

دراسة الفعالية التثبيطية للزايليتول في الحركي الخلوي IL-1 β المستحث بعديد السكريد الشحمي المستخلص من بكتريا *A. actinomycetecomitans*

حسين سعيد عباس المفرجي* أ.م.د. هيام عبد الرضا العواد

جامعة كربلاء /كلية التربية للعلوم الصرفة

*بحث مستقل من رسالة ماجستير للباحث الاول

الخلاصة :

عزلت (22) عزلة من *Aggregatibacter actinomycetecomitans* من (70) شخصا من المرضى المصابين بالتهابات ما حول السن والفترة من شباط 2013 وحزيران 2013 و نسبة الإصابة كانت (31.4%) وشخصت البكتريا عن طريق إجراء الاختبارات من الشكلية والكيموحيوية. تم استخلاص عديد السكريد الشحمي (LPS) من البكتريا باستخدام عدة الاستخلاص (LPS Extraction Kit) تم اختبار تأثير LPS في حث السايتوكينات ومنها الحركي الخلوي IL-1 β عن طريق تقدير مستوياتها بتقنية الأليزا (ELISA). وهدفت الدراسة الى اختبار الفعالية التثبيطية للزايليتول في الفعل الاستحثاثي ل LPS في السايتوكينات عن طريق الحقن الموضعي ل LPS بجرعتين في لثة الجرذان الذكور وقسمت الى ثلاث مجاميع حقنت الاولى بعديد السكريد الشحمي، وحقنت الاخرى بالزايليتول مع عديد السكريد الشحمي، اما الاخيرة فقد حقنت بالمحلول الملحي الفسيولوجي وعدت كمجموعة سيطرة ، واطهرت النتائج وجود فروق معنوية بين المجاميع وزيادة مستويات السايتوكينات في مصل الجرذان بعد 24 و 48 ساعة من الحقن واعلى قيمة سجلت في المجموعة المعاملة ب LPS وللجرعتين وكانت (33359.50 & 31477.83) بيكو غم/مل للحركي الخلوي IL-1 β بالجرعة الأولى، اما الثانية فكانت (31727.83 & 33842.83) بيكو غم/مل بالتتابع أيضا ومقارنة بالسيطرة للجرعة الثانية كانت (19043.66 & 21276.66) بيكو غم/مل على التوالي، وبينت الدراسة ايضا ان الزايليتول قد يثبط حث LPS للحركي الخلوي IL-1 β في المجموعة المعاملة بالزايليتول مع LPS وحصول انخفاض معنوي عند مقارنتها بمجموعة LPS والسيطرة والتي كانت (25634.66 & 26234.66) بيكو غم/مل على التوالي للجرعة الأولى، اما الجرعة الثانية فكانت (26340.38 & 26801.94) بيكو غم/مل بالتتابع أيضا، وبذلك نستنتج ان للزايليتول فعالية تثبيطية ضد حث عديد السكريد الشحمي لإنتاج السايتوكينات الالتهابية.

Abstract:

Isolated 22 isolation from *Aggregatibacter actinomycetecomitans* of (70) people from patients with Periodontitis for the period between the February 2013 to June 2013 and infection rate was (31.4%) and bacteria diagnosed by conducting tests of morphological and biochemical. Lipopolysaccharide (LPS) was extracted from bacteria using (LPS Extraction Kit). The effect LPS was tested to induce cytokines, including cytokine IL-1 β by estimating the levels of technology (ELISA). Study aimed to the inhibitory effectiveness of xylitol on LPS inducement by local injection for LPS two doses in gingivalis male rats which were divided into three groups injected first with LPS, injected Other xylitol with LPS, either was injected with normal saline promised as a control. The results showed significant differences the groups, and increased levels of cytokines in the serum of rats after 24 and 48 h of injection, the highest value recorded in the group treated with LPS and two doses was (33359.50 & 31477.83) Pico g/ml for interleukin IL-1 β first dose after 24-48 h respectively, compared to control (18810.33 & 21110.00) Pico g / ml for the first dose, while the second was (31727.83 & 33842.83) Pico g / ml sequentially as well and compared to control for

the second dose was (19043.66 & 21276.66) Pico g / ml respectively, the study also showed that xylitol may inhibited LPS induced IL-1 β in second group and decrease significant when compared to the group LPS and control, which were (25634.66 & 26234.66) Picot g / ml, respectively, for the first dose, while the second was (26340.38 & 26801.94) Pico g / ml sequentially as well, and thus conclude that the xylitol inhibition effectiveness of against LPS induced to produce inflammatory cytokines.

المقدمة: Introduction

إن أمراض ما حول السن (Periodontal Diseases) هي إصابات في المنطقة المحيطة بالسن وغالباً ما تكون على شكل التهابات تصيب هذه المنطقة وتؤدي إلى حدوث تلف أو تشوه في التراكيب المساندة للسن والتي تشمل اللثة (Gingiva)، وروابط ما حول السن (Periodontal ligament)، والعظم السني (Supporting alveolar bone)، أو هي عملية التهابية موضعية للتراكيب الداعمة للأسنان تقود إلى تحطيم الأنسجة المرتبطة بها. وأكثر هذه الإصابات شيوعاً هي التهاب اللثة (Gingivitis) والتهاب ما حول السن (Periodontitis) وغالباً ما تكون إصابات بكتيرية (Bacterial infection) ⁽¹⁾ وهذه الإصابات لا يكون تأثيرها مقتصر على الفم فقط فهي قد تؤثر على الجسم وأجهزته بصورة عامة وبطرق مختلفة، حيث تشارك إلى حد كبير بالأمراض المزمنة الأخرى كمرض الاوعية الدموية القلبية (Cardiovascular disease) وداء السكري (Diabetes) والتهاب المفاصل الرثوي (Rheumatoid Arthritis) مما يزيد خطورة وتطور هذه الأمراض ⁽²⁾. تعدّ الأحياء المجهرية لا سيما البكتيريا جزءاً أساسياً من مكونات الفلورا الطبيعية Normal flora لتجويف الفم Oral cavity ويعدّ وجودها ضرورياً للعمليات التي تحصل في هذا المكان، فضلاً عن ذلك فإن معظم أمراض الفم والأسنان تحصل بشكل مباشر أو غير مباشر بواسطة أنواع مختلفة من هذه الأحياء المجهرية ومنها البكتيريا ⁽³⁾. وهناك أكثر من 700 نوع من البكتيريا المختلفة في التجويف الفمي وهي أكثر من أي جزء في جسم الإنسان حيث إن لهذه الأنواع القدرة على استعمار وغزو التجويف الفموي ⁽⁴⁾، وهناك تقريباً 10-30 نوعاً من هذه البكتيريا هي المسؤولة عن أمراض ما حول السن ومعظمها من نوع السالبة لملون غرام لاهوائية واختيارية لاهوائية G-ve. وان ثلاثة أنواع من هذه البكتيريا هي المسببات الرئيسية للتهابات ما حول السن كما أنها الأكثر وجوداً في هذه الإصابات وتعد مؤشراً مفيداً على فعالية المرض وخطورة فقدان ارتباط الأسنان باللثة، وهذه الأنواع هي:

Aggregatibacter actinomycetemcomitans, Propyromonas gingivalis & Tannerella forsythia ⁽⁵⁾

فضلاً عن ذلك فإن هناك أنواعاً أخرى تعدّ أيضاً من مسببات التهابات ما حول السن، ومن هذه الأنواع:

Campylobacter rectus, Micromonas micros, Prevotella intermedia & Fusobacterium nucleatum. ⁽⁶⁾

ويعدّ التهاب ما حول السن (Periodontitis) حالة متطورة من التهاب اللثة وهو واحد من أهم المشاكل الصحية في أمراض ما حول السن ويعرف بأنه مرض التهابي يصيب الأنسجة الداعمة للسن ويؤثر بشكل بالغ على صحة الفم للبالغين حول العالم ⁽⁷⁾. وتحدث بسبب العلاقة المعقدة بين البكتيريا السالبة لملون غرام اللاهوائية واللاهوائية اختيارية G-ve ودفاعات الجسم (Host defenses). تؤدي هذه الحالة المرضية إلى حدوث التهاب في اللثة وجعلها تنزف بسهولة كما تؤدي إلى تكوين جيوب التهابية في المنطقة المحيطة بالسن وإذا ما استمرت الحالة فإنها تصل إلى جذر السن، كما أنها تعمل على تلف الأنسجة المحيطة بالسن ⁽⁸⁾. وقد تتحول الإصابة بالتهاب ما حول السن إلى حالة مزمنة تسمى بالتهاب ما حول السن المزمن (Chronic Periodontitis) وهي حالة شائعة تصيب الكبار عادة إلا أنه يمكن أن تشاهد في الأطفال أيضاً، وتشترك هذه الحالة مع حالة تراكم الصفيحة السنية والكلس (Calculus)، إذ أن تراكمها يساعد في حدوث وتطور المرض، وحالة أخرى تسمى بالتهاب ما حول السن الشديد (Aggressive Periodontitis) وهي تختلف عن السابقة بسرعة تطور المرض وحصول نزف وألم وقد يصاحب ذلك ارتفاعاً في درجة حرارة الجسم الإنسان وسقوط الأسنان مبكراً وتعد بكتيريا *A. actinomycetemcomitans* المسبب الرئيسي لهذه الحالة بنسبة 90% ⁽⁸⁾. وهذه الدراسة تركزت على بكتيريا *A. actinomycetemcomitans*، حيث تمتلك هذه البكتيريا عدداً واسعاً من عوامل الضراوة والإمراضية وهذه العوامل تكون مرتبطة بالأمراض الحاصلة في منطقة اللثة ومنها الذيفان القاتل لكريات الدم البيض (Leukotoxin)، البكتيريوسين Bacteriocin وطبقة عديد السكريد الشحمي Lipopolysaccharide (LPS) الموجود في الجدار الخلوي، وقابلية الالتصاق بالخلايا الطلائية للفم، وامتلاكها للمحفظة وغيرها من عوامل الضراوة ⁽⁹⁾. ويعد عديد السكريد الشحمي أو السم الداخلي (Endotoxin) من عوامل الأمراض المهمة وهو من المكونات الأساسية لجدران الخلايا السالبة لملون غرام وبسبب موقعه من الجدار الخلوي فهو يتوسط عملية التداخل بين الخلية البكتيرية ومحيطها الخارجي، ويعمل على حماية الخلية البكتيرية من الجزيئات المؤذية والسامة، كما يساعد الخلية البكتيرية على الالتصاق والاستيطان داخل الأنسجة. يعمل عديد السكريد الشحمي المشتق من البكتيريا المسببة لأمراض ما حول السن (Periodontal pathogen) ومنها بكتيريا *A. actinomycetemcomitans* على تنشيط الاستجابة الموضعية لدفاعات الجسم بواسطة حث الخلايا المنتجة للتهاب كالبلاعم الكبيرة والخلايا المفاوية والخلايا الطلائية على إنتاج كميات كبيرة من الساييتوكينات قبل الالتهابية pro-inflammatory ومنها (Interleukin-1 beta (IL-1β التي تعمل على تضخيم الاستجابة المناعية وبالتالي تؤدي إلى تدمير الأنسجة الرابطة لما حول السن التي تتضمن تآكل العظم (Bone resorption) وتحطيم الكولاجين وحث البروتينات المحطمة للأنسجة (tissue-degrading proteinases) ⁽¹⁰⁾. واستخدمت مادة الزايليتول وهو عبارة عن مركب خماسي الكربون متعدد الكحول السكر (Polyol sugar alcohol) وتم استخلاصه من العديد من المصادر الطبيعية ومنها التوت والخوخ والذرة والفراولة ويمكن أن يوجد في النباتات والثمار ⁽¹¹⁾. كما يستخدم في العديد من المنتجات غير المسرطنة non cariogenic منها العلكة Chewing gum ومعجون الأسنان Dentifrice، وغسولات الفم Oral rinses ⁽¹²⁾. ويتم استخدام الزايليتول على نطاق واسع في العديد من المنتجات كالعلكة ومعاجين الأسنان لامتلاكه خصائص مضادة للتسوس وتنشيط النمو البكتيري للعديد من البكتيريا الممرضة في تجويف الفم وأجزاء أخرى من الجسم كاللادن والجزء العلوي للجهاز التنفسي. ويقلل من أعداد البكتيريا المتواجدة باللحاجب والصفيحة السنية Dental plaque. ويثبط الزايليتول إنتاج الحركيات الخلوية المنتجة للوسائط الالتهابية المستحثة بعديد السكريد الشحمي المعزول من الممرضات الرئيسية لأمراض ما حول السن ^(11,13).

المواد وطرائق العمل Materials and Methods :

جمعت (70) عينة من التجويف الفموي للمرضى المصابين بالتهاب اللثة وما حول السن والمراجعين للمركز الصحي التخصصي لطب الاسنان في كربلاء وتراوح أعمار المرضى بين (16-55) سنة ، وأخذت العينات من منطقة ما حول السن Periodontitis بمسحات قطنية معقمة بأشراف طبيب اسنان مختص بأمراض ما حول السن ثم نقلت إلى أنابيب حاوية على الوسط المغذي الناقل (Nutrient broth) وتحت ظروف معقمة ، ثم نقلت العينات المأخوذة إلى المختبر مباشرة وزرعت على الاوساط الزرع الصلبة، تم حضنها لا هوائياً اختيارياً في درجة حرارة 37°م ولمدة 24-48 ساعة. ونقلت المستعمرات اللاتي تمتلك صفات بكتيريا *A. actinomycetecomitans* على موائ مرق نقيع القلب والدماغ (Brain heart infusion broth) وتم استخلاص عديد السكريد الشحمي من بكتيريا *A. actinomycetecomitans* التي تم تنميتها في BHI broth وحُضنت لاهوائياً اختيارياً بدرجة حرارة 37 م لمدة 24-48 ساعة باستخدام عدة استخلاص عديد السكريد الشحمي (LPS Extraction Kit) حسب الشركة المصنعة (Intron Biotechnology South Korea). تم استخدام ذكور الجرذان البيضاء عدد 18 وقسمت الحيوانات الى ثلاثة مجاميع لكل مجموعة ستة حيوانات والتي حققت موضعياً في نسيج اللثة المحيط بالأسنان الخلفية للجرذ بجرعتين وعوملت المجموعة الاولى بعديد السكريد الشحمي والثانية بعديد السكريد الشحمي مضافاً له مادة الزايليتول والثالثة بالمحلول الملحي الفسيولوجي وعدت كسيطرة وبعد اتمام عملية الحقن للمجاميع المختبرة، تم سحب (2-1) مل من عينة الدم (Blood sample) بواسطة محقنه طبية من القلب بطريقة طعنة القلب (Heart Puncture) بعد تخدير الحيوان بالكوروفورم ثم جمع الدم بفترتين بعد 24 و 48 ساعة على التوالي من الحقن ثم حفظت عينات الدم في أنابيب بلاستيكية (Gel tube) ، ثم نبذت الانابيب مركزياً بسرعة 3500 دورة / دقيقة لمدة 10 دقائق لفصل المصل وحفظت العينات تحت درجة حرارة 4-°م في أنابيب إندروف (Eppendroff tubes) واستخدمت لقياس مستوى الحركي الخلوي IL-1 β for Rat للجرذان باستخدام عدة الاليز ELISA Kit (Ray Biotech, Inc. USA). وتم تحليل النتائج إحصائياً بمقارنة المتوسطات باستعمال اختبار أقل فرق معنوي L.S.D تحت مستوى احتمال 0.05.

النتائج و المناقشة Results & Discussion :

تم عزل (22) عزلة من بكتيريا *A. actinomycetecomitans* من (70) عينة للمرضى البالغين والمصابين بالتهاب ما حول السن ، وكانت نسبة الإصابة بهذه البكتيريا هي (31.4%) ، وهذه البكتيريا عبارة عن عصويات قصيرة الشكل Coccobacilli على شكل قضبان، من نوع السالبة لملون غرام G-ve، غير متحركة، لاهوائية اختيارياً، وغير مكونة للأبواغ ، و تمتلك خلاياها المحفظة capsule⁽¹⁴⁾. وتمتاز مستعمرات *A. actinomycetecomitans* بكونها دائرية circular ، محدبة convex ، ملتصق بقوة على سطح الأكار (المزرعة الفتية)، وتنمو بصورة جيدة على الأكار الحاوي على المصل أو الدم وتحت ظروف لا هوائية أو بوجود 5-10 % Co2 ، وهي لا تحتاج إلى عوامل (Nicotinamide Adenin V Dinucleotide) و X (hemin)⁽¹⁵⁾. كما تمتلك هذه البكتيريا عدداً من الصفات البايوكيميائية والتي يمكن تشخيصها من خلالها، ومن هذه الصفات امتلاكها لإنزيم الكتاليز، والبعض من سلالاتها تمتلك الاوكسيديز، وتمتلك خلاياها الإنزيم المحلل للحامض النووي المنقوص الأوكسجين DNase، كما أن لخلاياها القدرة على تحليل الدم، ولا تنتج الأندول، وتخترل النترات، وتخمر بعض أنواع السكريات كاللوكوز⁽¹⁴⁾. تبين نتائج جدول (1) تأثير عديد السكريد الشحمي لبكتيريا *A. actinomycetecomitans* في حث الحركي الخلوي IL-1 β وفعالية الزايليتول التنشيطية للفعل الاستحثاثي ان تركيز الحركي الخلوي IL-1 β يتغير معنوياً بالارتفاع في الحيوانات المحقونة بعديد السكريد الشحمي على مستوى ($P < 0.05$) عند مقارنتها بحيوانات السيطرة، كذلك الحيوانات المحقونة بعديد السكريد الشحمي مع الزايليتول أظهرت فروق معنوية بالانخفاض على مستوى ($P < 0.05$) عند مقارنتها بحيوانات السيطرة والحيوانات المحقونة بعديد السكريد الشحمي. وهناك تغير طفيف بين المجاميع بالنسبة لوقت سحب الدم ولكنه غير معنوي. ويعد الحركي الخلوي IL-1 β من السابتوكينات قبل الالتهابية ويمتلك صفات تنشيطية عديدة التي تنظم العملية الالتهابية حيث وجد انه ينتج من قبل عدة انواع من الخلايا في انسجة ما حول السن مثل الخلايا الوحيدة والبلاعم الكبيرة والخلايا البيضاء متعددة النوى لممرضات ما حول السن لهذه الخلايا على انتاج كميات كبيرة من السابتوكينات تسبب اختلال بالتوازن لا تتناسب مع حجم التحفيز مما يؤدي الى تدمير الانسجة الرابطة لما حول السن وبالتالي فقدان العظم السني⁽¹⁶⁾.

جدول 1 تأثير عديد السكريد الشحمي لبكتريا *A. actinomycetecomitans* في حث الحركي الخلوي $IL-1\beta$ وفعالية الزايليتول التثبيطية.

الجرع	المجاميع المختبرة وكمية الجرعة	الوقت	تركيز $IL-1\beta$ بيكو غم/مل Mean $\pm$ S.E.
الجرعة الاولى A	السيطرة 100 μ l A	24 ساعة a	18810.33 $\pm$ 874. 11
		48 ساعة a	21110.00 $\pm$ 856.78
	LPS 3 μ g/100 μ l B	24 ساعة b	33359.50 $\pm$ 2646.22
		48 ساعة b	31477.83 $\pm$ 2422.30
	3 μ g LPS+X +15 μ l /100 μ l C	24 ساعة c	25634.66 $\pm$ 1886.40
		48 ساعة c	26234.66 $\pm$ 1691.13
الجرعة الثانية A	السيطرة 100 μ l A	24 ساعة a	19043.66 $\pm$ 815.24
		48 ساعة a	21276.66 $\pm$ 751.13
	LPS 3 μ g/100 μ l B	24 ساعة b	33842.83 $\pm$ 2662.02
		48 ساعة b	31727.83 $\pm$ 2483.40
	3 μ g LPS+X +15 μ l /100 μ l C	24 ساعة c	26340.38 $\pm$ 2097.65
		48 ساعة c	26801.94 $\pm$ 463.09

LSD: 2576.97

LPS: المجموعة المعاملة بعديد السكريد الشحمي

LPS+X: المجموعة المعاملة بعديد السكريد الشحمي مع الزايليتول

الحروف الكبيرة المختلفة تدل على وجود فروق معنوية*

الحروف الصغيرة استخدمت للمقارنة بين الوقتين ضمن المجموعة التجريبية**

. اوضحت نتائج الدراسة الحالية من خلال الجدول (1) ان هناك فروق معنوية في مستويات الحركي الخلوي $IL-1\beta$ بين المجاميع المختبرة، حيث يلاحظ ان مستوياته في المجموعة المحقونة بعديد السكريد الشحمي اعلى من مجموعتي السيطرة والمعاملة بعديد السكريد الشحمي مع الزايليتول بسبب فعالية عديد السكريد الشحمي في تحفيز استجابة المضيف من خلال حث الخلايا الالتهابية على انتاج كميات كبيرة من الحركي الخلوي $IL-1\beta$ مما يؤدي الى تحطيم الانسجة الرابطة لما حول السن وهذا يتفق مع عدة دراسات، فقد اشار⁽¹⁷⁾ الى ارتفاع معنوي بمستويات الحركي الخلوي $IL-1\beta$ في مصل الجرذان بعد 24-48 ساعة من معاملتها بعديد السكريد الشحمي لبكتريا *A. actinomycetecomitans* وحسب الجرعة، وان حقن بعديد السكريد الشحمي المستخلص من بكتريا *A. actinomycetecomitans* في نسيج اللثة للجرذان يحث زيادة انتشار الالتهاب وزيادة معنوية في مستويات $IL-1\beta$ إضافة الى زيادة انتاج ناقضات العظم (Osteoclasts) التي تؤدي الى زيادة فقدان العظم⁽¹⁸⁾. اضافة الى ان عديد السكريد الشحمي يحث على زيادة التعبير الجيني للحركي الخلوي $IL-1\beta$ وانتاجه بكميات كبيرة من قبل البلاعم الكبيرة⁽¹⁹⁾، و اشار⁽²⁰⁾ الى وجود مستويات عالية من الحركي الخلوي $IL-1\beta$ في مصل المرضى المصابين بالتهابات ما حول السن. وجد كذلك ان مستويات $IL-1\beta$ تكون عالية في انسجة ما حول السن المريضة مقارنة مع الانسجة السليمة⁽²¹⁾. من الناحية الاخرى فقد ذكر⁽²²⁾ عدم وجود اختلاف في مستويات $IL-1\beta$ في الانسجة المريضة عن السيطرة، فضلا عن ذلك فان تراكيز $IL-1\beta$ العالية كانت مرتبطة بوجود نسبة اصابة عالية من بكتريا *A. actinomycetecomitans* في جيوب ما حول السن⁽²³⁾. لذلك من المحتمل ان تلك التراكيز العالية للحركي الخلوي $IL-1\beta$ في المصل تنشأ أولا في انسجة ما حول السن كرد فعل على تحفيز عديد السكريد الشحمي للبكتريا وبذلك فقد يتوسط العمليات الالتهابية في الانسجة البعيدة عن التجويف الفموي للحيوانات المحقونة، وهذه النتيجة تتفق مع فرضية ان الساييتوكينات الموضعية تجد طريقها الى المجرى الدموي. لذا في هذه الدراسة كشفت ان المستويات المرتفعة للحركي الخلوي $IL-1\beta$ كانت متفقة مع دوره في الالتهاب وانه علامة جيدة لمعرفة التهابات ما حول السن. و اظهرت نتائج الدراسة الحالية ان اضافة الزايليتول مع عديد السكريد الشحمي ادى الى حصول انخفاض معنوي في $IL-1\beta$ ، وتتفق هذه النتائج مع ما توصل له⁽¹³⁾ حيث اثبت ان الزايليتول يثبط حث عديد السكريد الشحمي في $IL-1\beta$ من خلال تثبيط التعبير الجيني لهما وانتاج البروتينات. كذلك يعمل الزايليتول على تثبيط تنشيط العامل النووي كابا المنشط للخلايا البائية nuclear NF- κ B factor kappa الذي يلعب دورا مهما في تنظيم التعبير الجيني للساييتوكينات قبل الالتهابية $IL-1\beta$ محفزا الخلايا البائية على انتاجها للساييتوكينات لدورها الرئيسي في الاستجابة الخلوية للممرضات وبذلك فان الزايليتول يثبط انتاج الساييتوكينات قبل الالتهابية يتوسطها تثبيط تنشيط العامل كابا NF- κ B^(24,13).

المصادر :Referances

1. Bhatavadekar. N. B., & Williams, R. C. (2009). Modulation of the host inflammatory response in periodontal disease management: exciting new directions. *J. Int. Dental* 59: 305–308.
2. Tonetti, M. S., & Van Dyke, T. E. (2013). Periodontitis & atherosclerotic cardiovascular disease: consensus report of the Joint EFP/AAP Workshop on Periodontitis & Systemic Diseases. *J. Clin. Periodontol.*, 40(14):S24-9.
3. Willman, A. N., (1982). Oral Microbiology with Basic Microbiology & Immunology, C. V. Mosby Company, Toronto-London.
4. Graves, D. T.; Li, J., & Cochran, D. L. (2011). Critical review in oral biology & medicine: inflammation & uncoupling as mechanisms of periodontal bone loss, *J. of Dental Res.*, 90 (2) 143–153.
5. Wade, W.G., (2013). The Oral microbiome in health & disease. *Pharmacol. Res.*, 69 (1):137-143.
6. Kebschull, M., & Papapanou, P. N. (2011). Periodontal microbial complexes associated with specific cell & tissue responses. *J. Clin. Periodontol.*, 38(11): 17-27.
7. Dye, B.A. (2012). Global periodontal disease epidemiology. *J. Periodontol* 2000 58(1): 10–25.
8. Cafiero, C. & Matarasso, S. (2013) Predictive, preventive, personalised & participatory; Periodontology the 5Ps age“ has already starte. *The EPMA J.*, 4:16.
9. Nield-Ghrig J. S. & Willmann D. E. (2003). Foundations of Priodontics, for the Dental Hygienist; *Wolters Kluwer Company*.
10. Garlet, G. P. (2010). Destructive and protective roles of cytokines in periodontitis: a reappraisal from host defense and tissue destruction viewpoints. *J. of Dental Res.*, 89(12); 1349-1363.
11. Söderling, E. M., & Hietala-Lenkkeri, A. (2010.) Xylitol & Erythritol Decrease Adherence of Polysaccharide-Producing Oral Streptococci. *Current Microbiol.*, 60:25-29.
12. Holgerson, P.L.; Stecksén-Blicks, C.; Sjöström, I.; Oberg, M., & Twetman, S. (2006.) Xylitol Concentration in Saliva & Dental Plaque after Use of Various Xylitol-Containing Products. *Caries Res.*, 40:393-397.
13. Han, S.J.; Jeong, S.Y.; Nam, Y.J.; Yang, K.H.; Lim, H.S. & Chung, J. (2005). Xylitol inhibits inflammatory cytokine expression induced by lipopolysaccharide from *Porphyromonas gingivalis*. *Clin. Diagnostic & Lab. Immunol.*, 12:1285-1291.
14. Mythreyi, D. & Krishnababa, M. (2012). *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, an Aggressive Oral Bacteria - A Review. *Int. J. of Health Sciences & Res.*, 2 (5).
15. Forbes, B. A.; Sahm, D. F. & Weissfeld, A. S. (2007). Bailey & Scott's diagnostic microbiology, 12th ed. *Mosby, St. Louis, MO*.
16. Jiang, Z.L.; Cuia, Y.; Gaob, R.; Lia, Y.; Fuc, Z.; Zhanga, B., & Guana, G. (2013). Study of TNF- α , IL-1 β and LPS levels in the gingival crevicular fluid of a rat model of diabetes mellitus & periodontitis. *Dis. Markers.*, 34(5):295-304.
17. Noboru, k.; Yusuke, S.; Takachika, S.; Yoshimitsu, A. (2007). Stimulation of TNF- α , IL-1 β . & IL-6 Levels in Rat Serum by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* LPS Challenge. *J. of Med. & Biol.*, 15 (1):1-26.
18. Rogers, J.E.; Li, F.; Coatney, D.D.; Rossa C. Jr.; Bronson, P.; Krieder, J. M.; Giannobile, W. V., & Kirkwood, K. L. (2007). *Actinobacillus actinomycetemcomitans* lipopolysaccharide mediated experimental bone loss model for aggressive periodontitis. *J. Periodontol.*, 78:550–558.
19. Tanabe, S. I., & Grenier, D. (2008). Macrophage tolerance response to *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* lipopolysaccharide induces differential regulation of tumor necrosis factor- α , interleukin-1 β and matrix metalloproteinase 9 secretion. *J. Periodontal Res.*, 43:372–377.
20. Guzeldemir, E.; Cetinkaya, B. & Bulut, S. (2011). Cytokine Profiles in patiante with Rheumatoid Arthritis & Chronic Periodontitis. *Int. Association for Dental Res.*
21. Al-Ghurabi, B. H. (2013). Impact of smokining on the IL-1 β , IL-8, IL-10, IL-17 and TNF- α production in Chronic Periodontitis Patients. *J. of Asian Scientific Res.*, 3(5):462-470.
22. Elkhoul, A., (2011). The efficacy of host response modulation therapy (omega-3 plus low-dose aspirin) as an adjunctive treatment of chronic periodontitis (clinical and biochemical study). *J. Periodontal Res.*, 46(2): 261-268.
23. Kelk, P.; Claesson, R.; Chen, C.; Sjostedt, A. & Johansson, A. (2008). IL-1 β secretion induced by *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans* is mainly caused by the leukotoxin. *Int. J. of Med. Microbiol.*, 298(5-6): 529-541.
24. Yi, E. Y., & Kim, Y. J. (2013). Xylitol inhibits in vitro & in vivo angiogenesis by suppressing the NF- κ B and Akt signaling pathways. *Int. J. of Oncol.*, 10:315-320.