

**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**

**ΤΜΗΜΑ ΟΔΟΝΤΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ**

**ΕΙΔΙΚΕΥΣΗ:ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΣΤΟΜΑΤΟΣ**

**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**Συσχέτιση πολυμορφισμών στα γονίδια της κυκλοοξυγενάσης  
(COX-2) και της μεταλλοπρωτεϊνάσης 9 (MMP-9) με τη χρόνια και  
την επιθετική περιοδοντίτιδα.**

**Παπαδέλλη Αναστασία**

**Οδοντίατρος**

**ΑΘΗΝΑ 2015**

Επιβλέπων Καθηγητής για την εκπόνηση της Μεταπτυχιακής Διπλωματικής Εργασίας  
Επίκουρη Καθηγήτρια κα Βασταρδή Ελένη

Τριμελής Επιτροπή για την αξιολόγηση της Μεταπτυχιακής Διπλωματικής Εργασίας:

- 1.Επίκουρη Καθηγήτρια κα Βασταρδή Ελένη
- 2.Καθηγήτρια κα Κιτράκη Ευθυμία
3. Καθηγητής κος Μαδιανός Φοίβος

Στον πατέρα μου.

## Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε κατά τη διάρκεια της φοίτησής μου στο Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα της Βιολογίας Στόματος της Οδοντιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών. Με την ολοκλήρωση των σπουδών μου θα ήθελα να ευχαριστήσω τους ανθρώπους που συνέβαλλαν στην επιτυχή ολοκλήρωση της προσπάθειας αυτής.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω την Επιβλέπουσα της διπλωματικής μου Επίκουρη Καθηγήτρια κα Βασταρδή Ελένη για τη συμβολή της και την καθοδήγηση σε όλα τα στάδια της εργασίας αυτής.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Καθηγήτρια κα Κιτράκη Ευθυμία για τις γνώσεις και τη βοήθεια που μου προσέφερε αυτά τα δύο χρόνια στα πλαίσια του προγράμματος αυτού.

Επιθυμώ ακόμα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον Καθηγητή κο Μαδιανό Φοίβο για την τιμή που μου έκανε να συμμετάσχει στην τριμελή επιτροπή αξιολόγησης της διπλωματικής μου εργασίας.

Με την περάτωση της παρούσας εργασίας, μου δίνεται η ευκαιρία να ευχαριστήσω τα άτομα εκείνα, χωρίς τη συμβολή των οποίων θα ήταν αδύνατο να την ολοκληρώσω. Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επίκουρο Καθηγητή κο Κιάρη Ιπποκράτη για την παραχώρηση του εργαστηρίου του στη Βιοχημεία, όπου και πραγματοποιήθηκε το εργαστηριακό τμήμα της διπλωματικής μου εργασίας. Επιπρόσθετα, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κα Μιχαηλίδου Βαλεντίνα η οποία παρά το φορτωμένο πρόγραμμά της ήταν πάντα δίπλα μου να με συμβουλευσει και να με καθοδηγήσει.

Ιδιαίτερα ευχαριστώ στον κο Παπαγεωργίου Σπυρίδων για τη βοήθεια του για την πραγματοποίηση της στατιστικής επεξεργασίας των δεδομένων της διπλωματικής μου εργασίας.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τη μητέρα μου για την υποστήριξη και την υπομονή της.

## **ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ**

|   |           |
|---|-----------|
| <b>ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b>   |           |
| <b>ΠΕΡΙΟΔΟΝΤΙΚΗ ΝΟΣΟΣ.....</b>                              | <b>8</b>  |
| ΟΡΙΣΜΟΣ.....  | 8         |
| ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ .....  | 8         |
| ΕΠΙΠΟΛΑΣΜΟΣ.....  | 9         |
| ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ.....   | 10        |
| ΚΥΤΤΑΡΑ ΠΟΥ ΣΥΜΜΕΤΕΧΟΥΝ ΣΤΗΝ ΠΕΡΙΟΔΟΝΤΙΚΗ ΦΛΕΓΜΟΝΗ .....    | 11        |
| ΟΥΣΙΕΣ ΠΟΥ ΣΥΜΜΕΤΕΧΟΥΝ ΣΤΗΝ ΠΕΡΙΟΔΟΝΤΙΚΗ ΦΛΕΓΜΟΝΗ.....      | 12        |
| <b>ΓΕΝΕΤΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ.....</b>                            | <b>20</b> |
| ΓΕΝΕΤΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ ΚΑΙ ΕΠΙΘΕΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΔΟΝΤΙΤΙΔΑ .....     | 20        |
| ΓΕΝΕΤΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ ΚΑΙ ΧΡΟΝΙΑ ΠΕΡΙΟΔΟΝΤΙΤΙΔΑ .....        | 22        |
| ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ ΤΟΥ DNA.....                                  | 23        |
| ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ ΣΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ ΤΗΣ ΚΥΚΛΟΟΞΥΓΕΝΑΣΗΣ 2 (COX-2) ... | 24        |
| ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ ΣΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ ΤΗΣ ΜΕΤΑΛΛΟΠΡΩΤΕΪΝΑΣΗΣ 9 (MMP-9)  |           |
| .....   | 25        |
| <b>ΣΚΟΠΟΣ.....</b>  | <b>25</b> |
| <b>ΥΠΟΘΕΣΗ .....</b>  | <b>25</b> |
| <b>1) ΥΛΙΚΑ-ΜΕΘΟΔΟΣ.....</b>                                | <b>27</b> |
| <b>2) ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....</b>                                 | <b>34</b> |
| <b>3) ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....</b>                                     | <b>49</b> |
| <b>4) ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....</b>                                     | <b>55</b> |

|                                  |           |
|----------------------------------|-----------|
| <b>5) ΑΓΓΛΙΚΗ ΠΕΡΙΛΗΨΗ .....</b> | <b>57</b> |
| <b>6) ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....</b>     | <b>59</b> |

## **ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

## **ΠΕΡΙΟΔΟΝΤΙΚΗ ΝΟΣΟΣ**

### **ΟΡΙΣΜΟΣ**

Ο όρος περιοδοντική νόσος χρησιμοποιείται για να περιγράψει ένα σύνολο φλεγμονωδών καταστάσεων που επηρεάζουν το περιοδόντιο, δηλαδή τους στηρικτικούς ιστούς των δοντιών. Οι ιστοί αυτοί είναι το φατνιακό οστό, η οστεΐνη της ρίζας, τα ούλα και το περιρρίζιο.

### **ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ**

Κατά καιρούς έχουν προταθεί διάφορα συστήματα για την ταξινόμηση των νόσων του περιοδοντίου σύμφωνα με τις εκάστοτε γνώσεις. Η τελευταία ταξινόμηση των νόσων του περιοδοντίου έγινε στο «Παγκόσμιο Συμπόσιο για την Ταξινόμηση των Νόσων και Καταστάσεων του Περιοδοντίου» που διοργανώθηκε από την Αμερικανική Ακαδημία Περιοδοντολογίας (AAP) το 1999. Σύμφωνα με την ταξινόμηση αυτή οι περιοδοντικές νόσοι διακρίνονται ως εξής:

#### **I.Νοσήματα των ούλων**

Νοσήματα ούλων που οφείλονται στην μικροβιακή πλάκα

Νοσήματα ούλων που δεν οφείλονται στην μικροβιακή πλάκα

#### **II.Χρόνια περιοδοντίτιδα**

Εντοπισμένη

Γενικευμένη

#### **III.Επιθετική περιοδοντίτιδα**

Εντοπισμένη

Γενικευμένη

#### **IV.Περιοδοντίτιδα ως εκδήλωση συστηματικών νοσημάτων**



## **V.Νεκρωτικές νόσοι του περιοδοντίου**

## **VI.Αποστήματα του περιοδοντίου**

## **VII.Περιοδοντίτιδα σχετιζόμενη με ενδοδοντικές βλάβες**

## **VIII.Αναπτυξιακές ή επίκτητες δυσμορφίες και καταστάσεις**

Στη χρόνια και την επιθετική περιοδοντίτιδα ο διαχωρισμός σε γενικευμένη και εντοπισμένη γίνεται με βάση την έκταση της προσβολής. Πιο ειδικά ως γενικευμένη χαρακτηρίζεται όταν αφορά >30% του συνόλου των οδοντικών επιφανειών ενώ ως εντοπισμένη όταν αφορά <30% του συνόλου των οδοντικών επιφανειών.

Επιπλέον, η χρόνια περιοδοντίτιδα διακρίνεται με βάση τη βαρύτητα προσβολής σε αρχόμενη όταν η κλινική απώλεια πρόσφυσης είναι 1-2 mm, μέτρια όταν η απώλεια πρόσφυσης είναι 3 ή 4 mm και προχωρημένη εάν είναι >5 mm.

## **ΕΠΙΠΟΛΑΣΜΟΣ**

Οι περιοδοντικές νόσοι προσβάλλουν το 90% του πληθυσμού (Philstrom και συν. 2005). Ωστόσο, η επιδημιολογική έρευνα της χρόνιας περιοδοντίτιδας είναι αρκετά δύσκολη, λόγω της φύσεως της νόσου, της ποικιλότητας της βαρύτητας, της πολυπαραγοντικής αιτιολογίας και της μεγάλης εξάπλωσης στον πληθυσμό. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την ύπαρξη μελετών με αντικρουόμενα αποτελέσματα.

Έρευνες πριν από τη δεκαετία του 1980, καταλήγουν στο συμπέρασμα ότι οι νόσοι του περιοδοντίου αποτελούν σοβαρό πρόβλημα μετά την ηλικία των 35 ετών. Από τη μελέτη του Εθνικού Οργανισμού Υγείας των Η.Π.Α (NHANES III, 1988-1994) φαίνεται ότι ο επιπολασμός εξαρτάται από τον ορισμό της απώλειας πρόσφυσης και την επιλογή του ορίου βαρύτητας. Η κατανομή των περιοδοντικών νόσων έχει μελετηθεί κυρίως στους ενήλικες και προκύπτει ότι οι νεαροί ενήλικες έχουν ελαφρά περιοδοντικά προβλήματα ενώ οι ηλικιωμένοι εμφανίζουν σε μεγαλύτερη

συχνότητα περιοδοντίτιδα αλλά η έκταση της νόσου είναι περιορισμένη. Σύμφωνα με μελέτες στην Ελλάδα, το 39.62% των ενηλίκων εμφανίζει συμπτώματα της νόσου και η κατανομή του αριθμού των συμπτωμάτων είναι συχνότερη στους άνδρες (Τσάμη και συν. 2001, Τσαλίκης και συν. 2001).

Όσον αφορά στην επιθετική περιοδοντίτιδα, πρόκειται για μια σπάνια κλινική οντότητα και σύμφωνα με επιδημιολογικές μελέτες δεν ξεπερνά το 1% του πληθυσμού των βιομηχανικά ανεπτυγμένων χωρών (Κωνσταντινίδης 2003).

## ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ

Η περιοδοντίτιδα είναι μία πολυπαραγοντική νόσος. Ο κύριος αιτιολογικός της παράγοντας όμως είναι η μικροβιακή πλάκα. Οι άλλοι παράγοντες, τοπικοί ή γενικοί που έχουν αναφερθεί κατά καιρούς είναι προδιαθεσικοί/επιβαρυντικοί παράγοντες και όχι αιτιολογικοί. Τέτοιοι προδιαθεσικοί παράγοντες είναι:

α)Τοπικοί: τρυγία, στοματική αναπνοή κ.λ.π.

β)Γενικοί: Κάπνισμα, συστηματικά νοσήματα, γενετικός παράγοντας

Κατά καιρούς έχουν προταθεί διάφορες θεωρίες για την αιτιοπαθογένεια της περιοδοντίτιδας. Αρχικά οι πρώτες παρατηρήσεις οδήγησαν τους ερευνητές στη διατύπωση της θεωρίας της μη ειδικής πλάκας, σύμφωνα με την οποία δεν υπάρχει κάποιο/α μικρόβιο/α που να ενοχοποιείται ως αιτιολογικός παράγοντας για την πρόκληση περιοδοντικών νόσων. Αργότερα, διατυπώθηκε η θεωρία της ειδικής μικροβιακής πλάκας σύμφωνα με την οποία συγκεκριμένα βακτήρια ή συνδυασμένη δράση των βακτηρίων στο βιοϋμένιο προκαλούν περιοδοντική νόσο. Η θεωρία αυτή φαίνεται να εξηγεί ικανοποιητικά συγκεκριμένες περιπτώσεις όπως ελκονεκρωτικές νόσους, ορισμένες περιπτώσεις επιθετικής περιοδοντίτιδας, οξεία στρεπτοκοκκική, οξεία ερπητική ουλίτιδα. Η θεωρία που προσφέρει ικανοποιητική εξήγηση για την αιτιοπαθογένεια των υπόλοιπων περιοδοντικών νόσων είναι η

οικολογική θεωρία. Σύμφωνα με αυτή, η αρχική φλεγμονή στο περιοδόντιο προκαλείται από τη συσσώρευση μικροβιακής πλάκας. Η έναρξη της φλεγμονής προκαλεί αλλαγές στο βιοϋμένιο που ευνοούν την αποίκηση του οικοσυστήματος από άλλα συγκεκριμένα βακτήρια τα οποία ανευρίσκονται στον περιοδοντικό θύλακο σε προχωρημένα στάδια της νόσου.

Η διαδικασία και οι μηχανισμοί μετάπτωσης των περιοδοντικών ιστών από την υγεία στη νόσο ορίζονται ως παθογένεια των νόσων του περιοδοντίου. Από το 1990 και μετά έχουν διαλευκανθεί πολλά σημεία σχετικά με την αιτιοπαθογένεια των περιοδοντικών νόσων. Έτσι, α) έχει τεκμηριωθεί η άποψη της μεικτής βακτηριακής λοίμωξης και ο ρόλος συγκεκριμένων Gram αρνητικών βακτηρίων (Haffajee και Socransky 1994, AAP 1996) β) έχουν αναλυθεί οι λοιμογόνοι παράγοντες των βακτηρίων αλλά και οι παθογενετικοί μηχανισμοί που ενεργοποιούν τα βακτήρια αυτά (Holt και Bramanti 1991, Socransky και Haffajee 1991, Loesche 1993) και γ) έχουν περιγραφεί οι μηχανισμοί δράσης και αλληλεπίδρασης των κυττάρων και των ουσιών που εμπλέκονται στην περιοδοντική φλεγμονή (Seymour 1991, Page και Offenbacher 1997). Τα τελευταία χρόνια έχει προστεθεί και η αναζήτηση του γενετικού υπόβαθρου που διαφοροποιεί την απόκριση του ξενιστή και επηρεάζει την κλινική εικόνα (Hart και Kornman 1997).

#### ΚΥΤΤΑΡΑ ΠΟΥ ΣΥΜΜΕΤΕΧΟΥΝ ΣΤΗΝ ΠΕΡΙΟΔΟΝΤΙΚΗ ΦΛΕΓΜΟΝΗ

Υπάρχουν δυο βασικοί ανοσολογικοί άξονες προστασίας στους περιοδοντικούς ιστούς στους οποίους συμμετέχουν α) η εγγενής ανοσία, δηλαδή τα πολυμορφοπύρρηνα και τα μακροφάγα, και β) η επίκτητη ανοσία, δηλαδή η παραγωγή αντισωμάτων από τα λεμφοκύτταρα. Ο διαχωρισμός των ανοσολογικών αξόνων βασίζεται στην τοπογραφική και χρονολογική σειρά με την

οποία συμμετέχουν στην αμυντική διαδικασία χωρίς όμως ο διαχωρισμός αυτός να είναι απόλυτος καθώς οι διαδικασίες αυτές μπορεί να συμβαίνουν ταυτόχρονα. Ο πρώτος άξονας αφορά στην περιοχή της ουλοδοντικής σχισμής και προϋποθέτει την ενεργοποίηση των αντισωμάτων, του συμπληρώματος και των ουδετερόφιλων πολυμορφοπύρηνων. Ο δεύτερος άξονας αφορά στην περιοχή του συνδετικού ιστού και προϋποθέτει την ενεργοποίηση των μονοκυττάρων και των λεμφοκυττάρων (Miyasaki 1991, Offenbacher 1996, Dennison και Van Dyke 1997). Αρχικά τα ουδετερόφιλα πολυμορφοπύρηννα ενεργοποιούνται και σχηματίζουν ένα τείχος ως απάντηση στα βακτήρια που εντοπίζονται στην ουλοδοντική σχισμή. Εάν τα πολυμορφοπύρηννα αποτύχουν να ελέγξουν τη φλεγμονή στην περιοχή της ουλοδοντικής σχισμής τότε ενεργοποιείται ο δεύτερος άξονας, τα μονοκύτταρα μετατρέπονται σε μακροφάγα στο συνδετικό ιστό, και μαζί με τα λεμφοκύτταρα αναλαμβάνουν τον έλεγχο της φλεγμονής στην περιοχή των περιοδοντικών ιστών.

## ΟΥΣΙΕΣ ΠΟΥ ΣΥΜΜΕΤΕΧΟΥΝ ΣΤΗΝ ΠΕΡΙΟΔΟΝΤΙΚΗ ΦΛΕΓΜΟΝΗ

Οι ουσίες που έχει αποδειχθεί ότι συμμετέχουν στην περιοδοντική φλεγμονή είναι ορισμένοι μεσολαβητές της φλεγμονής, όπως οι προσταγλαδίνες, διάφορες κυτοκίνες και οι μεταλλοπρωτεϊνάσες εξωκυττάριας ουσίας (MMPs).

## A) ΜΕΣΟΛΑΒΗΤΕΣ ΦΛΕΓΜΟΝΗΣ - ΠΡΟΣΤΑΓΛΑΔΙΝΕΣ

Υπάρχουν τέσσερις βασικές προσταγλαδίνες που παράγονται *in vivo*: Η προσταγλανδίνη E2 (PGE2), η προστακυκλίνη (PGI2), προσταγλανδίνη D2 (PGD2) και προσταγλανδίνη P2α (PGF2α). Συνήθως κάθε τύπος κυττάρου παράγει ένα ή δύο κυρίαρχα προϊόντα τα οποία δρουν ως αυτοκρινείς και παρακρινείς μεσολαβητές για να διατηρηθεί η τοπική ομοιόσταση του σώματος. Κατά τη διάρκεια μιας φλεγμονώδους απόκρισης, τα επίπεδα της προσταγλανδίνης αλλάζουν δραματικά. Η παραγωγή των προσταγλανδινών είναι γενικά πολύ χαμηλή στους μη φλεγμαίνοντες ιστούς, αλλά αυξάνει αμέσως σε οξεία φλεγμονή, πριν από τη στρατολόγηση των λευκοκυττάρων και την διείσδυση των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος (Ricciotti et al. 2011).

## Ο ΡΟΛΟΣ ΠΡΟΣΤΑΓΛΑΔΙΝΩΝ

Οι προσταγλαδίνες είναι βιοχημικοί μεσολαβητές της φλεγμονώδους διαδικασίας και στην περιοδοντίτιδα (Offenbacher et al. 1993). Ιδιαίτερα η PGE2 προκαλεί αγγειοδιαστολή, ερύθημα, πυρεξία, έχει οστεοκλαστική δραστηριότητα και διεγείρει τα μακροφάγα και τις ινοβλάστες ώστε να εκκρίνουν μεταλλοπρωτεϊνάσες που καταστρέφουν τον συνδετικό ιστό. Η PGE2 δρα συνεργικά και επιτείνει τη δράση των κυτοκινών IL-1 και TNF-α. Στη δράση των τριών αυτών ουσιών μπορούν να αποδοθούν πολλά φαινόμενα της περιοδοντικής φλεγμονής.

Υπάρχουν πολλά δεδομένα που υποστηρίζουν ότι η PGE2 εμπλέκεται σε μεγάλο βαθμό στην ιστική καταστροφή που παρατηρείται στην περιοδοντίτιδα. Έρευνες

έχουν δείξει αυξημένα επίπεδα της PGE2 στους περιοδοντικούς ιστούς και στο υγρό της ουλοδοντικής σχισμής σε καταστάσεις όπως η ουλίτιδα και η περιοδοντίτιδα (Offenbacher et al. 1986,1989,1992), ενώ η χορήγηση μη στεροειδών αντιφλεγμονωδών ή η περιοδοντική θεραπεία οδηγεί σε ελάττωση των επιπέδων της PGE2.

Η PGE2 είναι γνωστό ότι ελέγχει και ρυθμίζει την οστεοκλαστική δραστηριότητα. Πιο συγκεκριμένα προάγει τη διαφοροποίηση των προστεοκλαστών σε ώριμα κύτταρα και στη συνέχεια δρα απευθείας στις ενεργοποιημένες μορφές τους, προκαλώντας αύξηση του μεγέθους τους, του αριθμού των πυρήνων τους και του μεγέθους της κροσσωτής τους ζώνης. Προκαλεί επίσης έντονη απελευθέρωση ασβεστίου ασκώντας έτσι οστεολυτική λειτουργία. Η PGE2 επιδρά και στους οστεοβλάστες αυξάνοντας την έκφραση του RANKL στην επιφάνειά τους με αποτέλεσμα έτσι να ενισχύεται η οστεοκλαστογένεση (Ho et al. 2008).

## Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΚΥΚΛΟΟΞΥΓΕΝΑΣΗΣ

Οι προσταγλαδίνες ανήκουν στα εικοσανοειδή. Τα εικοσανοειδή είναι παράγωγα του αραχιδονικού οξέος και παράγονται από τη δράση της φωσφολιπάσης A2 στα φωσφολιπίδια της κυτταρικής μεμβράνης πολλών κατηγοριών κυττάρων, κυρίως όμως από τα ουδετερόφιλα πολυμορφοπύρρηνα και τα μακροφάγα. Το αραχιδονικό οξύ μεταβολίζεται με δύο ενζυματικές οδούς, που καταλήγουν σε διαφορετική κατηγορία εικοσανοειδών. Η ενζυματική οδός της κυκλοξυγενάσης (COX) οδηγεί στο σχηματισμό προσταγλαδινών, ενώ η ενζυματική οδός της λιποξυγενάσης οδηγεί στο σχηματισμό των λευκοτριενίων (Marnett και συν. 1999, Κωνσταντινίδης 2003). Η κυκλοξυγενάση έχει δύο ισομορφές, την COX-1 και την COX-2 (Smith και συν. 1996). Οι ισομορφές αυτές κωδικοποιούνται από

διαφορετικά γονίδια αλλά ουσιαστικά καταλύουν την ίδια ενζυματική οδό. Η COX-1 είναι ένα housekeeping ένζυμο που εκφράζεται σε πολλούς ιστούς και είναι η κυρίαρχη μορφή που παρατηρείται στο γαστρικό βλεννογόνο και στα νεφρά. Αναστολή της COX-1 μειώνει την βασική παραγωγή κυτταροπροστατευτικών PGE2 και PGI2 στο στομάχι, οι οποίες μπορούν να συμβάλουν στην γαστρικό έλκος (Ricciotti και συν. 2011). Από την άλλη πλευρά, η COX-2 δεν ανιχνεύεται σε φυσιολογικές συνθήκες αλλά επάγεται η παραγωγή της στη φλεγμονή (Dubois και συν. 1998). Θεωρείται ότι η COX-2 είναι υπεύθυνη για την σύνθεση των προσταγλαδινών σε φλεγμονώδεις διαδικασίες όπως είναι και η περιοδοντίτιδα (Morton & Dongari-Bagtzoglou 2001, Zhang και συν. 2003). Πολλά κύτταρα στους περιοδοντικούς ιστούς, όπως ινοβλάστες, οστεϊνοβλάστες, οστεοβλάστες, επιθηλιακά κύτταρα, ενδοθηλιακά κύτταρα, πολυμορφοπύρρηνα, μονοκύτταρα, και μακροφάγα, ενεργοποιούνται από προφλεγμονώδεις κυτοκίνες (ιντερλευκίνη-1, παράγοντας νέκρωσης των όγκων), αυξητικούς παράγοντες, λιποπολυσακχαρίτες ή από την ίδια την PGE2 (Tai και συν. 1997, Offenbacher & Salvi 1999) και επάγουν την παραγωγή της COX-2. Η COX-2 με τη σειρά της συμμετέχει στο σχηματισμό της PGE2. Επομένως αυτό που συμβαίνει στη περιοδοντική φλεγμονή είναι ότι επάγεται η παραγωγή της COX-2 από τα κύτταρα των περιοδοντικών ιστών, η οποία συνακόλουθα καταλύει την ενζυματική οδό από την οποία παράγεται η PGE2. Η PGE2 με τη σειρά της συμμετέχει μαζί με άλλα μόρια (κυτοκίνες, μεταλλοπρωτεϊνάσες) στην καταστροφή του συνδετικού ιστού και του φατνιακού οστού. Η καταστροφή αυτή έχει ως στόχο την αύξηση του χώρου για την μετανάστευση των αμυντικών κυττάρων στην περιοχή της βλάβης και την εξάλειψη του μικροβιακού παράγοντα.

## B) ΜΕΤΑΛΛΟΠΡΩΤΕΪΝΑΣΕΣ ΕΞΩΚΥΤΤΑΡΙΑΣ ΟΥΣΙΑΣ

Πρόκειται για μια οικογένεια πρωτεολυτικών ενζύμων των οποίων η δράση στους περιοδοντικούς ιστούς έχει μελετηθεί αρκετά (Birkedal-Hansen 1993,1994, Reynolds και Meikle 1997). Αυτή η οικογένεια αποτελείται από τουλάχιστον 15 εξαρτώμενες από ψευδάργυρο ενδοπεπτιδάσες με εξωκυτάρια δράση. Είναι σημαντικές τόσο στη φυσιολογική όσο και στην παθολογική αναδιαμόρφωση των ιστών (Lindhe 2008). Παράγονται από τύπους κυττάρων που βρίσκονται και στους φυσιολογικούς και στους παθολογικούς περιοδοντικούς ιστούς και κυρίως από τις ινοβλάστες, τα ενδοθηλιακά κύτταρα, τα μακροφάγα και τα πολυμορφοπύρρηνα ( Tonetti και συν. 1993, Hamanway και συν.1994, Ingman και συν. 1994, Meikle και συν. 1994). Τα κύτταρα αυτά έχουν γονίδια τα οποία ρυθμίζουν την παραγωγή των μεταλλοπρωτεϊνών μετά από διέγερση. Η διέγερση των γονιδίων αυτών γίνεται από ουσίες όπως οι κυτοκίνες ( IL-1) , ο παράγοντας νέκρωσης των όγκων (TNF-α) και ο αυξητικός παράγοντας μετασχηματισμού (TGF-β) αλλά και από τα προϊόντα μεταβολισμού των βακτηρίων τους και τους πολυσακχαρίτες τους ( Sorsa και συν. 1992, Page και Offenbacher 1997 ).

Οι μεταλλοπρωτεϊνάσες εκκρίνονται αρχικά σε ανενεργή μορφή. Μετά την έκκρισή τους σε μορφή προενζύμων, απαιτείται η παρουσία ιόντων ψευδαργύρου για την ενεργοποίησή τους στο εξωκυττάριο περιβάλλον ( Birkedal-Hansen 1993,1994).



## ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ

Οι μεταλλοπρωτεϊνάσες παλαιότερα ταξινομούνταν με βάση το υπόστρωμα στο οποίο δρουν ως εξής:

- κολλαγενάσες: MMP-1, MMP-8, MMP-13
- γελατινάσες ή τύπου IV κολλαγενάσες: MMP-2, MMP-9
- στρομελυσίνες: MMP-3, MMP-10
- ματρυλυσίνες: MMP-7, MMP-26
- μεμβρανικού τύπου μεταλλοπρωτεϊνάσες: MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-17, MMP-24, MMP-25, MMP-23
- άλλου τύπου: MMP-11, MMP-12, MMP19, MMP-20

Μία άλλη ταξινόμηση των μεταλλοπρωτεϊνών βασίζεται στην εξέλιξη των ειδών με τη βοήθεια της βιοπληροφορικής χωρίς όμως να είναι ιδιαίτερα εύχρηστη στη μελέτη της δράσης τους.

## Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΜΕΤΑΛΛΟΠΡΩΤΕΪΝΑΣΩΝ

Οι μεταλλοπρωτεϊνάσες (MMPs) εμπλέκονται κυρίως στη διάσπαση της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας σε φυσιολογικές διαδικασίες, όπως η εμβρυϊκή ανάπτυξη, η αναπαραγωγή, η αγγειογένεση, η ανάπτυξη των οστών, η επούλωση, η κυτταρική μετανάστευση, η μάθηση και τη μνήμη, καθώς και σε παθολογικές διεργασίες, όπως η αρθρίτιδα, ενδοκρανιακή αιμορραγία και μετάσταση (Gross και Lapiere 1962). Όπως αναφέρθηκε, οι περισσότερες MMPs εκκρίνονται ως ανενεργές πρωτεΐνες οι οποίες ενεργοποιούνται όταν διασπώνται

από εξωκυττάρια πρωτεάσες. Το ένζυμο που κωδικοποιείται από το γονίδιο αυτό διασπά τον τύπο IV και V κολλαγόνων και άλλων πρωτεϊνών εξωκυττάριας μήτρας (Eisen και συν. 1968). Οι μελέτες σε πιθήκους *rhesus* δείχνουν ότι το ένζυμο εμπλέκεται κινητοποίηση των αιμοποιητικών προγονικών κυττάρων από μυελό των οστών επαγόμενη από την ιντερλευκίνη 8 (IL-8).

#### ΔΡΑΣΗ ΤΗΣ MMP-9

Η μεταλλοπρωτεϊνάση 9 (MMP-9), επίσης γνωστή ως κολλαγενάση τύπου IV, ζελατινάση ή ζελατινάση B (Gelb) ανήκει στην οικογένεια των μεταλλοπρωτεϊνών που εμπλέκονται στην αποδόμηση της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας. Διασπά το κολλαγόνο τύπου IV, V και XI αλλά και ήδη αποδομημένες δομές κολλαγόνου. Μπορεί όμως να διασπάσει και μη κολλαγονούχα υποστρώματα. Επιπρόσθετα, η MMP-9 ενεργοποιεί κυτοκίνες όπως είναι η IL-1α και ο TNFα (Yu et al.2000). Η MMP-9 φαίνεται ότι παίζει ρόλο στην α) ενεργοποίηση των ουδετερόφιλων, β) στην αγγειογένεση αλλά και γ) στην διαδικασία της επούλωσης.

Πιο αναλυτικά:

##### α) Ενεργοποίηση των ουδετερόφιλων

Η MMP-9 μαζί με την ελαστάση φαίνεται να είναι ένα ρυθμιστικός παράγοντας στη μετανάστευση των ουδετερόφιλων διαμέσου της βασικής μεμβράνης (Wang και Tsiarka, 2005). Εμπλέκεται σε πολλές σημαντικές λειτουργίες των ουδετερόφιλων, όπως αποδόμηση εξωκυττάριας ουσίας, ενεργοποίηση IL-1β και διάσπαση χημειοκινών (Delclaux και συν. 1996). Πειράματα σε ζώα έδειξαν ότι ανεπάρκεια

MMP-9 οδήγησε σε αντοχή στο σοκ ενδοτοξίνης, υποδηλώνοντας ότι η MMP-9 είναι σημαντική στη σήψη (Ordenakker και συν 2001).

#### β) Αγγειογένεση

Η MMP-9 μπορεί να διαδραματίσει σημαντικό ρόλο στην αγγειογένεση και την νεοαγγείωση. Για παράδειγμα, η MMP-9 φαίνεται να εμπλέκεται στην αναδιαμόρφωση που σχετίζεται με την νεοαγγείωση στο κακοήθες γλοίωμα (Dubois και συν. 2002). Πειράματα σε knock-out μοντέλα έδειξαν ότι έλλειψη της MMP-9 οδηγεί σε καθυστερημένη απόπτωση, αγγείωση, και οστεοποίηση των υπερτροφικών χονδροκυττάρων (Forsyth και συν. 1999). Τέλος, υπάρχουν σημαντικές ενδείξεις ότι η MMP-9 απαιτείται για την στρατολόγηση των ενδοθηλιακών βλαστικών κυττάρων, ένα κρίσιμο συστατικό της αγγειογένεσης (Vu και συν. 1998).

#### γ) Επούλωση

Η MMP-9 αυξάνεται σε σημαντικό βαθμό κατά τη διάρκεια της ανθρώπινης επιθηλιακής επούλωσης (Heissig και συν. 2002). Χρησιμοποιώντας ένα μοντέλο ποντικού με ανεπάρκεια της MMP-9, θεωρήθηκε ότι η MMP-9 συντονίζει την επιθηλιακή επισκευή του τραύματος καθώς στα ποντίκια με ανεπάρκεια δεν ήταν δυνατή η απομάκρυνση του πλέγματος ινωδογόνου κατά την επούλωση του τραύματος (Mohan και συν. 2001). Τέλος, όταν η MMP-9 αλληλεπιδρά με τον TGF-β1 διεγείρει σύσπαση του κολλαγόνου, βοηθώντας την επούλωση των τραυμάτων.

## ΓΕΝΕΤΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ

Όπως αναφέρθηκε, η περιοδοντίτιδα είναι μια νόσος μικροβιακής αιτιολογίας. Ωστόσο, υπάρχουν και άλλοι παράγοντες που δρουν επιβαρυντικά όπως είναι ο γενετικός παράγοντας.

Με την εξέλιξη της Μοριακής Βιολογίας τη δεκαετία του 1990, εμφανίστηκε μια νέα κατεύθυνση για τη μελέτη της αιτιολογίας και της παθογένειας διαφόρων παθήσεων αλλά και για την προληπτική και θεραπευτική τους αντιμετώπιση. Στην οδοντιατρική, και πιο ειδικά στην περιοδοντολογία, οι σύγχρονες γνώσεις της Γενετικής προσπάθησαν να απαντήσουν σε ερωτήματα σχετικά με την κληρονομική προδιάθεση των περιοδοντικών νόσων, την πιθανότητα γονιδιακού ελέγχου για την πρόβλεψη της εμφάνισης ή της βαρύτητας των περιοδοντικών νόσων, την καλύτερη πρόγνωση και τέλος την δυνατότητα εφαρμογής εξατομικευμένου σχεδίου θεραπείας σε κάθε ασθενή.

## ΓΕΝΕΤΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ ΚΑΙ ΕΠΙΘΕΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΔΟΝΤΙΤΙΔΑ

Οι περισσότερες αποδείξεις του ρόλου του γενετικού παράγοντα προέρχονται από μελέτες που αφορούν τις επιθετικές περιοδοντίτιδες. Είχε παρατηρηθεί για πολλά χρόνια αυξημένη πιθανότητα εμφάνισης επιθετικής περιοδοντίτιδας στην ίδια οικογένεια και μάλιστα πιθανότητα έως και 50% να συνυπάρχουν πάσχοντα άτομα. Ακόμη έχει αναφερθεί διαφορετική συχνότητα επιπολασμού ανά φυλή: σε Καυκάσιους 0,17%, σε Αφρικανούς 2,64% ( Hart 1996). Αυτά ενίσχυσαν την άποψη του γενετικού υπόβαθρου των επιθετικών μορφών της περιοδοντίτιδας. Το 1970, έρευνες έδειξαν ότι η επιθετική περιοδοντίτιδα ήταν πιο συχνή στις γυναίκες και γι' αυτό διατυπώθηκε η άποψη ότι μεταβιβάζονται μέσω του X

χρωμοσώματος, με το φυλοσύνδετο τύπο κληρονομικότητας (Butler 1969, Fourel 1972, Melnick και συν 1976). Όμως οι απόψεις αυτές καταρρίφθηκαν το 1980 και 1990 καθώς αποδείχθηκε ότι τα αυξημένα ποσοστά επιθετικής περιοδοντίτιδας σε γυναίκες οφείλονταν στην ακριβέστερη καταγραφή της νόσου σε γυναίκες λόγω του μεγαλύτερου ενδιαφέροντός τους για τη στοματική τους υγεία (Hart και συν. 1991, 1992). Η μελέτη των Marazita και συνεργατών το 1994 στις ΗΠΑ, απέδειξε ότι υπάρχει γενετική μεταβίβαση της νόσου με αυτοσωμικό κυρίαρχο τύπο κληρονόμησης, ενώ δύο άλλες έρευνες μία σε βορειοευρωπαϊκό και μία σε νοτιοευρωπαϊκό πληθυσμό επιβεβαίωσαν την αυτοσωμική κληρονόμηση αλλά με υπολειπόμενο τρόπο (Saxen και Nevalinna 1984, Lopez 1992). Επιπλέον, η μελέτη του Boughman και συνεργατών του επιβεβαίωσε τον αυτοσωμικό τύπο κληρονόμησης, ενώ με τη χρήση του μοντέλου γενετικής σύνδεσης έγινε προσπάθεια να βρεθεί μια γονιδιακή περιοχή που κληρονομείται στα άτομα αυτά. Διατυπώθηκε λοιπόν η άποψη ότι η επιθετική περιοδοντίτιδα συνκληρονομείται μαζί με κάποια παραλλαγή ενός γονιδίου στο χρωμόσωμα 4 που ρυθμίζει τη δέσμευση της βιταμίνης D (Boughman και συν. 1986). Η σύνδεση της επιθετικής περιοδοντίτιδας με το γονίδιο αυτό όμως καταρρίφθηκε το 1990 από άλλες έρευνες, οι οποίες όμως έδειξαν ότι υπάρχει συσχετισμός της νόσου με μία περιοχή στο χρωμόσωμα 9. Η περιοχή αυτή φέρει πολλά γονίδια που ρυθμίζουν την παραγωγή κάποιων μεσολαβητών της φλεγμονής (Hart και συν. 1993). Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι το γονίδιο της κυκλοοξυγενάσης 2. Συμπερασματικά, όσον αφορά στην επιθετική περιοδοντίτιδα φαίνεται να ακολουθεί αυτοσωμικό τύπο κληρονόμησης. Μέχρι στιγμής έχουν εντοπιστεί πολυμορφισμοί σε γονίδια που ρυθμίζουν την ανοσολογική απάντηση του ξενιστή χωρίς όμως να έχει διευκρινιστεί πλήρως ο τρόπος γονιδιακής ρύθμισης.

## ΓΕΝΕΤΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ ΚΑΙ ΧΡΟΝΙΑ ΠΕΡΙΟΔΟΝΤΙΤΙΔΑ

Σε αντίθεση με τη μελέτη της επίδρασης του γενετικού παράγοντα στην επιθετική περιοδοντίτιδα, για πολλά χρόνια δεν είχε δοθεί έμφαση στο ρόλο του γενετικού παράγοντα στη χρόνια περιοδοντίτιδα. Τη δεκαετία του 1960 οι πρώτες μελέτες γενετικής, υπέδειξαν υπολειπόμενο τύπο κληρονόμησης. Ωστόσο, η άποψη αυτή αργότερα αναθεωρήθηκε από την έρευνα του Chung και των συνεργατών του το 1970 οι οποίοι κατέληξαν ότι οι περιβαλλοντικοί παράγοντες, όπως το οικογενειακό περιβάλλον και ιδιαίτερα η μητέρα επηρεάζουν τη βαρύτητα της νόσου (Chung και συν. 1997, Beaty και συν. 1993). Ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι κλασσικές μελέτες σε διδύμους. Η έρευνα του Michalowicz και συνεργατών που πραγματοποιήθηκε σε 110 ζεύγη διδύμων, έδειξε ότι ο γενετικός παράγοντας επηρεάζει τους περιοδοντικούς δείκτες (Michalowicz et al, 1991). Κατά τη δεκαετία του 1990, η άποψη αυτή άρχισε να γίνεται ευρέως αποδεκτή, καθώς διαπιστώθηκε ότι κάποιες παράμετροι της ανοσολογικής απάντησης είναι γενετικώς προκαθορισμένες (Michalowicz 1994, Hart & Kornman 1997, Schenkein 2002). Οι έρευνες για την επίδραση συγκεκριμένων γονιδίων και των πολυμορφισμών τους έχουν επικεντρωθεί στα ουδετερόφιλα πολυμορφοπύρηνα, στην παραγωγή ανοσοσφαιρινών και σε ουσίες μεσολαβητές, όπως η προσταγλαδίνη και οι μεταλλοπρωτεϊνάσες. Η έρευνα για το ρόλο των γονιδίων που ρυθμίζουν την παραγωγή μεσολαβητών φλεγμονής φαίνεται πολλά υποσχόμενη. Μέχρι στιγμής ο μόνος συσχετισμός της χρόνιας περιοδοντίτιδας με το γενετικό υπόβαθρο που έχει αποδειχθεί αφορά πολυμορφισμούς στα γονίδια της ιντερλευκίνης 1α και 1β (Kornman και συν. 1997).

## ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ ΤΟΥ DNA

Το ανθρώπινο DNA διαφέρει σε συγκεκριμένες θέσεις μεταξύ των ατόμων ενός πληθυσμού. Σε πολλές, μη κωδικοποιές συνήθως περιοχές του γονιδιώματος είναι δυνατόν να υπάρχουν πολλαπλά φυσιολογικά αλληλόμορφα. Οι διαφορετικοί γονότυποι εξαιτίας της ύπαρξης πολλών αλληλομόρφων ονομάζονται πολυμορφισμοί του DNA. Οι κυριότεροι τύποι πολυμορφισμών του ανθρώπινου γονιδιώματος είναι:

1. Πολυμορφισμοί στο επίπεδο του ενός νουκλεοτιδίου (Single Nucleotide Polymorphisms, SNPs)
2. Μικρο-δορυφόροι ή αλληλουχίες με σύντομες διαδοχικές επαναλήψεις (Microsatellites ή Short Tandem Repeats, STRs)
3. Μινι-δορυφόροι ή αλληλουχίες με ποικίλο αριθμό διαδοχικών επαναλήψεων (Minisatellites ή Variable Number of Tandem Repeats, VNTRs)

Πιο ειδικά για τους πολυμορφισμούς σε επίπεδο ενός νουκλεοτιδίου: Σε μια συγκεκριμένη θέση ενός ομόλογου ζεύγους χρωμοσωμάτων (γενετικός τόπος) μπορεί να υπάρχει διαφορά ενός μόνο νουκλεοτιδίου (π.χ. σε ορισμένα άτομα να υπάρχει αδενίνη ενώ σε άλλα γουανίνη). Αυτή η διαφορά οδηγεί στην παρουσία 2 αλληλομόρφων στον πληθυσμό (A και G) από τα οποία προκύπτουν 3 γονότυποι (π.χ. ομοζυγωτία AA, ετεροζυγωτία AG, ομοζυγωτία GG). Υπολογίζεται ότι το ανθρώπινο γονιδίωμα περιέχει ~1 SNP σε κάθε 1000 βάσεις.

Η διαφορά των πολυμορφισμών από τις μεταλλάξεις είναι ότι ως μετάλλαξη ορίζεται μία αλλαγή στην αλληλουχία του DNA με συχνότητα στον πληθυσμό <1%, ο δε πολυμορφισμός με συχνότητα >1%.

## ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ ΣΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ ΤΗΣ ΚΥΚΛΟΟΞΥΓΕΝΑΣΗΣ 2 (COX-2)

Όπως αναφέρθηκε, οι πολυμορφισμοί στο γονίδιο της κυκλοοξυγενάσης θεωρείται ότι μπορεί να επηρεάζουν την έκφρασή της και κατ' επέκταση τα επίπεδα των προσταγλαδινών. Τρεις πολυμορφισμοί έχουν μελετηθεί περισσότερο και αυτοί είναι: COX-2 -765G/C, COX-2 -1195G/A και COX-2 -8473T/C. Οι πρώτοι δύο πολυμορφισμοί έχουν συσχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης ηπατοκυτταρικού καρκινώματος (Akkiz και συν.2011, Charib και συν. 2014). Όσον αφορά στις μελέτες για τη συσχέτιση των πολυμορφισμών στο γονίδιο της κυκλοοξυγενάσης με την περιοδοντική νόσο, οι περισσότερες αφορούν τον πολυμορφισμό COX-2 -765. Το 2008 ο Ho και οι συνεργάτες του έδειξαν ότι σε ασθενείς με επιθετική περιοδοντίτιδα ήταν πιο συχνό το G αλληλόμορφο και ότι οι γονότυποι GC/CC συνδέονταν με μειωμένο κίνδυνο εμφάνισης επιθετικής περιοδοντίτιδας (Ho και συν. 2008). Σε ασθενείς με χρόνια περιοδοντίτιδα οι Loo και συνεργάτες δεν βρήκαν σημαντική διαφορά ενώ οι Li και συνεργάτες βρήκαν αυξημένο το γονότυπο C/C σε ασθενείς με χρόνια περιοδοντίτιδα ( Loo και συν. 2011, Li και συν. 2012). Το 2009 οι Xie και συνεργάτες, μελέτησαν σε Κινέζικο πληθυσμό τη συσχέτιση του πολυμορφισμού COX-2 -1195G/A και του COX-2 -8473T/C με τη χρόνια περιοδοντίτιδα, και κατέληξαν ότι το αλληλόμορφο A σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο (Xie και συν. 2009). Τον πολυμορφισμό COX-2 -1195 G/A μελέτησαν σε Ευρωπαϊκό πληθυσμό οι Schaefer και συνεργάτες, χωρίς όμως να βρούν κάποια σημαντική συσχέτιση με τη χρόνια ή την επιθετική περιοδοντίτιδα. Τέλος, το 2012 σε πληθυσμό στην Ινδία οι Daing και συνεργάτες, δεν βρήκαν σημαντική συσχέτιση των δύο αυτών



πολυμορφισμών με τη χρόνια περιοδοντίτιδα. Ωστόσο, βρήκαν ότι ο απλότυπος AT ήταν αυξημένος σε ασθενείς με χρόνια περιοδοντίτιδα ( Daing και συν. 2012).

#### ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ ΣΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ ΤΗΣ ΜΕΤΑΛΛΟΠΡΩΤΕΪΝΑΣΗΣ 9 (MMP-9)

Η παρουσία πολυμορφισμών στα γονίδια των MMPs μπορούν να επηρεάσουν την έκφραση και τη λειτουργία τους. Κατά καιρούς έχουν γίνει μελέτες σε μία προσπάθεια συσχέτισης των πολυμορφισμών των MMPs με διάφορες νόσους μεταξύ των οποίων η περιοδοντίτιδα (de Souza και συν 2003, Holla και συν 2004, Itagaki και συν 2004, Holla και συν 2005, Cao και συν 2005 , de Souza και συν 2005 ) η πρόωρη απώλεια εμφυτευμάτων (Santos και συν 2004 , Leite και συν 2008), η οστεοπόρωση (Thiry-Blaise και συν 1995), οι καρδιαγγειακές νόσοι (Albilleira και συν 2006) και οι κακοήθεις νεοπλασίες (Yan και συν. 2007, Decock και συν. 2008). Πιο συγκεκριμένα για τη συσχέτιση των πολυμορφισμών στα γονίδια των μεταλλοπρωτεϊνών με τη περιοδοντίτιδα τα τελευταία χρόνια έχουν γίνει αρκετές μελέτες. Έχουν εξεταστεί πολυμορφισμοί που αφορούν τα γονίδια των MMP-1,-2,-3,-9,-12 αλλά και των αναστολέων τους TIMP-1,-2. Από τα αποτελέσματα των περισσότερων μελετών δεν φαίνεται να υπάρχει σημαντική συσχέτιση μεταξύ των πολυμορφισμών στα γονίδια των παραπάνω μορίων με την χρόνια περιοδοντίτιδα αλλά και με την επιθετική περιοδοντίτιδα. Μία πιθανή συσχέτιση υποστηρίζεται από μικρότερο αριθμό μελετών. Η μελέτη του Gurkan και των συνεργατών (Gurkan και συν. 2007, 2008) σε πληθυσμό στην Τουρκία έδειξε ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ ατόμων με υγιές περιοδόντιο και ασθενών με χρόνια και επιθετική περιοδοντίτιδα όσον αφορά στους πολυμορφισμούς στις MMP-2 (-73C/T) και MMP-12 (357Asn/Ser). Όσον αφορά όμως στον πολυμορφισμό της MMP-9 -1562C/T η μελέτη αυτή έδειξε ότι υπάρχει διαφορά, αποτέλεσμα που συμφωνούσε με τη μελέτη του Keles και

συνεργατών (2006). Οι μελέτες αυτές (Keles et al 2006, Gurkan et al 2007, 2008) κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι το αλληλόμορφο που προέκυπτε με την αντικατάσταση της βάσης C από την T, αύξανε τον κίνδυνο να εμφανίσει κάποιος περιοδοντίτιδα. Ωστόσο, δύο άλλες μελέτες, μία στη Βραζιλία και μία στην Κίνα δεν βρήκαν συσχέτιση του πολυμορφισμού της MMP-9 -1562C/T με την περιοδοντίτιδα (de Souza και συν 2005, Chen και συν 2007). Τέλος, μια μελέτη για τον πολυμορφισμό αυτό σε πληθυσμό στην Τσεχία δεν βρήκε διαφορά μεταξύ των ατόμων που είχαν περιοδοντίτιδα και αυτών που δεν είχαν. Η μελέτη αυτή όμως, βρήκε ότι το αλληλόμορφο T στα άτομα με περιοδοντίτιδα ήταν πιο συχνό στους άντρες με χρόνια προχωρημένη περιοδοντίτιδα σε σχέση με αυτούς που είχαν αρχόμενη χρόνια περιοδοντίτιδα (Holla και συν 2005). Πρόσφατες έρευνες σε Κινέζικο πληθυσμό έδειξαν ότι υπάρχει θετική συσχέτιση του πολυμορφισμού της MMP-9 -1562C>T με την χρόνια περιοδοντίτιδα (Loo και συν. 2011, Li και συν. 2012, Guangyue και συν. 2012).

**Πίνακας 1:** Πολυμορφισμοί στο γονίδιο της COX-2

| Πολυμορφισμοί στο γονίδιο της COX-2 | Εθνικότητα | Συσχέτιση με περιοδοντίτιδα              | Αναφορά              |
|-------------------------------------|------------|--|----------------------|
| -1195 G>A<br>-8473 T>C              | Κίνα       | Χ.Π. Αυξημένο το A αλληλόμορφο           | Xie et al, 2009      |
| -1195 G>A                           | Ευρώπη     | Χ.Π./Ε.Π. -<br>Χ.Π./Ε.Π. -               | Schaefer et al, 2010 |
| -1195 G>A<br>-8473 T>C              | Ινδία      | Χ.Π. -<br>ΑΤ απλότυπος αυξημένος σε Χ.Π. | Daing et al , 2012   |

**Πίνακας 2:** Πολυμορφισμοί στο γονίδιο της *MMP-9*

| Πολυμορφισμοί στο γονίδιο της <i>MMP-9</i> | Εθνικότητα | Συσχέτιση με περιοδοντίτιδα            | Αναφορά              |
|--|------------|--|----------------------|
| -1562 C>T                                  | Βραζιλία   | Χ.Π. -                                 | de Souza et al, 2005 |
| -1562 C>T                                  | Τουρκία    | Χ.Π. +                                 | Keles et al, 2006    |
| -1562 C>T                                  | Τσεχία     | Χ.Π. -                                 | Holla et al, 2006    |
| -1569 C>T                                  | Τουρκία    | Ε.Π. Τ αλληλόμορφο μειώνει τον κίνδυνο | Gurkan et al, 2007   |
| -1562 C>T                                  | Κίνα       | Ε.Π. -                                 | Chen et al, 2007     |
| -1562 C>T                                  | Κίνα       | Χ.Π.-                                  | Loo et al, 2011      |
| -1562 C>T                                  | Κίνα       | Χ.Π.+                                  | Li et al, 2012       |

## ΣΚΟΠΟΣ

Ο σκοπός της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας είναι να διαπιστωθεί εάν οι πολυμορφισμοί *COX-2* -1195G/A, *COX-2* -8473C/T και *MMP-9* -1562C/T εμφανίζονται με διαφορετική συχνότητα στους ασθενείς με χρόνια και επιθετική περιοδοντίτιδα σε σχέση με τους υγιείς επηρεάζοντας έτσι την συχνότητα εμφάνισης της περιοδοντικής νόσου.

## ΥΠΟΘΕΣΗ

Η υπόθεσή μας είναι πως οι ασθενείς με χρόνια και επιθετική περιοδοντίτιδα θα φέρουν κάποιους από τους παραπάνω πολυμορφισμούς σε ποσοστό μεγαλύτερο από τα υγιή άτομα.

## **ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

## 1) ΥΛΙΚΑ-ΜΕΘΟΔΟΣ

Η μεθοδολογία περιελάμβανε τα εξής στάδια. Α) Τη συλλογή των δειγμάτων των ομάδων των ασθενών και της ομάδας ελέγχου, Β) Την απομόνωση του DNA, Γ) Τη φωτομέτρηση του DNA, Δ) Την εξακρίβωση με RFLP PCR ύπαρξης ή μη σε κάθε άτομο των εν λόγω πολυμορφισμών, Ε) Τη στατιστική ανάλυση.

Α) Συλλογή δειγμάτων ομάδων ασθενών και ομάδας ελέγχου.

Το δείγμα αφορούσε γενετικό υλικό η λήψη του οποίου έγινε με συλλογή κυττάρων του επιθηλίου της παρειάς. Η μελέτη περιελάμβανε δύο πειραματικές ομάδες, μια ομάδα ασθενών με χρόνια περιοδοντίτιδα (ομάδα ΧΠ) και μία ομάδα με επιθετική περιοδοντίτιδα (ομάδα ΕΠ). Επιπλέον, υπήρχε και η ομάδα ελέγχου (ομάδα Κ). Για την εύρεση των ατόμων και τη συλλογή του δείγματος έγινε αναζήτηση στο αρχείο τόσο των προπτυχιακών όσο και των μεταπτυχιακών κλινικών της Οδοντιατρικής Σχολής του Ε.Κ.Π.Α. Συνολικά η αναζήτηση αφορούσε περισσότερους από 2000 φακέλους ασθενών. Τα κριτήρια για κάθε πειραματική ομάδα ήταν τα ακόλουθα.

Ομάδα Χρόνιας Περιοδοντίτιδας

| <b>Κριτήρια Εισαγωγής</b>  | <b>Κριτήρια Αποκλεισμού</b> |
|--|-----------------------------|
| Ηλικία 50-70 έτη   | Κάπνισμα                    |
| Ύπαρξη στον φραγμό >20/28 δόντια.<br>Δεν υπολογίζονται οι σωφρονιστήρες. | Σακχαρώδης Διαβήτης         |
| Περιοδοντόγραμμα και πανοραμική<br>ακτινογραφία.                         | Διαταραχές ανοσοαπόκρισης   |
| Απώλεια πρόσφυσης >3 σε ποσοστού<br>φραγμού >30%.                        | Ρευματοειδής αρθρίτιδα      |



### Ομάδα Ελέγχου

| <b>Κριτήρια Εισαγωγής</b>  | <b>Κριτήρια Αποκλεισμού</b> |
|--|-----------------------------|
| Ηλικία 50-70 έτη   | Κάπνισμα                    |
| Ύπαρξη στον φραγμό >20/28 δόντια.<br>Δεν υπολογίζονται οι σωφρονιστήρες. | Σακχαρώδης Διαβήτης         |
| Περιοδοντόγραμμα και πανοραμική ακτινογραφία.                            | Διαταραχές ανοσοαπόκρισης   |
| Απώλεια πρόσφυσης <3 σε όλο τον φραγμό.                                  | Ρευματοειδής αρθρίτιδα      |

### Ομάδα Επιθετικής Περιοδοντίτιδας

| <b>Κριτήρια Εισαγωγής</b>          |
|------------------------------------|
| Διάγνωση Επιθετικής Περιοδοντικής. |
| Ελεύθερο ιατρικό ιστορικό.         |

## B) Συλλογή και απομόνωση DNA

Αρχικά, το πρωτόκολλο της έρευνας υποβλήθηκε στην Επιτροπή Δεοντολογίας από όπου εγκρίθηκε. Οι ασθενείς που πληρούσαν τα κριτήρια συμμετοχής στην έρευνα, κλήθηκαν και αφού προσήλθαν στην Οδοντιατρική Σχολή, επιβεβαιώθηκε το ιατρικό και οδοντιατρικό ιστορικό τους. Στη συνέχεια, υπογράφηκε το έγγραφο συγκατάθεσης για συμμετοχή στη μελέτη και έγινε συλλογή του βιολογικού υλικού για απομόνωση του γενετικού υλικού.

Η λήψη των κυττάρων της παρειάς έγινε με τη χρήση βαμβακοφόρου στυλεού, στην μεταπτυχιακή κλινική της Περιοδοντολογίας. Οι ασθενείς είχαν ενημερωθεί ώστε να μην καταναλώσουν τροφή 30 λεπτά πριν τη διαδικασία. Μετά τη λήψη οι βαμβακοφόροι στυλεοί φυλάχθηκαν σε ακτινοσκιερό περιβάλλον στους -20 βαθμούς Κελσίου.

Ακολούθησε η απομόνωση του γενετικού υλικού με το Kit DNeasy της Qiagen. Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε είναι το εξής.

1. Αρχικά έγινε προθέρμανση υδατόλουτρου στους 56 βαθμούς Κελσίου.
2. Τοποθετήθηκαν 180  $\mu\text{L}$  ρυθμιστικού διαλύματος (Buffer ATL) & 4  $\mu\text{L}$  πρωτεϊνάσης K σε πλαστικό φιαλίδιο (Eppendorf tube) των 1,5 mL. Εμβύθιση της μπατονέτας των βαμβακοφόρων στυλεών και τοποθέτηση στο υδατόλουτρο για 1 h.
3. Παρασκευή διαλύματος με 200 $\mu\text{L}$  αιθανόλη ανά δείγμα και 200 $\mu\text{L}$  AL buffer ανά δείγμα και vortex μέχρι να γίνει ομοιόμορφο.  
Αφαίρεση της μπατονέτας αφού στραγγιστεί προσεκτικά στα τοιχώματα και τοποθέτηση σε κάθε Eppendorf 400 $\mu\text{L}$  από το παραπάνω διάλυμα.
4. Τοποθέτηση των περίπου 600  $\mu\text{L}$  που υπάρχουν σε κάθε Eppendorf σε στήλη του Kit και φυγοκέντρηση στα 6000 g ή 8.000 rpm για 1min.

5. Τοποθέτηση της μεμβράνης σε άλλο tube και προσθήκη 500μL AW1, φυγοκέντρηση στα 6000 g ή 8.000 rpm για 1min.
6. Τοποθέτηση της μεμβράνης σε άλλο tube και προσθήκη 500μL AW2, φυγοκέντρηση στα 14.000 rpm για 3min. Έπειτα, quick spin.
7. Τοποθέτηση της μεμβράνης σε Eppendorf και προσεκτική προσθήκη στο κέντρο της μεμβράνης 200μL AE buffer. Φυγοκέντρηση 8.000 rpm /1 min. Απόρριψη των μεμβρανών και φύλαξη του Eppendorf με το διάλυμα DNA στους -20 βαθμούς κελσίου.

#### Γ) Φωτομέτρηση του DNA.

Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης του DNA που απομονώθηκε έγινε με φωτομέτρηση στα 260-280 nm. Η οπτική πυκνότητα στα 260 nm αντιστοιχεί στο DNA που περιέχεται στο διάλυμα, ενώ η απορρόφηση στα 280nm στις πρωτεΐνες. Υπολογίζοντας το λόγο της οπτικής πυκνότητας OD260/OD280 εκτιμάται η καθαρότητα του DNA. Η φωτομέτρηση του γενετικού υλικού των δειγμάτων έγινε με τη χρήση του BioSpec-nano Micro-volume UV-Vis Spectrophotometer της Shimadzu ως εξής: Αρχικά 1μL απεσταγμένο νερό τοποθετήθηκε στην ειδική υποδοχή του μηχανήματος και φωτομετρήθηκε στα 260/280 nm. Αυτό χρησιμοποιήθηκε ως δείκτης. Στη συνέχεια 1μL από κάθε δείγμα τοποθετήθηκε στην υποδοχή και φωτομετρήθηκε στα 260/280 nm και καταγράφηκε η συγκέντρωση του DNA ανά μL(ng/μL). Η διαδικασία αυτή επαναλήφθηκε για όλα τα δείγματα

Δ) Εξακρίβωση με RFLP PCR της ύπαρξης ή μη σε κάθε άτομο των εν λόγω πολυμορφισμών.

Για την διερεύνηση της ύπαρξης ή όχι κάθε ενός από τους τρεις πολυμορφισμούς τα στάδια που ακολουθήθηκαν είναι η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR), η πέψη του γενετικού υλικού με περιοριστικά ένζυμα για τη δημιουργία ή όχι της πολυμορφικής θέσης και η ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της πέψης του γενετικού υλικού σε γέλη αγαρόζης.

Ι) Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται για τον πολλαπλασιασμό ενός τμήματος DNA, καθώς και για τον πολλαπλασιασμό ενός τμήματος DNA εισάγοντας παράλληλα σε αυτό θέσεις για πέψη με ενδονουκλεάσες περιορισμού, προκειμένου να κλωνοποιηθεί σε κατάλληλους πλασμιδιακούς φορείς. Η αρχή της μεθόδου στηρίζεται στη χρήση μιας θερμοάντοχης DNA πολυμεράσης, η οποία χρησιμοποιεί μονόκλωνο DNA ως εκμαγείο, για τη σύνθεση ενός νέου συμπληρωματικού κλώνου. Προκειμένου να δράσει η πολυμεράση, είναι απαραίτητη η ύπαρξη ενός μικρού τμήματος δίκλωνου DNA. Για το σκοπό αυτό, σχεδιάζονται κατάλληλα συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια (εκκινητές), τα οποία και καθορίζουν τα άκρα της ακολουθίας που επιθυμούμε να πολλαπλασιάσουμε. Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την πραγματοποίηση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης είναι τα εξής:

## Υλικά PCR

- Εκκινητές (primers) (Invitrogen)
- Taq DNA πολυμεράση (K Biosystems) σε συγκέντρωση 5U/μl,
- 25mM MgCl<sub>2</sub> (K Biosystems)
- Ρυθμιστικό διάλυμα KAPA Taq buffer with dye 10X (K Biosystems)
- dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) (dNTPs set 100mM Invitrogen)

## Συνθήκες PCR

### Για τον πολυμορφισμό MMP9 -1562

95 °C 4 min + 28 x (94 °C 1min + 62 °C 1min + 72 °C 1min)+ 72 °C 5 min

### Για τον πολυμορφισμό COX2 -1195

95 °C 7min + 31x (94 °C 30sec +59 °C 30sec + 72° C 30 sec ) + 72 °C 7 min

### Για τον πολυμορφισμό COX2 -8473

95 °C 7min + 31x (94 °C 30sec+49 °C 30sec + 72 °C 30 sec) + 72 °C 7 min

### Διάλυμα PCR τελικού όγκου 20μλ

|             |                |              |
|-------------|----------------|--------------|
| Buffer      | 2μL /δείγμα    |              |
| MgCl        | 0,5 μL/ δείγμα |              |
| dNTPs       | 2μL/δείγμα     |              |
| Primers mix | 1μL/δείγμα     |              |
| Taq pol     | 0,2 μL/δείγμα  |              |
| ddH2O       | 13,3 μL/δείγμα | +1μλ DNA mix |

### Εκκινητές (Primers) PCR

Η επιλογή των primers βασίστηκε στη βιβλιογραφία (Loo και συν. 2011, Daing και συν. 2012) και ο έλεγχός τους έγινε στο PRIME BLAST. Στον πίνακα 1 εμφανίζονται οι primers που χρησιμοποιήθηκαν και προήλθαν από την εταιρεία Invitrogen.

**Πίνακας 1: Forward και Revers primers.**

|            |                                 |
|------------|---------------------------------|
| MMP9 -1562 | FP: 5'-GCCTGGCACATAGTAGGCC-3'   |
|            | RP:5'-CTTCCTAGCCAGCCGGCATC-3'   |
| COX2 -1195 | FP:5'-CCCTGAGCACTACCCATGAT-3'   |
|            | RP:5'-GCCCTTCATAGGAGATACTGG-3'  |
| COX2 8473  | FR:5'-GAAATTTTAAAGTACTTTTGAT-3' |
|            | RP:5'-CTTTTACAGGTGATTCTACCC-3'  |

## II) ΠΕΨΗ ΜΕ ΠΕΡΙΟΡΙΣΤΙΚΑ ΕΝΖΥΜΑ

### Για τον πολυμορφισμό MMP9 -1562

- Πέψη με SphI (5 units ανά δείγμα) overnight στους 37 °C.

### Για τον πολυμορφισμό COX2 -1195

- Πέψη με PvuII (5 units ανά δείγμα) overnight στους 37 °C.

### Για τον πολυμορφισμό COX2 8473

- Πέψη με BclI (5 units ανά δείγμα) overnight στους 50 °C.

Τα ένζυμα προήλθαν από την εταιρία New England Biolabs.

## II) ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ

Τα προϊόντα της πέψης διαχωρίστηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης σε συσκευή οριζόντιας ηλεκτροφόρησης. Η επιλογή της συγκέντρωσης της αγαρόζης καθορίζεται από το μέγεθος των τμημάτων DNA που θα διαχωριστούν και συγκεκριμένα, η συγκέντρωσή της είναι αντιστρόφως ανάλογη του μοριακού βάρους των τμημάτων DNA.

### **Υλικά**

- Αγαρόζη (Invitrogen)
- Διάλυμα TBE 10X (Tris, βορικό οξύ και δινάτριο EDTA) pH 8
- 10 mg/ml διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου (Sigma)
- Διάλυμα φόρτωσης (loading buffer, New England Biolabs)
- Δείκτης μοριακών βαρών του DNA (DNA ladder, New England Biolabs): 100bp 50bp

Η ηλεκτροφόρηση έγινε σε πήκτωμα αγαρόζης 2% (2 gr αγαρόζη σε 100ml TBE) στα 100V συνεχούς ρεύματος για 45min για τους MMP9 [-1562] και COX2 [-1195] ενώ για τον πολυμορφισμό COX2 [8473] έγινε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 2,5% (2,5 gr αγαρόζης σε 100ml TBE) στα 100V συνεχούς ρεύματος για 45 min. Για την ανίχνευση του γενετικού υλικού τοποθετήθηκαν 15 μl βρωμιούχου αιθιδίου σε κάθε πήκτωμα. Ο δείκτης μοριακών βαρών (ladder) που χρησιμοποιήθηκε περιείχε μεγέθη 50bp και 100 bp (New England Biolabs). Στις ειδικές θέσεις προσθήκης δείγματος στο πήκτωμα τοποθετούνταν εναλλάξ 10 μL από το προϊόν της PCR στο οποίο δεν έχει γίνει πέψη με περιοριστικό ένζυμο και 20 μl από το προϊόν της πέψης. Αυτό γινόταν για την επιβεβαίωση της σωστής πέψης κάθε δείγματος. Στις δύο πρώτες θέσεις μετά το Ladder τοποθετούνταν το blank δείγματος ελέγχου της PCR, δηλαδή διάλυμα των συστατικών της PCR χωρίς να έχει προστεθεί γενετικό υλικό και του άπεπτου δείγματος ελέγχου της πέψης, δηλαδή διάλυμα των συστατικών της πέψης χωρίς την προσθήκη προϊόντων PCR, ώστε να αποκλειστεί πιθανότητα κάποιας επιμόλυνσης.

#### Ε) ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Η Στατιστική ανάλυση για τη σύγκριση των ομάδων της χρόνιας και της επιθετικής περιοδοντίτιδας με την κόντράλ ομάδα για τους τρεις πολυμορφισμούς έγινε με το τεστ  $\chi^2$  στο πρόγραμμα SPSS. Ως στατιστικά σημαντικό θεωρήθηκε το  $p < 0,05$  και τα αποτελέσματα είναι odds ratios με 95% όρια αξιοπιστίας. Για την ανάλυση των απλοτύπων και την ανισορροπία



σύνδεσης (linkage disequilibrium) χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα SHEsis ( Li και συν. 2009, Shi και συν. 2005).

## 2) ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Από την αναζήτηση στο αρχείο προέκυψαν 64 άτομα που ανταποκρίνονταν στα κριτήρια εκ των οποίων 49 συναίνεσαν εγγράφως να λάβουν μέρος στην έρευνα. Τα άτομα αυτά αντιστοιχούσαν σε 23 περιπτώσεις Χρόνιας Περιοδοντίτιδας (ΧΠ), 8 περιπτώσεις Επιθετικής Περιοδοντίτιδας (ΕΠ) και 18 περιπτώσεις Ελέγχου (Κ).

Για ένα από τα 23 ΧΠ δείγματα γενετικού υλικού δεν ήταν επιτυχής η RFLP-PCR που πραγματοποιήθηκε για κανέναν από τους τρεις πολυμορφισμούς. Έτσι, το δείγμα αυτό απορρίφθηκε θεωρώντας ότι είτε η συλλογή είτε η απομόνωση του γενετικού υλικού δεν ήταν επιτυχημένη. Από το σύνολο των ατόμων, τα 16 (33%) άτομα ήταν άνδρες και τα 32 (67%) ήταν γυναίκες (Πίνακας 2).

**Πίνακας 2: Κατανομή δείγματος με βάση το φύλο**

|                 | <b>ΟΜΑΔΑ<br/>ΕΛΕΓΧΟΥ<br/>(n=18)</b> | <b>ΧΡΟΝΙΑ<br/>ΠΕΡΙΟΔΟΝΤΙΤΙΔΑ<br/>(n=22)</b> | <b>ΕΠΙΘΕΤΙΚΗ<br/>ΠΕΡΙΟΔΟΝΤΙΤΙΔΑ<br/>(n=8)</b> |
|-----------------|-------------------------------------|---|---|
| <b>Άνδρες</b>   | 5                                   | 8   | 3   |
| <b>Γυναίκες</b> | 13                                  | 14  | 5   |

#### A) Αποτελέσματα για τον πολυμορφισμό της MMP-9 -1562 C/T

Από το σύνολο των ατόμων που μελετήθηκαν, κανένα άτομο δεν ήταν ομόζυγο για τον πολυμορφισμό (δηλαδή T/T). Πιο συγκεκριμένα το 83,3% της ομάδας ελέγχου (Κ) ήταν ομόζυγο για το φυσιολογικό αλληλόμορφο (C/C) ενώ μόνο το 16,7% ήταν ετερόζυγο και έφερε και τα δύο αλληλόμορφα (C/T). Από την ομάδα της χρόνιας περιοδοντίτιδας (ΧΠ) το 86,4% ήταν ομόζυγο για τα φυσιολογικά αλληλόμορφα ενώ το 13,6% ήταν ετερόζυγο. Τέλος, από την ομάδα της επιθετικής περιοδοντίτιδας (ΕΠ), το 87,5% ήταν ομόζυγο προς το φυσιολογικό και το 12,5% έφερε και τα δύο αλληλόμορφα (Πίνακας 3). Από τη στατιστική ανάλυση, δεν προέκυψε σημαντική διαφορά μεταξύ της ομάδας της χρόνιας περιοδοντίτιδας και της ομάδας ελέγχου. Αντίστοιχα δεν προέκυψαν σημαντικά αποτελέσματα από τη σύγκριση της ομάδας της επιθετικής περιοδοντίτιδας και της ομάδας ελέγχου. Τέλος, έγινε πολυμεταβλητή λογιστική παλινδρόμηση (multivariable logistic regression) για την αξιολόγηση της επίδρασης του φύλου και στις δύο ομάδες, χωρίς ωστόσο να υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά (Πίνακας 7).

**Πίνακας 3: Αποτελέσματα  $\chi^2$  για τον πολυμορφισμό της MMP-9 -1562C/T**

| MMP9-1562C/T | Κοντρόλ    | Χρόνια     | Επιθετική | P     |
|--------------|------------|------------|-----------|-------|
| C/C (W)      | 15 (83,3%) | 19 (86,4%) | 7 (87,5%) | 0.948 |
| C/T (H)      | 3 (16,7%)  | 3 (13,6%)  | 1 (12,5%) |       |

W: wild type, M: mutant, H: heterozygous

## Β) Αποτελέσματα για τον πολυμορφισμό της COX-2 -1195G/A

Από το σύνολο των ατόμων κανένα άτομο δεν ήταν ομόζυγο για το φυσιολογικό αλληλόμορφο. Πιο ειδικά, στην ομάδα ελέγχου το 16,7% ήταν ετερόζυγο και έφερε και τα δύο αλληλόμορφα (G/A) ενώ το 83,3% ήταν ομόζυγο για το αλληλόμορφο του πολυμορφισμού (A/A). Όσον αφορά στην ομάδα της χρόνιας περιοδοντίτιδας το 22,7% έφερε και τα δύο αλληλόμορφα, ενώ το 77,3% έφερε τα αλληλόμορφα του πολυμορφισμού. Τέλος, στην ομάδα της επιθετικής περιοδοντίτιδας το 12,5% ήταν ετερόζυγο, ενώ το 87,5% ήταν ομόζυγο για τον πολυμορφισμό. Από τα αποτελέσματα φαίνεται ότι τα δείγματα έφεραν σε μεγάλο ποσοστό τον πολυμορφισμό, χωρίς ωστόσο να παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων (Πίνακας 4). Σημαντική διαφορά δεν παρατηρήθηκε ούτε και μετά την ανάλυση με βάση το φύλο (Πίνακας 7).

**Πίνακας 4: Αποτελέσματα  $\chi^2$  για τον πολυμορφισμό της COX-2 1195G/A**

| COX2-1195G/A | Ομάδα Ελέγχου | Χρόνια     | Επιθετική | P     |
|--------------|---------------|------------|-----------|-------|
| G/A (H)      | 3 (16,7%)     | 5 (22,7%)  | 1 (12,5%) | 0.785 |
| A/A (M)      | 15 (83,3%)    | 17 (77,3%) | 7 (87,5%) |       |

W: wild type, M: mutant, H: heterozygous

### Γ) Αποτελέσματα για τον πολυμορφισμό της COX-2 -8473T/C

Από την ανάλυση των αποτελεσμάτων για τον πολυμορφισμό COX-2 -8473T/C προέκυψε ότι το 61,1% της ομάδας ελέγχου ήταν ομόζυγα για το φυσιολογικό (T/T) ενώ το 38,9% ήταν ετερόζυγο και έφερε και τα δύο αλληλόμορφα. Στην ομάδα της χρόνιας περιοδοντίτιδας το 59,1% ήταν ομόζυγο για το φυσιολογικό, το 36,4% ετερόζυγο και έφερε και τα δύο αλληλόμορφα και το 4,5 % ήταν ομόζυγο για τον πολυμορφισμό. Τέλος, για την ομάδα της επιθετικής περιοδοντίτιδας το 62,5% ήταν ομόζυγο για το φυσιολογικό αλληλόμορφο και το 37,5% ήταν ετερόζυγο (Πίνακας 5). Ωστόσο, ούτε για την ομάδα της χρόνιας ούτε για την ομάδα της επιθετικής περιοδοντίτιδας δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Τέλος, ούτε το φύλο φάνηκε να συσχετίζεται με τα αποτελέσματα ( Πίνακας 7).

**Πίνακας 5: Αποτελέσματα  $\chi^2$  για τον πολυμορφισμό της COX-2 -8473T/C**

| COX2-8473T/C | Ομάδα Ελέγχου | Χρόνια     | Επιθετική | P     |
|--------------|---------------|------------|-----------|-------|
| T/T (W)      | 11 (61,1%)    | 13 (59,1%) | 5 (62,5%) | 0.876 |
| T/C (H)      | 7 (38,9%)     | 8 (36,4%)  | 3 (37,5%) |       |
| C/C (M)      | 0             | 1 (4,5%)   | 0         |       |

W: wild type, M: mutant, H: heterozygous

Δ) Ανάλυση απλοτύπων για τους πολυμορφισμούς της COX2-1195GA/COX2-8473TC

Για την ανάλυση απλοτύπων χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό SHEsis. Τέσσερις ήταν οι πιθανοί απλότυποι AC, AT, GC, GT. Κανένας από τους απλότυπους δεν ήταν πιο συχνός σε κάποια από τις ομάδες της χρόνιας και της επιθετικής περιοδοντίτιδας σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (Πίνακας 6α,β).

**Πίνακας 6α: Ανάλυση απλοτύπων των ομάδων ΧΠ και Κ με το λογισμικό SHEsis για τους COX2 -1195GA/COX2 -8473TC**

| ΑΠΛΟΤΥΠΟΣ | ΧΡΟΝΙΑ ΠΕΡΙΟΔΟΝΤΙΤΙΔΑ (2n= 44) | ΚΟΝΤΟΛ (2n=36) | OD (95% CI)          | P value |
|-----------|--------------------------------|----------------|----------------------|---------|
| A C       | 12,2%                          | 15,3%          | 0,773 [0,215-2,779]  | 0,6924  |
| A T       | 76,4%                          | 76,4%          | 1,001 [0,355-2,824]  | 0,9986  |
| G C       | 6%                             | 1,4%           | 4,493 [0,452-44.633] | 0,3831  |
| G T       | 5,4%                           | 6,9%           | 0,767 [0,123-4,790]  | 0,7758  |

OD: Odds Ratios, CI: Confidence Intervals (95%)

**Πίνακας 6β: Ανάλυση απλοτύπων των ομάδων ΕΠ και Κ με το λογισμικό SHEsis για τους COX2 -1195GA/COX2 -8473TC**

| <b>ΑΠΛΟΤΥΠΟΣ</b> | <b>ΕΠΙΘΕΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΔΟΝΤΙΤΙΔΑ (2n= 16)</b> | <b>ΟΜΑΔΑ ΕΛΕΓΧΟΥ (2n=36)</b> | <b>OD (95% CI)</b>  | <b>P value</b> |
|------------------|--|------------------------------|---------------------|----------------|
| A C              | 18,8%                                    | 15,3%                        | 1,259 [0,267-5,931] | 0,7707         |
| A T              | 75%                                      | 76,4%                        | 0,873 [0,220-3,464] | 0,8464         |
| G C              | 0  | 1,4%                         | -                   | -              |
| G T              | 6,2%                                     | 6,9%                         | 0,880 [0,080-9,682] | 0,9167         |

OD: Odds Ratios, CI: Confidence Intervals (95%)

**Πίνακας 7 : Πολυμεταβλητή λογιστική παλινδρόμηση  
(multivariable logistic regression)**

| <b>Χρόνια</b>    |       |  | <b>Επιθετική</b>  |       |
|------------------|-------|--|-------------------|-------|
| OR (95% CI)      | P     |  | OR (95% CI)       | P     |
| Reference        |       |  | Reference         |       |
| 1.44 (0.29,7.12) | 0.654 |  | 0.74 (0.06,8.48)  | 0.805 |
|                  |       |  |                   |       |
| Reference        |       |  | Reference         |       |
| 1.05 (0.29,3.83) | 0.946 |  | 1.26 (0.20,7.94)  | 0.807 |
| Omitted          |       |  |                   |       |
|                  |       |  |                   |       |
| Reference        |       |  | Reference         |       |
| 1.27 (0.22,7.30) | 0.786 |  | 1.58 (0.13,19.15) | 0.718 |

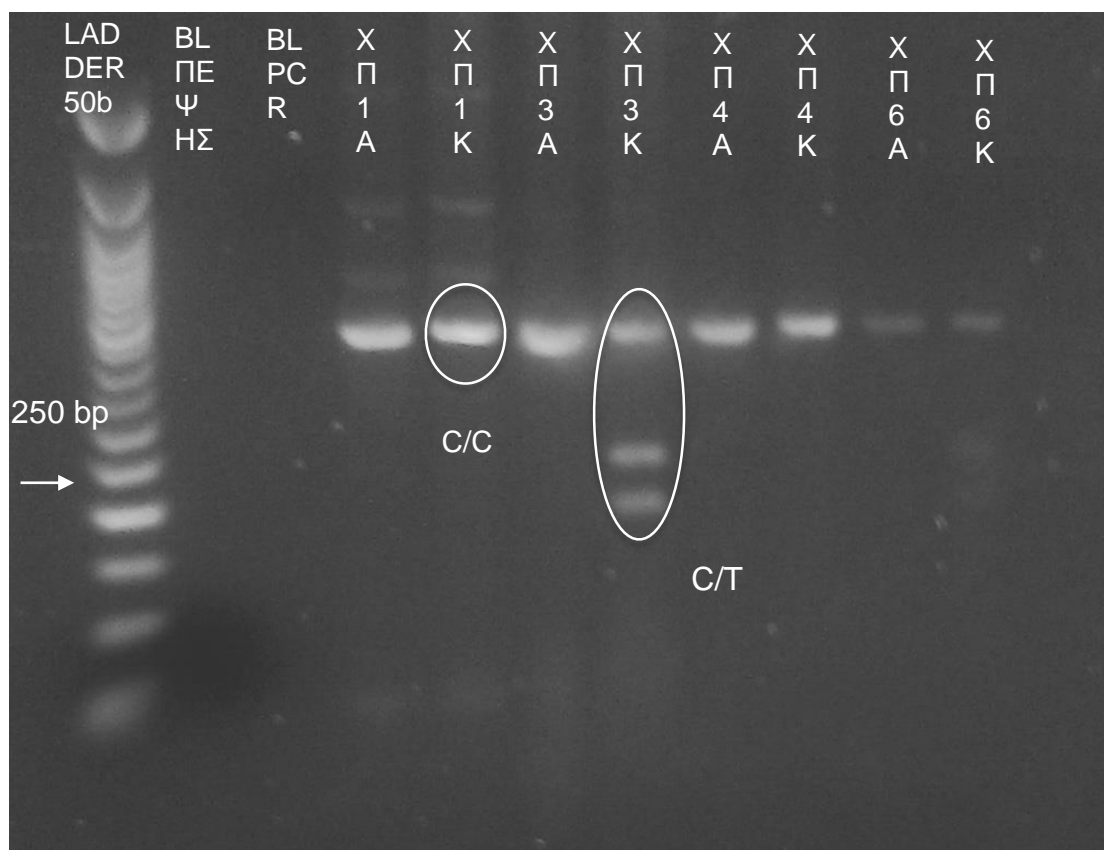
OD: Odds Ratios, CI: Confidence Intervals (95%)



## Εικόνες Αποτελεσμάτων Ηλεκτροφόρησης

Παρακάτω παρατίθενται ενδεικτικά κάποιες χαρακτηριστικές εικόνες αποτελεσμάτων ηλεκτροφόρησης.

i) MMP9 -1562C/T

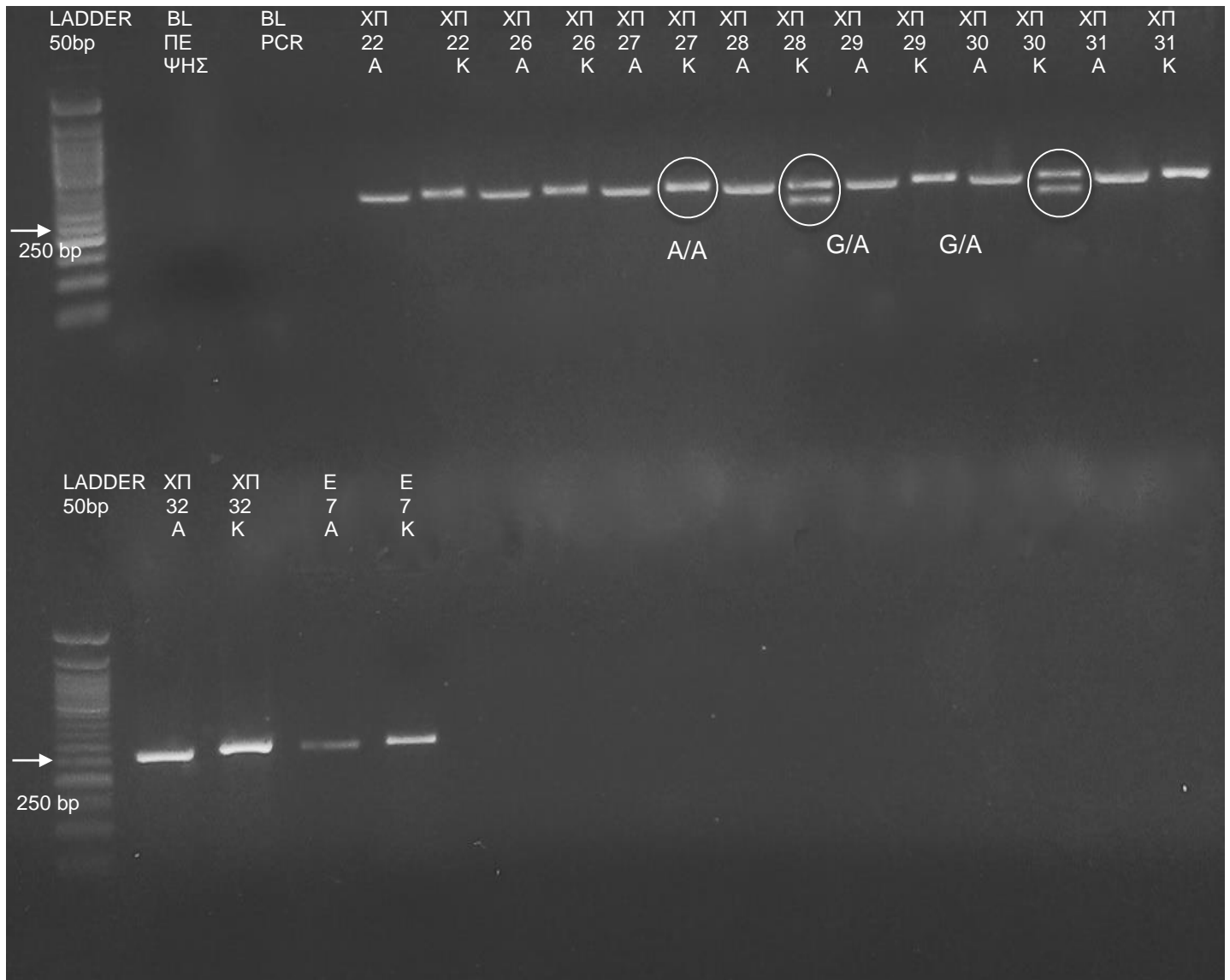


Εικόνα 1. Ο πολυμορφισμός της MMP9 στη θέση -1562 μετά την πέψη με το ένζυμο SphI. Τα ομόζυγα για το C/C αλληλόμορφο εμφανίζονται ως μία μπάντα στις 435 bp, τα ομόζυγα για το T/T αλληλόμορφο ως δύο μπάντες στις 247 και 188 bp ενώ τα ετερόζυγα απεικονίζονται ως συνδυασμός των C/T αλληλομόρφων. (3 μπάντες, 435, 247, 188 bp).

(A: άκοπο, χωρίς πέψη DNA, K: κομμένο, μετά από πέψη DNA, BL: BLANK, ΧΠ: Χρόνια Περιοδοντίτιδα)

(C: Wild type allele, T: Mutant allele)

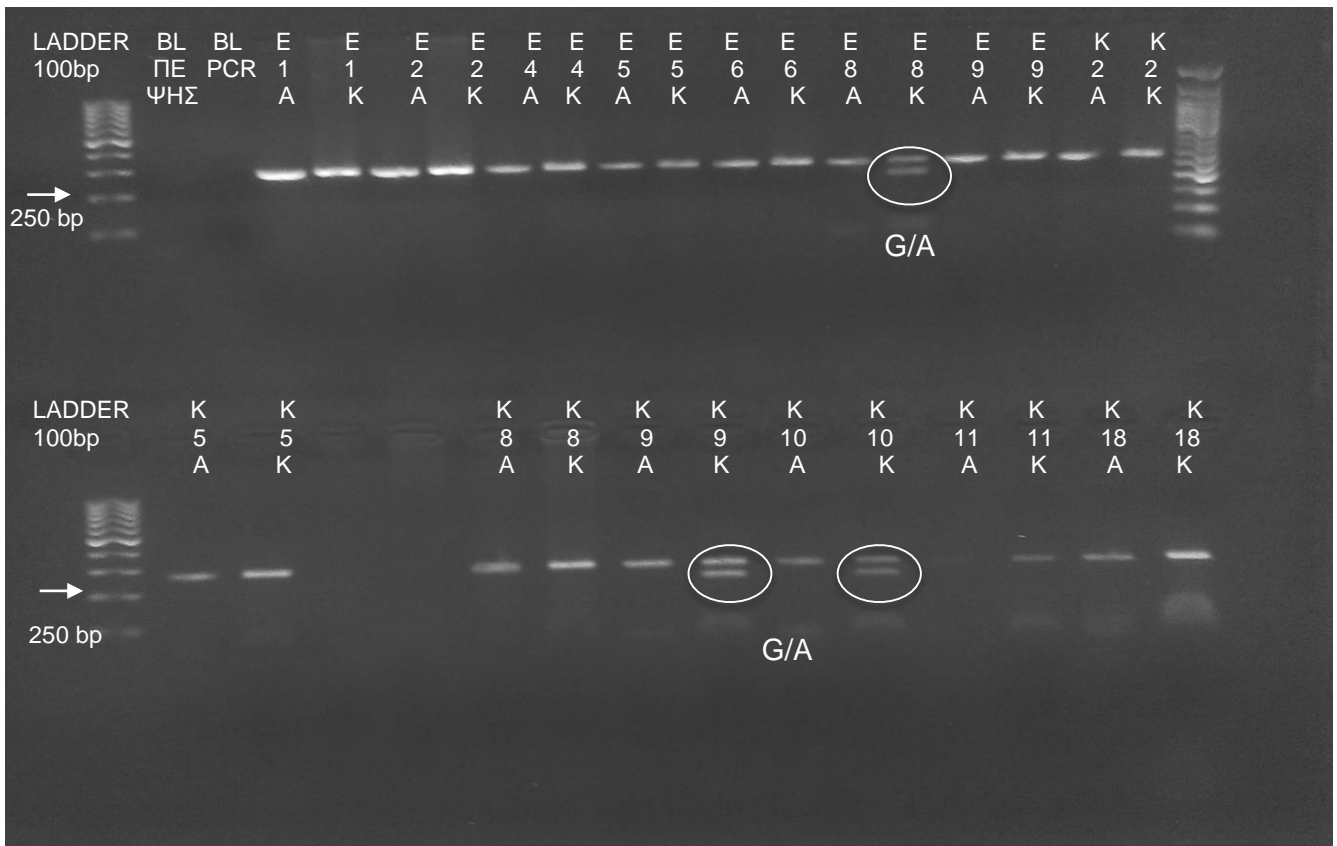
ii) COX2 -1195 G/A



Εικόνα 2. Το A αλληλόμορφο εμφανίζεται ως μια μπάντα στις 273 bp. Τα ομόζυγα για το G αλληλόμορφο εμφανίζεται ως μια μπάντα στις 220bp και μια μπάντα στις 53 bp. Τα ετερόζυγα και για τα δύο αλληλόμορφα εμφανίζονται ως τρεις μπάντες, στις 273bp , στις 220bp και τις 53bp που όμως δυστυχώς χάνεται.

(A: άκοπο, χωρίς πέψη DNA, K: κομμένο, μετά από πέψη DNA.B:BLANK, ΧΠ:Χρόνια Περιοδοντίτιδα, Ε:Επιθετική Περιοδοντίτιδα)

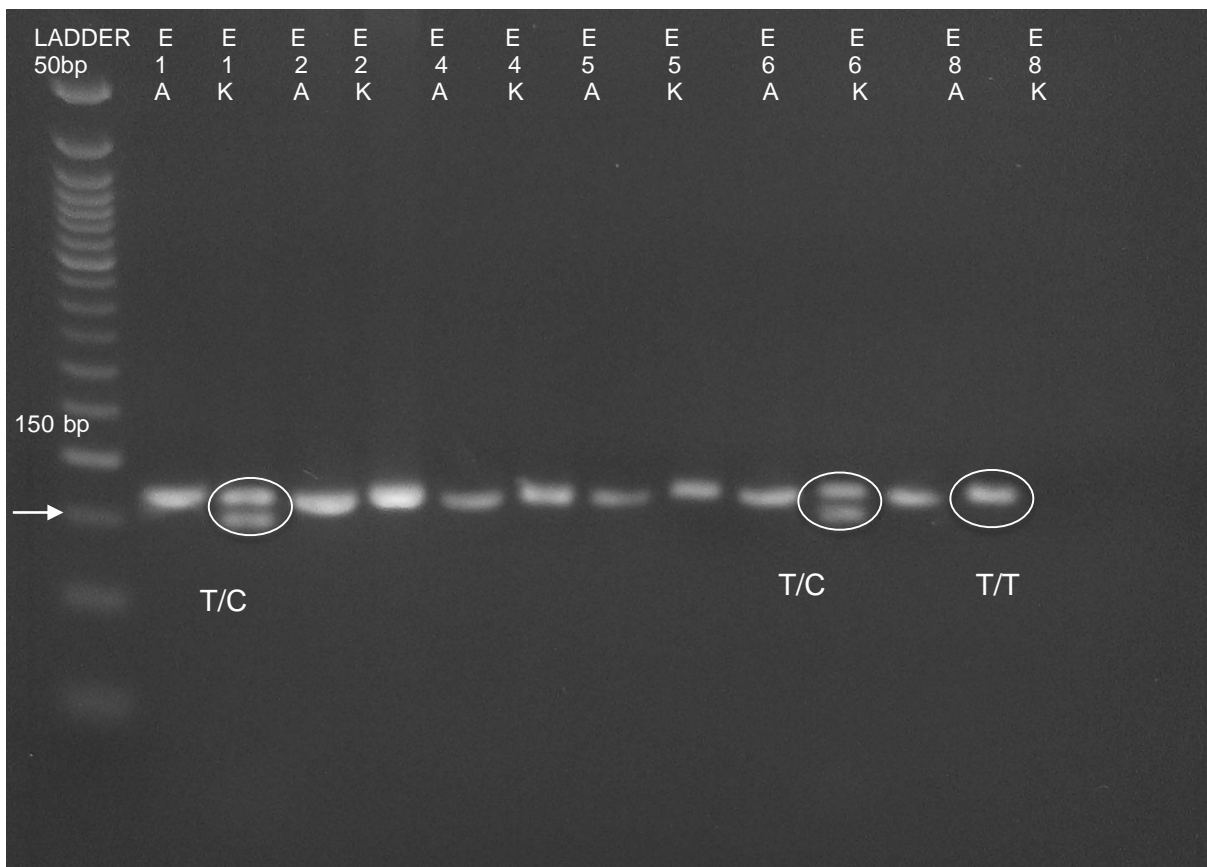
(G:Wild type allele, A:Mutant allele)



Εικόνα 3. Το A αλληλόμορφο εμφανίζεται ως μια μπάντα στις 273 bp. Τα ομόζυγα για το G αλληλόμορφο εμφανίζεται ως μια μπάντα στις 220bp και μια μπάντα στις 53 bp. Τα ετερόζυγα και για τα δύο αλληλόμορφα εμφανίζονται ως τρεις μπάντες, στις 273bp , στις 220bp και τις 53bp που όμως δυστυχώς χάνεται.

(A: άκοπτο, χωρίς πέψη DNA, K: κομμένο, μετά από πέψη DNA. B:BLANK, ΧΠ:Χρόνια Περιοδοντίτιδα, Ε:Επιθετική Περιοδοντίτιδα)

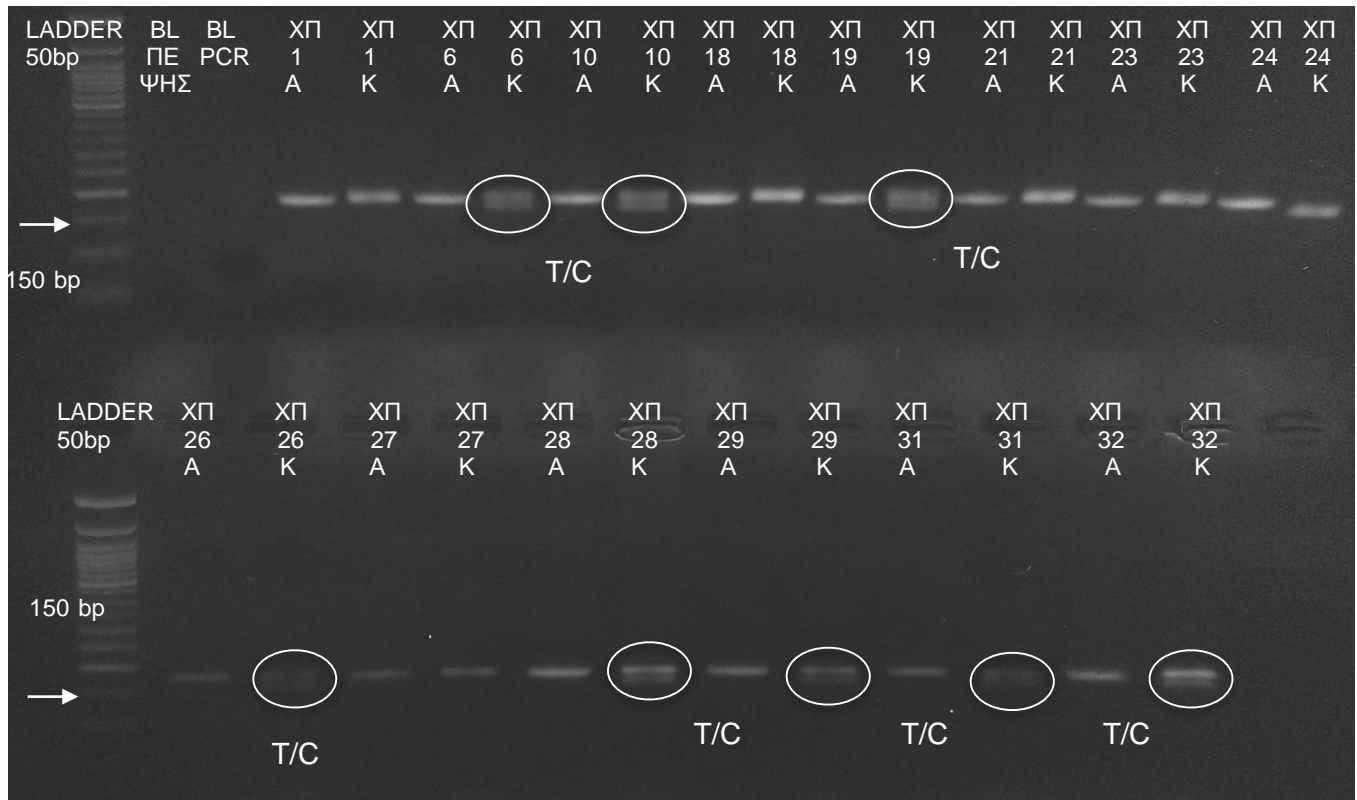
iii) COX2 -8473 T/C



Εικόνα 4. Το T αλληλόμορφο εμφανίζεται ως μια μπάντα στα 177 bp. Το C αλληλόμορφο εμφανίζεται ως μια μπάντα στα 156bp και μια μπάντα στα 21 bp. Το ετερόζυγο που φέρει και τα δύο αλληλόμορφα (T/C) εμφανίζεται ως δύο μπάντες στα 177 και 156 bp ενώ η τρίτη μπάντα στα 21bp που κανονικά θα έπρεπε να φαίνεται, χάνεται.

(A: άκοπτο, χωρίς πέψη DNA, K: κομμένο, μετά από πέψη DNA. B: BLANK, E: Επιθετική Περιοδοντίτιδα)

(T: Wild type allele, C: mutant allele)



Εικόνα 5. Το T αλληλόμορφο εμφανίζεται ως μια μπάντα στα 177 bp. Το C αλληλόμορφο εμφανίζεται ως μια μπάντα στα 156bp και μια μπάντα στα 21 bp. Το ετερόζυγο που φέρει και τα δύο αλληλόμορφα (T/C) εμφανίζεται ως δύο μπάντες στα 177 και 156 bp ενώ η τρίτη μπάντα στα 21bp που κανονικά θα έπρεπε να φαίνεται, χάνεται.

(A: άκοπο, χωρίς πέψη DNA, K: κομμένο, μετά από πέψη DNA. B: BLANK, E: Επιθετική Περιοδοντίτιδα)

(T: Wild type allele, C: mutant allele)

**ΑΝΑΛΥΤΙΚΟΣ ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ**

| Κωδικός<br>δείγματος | Πολυμορφισμός |           |           |
|----------------------|---------------|-----------|-----------|
|                      | MMP9 -1562    | COX2-1195 | COX2-8473 |
| ΧΠ01                 | c/c           | a/a       | t/t       |
| ΧΠ04                 | c/c           | a/a       | t/t       |
| ΧΠ06                 | c/c           | a/a       | t/c       |
| ΧΠ10                 | c/c           | a/a       | t/c       |
| ΧΠ13                 | c/c           | a/a       | t/t       |
| ΧΠ14                 | c/c           | a/a       | c/c       |
| ΧΠ17                 | c/c           | a/a       | t/t       |
| ΧΠ18                 | c/c           | g/a       | t/t       |
| ΧΠ19                 | c/c           | a/a       | t/c       |
| ΧΠ20                 | c/c           | g/a       | t/t       |
| ΧΠ21                 | c/t           | a/a       | t/t       |
| ΧΠ22                 | c/c           | a/a       | t/t       |
| ΧΠ23                 | c/c           | a/a       | t/t       |
| ΧΠ24                 | c/c           | a/a       | t/t       |
| ΧΠ25                 | c/t           | g/a       | t/t       |

|      |     |     |     |
|------|-----|-----|-----|
| ХП26 | c/t | a/a | t/c |
| ХП27 | c/c | a/a | t/t |
| ХП28 | c/c | a/a | t/c |
| ХП29 | c/c | g/a | t/c |
| ХП30 | c/c | a/a | t/t |
| ХП31 | c/c | a/a | t/c |
| ХП32 | c/c | a/a | t/c |
| K01  | c/t | a/a | t/t |
| K02  | c/c | a/a | t/c |
| K03  | c/t | a/a | t/t |
| K04  | c/c | a/a | t/c |
| K05  | c/c | a/a | t/t |
| K06  | c/c | a/a | t/t |
| K07  | c/c | a/a | t/t |
| K08  | c/c | a/a | t/t |
| K09  | c/c | g/a | t/c |
| K10  | c/t | g/a | t/t |
| K11  | c/c | a/a | t/c |
| K12  | c/c | a/a | t/t |

|     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|
| K13 | c/c | g/a | t/t |
| K14 | c/c | a/a | t/t |
| K15 | c/c | a/a | t/c |
| K16 | c/c | a/a | t/t |
| K17 | c/c | a/a | t/t |
| K18 | c/c | a/a | t/c |
| E1  | c/c | a/a | t/c |
| E2  | c/c | a/a | t/t |
| E4  | c/c | a/a | t/t |
| E5  | c/c | a/a | t/t |
| E6  | c/c | a/a | t/c |
| E7  | c/c | a/a | t/t |
| E8  | c/c | g/a | t/t |
| E9  | c/t | a/a | t/c |



### 3) ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στους φλεγμαίνοντες περιοδοντικούς ιστούς αυξάνεται η παραγωγή μεσολαβητών της φλεγμονής που συμμετέχουν στην καταστροφή του περιοδοντίου. Η καταστροφή αυτή έχει ως στόχο να δημιουργηθεί περισσότερος χώρος ώστε να φτάσουν στην περιοχή της φλεγμονής περισσότερα αμυντικά κύτταρα για να τεθεί σε έλεγχο η φλεγμονή. Τέτοιοι μεσολαβητές της φλεγμονής είναι οι κυτοκίνες, οι προσταγλαδίνες και οι μεταλλοπρωτεϊνάσες της εξωκυττάριας ουσίας. Η κυκλοοξυγενάση 2 είναι ένα σημαντικό ένζυμο που εμπλέκεται στο μεταβολισμό του αραχιδονικού οξέος σε προσταγλαδίνες. Οι μεταλλοπρωτεϊνάσες είναι ένζυμα που συμμετέχουν στο μεταβολισμό της εξωκυττάριας ουσίας. Πιο ειδικά, η MMP-9 διασπά το κολλαγόνο τύπου IV,V,XI αλλά και ήδη αποδομημένες δομές κολλαγόνου. Πολυμορφισμοί στα γονίδια της κυκλοοξυγενάσης και της μεταλλοπρωτεϊνάσης 9 επηρεάζουν την έκφρασή τους και κατά συνέπεια τη φλεγμονώδη διαδικασία (Sanak και συν. 2005, Dubois και συν. 1998).

Η συγκεκριμένη μελέτη διερεύνησε την πιθανή συσχέτιση των πολυμορφισμών COX-2 -1195G/A, COX2 -8473T/C και MMP9 -1562C/T με τη χρόνια και επιθετική περιοδοντίτιδα σε Ελληνικό πληθυσμό. Η μεθοδολογία που ακολουθήθηκε βασίστηκε σε προηγούμενες έρευνες (Daing και συν. 2012, Loo και συν. 2011). Τα κριτήρια επιλογής των ασθενών που τέθηκαν ήταν ιδιαίτερα αυστηρά σε μία προσπάθεια να αποκλειστούν όσο το δυνατόν πιθανόν συγχυτικοί παράγοντες που επηρεάζουν την εμφάνιση της περιοδοντίτιδας. Έτσι, όσον αφορά στη χρόνια περιοδοντίτιδα, αποκλείστηκαν ασθενείς που ήταν καπνιστές καθώς η πιθανότητα εμφάνισης περιοδοντίτιδας είναι αυξημένη

στους καπνιστές. Οι καπνιστές παρουσιάζουν μεγαλύτερα βάρη θυλάκων, μεγαλύτερες κλινικές απώλειες πρόσφυσης, μεγαλύτερες απώλειες στήριξης και μεγαλύτερες απώλειες δοντιών ( Burgan και συν. 1997, Laxman και συν. 2008). Επιπλέον, έρευνες έδειξαν ότι ο γενετικός παράγοντας ήταν πιο εμφανής όταν οι καπνιστές εξαιρούνταν από τις μελέτες ( Kornman και συν. 1997, Agrawal και συν. 2006, Shete και συν. 2010, Grossi και συν.1995). Από την παρούσα μελέτη εξαιρέθηκαν επίσης ασθενείς με συστηματικά νοσήματα και καταστάσεις που επηρεάζουν την εμφάνιση της περιοδοντίτιδας, όπως για παράδειγμα ο σακχαρώδης διαβήτης και η εγκυμοσύνη. Η αυστηρότητα των κριτηρίων αυτών όμως είχε σαν αποτέλεσμα τη δυσκολία εξεύρεσης μεγάλου αριθμού δειγμάτων.

Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν αποφολιδωμένα κύτταρα της παρείας και η συλλογή τους έγινε με βαμβακοφόρο στυλεό. Αυτή η μέθοδος είναι πολύ πιο εύκολη και κυρίως ανώδυνη για τον ασθενή, σε σχέση με τη συλλογή αίματος που χρησιμοποιείται σε άλλες έρευνες (Li και συν. 2011, Daing και συν. 2012, Loo και συν. 2012).

Παρόλο που έχουν βρεθεί πολλοί πολυμορφισμοί στο γονίδιο της κυκλοοξυγενάσης, λίγοι έχουν μελετηθεί για την επίδρασή τους στην έκφραση της κυκλοοξυγενάσης. Η συγκεκριμένη έρευνα μελετά τον πολυμορφισμό COX2 -1195G/A που εντοπίζεται στην περιοχή του υποκινητή και τον COX2 -8473T/C που εντοπίζεται στην 3' UTR (untranslated region) του γονιδίου. Όσον αφορά στον πολυμορφισμό COX2 -1195G/A δεν βρέθηκε σημαντική συσχέτιση την χρόνια ή την επιθετική περιοδοντίτιδα. Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρούνται στην έρευνα των Schaefer και συνεργατών, σε Ευρωπαϊκό πληθυσμό , (Schaefer και συν. 2010) που μελέτησε το συγκεκριμένο

πολυμορφισμό σε ασθενείς με χρόνια και επιθετική περιοδοντίτιδα. Ωστόσο, η έρευνα των Xie και συνεργατών, σε Κινέζικο πληθυσμό, βρήκε ότι το A αλληλόμορφο ήταν αυξημένο στους ασθενείς με χρόνια Περιοδοντίτιδα (Xie και συν. 2009). Το αποτέλεσμα αυτό επιβεβαίωσε αργότερα και η έρευνα των Daing και συνεργατών, σε πληθυσμό στην Ινδία (Daing και συν. 2012).

Ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο ο πολυμορφισμός μπορεί να επηρεάζει τη λειτουργία του γονιδίου της κυκλοοξυγενάσης παραμένει ασαφής. Ωστόσο, κάποιοι μηχανισμοί έχουν προταθεί σε προηγούμενες μελέτες. Ο πολυμορφισμός COX2 -1195G/A βρίσκεται στην 5' πλευρική περιοχή του γονιδίου, όπου βρίσκεται ο υποκινητής του γονιδίου και υπάρχουν πολλές περιοχές πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων (Parafili και συν. 2002). Είναι πιθανό λοιπόν, ο πολυμορφισμός να επηρεάζει τη λειτουργία του γονιδίου παρεμβαίνοντας στην ειδική σύνδεση των μεταγραφικών παραγόντων και τις ακολουθίες υποκινητή. Μια προηγούμενη μελέτη ανέφερε ότι το αλληλόμορφο A του COX2 -1195 πολυμορφισμού, οδήγησε σε αυξημένη γονιδιακή έκφραση και ως εκ τούτου αυξημένη ενζυμική δραστηριότητα που προσδίδει αυξημένη ευαισθησία του ξενιστή στη νόσο (Guo και συν. 2007). Ωστόσο, στη συγκεκριμένη μελέτη δεν βρέθηκε επικράτηση του A αλληλομόρφου.

Για τη συσχέτιση του πολυμορφισμού COX2 -8473 T/C με την περιοδοντίτιδα υπάρχουν δύο προηγούμενες έρευνες και αφορούν και οι δύο τη συσχέτιση του πολυμορφισμού με τη χρόνια περιοδοντίτιδα και όχι με την επιθετική. Στην παρούσα μελέτη δεν βρέθηκε συσχέτιση του συγκεκριμένου πολυμορφισμού με τη χρόνια περιοδοντίτιδα. Στο ίδιο αποτέλεσμα κατέληξαν και η μελέτη των Xie και συνεργατών αλλά και η μελέτη των Daing και συνεργατών που όμως βρήκαν ότι το C αλληλόμορφο σχετίζεται με μειωμένο κίνδυνο εμφάνισης της

νόσου (Xie και συν. 2009, Daing και συν. 2012). Ο πιθανός μηχανισμός είναι ο εξής: Στο mRNA της 3' μη μεταφραζόμενης περιοχής (3'UTR) του γονιδίου της κυκλοοξυγενάσης βρίσκονται μοτίβα πλούσια σε αδενίνη-ουρακίλη. Τα μοτίβα αυτά εμπλέκονται στη ρύθμιση της παραγωγής της κυκλοοξυγενάσης δρώντας ως καθοριστικό μήνυμα αστάθειας και ανασταλτικό στοιχείο για τη μετάφραση (Dixon και συν. 2000, Cok και συν.2001). Ο COX2 -8473T/C πολυμορφισμός αλλάζει τα μοτίβα αυτά προκαλώντας πιθανά αποδόμηση των COX2 μεταγράφων και κατ' επέκταση διαφορεική έκφραση της COX2.

Όσον αφορά τη συσχέτιση του πολυμορφισμού αυτού με την επιθετική περιοδοντίτιδα η συγκεκριμένη μελέτη δεν κατάφερε να βρει στατιστικά σημαντική συσχέτιση.

Η ανάλυση απλοτύπων πιστεύεται ότι είναι πιο ισχυρή από την ανάλυση μεμονωμένα των πολυμορφισμών για την ανίχνευση συσχέτισης μεταξύ γονότυπου και φαινοτύπου. Η μελέτη ενός απλοτύπου βοηθάει καλύτερα την ανίχνευση ανισορροπίας σύνδεσης (Linkage Disequilibrium) σε σχέση με τους μεμονωμένους δείκτες πολυμορφισμών (Gabriel και συν. 2002, Frazer και συν. 2007). Στατιστικά, οι χαμηλές D και  $r^2$  τιμές προβλέπουν ότι κανένας από τους παραπάνω πολυμορφισμούς δεν ήταν σε ανισορροπία σύνδεσης και οι δύο τόποι τείνουν να κληρονομούνται τυχαία. Περαιτέρω ανάλυση απλοτύπων, δεν κατέληξε σε σημαντική συσχέτιση κάποιου απλότυπου με την χρόνια περιοδοντίτιδα. Αντίθετα, η μελέτη των Xie και συνεργατών καθώς και η μελέτη των Daing και συνεργατών κατέληξαν ότι ο απλότυπος AT σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης της περιοδοντίτιδας και ότι θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως προγνωστικός δείκτης της νόσου.

Ως προς τον πολυμορφισμό MMP-9 -1562C/T η συγκεκριμένη μελέτη δεν κατάφερε να βρει συσχέτιση με τη χρόνια ή την επιθετική περιοδοντίτιδα. Παρόμοια αποτελέσματα βρήκαν και οι de Souza και συνεργάτες, οι Holla και συνεργάτες, καθώς και οι Loo και συνεργάτες, οι οποίοι δεν βρήκαν σημαντική διαφορά στους ασθενείς με χρόνια περιοδοντίτιδα και την ομάδα ελέγχου για τον πολυμορφισμό αυτό (de Souza και συν. 2005, Holla και συν. 2006, Loo και συν. 2011). Αντίθετα αποτελέσματα βρήκαν οι Keles και συνεργάτες και οι Li και συνεργάτες, οι οποίοι βρήκαν ότι το αλληλόμορφο T σχετίζεται με την χρόνια περιοδοντίτιδα (Keles και συν. 2006, Li και συν. 2012). Όσον αφορά στη συσχέτιση του πολυμορφισμού αυτού με την επιθετική περιοδοντίτιδα, οι Chen και συνεργάτες δεν βρήκαν συσχέτιση, ενώ οι Gurkan και συνεργάτες βρήκαν ότι το T αλληλόμορφο σχετίζεται με μειωμένο κίνδυνο εμφάνισης της νόσου. Σύμφωνα με τον Itagaki και συνεργάτες, είναι σύνηθες φαινόμενο για τις διάφορες εθνικότητες να εμφανίζουν διαφορετικούς πολυμορφισμούς ως παράγοντες κινδύνου για την ίδια νόσο. Σε αυτό οφείλεται λοιπόν, η ετερογένεια στα αποτελέσματα των διάφορων ερευνών για την επίδραση των ίδιων πολυμορφισμών στην ίδια νόσο, που πραγματοποιούνται σε διαφορετικές ομάδες εθνικοτήτων (Itagaki και συν. 2004).

## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η παρούσα έρευνα δεν κατάφερε να βρει σημαντική συσχέτιση των πολυμορφισμών στο γονίδιο της κυκλοοξυγενάσης COX2 -1195G/A COX2 -8473T/C με τη χρόνια ή την επιθετική περιοδοντίτιδα. Επιπρόσθετα, δεν βρέθηκε συσχέτιση του πολυμορφισμού στο γονίδιο της μεταλλοπρωτεϊνάσης 9, MMP-9 -1562C/T με τη χρόνια ή την επιθετική περιοδοντίτιδα. Το μικρό

μέγεθος του δείγματος δεν επιτρέπει την εξαγωγή ασφαλούς συμπεράσματος για τη συσχέτιση ή μη των πολυμορφισμών αυτών με την χρόνια και την επιθετική περιοδοντίτιδα. Ωστόσο, η αυστηρότητα των κριτηρίων με βάση τα οποία επιλέχθηκαν τα άτομα που συμμετείχαν στις ερευνητικές ομάδες προσδίδει αξιοπιστία στην έρευνα, καθώς μειώνεται η επίδραση συγχυτικών παραγόντων στην εμφάνιση της νόσου και γίνεται προσπάθεια να μελετηθεί, μεμονωμένα η επίδραση των συγκεκριμένων πολυμορφισμών. Επιπλέον, η συγκεκριμένη έρευνα είναι η πρώτη έρευνα που πραγματοποιείται σε Ελληνικό πληθυσμό για τους συγκεκριμένους πολυμορφισμούς, αλλά και η δεύτερη που αφορά σε Ευρωπαϊκό πληθυσμό. Τέλος, σχετικά με τον πολυμορφισμό COX2-8473T/C, είναι η πρώτη φορά που μελετάται η συσχέτισή του με την επιθετική περιοδοντίτιδα.

Περαιτέρω έρευνες με μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων θα συμβάλλουν στην επιβεβαίωση των συγκεκριμένων αποτελεσμάτων.

#### 4) ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η περιοδοντίτιδα είναι μία φλεγμονώδης νόσος των στηρικτικών ιστών των δοντιών. Κατά τη φλεγμονώδη απάντηση εκκρίνονται μεσολαβητές της φλεγμονής, που συμμετέχουν και στην παθογένεια των περιοδοντικών ιστών. Οι μεσολαβητές αυτοί είναι οι κυτοκίνες, οι μεταλλοπρωτεϊνάσες της εξωκυττάριας ουσίας και οι προσταγλαδίνες. Οι προσταγλαδίνες είναι παράγωγα του αραχιδονικού οξέος το οποίο μεταβολίζεται από ένζυμα που ονομάζονται κυκλοξυγενάσες. Οι μεταλλοπρωτεϊνάσες της εξωκυττάριας ουσίας είναι πρωτεολυτικά ένζυμα που αποδομούν κολλαγόνο και είναι τα κύρια ένζυμα στην καταστροφή του συνδετικού ιστού. Οι προσταγλαδίνες ανήκουν στα εικοσανοειδή και είναι παράγωγα του αραχιδονικού οξέος. Οι προσταγλαδίνες οδηγούν σε αγγειοδιαστολή, πυρεξία, αύξηση της διαπερατότητας και περιοδοντική καταστροφή. Πιο ειδικά η PGE2 διεγείρει τα μακροφάγα και τους ινοβλάστες να εκκρίνουν MMPs και έχει οστεοκλαστική δραστηριότητα.

Γενετικές αλλαγές στα γονίδια των MMPs και της COX2 μπορούν να επηρεάσουν το επίπεδο μεταγραφής τους και την παραγωγή πρωτεΐνης. Αρκετές μελέτες και μετα-αναλύσεις αναφέρουν πως υπάρχει στατιστικά σημαντική συσχέτιση των πολυμορφισμών της COX-2 και MMP-9 με τη χρόνια περιοδοντική νόσο. Ο σκοπός της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας είναι να διαπιστωθεί εάν οι πολυμορφισμοί COX-2 -1195G/A, COX-

2 -8473C/T και MMP-9 -1562C/T εμφανίζονται με διαφορετική συχνότητα στους ασθενείς με χρόνια και επιθετική περιοδοντίτιδα σε σχέση με τους υγιείς επηρεάζοντας έτσι τη συχνότητα εμφάνισης της περιοδοντικής νόσου. Η εξακρίβωση της ύπαρξης ή μη σε κάθε άτομο των εν λόγω πολυμορφισμών έγινε με RFLP PCR. Η παρούσα μελέτη δεν βρήκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση της χρόνιας περιοδοντίτιδας με τους πολυμορφισμούς COX-2 - 1195G/A, COX-2 -8473C/T και MMP-9 -1562C/T. Συσχέτιση δε βρέθηκε ούτε ανάμεσα στους παραπάνω πολυμορφισμούς και την επιθετική περιοδοντίτιδα. Τέλος, η ανάλυση απλοτύπων για τους δύο πολυμορφισμούς στο γονίδιο της COX2 δεν κατέληξε ότι υπάρχει συσχέτιση ανάμεσα σε κάποιο συγκεκριμένο απλότυπο και στη χρόνια ή επιθετική περιοδοντίτιδα. Το μικρό μέγεθος του δείγματος (23 περιπτώσεις ΧΠ, 8 περιπτώσεις ΕΠ και 18 περιπτώσεις ελέγχου) δεν επιτρέπει την εξαγωγή ασφαλούς συμπεράσματος για τη συσχέτιση ή μη των πολυμορφισμών αυτών με τη χρόνια και την επιθετική περιοδοντίτιδα. Ωστόσο, η αυστηρότητα των κριτηρίων με βάση τα οποία επιλέχθηκαν τα άτομα που συμμετείχαν στις ερευνητικές ομάδες προσδίδει αξιοπιστία στην έρευνα καθώς μειώνεται η επίδραση συγχυτικών παραγόντων στην εμφάνιση της νόσου και γίνεται προσπάθεια να μελετηθεί, μεμονωμένα η επίδραση των συγκεκριμένων πολυμορφισμών. Επιπλέον, η συγκεκριμένη έρευνα είναι η πρώτη που πραγματοποιείται σε Ελληνικό πληθυσμό για τους συγκεκριμένους πολυμορφισμούς αλλά και η δεύτερη που αφορά σε Ευρωπαϊκό πληθυσμό. Τέλος, όσον αφορά τον πολυμορφισμό COX2 - 8473T/C, είναι η πρώτη φορά που μελετάται η συσχέτισή του με την επιθετική περιοδοντίτιδα. Περαιτέρω έρευνες με μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων θα συμβάλλουν στην επιβεβαίωση των συγκεκριμένων αποτελεσμάτων.



## 5) ΑΓΓΛΙΚΗ ΠΕΡΙΛΗΨΗ

“Association of *COX2* and *MMP-9* gene polymorphisms with chronic and aggressive periodontitis.”

Periodontitis is an inflammatory disease of the supporting tissues of the teeth. During the inflammatory response secreted substances, mediators of inflammation involved in the pathogenesis of periodontal tissue. These substances are cytokines, extracellular matrix metalloproteinases and prostaglandins. Prostaglandins are derivatives of arachidonic acid which is metabolized by enzymes called cyclooxygenases. The matrix metalloproteinases are proteolytic enzymes which degrade collagen and represent the major enzymes in the destruction of connective tissue. Prostaglandins are the eicosanoids and are derivatives of arachidonic acid. The prostaglandins properties are vasodilation, pyrexia, increased permeability, periodontal destruction.

More especially PGE<sub>2</sub> stimulates macrophages and fibroblasts to secrete MMPs and has osteoclastic activity.

Genetic changes in the genes of MMPs and COX2 may affect the level of transcription and protein production. Several studies and meta-analyses indicate that there is statistically significant association of polymorphisms of COX-2 and MMP9 with chronic periodontal disease. The purpose of this thesis is to determine whether COX-2 polymorphisms -1195G / A , COX-2 -8473C / T and MMP-9 -1562C / T appear with different frequencies in patients with chronic and aggressive periodontitis compared to healthy ones. RFLP PCR was used in order to identify if each individual was carrying the polymorphisms or not.

This study found no significant association between chronic periodontitis and polymorphisms COX-2 -1195G / A, COX-2 -8473C / T and MMP-9 -1562C / T. Correlation was not found among these polymorphisms and aggressive periodontitis. Finally, the haplotype analysis between polymorphisms in the COX2 gene did not conclude that there is a correlation between a particular haplotype and chronic or aggressive periodontitis. Small sample size does not allow firm conclusions about the association or not of these polymorphisms with chronic and aggressive periodontitis. However, the stringency of the criteria based on which the selection of the study group was done, adds credibility to the research as the impact of confounding factors is eliminated. Furthermore, this study is the first attempt carried out in the Greek population for these polymorphisms and the second on any European population. Finally, this is the first report that investigates correlation of the COX2 -8473T/C polymorphism with aggressive periodontitis. Further studies with a greater number of samples will help to validate these results.

## 6) ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abilleira S, Bevan S, Markus HS. "The role of genetic variants of matrix metalloproteinases in coronary and carotid atherosclerosis." *J Med Genet.* (2006); 43(12):897-901.
- Agrawal AA, Kapley A, Yeltiwar RK, Purohit HJ. "Assessment of single nucleotide polymorphism at IL-1A+4845 and IL- 1B+3954 as genetic susceptibility test for chronic periodon- titis in Maharashtrian ethnicity." *J Periodontol*(2006);77:1515-21.
- Akkız H, Bayram S, Bekar A, Akgöllü E, Ülger Y. "Functional polymorphisms of cyclooxygenase-2 gene and risk for hepatocellular carcinoma." *Mol Cell Biochem.* 2011 Jan;347(1-2):201-8.
- American Academy of Periodontology. Position Paper. "Diabetes and periodontal diseases." *J Periodontal* (2000); 71:664-678.
- Armitage GC. "Development of a classification system for periodontal diseases and conditions." *Ann Periodontal* (1999);4:1–6.
- Beaty TH, Colyer CR, Chang YC, Liang KY, Graybeal JC, Muhammad NK, Levin LS. " Familial aggregation of periodontal indices." *J Dent Res* (1993); 72: 544-551.

- Birkedal-Hansen H, Moore WGI, Bodden MK, Windsor LJ, Birkedal-Hansen B, DeCarlo A, Engler A. "Matrix metalloproteinases: A review." *Crit Rev Oral Biol Med* (1993); 4:197-250.
- Birkedal-Hansen H. "Host-mediated extracellular matrix destruction by metalloproteinases." In: Genco R, Hamada S, Lehner T, McGhee J, Mergenhagen S. eds. *Molecular Pathogenesis of Periodontal disease*. (1994) Washington DC: ASM Press, pp 191-202.
- Birkedal-Hansen H. "Role of matrix metalloproteinases in human periodontal diseases." *J Periodontol* (1993); 64: 474-484.
- Boughman JA, Halloran SL, Roulston D, Schwartz S, Suzuki JD, Welckamp LP, Wenk RE, Wooten R, Cohen MM. "An autosomal-dominant form of juvenile periodontitis localization to chromosome 4 and linkage to dentinogenesis imperfecta and Gc." *J Craniofacial Genetics and Developmental Biology*. (1986); 6: 341-350.
- Buisson AC, Zahm JM, Polette M, Pierrot D, Bellon G, Puchelle E, Birembaut P, Tournier JM. "MMP9 is involved in the in vitro wound repair of human respiratory epithelium". *Journal of Cellular Physiology* (1996); 166 (2): 413–26.
- Burgan SW. "The role of tobacco use in periodontal diseases:A literature review." *Gen Dent* (1997); 45: 469-470

- Butler JH. "A familiar pattern of juvenile periodontitis (periodontosis)." *J periodontol* (1969); 40: 115-118
- Cao Z, Li C, Jin L, Corbet EF. "Association of matrix metalloproteinase-1 promoter polymorphism with generalized aggressive periodontitis in a Chinese population." *J Periodontal Res.* (2005); 40: 427-431.
- Chen D, Wang Q, Ma ZW, Chen FM, Chen Y, Xie GY, Wang QT, Wu ZF. "MMP-2, MMP-9 and TIMP-2 gene polymorphisms in Chinese patients with generalizes aggressive periodontitis." *J Clin Periodontol.* (2007); 34(5): 384-389.
- Chung CS, Kau MCW, Chung SSC, Rao DC. "A genetic and epidemiological study of periodontal disease in Hawaii. II Genetic and environmental influence." *American Journal of Human Genetics* (1977); 29: 76-82
- Cok SJ, Morrison AR. "The 3'-untranslated region of murine cyclooxygenase-2 contains multiple regulatory elements that alter message stability and translational efficiency." *J Biol Chem* (2001);276:23179-85.
- Daing et al., "Cyclooxygenase 2 gene polymorphisms and chronic periodontitis in a North Indian population: a pilot study" *Journal of Periodontal & Implant Science*, (2012);42:151-157.

- de Souza AP, Trevilatto PC, Scarel-Caminga RM, Brito RB Jr, Line SR. "MMP-1 promoter polymorphism: association with chronic periodontitis severity in a Brazilian population." *J Clin Periodontol.* (2003);30:154-158.
- de Souza AP, Trevilatto PC, Scarel-Caminga RM, de Brito RB Jr, Barros SP, Line SR. "Analysis of the MMP-9 (C-1562 T) and TIMP-2 (G-418C) gene promoter polymorphisms in patients with chronic periodontitis." *J Clin Periodontol.* (2005);32(2):207-211.
- Decock J, Paridaens R, Ye S. "Genetic polymorphisms of matrix metalloproteinases in lung, breast and collateral cancer." *Colin Genet.* (2008);73(3): 197-211.
- Delclaux C, Delacourt C, D'Ortho MP, Boyer V, Lafuma C, Harf A. "Role of gelatinase B and elastase in human polymorphonuclear neutrophil migration across basement membrane". *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* (1996); 14 (3): 288–95.
- Dennison DK & Van Dyke T. "The role of phagocytic cells, antibody and complement in periodontal health and disease." *Periodontology 2000* (1997); 14: 54-78.
- Dixon DA, Kaplan CD, McIntyre TM, Zimmerman GA, Prescott SM. "Post-transcriptional control of cyclooxygenase-2 gene expression. The role of the 3'-untranslated region." *J Biol Chem* (2000);275:11750-7.

- Dubois B, Starckx S, Pagenstecher A, Oord Jv, Arnold B, Opdenakker G. "MMP9 deficiency protects against endotoxin shock". *Eur. J. Immunol.* (2002);32 (8): 2163–71.
- Dubois RN, Abramson SB, Crofford L, Gupta RA, Simon LS, Van De Putte LB, et al. Cyclooxygenase in biology and disease. *FASEB J* (1998);12:1063-73.
- Eisen A, Jeffrey J, Gross J. "Human skin collagenase. Isolation and mechanism of attack on the collagen molecule". *Biochim Biophys Acta* (1968); 151 (3): 637–45.
- Emanuela Ricciotti, PhD and Garret A. FitzGerald, MD. "Prostaglandins and Inflammation" *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* (2011); 31 (5): 986-1000
- Forsyth PA, Wong H, Laing TD, Rewcastle NB, Morris DG, Muzik H, Leco KJ, Johnston RN, Brasher PM, Sutherland G, Edwards DR. "Gelatinase-A (MMP-2), gelatinase-B (MMP-9) and membrane type matrix metalloproteinase-1 (MT1-MMP) are involved in different aspects of the pathophysiology of malignant gliomas". *British Journal of Cancer* (1999); 79 (11-12): 1828–35.

- Fourel J. "Periodontitis: A periodontal syndrome." *J Periodontol* (1972); 43: 240-255.
- Frazer KA, Ballinger DG, Cox DR, Hinds DA, Stuve LL, et al. International HapMap Consortium, "A second generation human haplotype map of over 3.1 million SNPs." *Nature* (2007);449:851-61.
- Gabriel SB, Schaffner SF, Nguyen H, Moore JM, Roy J, Blumenstiel B, et al. "The structure of haplotype blocks in the human genome." *Science* (2002);296:2225-9.
- Gharib AF, Karam RA, Abd El Rahman TM, Elsayy WH. "COX-2 polymorphisms -765G→C and -1195A→G and hepatocellular carcinoma risk." *Gene*. (2014) Jun 15;543(2):234-6.
- Gross J, Lapiere C. "Collagenolytic Activity in amphibian tissues: A tissue culture assay". *Proc Natl Acad Sci USA* (1962); 48 (6): 1014–22.
- Grossi SG, Genco RJ, Machtei EE, Ho AW, Koch G, Dunford R, et al. "Assessment of risk for periodontal disease. II. Risk indicators for alveolar bone loss." *J Periodontol* (1995); 66:23-9.
- Guo Y, Zhang X, Tan W, Miao X, Sun T, Zhao D, et al. "Platelet 12-lipoxygenase Arg261Gln polymorphism: functional characterization and association with risk of esophageal squamous cell carcinoma in



combination with COX-2 polymorphisms.” *Pharmacogenet Genomics* (2007); 17: 197-205.

- Guo Y, Zhang X, Tan W, Miao X, Sun T, Zhao D, et al. “Platelet 12-lipoxygenase Arg261Gln polymorphism: functional characterization and association with risk of esophageal squamous cell carcinoma in combination with COX-2 polymorphisms.” *Pharmacogenet Genomics* (2007);17:197-205
- Gürkan A, Emingil G, Saygan BH, Atilla G, Cinarcik S, Köse T, Berdeli A. “Matrix metalloproteinases-2, -9 and -12 gene polymorphisms in generalized aggressive periodontitis.” *J Periodontol* (2007);78:2338–47.
- Gürkan A, Emingil G, Saygan BH, Atilla G, Cinarcik S, Köse T, Berdeli A. “Gene polymorphisms of matrix metalloproteinases-2, -9 and -12 in periodontal health and severe chronic periodontitis.” *J Periodontol* (2007);78:2338–47.
- Haffajee AD, Socransky SS. “Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases.” *Periodontology* 2000 (1994); 5:78-111.
- Hamanway MM, Siraganian RP & Mergenhagen SE. “ Role of the extracellular matrix in inflammation.” In: Genco R, Hamada S, Lehner T, McGhee J Mergenhagen S. eds. *Molecular Pathogenesis of Periodontal disease*. (1994) Washington DC: ASM Press, pp 235-246.
- Hart TC, Kornman KS. “Genetic factors in the pathogenesis of periodontitis.” *Periodontology* 2000 (1997); 14: 202-215.

- Hart TC, Marazita ML, Schenkein HA, Diehl SR. "Reinterpretation of evidence of Xlinked dominant inheritance of juvenile periodontitis." (1992); 63: 169-173.
- Hart TC, Schenkein HA, Marazita ML, Brooks GN, Gunsolley JG, Diehl SR. "No female predominance in juvenile periodontitis after correction for ascertainment of bias." J Periodontol (1991); 62: 745-749.
- Hart TC. "Genetic risk factors for early-onset periodontitis." J Periodontol (1996); 67: 355-366.
- Heissig B, Hattori K, Dias S, Friedrich M, Ferris B, Hackett NR, Crystal RG, Besmer P, Lyden D, Moore MA, Werb Z, Rafii S. "Recruitment of Stem and Progenitor Cells from the Bone Marrow Niche Requires MMP-9 Mediated Release of Kit-Ligand". Cell 109 (2002); (5): 625–37.
- Ho Y-P, Lin Y-C, Yang Y-H, Ho K-Y, Wu Y-M, Tsai C-C. "Cyclooxygenase-2 Gene <sup>□ 765</sup> single nucleotide polymorphism as a protective factor against periodontitis in Taiwanese." Journal of Clinical Periodontology (2008) 35: 1–8.
- Holla LI, Fassmann A, Muzik J, Vanek J, Vasku A. "Functional polymorphisms in the matrix metalloproteinase-9 gene in relation to severity of chronic periodontitis." J Periodontol. (2006);77(1):1850-1855.
- Holla LI, Fassmann A, Vasku A, Goldbergova M, Beranek M, Znojil V, Vanek J, Vacha J. "Genetic variations in the human gelatinase A (matrix

metalloproteinase-2) promoter are not associated with susceptibility to, and severity of, chronic periodontitis.” J Periodontol. (2005);76(7):1056-1060.

- Holla LI, Jurajda M, Fassman A, Dvorakova N, Znojil V, Vacha J. “Genetic variations in the matrix metalloproteinase-1 promoter risk of susceptibility and/or severity of chronic periodontitis in the Czech population.” J Clin Periodontol. (2004); 31:658-690.
- Holt SC, Bramanti TE. “Factors in virulence expression and their role in periodontal disease pathogenesis.” Critical Reviews in Oral Biology and Medicine (1991); 2: 177-281.
- Ingman T, Sorsa T, Michaeli J, Pkonttinen YT. “ Immunohistochemical study of neutrophil and fibroblast-type collagenases and stromelysin-1 in adult periodontitis.” Scandinavian Journal of Dental Research (1994); 102: 342-349.
- Itagaki M, Kubota T, Tai H, Shimanda Y, Morozumi T, Yamazaki K. “Matrix metalloproteinase-1 and -3 gene promoter polymorphisms in Japanese patients with periodontitis.” J Periodontol. (2004); 31:764-769.
- Keles GC, Gunes S, Sumer AP, Sumer M, Kara N, Bagci H. “Association of matrix metalloproteinase-9 promoter gene polymorphism with chronic periodontitis.” J Periodontol (2006);77:1510–4.

- Kornman KS, Crane A, Wang HY, di Giovine FS, Newman MG, Pirk FW, et al. "The interleukin-1 genotype as a severity factor in adult periodontal disease." *J Clin Periodontol* (1997);24:72-7.
- Laxman VK, Annaji S. "Tobacco use and its effects on the periodontium and periodontal therapy" *J Contemp Dent Pract* (2008); 9(7):97-107
- Leite MF, Santos MC, de Souza AP, Line SR. "Osseointegrated implant failure associated with MMP-1 promoter polymorphisms (-1607 and -519)." *Int J Oral Maxillofac Implants.* (2008); 23(4): 653-658.
- Li Guangyue , Yuan Yue , Ye Tian , Jin-le Li , Min Wang , Hao Liang , Peixi Liao , Loo Wings T.Y. , Mary N.B. Cheung , Louis W.C. Chow "Association of matrix metalloproteinase (MMP)-1, 3, 9, interleukin (IL)-2, 8 and cyclooxygenase (COX)-2 gene polymorphisms with chronic periodontitis in a Chinese population" *Cytokine* (2012); 60:552–560.
- Li Z, Zhang Z, He Z, Tang W, Li T, Zeng Z, He L, Shi Y. "A partition-ligation-combination-subdivision EM algorithm for haplotype inference with multiallelic markers: update of the SHEsis (<http://analysis.bio-x.cn>)." *Cell Res.* (2009);19(4):519-23.
- Loesche WJ. "Bacterial mediators in periodontal disease." *Clinical Infectious diseases* (1993); 16 (supl 4): 203-210.
- Loo Wings T.Y., Min Wang, L.J. Jin , Mary N.B. Cheung , G.R. Li "Association of matrix metalloproteinase (MMP-1, MMP-3 and MMP-9)

and cyclooxygenase-2 gene polymorphisms and their proteins with chronic periodontitis” Archives of oral biology (2011); 56:1081–1090.

- Lopez NJ. “Clinical laboratory and immunological studies of a family with a high prevalence of generalized prepubertal and juvenile periodontitis.” J Periodontal (1992); 63: 457-468.
- Marazita ML, Burmeister JA, Gunsolley JC, Koertge TE, Lake K, Schenkein HA. “Evidence for autosomal dominant inheritance and race-specific heterogeneity in early-onset periodontitis.” J Periodontal (1994); 65: 623-630.
- Marnett, L. J., Rowlinson, S. W., Goodwin, D. C., Kalgutkar, A. S. & Lanzo, C. “Arachidonic acid oxygenation by COX-1 and COX-2.” Journal of Biological Chemistry (1999) 274, 22903–22906.
- Meikle MC, Hembry RM, Holley J, Horton C, Mc Farlane GD, Reynolds JJ. “Immunolocalization of matrix metalloproteinases and TIMP-1 (tissue inhibitor metalloproteinases) in human gingival tissues from periodontal patients. J Periodont Research (1994); 29: 118-126.
- Melnick M, Shields ED, Bixler E. “Periodontitis: A phenotypic and genetic analysis.” Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology (1976); 42: 32-41.
- Michalowicz BS, Aeppli D, Kuba RK, Bereuter JE, Conry JP, Segal NL, Bouchard TJ, Pihlstrom BL. “A twin study of genetic variation in

proportional radiographic alveolar bone height." J Dent Research (1991 $\beta$ ); 70:1431-1435.

- Michalowicz BS, Aeppli D, Virag Jg, Klump DG, Hinrichs JE, Segal NL, Bouchard TJ, Pihlstrom BL. "Periodontal findings in adult twins." J Periodontol (1991a); 62: 293-299.
- Miyasaki KT. "The neutrophil: Mechanisms of controlling periodontal bacteria." J Periodontol (1991); 28: 440-450.
- Mohan R, Chintala SK, Jung JC, Villar WV, McCabe F, Russo LA, Lee Y, McCarthy BE, Wollenberg KR, Jester JV, Wang M, Welgus HG, Shipley JM, Senior RM, Fini ME. "Matrix metalloproteinase gelatinase B (MMP-9) coordinates and effects epithelial regeneration". The Journal of Biological Chemistry (2001); 277 (3): 2065–72.
- Morton, R. S. & Dongari-Bagtzoglou, A. I. "Cyclooxygenase-2 is upregulated in inflamed gingival tissues." Journal of Periodontology(2001); 72: 461–469.
- Nagase H, Woessner JF. "Matrix metalloproteinases". The Journal of Biological Chemistry (1999); 274 (31): 21491–4. doi:10.1074/jbc.274.31.21491. PMID 10419448.
- Nares, S. "The genetic relationship to periodontal disease." Periodontology 2000 (2003); 32, 36–49.

- Offenbacher S, Heasman PA, Collins JG. "Modulation of host PGE2 secretion as a determinant of periodontal disease expression." *Journal of Periodontology* (1993); 64: 432-44.
- Offenbacher S, Odle BM, Braswell LD, Johnson HG, Hall CM, McClure H, Orkin JL, Strobert EA, Green MD.(1989) "Changes in cyclooxygenase metabolites in experimental periodontitis in *Macaca mulatta*." *Journal of Periodontal Research* (1989); 24 (1): 63-74.
- Offenbacher S, Odle BM, Van Dyke TE "The use of crevicular fluid prostaglandin E2 levels as a predictor of periodontal attachment loss." *Journal of Periodontal Research* (1986); 21, 101-112.
- Offenbacher S, Williams RC, Jeffcoat MK, Howell TH, Odle BM, Smith MA, Hall CM, Johnson HG, Goldhaber P. "Effects of NSAIDs on beagle crevicular cyclooxygenase metabolites and periodontal bone loss." *Journal of Periodontal Research* 27 (1992); (3) :207-213.
- Offenbacher S. "Periodontal diseases: Pathogenesis." *Annals of Periodontology* (1996); 1:879-925.
- Offenbacher, S. & Salvi, G. E. "Induction of prostaglandin release from macrophages by bacterial endotoxin." *Clinical Infectious Diseases* (1999); 28, 505–513.
- Opdenakker G, Van den Steen PE, Dubois B, Nelissen I, Van Coillie E, Masure S, Proost P, Van Damme J. "MMP9 functions as regulator and effector in leukocyte biology". *Journal of Leukocyte Biology* (2001); 69 (6): 851–9.

- Page RC & Offenbacher S. "Advances in the pathogenesis of periodontitis: summary of developments, clinical implications and future directions." *Periodontology 2000* (1997); 14: 216-248.
- Papafili A, Hill MR, Brull DJ, McAnulty RJ, Marshall RP, Humphries SE, et al. "Common promoter variant in cyclo-oxygenase-2 represses gene expression: evidence of role in acute-phase inflammatory response." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* (2002);22:1631-6.
- Pihlstrom BL, Michalowicz BS, Johnson NW. "Periodontal diseases." *Lancet* (2005); 366: 1809–20.
- Reynolds JJ & Meikle MC. "Mechanisms of connective tissue matrix destruction in periodontitis." *Periodontology 2000* (1997);14: 144-157.
- Sanak M, Szczeklik W, Szczeklik A. "Association of COX-2 gene haplotypes with prostaglandins production in bronchial asthma." *J Allergy Clin Immunol* (2005); 116 :221-3.
- Sanak M, Szczeklik W, Szczeklik A. Association of COX-2 gene haplotypes with prostaglandins production in bronchial asthma. *J Allergy Clin Immunol* (2005);116:221-3.



- Santos MCL, Campos MIG, de Souza AP, Trevilatto PC, Line SR. “Analysis of MMP-1 and MMP-9 promoter polymorphism in early osseointegrated implant failure.” *Int J Maxillofac Implants.* (2004); 19: 38-43.
- Saxen L & Nevalinna HR. “Autosomal recessive inheritance of juvenile periodontitis : Test of a hypothesis” *Clinical Genetics* (1984); 25: 332-335.
- Schaefer et al., “COX-2 Is Associated with Periodontitis in Europeans”, *J. Dental Research*, (2010);89(4):384-8.
- Seymour GJ. “Importance of the host response in the periodontium.” *J Clin Periodontol* (1991); 18: 421-426.
- Shete AR, Joseph R, Vijayan NN, Srinivas L, Banerjee M. “Association of single nucleotide gene polymorphism at interleukin-1beta +3954, -511, and -31 in chronic periodontitis and aggressive periodontitis in Dravidian ethnicity. “*J Periodontol* (2010);81:62-9.
- Shi YY, He L. “SHEsis, a powerful software platform for analyses of linkage disequilibrium, haplotype construction, and genetic association at polymorphism loci.” *Cell Res.* (2005);15(2):97-8.
- Smith, W. L., Garavito, R. M. & DeWitt, D. L. (1996) “Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenase)-1 and -2.” *Journal of Biological Chemistry* 271, 33157–33160.

- Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL. "Microbial complexes in subgingival plaque." *J Periodontol* (1998); 25: 346-353.
- Sorsa T, Ingman T, Suomalainen K, Haapasalo M, Konttinen YT, Lindy O, Saari O, Uitto VJ. "Identification of proteases from periodontopathogenic bacteria as activators of latent human neutrophil and fibroblast-type interstitial collagenases." *Infection and Immunity* (1992); 60: 4491-4495.
- Tai, H., Miyaura, C., Pilbeam, C. C., Tamura, T., Ohsugi, Y., Koishihara, Y., Kubodera, N., Kawaguchi, H., Raisz, L. G. & Suda, T. "Transcriptional induction of cyclooxygenase-2 in osteoblasts is involved in interleukin-6-induced osteoclast formation." *Endocrinology* (1997) 138, 2372–2379.
- Thiry-Blaise LM, Taquet AN, Reginster JY, Nusgens B, Franchimont P, Lapiere CM. "Investigation of the relationship between osteoporosis and the collagenase gene by means of polymorphism of the 5' upstream region of this gene." *Calcif Tissue Int.* (1995);56: 88-91.
- Tonetti MS, Freiburghaus K, Lang NP, Bickel M. "Detection of interleukin-8 and matrix metalloproteinases transcripts in healthy and diseased gingival biopsies by RNA/PCR." *J Periodontal Res.* (1993); 28(6 Pt 2):511-513.
- Vairaktaris et al, "A metalloproteinase-9 polymorphism which affects its expression is associated with increased risk for oral squamous cell carcinoma." *Eur J Surg Oncol.* (2008); 34(4):450-5

- Vu TH, Shipley JM, Bergers G, Berger JE, Helms JA, Hanahan D, Shapiro SD, Senior RM, Werb Z. "MMP-9/Gelatinase B Is a Key Regulator of Growth Plate Angiogenesis and Apoptosis of Hypertrophic Chondrocytes". *Cell* 93 (1998); (3): 411–22.
- Wang J, Tsirka SE. "Neuroprotection by inhibition of matrix metalloproteinases in a mouse model of intracerebral haemorrhage.". *Brain* (2005); 128(7): 1622–33.
- Xie CJ, Xiao LM, Fan WH, Xuan DY, Zhang JC. "Common single nucleotide polymorphisms in cyclooxygenase-2 and risk of severe chronic periodontitis in a Chinese population." *J Clin Periodontol* (2009); 36: 198–203.
- Yan C, Boyd DD. "Regulation of matrix metalloproteinase gene expression." *J Cell Physiol.* (2007); 211(1): 19-26.
- Yu Q, Stamenkovic I. "Cell surfacelocalized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis." *Genes Dev* (2000); 14:163-176.
- Zhang, F., Engebretson, S. P., Morton, R. S., Cavanaugh, P. F. Jr., Subbaramaiah, K. & Dannenberg, A. J. "The overexpression of cyclooxygenase-2 in chronic periodontitis." *Journal of American Dental Association* (2003); 134: 861–867.
- Κωνσταντινίδης Α. (2003) "Περιοδοντολογία", Πρώτος Τόμος.