkek 17 juvenil periodontitis, 10'u kız, 6'sı erkek 16 sağlıklı birey üzerinde yürütüldü.

Klinik Çalışmalar : Hasta grubunu oluşturan bireylerin tüm dişlerinin cep derinlikleri ölçümleri ve ağız içi radyografileri alındı. Russell periodontal indeksleri belirlendi.

Laboratuvar Çalışmaları : Hasta ve kontrol grubunu oluşturan bireylerin lenfosit kemotaksis ve random migrasyonları çalışıldı.

Lenfositlerin elde edilişi : Hasta ve kontrol grubunu oluşturan bireylerden yaklaşık 10 ml venöz kan, 20 ü/ml heparin içerecek şekilde plastik enjektörlere alındı. Cam tüpteki 10 ml venöz kana monositleri elimine etmek için bir spatül ucu «Carbonyl Iron» eklenip 37°C de, 30 dakika çalkalandı. Daha sonra PBS (phosphate buffered saline) ile sulandırıldı. Sulandırılan kandan yapılan yayma peroksidaz ile boyandı. Monosit sayısı % 3'den fazla ise tekrar «carbonyl Iron» ile muamele edildi. Monosit oranı % 3 den az ise kan 3 ml. «Ficoll Hypaque» (Nyaguard Co, As Oslo Narway) üzerine tabaka yapacak şekilde katmanlandırıldı. 1400 devir/dk da 30 dakika çevrildi. Pastör pipeti ile lenfosit tabakası alındı. İki kez içinde % 2 FCS (Fetal Calf Serum) bulunan PBS ile 1200 devir/dk. da çevrilerek yıkandı ve % 10 FCS içeren RPMI 1640 medium ile hücreler $4x10^6$/ml olacak şekilde sulandırıldı.

Zimozanla aktive serumun hazırlanması : Sağlıklı ABRh (+) üç donörden alınan kan oda ısısında pıhtılaşması için 20 dakika bekletildikten sonra 1400 devir/dk. da 15 dakika çevrilerek serum ayrıldı ve

serumlar karıştırıldıktan sonra komplemanı alternatif yoldan aktive et mek için 5 mg/ml zimozan A (Sigma chemical Co.St.Louis Mo. USA) ile karıştırıldı. Bir saat 37°C de bekletildi, süre sonunda 600 g de 20 dakika çevrilerek zimozan çöktürüldü. Zimozanla aktive serumun kemotaktik aktivesi normal hücrelerle kontrol edildikten sonra küçük bölümlere (0.4 ml) ayrılarak —20°C de donduruldu ve çalışma süresince aynı serum RPMI 1640 ile 1/10 oranında sulandırıldıktan sonra kullanıldı.

Milipore filtre yöntemi : Boyden'in (2) tanımladığı yöntem bazı değişiklikler yapılarak uygulandı. Skyes Moore çelik kameraları (Bellco Glass Co. Vineland NJ. USA) kullanıldı. Lenfosit sayısı $4x10^6$/ml'ye ayarlandı. Lenfositler için 5 μm olan filtreler kullanıldı. Skyes Moore kameraları milipore filtre ile ayrılan alt ve üst bölümlerden oluşmaktadır. Alt bölüme kemotaksisi değerlendirmek için 0,6 ml 1/10 ZAS veya random migrasyonu (rastgele göç) değerlendirmek üzere RPMI 1640, üst bölüme 0,5 ml hücre kondu ve üç saat % 5 CO_2 içeren ortamda 37°C de bekletildi. Süre sonunda kameralar açılarak filtreler üst kısım üstte olacak şekilde alındı ve hemotoksilen eosin ile boyandı. Boya sonunda filtre üzerine bir damla immersiyon yağı damlatıldı, lam lamel arasına konuldu. Bir mikroskop alanında filtre içinde en ileri giden üç hücrenin gittikleri mesafe mikrometre yardımı ile ölçüldü. Bu ölçümler filtrede en az altı alanda yapıldı ve bütün bu ölçümlerin ortalaması sonuç olarak değerlendirildi. Bu yöntemde ZAS/medium değerleri kemotaktik indeks olarak alındı. Sonuçların istatistiksel değerlendirmesi iki aritmetik ortalama arası farkın önemlilik testi (t testi) ile yapıldı (17).

BULGULAR

Klinik bulgular : Sağlıklı kontrol grubunu yaşları 19 - 28 arasında değişen 16 gönüllü birey oluşturdu. Cep derinliği 1.60 ∓ 0.06 mm. olan bu kişilerde, Russell periodontal indeks ortalaması ise 0.23 ∓ 0.06 olarak hesaplandı. Juvenil periodontitis grubunu oluşturan 17 hastanın yaşları 15 ile 23 arasında olup, ortalaması 19 ∓ 0.5 olarak bulundu. Bu grupdaki birinci molar dişler için cep derinliği ortalaması 4.38 ∓ 0.18 mm, bir numaralı dişler için ise bu değer 3.66 ∓ 0.10, 5.65 ∓ 0.20 olarak saptandı.

Juvenil periodontitisli hastaların incelenen klinik parametreleri (cep derinliği, Russell periodontal indeksi) açısından sağlıklı kontrol grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak önemli farklılıklar bulundu ($P<0.05$).

Labaratuvar bulguları : Araştırmamızda, kontrol grubunun lenfosit kemotaksisi değişim sınırları 51.25 — 67.1 olup, ortalaması 59.02∓1.49 μm, olarak bulundu. Random migrasyon değerleri ortalaması 21.21∓0.78 μm., değişim sınırları 15 — 28.2 idi. Kemotaktik indeks değerleri ise 2.20 ile 3.85 arasında ve ortalaması 2.83∓0.13 olarak belirlendi.

Juvenil periodontitisli grubun lenfosit kemotaksisi değerleri ortalaması 36.90∓1.53 μm olup, değişim sınırları 21.6 — 51.6 olarak bulundu. Aynı grubun random migrasyon değerleri 10.6 — 24.3 arasında, ortalaması ise 17.98∓0.76 μm. olarak belirlendi.

Kemotaktik indeks değerleri ortalaması ise 2.06∓0.07 μm olup, değişim sınırları ise 1.56 — 2.61 idi (Tablo I).

TABLO I. Juvenil periodontitisli hastalarda ve sağlıklı kontrollerde lenfosit kemotaksisi ve random migrasyonu.

	No.	ZAS'a doğru katedilen mesafe (Kemotaksis) X ∓ SH (μm)	Medium'a doğru katedilen mesafe (Random migrasyon) X ∓ SH (μm)	Lenfosit Kemotaktik indeksi
Juvenil Periodontitis	17	36.90∓ 1.53 (21.6 —51.6)*	17.98∓ 0.76 (10.6 —24.3)	2.06∓0.07 (1.56—2.61)
Sağlıklı Kontrol grubu	16	59.02∓ 1.49 (51.25—67.1)	21.21∓ 0.78 (15—28.2)	2.83∓0.13 (2.20—3.85)
		$p<0.01$	$p<0.01$	$p<0.01$

No : Denek sayısı X = aritmetik ortalama

SH : Standart hata

* : Parantez içinde değişim sınırları verilmiştir.

Araştırmamızdan elde edilen bu bulgular istatistiksel olarak değerlendirildiğinde, juvenil periodontitisli hastaların lenfosit kemotaksis, random migrasyon ve kemotaktik indeks değerleri, kontrol grubu değerlerinden önemli derecede düşük bulundu ($P<0.01$) (Tablo I).

TARTIŞMA

Nötrofillerin, makrofajların ve lenfositlerin enfeksiyon bölgesinde veya hasara uğramış dokularda toplanmaları bağışıklık sistemin temel olaylarından birini oluşturur (20, 23). Bu fonksiyonlardaki herhangi bir bozukluk, enfeksiyonlara hassasiyetin artmasına yol açabilir. Juvenil periodontitisli hastalarda nötrofil kemotaksisinin düşük olduğu bildirilmiştir (3, 4, 18, 19).

Lenfosit kemotaksisi konusundaki çalışmalar son yıllarda önem kazanmıştır. Nötrofil ve monositler gibi lenfositlerin de enfeksiyon bölgesine gelmeleri kemotaktik aktiviteleri aracılığı ile olmaktadır (12, 22). Araştırmamızda juvenil periodontitisli hastaların lenfosit kemotaksisi ve random migrasyonları kontrol grubuna kıyasla önemli derecede düşük bulunmuştur ($P<0.01$). Literatürde Juvenil periodontitisli hastalarda lenfosit kemotaksisinin araştırıldığı bir çalışmaya rastlanmadığından çalışmamızın sonuçlarını karşılaştıramadık. Ancak literatür incelendiğinde Juvenil periodontitisli hastalarda çeşitli lenfosit fonksiyonlarının araştırıldığı ve lenfositlerin mitojenlere ve çeşitli antijenlere karşı blastik transformasyon cevabının normallere göre daha yüksek olduğu, ancak bazı plâk bakterilerine özellikle gram-bakterilere karşı ise cevapsız oldukları bildirilmiştir. Yine bu hastalarda blastogenesisin bozuk olmasına karşın, aynı antijenlerle makrofaj migrasyonunu inhibe eden faktörlerin oluştuğunu saptamışlardır (5, 6).

Juvenil periodontitisli hastalarda, lenfositlerin plâk antijenlerine karşı cevabını inceleyen Suzuki ve ark. (15, 16) bu cevabın sağlıklı bireylere göre azalmış olduğunu saptamışlardır. Tedavi sonrası 6. ayda ve 12. ayda lenfosit cevabını inceleyen araştırıcılar, 6. ayda azalmış blastojenik cevabın değişmediğini, 12. ayda ise normale döndüğünü bildirmişlerdir.

Shenker ve ark. (11) juvenil periodontitisde baskın olarak gözlenen Actinobacillus actinomycetemcomitans'ın mitojenlere karşı lenfosit cevabını inhibe ettiğini göstermişlerdir. Yine aynı araştırıcılar Actinobacillus actinomycetemcomitans'ın Y_4 şuşunun, T baskılayıcı hücrelerini aktive edip, T yardımcı hücrelerinin süpresyonuna neden olduğunu bildirmişlerdir (10). Ancak literatürde T hücresi alt grupları ile lenfosit kemotaksisi ilişkisinin açıklandığı bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Juvenil periodontitisli hastalarda gözlenen nötrofil kemotaksisindeki bozukluk bazı yazarlara göre humoral, bazılarına göre ise hücresel nedenlere bağlanmıştır. Bu hastalarda serumda nötrofil kemotaktik cevabı inhibe eden iki humoral faktör, CDI (cell-directed inhibitor) (hücreye yönelik inhibitör), CFI (chemotactic factor inactivator) (kemotaktik faktör inaktivatörü) gösterilmiştir. Bunun yanısıra J. periodontitisde hakim olarak bulunan Actirobacillus actinomycetemcomitans'ın nötrofillerin kemotaksisini inhibe ettiği gösterilmiştir (4, 8, 18, 19).

Çalışmamızda, hastalarda saptadığımız lenfosit kemotaksisindeki düşüklük benzer mekanizmalara bağlı olabilir. Ancak araştırmamızda, bu düşüklüğün mekanizmasını açıklamaya yönelik bir çalışma yapılmamıştır.

Kanımızca juvenil periodontitisli hastalarda lenfosit kemotaksisi bozukluğunun nedenini açıklayabilmek için daha ileri düzeyde araştırmalara gerek vardır.

ÖZET

Bu çalışmada, 17 juvenil periodontitis ve aynı yaş grubundaki 16 sağlıklı bireyin lenfosit kemotaksisi incelendi. Juvenil periodontitisli hastaların lenfosit kemotaksis, random migrasyon ve kemotaktik indeks değerleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında önemli derecede düşük bulundu.

SUMMARY

LYMPHOCYTE CHEMOTAXIS IN PATIENTS WITH JUVENILE PERIODONTITIS

In this study, the lymphocyte chemotaxis studies were performed in 17 patients with juvenile periodontitis and 16 healthy, age-matched subjects. The lymphocyte chemotaxis, random migration and chemotactic index of patients were found to be significantly lower than controls.

KAYNAKLAR

1 — Baer, P.N. : The case for periodontozis as a clinical entity. J. Periodontol., 42 . 516, 1971.

2 — Boyden, S.V. : The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen of polymorphonuclear leukocytes and monocytes. J. Exp. Med. 115 : 453, 1962.

3 — Clark, R.A., Page, R.C., Wilde, G. : Defective neutrophil chemotaxis in juvenile periodontitis. Infect and Immun., 18 : 694, 1977.

4 — Lavine, w.S., Maderazo, E.G., Stolman, J., Ward, P.A., Cogen, R.B., Greenblatt, I., Robertsson, P.B. : Impaired neutrophil chemotaxis in patients with Juvenile and rapidly progressing periodontitis. J. Periodont. Res. 14 : 10, 1979.

5 — Lehner, T., Wilton, J.M.A., Ivany, L., and Manson, J.D. : Immunological aspects of Juvenile periodontitis (periodontosis). J. Periodont. Res. 9 : 261, 1974.

6 — Manson, J.D., and Lehner, T. : Clinical features in juvenile periodontitis (Periodontosis). J. Periodontol. 45 : 636, 1974.

7 — Mc Cluskey, R.J., Bennocciral, B. and Mc Cluskey, J.W. : Studies on the specifity of the cellular infiltrate of delayed hypersensitivity reactions. J. Immunol, 98 : 466, 1963.

8 — Sandholm, L. : Cellular host response in juvenile periodontitis, J. Periodontol. 56 : 359, 1985.

9 — Saxen, Leena : Juvenile periodontitis. J. Clin. Periodont. 7 : 1, 1980.

10 — Shenker, B.J., Mc Arthur, W.P. and Tsa : C-C. : Immune supression induced by Actinobacillus actinomycetemcomitans I. Effects on human peripheral blood lymphocyte responses to mitogens and antigens. J. Immunol 128 : 148, 1982.

11 — Shenker, B.J., Tsai, C.-C. and Taichman, N.S. : Supression of lymphocyte responses by Actinobacillus actinomycetemcomitans. J. Periodont. Res. 17 : 462, 1982.

12 — Shimokowa, Y., Harta, S., Higuchi, Y. and Hayashi, H. : Lymphocyte chemotaxis in inflammation III. Br. J. Exp. Path. 63 : 355, 1982.

13 — Slots, J. : The predominant cultivable organisms in juvenile periodontitis. Scandinavian Journal of Dental Research. 84 : 1, 1976.

14 — Slots, J., Reynolds, H.S., Genco, R.J. : Actinobacillus actinomycetemcomitans in human periodontal disease : a cross-sectional microbiological investigation. Infect and Immun. 29, 1013, 1980.

15 — Suzuki, J.B., Burger, B., and Falkler, W. : In vitro Lympohocyte responsiveness to plaque antigens in patients with juvenile periodontitis (Abstr. 1251). J. Dent. Res. 61 : 317, 1982.

16 — Suzuki, J.B., Park, S.K., Nauman, R.K., and Falkler, W.A. : Lymphocyte AMLR and neutrophil function following periodontal therapy (Abstr. 162) J. Dent. Res. 62 : (Special Issue) 667, 1983.

17 — Sümbüloğlu, K. : Sağlık bilimlerinde araştırma teknikleri ve istatistik. Sayfa 116, Matiş Yayınları, Ankara, 1978.

18 — Van Dyke, T.E., Horoszewicz, H.U., Cianciola, L.J., Genco, R.J. : Neutrophil chemotaxis dysfunction in human periodontitis. Infect and Immun. 27 : 124, 1980.

19 — Van Dyke, T.E., et al. : Periodontal disease and impaired neutrophil function. J. Periodont. Res. 17 : 492, 1982.

20 — Ward, P.A., Gallin, J.I., Quie, P.G. : Leucocyte chemotaxis. Sayfa : 405, Raven Press, New York, 1978.

21 — Ward, P.A., Remold, H.G. and David, J.R. : Leukotactic factors produced by sensitized lymphocytes. Science 163 : 1079, 1969.

22 — Wilkinson, P.C., Roberts, J.A., Russel, R.J. and Mc Laughlin, M. : Chemotaxis of mitogen activated human lymphocytes and the effects of membrane active enzymes. Clin. Exp. Immunol 25 : 280, 1976.

23 — Zigmond, S.H. : Chemotaxis by polymorphonuclear leukocytes. J. Cell. Biol. 77 : 269, 1978.