



Η επίδραση του λιποπολυσακχαριδίου (LPS) από το *P. gingivalis* στην έκφραση και έκκριση προφλεγμονωδών διαμεσολαβητών στα ανθρώπινα μαστοκύτταρα και η συνάφειά του με την περιοδοντική φλεγμονή: μελέτη in vitro

The effect of *P. gingivalis* LPS on the expression and release of pro-inflammatory mediators in human mast cells and its relevance with periodontal inflammation: an in vitro study

Περίληψη

Τα μαστοκύτταρα (MC) είναι ανοσοκύτταρα ενδογενή στους ιστούς τα οποία συμβάλλουν σε ποικιλία αλλεργικών και φλεγμονωδών παθήσεων, συμπεριλαμβανομένης της περιοδοντικής νόσου, μέσω της έκκρισης κυτοκινών, χημοκινών και πρωτεολυτικών ενζύμων. Το *Porphyromonas gingivalis* (*P. g*) αναγνωρίζεται ευρέως ως κύριο παθογόνο στην ανάπτυξη και εξέλιξη της περιοδοντίτιδας. Στη συγκεκριμένη μελέτη συγκρίναμε τις επιδράσεις των λιποπολυσακχαριδίων (LPS) από τα *P. g* και *E. coli* στην έκφραση και παραγωγή του παράγοντα νέκρωσης των όγκων (TNF), του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (VEGF) και της χημειοτακτικής πρωτεΐνης των μονοκυττάρων (MCP-1) από τα ανθρώπινα MC. Τα ανθρώπινα MC της LAD2 (ανεπάρκεια προσκόλλησης λευκοκυττάρων) διεγέρθηκαν με LPS από *P. g* ή από *E. coli* (1μg/ml). Τα MC διεγέρθηκαν επίσης με SP (ουσία P) (2 μM) η οποία χρησίμευσε ως ουσία θετικού ελέγχου ή μόνο με το μέσο ως ουσία αρνητικού ελέγχου. Μετά από 24 ώρες, συλλέχθηκαν και αναλύθηκαν τα κύτταρα και τα υπερκείμενα υγρά για

Ηρώ Παλάσκα, DMD, MS^{1,4}, Ελένη Γκαγκάρη, DMD, PhD² και Θεοχάρης Κ. Θεοχαρίδης, MS, MPhil, PhD, MD^{1,2,3}

¹ ITI Fellow, Barts and the London School of Dentistry, London, UK, Εργαστήριο Μοριακής Ανοσοφαρμακολογίας και Ανακάλυψης Φαρμάκων, Τμήμα Ολοκληρωμένης Φυσιολογίας και Παθολογίας, Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Tufts, 136 Harrison Avenue, Βοστώνη, Μασαχουσέτη

² Κλινικές Στοματικής Ιατρικής, Νοσοκομείο Αφροδισίων & Δερματικών Νόσων Ανδρέας Συγγρός, Τμήμα Δερματολογίας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Αθηνών

³ Τμήμα Εσωτερικής Παθολογίας, Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Tufts, 136 Harrison Avenue, Βοστώνη, Πολιτεία Μασαχουσέτης, ΗΠΑ

⁴ Ιατρική και Οδοντιατρική Σχολή Barts and The London, Πανεπιστήμιο Queen Mary του Λονδίνου, Λονδίνο, ΗΒ

Iro Palaska, DMD, MS^{1,4}, Gagari Eleni, DMD, PhD² and Theoharis C. Theoharides, MS, MPhil, PhD, MD^{1,2,3}

¹ ITI Fellow, Barts and the London School of Dentistry, London, UK, Molecular Immunopharmacology and Drug Discovery Laboratory, Department of Integrative Physiology and Pathobiology, Tufts University School of Medicine, 136 Harrison Avenue, Boston, MA

² Oral Medicine Clinics, A. Sygros Hospital of Dermatologic and Venereal Diseases, Department of Dermatology, School of Medicine, University of Athens

³ Department of Internal Medicine, Tufts University School of Medicine, 136 Harrison Avenue, Boston, MA

⁴ Bart's and The London Medical and Dental School, Queen Mary University of London, London, UK

Abstract

Mast cells (MCs) are tissue-resident immune cells that participate in a variety of allergic and inflammatory conditions including periodontal disease through the release of cytokines, chemokines and proteolytic enzymes. *Porphyromonas gingivalis* (*P. g*) is widely recognized as a major pathogen in the development and progression of periodontitis. Here we compared the effects of lipopolysaccharides (LPS) from *P. g* and *E. coli* on the expression and production of tumor necrosis factor (TNF), vascular endothelial growth factor (VEGF) and monocyte chemoattractant protein (MCP-1) by human MCs. Human LAD2 MCs were stimulated with LPS from either *P. g* or *E. coli* (1μg/ml). MCs were also stimulated with SP (2 μM) serving as the positive control or media alone as the negative control. After 24 h, the cells and supernatant fluids were collected and analyzed for β-Hexosaminidase (β-hex) spec-

β-εξοζαμινιδάση (β-hex) με τη φασματοφωτομετρική μέθοδο, η έκκριση TNF, VEGF και MCP-1 με τη μέθοδο ELISA και της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (PCR) για τη γονιδιακή έκφραση των διαμεσολαβητών, αντίστοιχα. Προκειμένου να αξιολογηθεί ο λειτουργικός ρόλος των υποδοχέων τύπου Toll (TRL) στην έκκριση διαμεσολαβητών, πραγματοποιήθηκε προ-επώαση των MC με πολυκλωνικό αντίσωμα anti-TLR2 ή anti-TLR4 (2 μg/ml) για 1 ώρα πριν από τη διέγερση με LPS. Όταν τα MC διεγέρθηκαν με SP (2 μM), ανιχνεύθηκε στατιστικά σημαντική έκκριση β-hex καθώς και έκκριση TNF, VEGF και MCP-1. Η διέγερση των MC με LPS δεν προκάλεσε απώλεια κοκκίων με βάση την έλλειψη της έκκρισης β-hex. Ωστόσο, τα LPS διεγείρουν την έκφραση και έκκριση TNF, VEGF και MCP-1. Επιπλέον, διαπιστώθηκε ότι τα LPS διεγείρουν τον TNF μέσω της οδού του TLR-2. Η έκκριση VEGF απαιτεί τον συνδυασμό TRL-2 και TRL-4, ενώ η έκκριση MCP-1 ήταν ανεξάρτητη από τους TLR. Το συμπέρασμα που προέκυψε ήταν ότι το LPS από *P. g* διεγείρει τα ανθρώπινα MC για την παραγωγή και έκκριση TNF, VEGF και MCP-1. Επομένως, τα MC μπορεί να εμπλέκονται στις φλεγμονώδεις διεργασίες που είναι υπεύθυνες για την περιοδοντική νόσο.

Περιοδοντολογικά Ανάλεκτα 2016, 25:51-66

Λέξεις κλειδιά: περιοδοντίτιδα, LPS, μαστοκύτταρα, προ-φλεγμονώδεις διαμεσολαβητές

trophotometrically, TNF, VEGF and MCP-1 release by Elisa and real-time polymerase chain reaction (PCR) for mediator gene expression, respectively. To assess the functional role of toll-like receptors (TRL) in mediator release, MCs were pre-incubated with either anti-TLR2 or anti-TLR4 (2 μg/ml) polyclonal antibody for 1 h before stimulation with LPS. When MCs were stimulated with SP (2 μM), there was a statistically significant β-hex release as well as release of TNF, VEGF and MCP-1. Stimulation of MCs with LPS did not induce degranulation based on the lack of β-hex release. However, LPS stimulated expression and release of TNF, VEGF and MCP-1. In addition, it was shown that LPS stimulated TNF through TLR-2 pathway. VEGF release required both TRL-2 and TRL-4 whereas release of MCP-1 was independent of TLRs. It was concluded that *P. g* LPS activates human MCs to generate and release TNF, VEGF and MCP-1. MCs may, therefore, be involved in the inflammatory processes responsible for periodontal disease.

Analecta Periodontologica 2016, 25:51-66

Key words: periodontitis, LPS, mast cells, pro-inflammatory mediators