



# ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

---

*ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ  
«ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ»*

---

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΕΡΕΥΝΑΣ ΠΑΘΗΣΕΩΝ ΜΥΟΣΚΕΛΕΤΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ  
«Θ.ΓΑΡΟΦΑΛΙΔΗΣ»  
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΕΥΣΤΑΘΙΟΣ ΧΡΟΝΟΠΟΥΛΟΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ  
ΑΝΔΡΙΑΝΝΕΤΑ Ι. ΑΒΡΑΜΙΔΟΥ  
ΟΔΟΝΤΙΑΤΡΟΣ

*ΠΕΡΙΟΔΟΝΤΙΚΗ ΝΟΣΟΣ ΚΑΙ miRNAs-ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΙ  
ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΚΑΙ ΚΛΙΝΙΚΗ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ*

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ

ΓΕΩΡΓΙΟΣ Ι. ΛΑΜΠΡΟΥ

Μέλος ΕΔΙΠ, Εθνικόν και Καποδιστριακόν Πανεπιστήμιον Αθηνών, Ιατρική Σχολή

ΑΘΗΝΑ 2024



NATIONAL AND  
KAPODISTRIAN UNIVERSITY OF  
ATHENS  
MEDICAL SCHOOL

---

*POST-GRADUATE PROGRAM*  
*METABOLIC BONE DISEASES*

---

LABORATORY FOR THE RESEARCH OF MUSCULOSKELETAL DISEASES «TH.  
GAROFALIDES»  
DIRECTOR: PROFESSOR EFSTATHIOS CHRONOPOULOS

MASTER THESIS  
ANDRIANNETA I. AVRAMIDOU  
DENTIST

PERIODONTAL DISEASE AND miRNAs-BIOLOGY AND  
CLINICAL CHARACTERISTICS

SUPERVISOR

George I. Lambrou, Laboratory Teaching Faculty, National and Kapodistrian  
University of Athens, Medical School

ATHENS 2024

## **I. ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την τριμελή επιτροπή, για την πολύτιμη συμβολή και βοήθειά τους στη διεκπεραίωση του μεταπτυχιακού αυτού διπλώματος, καθώς και την οικογένειά μου, για τη συνεχή στήριξη στη μακρά ακαδημαϊκή μου πορεία.

## II. ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

Η Ανδριαννέτα Ι. Αβραμίδου γεννήθηκε στη Αθήνα το 1988. Το 2008 εισήχθη στο τμήμα Χημείας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, απ' όπου και αποφοίτησε το 2013 με βαθμό «Λίαν Καλώς». Στη συνέχεια, εισήχθη κατόπιν κατατακτηρίων εξετάσεων, στην Οδοντιατρική Σχολή του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, απ' όπου αποφοίτησε το 2019, με βαθμό πτυχίου «Λίαν Καλώς». Μετά το τέλος των σπουδών εργάστηκε για δύο χρόνια σε οδοντιατρεία της Αθήνας. Τον Μάρτιο του 2021 έλαβε πιστοποιητικό επιμόρφωσης στο εκπαιδευτικό αντικείμενο «Βασικές Αρχές του Καρκίνου – Παθογενετικοί Μηχανισμοί και Νεότερες Θεραπευτικές Προσεγγίσεις» από το Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, ενώ τον Οκτώβριο του ίδιου έτους, εισήχθη στο Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα «Μεταβολικά Νοσήματα των Οστών», της Ιατρικής Σχολής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών. Το χρονικό διάστημα Μαρτίου - Αυγούστου του 2023, ολοκλήρωσε το εξ' αποστάσεως πρόγραμμα επιμόρφωσης «Molecular Foundations of Medicine» του Πανεπιστημίου του Stanford, ενώ από τον Σεπτέμβριο του ίδιου έτους, ξεκίνησε νέο κύκλο σπουδών στο αντικείμενο «Σακχαρώδης Διαβήτης – Από τη Θεωρία στην Πράξη», του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών. Από τον Νοέμβριο του 2022 διατηρεί ιδιωτικό οδοντιατρείο στην περιοχή του Αμαρουσίου Αττικής και από τον Μάιο του 2023 εργάζεται ως εδελόντρια στο Οδοντιατρείο Φρουράς Αθηνών, του 401 Γενικού Στρατιωτικού Νοσοκομείου Αθηνών.

### III. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα miRNAs έχουν αναδειχθεί τα τελευταία χρόνια, ως νέοι, πολύ σημαντικοί βιοχημικοί δείκτες, ανοίγοντας με αυτόν τον τρόπο, νέα πεδία στον τομέα της έρευνας. Τα μόρια αυτά είναι μικρά, μονόκλιωνα τμήματα RNA, 18–25 νουκλεοτιδίων περίπου και έχουν την ικανότητα να προσδένονται στην 3' αμετάφραστη περιοχή των mRNAs. Με αυτόν τον τρόπο, παρεμποδίζουν τη μετάφραση του mRNA στο οποίο προσδένονται, είτε το οδηγούν σε αποικοδόμησή του. Σε αυτή την ανασκόπηση θα αναλυθεί η σχέση των miRNAs με την περιοδοντίτιδα. Η νόσος αυτή είναι μια χρόνια φλεγμονώδης νόσος των περιοδοντικών ιστών, των στηρικτικών δηλαδή ιστών των δοντιών. Η βλάβη των περιοδοντικών ιστών είναι αποτέλεσμα του μεταβολισμού του βιοϋμενίου. Παράλληλα, ενεργοποιείται και το ανοσοποιητικό σύστημα του οργανισμού ξενιστή, αρχικά με τη φλεγμονώδη (μη ειδική) και μετέπειτα με την ανοσιακή (ειδική) απάντηση. Αυτός ο συνδυασμός, των προϊόντων του μεταβολισμού των μικροβίων και της ανοσιακής απόκρισης του ξενιστή, είναι που προκαλεί τις βλάβες στους περιοδοντικούς ιστούς και την απορρόφηση του οστού. Τα miRNAs είναι υπερεκφρασμένα ή υποεκφρασμένα, ανάλογα με τις συνθήκες και αυτές οι λεπτές διαφορές στην έκφραση, στους περιοδοντικούς ιστούς σε σχέση με τους υγιείς, είναι που επηρεάζουν την εξέλιξη της νόσου. Επιδρούν στις διεργασίες της οστεογένεσης και της οστεοκλαστογένεσης, δρώντας τόσο ανασταλτικά, όσο και ενεργοποιητικά. Συνεπώς, το τελικό αποτέλεσμα, που είναι η περιοδοντική νόσος και κατ' επέκταση η ενεργοποίηση και η ενίσχυση του καταβολισμού του οστίτη ιστού, προκύπτει ως η συνισταμένη των επιμέρους δράσεων των miRNAs, σε γονίδια-στόχους, στις δυο αυτές αντίθετες διεργασίες του αναβολισμού και του καταβολισμού του οστού. Επίσης, τα miRNAs μέσω της ικανότητας της γονιδιακής ρύθμισης που διαθέτουν, μπορούν να χρησιμοποιούνται ως θεραπευτικά μόρια στη αναγέννηση των κατεστραμμένων ιστών, στο νέο πεδίο της μηχανικής των ιστών.

**Λέξεις Κλειδιά:** Περιοδοντική νόσος, miRNAs, κλινικά χαρακτηριστικά, βιολογία

#### **IV. ABSTRACT**

MiRNAs have recently emerged as new biomarkers, of high significance and importance, unfolding a new potential in research. These RNAs are small, single stranded RNAs of 18–25 nucleotides and they have the ability to bind at the 3' untranslated region (UTR) of mRNAs. In this way, they inhibit mRNA translation or they result in its degradation. In the present review, it will be discussed the correlation between miRNAs and periodontal disease. Periodontitis is a chronic, inflammatory disease of the supportive tissues of the teeth. The damage of the periodontal tissues that is caused, is a result of the metabolism of the biofilm. Also, at the same time, there is an activation of the host's immune system, at first with inflammatory (non-specific) response and afterwards with immune (specific) response. This combination, of the products of the biofilm's metabolism, as well as those of the host's immune response, is the one that causes periodontal tissue damage and alveolar bone loss. MiRNAs are upregulated or downregulated, depending on the local tissue conditions and those fine differences in expression profiles, at periodontal tissues compared with healthy tissues, are responsible for the progress of the disease. MiRNAs affect osteoblast differentiation, as well as osteoclast activity, either by inhibiting or by activating them. In conclusion, the final result, which is periodontal disease and the activation and the enhancement of the catabolic pattern of the bone tissue, is caused by the overall actions of each individual miRNA, at target-genes, affecting these two opposite processes of the bone metabolism. Furthermore, due to the miRNA ability of gene regulation, they can possibly be used as therapeutic molecules in tissue regeneration, in the new research field of tissue engineering.

**Key words:** Periodontal disease, miRNAs, clinical characteristics, biology

## V. ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΟΧΟΜΕΝΩΝ

I. ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	3
II. ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ.....	4
III. ΠΕΡΙΛΗΨΗ .....	5
IV. ABSTRACT .....	6
V. ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΟΧΟΜΕΝΩΝ .....	7
VI. ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ .....	10
ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....	1
1. ΠΕΡΙΟΔΟΝΤΙΚΗ ΝΟΣΟΣ ΚΑΙ miRNAs - ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ. 2	
1.1. miRNAs.....	2
1.2. ΠΕΡΙΟΔΟΝΤΙΚΗ ΝΟΣΟΣ ΚΑΙ miRNAs .....	3
2. ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΗΣ ΠΕΡΙΟΔΟΝΤΙΚΗΣ ΝΟΣΟΥ ΚΑΙ ΤΩΝ miRNAs ΜΕ ΤΟΝ ΟΣΤΙΚΟ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟ .....	6
2.1. Η ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΟΜΟΙΟΣΤΑΣΗΣ ΤΟΥ ΕΠΙΜΕΤΑΛΛΩΜΕΝΟΥ ΟΣΤΙΤΗ ΙΣΤΟΥ ΚΑΙ ΤΩΝ miRNAs: ΤΟ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΟ ΜΟΝΟΠΑΤΙ BMP/WNT/NOTCH .....	6
2.2. ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΑ ΜΟΝΟΠΑΤΙΑ ΣΥΜΜΕΤΟΧΗΣ ΤΩΝ miRNAs, ΣΧΕΤΙΖΟΜΕΝΑ ΜΕ ΤΗΝ ΑΝΑΓΕΝΝΗΣΗ ΤΩΝ ΠΕΡΙΟΔΟΝΤΙΚΩΝ ΙΣΤΩΝ. 7	
2.3. ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΤΟΥ miR-30a-5p ΕΛΑΤΤΩΝΟΥΝ ΤΗΝ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ ΦΛΕΓΜΟΝΩΔΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΚΑΙ ΕΝΙΣΧΥΟΥΝ ΤΗΝ ΕΚΦΡΑΣΗ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΠΟΥ ΣΧΕΤΙΖΟΝΤΑΙ ΜΕ ΤΗΝ ΟΣΤΕΟΓΕΝΗ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ.....	8
2.4. RUNX2: ΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ-ΣΤΟΧΟΣ ΤΟΥ miR-30a-5p.....	9
2.5. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ OSTERIX ΤΩΝ miRNAs ΣΤΟΝ ΟΣΤΙΚΟ ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟ ΚΑΙ ΤΗΝ ΟΔΟΝΤΙΚΗ ΑΝΑΠΤΥΞΗ .....	10
2.5.1. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ OSX ΚΑΙ ΤΩΝ miRNAs ΣΤΟΝ ΟΣΤΙΚΟ ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟ .....	10
2.5.2. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ OSX ΚΑΙ ΤΩΝ miRNAs ΣΤΗΝ ΟΔΟΝΤΙΚΗ ΑΝΑΠΤΥΞΗ.....	11
2.5.3. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ OSTERIX ΚΑΙ ΤΩΝ miRNAs ΣΤΑ ΧΟΝΔΡΟΚΥΤΤΑΡΑ.....	12
2.5.4. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ OSTERIX ΚΑΙ ΤΩΝ miRNAs ΣΤΟΥΣ ΟΣΤΕΟΚΛΑΣΤΕΣ.....	12
2.6. ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΟΥ OSX ΚΑΙ ΤΩΝ miRNAs.....	13
2.7. ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΑ ΜΟΝΟΠΑΤΙΑ ΣΥΜΜΕΤΟΧΗΣ ΤΩΝ miRNAs, ΣΧΕΤΙΖΟΜΕΝΑ ΜΕ ΤΗΝ ΚΑΤΑΣΤΡΟΦΗ ΤΩΝ ΠΕΡΙΟΔΟΝΤΙΚΩΝ ΙΣΤΩΝ 15	
2.7.1. ΚΑΤΑΣΤΟΛΗ ΤΗΣ ΛΙΠΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΚΑΙ ΟΣΤΕΟΓΕΝΟΥΣ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΤΟΥ ΠΕΡΙΟΔΟΝΤΙΚΟΥ ΣΥΝΔΕΣΜΟΥ, ΑΠΟ ΤΟΝ TNFA, ΜΕΣΩ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ ΤΟΥ ΜΟΝΟΠΑΤΙΟΥ miR-21/Spryl.....	16
2.7.2. ΑΝΑΣΤΟΛΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ miR-21 ΚΑΙ ΤΗΣ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΩΝ PDLSCs ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΑΠΟ ΤΟΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ TNFA.....	18
2.7.3. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ miR-21 ΣΤΗ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ PDLSCs	18

2.7.4.	<b>ΓΟΝΙΔΙΟ-ΣΤΟΧΟΣ ΤΟΥ <i>miR-21</i></b> .....	19
2.7.5.	<b>ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ <i>SPRY1</i> ΑΠΟ ΤΟΝ <i>TNFA</i>, ΜΕΣΩ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ ΤΟΥ <i>miR-21</i></b> .....	19
2.7.6.	<b>ΑΝΑΣΤΟΛΗ ΤΗΣ ΟΣΤΕΟΓΕΝΕΣΗΣ ΚΑΙ ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΤΗΣ ΠΕΡΙΟΔΟΝΤΙΚΗΣ ΚΑΤΑΣΤΡΟΦΗΣ ΑΠΟ ΤΟ <i>miR-30a-5p</i> ΜΕ ΔΡΑΣΗ ΣΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ-ΣΤΟΧΟ ΤΟΥ <i>RUNX2</i></b> .....	21
2.7.7.	<b><i>microRNAs</i> ΚΑΙ ΟΣΤΕΟΚΛΑΣΤΟΓΕΝΕΣΗ</b> .....	21
3.	<b>ΝΟΣΗΜΑΤΑ ΠΟΥ ΣΧΕΤΙΖΟΝΤΑΙ ΜΕ ΤΗΝ ΠΕΡΙΟΔΟΝΤΙΚΗ ΝΟΣΟ ΚΑΙ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ <i>miRNAs</i></b> .....	27
3.1.	ΠΕΡΙΟΔΟΝΤΙΚΗ ΚΑΙ ΚΑΡΔΙΑΓΓΕΙΑΚΗ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ: ΤΟ <i>MIR-146</i> ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΧΡΟΝΙΑ ΠΕΡΙΟΔΟΝΤΙΤΙΔΑ ΜΕ ΚΑΙ ΧΩΡΙΣ ΣΤΕΦΑΝΙΑΙΑ ΝΟΣΟ.....	27
3.2.	ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΗΣ ΠΕΡΙΟΔΟΝΤΙΤΙΔΑΣ ΜΕ ΟΞΥ ΣΤΕΦΑΝΙΑΙΟ ΣΥΝΔΡΟΜΟ: ΑΠΟΡΡΥΘΜΙΣΗ ΤΟΥ <i>miR-146a</i> ΑΠΟ ΤΑ ΠΕΡΙΟΔΟΝΤΙΚΑ ΠΑΘΟΓΟΝΑ.....	29
3.3.	ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΗΣ ΠΕΡΙΟΔΟΝΤΙΚΗΣ ΝΟΣΟΥ ΚΑΙ ΤΟΥ ΣΑΚΧΑΡΩΔΟΥΣ ΔΙΑΒΗΤΗ: ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ <i>miR-223</i> , <i>miR-203</i> ΚΑΙ <i>miR-200b</i> ΣΕ ΠΕΡΙΟΔΟΝΤΙΚΟΥΣ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΚΑΙ ΧΩΡΙΣ ΣΑΚΧΑΡΩΔΗ ΔΙΑΒΗΤΗ.....	31
3.4.	ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΗΣ ΠΕΡΙΟΔΟΝΤΙΚΗΣ ΝΟΣΟΥ ΚΑΙ ΤΟΥ ΛΙΠΩΔΟΥΣ ΙΣΤΟΥ: ΑΝΤΙΦΛΕΓΜΟΝΩΔΗΣ ΕΠΙΠΤΩΣΗ ΤΟΥ <i>miR-146a</i> ΕΠΑΓΟΜΕΝΗ ΣΕ ΛΙΠΩΔΗ ΙΣΤΟ ΚΑΙ ΣΤΟΥΣ ΠΕΡΙΟΔΟΝΤΙΚΟΥΣ ΙΣΤΟΥΣ.....	34
4.	<b>Η ΜΗΧΑΝΙΚΗ ΤΩΝ ΙΣΤΩΝ ΚΑΙ ΤΑ <i>miRNAs</i></b> .....	36
4.1.	Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΕΞΟΚΥΤΤΑΡΙΩΝ <i>miRNAs</i> ΚΑΙ ΤΑ ΕΞΩΣΩΜΑΤΑ.....	36
4.2.	ΕΞΩΣΩΜΙΚΑ <i>miRNAs</i> ΚΑΙ ΟΣΤΕΟΚΛΑΣΤΟΓΕΝΕΣΗ: ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΗΣ ΠΕΡΙΟΔΟΝΤΙΚΗΣ ΝΟΣΟΥ.....	37
4.3.	ΕΞΩΣΩΜΙΚΑ <i>miRNAs</i> ΚΑΙ ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗ: ΑΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΤΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΤΟΥ ΠΟΛΦΟΥ ΕΚΚΡΙΝΟΥΝ ΕΞΩΣΩΜΙΚΑ <i>miRNAs</i> ΚΑΙ ΕΝΙΣΧΥΟΥΝ ΤΗΝ ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗ ΤΟΠΙΚΑ.....	38
4.3.1.	<b>ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ <i>miR-378a</i> ΣΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ <i>SUFU</i>: ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΤΗΣ ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗΣ</b> .....	39
4.3.2.	<b>ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ <i>miR-378a</i> ΣΤΟ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΟ ΜΟΝΟΠΑΤΙ <i>SUFU/GLII/HEDGEHOG</i></b> .....	40
4.4.	ΕΚΚΡΙΣΗ <i>miRNAs</i> ΚΑΙ ΑΥΣΗΤΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΑΠΟ ΝΑΝΟΣΠΟΓΓΩΔΗ ΜΙΚΡΟΣΦΑΙΡΙΔΙΑ, ΜΕ ΣΤΟΧΟ ΤΗΝ ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΤΩΝ ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΩΝ Τ-ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΩΝ ΚΑΙ ΤΗΝ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΤΗΣ ΠΕΡΙΟΔΟΝΤΙΚΗΣ ΟΣΤΙΚΗΣ ΑΠΩΛΕΙΑΣ.....	41
4.4.1.	<b>ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ <i>miR-10a/IL-2/TGF-β</i> ΣΤΗ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ Τ-ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΩΝ ΤΟΥ ΘΥΜΟΥ ΑΔΕΝΑ ΣΕ ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΑ Τ-ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΑ <i>T<sub>REGS</sub></i></b> .....	42
4.4.2.	<b>ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΒΙΟΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΣΦΑΙΡΙΔΙΩΝ (<i>NF-SMS</i>) ΣΤΗΝ ΠΕΡΙΟΔΟΝΤΙΚΗ ΝΟΣΟ</b> .....	43
5.	<b>ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΩΝ ΔΙΦΩΣΦΟΝΙΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ ΜΕ ΤΑ <i>miRNAs</i> ΣΤΟΥΣ ΠΕΡΙΟΔΟΝΤΙΚΟΥΣ ΙΣΤΟΥΣ</b> .....	46
5.1.	ΤΟ ΙΒΑΝΔΡΟΝΙΚΟ ΟΞΥ ΕΝΙΣΧΥΕΙ ΤΗΝ ΟΣΤΕΟΓΕΝΗ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΤΟΥ ΠΕΡΙΟΔΟΝΤΙΚΟΥ ΣΥΝΔΕΣΜΟΥ ΜΕΣΩ ΤΗΣ ΡΥΘΜΙΣΗΣ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ <i>miRNAs</i> .....	46
6.	<b>ΤΑ <i>miRNAs</i> ΩΣ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ</b> .....	49



6.1. ΤΑ miRNAs ΩΣ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΑ ΜΟΡΙΑ .....	49
6.2. ΤΑ miRNAs ΩΣ ΠΙΘΑΝΟΙ ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΙ ΚΑΙ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΟΙ ΣΤΟΧΟΙ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΤΗΣ ΑΠΩΛΕΙΑΣ ΤΟΥ ΦΑΤΝΙΑΚΟΥ ΟΣΤΟΥ ΣΤΗΝ ΠΕΡΙΟΔΟΝΤΙΚΗ ΝΟΣΟ.....	49
<b>7. ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ .....</b>	<b>50</b>
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....</b>	<b>51</b>

## VI. ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

**Πίνακας 1.** Αλλαγές στα προφίλ έκφρασης των miRNAs στον ουλικό ιστό, σε ζώα με περιοδοντίτιδα συγκρινόμενα με υγιή πρότυπα (9).....4

**Πίνακας 2.** Σύνοψη των σχετικών με την περιοδοντική νόσο miRNA (16)..... 5

**Πίνακας 3.** Μόρια miRNA σχετιζόμενα με την οστεοκλαστογένεση της περιοδοντικής νόσου (**Θ**: θετικός ρυθμιστής της οστεοκλαστογένεσης, **A**: αρνητικός ρυθμιστής της οστεοκλαστογένεσης)..... 22

**Πίνακας 4.** Συσχέτιση όλων των μεταβλητών της ομάδας ασθενών με χρόνια περιοδοντίτιδα και καρδιαγγειακή νόσο (CP+CHD) και της ομάδας ασθενών με χρόνια περιοδοντίτιδα (CP), με τα επίπεδα του miR-146a (**Συντιμήσεις**: BMI, body mass index= δείκτης μάζας σώματος, BOP, bleeding on probing=αιμορραγία κατά την ανίχνευση, CAL, clinical attachment level=επίπεδο κλινικής πρόσφυσης CHD, coronary heart disease=αρτηριακή καρδιακή νόσος, CP, chronic periodontitis=χρόνια περιοδοντίτιδα, DBP, diastolic blood pressure=διαστολική πίεση αίματος, HDL, high-density lipoprotein=λιποπρωτεΐνη υψηλής πυκνότητας, LDL, low-density lipoprotein=λιποπρωτεΐνη χαμηλής πυκνότητας, NS, not significant=όχι σημαντικό; PI, plaque index=δείκτης πλάκας, PPD, probing pocket depth=βάθος περιοδοντικού θυλάκου, SBP, systolic blood pressure=συστολική πίεση αίματος, TC, total cholesterol=ολική χοληστερόλη, TG, triglyceride=τριγλυκερίδια \*P < 0.05)..... 28

**Πίνακας 5.** Επίπεδα έκφρασης και αποτελέσματα των miRNAs που σχετίζονται με τη χρόνια περιοδοντίτιδα και τον σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2, στην ομάδα των ασθενών συγκρινόμενη με την ομάδα ελέγχου..... 34

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Στην παρούσα εργασία θα μελετηθεί η περιοδοντική νόσος και η σχέση της με τα μόρια miRNAs, ως βιοχημικοί δείκτες χρήσιμοι για τη διάγνωση της νόσου. Επίσης, θα αναφερθούν τα διάφορα σηματοδοτικά μονοπάτια στα οποία συμμετέχουν τα μόρια αυτά, κατά την περιοδοντική νόσο. Συγκεκριμένα, στόχος είναι να παρουσιαστούν τα βασικά μόρια που συμμετέχουν, η επίδραση της διακύμανσης της έκφρασής τους (υπερέκφραση, υποέκφραση) στην εξέλιξη της νόσου, οι μοριακοί μηχανισμοί δράσης τους, αλλά και ο τρόπος ανίχνευσης και απομόνωσής τους. Τέλος, θα γίνει λόγος για τον τρόπο με τον οποίο μπορούν να χρησιμεύσουν και ως θεραπευτικοί δείκτες για την περιοδοντική νόσο, αλλά και για την αναγέννηση των ιστών γενικότερα, με βάση ένα νέο επιστημονικό πεδίο έρευνας που έχει ανακύψει, αυτό της μηχανικής των ιστών.

# 1. ΠΕΡΙΟΔΟΝΤΙΚΗ ΝΟΣΟΣ ΚΑΙ miRNAs - ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ

Η περιοδοντική νόσος είναι χρόνια φλεγμονώδης νόσος των περιοδοντικών ιστών, δηλαδή των στηρικτικών ιστών των δοντιών και έχει σαν αποτέλεσμα, την απώλειά τους. Οι περιοδοντικοί ιστοί αποτελούνται από τα ούλα, το περιρρίζιο (περιοδοντικός σύνδεσμος, periodontal ligament (PDL)), το φατνιακό οστόν και την οστεΐνη της ρίζας. Ο βασικός παθογενετικός μηχανισμός της νόσου προϋποθέτει απαραίτητα την ύπαρξη παθολογικού βιοϋμενίου, το οποίο αποτελείται κυρίως από gram<sup>(+)</sup> αναερόβια βακτήρια, όπως τα *Agregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides forsythus* (*T. forsythia*) και *Eikenella corrodens*. Η δημιουργία αυτού του βιοϋμενίου είναι αποτέλεσμα της διαταραχής της ομοιόστασης μεταξύ των μικροβίων που φυσιολογικά βρίσκονται εντός της στοματικής κοιλότητας, πάνω στις επιφάνειες των δοντιών, αλλά και στους μαλακούς ιστούς των ούλων, εντός της ουλοδοντικής σχισμής. Ωστόσο, η ύπαρξη αυτού του βιοϋμενίου και μόνο, δεν επαρκεί για να ξεκινήσει η νόσος, καθώς αυτή είναι αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης του βιοϋμενίου με το αμυντικό σύστημα του οργανισμού – ξενιστή, το οποίο ενεργοποιείται ως απόκριση στον μικροβιακό παράγοντα. Η βλάβη των περιοδοντικών ιστών προκύπτει τόσο από τα τοξικά προϊόντα του μικροβιακού μεταβολισμού του βιοϋμενίου, όσο και από τα προϊόντα που παράγονται από τον αμυντικό μηχανισμό του ξενιστή, κατά τη φλεγμονώδη και την ανοσιακή απόκριση (1). Τέτοια προϊόντα είναι οι κυτοκίνες, οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου (οξειδωτικό stress), καθώς και άλλα ένζυμα όπως οι μεταλλοπρωτεϊνάσες της οργανικής μήτρας του οστού (Matrix metalloproteinases, MMPs), τα οποία προκαλούν την περιοδοντική καταστροφή (2). Ωστόσο και άλλοι παράγοντες, ενδογενείς και εξωγενείς, μπορεί να επηρεάσουν την εξέλιξη της νόσου. Τέτοιοι παράγοντες είναι συστηματικές νόσοι όπως ο σακχαρώδης διαβήτης, το AIDS, η καρδιαγγειακή νόσος, αλλά και το κάπνισμα (1), το χαμηλό βάρος των πρόωρων νεογνών και μη αλκοολική διήθηση του ήπατος (3, 4). Επίσης, τοπικοί παράγοντες (ανατομικοί) όπως ο έντονος συνωστισμός των δοντιών ή χαρακτηριστικά στη μορφολογία, μπορούν να ευνοούν την περιοδοντική νόσο (2).

## 1.1. miRNAs

Τα miRNAs είναι μικρά (18–25 νουκλεοτίδια) μονόκλωνα μόρια ριβονουκλεϊκού οξέος, τα οποία αποτελούν σημαντικούς ρυθμιστές της γονιδιακής έκφρασης (5). Συμμετέχουν επίσης σε διάφορες κυτταρικές διεργασίες και μεταβολικά μονοπάτια, όπως η διαφοροποίηση, ο πολλαπλασιασμός και η απόπτωση (6). Ένα μικρό ποσοστό των γονιδίων (3%) κωδικοποιεί τα miRNAs, αλλά αυτά ρυθμίζουν το 30%

των γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες (7). Η βιογένεση των miRs λαμβάνει χώρα μέσα στον πυρήνα του κυττάρου. Τα γονίδια που κωδικοποιούν miRs μεταγράφονται από την RNA πολυμεράση II. Τα miRs αποτελούν τμήματα εσωνίων, δηλαδή μη κωδικοποιών περιοχών του γονιδιώματος. Αρχικά, παράγεται ένα εσώνιο των 400 περίπου νουκλεοτιδίων, από το αρχικό mRNA προϊόν μεταγραφής, το πρόδρομο miRNA (pri-miRNA). Το pri-miRNA υφίσταται επεξεργασία μέσα στον πυρήνα, από την RNAάση Dorsha και με αυτόν τον τρόπο παίρνει τη μορφή φουρκέτας/βρόγχου, περίπου 70 νουκλεοτιδίων, σχηματίζοντας το pre-miRNA. Το μόριο σε αυτή τη μορφή, εξάγεται από τον πυρήνα μέσω μιας πρωτεΐνης που βρίσκεται στην πυρηνική μεμβράνη, της εξαπορτίνης-5 (exportin-5). Στο κυτταρόπλασμα, δρα μια 2<sup>η</sup> RNAάση, η Dicer, η οποία σχηματίζει ως τελικό προϊόν το ώριμο miRNA. Με τη δράση της πρωτεΐνης Dicer, απομακρύνεται ο βρόγχος από το pre-miRNA και παραμένει ένα δίκλωνο μόριο, των περίπου 22 νουκλεοτιδίων, στο οποίο ο ένας κλώνος είναι το ώριμο miRNA και είναι συνδεδεμένος με τον συμπληρωματικό του, miRNA\*, ή passenger strand. Τελικά, ειδικές πρωτεΐνες, οι «αργοναύτες» (Argonautes (AGO)), συνδέονται με τον έναν από τους δύο κλώνους (τον μετέπειτα ώριμο) και ο συμπληρωματικός απομακρύνεται. Το τελικό αυτό σύμπλοκο των AGO με τη μονή έλικα miRNA, αποτελεί το RISC-complex (RNA induced silencing complex), που είναι το ενεργό πλέον μόριο, το οποίο ρυθμίζει τη γονιδιακή έκφραση. Τα miRs, ρυθμίζουν τη γονιδιακή έκφραση με 3 τρόπους: α) Συνδέονται στην 3' αμετάφραστη περιοχή των mRNAs και εμποδίζουν τη μετάφρασή τους, β) συνδέονται στην 3' αμετάφραστη περιοχή των mRNAs και προωθούν την αποικοδόμησή τους και γ) προωθούν αλλαγές στη μεθυλίωση του DNA (8).

Διάφορες χρόνιες και οξείες παθήσεις σχετίζονται με μη φυσιολογικά επίπεδα miRNAs, τα οποία επηρεάζουν τη γονιδιακή έκφραση και τις διάφορες κυτταρικές λειτουργίες κατά την εξέλιξη της νόσου (9). Τα επίπεδα των miRs στους διάφορους ιστούς, ανιχνεύονται στα βιολογικά υγρά, όπως στο σίελο, το υγρό της ουλοδοντικής σχισμής και στον ορό (10, 11).

## 1.2. ΠΕΡΙΟΔΟΝΤΙΚΗ ΝΟΣΟΣ ΚΑΙ miRNAs

Όπως προαναφέρθηκε, τα miRs σχετίζονται με διάφορες παθήσεις, οξείες ή χρόνιες. Η περιοδοντική νόσος είναι μια από αυτές. Οι ερευνητικές μελέτες αρχικά επικεντρώθηκαν στη συλλογή δειγμάτων, για την απομόνωση των miRNAs, από τον ουλικό ιστό, αλλά τα τελευταία χρόνια, αρχίζει να κερδίζει έδαφος η απομόνωση από το σίελο των ασθενών, ως πηγή των miRNAs (12). Ο λόγος για τον οποίο

προτιμάται αυτό το βιολογικό υγρό ως πηγή των miRNAs, είναι: α) η μεγαλύτερη ευκολία συλλογής δείγματος (σιέλου, υγρού ουλοδοντικής σχισμής), χωρίς επεμβατικό τρόπο και χωρίς να υπάρχει κίνδυνος αιμορραγίας, καθιστώντας έτσι την όλη διαδικασία πιο ανεκτή και από τους ασθενείς, β) η υψηλή σταθερότητα των miRNAs στα διάφορα βιολογικά υγρά, τα οποία χρησιμοποιούνται στις αναλυτικές δοκιμασίες (13, 14) και γ) η ευκολία ταυτοποίησης των miRNAs από την qPCR.

Πολλές μελέτες έχουν διεξαχθεί, ώστε να αναδειχθούν ποιά από τα μόρια αυτά μπορούν, ως βιοχημικοί δείκτες, να χρησιμοποιηθούν για τη διάγνωση της νόσου (12). Επίσης, τα miRs μπορούν να χρησιμοποιηθούν και ως θεραπευτικοί δείκτες, δρώντας σε γονίδια-στόχους και επηρεάζοντας πολλά σηματοδοτικά μονοπάτια (12). Κάποια από τα μόρια αυτά, καθώς και οι αλλαγές στην έκφρασή τους σε υγιείς και σε περιοδοντικούς ιστούς, σε μελέτη ζώων, φαίνονται στους ακόλουθους πίνακες (Πίνακας 1, Πίνακας 2).

miRNAs	Αλλαγές στην έκφραση
miR-15a	Αύξηση
miR-21a	Αύξηση
miR-26a	Αύξηση
miR-29b	Αύξηση
miR-126a	Αύξηση
miR-125a	Αύξηση
miR-146a	Αύξηση
miR-146b	Αύξηση
miR-148a	Αύξηση
miR-181b	Αύξηση
miR-223	Αύξηση
let-7e	Αύξηση
let-7f	Αύξηση
let-7j	Αύξηση
let-7k	Αύξηση
miR-17	Μείωση
miR-24	Μείωση
miR-30	Μείωση
miR-92a	Μείωση
miR-451	Μείωση

**Πίνακας 1.** Αλλαγές στα προφίλ έκφρασης των miRNAs στον ουλικό ιστό, σε ζώα με περιοδοντίτιδα συγκρινόμενα με υγιή πρότυπα (9).

Σε μελέτες που έγιναν τόσο *in vivo*, όσο και *in vitro*, 5 miRNAs ταυτοποιήθηκαν σε πάνω από μια από αυτές. Αυτά είναι τα miRNA-142-3p, miRNA-146a, miRNA-155, miRNA-203 και miRNA-223 (15). Συνεπώς, οδηγούμαστε στο συμπέρασμα ότι τα μόρια αυτά διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην περιοδοντική νόσο, έχοντας το ρόλο του βιοχημικού δείκτη για τη νόσο (15). Άλλα είδη miRs που σχετίζονται τόσο

με την περιοδοντική νόσο, όσο και με άλλες συστηματικές νόσους, είναι τα miRNA-146, miRNA-let7, miRNA-200b-5p και miRNA-200b/c, όπως συνοψίζονται στον ακόλουθο πίνακα (Πίνακας 2).

<i>mRNAs</i>	<i>miRNAs in Diseased tissues</i>	<i>Functions</i>
<i>miRNA-548</i>	Αύξηση	Αυξημένη ρύθμιση της IL-8 μέσα στον περιοδοντικό θύλακο
<i>miRNA-31</i>	Αύξηση	Ρυθμίζει την έκφραση του ICAM-1, που ελέγχει τη μετανάστευση των λευκοκυττάρων από την αιματική κυκλοφορία, στους ιστούς
<i>miRNA-17</i>	Αύξηση	Ρυθμίζει την έκφραση της E-Σελεκτίνης, που ελέγχει τη μετανάστευση των λευκοκυττάρων από την αιματική κυκλοφορία, στους ιστούς
<i>miRNA-146</i>	Αύξηση	Ρυθμίζει αρνητικά το TLR4 σηματοδοτικό μονοπάτι
<i>miRNA-146a</i>	Αύξηση	Ρυθμίζει αρνητικά την TLR4 σηματοδότηση ; μειωμένη έκφραση των NF-kB, TNF-a, IL-1β, IL-6, που επάγει την οστεοκλαστογένεση
<i>miRNA-146b</i>	Αύξηση	Ρυθμίζει αρνητικά την TLR4 σηματοδότηση
<i>miRNA-155</i>	Μείωση	Ρυθμίζει την έκκριση του TLR υποδοχέα σε φλεγμονώδεις ιστούς
<i>miRNA-200</i>	Αύξηση	Μειώνει την έκκριση των IL-6, IL-8, IFRD1 και NF-kB παραγόντων
<i>miRNA-200c</i>	Αύξηση	Ρυθμιστική επίδραση στο μονοπάτι μεσολαβούμενο από τον TLR4 υποδοχέα, στα μακροφάγα
<i>miRNA-21</i>	Αύξηση	Μειώνει την ενεργοποίηση του NF-KB παράγοντα
<i>miRNA-let-7</i>	Αύξηση	Παρεμποδίζει τον υποδοχέα TLR4
<i>miRNA-203</i>	Μείωση	Προάγει τη νεοαγγειογένεση και ρυθμίζει την επίκτητη ανοσία
<i>miRNA-223</i>	Αύξηση	Παίζει ρόλο στην απώλεια του φατνιακού οστού

**Πίνακας 2.** Σύνοψη των σχετικών με την περιοδοντική νόσο miRNA (16).

Σε μελέτες που έχουν διεξαχθεί, ωστόσο, η πλειονότητα των μορίων miR που ανιχνεύθηκαν, διέφεραν σημαντικά από μελέτη σε μελέτη (15). Αυτό συμβαίνει γιατί έχουν αξιολογηθεί τα επίπεδα έκφρασης των miRNAs, τόσο σε υγιείς, όσο και σε περιοδοντικούς ιστούς, σε δείγματα από βιοψίες ουλικού ιστού, που περιέχουν και διάφορα άλλα κυτταρικά στοιχεία και μόρια, επομένως η αναλογία των μορίων miRNA μπορεί να διαφέρει (2). Επίσης, έχει βρεθεί ότι δεν υπάρχει σημαντική διαφορά στα είδη των miRs, μεταξύ χρόνιας και «επιθετικής» περιοδοντίτιδας (17). Όπως φαίνεται από τα δεδομένα αυτά, τα miRs δρουν μεταβάλλοντας τα επίπεδα, θετικά ή αρνητικά, διαφόρων κυτοκινών και μεσολαβητών της φλεγμονής, αλλά και διαφόρων άλλων μορίων, επηρεάζοντας τελικά την εξέλιξη της νόσου.

## 2. ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΗΣ ΠΕΡΙΟΔΟΝΤΙΚΗΣ ΝΟΣΟΥ ΚΑΙ ΤΩΝ miRNAs ΜΕ ΤΟΝ ΟΣΤΙΚΟ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟ

### 2.1. Η ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΟΜΟΙΟΣΤΑΣΗΣ ΤΟΥ ΕΠΙΜΕΤΑΛΛΩΜΕΝΟΥ ΟΣΤΙΤΗ ΙΣΤΟΥ ΚΑΙ ΤΩΝ miRNAs: ΤΟ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΟ ΜΟΝΟΠΑΤΙ BMP/WNT/NOTCH

Τα προγονικά κύτταρα του περιοδοντίου, για να διαφοροποιηθούν είτε σε κύτταρα φατνιακού οστού (οστεοβλάστες/οστεοκλάστες), είτε σε κύτταρα ινώδους συνδετικού ιστού του περιριζίου, είτε σε οστεϊνοβλάστες (18), ελέγχονται από διάφορα μόρια, όπως το RunX2, τις μορφογενετικές πρωτεΐνες του οστού (Bone Morphogenetic Proteins - BMPs), τη σηματοδότηση Notch και άλλα σηματοδοτικά μονοπάτια. Σε αυτά τα πολύπλοκα και αλληλοεπικαλυπτόμενα μονοπάτια, σημαντικό ρόλο παίζουν τα miRNAs, η έκφραση των οποίων άλλοτε αυξάνεται και άλλοτε μειώνεται.

Ερευνητική μελέτη που έγινε από τους Luan *et al.* (2018), έδειξε ότι η έκφραση των miRNA-31, miRNA-34a και miRNA-34c, μειώθηκε κατά τη διαφοροποίηση των προγονικών κυττάρων των περιοδοντικών ιστών, επαγόμενη από οστεογενετικές συνθήκες (9). Τα miRNAs αυτά, επηρεάζουν την οστεοβλαστογένεση μέσω του RunX2 μονοπατιού. Η οστεοβλαστική διαφοροποίηση προκύπτει μετά από συντονισμένη δράση πολλαπλών σηματοδοτικών μονοπατιών, συμπεριλαμβανομένων των BMPs, Wnt και Notch. Μεταξύ αυτών, το BMP μονοπάτι παίζει έναν ουσιώδους σημασίας ρόλο στην οστεοβλαστική διαφοροποίηση (9). Έχει δειχθεί από μελέτες ότι η υποέκφραση του miRNA-100 ενισχύει την οστεογένεση σε ανθρώπινα αρχέγονα μεσεγχυματικά κύτταρα. Στόχος του miRNA-100, είναι το BMPR2 (19). Αντίθετα, η υπερέκφρασή του, μειώνει την έκφραση του BMPR2 γονιδίου, οδηγώντας σε αναστολή του RunX2 και της οστεογενετικής διαφοροποίησης. Συνεπώς, η μειωμένη έκφραση του miRNA-100 στη μελέτη αυτή (9), ευνοεί την οστεογένεση, καθώς το μόριο δρα ως αρνητικός ρυθμιστής της επιμετάλλωσης. Άλλο miRNA που έχει ρυθμιστικό ρόλο στην επιμετάλλωση είναι το miRNA-195, του οποίου η έκφραση βρίσκεται σε χαμηλά επίπεδα, κατά την οστεογενετική επαγωγή των κυττάρων των περιοδοντικών ιστών (PDLs). Σε άλλες μελέτες, έχει δειχθεί ότι το miRNA-195 μειώνει την έκφραση κάποιων μορίων, δρώντας σαν ανταγωνιστής της BMP σηματοδότησης στα κύτταρα του οστίτη ιστού (20). Επομένως, η αρνητική ρύθμιση του miRNA-195 στα προγονικά κύτταρα αποτελεί παράδειγμα ενός ανασταλτικού miRNA, το οποίο υποεκφράζεται, ώστε να ευοδώσει την επιμετάλλωση. Τα miRNAs ευοδώνουν την οστεογένεση με το να ρυθμίζουν αρνητικά τους αναστολείς της επιμετάλλωσης (9).



Η σηματοδοτική πορεία Wnt είναι μια πολύ σημαντική πορεία για την ανάπτυξη και εξέλιξη των περιοδοντικών ιστών και την ομοιοστασία τους (21-26). Πολλά από τα miRNA μόρια ενισχύουν το Wnt μονοπάτι, στοχεύοντας στους αναστολείς του και επάγοντας την οστεοβλαστογένεση (27, 28). Τέτοια miRNAs είναι τα miRNA-27, miRNA-29, miRNA-199a, τα οποία βρέθηκαν υπερεκφρασμένα κατά την οστεογενετική διαφοροποίηση των προγονικών PDLs. Τα μόρια αυτά ελέγχουν τη διαφοροποίηση των μεσεγχυματικών κυττάρων, μέσω σχηματισμού μηχανισμών δετικής ανατροφοδότησης και ενεργοποίησης της πορείας Wnt/β-κατενίνης (9).

Άλλο ένα σηματοδοτικό μονοπάτι είναι αυτό του Notch. MiRNAs μέλη της οικογένειας των miRNA-34, είναι αναστολείς του Notch μονοπατιού και καταστέλλουν την οστεοβλαστική διαφοροποίηση (9). Έχει δειχθεί ότι η ανεπάρκεια του miRNA-34, αυξάνει τον οστικό σχηματισμό, επηρεάζοντας τον πολλαπλασιασμό των οστεοβλαστών.

## 2.2. ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΑ ΜΟΝΟΠΑΤΙΑ ΣΥΜΜΕΤΟΧΗΣ ΤΩΝ miRNAs, ΣΧΕΤΙΖΟΜΕΝΑ ΜΕ ΤΗΝ ΑΝΑΓΕΝΝΗΣΗ ΤΩΝ ΠΕΡΙΟΔΟΝΤΙΚΩΝ ΙΣΤΩΝ

Οι φλεγμονώδεις συνθήκες, που λαμβάνουν χώρα στην περιοδοντική νόσο, προκαλούν απώλεια του φατνιακού οστού και διαταραχή του συνδετικού ιστού (29-32). Σε αυτές τις συνθήκες, ποικίλα miRNAs, έχουν βρεθεί σε αυξημένα ή μειωμένα επίπεδα, ρυθμίζοντας με διάφορους τρόπους, θετικά ή αρνητικά την οστεογένεση. Κάποια από τα miRNAs που πιθανόν σχετίζονται με τη ρύθμιση της οστεογένεσης στην περιοδοντική νόσο, είναι τα miR-138, miR-17, miR-146a, miR-150, miR-155 και miR-30a-5p.

Το miRNA-138 έχει βρεθεί ιδιαίτερα αυξημένο και αυτή η αύξηση έχει σαν αποτέλεσμα την αναστολή βασικών γονιδίων, σχετικών με την επιμετάλλωση, όπως αυτό της οστεοκαλσίνης (OC), το RunX2 και το γονίδιο του κολλαγόνου τύπου I. Επομένως, κάποιο μόριο που λειτουργεί ως αναστολέας του miRNA-138, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως θεραπευτικός παράγοντας για την πρόληψη της απώλειας οστού, σχετιζόμενη με την προκεχωρημένη περιοδοντίτιδα (32).

Άλλο ένα μόριο που έχει μελετηθεί είναι το miRNA-17 και η επίδρασή του στην οστεογενετική διαφοροποίηση των προγονικών PDL κυττάρων, όπου φαίνεται πως το φλεγμονώδες περιβάλλον, αναστέλλει την οστεοβλαστική δραστηριότητα και τη

διαφοροποίηση των κυττάρων αυτών (33). Οι φλεγμονώδεις κυτοκίνες αναστέλλουν το miRNA-17 και προάγουν την έκφραση του Smurf1, το οποίο αποτελεί έναν άμεσο στόχο του miRNA-17 στα προγονικά κύτταρα του περιοδοντίου. Επίσης, προκαλούν την εξασθένιση των ειδικών για την οστεοβλαστογένεση παραγόντων, μεσολαβούμενων από το Smurf1 (33).

Το miRNA-146a επίσης επηρεάζει τη διαφοροποίηση των κυττάρων του περιοδοντικού συνδέσμου, σε φλεγμονώδες περιβάλλον. Παρατηρείται αύξηση της έκφρασής του κατά την οστεοβλαστική διαφοροποίηση των PDL κυττάρων (34). Η υπερέκφραση αυτή οδηγεί σε μειωμένη δραστηριότητα του NF-κB καθώς και σε αυξημένα προφίλ έκφρασης των γονιδίων που ρυθμίζουν την οστεοβλαστική διαφοροποίηση. Η ρύθμιση της ενεργότητας του μορίου NF-κB, μπλοκάρει τη λειτουργία του miRNA-146a στην οστεογένεση, καταδεικνύοντας ότι το μόριο αυτό προάγει τη διαφοροποίηση των PDL κυττάρων, μέσω της αρνητικής ρύθμισης του NF-κB σηματοδοτικού μονοπατιού (34).

Τα miRNA-150 και miRNA-155 συνεισφέρουν επίσης στην ανασταλτική επίδραση της φλεγμονής στην οστεοβλαστική διαφοροποίηση, στους προ-οστεοβλάστες και στα αδιαφοροποίητα μεσεγχοματικά κύτταρα *in vitro* (9).

### 2.3. ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΤΟΥ miR-30a-5p ΕΛΑΤΤΩΝΟΥΝ ΤΗΝ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ ΦΛΕΓΜΟΝΩΔΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΚΑΙ ΕΝΙΣΧΥΟΥΝ ΤΗΝ ΕΚΦΡΑΣΗ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΠΟΥ ΣΧΕΤΙΖΟΝΤΑΙ ΜΕ ΤΗΝ ΟΣΤΕΟΓΕΝΗ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ

Σε περαιτέρω διερεύνηση, βρέθηκε ότι μόρια - αναστολείς του miRNA-30a-5p μειώνουν την έκφραση των φλεγμονωδών παραγόντων και αντίθετα, ενισχύουν την έκφραση παραγόντων που ευνοούν την οστεογένεση. Συγκεκριμένα, οι φλεγμονώδεις κυτοκίνες IL1-R1, IL1-R2 και TNFR1 βρέθηκαν αυξημένες, σε κύτταρα στα οποία μεταφέρθηκαν αγωνιστές του miRNA-30a-5p, ενώ αντίθετα, μειώθηκαν, όταν στα κύτταρα μεταφέρθηκαν αναστολείς του miRNA-30a-5p. Οι αναστολείς του miRNA-30a-5p φαίνεται να ευνοούν την οστεογενή διαφοροποίηση των κυττάρων, ενώ οι αγωνιστές να αναστέλλουν την διαδικασία αυτή. Συνεπώς, αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν ότι το miRNA-30a-5p σχετίζεται με τη ρύθμιση της οστεογένεσης και της φλεγμονής, στην περιοδοντική νόσο.

#### 2.4. RUNX2: ΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ-ΣΤΟΧΟΣ ΤΟΥ miR-30a-5p

Σε πρόσφατη μελέτη, βρέθηκαν πάνω από 1576 γονίδια-στόχοι του miRNA-30a-5p, συμπεριλαμβανομένου του Runx2. Το γονίδιο αυτό, δεν είναι μόνο επαγωγέας της χονδροκυτταρικής και οστεογενούς διαφοροποίησης, αλλά και της διαφοροποίησης των προγονικών μεσεγχυματικών κυττάρων (35, 36). Η έκφρασή του ποικίλλει στα διάφορα είδη κυττάρων. Παραδείγματος χάριν, εκφράζεται ασθενώς στα αδιαφοροποίητα μεσεγχυματικά κύτταρα, σε υψηλό βαθμό στις προ-οστεοβλάστες, στο μέγιστο βαθμό στις ανώριμες οστεοβλάστες και ακολούθως, σε χαμηλό βαθμό, στις ώριμες οστεοβλάστες. Είναι πιθανό ότι το γονίδιο Runx2 σχετίζεται με τη φλεγμονή και αυτός είναι ο λόγος που οι αναστολείς του miRNA-30a-5p ενισχύουν την οστεογένεση, αναστέλλοντας συγχρόνως τη φλεγμονή, μέσω της υπερέκφρασης του Runx2. Αποτελέσματα πειραμάτων έδειξαν ότι τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου Runx2, τα οποία προκύπτουν από τη μέτρηση των επιπέδων mRNA του γονιδίου, ήταν αυξημένα στα κύτταρα με τους miRNA-30a-5p αναστολείς και μειωμένα, στα κύτταρα με τους miRNA-30a-5p αγωνιστές (37). Αντίστοιχα, τα επίπεδα των δεικτών αλκαλική φωσφατάση (ALP), οστεοκαλσίνη (OC) και γονίδιο Col-1, ήταν αυξημένα στα κύτταρα με τους miRNA-30a-5p αναστολείς και ελαττωμένα στα κύτταρα με τους miRNA-30a-5p αγωνιστές. Επίσης, φάνηκε ότι η επίδραση του miRNA-30a-5p στη μείωση/αύξηση της έκφρασης των δεικτών αλκαλική φωσφατάση (ALP), οστεοκαλσίνη (OC) και γονίδιο Col-1, είναι έμμεση (37).

Ωστόσο, ο ακριβής μηχανισμός αλληλεπίδρασης αυτών των μορίων, δεν είναι πλήρως ξεκάθαρος και χρήζει περαιτέρω διερεύνησης. Επίσης, χρειάζονται και περισσότερα κλινικά δεδομένα, για να συνεχιστεί η έρευνα σε αυτό το πεδίο. Σε κάθε περίπτωση, από τη μελέτη αυτή φάνηκε πως το miRNA-30a-5p έχει ρυθμιστικό ρόλο στην οστεογένεση και τη φλεγμονή, στην περιοδοντική νόσο, στοχεύοντας το γονίδιο Runx2. Το miRNA-30a-5p ήταν υπερεκφρασμένο σε φλεγμονώδεις συνθήκες των περιοδοντικών ιστών, σε ζωικό μοντέλο ποντικών με περιοδοντική νόσο, με τους miRNA-30a-5p αναστολείς να ευνοούν την οστεογένεση και να καταστέλλουν τη φλεγμονή, ενισχύοντας τη δράση του Runx2. Επομένως, η μελέτη αυτή έδειξε έναν πιθανό τρόπο ενίσχυσης του οστικού σχηματισμού για την αντιμετώπιση των βλαβών της περιοδοντικής νόσου.

## 2.5. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ OSTERIX ΤΩΝ miRNAs ΣΤΟΝ ΟΣΤΙΚΟ ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟ ΚΑΙ ΤΗΝ ΟΔΟΝΤΙΚΗ ΑΝΑΠΤΥΞΗ

### 2.5.1. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ OSX ΚΑΙ ΤΩΝ miRNAs ΣΤΟΝ ΟΣΤΙΚΟ ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟ

Ο Osterix (Osx) είναι ένας ειδικός μεταγραφικός παράγοντας, απαραίτητος για τον οστικό σχηματισμό. Η μελέτη των Wang C *et al.* (2016) κατέδειξε τις ειδικές λειτουργίες του Osterix και των miRNAs σε συγκεκριμένους κυτταρικούς τύπους κατά την οστεογένεση και κατά τη οδοντική ανάπτυξη και ειδικότερα, σε άλλους τύπους κυττάρων οι οποίοι εμπλέκονται στο σχηματισμό οστού, όπως τα χονδροκύτταρα, τα λιποκύτταρα και οι οστεοκλάστες. Το πιο σημαντικό, όμως, είναι ότι η σχέση μεταξύ των μορίων αυτών, φαίνεται να οδηγεί σε νέα μονοπάτια καινοτόμων θεραπειών, για σκελετικές νόσους, αλλά και για την περιοδοντική νόσο (38).

Είναι γνωστό ότι ο οστικός σχηματισμός αποτελείται από δύο διαφορετικές αναπτυξιακές διαδικασίες. Την ενδομεμβρανώδη οστεοποίηση και την ενδοχόνδρινη οστεοποίηση. Τα προγονικά κύτταρα των οστεοβλαστών, ανάμεσα στα μεσεγχυματικά κύτταρα της ενδοχόνδρινης και ενδομεμβρανώδους σκελετικής ανάπτυξης, πρώτα διαφοροποιούνται μέσω ενός ή περισσότερων βημάτων, σε προ-οστεοβλάστες, οι οποίες εξακολουθούν να έχουν δυναμικό διαφορετικής διαφοροποίησης. Οι προ-οστεοβλάστες αυτές, μπορούν δηλαδή να διαφοροποιηθούν στη συνέχεια, σε ένα ή περισσότερα βήματα, σε ώριμες οστεοβλάστες και σε ώριμα χονδροκύτταρα (39). Οι οστεοβλάστες έχουν την ικανότητα να σχηματίζουν απευθείας οστίτη ιστό, ενώ τα χονδροκύτταρα σχηματίζουν ένα χόνδρινο ικρίωμα, το οποίο στη συνέχεια αντικαθίσταται από οστίτη ιστό.

Ο Osterix (Osx), ανακαλύφθηκε από τους Nakashima *et al.* (2002) και βρέθηκε ότι ανήκει στην οικογένεια των ειδικών πρωτεϊνών (Specificity protein, Sp), υπεύθυνος για τη διαφοροποίηση των προ-οστεοβλαστών σε ώριμες οστεοβλάστες (39). Έως σήμερα, χιλιάδες μελέτες, τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*, έχουν πραγματοποιηθεί, εδραιώνοντας τον ρόλο του Osterix στον οστικό σχηματισμό και τη συμμετοχή του στις παραπάνω διαδικασίες (40-44). Ωστόσο, ο ρόλος του Osterix σε άλλα είδη κυττάρων, πέραν των ανθρώπινων μεσεγχυματικών, δεν έχει διερευνηθεί. Επίσης, δεν έχει διερευνηθεί και ο ρόλος του Osterix κατά την οδοντική ανάπτυξη.

Όσον αφορά στα miRNAs, επίσης δεν έχει διαλευκανθεί ο ρόλος τους στην οδοντική ανάπτυξη, ωστόσο έχουν μελετηθεί κατά την οστεογενή διαφοροποίηση των κυττάρων. Παραδείγματος χάριν, το miRNA-138, έχει βρεθεί ότι έχει την ικανότητα να τροποποιεί την οστεογενή διαφοροποίηση των ανθρώπινων μεσεγγυματικών κυττάρων (human mesenchymal stem cells, hMSCs). Συγκεκριμένα, έχει φανεί σε *in vivo* πειράματα, ότι τα αυξημένα επίπεδα του μορίου αυτού, ρυθμίζουν αρνητικά την οστεοπλαστική διαφοροποίηση και το σχηματισμό οστού (45) ενώ τα ελαττωμένα επίπεδά του, την ενισχύουν. Άλλα miRNAs τα οποία συμμετέχουν σε αυτή τη διαδικασία είναι τα miRNA-194, miRNA-210, miRNA-204, miRNA-23, miRNA-24, miRNA-145, miRNA-375 και miRNA-150 (46-51). Τα miRNAs, ρυθμίζουν τόσο θετικά όσο και αρνητικά την οστεοπλαστική διαφοροποίηση και τον οστικό σχηματισμό.

#### 2.5.2. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ OSX ΚΑΙ ΤΩΝ miRNAs ΣΤΗΝ ΟΔΟΝΤΙΚΗ ΑΝΑΠΤΥΞΗ

Τα δόντια, όπως και ο οστίτης ιστός, αποτελούν ένα ακόμη επιμεταλλωμένο όργανο. Εξαιτίας της πολύ μεγάλης επίπτωσης της περιοδοντικής νόσου, η οποία οδηγεί σε απώλεια των δοντιών, καταστρέφοντας το φατνιακό οστό και την οστεΐνη, υπάρχει η επιτακτική ανάγκη εύρεσης τρόπων θεραπείας και αναγέννησης των περιοδοντικών ιστών.

Υπάρχει πολύ μεγάλη ομοιότητα μεταξύ της διαδικασίας του οδοντικού σχηματισμού και αυτής της ενδομεμβρανώδους οστεοποίησης του οστίτη ιστού. Οι οστεΐνοβλάστες είναι τα κύτταρα που παράγουν την οστεΐνη της ρίζας και είναι αρκετά παρόμοια με τις οστεοβλάστες, που είναι υπεύθυνες για τον οστικό σχηματισμό (52, 53). Επιπρόσθετα, εκτός της ικανότητας που έχουν να συνδέτουν επιμεταλλωμένες μάζες *in vitro*, οι οστεΐνοβλάστες εκφράζουν γονίδια όπως αυτά της οστικής σιαλοπρωτεΐνης (BSP) και της οστεοκαλσίνης (OC). Τα προϊόντα των γονιδίων *Runx2* και *Osx*, είναι δυο μείζονος σημασίας μεταγραφικοί παράγοντες στην οστεογένεση (54-56),(39) τα οποία βρίσκονται και στις οστεΐνοβλάστες (57). Επομένως, φαίνεται ότι τα μόρια *Osx* αλλά και τα miRNAs, είναι απαραίτητα και για τη διαφοροποίηση των οδοντοβλαστών και την οδοντική ανάπτυξη.

Όσον αφορά στον *Osx*, βρέθηκε επίσης, ότι ρυθμίζει τη διαφοροποίηση των οστεΐνοβλαστών, διατηρώντας χαμηλού ρυθμού σηματοδότηση του μονοπατιού Wnt/ $\beta$ -κατενίνης, μέσω θετικής ρύθμισης της DKK1 πρωτεΐνης (58). Επομένως, είναι πιθανό ότι ο *Osx* διαδραματίζει έναν πολύ σημαντικό ρόλο στην αναγέννηση

των περιοδοντικών ιστών και σε συνδυασμό με γονιδιακά ενεργοποιούμενη μήτρα (gene-activated matrix, GAM), ίσως να είναι αποτελεσματικός στην αναγέννηση της οστέινης (59).

Ωστόσο, το πεδίο έρευνας για τα miRNAs και την οστεϊνογένεση δεν έχει ακόμη διερευνηθεί. Συγκεκριμένα μοτίβα έκφρασης κάποιων miRNAs στην περιοδοντική νόσο (60, 61), καθώς και συγκεκριμένα miRNAs σε διαφορετικούς περιοδοντικούς ιστούς (62, 63), έχουν αναγνωρισθεί, ωστόσο ο ακριβής τους ρόλος και οι μηχανισμοί δράσεως τους, χρειάζεται να μελετηθούν περαιτέρω.

### 2.5.3. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ OSTERIX ΚΑΙ ΤΩΝ miRNAs ΣΤΑ ΧΟΝΔΡΟΚΥΤΤΑΡΑ

Η πλειοψηφία των οστών στο ανθρώπινο σώμα, σχηματίζεται με την ενδοχόνδρινη οστεοποίηση, η οποία χρειάζεται ένα χόνδρινο υπόβαθρο. Εξαιρέση αποτελούν τα οστά της κρανιοπροσωπικής χώρας, τα οποία σχηματίζονται με ενδομεμβρανώδη οστεοποίηση. Κάποιες μελέτες έδειξαν ότι ο Osterix λειτουργεί ως μοριακός «διακόπτης» ανάμεσα στην οστεβλαστική και χονδροκυτταρική διαφοροποίηση των κυττάρων (64), προτείνοντας ότι το μόριο αυτό παίζει εκτός από την ωρίμανση των οστεοβλαστών και στη διαφοροποίηση των χονδροκυττάρων. Γενικά, έχειδειχθεί ότι ο Osx παίζει ρόλο στην τελικού σταδίου ενδοχόνδρινη οστεοποίηση, ωστόσο οι ακριβείς λειτουργίες του χρειάζονται περαιτέρω διερεύνηση.

Εκτός από τον Osx, μια πληθώρα miRNAs συμμετέχει στη ρύθμιση των διαδικασιών της χονδροκυτταρικής διαφοροποίησης και λειτουργίας. Κάποια συγκεκριμένα miRNAs, όπως το miRNA-23b, έχουν την ικανότητα να επάγουν τη χονδροκυτταρική διαφοροποίηση των μεσεγχυματικών κυττάρων, στοχεύοντας τη σηματοδότηση στην οποία συμμετέχει η πρωτεϊνική κινάση A (65). Άλλα miRNAs όπως τα miRNA-1, miRNA-140, miRNA-145 και miRNA-365, έχουν αναγνωρισθεί ότι διεγείρουν τον πολλαπλασιασμό των χονδροκυττάρων καθώς και τη διαφοροποίησή τους (66, 67) και τη ρύθμιση της σκελετικής ανάπτυξης (68-72).

### 2.5.4. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ OSTERIX ΚΑΙ ΤΩΝ miRNAs ΣΤΟΥΣ ΟΣΤΕΟΚΛΑΣΤΕΣ

Η ποσότητα του οστίτη ιστού που είναι διαδέσιμη, προκύπτει ως αποτέλεσμα της ισορροπίας μεταξύ οστικού σχηματισμού και οστικής απορρόφησης. Οι οστεοβλάστες, τα κύτταρα που είναι υπεύθυνα για τον οστικό σχηματισμό, ρυθμίζονται από τον Osx και από τα miRNAs, αλλά η επίδραση αυτών των μορίων στις οστεοκλάστες, τα κύτταρα που είναι υπεύθυνα για την οστική απορρόφηση, είναι προς το παρόν σχετικά ασαφής. Αποτελέσματα μελετών έδειξαν ότι η

ανεπάρκεια του *Osx* στους οστεοβλάστες, δεν επηρέασε την οστεοκλαστική διαφοροποίηση και λειτουργία (73, 74). Ωστόσο, οι Cao *et al.* (2008), έδειξαν ότι ο *Osx* ανέστειλε την έκφραση της ιντερλευκίνης 1α (IL-1α) (75). Η ιντερλευκίνη 1α είναι μια κυτοκίνη με πιθανή διεγερτική δράση στην οστεοκλαστογένεση (76). Επομένως, αυτό δείχνει ότι ο *Osx* έχει διαφορετικές επιδράσεις στις οστεοκλάστες.

Τα miRNAs έχουν επίσης ποικίλες δράσεις στις οστεοκλάστες. Σε πρόσφατη μελέτη σχετικά με αυτό το θέμα, οι Tang *et al.* (2014), ταξινόμησαν τις λειτουργίες των διαφόρων miRNAs, σχετικές με τις οστεοκλάστες και με τις παθήσεις των οστών, οι οποίες έδειξαν ότι κάποια από τα μόρια αυτά ευοδώνουν την οστεοκλαστογένεση, ενώ άλλα την αναστέλλουν (77).

## 2.6. ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΟΥ OSX ΚΑΙ ΤΩΝ miRNAs

Εφόσον ο *Osx* και τα miRNAs έχουν πολύ ενεργό ρόλο στη διαμόρφωση και σχηματισμό του οστίτη ιστού και στη σκελετική ανάπτυξη γενικότερα, είναι σαφές ότι τα δυο αυτά μόρια αλληλεπιδρούν και μεταξύ τους. Κάποιες έρευνες έχουν δείξει ότι τα miRNAs έχουν ως μόριο-στόχο τον *Osx*. Για παράδειγμα, ένα από αυτά, το miRNA-637, στοχεύοντας το μόριο *Osx*, διατηρεί την ισορροπία μεταξύ των οστεοβλαστών και των λιποκυττάρων (78). Άλλα miRNAs, που έχουν στόχο τον *Osx*, είναι τα miRNA-125b, miRNA-31, hsa- miRNA-135b, και το miRNA-214 (79-82). Επιπλέον, τα miRNAs μπορούν να αλληλεπιδρούν με τον *Osx* έμμεσα, στοχεύοντας μόρια-ενεργοποιητές του ή αναστολείς του, ή γονίδια σχετιζόμενα με αυτόν.

Παραδείγματος χάριν το *Runx2*, το οποίο ρυθμίζει την έκφραση του *Osx*, αποτελεί έναν πιθανό στόχο για το miRNA-338-3p. Η αυξημένη έκφραση του miR αυτού, προκαλεί μείωση της έκφρασης του *Runx2*, σε επίπεδο mRNA και πρωτεϊνών, άρα και έμμεση μείωση των επιπέδων του *Osx*, ενώ αντίθετα, η έκφραση του αυξάνεται, μετά από χρήση αναστολέων του miRNA-338-3p (83). Άλλα miRNA μόρια τα οποία έχουν βρεθεί ότι στοχεύουν το *Runx2*, κατά την οστεογενή διαφοροποίηση των κυττάρων, είναι τα miRNA-23a, miRNA-30c, miRNA-34c, miRNA-133a, miRNA-135a, miRNA-204, miRNA-205, miRNA-217, miRNA-218 και το miRNA-335 (84-88). Καθώς η δράση του *Runx2* σχετίζεται με τον *Osx* (38), η λειτουργία των miRNAs αυτών μπορεί να είναι έμμεση στην επίδρασή της στον *Osx*. Άλλο παράδειγμα το οποίο καταδεικνύει την έμμεση ρύθμιση του *Osx* από τα miRNAs είναι το εξής: Το miRNA-322 εμπλέκεται στην οστεοβλαστική διαφοροποίηση, στοχεύοντας το γονίδιο *Tob2* και ρυθμίζοντάς το αρνητικά.

Φυσιολογικά, το Tob2 προκαλεί αποδόμηση του mRNA του Osx. Η υπερέκφραση του miR αυτού, ελαττώνει την έκφραση του Tob2 σε επίπεδο mRNA και πρωτεϊνών και έχει ως τελικό αποτέλεσμα την αύξηση των επιπέδων του μεταγραφικού παράγοντα Osx (89). Αυτή ήταν η πρώτη φορά όπου δείχθηκε ότι ένα miRNA μπορεί να αυξάνει έμμεσα τα επίπεδα του Osx, αποτελώντας έτσι έναν νέο μοριακό μηχανισμό για τον έλεγχο της οστεογένεσης, χρησιμοποιώντας την πολύ σημαντική δράση του Osx.

Όπως φαίνεται, μια πληθώρα miRNAs μπορούν να στοχεύουν τον Osx. Γεννάται επομένως το ερώτημα εάν ο Osx εμπλέκεται, αντίστροφα, στη ρύθμιση της έκφρασης των miRNAs. Για παράδειγμα, βρέθηκε ότι το miRNA-93 είναι ικανό να δημιουργεί αμφίδρομη επικοινωνία με το μόριο Osx, ώστε να ρυθμίζει την επιμετάλλωση των οστεοβλαστών (90). Στα αποτελέσματα άλλης μελέτης, των Chen *et al.* (2013) δείχθηκε ότι ο Osx μείωσε την έκφραση μιας ομάδας miRNAs, που περιελάμβανε τα miRNA-133a και miRNA-204/211, ενώ αύξησε την έκφραση άλλης ομάδας miRNAs, στην οποία ανήκαν τα miRNA-141/200a. Βασιζόμενοι στη γνώση ότι τα miRNA-133a και miRNA-204/211 στοχεύουν το γονίδιο Runx2 και επειδή η σκληροστίνη και η αλκαλική φωσφατάση (ALP) αποτελούν επίσης δυο ακόμα στόχους των τα miRNA-141/200a και miRNA-204/211, κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι και ο Osx μπορεί να ρυθμίζει τα επίπεδα του Runx2, της αλκαλικής φωσφατάσης, της σκληροστίνης, μέσω ρύθμισης συγκεκριμένων miRNAs (91). Κάποια miRNAs έχει βρεθεί ότι έχουν τους δικούς τους προαγωγείς και μπορούν να μεταγράφονται ανεξάρτητα (92), ωστόσο φαίνεται να υπάρχουν λίγα μόρια τα οποία μπορούν να τα ρυθμίζουν. Συνεπώς, αυτή η παρατήρηση ανοίγει ένα νέο παράθυρο στην εξερεύνηση της σχέσης του Osx με τα miRNAs.

Συμπερασματικά, φαίνεται ότι ο σχηματισμός οστίτη ιστού πραγματοποιείται μέσω πολλών σηματοδοτικών μονοπατιών και μορίων. Το να γνωρίζουμε τις σχέσεις και τους μηχανισμούς αλληλεπίδρασης μεταξύ των μορίων αυτών, θα προσφέρει έναν τρόπο να παρεμβαίνουμε στα μονοπάτια αυτά, επηρεάζοντας τη σκελετική ανάπτυξη και συνεισφέροντας στη θεραπεία των νόσων του οστίτη ιστού. Επιπλέον, η αναγέννηση της οστεΐνης είναι πεδίο μείζονος σημασίας για την αντιμετώπιση της περιοδοντικής νόσου και της απώλειας των δοντιών και χρειάζεται εντατική μελέτη και διερεύνηση, στο επίπεδο της σχέσης των Osx με τα miRNAs και την οδοντική ανάπτυξη.



## 2.7. ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΑ ΜΟΝΟΠΑΤΙΑ ΣΥΜΜΕΤΟΧΗΣ ΤΩΝ miRNAs, ΣΧΕΤΙΖΟΜΕΝΑ ΜΕ ΤΗΝ ΚΑΤΑΣΤΡΟΦΗ ΤΩΝ ΠΕΡΙΟΔΟΝΤΙΚΩΝ ΙΣΤΩΝ

Οι φλεγμονώδεις συνθήκες που επικρατούν στην περιοδοντική νόσο, εκτός από την αναστολή της οστεοβλαστικής διαφοροποίησης και δραστηριότητας, επηρεάζουν και την οστεοκλαστική δραστηριότητα, ενισχύοντάς την και οδηγώντας σε απορρόφηση οστού (31). Η οστεοκλαστική δραστηριότητα προκαλείται από σηματοδοτικούς καταρράκτες, που ενεργοποιούνται από τους λιποπολυσακχαρίτες των τοιχωμάτων των βακτηριακών κυττάρων και από την επίδραση αυτών στις προφλεγμονώδεις κυτοκίνες, όπως IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ . Οι κυτοκίνες αυτές ενεργοποιούν το μόριο RANK, στην κυτταρική επιφάνεια των οστεοκλαστών και το πυρηνικό μόριο-στόχο του, NF- $\kappa$ B, όπως επίσης προάγουν και τη διαφοροποίηση των προ-οστεοκλαστών σε ώριμες, πολυπύρηνες οστεοκλάστες (93-97). Έπειτα, οι ώριμες οστεοκλάστες προσκολλώνται στην επιφάνεια του οστίτη ιστού, με το σχηματισμό της πτυχωτής επιφάνειάς τους και δημιουργούν ένα όξινο περιβάλλον, με την έκκριση οξέων, το οποίο αρχικά απομεταλλικοποιεί την ανόργανη φάση του οστού, μέσω της κινητοποίησης του ανταλλάξιμου, μη κρυσταλλικού ασβεστίου Ca<sup>2+</sup> (ανόργανα άλατα φωσφορικού ασβεστίου, CaHPO<sub>4</sub>). Αυτή η διαδικασία διευκολύνει τη μετέπειτα διάσπαση της οργανικής μήτρας του οστίτη ιστού, δηλαδή τη διάσπαση του κολλαγόνου τύπου I και των λοιπών μη κολλαγονούχων οργανικών πρωτεϊνών, μέσω της καδεψίνης K (98, 99).

Τα miRNAs που εκφράζονται στους ιστούς στην περιοδοντική νόσο, επιδρούν στη φλεγμονώδη ενεργοποίηση των οστεοκλαστών και στην απορρόφηση του φατνιακού οστού (9). Επηρεάζουν και ευοδώνουν το καταβολικό μονοπάτι στην ομοίωση του οστίτη ιστού, είτε αναστέλλοντας την οστεοκλαστική δραστηριότητα και λειτουργία, είτε ενισχύοντας αρνητικούς κύκλους ανατροφοδότησης, είτε προάγοντας την οστεοκλαστογένεση. Τέτοια miRNAs είναι τα miRNA-17, miRNA-15a, miRNA-34a, miRNA-34c, miRNA-146a, miRNA-155, miRNA-223, miRNA-125a,b, τα οποία είναι υπερεκφρασμένα και τα miRNA-15b, miRNA-17, miRNA-100, miRNA-132, και miRNA-199a, τα οποία υποεκφράζονται.

Συγκεκριμένα, τα miRNA-146a, miRNA-223, miRNA-34a, miRNA-125a, και miRNA-503, αναστέλλουν τη λειτουργία και διαφοροποίηση των οστεοκλαστών, ρυθμίζοντας διάφορα μόρια σηματοδοτικών μονοπατιών της οστεοκλαστικής διαφοροποίησης (100-103). Η έκφραση αυτών στην περιοδοντική νόσο, βρέθηκε μειωμένη κατά την οστεοκλαστογένεση, οπότε το γεγονός αυτό προήγαγε τη

διαφοροποίηση των οστεοκλαστών. Επομένως, κάποια από τα μόρια αυτά, όπως τα miRNA-146a και miRNA-125a, σε αυξημένη έκφραση, θα μπορούσαν να εμποδίσουν την οστεοκλαστική διαφοροποίηση και την απορρόφηση οστού και έτσι να βελτιώσουν την περιοδοντική κατάσταση. Άλλη κατηγορία των miR, αναστέλλει την οστεοκλαστική διαφοροποίηση και η έκφρασή τους βρέθηκε αυξημένη, ώστε να προκαλεί κύκλους αρνητικής ανατροφοδότησης σχετικά με την οστεοκλαστογένεση. Μεταξύ αυτών, είναι τα miRNA-26a και miRNA-155, τα οποία πιθανόν να αποτελούν έναν εσωτερικό μηχανισμό ανατροφοδότησης για τη ρύθμιση της οστικής ανακατασκευής. Συνεπώς αυτά τα δύο μόρια, ή αγωνιστές αυτών, λόγω της ικανότητάς τους να αναστέλλουν την οστεοκλαστογένεση, μπορούν να χρησιμοποιηθούν στο μέλλον για τη θεραπεία της απώλειας του οστού (9).

Επιπρόσθετα, το miRNA-21 είναι ένα ακόμα miRNA που συμμετέχει φυσιολογικά στην οστεογενή διαφοροποίηση των κυττάρων και αποτελεί και έναν πιθανό μεσολαβητή στη σχέση μεταξύ περιοδοντικής νόσου και ανεπάρκειας οιστρογόνων, που οδηγεί σε αυξημένη οστεοκλαστική δραστηριότητα, με την πρόσδεση στον FASL (FAS-Ligand) προσδέτη (104) στις γυναίκες με περιοδοντίτιδα, κατά την εμμηνόπαυση (105).

#### 2.7.1. ΚΑΤΑΣΤΟΛΗ ΤΗΣ ΛΙΠΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΚΑΙ ΟΣΤΕΟΓΕΝΟΥΣ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΤΟΥ ΠΕΡΙΟΔΟΝΤΙΚΟΥ ΣΥΝΔΕΣΜΟΥ, ΑΠΟ ΤΟΝ TNFA, ΜΕΣΩ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ ΤΟΥ ΜΟΝΟΠΑΤΙΟΥ miR-21/Spry1

Τα αδιαφοροποίητα μεσεγχυματικά κύτταρα (MSCs), αποτελούν κύτταρα μεσοδερμικής προέλευσης, τα οποία μπορούν να διαφοροποιούνται σε οστεβλάστες, χονδροβλάστες, λιποκύτταρα κλπ. (106, 107). Μελέτες έχουν δείξει ότι τα κύτταρα αυτά μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την αναγέννηση οστού και ιστών σχετιζόμενων με οστόν, προσφέροντας ένα θεραπευτικό δυναμικό στην κλινική πράξη (108-110).

Τα miRNAs συμμετέχουν σε αυτή τη ρύθμιση της λιποκυτταρικής και οστεογενούς διαφοροποίησης των μεσεγχυματικών κυττάρων του ανθρώπινου μυελού των οστών (45, 111). Η έκφραση των ποικίλων miRNAs, είναι στενά σχετιζόμενη με διάφορες παθοφυσιολογικές καταστάσεις κυττάρων και ιστών, συμπεριλαμβανομένης και της περιοδοντικής νόσου (112).

Ερευνητικές μελέτες τα πρόσφατα χρόνια, έδειξαν ότι ο περιοδοντικός σύνδεσμος αποτελείται από έναν πληθυσμό πολυδύναμων κυττάρων, τα οποία έχουν τη δυνατότητα να αναπτύσσονται σε διάφορους φαινοτύπους (113, 114). Επομένως, όσον αφορά στην περιοδοντική νόσο και την καταστροφή των περιοδοντικών ιστών, είναι πλέον γνωστό ότι τα κύτταρα του περιοδοντικού συνδέσμου (hPDLSCs – human Periodontal Ligament Stem Cells), είναι τα πλέον κατάλληλα για την αναγέννηση αυτών.

Πρόσφατα βρέθηκε ότι οι φλεγμονώδεις κυτοκίνες μπορούν να ρυθμίζουν τα miRNAs και με αυτόν τον τρόπο, να συνεισφέρουν στις διάφορες φλεγμονώδεις νόσους. Συγκεκριμένα, η κυτοκίνη TNF-a (Tumor Necrosis Factor – Παράγοντας Νέκρωσης των Όγκων) είναι ένας πιθανός αρνητικός ρυθμιστής της κυτταρικής διαφοροποίησης. Έχει βρεθεί ότι τα αυξημένα επίπεδά του, σχετίζονται με τη βαρύτητα της περιοδοντικής νόσου. Σε μελέτη βρέθηκε ότι ο TNF-a μπορεί να αναστείλει τη λιποκυτταρική και οστεογενή διαφοροποίηση των κυττάρων του περιοδοντικού συνδέσμου. Συνεπώς, είναι πιθανό ότι ο TNF-a παίζει ρόλο στη ρύθμιση συγκεκριμένων σηματοδοτικών μονοπατιών στα οποία συμμετέχουν miRNAs και έτσι, επηρεάζει τη διαφοροποίηση των κυττάρων του περιοδοντικού συνδέσμου.

Ειδικότερα το miR-21 μόριο, σε αυξημένα επίπεδα, ενισχύει την κυτταρική αυτή διαφοροποίηση, σε λιποκύτταρα και οστεοκύτταρα, των κυττάρων του περιοδοντικού συνδέσμου, καταστέλλοντας το γονίδιο-στόχο του, *Spry1*, με πρόσδεση στην 3' αμετάφραστη περιοχή του. Το γονίδιο αυτό αποτελεί αρνητικό ρυθμιστή των ERK – MAPK και FGF μονοπατιών, τα οποία σε φυσιολογικές συνθήκες, ενισχύουν τη διαφοροποίηση των μεσεγχυματικών κυττάρων σε οστεοκύτταρα και λιποκύτταρα. Με αυτόν τον τρόπο φαίνεται ότι το μονοπάτι miR-21/*Spry1* παίζει σημαντικό ρόλο στη διαφοροποίηση των PDLSCs και σε φλεγμονώδεις συνθήκες. Ειδικότερα, σε φλεγμονώδεις συνθήκες, ο TNF-a μειώνει την έκφραση του miR-21. Με αυτόν τον τρόπο, προάγει έμμεσα τη δράση του γονιδίου *Spry1*, προκαλώντας ελαττωματική διαφοροποίηση σε λιποκύτταρα και οστεοκύτταρα, των κυττάρων του περιοδοντικού συνδέσμου, στην περιοδοντική νόσο (115).

### 2.7.2. ΑΝΑΣΤΟΛΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ miR-21 ΚΑΙ ΤΗΣ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΩΝ PDLSCs ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΑΠΟ ΤΟΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ TNF $\alpha$

Στο πείραμα των Yang *et al.* (2017) κύτταρα του περιοδοντικού συνδέσμου (PDLSCs) επώαστηκαν με και χωρίς TNF- $\alpha$  (10 ng/ml), κατά την κυτταρική διαφοροποίηση, για διάστημα 14 ημερών. Τα αποτελέσματα έδειξαν μειωμένη λιποκυτταρική αλλά και οστεογενή διαφοροποίηση, στα κύτταρα τα οποία επώαστηκαν με TNF- $\alpha$ . Η επώαση, οδήγησε σε αναστολή της έκφρασης των mRNA, των γονιδίων που σχετίζονται με λιποκυτταρογένεση και οστεογένεση, κατά τη διαφοροποίηση των κυττάρων του περιοδοντικού συνδέσμου, μετά από 7 ημέρες επώασης. Συγκεκριμένα, ο TNF- $\alpha$  προκάλεσε αναστολή της έκφρασης του miR-21. Επομένως, ο TNF- $\alpha$  αποτελεί έναν αρνητικό ρυθμιστή της διαφοροποίησης αυτής (115).

### 2.7.3. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ miR-21 ΣΤΗ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ PDLSCs

Για τη διερεύνηση του ρόλου του miR-21 στη διαφοροποίηση των PDLSCs, χρησιμοποιήθηκε η δοκιμασία «κέρδους λειτουργίας» και «απώλειας λειτουργίας». Μόρια – αγωνιστές του miR-21 (pre-miR-21) και αναστολείς αντίστοιχα (anti-miR-21), μεταφέρθηκαν στα κύτταρα του περιοδοντικού συνδέσμου. Μετά από αυτή τη μεταφορά, οι miR-21 αγωνιστές προκάλεσαν αύξηση των επιπέδων του miR-21, ενώ αντίστοιχα, οι miR-21 αναστολείς προκάλεσαν μείωσή τους. Επομένως, τα μόρια αυτά βρέθηκαν να είναι ειδικά και αποτελεσματικά, για τη ρύθμιση της έκφρασης των επιπέδων του miR-21. Στη συνέχεια, τα κύτταρα αυτά, στα οποία έγινε η μεταφορά, καδοδηγήθηκαν σε λιποκυτταρική διαφοροποίηση, με κατάλληλους παράγοντες, για 14 ημέρες. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα κύτταρα στα οποία είχαν μεταφερθεί οι miR-21 αγωνιστές, πραγματοποίησαν λιποκυτταρογένεση, ενώ αυτά στα οποία είχαν μεταφερθεί οι miR-21 αναστολείς, δεν προχώρησαν σε αυτή τη διαδικασία (115). Στη συνέχεια, τα τροποποιημένα PDLSCs κύτταρα, κατευδύνθηκαν σε οστεογενή διαφοροποίηση για 14 ημέρες. Η οστεογενής διαφοροποίηση ενισχύθηκε από την υπερέκφραση του miR-21 και επιβεβαιώθηκε από τη μέτρηση των επιπέδων της αλκαλικής φωσφατάσης. Έγινε φανερό ότι τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων σχετιζόμενων με την οστεογένεση, Runx2 και Osterix, ήταν αυξημένα στα PDLSCs κύτταρα με τους miR-21 αγωνιστές και μειωμένα αντίστοιχα, στα κύτταρα με τους miR-21 αναστολείς, σε σχέση με τα αρνητικά πρότυπα (115).

#### 2.7.4. ΓΟΝΙΔΙΟ-ΣΤΟΧΟΣ ΤΟΥ miR-21

Το υποψήφιο γονίδιο – στόχος για το miR-21, βρέθηκε να είναι το Spry1. Με εργαστηριακή ανάλυση Western blot, φάνηκε ότι τα επίπεδα πρωτεϊνικής έκφρασης του Spry1, ήταν μειωμένα στα κύτταρα με μεταφορά των miR-21 αγωνιστών σε σύγκριση με τα αρνητικά πρότυπα, και αντίθετα, αυξημένα στα κύτταρα με τους miR-21 αναστολείς. Συνεπώς, διαφαίνεται ότι το Spry1 αποτελεί στόχο για το miR-21, το οποίο το ρυθμίζει, προσδεδεμένο στην 3' αμετάφραστη περιοχή του.

#### 2.7.5. ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ SPRY1 ΑΠΟ ΤΟΝ TNF $\alpha$ , ΜΕΣΩ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ ΤΟΥ miR-21

Όπως αναφέρθηκε και προηγούμενα, με σκοπό να διερευνηθεί η επίδραση του TNF- $\alpha$  στην έκφραση του Spry1, έγινε εκ νέου πείραμα, στο οποίο κύτταρα του περιοδοντικού συνδέσμου καλλιεργήθηκαν με παράγοντες που ευνοούν την οστεογένεση και τη λιποκυτταρική διαφοροποίηση, παρουσία και απουσία του TNF- $\alpha$  αυτή τη φορά.

Με εργαστηριακές αναλύσεις Western blot και RT-PCR, αποδείχθηκε ότι ο TNF- $\alpha$  προήγαγε την έκφραση του Spry1, μέσω αναστολής του miR-21, οδηγώντας σε ελαττωματική οστεογένεση και λιποκυτταρογένεση (115). Επομένως, φαίνεται ότι το γονίδιο αυτό ίσως παίζει ρόλο στην αναστολή της οστεογένεσης και της λιποκυτταρικής διαφοροποίησης, μεσολαβούμενων από τον TNF- $\alpha$ , στα κύτταρα του περιοδοντικού συνδέσμου. Στη συνέχεια, κύτταρα στα οποία είχαν μεταφερθεί miR-21 αγωνιστές, καλλιεργήθηκαν για 14 ημέρες, σε μέσο με παράγοντες που ευνοούν την οστεογένεση και τη λιποκυτταρική διαφοροποίηση, παρουσία TNF- $\alpha$  (10 ng/ml).

Μετά τις 14 ημέρες, τα αποτελέσματα έδειξαν αυξημένη διαφοροποίηση σε λιποκύτταρα, μετά από υπερέκφραση του miR-21 (115). Επίσης, τα αποτελέσματα εργαστηριακών αναλύσεων, αποκάλυψαν υψηλότερα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων που σχετίζονται με τη λιπογένεση (PPAR- $\gamma$  και FABP4), στα PDLSCs κύτταρα με τους miR-21 αγωνιστές, συγκριτικά με τα κύτταρα χωρίς αυτούς. Ομοίως, μετά από καλλιέργεια για 14 ημέρες σε μέσο με παράγοντες που ευνοούν την οστεογένεση, παρατηρήθηκε αύξηση κατά 75% του σχηματισμού μεταλλοποιημένης μήτρας οστίτη ιστού, στα PDLSCs κύτταρα με υπερέκφραση του miR-21.

Μετά από εργαστηριακές αναλύσεις, φάνηκε ότι τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων σχετικών με την οστεογένεση, Runx2 και Osterix ήταν αυξημένα, ακολουθώντας την υπερέκφραση του miR-21. Συνεπώς, φαίνεται από τα παραπάνω αποτελέσματα ότι η υπερέκφραση του miR-21 μπορεί να τροποποιήσει την ελαττωματική οστεογένεση και λιποκυτταρική διαφοροποίηση των κυττάρων του περιοδοντικού συνδέσμου, μεσολαβούμενες από τον TNF-a. Επίσης, για να διερευνηθεί η επίδραση του miR-21 στα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου Spry1, κάτω από φλεγμονώδεις συνθήκες, παρουσία δηλαδή TNF-a, χρησιμοποιήθηκε Western blot και RT-PCR, μετά την οστεογενή και λιποκυτταρική επαγωγή (115).

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι πρωτεΐνες – προϊόντα έκφρασης του Spry1, κάτω από την επίδραση του TNF-a, ήταν σε πολύ χαμηλά επίπεδα, στα PDLSCs κύτταρα με αυξημένη έκφραση του miR-21. Κατά τη διαφοροποίηση, ο TNF-a προάγει την έκφραση του γονιδίου Spry1, μέσω αναστολής του miR-21 και αντίθετα, η υπερέκφραση του miR-21 μειώνει αντίστοιχα την έκφραση του Spry1, στα κύτταρα υπό την επίδραση του TNF-a και έμμεσα διεγείρει τα ERK-MAPK και FGF σηματοδοτικά μονοπάτια. Επομένως, τα ευρήματα αυτά συνιστούν έναν μοριακό μηχανισμό όπου ο TNF-a καταστέλλει την οστεογενή και λιποκυτταρική διαφοροποίηση των κυττάρων του περιοδοντικού συνδέσμου, μέσω αναστολής του λειτουργικού άξονα miR-21/Spry1, με το miR-21 συνεπώς, να αποτελεί έναν σημαντικό ρυθμιστή της αλληλεπίδρασης TNF-a/Spry1 (115).

Το φλεγμονώδες περιβάλλον στην περιοδοντική νόσο επηρεάζει όχι μόνο την απορρόφηση του οστίτη ιστού και την οστεοκλαστική δραστηριότητα, αλλά επιπλέον ελαττώνει ή και αναστέλλει την ικανότητα των προγονικών κυττάρων των περιοδοντικών ιστών, να σχηματίσουν νέους ιστούς μετά από καταστροφή τους, συμπεριλαμβανομένου του φατνιακού οστού (116). Συνεπώς, ως θεραπευτικός στόχος για την περιοδοντίτιδα, είναι να ενισχυθεί η αναγέννηση των περιοδοντικών ιστών, χρησιμοποιώντας το μοριακό αυτό μονοπάτι, προς όφελος της οστεογένεσης. Ωστόσο, ο ακριβής παθογενετικός μηχανισμός με τον οποίο το φλεγμονώδες μικροπεριβάλλον μειώνει την ικανότητα των κυττάρων του περιοδοντικού συνδέσμου να αναγεννηθούν, δεν είναι ακόμα πλήρως ξεκάθαρος. Ο μηχανισμός αυτός περιλαμβάνει συγκεκριμένα σηματοδοτικά μονοπάτια και μεταγραφικούς παράγοντες, οι οποίοι με τη σειρά τους ενεργοποιούνται από εξωκυττάρια σήματα.

## 2.7.6. ΑΝΑΣΤΟΛΗ ΤΗΣ ΟΣΤΕΟΓΕΝΕΣΗΣ ΚΑΙ ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΤΗΣ ΠΕΡΙΟΔΟΝΤΙΚΗΣ ΚΑΤΑΣΤΡΟΦΗΣ ΑΠΟ ΤΟ miR-30a-5p ΜΕ ΔΡΑΣΗ ΣΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ-ΣΤΟΧΟ ΤΟΥ RUNX2

Όπως έχουμε ήδη δει παραπάνω, πολλά και διαφορετικά miRNAs εμπλέκονται στην παθογένεση της περιοδοντικής νόσου (117-119). Ένα από τα miRNAs αυτά είναι το miRNA-30a-5p, το οποίο βρίσκεται στο χρωμόσωμα 6:71 και συμμετέχει σε πολλές παθολογικές αλλά και φυσιολογικές καταστάσεις. Στη μελέτη των Liu X *et al.* σχεδιάστηκε πείραμα με ζωικό μοντέλο περιοδοντίτιδας, ώστε να διερευνηθεί η δράση του miRNA-30a-5p καθώς και η επίδρασή του στην οστεογένεση και τη φλεγμονή στην περιοδοντική νόσο, στοχεύοντας το γονίδιο-στόχο του Runx2 (37). Το γονίδιο Runx2 (μεταγραφικός παράγοντας 2 των οστεοβλαστών) είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας που σχετίζεται με τη διαφοροποίηση των οστεοβλαστών (120). Ωστόσο, διαδραματίζει ρόλο και στην ωρίμανση των χονδροκυττάρων (35). Συγκεκριμένα, βρέθηκε ότι το Runx2 ενισχύει την οστεογενή διαφοροποίηση των αδιαφοροποίητων μεσεγχυματικών κυττάρων του μυελού των οστών *in vitro* και επιδιορθώνει τις χόνδρινες βλάβες *in vivo* (121). Τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής έδειξαν ότι τα επίπεδα του miRNA-30a-5p ήταν αυξημένα τόσο στον οστίτη ιστό, όσο και στον ουλικό ιστό στο ζωικό μοντέλο με περιοδοντίτιδα, συγκρινόμενα με τους αντίστοιχους υγείς ιστούς. Επομένως, το miRNA-30a-5p φαίνεται να εμπλέκεται στην ανάπτυξη και εξέλιξη της περιοδοντικής νόσου.

## 2.7.7. microRNAs ΚΑΙ ΟΣΤΕΟΚΛΑΣΤΟΓΕΝΕΣΗ

Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι τα miRNAs διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη διαφοροποίηση των οστεοκλαστών και στη λειτουργία τους (122). Ο παρακάτω πίνακας (Πίνακας 3) παρουσιάζει μια λίστα με τα miRNA μόρια τα οποία εμπλέκονται στην οστεοκλαστογένεση σχετιζόμενη με την περιοδοντική νόσο.

miRNA	Function(s)	Target(s)	Reference(s)	Gingiva with Periodontitis	Reference(s)
miR-21	Θ	Pdcd4, FasL	(104, 123)	Αυξημένο	(124)
miR-29b	A	C-FOS, MMP-2	(125)	Αυξημ.	(124)
miR-29a/b/c	Θ	Calcr, Cd93, Cdc42	(126)	Αυξημ.	(124)
miR-31	Θ	Gpr85, Nfia, Srgap2 RhoA	(127)	Μειωμ.	(128)
miR-34a	A	Tgif2	(129)	Αυξημ./Μειωμ.	
miR-124	A	NFATc1	(130, 131)	Δεν αναφέρεται	(60, 124)
miR-125a	Θ/A	TRAF6, TNFIP3	(103, 132)		(124)
miR-141	A	Mitf, Calcr	(133)	Αυξημ.	-
miR-146a	A	TRAF6	(134)	Μειωμ.	(128)
miR-148a	Θ	MAFB	(135)	Αυξημ.	204
miR-150	A	Opg	(136)	Αυξημ.	(128)

miR-155	A	Mitf, Socsl, Pu.1	(122, 137, 138)	Αυξημ.	(60)
miR-223	Θ/A	NFI-A	(100, 122, 139, 140)	Αυξημ./Μειωμ. Αυξημ.	(60, 61, 128)

**Πίνακας 3.** Μόρια miRNA σχετιζόμενα με την οστεοκλαστογένεση της περιοδοντικής νόσου (Θ: θετικός ρυθμιστής της οστεοκλαστογένεσης, A: αρνητικός ρυθμιστής της οστεοκλαστογένεσης).

Το miR-21 εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα όχι μόνο στα ούλα, στην περιοδοντική νόσο, αλλά επίσης και στα κύτταρα, κατά τη διάρκεια της οστεοκλαστογένεσης (122). Ορισμένοι κρίσιμοι παράγοντες στην περιοδοντική νόσο, επάγουν την έκφραση αυτή του miR-21. Οι λιποπολυσακχαρίτες (LPS) αποτελούν μείζον παθογονικό στοιχείο των κυτταρικών τοιχωμάτων των Gram-αρνητικών βακτηρίων και έναν σημαντικό παράγοντα που συνεισφέρει στην περιοδοντική νόσο. Η σηματοδότηση με τους LPS, μεσολαβείται από τους υποδοχείς τύπου Toll (Toll-like receptors), οδηγώντας τελικά στην ενεργοποίηση του NF-κB παράγοντα (141). Ο παράγοντας NF-κB επάγει με τη σειρά του την έκφραση του γονιδίου του miR-21.

Στα μακροφάγα, οι LPS επίσης επάγουν την ενεργοποίηση του NF-κB και συνεπακόλουθα του miR-21 και μειώνουν τα επίπεδα των πρωτεϊνών προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου 4 (PDCD4), οι οποίες με τη σειρά τους επάγουν την απόπτωση των οστεοκλαστών (142). Άλλο παράδειγμα επαγωγής της έκφρασης του miR-21, είναι μέσω του RANKL. Η πρωτεΐνη c-Fos, επαγόμενη από τον RANKL, αυξάνει την έκφραση του γονιδίου του miR-21, το οποίο ρυθμίζει αρνητικά την έκφραση των PDCD4, αρνητικών ρυθμιστών της οστεοκλαστογένεσης (123). Επιπρόσθετα, ο παράγοντας νέκρωσης των όγκων α (TNF-α), όπως είδαμε και σε προηγούμενη ενότητα, υπάρχει σε υψηλά επίπεδα τόσο στο ουλικό υγρό, όσο και στους φλεγμονώδεις περιοδοντικούς ιστούς και εμπλέκεται στην παθογένεση της περιοδοντίτιδας (122). Ο TNF-α δρα μέσω ποικίλων σηματοδοτικών μονοπατιών, συμπεριλαμβανομένου και αυτού του NF-κB, το οποίο συμμετέχει στη φλεγμονή και στην απόπτωση (143). Επομένως, ο TNF-α αυξάνει και αυτός την έκφραση του miRNA-21, μέσω του NF-κB και ο συνδυασμός δράσης των TNF-α και RANKL, στην περιοδοντική νόσο, αυξάνει την έκφραση του miRNA-21 σε υψηλότερα επίπεδα, σε σχέση με τη δράση μόνο του RANKL, κατά την οστεοκλαστική διαφοροποίηση των κυττάρων, σε καθεστώς ελεύθερο περιοδοντικής νόσου (122).

Μια άλλη οικογένεια miRNAs, περιλαμβάνει τα miR-29a, miR-29b και miR-29c, τα οποία είναι επίσης υπερεκφρασμένα στον ουλικό ιστό, σε καθεστώς φλεγμονής.



Τα miR-29 παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στον οστίτη ιστό, όπως επίσης και στον ουλικό ιστό (60, 122, 124). Η κανονική Wnt σηματοδότηση που ενεργοποιείται κατά την οστεοβλαστική διαφοροποίηση, επάγει την έκφραση των miR-29 (144). Ειδικότερα, τα miR-29a και miR-29c, ρυθμίζουν θετικά την οστεοβλαστική διαφοροποίηση, ελέγχοντας την έκφραση της οστεονεκτίνης (144).

Το miR-29c επίσης προάγει την οστεογένεση, ρυθμίζοντας αρνητικά αναστολείς της οστεοβλαστικής διαφοροποίησης (145). Όσον αφορά το miR-29b, η έκφρασή του καταστέλλει την έκφραση των πρωτεϊνών c-Fos (οι οποίες όπως είδαμε πριν αυξάνουν τα επίπεδα του miR-21, με τελικό αποτέλεσμα την επαγωγή της οστεοκλαστογένεσης), και των MMP-2 (Matrix Metalloproteinase-2) και έτσι αναστέλλει τον σχηματισμό των οστεοκλαστών. Φαίνεται δηλαδή ότι το miR-29b, σε αυξημένα επίπεδα στους φλεγμονώδεις ιστούς, ίσως έχει προστατευτικό ρόλο στην περιοδοντική νόσο, ελέγχοντας και καταστέλλοντας την εξέλιξη της περιοδοντικής καταστροφής. Η έκφραση του miR-29b όπως και του miR-21 που προαναφέρθηκε, επάγεται επίσης από τον παράγοντα NF-κB και αυξάνεται στα κύτταρα στα οποία δρουν οι TNF-α/RANKL, δηλαδή σε φλεγμονώδεις συνθήκες στην περιοδοντική νόσο, συγκριτικά με τα κύτταρα στα οποία δρα μόνο ο RANKL, κατά τη φυσιολογική οστεοκλαστογένεση (122, 146). Το αποτέλεσμα αυτό συνάδει με αυτό των Rossi *et al.* (2013), οι οποίοι ανέφεραν ότι η έκφραση του miR-29b προοδευτικά μειώνεται κατά την οστεοκλαστική διαφοροποίηση στα ανθρώπινα κύτταρα, σε υγιείς ιστούς, χωρίς περιοδοντική νόσο (125). Αντίθετα, οι Franceschetti *et al.* (2013) ανέφεραν ότι τα μέλη της οικογένειας miR-29 ρυθμίζουν θετικά την οστεοκλαστική διαφοροποίηση, με την έκφρασή τους να αυξάνεται κατά τη διαδικασία αυτή (126). Συνοπτικά, η οικογένεια των miR-29 φαίνεται ότι παίζει σημαντικό ρόλο στην οστεοκλαστική διαφοροποίηση, παρά τις επιμέρους αντιφάσεις στις διάφορες μελέτες.

Ένα άλλο miRNA το οποίο εκφράζεται σε μια ποικιλία ιστών και κυττάρων, είναι το miR-31 (122, 146). Το miR-31 παίζει επίσης σημαντικό ρόλο στην απορρόφηση του οστού από τις οστεοκλάστες, καθώς βρίσκεται εκφρασμένο σε υψηλά επίπεδα κατά την ανάπτυξη των οστεοκλαστών. Η αναστολή του έχει βρεθεί ότι καταστέλλει τον οστεοκλαστικό σχηματισμό και συνεπακόλουθα και την οστική απορρόφηση. Συγκεκριμένα, η ενεργοποιημένη οστεοκλάστη περιέχει έναν ειδικό δακτύλιο ακτίνης, ο οποίος σχηματίζει μια ζώνη «σφραγίσματος», με την οποία η οστεοκλάστη προσκολλάται ισχυρά, στην προς απορρόφηση οστική επιφάνεια (122, 147). Το miR-31 ελέγχει τη δομή αυτού του κυτταροσκελετού, ρυθμίζοντας την

έκφραση του γονιδίου Rhoa, το οποίο με τη σειρά του ρυθμίζει το σχηματισμό του δακτυλίου της ακτίνης (127). Επομένως, η υποέκφραση του miR, καταστέλλει τη δημιουργία αυτού του κυτταροσκελετού και συνεπώς και τη λειτουργία της οστεοκλάστης.

Το miR-34a βρέθηκε πρόσφατα ότι συμμετέχει στην οστεοβλαστική και οστεοκλαστική διαφοροποίηση. Έχει αναφερθεί ότι το miRNA αυτό, μπλοκάρει την οστεοπόρωση αλλά και την οστική μετάσταση, αναστέλλοντας την οστεοκλαστική διαφοροποίηση (129). Η έκφραση του miR-34a ελαττώνεται κατά την οστεοκλαστογένεση, ενώ φαίνεται ότι knock-down του γονιδίου του miR αυτού σε κύτταρα, επάγει την οστεοκλαστογένεση, ενώ η υπερέκφρασή του αναστρέφει τη διαδικασία αυτή (122, 129). Οι Krzezinski *et al.* (2014), αναγνώρισαν τον Tgif2 (Transforming growth factor- $\beta$  induced factor 2) ως άμεσο στόχο του miR-34a (129). Ο παράγοντας αυτός αποτελεί ένα σημαντικό στοιχείο για την οστεοκλαστική διαφοροποίηση.

Όσον αφορά το miR-124, είναι άφθονο στον εγκέφαλο και συνεισφέρει στη διαφοροποίηση των προγονικών νευρώνων σε ώριμους νευρώνες (122, 130). Επίσης, παίζει επίσης ρόλο στην οστεοκλαστογένεση. Η έκφρασή του ελαττώνεται με χρονοεξαρτώμενο τρόπο κατά την οστεοκλαστική διαφοροποίηση (131). Η αναστολή του ενισχύει την οστεοκλαστική διαφοροποίηση μέσω της έκφρασης του παράγοντα NFATc1, ο οποίος συμμετέχει στην οστεοκλαστογένεση. Είναι πιθανό ότι το miR-124 ρυθμίζει απευθείας την έκφραση του NFATc1. Πράγματι, οι Nakamachi *et al.* (2016), έδειξαν ότι ο NFATc1 αποτελεί άμεσο στόχο του miR-124, στις ανθρώπινες οστεοκλάστες, επομένως το miR-124 είναι πιθανό να σχετίζεται με την απώλεια του φατνιακού οστού και στην περιοδοντική νόσο (130).

Το miR-125a βρέθηκε επίσης αυξημένο σε ουλικό ιστό με περιοδοντική νόσο, συγκριτικά με ουλικό ιστό χωρίς περιοδοντική νόσο και επίσης, συμμετέχει στην οστεοκλαστογένεση. Έχει βρεθεί ότι το miR-125a ενεργοποιείται απευθείας από τον NF- $\kappa$ B και ότι η αναστολή του παρεμποδίζει την οστεοκλαστογένεση. Ωστόσο, οι Guo *et al.* (2014) ανέφεραν ότι η έκφραση του miR-125a είναι σε μεγάλο βαθμό μειωμένη κατά την οστεοκλαστογένεση των ανθρώπινων κυττάρων, έπειτα από τη δράση των M-CSF/RANKL (103). Ο TRAF6 (TNF receptor-associated factor 6), το κυριότερο υπόστρωμα του RANKL, βρέθηκε ότι είναι άμεσος στόχος του miR-125a. Επιπλέον, έδειξαν ότι ο παράγοντας NFATc1 που προαναφέρθηκε, προσδένεται στον προαγωγέα του miR-125a και αναστέλλει τη μεταγραφή του.

Συνοπτικά, φαίνεται ότι το miR-125a έχει κρίσιμο ρόλο στην διαφοροποίηση των οστεοκλαστών, παρόλο που υπάρχουν διαφωνίες μεταξύ των ερευνών, για τους ακριβείς μηχανισμούς δράσης του.

Το miR-146a, προέρχεται από το αντίστοιχο γονίδιο εξαρτώμενο από τον NF-κB και παίζει ρόλο στη φυσική ανοσία (122, 134, 145). Το ώριμο miR-146a είναι υψηλά εκφρασμένο στον ουλικό ιστό με περιοδοντική νόσο. Επίσης αναφέρθηκε ότι η έκφρασή του αυξάνεται κατά την TNF-a μεσολαβούμενη οστεοκλαστική διαφοροποίηση, ενώ χωρίς τη δράση του TNF-a, η έκφραση του miR-146a σταδιακά μειώνεται (122). Ωστόσο, η αύξηση αυτής της έκφρασης πάνω από ένα όριο, αναστέλλει τον οστεοκλαστικό σχηματισμό (101), επειδή πιθανόν το TRAF6 είναι άμεσο γονίδιο-στόχος του miR-146a (134), αλλά και άμεσο υπόστρωμα για τον RANKL, όπως έχει ήδη προαναφερθεί. Συνεπώς, από ένα σημείο και μετά, σε αυξημένα επίπεδα έκφρασης του miR-146a, δεν υπάρχει διαδέσιμο υπόστρωμα για τον RANKL, άρα ο ρυθμός της οστεοκλαστογένεσης ελαττώνεται. Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι η αυξημένη έκφραση του miR-146a, δεν επηρεάζει την παραγωγή των προφλεγμονωδών κυτοκινών, όπως των TNF-a και LPS, στα ανθρώπινα κύτταρα που προσομοιάζουν με τα μακροφάγα (148). Αυτές οι παρατηρήσεις καταδεικνύουν ότι το miR-146a μόνο του, δεν μπορεί να επάγει την παραγωγή προφλεγμονωδών κυτοκινών στα μακροφάγα, ενώ οι προφλεγμονώδεις αυτές κυτοκίνες, ενισχύουν την έκφραση του. Συνοπτικά, για το miR-146a, μπορούμε να πούμε πως φαίνεται να έχει έναν πολύ σημαντικό ρόλο στη φλεγμονώδη απόκριση του οργανισμού, ωστόσο η υπερβολική έκφρασή του, ίσως λειτουργεί ως αρνητικός ρυθμιστής της οστεοκλαστογένεσης.

Ένα ακόμη miRNA, το miRNA-155, είναι μόριο σχετιζόμενο με τη φλεγμονή, το οποίο ρυθμίζει τη φλεγμονή και τη λειτουργία των κυττάρων του ανοσοποιητικού, σε πολλαπλά επίπεδα (122, 149). Οι Mann *et al.* (2010) ανέφεραν ότι η έκφραση του miRNA-155 ελαττώνεται κατά την οστεοκλαστική διαφοροποίηση (150). Ειδικότερα, ανέφεραν ότι η έκφραση του miR-155 αναστέλλει τον οστεοκλαστικό σχηματισμό, καταστέλλοντας τα MITF και PU1, οι οποίοι είναι μεταγραφικοί παράγοντες σημαντικοί για την οστεοκλαστική διαφοροποίηση. Στη μελέτη των Kagiya *et al.* (2016) αντίθετα, αναφέρεται ότι τα επίπεδα έκφρασης του miRNA-155 σε μακροφάγα μυελού των οστών τρωκτικών, αυξάνονται με τη δράση των παραγόντων TNF-a/M-CSF/RANKL στα κύτταρα αυτά, δηλαδή σε φλεγμονώδεις συνθήκες, αλλά μειώνονται, με τη δράση των M-CSF/RANKL, κατά τον σχηματισμό των οστεοκλαστών, σε μη φλεγμονώδεις συνθήκες (151). Ωστόσο,

φάνηκε ότι η έκφραση του miRNA-155 δεν είχε στατιστικά σημαντική διαφορά, μετά από δράση του M-CSF/RANKL/TNF- $\alpha$  και των M-CSF/RANKL αντίστοιχα, στα ανθρώπινα CD14+ κύτταρα του περιφερικού αίματος, κατά την οστεοκλαστογένεση. Συμπερασματικά, από τις παραπάνω αναφορές, είναι εμφανές ότι το miRNA-155 διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο στην οστεοκλαστική διαφοροποίηση και πιθανόν η υποέκφρασή του δεν είναι απαραίτητη για την οστεοκλαστογένεση.

Το miRNA-223 επίσης, είναι ένα άλλο miR του οποίου η έκφραση έχει βρεθεί αυξημένη στον ουλικό ιστό με περιοδοντική νόσο, σε σχέση με τον ουλικό ιστό ελεύθερο νόσου. Το miRNA αυτό, εκφράζεται στα ανθρώπινα μονοκύτταρα, κοκκιοκύτταρα και αιμοπετάλια και είναι υπεύθυνο για τη διαφοροποίηση των κυττάρων του μυελού των οστών (122, 151). Οι οστεοκλάστες είναι κύτταρα τα οποία προέρχονται από τα πρόδρομα αιμοποιητικά κύτταρα του μυελού, από τη σειρά των μονοκυττάρων/μακροφάγων και το miRNA-223 φαίνεται να έχει μείζον ρόλο στη διαδικασία της διαφοροποίησης των οστεοκλαστών (122, 151). Έχει παρατηρηθεί ότι η έκφρασή του μειώνεται κατά την οστεοκλαστογένεση σε τρωκτικά (100, 122, 151). Συγκεκριμένα, το miR-223 ρυθμίζει τον παράγοντα NFI-A και την έκφραση του c-Fms, που είναι ο υποδοχέας του M-CSF, μόρια τα οποία έχουν κρίσιμο ρόλο στην οστεοκλαστική διαφοροποίηση και λειτουργία (139). Βρέθηκε ότι η αύξηση της έκφρασής του αναστέλλει την οστεοκλαστογένεση, ενώ η αναστολή του έχει το αντίθετο αποτέλεσμα (100). Παρόλα αυτά, η έκφρασή του δεν ήταν στατιστικά σημαντική κατά την ανθρώπινη οστεοκλαστογένεση και διαφοροποίηση. Σε άλλη έρευνα, των Moutoula *et al.* (2015), αναφέρθηκε ότι η υπερέκφρασή του ενισχύει την ανθρώπινη οστεοκλαστογένεση, ενώ η αναστολή του, έχει το αντίθετο αποτέλεσμα (140). Όπως φαίνεται, τα αποτελέσματα των διαφόρων ερευνών, σχετικά με το miR-223, είναι αντικρουόμενα, ωστόσο, αναμφίβολα, το μόριο αυτό έχει ενεργό ρόλο στην οστεοκλαστογένεση.

### 3. ΝΟΣΗΜΑΤΑ ΠΟΥ ΣΧΕΤΙΖΟΝΤΑΙ ΜΕ ΤΗΝ ΠΕΡΙΟΔΟΝΤΙΚΗ ΝΟΣΟ ΚΑΙ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ miRNAs

#### 3.1. ΠΕΡΙΟΔΟΝΤΙΚΗ ΚΑΙ ΚΑΡΔΙΑΓΓΕΙΑΚΗ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ: ΤΟ MIR-146 ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΧΡΟΝΙΑ ΠΕΡΙΟΔΟΝΤΙΤΙΔΑ ΜΕ ΚΑΙ ΧΩΡΙΣ ΣΤΕΦΑΝΙΑΙΑ ΝΟΣΟ

Η στεφανιαία νόσος είναι μια από τις πιο κοινές και σοβαρές αιτίες θανάτου στον πληθυσμό παγκοσμίως. Οι ερευνητές θεωρούν ότι υπάρχουν γενετικοί παράγοντες οι οποίοι επηρεάζουν την εξέλιξη της στεφανιαίας νόσου, όπως συμβαίνει και με τη χρόνια περιοδοντίτιδα. Παρόλα αυτά, το πεδίο αυτό δεν έχει ακόμα διερευνηθεί πλήρως. Θεωρείται ότι ένα από τα πιο σημαντικά εργαλεία για τη διερεύνησή του, είναι τα microRNAs (152). Οι λειτουργίες των microRNAs συνίστανται στη ρύθμιση της φλεγμονής, την απόπτωση και την αγγειογένεση, διαδικασίες που χαρακτηρίζουν το σχηματισμό της αθηρωματικής πλάκας και επομένως μπορεί να προκαλούν στεφανιαία νόσο (153). Συμμετέχουν επίσης στα περίπλοκα κυτταρικά σηματοδοτικά μονοπάτια, όπως στη φλεγμονώδη απόκριση, τα οποία επηρεάζουν την περιοδοντική νόσο (154). Ένα παράδειγμα είναι το miR-146, το οποίο βρίσκεται στο χρωμόσωμα 5q33.3 (155). Το miR-146 παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στη φυσική και επίκτητη ανοσιακή απόκριση των περιοδοντικών ιστών, κατά τη διέγερση από κυτοκίνες και από τους προσδέτες των υποδοχέων τύπου Toll, μετά από βακτηριακή λοίμωξη (134). Όσον αφορά στον καρδιακό ιστό, το miR-146a επηρεάζει πολλές διαδικασίες μείζονος σημασίας, όπως τους φλεγμονώδεις σηματοδοτικούς καταρράκτες και έχει βρεθεί αυξημένο στην αορτική και στη μηριαία πλάκα, όπως έχει ληφθεί από καρδιακούς ασθενείς (156). Το μόριο αυτό έχει βρεθεί ότι διαδραματίζει κάποιο ρόλο στην καρδιακή νόσο, όπως επίσης και στη χρόνια περιοδοντίτιδα ξεχωριστά, αλλά δεν είναι ακόμα ξεκάθαρο εάν αποτελεί έναν ειδικό και ευαίσθητο βιολογικό δείκτη, που συσχετίζει την καρδιαγγειακή νόσο με την χρόνια περιοδοντίτιδα.

Στη μελέτη των Yagnik *et al.* (2019), έγινε προσπάθεια να ταυτοποιηθούν και να ποσοτικοποιηθούν τα επίπεδα του miR-146a σε δείγματα υποουλικής πλάκας από ασθενείς με χρόνια περιοδοντίτιδα, με και χωρίς καρδιαγγειακή νόσο και να συγκριθούν με δείγματα υγιών ατόμων, σε έναν πληθυσμό από τη νότια Ινδία (152). Ποικίλες μεταβλητές συσχετίστηκαν με το miR-146a, όπως ηλικία, δείκτης σωματικής μάζας (BMI), περιοδοντικές παράμετροι όπως δείκτης πλάκας (PI), αιμορραγία κατά την ανίχνευση (BoP), βάθος θυλάκου (PPD) και επίπεδα κλινικής πρόσφυσης (CAL). Οι καρδιαγγειακές παράμετροι που καταγράφηκαν ήταν η ολική χοληστερόλη (TC), οι λιποπρωτεΐνες χαμηλής πυκνότητας (LDL), επίπεδα

τριγλυκεριδίων (TG) και η συστολική και διαστολική πίεση του αίματος (SBP και DBP). Τα δείγματα υποουλικής πλάκας συλλέχθηκαν με ξέστρα Gracey (Hu Friedy), από τους βαδύτερους περιοδοντικούς θυλάκους των ασθενών με χρόνια περιοδοντίτιδα, με και χωρίς καρδιαγγειακή νόσο, ενώ στους υγιείς τα δείγματα συλλέχθηκαν από την ουλοδοντική σχισμή. Ακολούθησε μοριακή ανάλυση. Τα δείγματα υποουλικής πλάκας υποβλήθηκαν σε real time αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (RT-PCR), για τον υπολογισμό της έκφρασης και της ποσοτικοποίησης του miR-146a (152). Σαν αποτέλεσμα αυτής της μελέτης προέκυψε ότι μεταξύ των ομάδων ασθενών με χρόνια περιοδοντίτιδα και με χρόνια περιοδοντίτιδα και καρδιαγγειακή νόσο, και όσον αφορά τις δημογραφικές, περιοδοντικές και καρδιαγγειακές παραμέτρους, για τα BMI, BOP, PPD, CAL, TC, LDL, HDL και TG βρέθηκε θετική συσχέτιση με τα επίπεδα του miRNA - 146a, στην ομάδα των ασθενών με χρόνια περιοδοντίτιδα και καρδιαγγειακή νόσο. Στην ομάδα των ασθενών με χρόνια περιοδοντίτιδα, τα BMI, BOP, PPD, CAL και TC βρέθηκαν θετικά συσχετισμένα με το miR-146a (152) (Πίνακας 4).

Μεταβλητές	Επίπεδα miRNA - 146a στην ομάδα CP+CHD		Επίπεδα miRNA - 146a στην ομάδα CP	
	Συσχέτιση	P	Συσχέτιση	P
Ηλικία	0.307	0.98 <sup>NS</sup>	0.41	0.831 <sup>NS</sup>
Δείκτης μάζας σώματος (BMI)	0.463	0.010	0.568	0.001
Εισόδημα	-0.39	0.836 <sup>NS</sup>	-0.363	0.048 <sup>a</sup>
PI	0.039	0.67 <sup>NS</sup>	0.353	0.056 <sup>NS</sup>
BOP(%)	0.679	0.00 <sup>a</sup>	0.651	0.00 <sup>a</sup>
PPD (mm)	0.740	0.00 <sup>a</sup>	0.870	0.00 <sup>a</sup>
CAL(mm)	0.720	0.00 <sup>a</sup>	0.850	0.00 <sup>a</sup>
TC (mg/dL)	0.691	0.00 <sup>a</sup>	0.541	0.002 <sup>a</sup>
HDL (mg/dL)	-0.567	0.001 <sup>a</sup>	-0.056	0.770 <sup>NS</sup>
LDL (mg/dL)	0.714	0.00 <sup>a</sup>	0.078	0.681 <sup>NS</sup>
TG (mg/dL)	0.618	0.00 <sup>a</sup>	0.340	0.066 <sup>NS</sup>
SBP (mm Hg)	0.059	0.757 <sup>NS</sup>	0.026	0.892 <sup>NS</sup>
DBP (mm Hg)	0.208	0.269 <sup>NS</sup>	0.115	0.544 <sup>NS</sup>

**Πίνακας 4.** Συσχέτιση όλων των μεταβλητών της ομάδας ασθενών με χρόνια περιοδοντίτιδα και καρδιαγγειακή νόσο (CP+CHD) και της ομάδας ασθενών με χρόνια περιοδοντίτιδα (CP), με τα επίπεδα του miR-146a (**Συντμήσεις:** BMI, body mass index= δείκτης μάζας σώματος, BOP, bleeding on probing=αιμορραγία κατά την ανίχνευση, CAL, clinical attachment level=επίπεδο κλινικής πρόσφυσης CHD, coronary heart disease=αρτηριακή καρδιακή νόσος, CP, chronic periodontitis=χρόνια περιοδοντίτιδα, DBP, diastolic blood pressure=διαστολική πίεση αίματος, HDL, high-density lipoprotein=λιποπρωτεΐνη υψηλής πυκνότητας, LDL, low-density lipoprotein=λιποπρωτεΐνη χαμηλής πυκνότητας, NS, not significant=όχι σημαντικό; PI, plaque index=δείκτης πλάκας, PPD, probing pocket depth=βάθος περιοδοντικού

δυλάκου, SBP, systolic blood pressure=συστολική πίεση αίματος, TC, total cholesterol=ολική χοληστερόλη, TG, triglyceride=τριγλυκερίδια \*P < 0.05).

Σε αυτή τη μελέτη, μεταξύ των διάφορων δημογραφικών παραμέτρων, μόνο ο δείκτης μάζας σώματος (BMI) έδειξε να διαφέρει στις τρεις ομάδες. Ο μέσος δείκτης μάζας σώματος των ασθενών με χρόνια περιοδοντίτιδα και καρδιαγγειακή νόσο, ήταν υψηλότερος από αυτόν της ομάδας ασθενών με χρόνια περιοδοντίτιδα μόνο και των υγιών ατόμων. Η υπόθεση γι' αυτό, όπως θα συζητηθεί παρακάτω, είναι το γεγονός ότι τα λιποκύτταρα εκκρίνουν προφλεγμονώδεις κυτοκίνες και γι' αυτό το λόγο μπορεί να δρα ως συνδετικός μηχανισμός για την παθογένεση των φλεγμονωδών νόσων, όπως της καρδιαγγειακής νόσου. Συνεπώς ο υψηλότερος δείκτης μάζας σώματος (BMI), μπορεί να δρα ως σύνδεσμος μεταξύ χρόνιας περιοδοντίτιδας και καρδιαγγειακής νόσου, κάτι που παρατηρήθηκε σε αυτή τη μελέτη (152). Έχει επίσης θεωρηθεί ότι πολλές παράμετροι της περιοδοντικής νόσου μπορεί να επηρεάζουν το συστηματικό κίνδυνο για ανάπτυξη και άλλων φλεγμονωδών νόσων. Τέτοιες παράμετροι μπορεί να είναι μικροβιακοί, κυτταρικοί και φλεγμονώδεις μηχανισμοί, οι οποίοι προκαλούν τα κλινικά συμπτώματα (157). Αυτές οι υποδόσκουσες φλεγμονώδεις συνθήκες μπορεί να εξηγήσουν την παθοβιολογία της χρόνιας περιοδοντίτιδας σε συσχέτιση με την αρτηριακή καρδιαγγειακή νόσο.

### 3.2. ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΗΣ ΠΕΡΙΟΔΟΝΤΙΤΙΔΑΣ ΜΕ ΟΞΥ ΣΤΕΦΑΝΙΑΙΟ ΣΥΝΔΡΟΜΟ: ΑΠΟΡΡΥΘΜΙΣΗ ΤΟΥ miR-146a ΑΠΟ ΤΑ ΠΕΡΙΟΔΟΝΤΙΚΑ ΠΑΘΟΓΟΝΑ

Σύμφωνα με την Μελέτη Παγκόσμιας Επιβάρυνσης Νόσων (Global Burden of Disease Study) (158) η περιοδοντική νόσος είναι η έκτη πιο συνήθης (11.2%) νόσος παγκοσμίως. Κάποια από τα αποτελέσματά της είναι η βακτηριαιμία, η ενδοτοξιναιμία και η συστηματική χαμηλού βαθμού φλεγμονή, συνθήκες που σχετίζονται με συστηματικές νόσους, όπως ο σακχαρώδης διαβήτης και η στεφανιαία νόσος, όπως και έχει αναφερθεί προηγούμενα (159). Η χρόνια φλεγμονή μπορεί να προκαλέσει οξύ στεφανιαίο σύνδρομο (ACS), καθώς διαδραματίζει έναν σπουδαίο ρόλο σε όλα τα στάδια του σχηματισμού αθηρωματικών πλακών, όπως επίσης προκαλεί και ρήξη της ινώδους κάψας γύρω από την αθηρωματική πλάκα (160). Συνεπώς, ο κίνδυνος ανάπτυξης στεφανιαίου συνδρόμου (ACS) εξαρτάται από την ισορροπία μεταξύ εξέλιξης και αναχαίτισης της φλεγμονής. Είναι η ευαισθησία του ξενιστή που επηρεάζεται από την απόκριση στο σχηματισμό του βιοϋμενίου και από ανοσοφλεγμονώδεις και γενετικούς παράγοντες. Μια δυσανάλογη, υπερβολική φλεγμονώδης απόκριση θα οδηγήσει σε χρονίως φλεγμονώδεις συνθήκες, όπου οι

κυτοκίνες, το οξειδωτικό στρες και οι επιγενετικοί παράγοντες παίζουν επίσης σημαντικό ρόλο. Ωστόσο, η επίδραση της φλεγμονής στο οξύ στεφανιαίο σύνδρομο χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση (2).

Ο ρόλος του *P. gingivalis* έχει εκτεταμένως διερευνηθεί, καθώς αυτό το παθογόνο εμπλέκεται σε πολλές συστημικές νόσους, συμπεριλαμβανομένης της αθηροσκλήρωσης (161). Έχει επίσης βρεθεί ότι ο *P. gingivalis* σχετίζεται με έναν αριθμό ικόν παραγόντων όπως τις φίμπριες, με φωσφατάσες της σερίνης (SerB), πρωτεάσες κυστεΐνης και ενδοτοξίνες, όπως οι λιποπολυσακχαρίτες (LPS). Η ενεργοποίηση των LPS-Toll-like Receptor οδηγεί σε μετατόπιση του παράγοντα NF-κB, στον πυρήνα και τελικά στην επαγωγή σχετιζόμενων με φλεγμονή γονιδίων (162). Το miR-146a έχει βρεθεί ότι παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της φυσικής ανοσιακής απόκρισης στη φλεγμονή (163). Επάγεται ως απάντηση στις κυτοκίνες και σε προϊόντα των παθογόνων, όπως οι λιποπολυσακχαρίτες (LPS), στα μακροφάγα και στα δενδριτικά κύτταρα. Επάγεται μέσω μεταγραφής από τον παράγοντα NF-κB, ως απάντηση στην ενεργοποίηση της φυσικής ανοσίας. Συγκεκριμένα ως επακόλουθο της επαγωγής του miR-146a, είναι η καταστολή γονιδίων που σχετίζονται με πρωτεΐνες οι οποίες εμπλέκονται στις φλεγμονώδεις αποκρίσεις, όπως οι TRAF6 και IRAK1, όπως επίσης και οι προφλεγμονώδεις κυτοκίνες, όπως οι TNF-α and IL-1β, μέσω του NF-κB σηματοδοτικού μονοπατιού, οδηγώντας τελικά σε αναστολή της ενεργοποίησης του NF-κB, μέσω ενός κύκλου αρνητικής ανατροφοδότησης (164). Συνεπώς, το miRNA-146a δρα ως αρνητικός ρυθμιστής της φλεγμονής (134).

Επιπλέον, το miR-146a έχει εμπλακεί στην παθογένεση πολλών άλλων φλεγμονωδών νόσων, όπως ο σακχαρώδης διαβήτης, η αθηροσκλήρωση, ο καρκίνος και η χρόνια περιοδοντίτιδα. Συγκεκριμένα, στη χρόνια περιοδοντίτιδα, το miR-146a έχει βρεθεί υπερεκφρασμένο (165). Η υπερέκφραση αυτή, μπορεί να οδηγεί στην πρόληψη, αλλά και στη θεραπεία της αθηροσκλήρωσης (166). Γι' αυτό το λόγο, το miR-146a πιθανόν να αποτελέσει έναν καινοτόμο θεραπευτικό δείκτη για το οξύ στεφανιαίο σύνδρομο (167).

Παρόλα αυτά, ο ρόλος του miR-146a ως σύνδεσμος μεταξύ της χρόνιας περιοδοντίτιδας και του οξέος στεφανιαίου επεισοδίου, δεν έχει ακόμη πλήρως διερευνηθεί. Η μελέτη των Bagavad Gita *et al.* (2019), στοχεύει να αξιολογήσει τη σχετική έκφραση των επιπέδων του miRNA-146a σε ασθενείς με οξύ στεφανιαίο σύνδρομο, με και χωρίς χρόνια περιοδοντίτιδα, όπως επίσης και να κατανοήσει το



ρυθμιστικό ρόλο του miR-146a στην ανοσιακή απόκριση στη φλεγμονή, στους ασθενείς με χρόνια περιοδοντίτιδα και οξύ στεφανιαίο σύνδρομο (168). Η μελέτη αυτή έδειξε ότι υπήρξε μια στατιστικά σημαντική αύξηση στα επίπεδα των miRNA-146a, TNF-a, IL-6 και IL-16 στους ασθενείς με οξύ στεφανιαίο σύνδρομο και χρόνια περιοδοντίτιδα ( $p < 0.01$ ). Γι' αυτό τον λόγο, η μελέτη αυτή εδραιώνει τον ρόλο του miRNA-146a στη συσχέτιση της χρόνιας περιοδοντίτιδας, με το οξύ στεφανιαίο σύνδρομο. Μπορεί επίσης να θεωρηθεί και ως ένας πιθανός βιοχημικός δείκτης του ορού, στις φλεγμονώδεις συνθήκες, σχετιζόμενες με χρόνια περιοδοντίτιδα και οξύ στεφανιαίο σύνδρομο, σε ένα υπόβαθρο συννοσηροτήτων, όπως το κάπνισμα και ο σακχαρώδης διαβήτης (168).

### 3.3. ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΗΣ ΠΕΡΙΟΔΟΝΤΙΚΗΣ ΝΟΣΟΥ ΚΑΙ ΤΟΥ ΣΑΚΧΑΡΩΔΟΥΣ ΔΙΑΒΗΤΗ: ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ miR-223, miR-203 ΚΑΙ miR-200b ΣΕ ΠΕΡΙΟΔΟΝΤΙΚΟΥΣ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΚΑΙ ΧΩΡΙΣ ΣΑΚΧΑΡΩΔΗ ΔΙΑΒΗΤΗ

Ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2 είναι μια μακροχρόνια μεταβολική διαταραχή, η οποία επηρεάζει τη φλεγμονώδη απόκριση, την αγγειογένεση και την επιδιόρθωση/επούλωση των ιστών (169). Αποτελεί μια από τις μείζονες αιτίες της ενήλικης θνησιμότητας και έχει βρεθεί ότι η σχέση του με την περιοδοντική νόσο είναι αμφίδρομη (170). Η μελέτη των Elazazy *et al.* (2021) στοχεύει στο να αξιολογήσει τη σχέση των επιπέδων έκφρασης των miR-223, miR-203 και miR-200b, στον ορό και στο ουλικό υγρό της ουλοδοντικής σχισμής, σε ασθενείς με χρόνια περιοδοντίτιδα, με και χωρίς σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 (171). Αυτή η μελέτη είναι η πρώτη που συσχετίζει τα επίπεδα έκφρασης των miRNA στο ουλικό υγρό και στον ορό, με τις κλινικές παραμέτρους και επίσης με τα μόρια TNF-a και IL-10. Τα επίπεδα του TNF-a βρέθηκαν αυξημένα στην ομάδα των ασθενών, σε σχέση με την ομάδα των υγιών (172, 173), ενώ τα επίπεδα του αντιφλεγμονώδους IL-10, ήταν χαμηλότερα στην ομάδα των ασθενών σε σχέση με την ομάδα των υγιών (174). Τα επίπεδα αυτών των κυτοκινών αντανακλούν την παρουσία συστημικής φλεγμονής, στην ομάδα των ασθενών (175).

Το miR-223 βρέθηκε ότι ήταν υπερεκφρασμένο στον ορό και στο ουλικό υγρό των ασθενών με χρόνια περιοδοντίτιδα με σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2, συγκριτικά με την ομάδα ασθενών με χρόνια περιοδοντίτιδα χωρίς σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 και την ομάδα ελέγχου (υγιών) και συγκεκριμένα, βρέθηκε περισσότερο αυξημένο στο ουλικό υγρό (GCF) σε σχέση με τον ορό (171). Επομένως, μπορεί να χρησιμοποιηθεί

ως διαγνωστικός βιοχημικός δείκτης για τη διαφορική διάγνωση μεταξύ των ασθενών με περιοδοντική νόσο και σακχαρώδη διαβήτη και ασθενών μόνο με περιοδοντική νόσο (171, 176, 177). Επιπλέον, βρέθηκε ότι το miR-223 παρουσιάζει μια θετική συσχέτιση με τον παράγοντα TNF-a, καθώς και με κλινικές παραμέτρους στην ομάδα των ασθενών με χρόνια περιοδοντίτιδα, συμμετέχοντας έτσι στη φλεγμονή, στην επιστράτευση ουδετερόφιλων και στην παθογένεση της χρόνιας περιοδοντίτιδας (177). Το miR-223 αποτελεί έναν μείζονα ρυθμιστή της φυσικής ανοσίας και φυσιολογικά, συμμετέχει στην ομοίωση των ιστών, στη διαφοροποίηση των κυττάρων του ανοσοποιητικού, όπως επίσης επηρεάζει και την ενεργοποίηση των μονοπατιών της κοκκιοποίησης, της αιμοποίησης και της έκδεσης λιποπολυσακχαριτών (LPS) (178), ενώ βρίσκεται υποεκφρασμένο σε φλεγμονώδεις συνθήκες. Γι' αυτό το λόγο παίζει έναν σημαντικό ρόλο στα πρώιμα στάδια της λοίμωξης και της φλεγμονής. Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι το miR-223 σχετίζεται με τον έλεγχο της διαφοροποίησης των οστεοβλαστών και μαζί με το miR-214 και το miR-338, αναστέλλει την οστεογένεση, επάγοντας την απόπτωση των οστεοβλαστών και ταυτόχρονα διεγείροντας τη διαφοροποίηση των οστεοκλαστών, δρώντας στον πυρηνικό παράγοντα 1-A (NF1-A). Γι' αυτό το λόγο, τα αυξημένα επίπεδά του στη χρόνια περιοδοντίτιδα, παίζουν σημαντικό ρόλο στην απώλεια του φατνιακού οστού (179). Αντίθετα, σε άλλες μελέτες, το miR-223 βρέθηκε υποεκφρασμένο στον διαβήτη τύπου 2, σαν αποτέλεσμα της δράσης των τελικών προϊόντων υψηλής γλυκοζυλίωσης, μια διαδικασία που επίσης προκαλεί την απόπτωση των οστεοβλαστών και των ενδοθηλιακών κυττάρων (179).

Όσον αφορά το miR-203, βρέθηκε ότι η έκφρασή του ήταν χαμηλότερη μεταξύ όλων των ομάδων ασθενών, στον ορό και στο ουλικό υγρό. Επίσης, η χαμηλή αυτή έκφρασή του, προκαλεί αύξηση των επιπέδων του TNF-a. Φαίνεται δηλαδή ότι έχει αρνητική συσχέτιση με τον TNF-a. Μια από τις λειτουργίες του miR-203, μεταξύ άλλων, σχετιζόμενη με τα κερατινοκύτταρα, είναι ότι αποτελεί έναν σημαντικό ρυθμιστή των λειτουργιών των ειδικών για την επούλωση κυττάρων και του δικτύου των κυτοκινών που σχετίζονται με την επούλωση (9, 180, 181). Θεωρείται ότι τα χαμηλότερα επίπεδα του miR-203 στους περιοδοντικούς φλεγμονώδεις ιστούς, αυξάνουν την αγγειογένεση και την εξέλιξη της φλεγμονής, ενώ στους υγιείς ιστούς και σε φυσιολογικά επίπεδα έκφρασης, δρα στον αγγειακό ενδοθηλιακό αυξητικό παράγοντα a (VEGF-a) και αναστέλλει την αγγειογένεση (182). Συνεπώς, η χαμηλότερη έκφραση του miR-203 σε περιοδοντικούς ασθενείς και η αρνητική συσχέτισή του με τον TNF-a, προωθεί τη μειωμένη επούλωτική διαδικασία, και γι' αυτό, ορίζει την μη αντιστρεπτή ιστική καταστροφή, στην περιοδοντική νόσο.

Συμπερασματικά, λόγω αυτής της αρνητικής συσχέτισης που παρουσιάζει με τον TNF-a, έχει προταθεί ότι το miR-203 σε αυξημένα επίπεδα, μπορεί να έχει προστατευτικό ρόλο στη χρόνια περιοδοντίτιδα και πιθανόν υπάρχει η δυνατότητα να χρησιμοποιηθεί σαν θεραπευτικό μόριο στην προαγωγή της επούλωσης. Τέλος, το miR-203 αποτελεί έναν ειδικό δείκτη, ο οποίος μπορεί να διαφοροδιαγνώσει τους περιοδοντικούς ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 και τους περιοδοντικούς ασθενείς χωρίς διαβήτη, από τους υγιείς (171, 182, 183), καθώς τα επίπεδά του ήταν μειωμένα και στις δύο ομάδες των ασθενών.

Το miRNA-200b αντίθετα, βρέθηκε υπερεκφρασμένο τόσο στον ορό, όσο και στο ουλικό υγρό και των δυο ομάδων ασθενών, αλλά σε υψηλότερα επίπεδα στην ομάδα των ασθενών με περιοδοντίτιδα και σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2. Συνεπώς και το miRNA αυτό, όπως και το miR-223, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη διαφοροδιάγνωση μεταξύ των ασθενών με περιοδοντίτιδα και των ασθενών με συννοσηρότητα περιοδοντίτιδας και σακχαρώδους διαβήτη (171, 176, 177). Συγκεκριμένα, η μελέτη αυτή έδειξε μια θετική συσχέτιση με τον παράγοντα TNF-a και αρνητική συσχέτιση με την IL-10, στην ομάδα ασθενών με χρόνια περιοδοντίτιδα και σακχαρώδη διαβήτη. Έχει αναφερθεί ότι το miRNA-200b επάγεται από κυτοκίνες σε φλεγμονώδεις συνθήκες και γι' αυτό το λόγο, ίσως συμμετέχει σε οποιαδήποτε φλεγμονώδη νόσο (184). Επιπρόσθετα, θεωρείται ότι τα υψηλότερα επίπεδα του miRNA-200b σχετίζονταν με τον αυξημένο ρυθμό απόπτωσης των β-παγκρεατικών κυττάρων (185), κάτι που καταδεικνύει ότι το miRNA-200b εμπλέκεται περισσότερο στην παθογένεση του διαβήτη. Επίσης, το miRNA-200b δρα στον αγγειακό ενδοθηλιακό αυξητικό παράγοντα (VEGF) και προωθεί την αύξηση της αγγειογένεσης και της αγγειακής διαπερατότητας. Αυτό το γεγονός εξηγεί την υπερέκφρασή του σε φλεγμονώδεις συνθήκες (186). Τα παραπάνω αποτελέσματα συνοψίζονται στον ακόλουθο πίνακα (Πίνακας 5).

miRNAs	Χρόνια περιοδοντίτιδα και σακχ. διαβήτη τύπου 2	Χρόνια περιοδοντίτιδα	Ομάδα ελέγχου
MiR-223	Αυξημένη ρύθμιση	Αυξημένη ρύθμιση	Φυσιολογικό
Αποτέλεσμα	Αύξηση TNF-a Μείωση IL-10, οστεογένεσης	Αύξηση TNF-a, οστεοκλαστογένεσης, απώλεια οστού Μείωση IL-10, οστεογένεσης	Μείωση TNF-a Αύξηση IL-10
MiR -203	Μειωμένη ρύθμιση	Μειωμένη ρύθμιση	Φυσιολογικό
Αποτέλεσμα	Αύξηση αγγειογένεσης Μείωση TNF-a & επούλωσης	Αύξηση αγγειογένεσης Μείωση TNF-a & επούλωσης	Αναστολή αγγειογένεσης Αύξηση TNF-a
MiR-200b	Αυξημένη ρύθμιση	Αυξημένη ρύθμιση	Φυσιολογικό

Αποτέλεσμα	Αύξηση TNF-a, β-cell απόπτωσης, αγγειογένεσης, αγγειακής διαπερατότητας	Αύξηση TNF-a	Μείωση TNF-a Αύξηση IL-10
------------	---	--------------	------------------------------

**Πίνακας 5.** Επίπεδα έκφρασης και αποτελέσματα των miRNAs που σχετίζονται με τη χρόνια περιοδοντίτιδα και τον σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2, στην ομάδα των ασθενών συγκρινόμενη με την ομάδα ελέγχου.

Τα επίπεδα έκφρασης των miR-223, miR-203 και miR-200b στους ασθενείς με χρόνια περιοδοντίτιδα, με και χωρίς σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 καταδεικνύουν ότι τα μόρια αυτά αποτελούν πολλά υποσχόμενους βιοχημικούς δείκτες του ορού, οι οποίοι μπορεί να ρίξουν φως στους μοριακούς μηχανισμούς και στην παθοφυσιολογία της χρόνιας περιοδοντίτιδας, αλλά και στις συστημικές επιπλοκές της, όπως ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2.

### 3.4. ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΗΣ ΠΕΡΙΟΔΟΝΤΙΚΗΣ ΝΟΣΟΥ ΚΑΙ ΤΟΥ ΛΙΠΩΔΟΥΣ ΙΣΤΟΥ: ΑΝΤΙΦΛΕΓΜΟΝΩΔΗΣ ΕΠΙΠΤΩΣΗ ΤΟΥ miR-146a ΕΠΑΓΟΜΕΝΗ ΣΕ ΛΙΠΩΔΗ ΙΣΤΟ ΚΑΙ ΣΤΟΥΣ ΠΕΡΙΟΔΟΝΤΙΚΟΥΣ ΙΣΤΟΥΣ

Η παχυσαρκία θεωρείται μια πολυπαραγοντική, χρόνια νόσος, που καθορίζεται από γενετικούς αλλά και περιβαλλοντικούς παράγοντες (187). Θεωρείται επίσης ότι ενισχύει τον κίνδυνο άλλων χρόνιων παθήσεων, με υψηλό ποσοστό θνησιμότητας, όπως η στεφανιαία νόσος και ο καρκίνος. Η παχυσαρκία επηρεάζει τον συστημικό μεταβολισμό και συμμετέχει σε φλεγμονώδεις αποκρίσεις. Επιπλέον, προκαλεί χαμηλού βαθμού φλεγμονώδεις συνθήκες και ενισχύει την περιοδοντική φλεγμονή (188, 189). Ερευνητικές μελέτες σε ανθρώπους και ζώα, καταδεικνύουν ότι υπάρχει ένας σύνδεσμος μεταξύ περιοδοντικής νόσου και παχυσαρκίας (190, 191). Φλεγμονώδεις αποκρίσεις όπως η παραγωγή του TNF-a, η οποία προκαλείται από τον λιπώδη ιστό, θεωρείται ότι ενισχύει τη χαμηλού βαθμού φλεγμονή, η οποία με τη σειρά της δρα ως επιβαρυντικός παράγοντας για τη φλεγμονή γενικότερα και ειδικότερα, για άλλες φλεγμονώδεις νόσους και συνεπώς και για την περιοδοντική νόσο. Η έκφραση πολλών miRNAs έχει βρεθεί αυξημένη, σε φλεγμονώδη ούλα παχύσαρκων ασθενών, συγκρινόμενα με αυτά υγιών ατόμων (192). Παρατηρήθηκε έκφραση του miRNA – 146a στον λιπώδη ιστό και στους περιοδοντικούς ιστούς, σε συνθήκες φλεγμονής. Η έκφρασή του βρέθηκε αυξημένη στο λιπώδη ιστό. Επίσης, το miRNA – 146a βρέθηκε εκφρασμένο και στα λιποκύτταρα και στους ινοβλάστες που προέρχονται από μακροφάγα, μετά από φλεγμονώδη διέγερση. Παρατηρήθηκε ότι η έκφρασή του αυτή, προκάλεσε μειωμένη ρύθμιση της έκφρασης φλεγμονωδών κυτοκινών (193). Επιπλέον, παρατηρήθηκε θετική συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης

των επιπέδων του miRNA – 146a και κλινικών περιοδοντολογικών παραμέτρων, όπως το βάθος του περιοδοντικού θυλάκου (165). Συγκεκριμένα, στη μελέτη των Sanada *et al.* (2020), τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η μετάθεση του miRNA – 146a στα λιποκύτταρα, στους ινοβλάστες των ούλων και στα μακροφάγα, καταστέλλει την έκφραση των γονιδίων που επάγουν τη φλεγμονή. Ειδικότερα, το miRNA – 146a, καταστέλλει την έκφραση των IRAK1 και TRAF6, τα οποία είναι σηματοδοτικά μόρια που μεσολαβούν στη σηματοδότηση του TNF-a, ο οποίος είναι παράγοντας που επάγει τη φλεγμονή (194). Τα μόρια IRAK1 και TRAF6 είναι μόρια –στόχοι για το miRNA – 146a, όπως επίσης και για το ομόλογό του, miRNA-146b (134). Η φωσφορυλίωση και τελικά ενεργοποίηση του IRAK1, προκαλεί τη σύνδεση του μορίου με το TRAF6 και αυτή η διαδικασία ενεργοποιεί τη MAP κινάση (JNK, p38 MAPK), όπως επίσης και τα σηματοδοτικά μονοπάτια του NF-Kb, που τελικά οδηγούν σε φλεγμονή και περιοδοντική καταστροφή (195). Επομένως, η μετάθεση του miRNA – 146a στα μακροφάγα, ινοβλάστες και λιποκύτταρα, προκαλεί αρνητική ρύθμιση των IRAK1 και TRAF6, η οποία καταλήγει σε μειωμένη JNK φωσφορυλίωση και συνεπώς μειωμένη ενδοκυτταρική δράση του TNF-a. Με αυτόν τον τρόπο, το miRNA – 146a παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της φλεγμονώδους απόκρισης του οργανισμού. Επιπλέον, η υπερέκφραση του miRNA – 146a έχει βρεθεί ότι καταστέλλει το σχηματισμό αφρωδών λιποκυττάρων και την παραγωγή κυτοκινών (166). Τέλος, σε αυτή τη μελέτη, με περαιτέρω έγχυση miRNA – 146a, παρατηρήθηκε αρνητική ρύθμιση της φλεγμονώδους απόκρισης σε λιπώδη και ουλικό ιστό, *in vivo*. Γι' αυτό το λόγο, αυτή η διαδικασία που μεσολαβείται από το miRNA – 146a, ίσως έχει επίδραση στη μακροπρόθεσμη ανοσιακή ρύθμιση, σε νόσους με φλεγμονώδες υπόβαθρο, όπως η παχυσαρκία και η περιοδοντική νόσος (194).

## 4. Η ΜΗΧΑΝΙΚΗ ΤΩΝ ΙΣΤΩΝ ΚΑΙ ΤΑ miRNAs

### 4.1. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΕΞΩΚΥΤΤΑΡΙΩΝ miRNAs ΚΑΙ ΤΑ ΕΞΩΣΩΜΑΤΑ

Μέχρι σήμερα, θεωρείτο ότι τα miRNAs δρουν μόνο μέσα στο κύτταρο στο οποίο παράγονται. Ωστόσο, πρόσφατα δείχθηκε ότι miRNAs είναι παρόντα σε διάφορα σωματικά υγρά, όπως στον σίελο, τον ορό, τα ούρα και το εγκεφαλονωτιαίο υγρό (196), έχοντας την ικανότητα να διατηρούνται σταθερά στα εξωκυττάρια υγρά, λόγω του πακεταρίσματός τους (197-199), προσδεμένα σε λιπίδια και πρωτεΐνες, ή έγκλειστα, μέσα σε κυτταρικά σωματίδια, τα εξωσώματα. Επομένως, διαχωρίζονται σε δυο βασικές κατηγορίες: α) Τα miRNAs σχετιζόμενα με κυστίδια και τα μη σχετιζόμενα με κυστίδια (122, 196, 200). Τα μόρια αυτά όπως έχουμε ήδη αναφέρει, θεωρούνται ως πιθανοί βιοχημικοί δείκτες, αλλά και θεραπευτικοί στόχοι για τις διάφορες ασθένειες και παθολογικές καταστάσεις. Στην οικογένεια των σχετιζόμενων με κυστίδια, τα miRNAs βρίσκονται σε εξωσώματα και μικροκυστίδια. Στην οικογένεια των μη σχετιζόμενων με κυστίδια, τα miRNAs βρίσκονται σε σύμπλοκα με τις πρωτεΐνες Ago, με υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες και άλλες πρωτεΐνες (196, 201).

Τα εξωσώματα είναι μικρά λιπιδικά σωματίδια (δομή «σαπουνόφουσκας»), 30–150 nm, που απελευθερώνονται φυσιολογικά από τα περισσότερα κύτταρα και εκκρίνουν στον εξωκυττάριο χώρο, προϊόντα ενδοκυττάριας προέλευσης (202). Πρόσφατες έρευνες έδειξαν ότι τα εξωσώματα διαδραματίζουν ρόλο στην κυτταρική επικοινωνία, με τη μεταφορά mRNAs, miRNAs, πρωτεϊνών και λιπιδίων, μεταξύ των κυττάρων (196, 203-205). Η έκκριση των εξωσωμάτων εξαρτάται από τον κυτταρικό τύπο και τις βιολογικές συνθήκες (122, 196, 206).

Τα εξωσωμικά miRs κυκλοφορούν σε όλο το σώμα και μεταφέρουν πληροφορίες μεταξύ των κυττάρων, όπως επίσης προκαλούν και αλλαγές στη γονιδιακή έκφραση, καθώς μπορούν να ενδοκυτταρώνονται από άλλα κύτταρα. Επομένως, τα εξωσώματα αποτελούν έναν μηχανισμό τόσο ενδοκυττάριας όσο και εξωκυττάριας επικοινωνίας. Ανιχνεύονται είτε στο πλάσμα, είτε στον ορό, είτε στο σίελο. Έχειδειχθεί ότι τα εξωσώματα παίζουν ρόλο στη φλεγμονή, σε νοσήματα του ανοσοποιητικού και σε νεοπλασματικές ασθένειες της στοματικής κοιλότητας και όχι μόνο, όπως επίσης και στο σύνδρομο *Sjogren*, στον συστηματικό ερυθηματώδη λύκο (ΣΕΛ), στο καρκίνωμα εκ πλακωδών κυττάρων και στην περιοδοντίτιδα. Είναι επόμενο ότι γι' αυτούς τους λόγους αιχμαλώτισαν το ενδιαφέρον των ερευνητών, καθώς μπορούν να έχουν κλινική εφαρμογή στην αναγέννηση των ιστών, στη στοχευμένη θεραπεία και στην έρευνα των βιοχημικών δεικτών (207, 208). Σε

πολλές μελέτες έχει διερευνηθεί ο ρόλος των εξωσωμάτων στην αναγέννηση του οστού, στο κατεστραμμένο περιοδόντιο. Έδειξαν μια βελτίωση στην περιοδοντική κατάσταση, προσδιοριζόμενη από την ενεργοποίηση του μονοπατιού Wnt/ $\beta$ -κατενίνης, που επάγει την αγγειογένεση (209). Επομένως, σύμφωνα με τους Wang *et al.*(2019), τα εξωσώματα μπορεί να έχουν προφλεγμονώδεις ή αντιφλεγμονώδεις δράσεις, εξαρτώμενες από το μεταφερόμενο περιεχόμενο (210). Έχει δειχθεί επίσης ότι η θεραπεία με εξωσώματα βελτιώνει σημαντικά την αναγέννηση του οστού και των περιοδοντικών ιστών γενικότερα. Σχετικά με αυτό, έχει παρατηρηθεί μια δοσοεξαρτώμενη επίδραση. Για να βελτιωθεί ωστόσο η εφαρμογή των εξωσωμάτων για θεραπευτικούς σκοπούς, οι μελλοντικές έρευνες χρειάζεται να επικεντρωθούν στις πηγές των εξωσωμάτων (16).

#### 4.2. ΕΞΩΣΩΜΙΚΑ miRNAs ΚΑΙ ΟΣΤΕΟΚΛΑΣΤΟΓΕΝΕΣΗ: ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΗΣ ΠΕΡΙΟΔΟΝΤΙΚΗΣ ΝΟΣΟΥ

Παρόλο που οι διάφορες μελέτες έχουν δείξει ότι τα miRNAs παίζουν σημαντικό ρόλο στον μεταβολισμό των οστών, συμπεριλαμβανομένου του φατνιακού οστού, το αν τα κύτταρα που συμμετέχουν στον οστικό μεταβολισμό, όπως οι οστεοκλάστες, εκκρίνουν εξωσώματα τα οποία περιέχουν miRNAs, ήταν μέχρι πρόσφατα άγνωστο.

Στη μελέτη των Kagiya *et al.* (2016) (151), εξετάστηκαν οκτώ μόρια miRNA, τα οποία έχουν βρεθεί εντός των εξωσωμάτων και φαίνεται να έχουν σημαντικό ρόλο για την οστεοκλαστική διαφοροποίηση. Σε αυτά συμπεριλαμβάνονται τα let-7e, miR-21, miR-33, miR-155, miR-210, miR-223, miR-378, και miR-1224. Από τα μόρια αυτά, η έκφραση των miR-378, miR-21 και miR-210, ήταν πολύ υψηλή, ενώ δεν ανιχνεύθηκε σημαντική έκφραση των miR-33 και miR-1224 (122, 211). Τα αποτελέσματα αυτά έδειξαν ότι οι οστεοκλάστες εκκρίνουν εξωσώματα τα οποία περιέχουν συγκεκριμένα miRNAs, αλλά όχι το πλήρες σύνολο των ενδοκυτταρικών miRs. Μεταξύ των miRs που περιέχονται στα εξωσώματα των οστεοκλαστών, σε υψηλό επίπεδο έκφρασης βρέθηκε το miR-378, το οποίο έχει βρεθεί επίσης υπερεκφρασμένο στον ορό των ασθενών με καρκίνο του μαστού με οστικές μεταστάσεις, σε συνθήκες δηλαδή πολύ αυξημένης οστεολυτικής δραστηριότητας, συγκρινόμενο με τον ορό υγιών ατόμων (133). Όλες οι παραπάνω παρατηρήσεις, συνολικά, ενισχύουν την άποψη ότι το miR-378 μπορεί να θεωρηθεί ως υποψήφιος βιοχημικός δείκτης για την απώλεια του φατνιακού οστού και στην περιοδοντική νόσο.

Επιπρόσθετα, οι Alexander *et al.* (2015) ανέφεραν ότι δυο κρίσιμα miRs που ρυθμίζουν τη φλεγμονή, τα miR-146a και miR-155, εκκρίνονται μέσα σε εξωσώματα, από δενδριτικά κύτταρα και λαμβάνονται από δενδριτικά κύτταρα επίσης (212). Αυτή η παρατήρηση καταδεικνύει ότι τα miRs μέσω των εξωσωμάτων, μπορούν να μεταφερθούν μεταξύ των κυττάρων του ανοσοποιητικού, στους περιοδοντικούς ιστούς. Επομένως, σύμφωνα με τα παραπάνω, τα εξωσωμικά αυτά miRs, σχετίζονται με την απώλεια του φατνιακού οστού στην περιοδοντική νόσο. Γι' αυτό το λόγο, πιθανόν αντιπροσωπεύουν υποψήφιους βιοχημικούς δείκτες του ορού και του σιέλου, για την περιοδοντική νόσο. Και εφόσον τα εξωσώματα μεταφέρονται μεταξύ των κυττάρων, στους περιοδοντικούς ιστούς, μπορεί να χρησιμοποιηθούν ως θεραπευτικοί στόχοι και ως συστήματα διοχέτευσης φαρμάκων, πακεταρισμένα με συγκεκριμένα miRNAs, mRNAs και πρωτεΐνες, όπως θα δούμε παρακάτω. Ωστόσο και γι' αυτό το πεδίο, χρειάζεται περαιτέρω έρευνα.

#### 4.3. ΕΞΩΣΩΜΙΚΑ miRNAs ΚΑΙ ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗ: ΑΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΤΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΤΟΥ ΠΟΛΦΟΥ ΕΚΚΡΙΝΟΥΝ ΕΞΩΣΩΜΙΚΑ miRNAs ΚΑΙ ΕΝΙΣΧΥΟΥΝ ΤΗΝ ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗ ΤΟΠΙΚΑ

Μια από τις πιο ενδιαφέρουσες παρατηρήσεις των πιο πρόσφατων ερευνών, είναι ότι τα αδιαφοροποίητα μεσεγχυματικά κύτταρα του πλφού (Dental pulp stem cells (DPSCs)), μπορούν να χρησιμοποιηθούν στη μηχανική των ιστών (tissue engineering), τόσο για ερευνητικούς όσο και για θεραπευτικούς σκοπούς.

Στο πείραμα των Zhou *et al.* (2010), μελετήθηκαν τα αδιαφοροποίητα μεσεγχυματικά κύτταρα του οδοντικού πλφού (dental pulp stem cells (DPSCs)), από δόντια με περιοδοντική νόσο (Periodontal-compromised dental pulp stem cells (P-DPSCs)), ως ένας πιο αξιολογήσιμος πληθυσμός κυττάρων, που απομονώθηκε από απορριπτέα δόντια (213, 214). Τα κύτταρα αυτά, φαίνεται να έχουν μια αναγεννητική ικανότητα, παρόμοια με αυτή των αδιαφοροποίητων κυττάρων του πλφού από υγιή δόντια (Healthy dental pulp stem cells (H-DPSCs)), κάτι το οποίο είχε φανεί στην προηγούμενη μελέτη τους (214). Σε αυτό το πείραμα, χρησιμοποιήθηκαν εξωσωμικά κυστίδια (Extracellular Vesicles, EVs), τα οποία είναι νανοσωματίδια εκκρινόμενα από κύτταρα. Αποτελούνται από μια λιπιδική διπλοστιβάδα, εντός της οποίας περικλείονται διάφορα μόρια, όπως, πρωτεΐνες, mRNAs, miRNAs, λιπίδια κλπ. Μεταξύ αυτών των συστατικών, τα miRNAs είναι αυτά που κατέχουν τον πιο σημαντικό ρόλο. Τα κυστίδια αυτά, όπως αναφέρθηκε και στην προηγούμενη ενότητα, χρησιμοποιούνται στη διακυτταρική επικοινωνία, μεταφέρονται από κύτταρο σε κύτταρο και έτσι



επιτυγχάνεται η ανταλλαγή συστατικών και μορίων μεταξύ των κυττάρων. Με αυτόν τον τρόπο εν τέλει, επηρεάζεται και η βιολογική λειτουργία των κυττάρων (215, 216).

Τα εξωκυτταρικά κυστίδια (EVs) που εκκρίνονται από τα H- DPSCs (H-EVs), έχει βρεθεί ότι συμμετέχουν στο σχηματισμό των αγγείων και ότι διευκολύνουν την αγγείωση (217). Στη μελέτη των Zhou *et al.*(2021), όπως προαναφέρθηκε, διερευνήθηκε περαιτέρω η ικανότητα για αγγειογένεση, των EVs που εκκρίνονται από τα P-DPSCs (P-EVs) και επιβεβαιώθηκε ότι τα εξωσωμικά κυστίδια των αδιαφοροποίητων κυττάρων του πολφού περιοδοντικών δοντιών, ενισχύουν την μετανάστευση, τον πολλαπλασιασμό και την αγγειογένεση σε ενδοθηλιακά κύτταρα *in vitro* και συνεπακόλουθα, επιταχύνουν την επούλωση και την αγγειογένεση *in vivo* (214). Το πιο σημαντικό εύρημα όμως, ήταν ότι τα P- EVs, έδειξαν να έχουν ένα πιο ενισχυμένο δυναμικό αγγειογένεσης, σε σχέση με τα H-EVs, τα οποία προέρχονται από τα υγιή αδιαφοροποίητα κύτταρα του πολφού H-DPSCs, αντίστοιχα. Ωστόσο, ο ακριβής μηχανισμός ο οποίος οδηγεί σε αυτό το εύρημα, χρειάζεται να διερευνηθεί (218, 219).

Κάποια από τα miRNAs που βρέθηκαν εντός των EVs αυτών, είναι τα ακόλουθα: miR-29a, miR-423-5p και miR-181b-5p. Τα miRs αυτά, παρουσίασαν δυναμικό αγγειογένεσης και επομένως ικανότητα να προάγουν τη διαδικασία αυτή. Συνεπώς, στη μελέτη αυτή των Zhou *et al.* (2020) έγινε η υπόθεση ότι η ικανότητα αγγειογένεσης που παρουσίασαν τα P- EVs, οφείλεται στα συγκεκριμένα miRNAs τα οποία περιέχονται εντός αυτών και τα οποία μπορούν μέσω των κυστιδίων να μεταφερθούν στα ενδοθηλιακά κύτταρα και να ρυθμίσουν σε αυτά την αγγειογένεση (218, 219). Ειδικότερα, ελέγχθηκε η διαφορική έκφραση των miRNAs ανάμεσα στα H-EVs και στα P- EVs και έπειτα, ταυτοποιήθηκαν τα γονίδια-στόχοι των miRNAs αυτών, ώστε να διερευνηθούν περαιτέρω τα πιθανά σηματοδοτικά μονοπάτια της αγγειογένεσης, στα οποία τα miRNAs αυτά επιδρούν, στα ενδοθηλιακά κύτταρα.

#### 4.3.1. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ miR-378a ΣΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ *SUFU*: ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΤΗΣ ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗΣ

Σε πρόσφατη μελέτη, μελετήθηκε συγκεκριμένα ο ρόλος του miR-378a και διαπιστώθηκε ότι είναι σε μεγάλο βαθμό υπεύθυνο για την αγγειογενετική δράση των P-EVs, στα οποία περιέχεται. Το miR αυτό μπορεί να μεταφερθεί στα ενδοθηλιακά κύτταρα και να προάγει την αγγειογένεση. Ειδικότερα, βρέθηκε ότι το γονίδιο-στόχος του miR-378a, είναι το *Sufu* (suppressor of fused), το οποίο

φαίνεται να σχετίζεται άμεσα με την αγγειογένεση και συγκεκριμένα να την καταστέλλει, μέσω αρνητικής ρύθμισης στο σηματοδοτικό μονοπάτι Hedgehog/Gli1 (220-222). Με την αλληλεπίδραση του miR-378a με το *Sufu*, το σηματοδοτικό αυτό μονοπάτι ενεργοποιείται. Έχει διαπιστωθεί ότι το γονίδιο *Sufu* συμμετέχει σε ποικίλες βιολογικές διαδικασίες με καθοριστικό ρόλο και έχει βρεθεί ότι η μείωση της έκφρασής του, επάγει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την κυτταρική μετανάστευση (223, 224). Συγκεκριμένα, στο πείραμα των Zhou *et al.* (2021), αφού επιβεβαιώθηκε ότι το *Sufu* είναι το γονίδιο-στόχος του miR-378a, κατέστειλαν την έκφρασή του στα ενδοθηλιακά κύτταρα (ECs) και διαπίστωσαν ότι ο πολλαπλασιασμός, η μετανάστευση και το αγγειογενετικό δυναμικό των ενδοθηλιακών κυττάρων αυξήθηκε αξιοσημείωτα (214). Αυτές οι παρατηρήσεις που προέκυψαν ως αποτέλεσμα της καταστολής της έκφρασης του *Sufu*, ήταν όμοιες με αυτές που προέκυψαν σε επακόλουθη έκθεση των ECs, σε miR-378a αγωνιστή. Συνεπώς, αυτό σήμαινε ότι η θετική επίδραση που εμφανίζουν τα P-EVs στα ενδοθηλιακά κύτταρα, μεσολαβείται από την miR-378a-επαγόμενη αναστολή του *Sufu*. Επίσης δείχθηκε ότι τα ενδοθηλιακά κύτταρα στα οποία επέδρασαν P-EVs με αγωνιστές του miR-378a, παρουσίασαν εντονότερο δυναμικό πολλαπλασιασμού, μετανάστευσης και σχηματισμού αυλού, σε σχέση με τα ενδοθηλιακά κύτταρα στα οποία επέδρασαν P-EVs με miR-378a αναστολείς.

#### 4.3.2. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ miR-378a ΣΤΟ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΟ ΜΟΝΟΠΑΤΙ SUFU/GLI1/HEDGEHOG

Όσον αφορά το Gli1, αυτό είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας για το σηματοδοτικό μονοπάτι Hedgehog και έχει αποδειχθεί ότι παίζει καίριο ρόλο στην αγγειογένεση, όπως προαναφέρθηκε (225). Το Gli1 αποτελεί επίσης και έναν άμεσο στόχο του *Sufu* και όπως έχει δείχθει από προηγούμενες μελέτες, αυτό επιδρά με το Gli1 και άλλους αντίστοιχους μεταγραφικούς παράγοντες και παρεμποδίζει την μετατόπισή τους στον πυρήνα. Έτσι, το τελικό αποτέλεσμα είναι να αναστέλλεται η Hedgehog σηματοδότηση (226, 227). Έπειτα, ανίχνευσαν τα επίπεδα έκφρασης του Gli1 στα ενδοθηλιακά κύτταρα και τα βρήκαν αυξημένα, μετά από τη δράση των P-EVs με τους miR-378a- αγωνιστές στο γονίδιο *Sufu*, ενώ αντίθετα, τα βρήκαν μειωμένα, μετά από τη δράση των P-EVs με τους miR-378a-αναστολείς αντίστοιχα. Έχει αποδειχθεί ότι το σηματοδοτικό μονοπάτι Hedgehog ρυθμίζει ποικίλες κυτταρικές λειτουργίες και βιολογικές διεργασίες και κυρίως την αγγειογένεση (228-230). Για να διερευνήσουν περαιτέρω τη συμμετοχή του Hedgehog/Gli1 στην επαγόμενη αγγειογένεση των ενδοθηλιακών κυττάρων από τη δράση του miR-378a εκκρινόμενο από τα P-EVs, αξιολόγησαν τη δράση του GANT61, ενός μορίου-

αναστολέα, στο μονοπάτι αυτό. Παρατήρησαν ότι η επίδραση του GANT61 ανέστρεψε μερικώς την ενίσχυση που είχε παρατηρηθεί, από τη δράση των P-EVs/ miR-378a- αγωνιστών. Επομένως, έγινε σαφές ότι η αγγειογενετική επίδραση των P-EVs/ miR-378a στα ενδοθηλιακά κύτταρα, οφείλεται, τουλάχιστον εν μέρει, στην ενεργοποίηση του μονοπατιού Hedgehog. Παρόλα αυτά, είναι γνωστό ότι εκτός του miR-378a, το οποίο όπως αναφέρθηκε έχει μείζον ρόλο, στα P-EVs συνυπάρχουν και άλλα miR μόρια, τα οποία πιθανόν να αλληλεπιδρούν και να συμμετέχουν και αυτά στη συνολική θετική επίδραση των P-EVs στην αγγειογένεση.

Η επίτευξη ενός αγγειακού δικτύου με υψηλό επίπεδο οργάνωσης, παρέχει επαρκή οξυγόνωση και θρεπτικά συστατικά για τα κύτταρα και επιπλέον διατηρεί την αύξηση και την αναγέννηση των ιστών, ειδικά των ιστών και οργάνων που έχουν υποστεί βλάβη (231). Ωστόσο, χρειάζεται να αξιολογηθεί περαιτέρω η επίδραση του μικροπεριβάλλοντος στα φλεγμονώδη αυτά κύτταρα P-DPSCs και στα εξωσώματα που εκκρίνουν (P-EVs), επειδή το περιβάλλον αυτό μπορεί να επηρεάσει καθοριστικά τη βιολογική δράση των DPSCs (232). Επιπλέον, χρειάζεται να διαλευκανθεί περαιτέρω το αν τα κύτταρα αυτά και τα εκκρινόμενα εξωσώματά τους, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως θεραπευτικοί παράγοντες για την αναγέννηση άλλων ιστών, όπως του οστίτη ιστού, αν ληφθεί υπόψιν ότι τα EVs εκκρινόμενα από τα H-DPSCs, μπορούν να επάγουν την οστεογένεση. Η βαθύτερη διερεύνηση και κατανόηση του μηχανισμού με τον οποίο τα P-EVs επάγουν την αγγειογένεση, αδιαμφισβήτητα προσφέρει ένα νέο τρόπο ρύθμισης των αδιαφοροποίητων μεσεγχυματικών κυττάρων, όσον αφορά στην αναγέννηση των αγγείων συγκεκριμένα, αλλά επίσης και ένα νέο εφόδιο για τη μηχανική των ιστών γενικότερα.

#### 4.4. ΕΚΚΡΙΣΗ miRNAs ΚΑΙ ΑΥΞΗΤΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΑΠΟ ΝΑΝΟΣΠΟΓΓΩΔΗ ΜΙΚΡΟΣΦΑΙΡΙΔΙΑ, ΜΕ ΣΤΟΧΟ ΤΗΝ ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΤΩΝ ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΩΝ T-ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΩΝ ΚΑΙ ΤΗΝ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΤΗΣ ΠΕΡΙΟΔΟΝΤΙΚΗΣ ΟΣΤΙΚΗΣ ΑΠΩΛΕΙΑΣ

Η μηχανική των ιστών, η οποία προαναφέρθηκε, είναι ένα νέο, υποσχόμενο πεδίο, το οποίο αναπτύσσει βιοϋλικά, βιομόρια και κυτταρικές θεραπείες, για την αναγέννηση κατεστραμμένων ή νοσούντων ιστών (233). Όμως, στην περίπτωση έλλειψης ομοιόστασης ή βιοσυμβατότητας σε ένα σύστημα μηχανικής ιστών, η ανοσολογική απάντηση του οργανισμού μπορεί να οδηγήσει σε ανεπιθύμητα αποτελέσματα. Γι' αυτό το λόγο, η ανοσορύθμιση πρέπει να ληφθεί σοβαρά υπόψιν, για τη σχεδίαση ενός συστήματος μηχανικής ιστών. Εξελιγμένα βιοϋλικά μπορούν να

χρησιμοποιηθούν ώστε να βελτιωθεί η ανοσοθεραπεία (234, 235) και να ρυθμιστεί η ανοσοαπόκριση (236).

Τα ρυθμιστικά Τ-λεμφοκύτταρα (Regulatory T-cells, Tregs), αποτελούν μια υποκατηγορία των CD4+ Τ-κυττάρων και είναι κύριοι ρυθμιστές του ανοσιακού συστήματος, συνεισφέροντας στην ανθεκτικότητά του σε αυτοαντιγόνα, στην ελάττωση των συμπτωμάτων των αυτοάνοσων νοσημάτων με το να καταστέλλουν τη δραστηριότητα άλλων ανοσολογικών κυττάρων (237) και γενικότερα, στην αποκατάσταση της ανοσιακής ισορροπίας. Επομένως, η χρήση και η τροποποίηση των T<sub>regs</sub>, έχει προταθεί ως μια θεραπευτική προσέγγιση για τις αυτοάνοσες παθήσεις και για την αντιμετώπιση της καταστροφής της φλεγμονής, στους ιστούς (238). Οι παράγοντες IL-2 και ο TGF-β είναι κυτοκίνες που έχει βρεθεί ότι ενισχύουν την επιστράτευση, πολλαπλασιασμό και διαφοροποίηση των Tregs (239, 240).

#### 4.4.1. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ miR-10a/IL-2/TGF-β ΣΤΗ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ Τ-ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΩΝ ΤΟΥ ΘΥΜΟΥ ΑΔΕΝΑ ΣΕ ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΑ Τ-ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΑ T<sub>REGS</sub>

Όσον αφορά τη σχέση των miRNAs με τα Tregs, δεν έχει αναφερθεί έως τώρα η παρατήρηση ότι τα miRs επάγουν τον πολλαπλασιασμό ή τη διαφοροποίηση των Tregs. Ειδικότερα, το miR-10a έχει βρεθεί ότι εκφράζεται στα Tregs, αλλά όχι στα Τ-λεμφοκύτταρα του θύμου και επομένως θεωρείται ως ένας δείκτης για τα Tregs (241). Οι Liu *et al.* (2018) στη μελέτη τους, υπέθεσαν ότι το miR-10a μπορεί να συνεισφέρει στη διαφοροποίηση των Τ-κυττάρων του θύμου, σε Tregs (242). Επιπλέον, υπέθεσαν περαιτέρω ότι ο συνδυασμός του miR-10a με τα μόρια IL-2/TGF-β, μπορεί πιθανόν να δρα συνεργιστικά και να επιστρατεύει και να επάγει με μεγάλη αποτελεσματικότητα τη διαφοροποίηση και τον πολλαπλασιασμό των Τ-κυττάρων του θύμου αδένου, σε ρυθμιστικά Τ-λεμφοκύτταρα.

Παραδοσιακά, οι φορείς για τα miRNAs έχουν χαμηλού βαθμού ικανότητα μεταφοράς, υψηλή τοξικότητα ή και ιική αντιγονικότητα (243-245). Στο πείραμα των Liu *et al.* (2018), δημιουργήθηκε ένα υπερδιακλαδισμένο πολυμερές δίκτυο, ως ένα σύστημα μη ιικού φορέα, το οποίο μπορεί να σχηματίζει μικροσφαιρίδια και να επιτυγχάνει καθορισμένη και ελεγχόμενη κινητική έκκρισης και συνεπώς, μακροπρόθεσμη διατήρηση και παροχή των miRNAs (224, 242, 246). Αυτός ο μη ιικός φορέας έχει υψηλή συγγένεια πρόσδεσης με τα miRNAs, υψηλή αποδοτικότητα μεταφοράς και αμελητέα κυτταροτοξικότητα (246). Το πλέγμα

αυτό, χρησιμοποιείται ως ενέσιμο ικρίωμα, στο οποίο μπορούν να ενσωματώνονται συγκεκριμένα miRNAs, αλλά και άλλα μόρια, τα οποία δρώντας τοπικά και σε συνδυασμό, συνεισφέρουν στην αναγέννηση των ιστών. Συγκεκριμένα, το πολυμερές αυτό πλέγμα, συνίσταται από μικροπορώδη σφαιρίδια με νανοϊνες (Nanofibrous Spongy microspheres, NF-SMS), που αποτελούνται από νανοσωματίδια πυριτίου. Η μικροπορότητα αυτή, επιτυγχάνει την αποθήκευση και τη γρήγορη απελευθέρωση των παραγόντων IL-2 και TGF-β και συγχρόνως τα βιοδιασπώμενα μικροσφαιρίδια συμπολυμερούς πλέγματος πολύ-γαλακτικού/γλυκολικού οξέος, δεσμεύουν και απελευθερώνουν πιο μακροπρόθεσμα, τα μόρια miR-10a. Αυτή η απελευθέρωση των miR-10a τοπικά, επάγει τη μετατροπή των συμβατικών T-κυττάρων σε ρυθμιστικά Tregs. Τα NF-SMS αποτελούν επομένως έναν προηγμένο, ενέσιμο κυτταρικό μικροφορέα για τη μηχανική των ιστών, που χρησιμοποιείται για να διευκολύνει την έκκριση βιομορίων τοπικά και παράλληλα να ελαχιστοποιήσει τις πιθανές ανεπιθύμητες παρενέργειες (247, 248).

#### 4.4.2. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΒΙΟΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΣΦΑΙΡΙΔΙΩΝ (NF-SMS) ΣΤΗΝ ΠΕΡΙΟΔΟΝΤΙΚΗ ΝΟΣΟ

Η περιοδοντική νόσος όπως γνωρίζουμε, προκαλείται από την επιδεινούμενη ανοσολογική απάντηση του ξενιστή, στην μικροβιακή προσβολή (249). Τα Tregs που υπάρχουν *in vivo*, δεν επαρκούν ώστε να φέρουν ισορροπία στην εξέλιξη της απώλειας του φατνιακού οστού, που προκαλείται από την περιοδοντίτιδα (250). Ο απώτερος στόχος επομένως αυτού του πειράματος, είναι η μεσολαβούμενη από Tregs ανοσοθεραπεία. Πιο αναλυτικά, στόχος είναι να αναπτυχθεί αυτό το προγραμματιζόμενο βιολογικό σύστημα χορήγησης, του συμπολυμερούς πλέγματος μικροσφαιριδίων, το οποίο να δημιουργεί ένα συγκεκριμένο ανοσολογικό προφίλ στο τοπικό μικροπεριβάλλον. Έτσι θα ενισχύει τη διαφοροποίηση των T-κυττάρων σε ρυθμιστικά Tregs, με τελικό αποτέλεσμα να αυξάνει τον αριθμό των λειτουργικών Tregs *in situ*. Σε αυτή τη μελέτη, χρησιμοποιήθηκε ένα μοντέλο περιοδοντίτιδας σε ποντίκια, στο οποίο ελέγχθηκε το ενέσιμο αυτό βιοσύστημα, ώστε να εξακριβωθεί η υποθετική επίδραση του miR-10a στη διαφοροποίηση των Tregs, αλλά και η συνεργιστική δράση του συστήματος των IL-2/TGF-β με το miR-10a, στη ρύθμισή των Tregs, με ιδανικό στόχο την αναχαίτιση της εξελισσόμενης οστικής απώλειας, που προκύπτει ως αποτέλεσμα της φλεγμονώδους ανοσοαπόκρισης του οργανισμού. Οι περιοδοντικές βλάβες είναι γνωστό ότι είναι απρόβλεπτες, ανισοβαρείς και ανισομερείς, με ακανόνιστο δηλαδή σχήμα και έκταση. Επομένως, το ενέσιμο αυτό ικρίωμα με τις οστεογενείς ιδιότητες, φαίνεται να είναι ιδανικό για την αναγέννηση του φατνιακού οστού στην περιοδοντική νόσο.

Η υψηλή πορώτητα που προαναφέρθηκε ότι παρουσιάζει, είναι κατάλληλη για την εμφύτευση και αποίκηση των κυττάρων, τη νεοαγγειογένεση και τη συνολική ιστική αναγέννηση (251, 252). Επίσης, η νανοϊνώδης μορφολογία στο ικρίωμα, του προσδίδει οστεογενείς ιδιότητες (253-258).

Τα αποτελέσματα αυτού του πειράματος, έδειξαν ότι το miR-10a μπορεί πράγματι να επάγει τη διαφοροποίηση των T-κυττάρων σε T-ρυθμιστικά (Tregs), με την παρουσία και δράση των IL-2 και TGF- $\beta$ . Μέσω του βιοσυστήματος που προαναφέρθηκε, επιτυγχάνεται η συνδυασμένη διαδικασία της γρήγορης απελευθέρωσης των IL-2/TGF- $\beta$  και διατήρησης/αργής απελευθέρωσης του miR-10a, με τελικό αποτέλεσμα, το miR-10a να αυξάνει τον αριθμό των Tregs, στο τοπικό φλεγμονώδες μικροπεριβάλλον. Η ανάλυση των γονιδίων-στόχων που πραγματοποιήθηκε, έδειξε ότι το miR-10a καταστέλλει απευθείας το μόριο IRS-1 (Insulin Receptor Substrate 1), το οποίο εμπλέκεται στο PI3K σηματοδοτικό μονοπάτι, το οποίο με τη σειρά του, αναστέλλει τη διαφοροποίηση των Tregs. Άλλες μελέτες έχουν δείξει ότι η ρύθμιση της PI3K σηματοδότησης, είναι απαραίτητη για τη διατήρηση της ομοιόστασης και σταθερότητας των Tregs (259). Το μόριο IRS-1 έχει κρίσιμο ρόλο στη σηματοδότηση της ινσουλίνης, μεταδίδοντας σήματα από την ινσουλίνη στο ενδοκυττάριο μονοπάτι PI3K/Akt (260). Με την άμεση καταστολή που προκαλεί το miR-10a στο IRS-1, φαίνεται ότι το miR αυτό, συμμετέχει στη ρύθμιση της περιοδοντικής μεταβολικής ισορροπίας, καθώς η περιοδοντική νόσος θεωρείται ως επιπλοκή του συνδρόμου αντίστασης στην ινσουλίνη και του σακχαρώδους διαβήτη (261, 262). Επίσης, η περιοδοντίτιδα μπορεί να συσχετιστεί με επιδείνωση της αντίστασης στην ινσουλίνη (263). Επομένως, με τη μελέτη αυτή δείχθηκε ότι το miR-10a είναι ένας πολύ σημαντικός ρυθμιστής της κατεύθυνσης διαφοροποίησης των T-κυττάρων σε Tregs. Επιπλέον, έδειξαν την ουσιώδη θεραπευτική επίδραση του miR-10a στην πρόληψη της απώλειας του φατνιακού οστού, μέσω της επαγωγής της διαφοροποίησης των Tregs, στο μοντέλο περιοδοντίτιδας σε τρωκτικά.

Όσον αφορά την περιοδοντική νόσο και τα T-κύτταρα, έχει δειχθεί σε σειρά μελετών ότι η συσσώρευση T-κυττάρων σε περιοδοντικούς ιστούς, σχετίζεται με την εξέλιξη της περιοδοντικής καταστροφής. Χαρακτηριστικοί δείκτες των Th1, Th2, Th17 και Tregs, έχουν βρεθεί σε φλεγμονώδεις περιοδοντικούς ιστούς. Κυτοκίνες τύπου Th1 και Th17, θεωρήθηκε ότι αυξάνουν την έκφραση προφλεγμονωδών κυτοκινών και του RANKL, διαδικασία η οποία επάγει την οστεοκλαστογένεση και την απώλεια του φατνιακού οστού στην περιοδοντίτιδα (264). Τα Tregs αποτελούν ένα ζωτικό

μέρος της διαδικασίας ρύθμισης του ανοσοποιητικού συστήματος, στην περιοδοντική νόσο, που κυμαίνεται από τη λοίμωξη έως την ανοσοπαθολογία και την αυτοανοσία. Τα Tregs βρέθηκαν και ταυτοποιήθηκαν σε ανθρώπινους περιοδοντικούς ιστούς, από την έκφραση των Foxp3, IL-10 και TGF- $\beta$  και θεωρήθηκαν ότι επηρεάζουν τη διατήρηση της περιοδοντικής υγείας (265). Η παραγωγή συγκεκριμένων κυτοκινών, όπως των IL-10 και TGF- $\beta$  που προαναφέρθηκαν, μπορεί να προκαλέσει αναστολή της διαφοροποίησης των οστεοκλαστών (266). Επίσης, τα Tregs, συμμετέχουν στην αναστολή του RANKL στους περιοδοντικούς ιστούς και έχουν ανοσοκατασταλτική λειτουργία κατά της οστεοκλαστικής διαφοροποίησης και της απώλειας οστού (267, 268). Παλαιότερες μελέτες έχουν δείξει ότι η αναστολή των Tregs είχε ως αποτέλεσμα έντονη απορρόφηση του φατνιακού οστού, σε ζωικό μοντέλο περιοδοντίτιδας (250). Συνεπώς, τα ρυθμιστικά αυτά T-κύτταρα θεωρείται ότι έχουν την ικανότητα να ελαχιστοποιούν την ιστική βλάβη, μέσω τροποποίησης της ανοσολογικής απόκρισης του ξενιστή και της ανακατασκευής του οστού στην περιοδοντική νόσο (250, 269).

## 5. ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΩΝ ΔΙΦΩΣΦΟΝΙΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ ΜΕ ΤΑ miRNAs ΣΤΟΥΣ ΠΕΡΙΟΔΟΝΤΙΚΟΥΣ ΙΣΤΟΥΣ

### 5.1. ΤΟ ΙΒΑΝΔΡΟΝΙΚΟ ΟΞΥ ΕΝΙΣΧΥΕΙ ΤΗΝ ΟΣΤΕΟΓΕΝΗ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΤΟΥ ΠΕΡΙΟΔΟΝΤΙΚΟΥ ΣΥΝΔΕΣΜΟΥ ΜΕΣΩ ΤΗΣ ΡΥΘΜΙΣΗΣ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ miRNAs

Τα διφωσφονικά είναι μια ομάδα σταθερών ενώσεων, ανάλογα του πυροφωσφορικού οξέος (PPi), με ικανότητα να παρεμβαίνουν στο μεταβολισμό των οστεοκλαστών και των οστεοβλαστών και να διαταράσσουν τη διαδικασία της οστικής απορρόφησης, παρουσιάζοντας συνολικά, αντι-οστεολυτική δράση. Κατά κύριο λόγο, αναστέλλουν τη διαφοροποίηση των προ-οστεοκλαστών, επάγουν την απόπτωση των οστεοκλαστών και διεγείρουν την έκκριση από τις οστεοβλάστες, παραγόντων ανασταλτικών της οστεοκλαστογένεσης (270, 271). Χρησιμοποιούνται ευρέως πλέον, ως θεραπευτικοί παράγοντες για πληθώρα διαταραχών του οστικού μεταβολισμού, οι οποίες χαρακτηρίζονται από αυξημένη οστική απορρόφηση πχ. η νόσος *Paget* (272), τα οστικά νεοπλάσματα, η υπερασβεστιαμία της κακοήθειας (273) και η οστεοπόρωση (274). Το ιβανδρονικό οξύ (ιβανδρονάτη) είναι ένα αζωτούχο διφωσφονικό, με χημική συγγένεια προς τον υδροξυαπατίτη του οστίτη ιστού. Το διφωσφονικό αυτό αναστέλλει τη μεσολαβούμενη από οστεοκλάστες οστική απορρόφηση και είναι αποτελεσματικό για τη θεραπεία της οστεοπόρωσης που προκαλείται από ανεπάρκεια οιστρογόνων (275). Τα διφωσφονικά αλληλεπιδρούν επίσης και με τους οστεοβλάστες, όπως έχει βρεθεί, και συγκεκριμένα ενισχύουν τον πολλαπλασιασμό τους και την ωρίμανσή τους (276-278) και αναστέλλουν την απόπτωσή τους (279). Επομένως, όπως φαίνεται από αυτά τα δεδομένα, τα διφωσφονικά έχουν θετική επίδραση στους οστεοβλάστες.

Ο περιοδοντικός σύνδεσμος, όπως έχουμε προαναφέρει, είναι ένας τύπος μη επιμεταλλωμένου συνδετικού ιστού, ο οποίος συνδέει την οστεΐνη της ρίζας με το εσωτερικό τοίχωμα του φατνιακού οστού και με αυτό τον τρόπο, συγκρατεί το δόντι εντός του φατνίου του (280, 281). Ο ανθρώπινος περιοδοντικός σύνδεσμος, περιλαμβάνει προγονικά, αδιαφοροποίητα κύτταρα τα οποία έχουν την ικανότητα να διαφοροποιούνται σε οστεΐνοβλάστες, οστεοβλάστες και λιποκύτταρα. Αυτά τα αδιαφοροποίητα κύτταρα, όπως έχει ήδη προαναφερθεί, έχουν πολύ σημαντικό ρόλο στην αναγέννηση των περιοδοντικών ιστών (282-284). Στη μελέτη των Zhou *et al.* (2011) έγινε προσπάθεια να αναλυθούν οι βιολογικές επιδράσεις της ιβανδρονάτης στην οστεογενή διαφοροποίηση των ανθρώπινων κυττάρων του περιοδοντικού συνδέσμου (hPDLSCs) και να προσδιοριστεί η διαφορική έκφραση



των miRNAs και των πιθανών γονιδίων-στόχων τους, που σχετίζονται με την οστεογενή διαφοροποίηση (285). Τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής έδειξαν ότι η ιβανδρονάτη ενίσχυσε την έκφραση της αλκαλικής φωσφατάσης στα κύτταρα αυτά. Οι δείκτες για την οστεογενή διαφοροποίηση αξιολογήθηκαν με qRT-PCR. Επίσης, βρέθηκε και αύξηση της έκφρασης των γονιδίων Col-1, Runx2, OC και OPG, επομένως φαίνεται ότι η ιβανδρονάτη μπορεί να ρυθμίζει θετικά την έκφραση των οστεογενών γονιδίων. Ωστόσο, χρειάζονται περισσότερες μελέτες, ώστε να διαλευκανθεί ο ακριβής μηχανισμός δράσης της σε μοριακό και κυτταρικό επίπεδο.

Όσον αφορά τα miRNAs, στη μελέτη αυτή βρέθηκε ότι είχαν διαφορετική έκφραση στα hPDLSCs κύτταρα, μετά από τη δράση της ιβανδρονάτης (285). Συγκεκριμένα, τα miR-18a και miR-133a βρέθηκαν σε αυξημένη έκφραση, ενώ τα miR-141 και miR-19a, βρέθηκαν σε μειωμένη έκφραση. Ένα ακόμη miRNA του οποίου η έκφραση βρέθηκε μειωμένη από την ιβανδρονάτη, είναι το miR-26a. Οι Luzi *et al.* (2008) ανέφεραν ότι το miR-26a καταστέλλει την οστεογενετική διαφοροποίηση των αδιαφοροποίητων κυττάρων που προέρχονται από τα ανθρώπινα λιποκύτταρα, δρώντας στο γονίδιο – στόχο του, το SMAD1 (286). Το SMAD1 συμμετέχει στα τελικά στάδια της σηματοδότησης των οστικών μορφογενετικών πρωτεϊνών (BMPs) και παίζει σημαντικό ρόλο στην οστεοβλαστική διαφοροποίηση. Στη μελέτη των Zhou *et al.* (2011), βρέθηκε ομοίως, ότι η δράση της ιβανδρονάτης στα κύτταρα του περιοδοντικού συνδέσμου, κατέστειλε σημαντικά την έκφραση του miR-26a, γεγονός το οποίο αύξησε συνεπακόλουθα την έκφραση του SMAD1 (285). Επομένως φαίνεται από το εύρημα αυτό, ότι η ιβανδρονάτη προάγει την οστεογενή διαφοροποίηση των κυττάρων του περιοδοντικού συνδέσμου, με παρόμοιο μηχανισμό με αυτόν της διαφοροποίησης των ανθρώπινων αδιαφοροποίητων κυττάρων προερχόμενων από τα λιποκύτταρα (hADSCs) σε οστεογενή κύτταρα.

Όσον αφορά το miR-18a, οι Ohgawara *et al.* (2009), βρήκαν ότι το miR αυτό ρυθμίζει τη διαφοροποίηση των χονδροκυττάρων, μέσω της οικογένειας πρωτεϊνών CCN2 και του αυξητικού παράγοντα του συνδετικού ιστού (CCN2/CTGF), τα οποία παίζουν κρίσιμο ρόλο στον ενδοχόνδρινο οστικό σχηματισμό και στη χονδροκυτταρική οστεοποίηση (287).

Σχετικά με το miR-141, προηγούμενες μελέτες έδειξαν ότι αυτό ρυθμίζει την επαγόμενη από τη BMP-2, διαφοροποίηση των προ-οστεοβλαστών, μέσω καταστολής της μετάφρασης του γονιδίου που κωδικοποιεί το μόριο Dlx5, το οποίο είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας που διεγείρει τον οστικό σχηματισμό και

εκφράζεται κατά την προ-οστεοβλαστική διαφοροποίηση. Οι Zhou *et al.* (2011), έδειξαν ότι η έκφραση αυτών των miRNAs, μεταβάλλεται από την ιβανδρονάτη και αυτή η παρατήρηση συνάδει με αυτές των προηγούμενων μελετών, στις οποίες τα βρέθηκε ότι τα miRNAs έχουν ρυθμιστικό ρόλο στην οστεογενή διαφοροποίηση και στον οστικό σχηματισμό (285).

## 6. ΤΑ miRNAs ΩΣ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ

### 6.1. ΤΑ miRNAs ΩΣ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΑ ΜΟΡΙΑ

Στις παραπάνω μελέτες είδαμε ένα μικρό μόνο μέρος από τα εμπλεκόμενα με την περιοδοντική νόσο miRNAs. Τα miRNAs δεν έχουν μόνο διαγνωστική αξία ως βιοχημικοί δείκτες, αλλά έχουν επίσης δυναμικό ως θεραπευτικοί δείκτες, των διαφόρων νόσων, όπως η περιοδοντική νόσος. Τα μόρια αυτά αποτελούν μοναδικούς ρυθμιστές της έκφρασης μεγάλου ποσοστού γονιδίων, λόγω της ικανότητάς τους να συνδέονται, χωρίς την προϋπόθεση υψηλής συμπληρωματικότητας, με τα mRNAs (25, 26). Όπως είδαμε, μεμονωμένα μόρια miRNA με θεραπευτική δράση, δρουν σε γονίδια-στόχους και επηρεάζουν πολλά σηματοδοτικά μονοπάτια. Συνδυασμός μορίων miRNAs επίσης, μπορεί να ρυθμίζει πολλά μόρια ενός δεδομένου σηματοδοτικού μονοπατιού.

### 6.2. ΤΑ miRNAs ΩΣ ΠΙΘΑΝΟΙ ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΙ ΚΑΙ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΟΙ ΣΤΟΧΟΙ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΤΗΣ ΑΠΩΛΕΙΑΣ ΤΟΥ ΦΑΤΝΙΑΚΟΥ ΟΣΤΟΥ ΣΤΗΝ ΠΕΡΙΟΔΟΝΤΙΚΗ ΝΟΣΟ

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η περιοδοντική νόσος αποτελεί μια από τις πιο κοινές νόσους παγκοσμίως. Είναι μια φλεγμονώδης νόσος προκαλούμενη από βακτηριακή λοίμωξη των στηρικτών ιστών των δοντιών, που έχει ως αποτέλεσμα την απορρόφηση του φατνιακού οστού (288). Όπως ήδη γνωρίζουμε, ο οστικός σχηματισμός και η οστική απορρόφηση βρίσκονται σε συνεχή ισορροπία μεταξύ τους. Στην περιοδοντική νόσο, η ισορροπία αυτή διαταράσσεται υπέρ της οστικής απορρόφησης και απολήγει σε καταστροφή και απώλεια του φατνιακού οστού. Επιπρόσθετα, όπως φαίνεται από το νέο πεδίο έρευνας που έχει διαμορφωθεί, αυτό των EV θεραπειών, τα miRNAs μπορούν να μεταφέρονται μεταξύ των κυττάρων, εντός των μεμβρανωδών αυτών κυστιδίων και να δρουν σε γονίδια-στόχους. Με αυτόν τον τρόπο επηρεάζουν πάλι σηματοδοτικά μονοπάτια προς όφελος της αγγειογένεσης και της ιστικής αναγέννησης συνολικά, στις περιπτώσεις κατεστραμμένων ιστών και οργάνων. Ο ρόλος τους τόσο ως διαγνωστικοί, όσο και ως θεραπευτικοί δείκτες είναι ωστόσο ακόμα υπό συνεχή διερεύνηση, καθώς το πεδίο αυτό της έρευνας ακόμα αναπτύσσεται και αναδύονται συνεχώς καινούριες πληροφορίες και νέα δεδομένα.

## 7. ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Μέχρι σήμερα, οι πιο κοινοί βιοχημικοί δείκτες που απομονώνονται από το περιβάλλον της στοματικής κοιλότητας, και αφορούν την περιοδοντίτιδα, ανήκουν σε 3 κατηγορίες: α) Τα ένζυμα του ξενιστή και οι αναστολείς τους, β) μεσολαβητές της φλεγμονής και τροποποιητές της ανοσοαπόκρισης του ξενιστή και γ) προϊόντα αποικοδόμησης των ιστών.

Τα miRNAs έχουν αναδειχθεί σε μια καινοτόμα κατηγορία βιοχημικών δεικτών υψηλής ευαισθησίας και ειδικότητας. Έχειδειχθεί ότι τα μόρια αυτά επηρεάζουν την πορεία της νόσου, συμμετέχοντας τόσο στη διαδικασία σχηματισμού οστού, όσο και στη διαδικασία της απορρόφησης. Επιδρούν σε πολλά σηματοδοτικά μονοπάτια, με τελικό στόχο τη ρύθμιση γονιδίων, που αφορούν στη διαφοροποίηση των πρόδρομων κυττάρων του περιοδοντίου, σε οστεοβλάστες και οστεοκλάστες. Αυτή ακριβώς η ικανότητά τους, τα καθιστά και σημαντικούς θεραπευτικούς δείκτες, με τους οποίους πιθανόν να μπορούμε να τροποποιούμε την εξέλιξη της νόσου. Ωστόσο, καθώς το πεδίο αυτό μόλις πρόσφατα άρχισε να αναδύεται, χρειάζονται ακόμα περαιτέρω έρευνες για να εξακριβωθούν οι ακριβείς συνθήκες και μηχανισμοί δράσεις των miRNAs, αλλά και οι δυνατότητές τους στη θεραπεία.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Βρότσος ΙΑ, Καρούσης ΙΚ. *Περιοδοντολογία-Εμφυτευματολογία*. Αθήνα: ΒΗΤΑ Ιατρικές Εκδόσεις; 2016.
2. Meyle J, Chapple I. Molecular aspects of the pathogenesis of periodontitis. *Periodontology* 2000. 2015;69(1):7-17. doi.10.1111/prd.12104.
3. Basha S, Shivalinga Swamy H, Noor Mohamed R. Maternal Periodontitis as a Possible Risk Factor for Preterm Birth and Low Birth Weight--A Prospective Study. *Oral health & preventive dentistry*. 2015;13(6):537-44. doi.10.3290/j.ohpd.a34053.
4. Iwasaki T, Hirose A, Azuma T, Ohashi T, Watanabe K, Obora A, et al. Correlation between ultrasound-diagnosed non-alcoholic fatty liver and periodontal condition in a cross-sectional study in Japan. *Scientific reports*. 2018;8(1):7496. doi.10.1038/s41598-018-25857-z.
5. Hobert O. Gene regulation by transcription factors and microRNAs. *Science*. 2008;319(5871):1785-6. doi.10.1126/science.1151651.
6. Stefani G, Slack FJ. Small non-coding RNAs in animal development. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2008;9(3):219-30. doi.10.1038/nrm2347.
7. Λυρίτης ΓΠ. *Μεταβολικά Νοσήματα των Οστών*. Αθήνα: Hylonome; 2021.
8. Foessel I, Kotzbeck P, Obermayer-Pietsch B. miRNAs as novel biomarkers for bone related diseases. *J Lab Precis Med*. 2019;4(2):2.
9. Luan X, Zhou X, Naqvi A, Francis M, Foyle D, Nares S, et al. MicroRNAs and immunity in periodontal health and disease. *International journal of oral science*. 2018;10(3):24. doi.10.1038/s41368-018-0025-y.
10. Turchinovich A, Cho WC. The origin, function and diagnostic potential of extracellular microRNA in human body fluids. *Front Genet*. 2014;5:30. doi.10.3389/fgene.2014.00030.
11. Cortez MA, Bueso-Ramos C, Ferdin J, Lopez-Berestein G, Sood AK, Calin GA. MicroRNAs in body fluids--the mix of hormones and biomarkers. *Nature reviews Clinical oncology*. 2011;8(8):467-77. doi.10.1038/nrclinonc.2011.76.
12. Santonocito S, Ronsivalle V, Fichera G, Indelicato F. Psychological impact and patient perception of occlusion and orthodontic treatment in periodontitis patients. *Mediterranean Journal of Clinical Psychology*. 2020;8(3):1-16. doi.10.6092/2282-1619/mjcp-2845.
13. Kim SH, Lee SY, Lee YM, Lee YK. MicroRNAs as biomarkers for dental diseases. *Singapore Dent J*. 2015;36:18-22. doi.10.1016/j.sdj.2015.09.001.
14. Garcia-Gimenez JL, Sanchis-Gomar F, Lippi G, Mena S, Ivars D, Gomez-Cabrera MC, et al. Epigenetic biomarkers: A new perspective in laboratory diagnostics. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 2012;413(19-20):1576-82. doi.10.1016/j.cca.2012.05.021.
15. Schmalz G, Li S, Burkhardt R, Rinke S, Krause F, Haak R, et al. MicroRNAs as Salivary Markers for Periodontal Diseases: A New Diagnostic Approach? *BioMed research international*. 2016;2016:1027525. doi.10.1155/2016/1027525.
16. Santonocito S, Polizzi A, Palazzo G, Isola G. The Emerging Role of microRNA in Periodontitis: Pathophysiology, Clinical Potential and Future Molecular Perspectives. *International journal of molecular sciences*. 2021;22(11). doi.10.3390/ijms22115456.

17. Amaral SA, Pereira TSF, Brito JAR, Cortelli SC, Cortelli JR, Gomez RS, et al. Comparison of miRNA expression profiles in individuals with chronic or aggressive periodontitis. *Oral diseases*. 2019;25(2):561-8. doi.10.1111/odi.12994.
18. Dangaria SJ, Ito Y, Luan X, Diekwisch TG. Differentiation of neural-crest-derived intermediate pluripotent progenitors into committed periodontal populations involves unique molecular signature changes, cohort shifts, and epigenetic modifications. *Stem cells and development*. 2011;20(1):39-52. doi.10.1089/scd.2010.0180.
19. Zeng Y, Qu X, Li H, Huang S, Wang S, Xu Q, et al. MicroRNA-100 regulates osteogenic differentiation of human adipose-derived mesenchymal stem cells by targeting BMP2. *FEBS Lett*. 2012;586(16):2375-81. doi.10.1016/j.febslet.2012.05.049.
20. Grunhagen J, Bhushan R, Degenkolbe E, Jager M, Knaus P, Mundlos S, et al. MiR-497 approximately 195 cluster microRNAs regulate osteoblast differentiation by targeting BMP signaling. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 2015;30(5):796-808. doi.10.1002/jbmr.2412.
21. Lim WH, Liu B, Cheng D, Williams BO, Mah SJ, Helms JA. Wnt signaling regulates homeostasis of the periodontal ligament. *Journal of periodontal research*. 2014;49(6):751-9. doi.10.1111/jre.12158.
22. Lim WH, Liu B, Mah SJ, Yin X, Helms JA. Alveolar bone turnover and periodontal ligament width are controlled by Wnt. *Journal of periodontology*. 2015;86(2):319-26. doi.10.1902/jop.2014.140286.
23. Yin X, Li J, Salmon B, Huang L, Lim WH, Liu B, et al. Wnt Signaling and Its Contribution to Craniofacial Tissue Homeostasis. *Journal of dental research*. 2015;94(11):1487-94. doi.10.1177/0022034515599772.
24. Diekwisch TG. Our periodontal tissue: a masterpiece of evolution. *Journal of clinical periodontology*. 2016;43(4):320-2. doi.10.1111/jcpe.12532.
25. Diekwisch TG. Novel approaches toward managing the micromanagers: 'non-toxic' but effective. *Gene therapy*. 2016;23(10):697-8. doi.10.1038/gt.2016.49.
26. Tamura M, Nemoto E. Role of the Wnt signaling molecules in the tooth. *The Japanese dental science review*. 2016;52(4):75-83. doi.10.1016/j.jdsr.2016.04.001.
27. Li Z, Hassan MQ, Jafferji M, Aqeilan RI, Garzon R, Croce CM, et al. Biological functions of miR-29b contribute to positive regulation of osteoblast differentiation. *The Journal of biological chemistry*. 2009;284(23):15676-84. doi.10.1074/jbc.M809787200.
28. Wang T, Xu Z. miR-27 promotes osteoblast differentiation by modulating Wnt signaling. *Biochemical and biophysical research communications*. 2010;402(2):186-9. doi.10.1016/j.bbrc.2010.08.031.
29. Darveau RP. Periodontitis: a polymicrobial disruption of host homeostasis. *Nature reviews Microbiology*. 2010;8(7):481-90. doi.10.1038/nrmicro2337.
30. Bartold PM, Van Dyke TE. Periodontitis: a host-mediated disruption of microbial homeostasis. *Unlearning learned concepts*. *Periodontology* 2000. 2013;62(1):203-17. doi.10.1111/j.1600-0757.2012.00450.x.
31. Hienz SA, Paliwal S, Ivanovski S. Mechanisms of Bone Resorption in Periodontitis. *Journal of immunology research*. 2015;2015:615486. doi.10.1155/2015/615486.

32. Zhou X, Luan X, Chen Z, Francis M, Gopinathan G, Li W, et al. MicroRNA-138 Inhibits Periodontal Progenitor Differentiation under Inflammatory Conditions. *Journal of dental research*. 2016;95(2):230-7. doi.10.1177/0022034515613043.
33. Liu Y, Liu W, Hu C, Xue Z, Wang G, Ding B, et al. MiR-17 modulates osteogenic differentiation through a coherent feed-forward loop in mesenchymal stem cells isolated from periodontal ligaments of patients with periodontitis. *Stem Cells*. 2011;29(11):1804-16. doi.10.1002/stem.728.
34. Hung PS, Chen FC, Kuang SH, Kao SY, Lin SC, Chang KW. miR-146a induces differentiation of periodontal ligament cells. *Journal of dental research*. 2010;89(3):252-7. doi.10.1177/0022034509357411.
35. Komori T. Runx2, an inducer of osteoblast and chondrocyte differentiation. *Histochemistry and cell biology*. 2018;149(4):313-23. doi.10.1007/s00418-018-1640-6.
36. Bruderer M, Richards RG, Alini M, Stoddart MJ. Role and regulation of RUNX2 in osteogenesis. *European cells & materials*. 2014;28:269-86. doi.10.22203/ecm.v028a19.
37. Liu X, Yang B, Zhang Y, Guo X, Yang Q, Liu X, et al. miR-30a-5p inhibits osteogenesis and promotes periodontitis by targeting Runx2. *BMC oral health*. 2021;21(1):513. doi.10.1186/s12903-021-01882-9.
38. Wang C, Liao H, Cao Z. Role of Osterix and MicroRNAs in Bone Formation and Tooth Development. *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research*. 2016;22:2934-42. doi.10.12659/msm.896742.
39. Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, Zhang Z, Deng JM, Behringer RR, et al. The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell*. 2002;108(1):17-29. doi.10.1016/s0092-8674(01)00622-5.
40. Sinha KM, Yasuda H, Zhou X, deCrombrughe B. Osterix and NO66 histone demethylase control the chromatin of Osterix target genes during osteoblast differentiation. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 2014;29(4):855-65. doi.10.1002/jbmr.2103.
41. Zhu F, Friedman MS, Luo W, Woolf P, Hankenson KD. The transcription factor osterix (SP7) regulates BMP6-induced human osteoblast differentiation. *Journal of cellular physiology*. 2012;227(6):2677-85. doi.10.1002/jcp.23010.
42. Yun-Feng W, Matsuo N, Sumiyoshi H, Yoshioka H. Sp7/Osterix up-regulates the mouse pro-alpha3(V) collagen gene (Col5a3) during the osteoblast differentiation. *Biochemical and biophysical research communications*. 2010;394(3):503-8. doi.10.1016/j.bbrc.2010.02.171.
43. Tu Q, Valverde P, Chen J. Osterix enhances proliferation and osteogenic potential of bone marrow stromal cells. *Biochemical and biophysical research communications*. 2006;341(4):1257-65. doi.10.1016/j.bbrc.2006.01.092.
44. Kim YJ, Kim HN, Park EK, Lee BH, Ryoo HM, Kim SY, et al. The bone-related Zn finger transcription factor Osterix promotes proliferation of mesenchymal cells. *Gene*. 2006;366(1):145-51. doi.10.1016/j.gene.2005.08.021.
45. Eskildsen T, Taipaleenmaki H, Stenvang J, Abdallah BM, Ditzel N, Nossent AY, et al. MicroRNA-138 regulates osteogenic differentiation of human stromal (mesenchymal) stem cells in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011;108(15):6139-44. doi.10.1073/pnas.1016758108.

46. Wang Y, Chen S, Deng C, Li F, Wang Y, Hu X, et al. MicroRNA-204 Targets Runx2 to Attenuate BMP-2-induced Osteoblast Differentiation of Human Aortic Valve Interstitial Cells. *Journal of cardiovascular pharmacology*. 2015;66(1):63-71. doi.10.1097/FJC.0000000000000244.
47. Liu XD, Cai F, Liu L, Zhang Y, Yang AL. MicroRNA-210 is involved in the regulation of postmenopausal osteoporosis through promotion of VEGF expression and osteoblast differentiation. *Biol Chem*. 2015;396(4):339-47. doi.10.1515/hsz-2014-0268.
48. Li J, He X, Wei W, Zhou X. MicroRNA-194 promotes osteoblast differentiation via downregulating STAT1. *Biochemical and biophysical research communications*. 2015;460(2):482-8. doi.10.1016/j.bbrc.2015.03.059.
49. Zhao W, Wu C, Dong Y, Ma Y, Jin Y, Ji Y. MicroRNA-24 Regulates Osteogenic Differentiation via Targeting T-Cell Factor-1. *International journal of molecular sciences*. 2015;16(5):11699-712. doi.10.3390/ijms160511699.
50. Du F, Wu H, Zhou Z, Liu YU. microRNA-375 inhibits osteogenic differentiation by targeting runt-related transcription factor 2. *Exp Ther Med*. 2015;10(1):207-12. doi.10.3892/etm.2015.2477.
51. Dong CL, Liu HZ, Zhang ZC, Zhao HL, Zhao H, Huang Y, et al. The influence of MicroRNA-150 in Osteoblast Matrix Mineralization. *Journal of cellular biochemistry*. 2015;116(12):2970-9. doi.10.1002/jcb.25245.
52. Somerman MJ, Shroff B, Agraves WS, Morrison G, Craig AM, Denhardt DT, et al. Expression of attachment proteins during cementogenesis. *Journal de biologie buccale*. 1990;18(3):207-14.
53. Bosshardt DD. Are cementoblasts a subpopulation of osteoblasts or a unique phenotype? *Journal of dental research*. 2005;84(5):390-406. doi.10.1177/154405910508400501.
54. Ducy P, Starbuck M, Priemel M, Shen J, Pinero G, Geoffroy V, et al. A Cbfa1-dependent genetic pathway controls bone formation beyond embryonic development. *Genes & development*. 1999;13(8):1025-36. doi.10.1101/gad.13.8.1025.
55. Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G. Osf2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell*. 1997;89(5):747-54. doi.10.1016/s0092-8674(00)80257-3.
56. Zhou X, Zhang Z, Feng JQ, Dusevich VM, Sinha K, Zhang H, et al. Multiple functions of Osterix are required for bone growth and homeostasis in postnatal mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;107(29):12919-24. doi.10.1073/pnas.0912855107.
57. Hirata A, Sugahara T, Nakamura H. Localization of runx2, osterix, and osteopontin in tooth root formation in rat molars. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*. 2009;57(4):397-403. doi.10.1369/jhc.2008.952192.
58. Cao Z, Liu R, Zhang H, Liao H, Zhang Y, Hinton RJ, et al. Osterix controls cementoblast differentiation through downregulation of Wnt-signaling via enhancing DKK1 expression. *International journal of biological sciences*. 2015;11(3):335-44. doi.10.7150/ijbs.10874.
59. Liu R, Cao Z. Osterix combined with gene-activated matrix: A potential integrated strategy for achieving cementum regeneration. *Dental Hypotheses*. 2015;6(1):10.



60. Ogata Y, Matsui S, Kato A, Zhou L, Nakayama Y, Takai H. MicroRNA expression in inflamed and noninflamed gingival tissues from Japanese patients. *Journal of oral science*. 2014;56(4):253-60. doi.10.2334/josnusd.56.253.
61. Xie YF, Shu R, Jiang SY, Liu DL, Zhang XL. Comparison of microRNA profiles of human periodontal diseased and healthy gingival tissues. *International journal of oral science*. 2011;3(3):125-34. doi.10.4248/IJOS11046.
62. Sipert CR, Morandini AC, Dionisio TJ, Trachtenberg AJ, Kuo WP, Santos CF. MicroRNA-146a and microRNA-155 show tissue-dependent expression in dental pulp, gingival and periodontal ligament fibroblasts in vitro. *Journal of oral science*. 2014;56(2):157-64. doi.10.2334/josnusd.56.157.
63. Xie YF, Shu R, Jiang SY, Liu DL, Ni J, Zhang XL. MicroRNA-146 inhibits pro-inflammatory cytokine secretion through IL-1 receptor-associated kinase 1 in human gingival fibroblasts. *Journal of inflammation (London, England)*. 2013;10(1):20. doi.10.1186/1476-9255-10-20.
64. Hilton MJ, Tu X, Cook J, Hu H, Long F. Ihh controls cartilage development by antagonizing Gli3, but requires additional effectors to regulate osteoblast and vascular development. *Development (Cambridge, England)*. 2005;132(19):4339-51. doi.10.1242/dev.02025.
65. Ham O, Song BW, Lee SY, Choi E, Cha MJ, Lee CY, et al. The role of microRNA-23b in the differentiation of MSC into chondrocyte by targeting protein kinase A signaling. *Biomaterials*. 2012;33(18):4500-7. doi.10.1016/j.biomaterials.2012.03.025.
66. Guan YJ, Yang X, Wei L, Chen Q. MiR-365: a mechanosensitive microRNA stimulates chondrocyte differentiation through targeting histone deacetylase 4. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2011;25(12):4457-66. doi.10.1096/fj.11-185132.
67. Li P, Wei X, Guan Y, Chen Q, Zhao T, Sun C, et al. MicroRNA-1 regulates chondrocyte phenotype by repressing histone deacetylase 4 during growth plate development. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2014;28(9):3930-41. doi.10.1096/fj.13-249318.
68. Papaioannou G, Mirzamohammadi F, Lisse TS, Nishimori S, Wein MN, Kobayashi T. MicroRNA-140 Provides Robustness to the Regulation of Hypertrophic Chondrocyte Differentiation by the PTHrP-HDAC4 Pathway. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 2015;30(6):1044-52. doi.10.1002/jbmr.2438.
69. Papaioannou G, Inloes JB, Nakamura Y, Paltrinieri E, Kobayashi T. let-7 and miR-140 microRNAs coordinately regulate skeletal development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013;110(35):E3291-300. doi.10.1073/pnas.1302797110.
70. Martinez-Sanchez A, Dudek KA, Murphy CL. Regulation of human chondrocyte function through direct inhibition of cartilage master regulator SOX9 by microRNA-145 (miRNA-145). *The Journal of biological chemistry*. 2012;287(2):916-24. doi.10.1074/jbc.M111.302430.
71. Nakamura Y, Inloes JB, Katagiri T, Kobayashi T. Chondrocyte-specific microRNA-140 regulates endochondral bone development and targets Dnpep to modulate bone morphogenetic protein signaling. *Molecular and cellular biology*. 2011;31(14):3019-28. doi.10.1128/MCB.05178-11.
72. Miyaki S, Sato T, Inoue A, Otsuki S, Ito Y, Yokoyama S, et al. MicroRNA-140 plays dual roles in both cartilage development and homeostasis. *Genes & development*. 2010;24(11):1173-85. doi.10.1101/gad.1915510.

73. Baek WY, Lee MA, Jung JW, Kim SY, Akiyama H, de Crombrughe B, et al. Positive regulation of adult bone formation by osteoblast-specific transcription factor osterix. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 2009;24(6):1055-65. doi.10.1359/jbmr.081248.
74. Baek WY, de Crombrughe B, Kim JE. Postnatally induced inactivation of Osterix in osteoblasts results in the reduction of bone formation and maintenance. *Bone*. 2010;46(4):920-8. doi.10.1016/j.bone.2009.12.007.
75. Cao Y, Jia SF, Chakravarty G, de Crombrughe B, Kleinerman ES. The osterix transcription factor down-regulates interleukin-1 alpha expression in mouse osteosarcoma cells. *Molecular cancer research : MCR*. 2008;6(1):119-26. doi.10.1158/1541-7786.MCR-07-0090.
76. Lacey DL, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T, et al. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell*. 1998;93(2):165-76. doi.10.1016/s0092-8674(00)81569-x.
77. Tang P, Xiong Q, Ge W, Zhang L. The role of microRNAs in osteoclasts and osteoporosis. *RNA Biol*. 2014;11(11):1355-63. doi.10.1080/15476286.2014.996462.
78. Zhang JF, Fu WM, He ML, Wang H, Wang WM, Yu SC, et al. MiR-637 maintains the balance between adipocytes and osteoblasts by directly targeting Osterix. *Molecular biology of the cell*. 2011;22(21):3955-61. doi.10.1091/mbc.E11-04-0356.
79. Shi K, Lu J, Zhao Y, Wang L, Li J, Qi B, et al. MicroRNA-214 suppresses osteogenic differentiation of C2C12 myoblast cells by targeting Osterix. *Bone*. 2013;55(2):487-94. doi.10.1016/j.bone.2013.04.002.
80. Goettsch C, Rauner M, Pacyna N, Hempel U, Bornstein SR, Hofbauer LC. miR-125b regulates calcification of vascular smooth muscle cells. *The American journal of pathology*. 2011;179(4):1594-600. doi.10.1016/j.ajpath.2011.06.016.
81. Schaap-Oziemlak AM, Raymakers RA, Bergevoet SM, Gilissen C, Jansen BJ, Adema GJ, et al. MicroRNA hsa-miR-135b regulates mineralization in osteogenic differentiation of human unrestricted somatic stem cells. *Stem cells and development*. 2010;19(6):877-85. doi.10.1089/scd.2009.0112.
82. Baglio SR, Devescovi V, Granchi D, Baldini N. MicroRNA expression profiling of human bone marrow mesenchymal stem cells during osteogenic differentiation reveals Osterix regulation by miR-31. *Gene*. 2013;527(1):321-31. doi.10.1016/j.gene.2013.06.021.
83. Sun Q, Liu H, Lin H, Yuan G, Zhang L, Chen Z. MicroRNA-338-3p promotes differentiation of mDPC6T into odontoblast-like cells by targeting Runx2. *Molecular and cellular biochemistry*. 2013;377(1-2):143-9. doi.10.1007/s11010-013-1580-3.
84. Liu H, Sun Q, Wan C, Li L, Zhang L, Chen Z. MicroRNA-338-3p regulates osteogenic differentiation of mouse bone marrow stromal stem cells by targeting Runx2 and Fgfr2. *Journal of cellular physiology*. 2014;229(10):1494-502. doi.10.1002/jcp.24591.
85. Zhang Y, Xie RL, Croce CM, Stein JL, Lian JB, van Wijnen AJ, et al. A program of microRNAs controls osteogenic lineage progression by targeting transcription factor Runx2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011;108(24):9863-8. doi.10.1073/pnas.1018493108.
86. Tome M, Lopez-Romero P, Albo C, Sepulveda JC, Fernandez-Gutierrez B, Dopazo A, et al. miR-335 orchestrates cell proliferation, migration and differentiation in human mesenchymal stem cells. *Cell death and differentiation*. 2011;18(6):985-95. doi.10.1038/cdd.2010.167.

87. Huang J, Zhao L, Xing L, Chen D. MicroRNA-204 regulates Runx2 protein expression and mesenchymal progenitor cell differentiation. *Stem Cells*. 2010;28(2):357-64. doi:10.1002/stem.288.
88. Li Z, Hassan MQ, Volinia S, van Wijnen AJ, Stein JL, Croce CM, et al. A microRNA signature for a BMP2-induced osteoblast lineage commitment program. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008;105(37):13906-11. doi:10.1073/pnas.0804438105.
89. Gamez B, Rodriguez-Carballo E, Bartrons R, Rosa JL, Ventura F. MicroRNA-322 (miR-322) and its target protein Tob2 modulate Osterix (Osx) mRNA stability. *The Journal of biological chemistry*. 2013;288(20):14264-75. doi:10.1074/jbc.M112.432104.
90. Yang L, Cheng P, Chen C, He HB, Xie GQ, Zhou HD, et al. miR-93/Sp7 function loop mediates osteoblast mineralization. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 2012;27(7):1598-606. doi:10.1002/jbmr.1621.
91. Chen Q, Liu W, Sinha KM, Yasuda H, de Crombrughe B. Identification and characterization of microRNAs controlled by the osteoblast-specific transcription factor Osterix. *PloS one*. 2013;8(3):e58104. doi:10.1371/journal.pone.0058104.
92. Ozsolak F, Poling LL, Wang Z, Liu H, Liu XS, Roeder RG, et al. Chromatin structure analyses identify miRNA promoters. *Genes & development*. 2008;22(22):3172-83. doi:10.1101/gad.1706508.
93. Wiebe SH, Hafezi M, Sandhu HS, Sims SM, Dixon SJ. Osteoclast activation in inflammatory periodontal diseases. *Oral diseases*. 1996;2(2):167-80. doi:10.1111/j.1601-0825.1996.tb00218.x.
94. Boyce BF. Advances in osteoclast biology reveal potential new drug targets and new roles for osteoclasts. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 2013;28(4):711-22. doi:10.1002/jbmr.1885.
95. Cekici A, Kantarci A, Hasturk H, Van Dyke TE. Inflammatory and immune pathways in the pathogenesis of periodontal disease. *Periodontology 2000*. 2014;64(1):57-80. doi:10.1111/prd.12002.
96. Lee EJ, Song DH, Kim YJ, Choi B, Chung YH, Kim SM, et al. PTX3 stimulates osteoclastogenesis by increasing osteoblast RANKL production. *Journal of cellular physiology*. 2014;229(11):1744-52. doi:10.1002/jcp.24626.
97. Boyce BF, Xiu Y, Li J, Xing L, Yao Z. NF- $\kappa$ B-Mediated Regulation of Osteoclastogenesis. *Endocrinology and metabolism (Seoul, Korea)*. 2015;30(1):35-44. doi:10.3803/EnM.2015.30.1.35.
98. Teitelbaum SL. Bone resorption by osteoclasts. *Science*. 2000;289(5484):1504-8. doi:10.1126/science.289.5484.1504.
99. Karsenty G, Wagner EF. Reaching a genetic and molecular understanding of skeletal development. *Developmental cell*. 2002;2(4):389-406. doi:10.1016/s1534-5807(02)00157-0.
100. Sugatani T, Hruska KA. MicroRNA-223 is a key factor in osteoclast differentiation. *Journal of cellular biochemistry*. 2007;101(4):996-9. doi:10.1002/jcb.21335.
101. Nakasa T, Shibuya H, Nagata Y, Niimoto T, Ochi M. The inhibitory effect of microRNA-146a expression on bone destruction in collagen-induced arthritis. *Arthritis and rheumatism*. 2011;63(6):1582-90. doi:10.1002/art.30321.

102. Chen C, Cheng P, Xie H, Zhou HD, Wu XP, Liao EY, et al. MiR-503 regulates osteoclastogenesis via targeting RANK. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 2014;29(2):338-47. doi:10.1002/jbmr.2032.
103. Guo LJ, Liao L, Yang L, Li Y, Jiang TJ. MiR-125a TNF receptor-associated factor 6 to inhibit osteoclastogenesis. *Exp Cell Res*. 2014;321(2):142-52. doi:10.1016/j.yexcr.2013.12.001.
104. Sugatani T, Hruska KA. Down-regulation of miR-21 biogenesis by estrogen action contributes to osteoclastic apoptosis. *Journal of cellular biochemistry*. 2013;114(6):1217-22. doi:10.1002/jcb.24471.
105. Shapiro LF, Freeman K. The relationship between estrogen, estrogen receptors and periodontal disease in adult women: a review of the literature. *The New York state dental journal*. 2014;80(3):30-4.
106. Crane JL, Cao X. Bone marrow mesenchymal stem cells and TGF-beta signaling in bone remodeling. *The Journal of clinical investigation*. 2014;124(2):466-72. doi:10.1172/JCI70050.
107. Park D, Spencer JA, Koh BI, Kobayashi T, Fujisaki J, Clemens TL, et al. Endogenous bone marrow MSCs are dynamic, fate-restricted participants in bone maintenance and regeneration. *Cell stem cell*. 2012;10(3):259-72. doi:10.1016/j.stem.2012.02.003.
108. Liu S, Liu D, Chen C, Hamamura K, Moshaverinia A, Yang R, et al. MSC Transplantation Improves Osteopenia via Epigenetic Regulation of Notch Signaling in Lupus. *Cell Metab*. 2015;22(4):606-18. doi:10.1016/j.cmet.2015.08.018.
109. Oryan A, Kamali A, Moshiri A, Baghaban Eslaminejad M. Role of Mesenchymal Stem Cells in Bone Regenerative Medicine: What Is the Evidence? *Cells, tissues, organs*. 2017;204(2):59-83. doi:10.1159/000469704.
110. Takewaki M, Kajiya M, Takeda K, Sasaki S, Motoike S, Komatsu N, et al. MSC/ECM Cellular Complexes Induce Periodontal Tissue Regeneration. *Journal of dental research*. 2017;96(9):984-91. doi:10.1177/0022034517708770.
111. Wang X, Guo B, Li Q, Peng J, Yang Z, Wang A, et al. miR-214 targets ATF4 to inhibit bone formation. *Nat Med*. 2013;19(1):93-100. doi:10.1038/nm.3026.
112. Wang M, Zhao C, Shi H, Zhang B, Zhang L, Zhang X, et al. Deregulated microRNAs in gastric cancer tissue-derived mesenchymal stem cells: novel biomarkers and a mechanism for gastric cancer. *British journal of cancer*. 2014;110(5):1199-210. doi:10.1038/bjc.2014.14.
113. Seo BM, Miura M, Gronthos S, Bartold PM, Batouli S, Brahim J, et al. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet*. 2004;364(9429):149-55. doi:10.1016/S0140-6736(04)16627-0.
114. Yam GH, Peh GS, Singhal S, Goh BT, Mehta JS. Dental stem cells: a future asset of ocular cell therapy. *Expert reviews in molecular medicine*. 2015;17:e20. doi:10.1017/erm.2015.16.
115. Yang N, Li Y, Wang G, Ding Y, Jin Y, Xu Y. Tumor necrosis factor-alpha suppresses adipogenic and osteogenic differentiation of human periodontal ligament stem cell by inhibiting miR-21/Spryl functional axis. *Differentiation; research in biological diversity*. 2017;97:33-43. doi:10.1016/j.diff.2017.08.004.
116. Araujo AA, Souza TO, Moura LM, Brito GA, Aragao KS, Araujo LS, et al. Effect of telmisartan on levels of IL-1, TNF-alpha, down-regulated COX-2, MMP-2, MMP-9

- and RANKL/RANK in an experimental periodontitis model. *Journal of clinical periodontology*. 2013;40(12):1104-11. doi.10.1111/jcpe.12160.
117. Luo Y, Peng X, Duan D, Liu C, Xu X, Zhou X. Epigenetic Regulations in the Pathogenesis of Periodontitis. *Current stem cell research & therapy*. 2018;13(2):144-50. doi.10.2174/1574888X12666170718161740.
118. Marques-Rocha JL, Samblas M, Milagro FI, Bressan J, Martinez JA, Marti A. Noncoding RNAs, cytokines, and inflammation-related diseases. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2015;29(9):3595-611. doi.10.1096/fj.14-260323.
119. Ross AK, Coutinho de Almeida R, Ramos YFM, Li J, Meulenbelt I, Guilak F. The miRNA-mRNA interactome of murine induced pluripotent stem cell-derived chondrocytes in response to inflammatory cytokines. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2020;34(9):11546-61. doi.10.1096/fj.202000889R.
120. Vimalraj S, Arumugam B, Miranda PJ, Selvamurugan N. Runx2: Structure, function, and phosphorylation in osteoblast differentiation. *International journal of biological macromolecules*. 2015;78:202-8. doi.10.1016/j.ijbiomac.2015.04.008.
121. Hu J, Zou WZ, Li L, Shi ZS, Liu XZ, Cai HT, et al. Overexpressing Runx2 of BMSCs Improves the Repairment of knee Cartilage Defects. *Current gene therapy*. 2020;20(5):395-404. doi.10.2174/1566523220666201005110339.
122. Kagiya T. Roles of microRNAs in osteoclast differentiation and function. *Osteoclasts: Cell Biology, Functions and Related Disease*; Reeves, C, Ed. 2015:1-18.
123. Sugatani T, Vacher J, Hruska KA. A microRNA expression signature of osteoclastogenesis. *Blood*. 2011;117(13):3648-57. doi.10.1182/blood-2010-10-311415.
124. Lee YH, Na HS, Jeong SY, Jeong SH, Park HR, Chung J. Comparison of inflammatory microRNA expression in healthy and periodontitis tissues. *Biocell : official journal of the Sociedades Latinoamericanas de Microscopia Electronica et al*. 2011;35(2):43-9.
125. Rossi M, Pitari MR, Amodio N, Di Martino MT, Conforti F, Leone E, et al. miR-29b negatively regulates human osteoclastic cell differentiation and function: implications for the treatment of multiple myeloma-related bone disease. *Journal of cellular physiology*. 2013;228(7):1506-15. doi.10.1002/jcp.24306.
126. Franceschetti T, Kessler CB, Lee SK, Delany AM. miR-29 promotes murine osteoclastogenesis by regulating osteoclast commitment and migration. *The Journal of biological chemistry*. 2013;288(46):33347-60. doi.10.1074/jbc.M113.484568.
127. Mizoguchi F, Murakami Y, Saito T, Miyasaka N, Kohsaka H. miR-31 controls osteoclast formation and bone resorption by targeting RhoA. *Arthritis research & therapy*. 2013;15(5):R102. doi.10.1186/ar4282.
128. Stoecklin-Wasmer C, Guarnieri P, Celenti R, Demmer RT, Kebschull M, Papananou PN. MicroRNAs and their target genes in gingival tissues. *Journal of dental research*. 2012;91(10):934-40. doi.10.1177/0022034512456551.
129. Krzeszinski JY, Wei W, Huynh H, Jin Z, Wang X, Chang TC, et al. miR-34a blocks osteoporosis and bone metastasis by inhibiting osteoclastogenesis and Tgif2. *Nature*. 2014;512(7515):431-5. doi.10.1038/nature13375.
130. Nakamachi Y, Ohnuma K, Uto K, Noguchi Y, Saegusa J, Kawano S. MicroRNA-124 inhibits the progression of adjuvant-induced arthritis in rats. *Annals of the rheumatic diseases*. 2016;75(3):601-8. doi.10.1136/annrheumdis-2014-206417.

131. Lee Y, Kim HJ, Park CK, Kim YG, Lee HJ, Kim JY, et al. MicroRNA-124 regulates osteoclast differentiation. *Bone*. 2013;56(2):383-9. doi:10.1016/j.bone.2013.07.007.
132. de la Rica L, Garcia-Gomez A, Comet NR, Rodriguez-Ubreva J, Ciudad L, Vento-Tormo R, et al. NF-kappaB-direct activation of microRNAs with repressive effects on monocyte-specific genes is critical for osteoclast differentiation. *Genome biology*. 2015;16(1):2. doi:10.1186/s13059-014-0561-5.
133. Ell B, Mercatali L, Ibrahim T, Campbell N, Schwarzenbach H, Pantel K, et al. Tumor-induced osteoclast miRNA changes as regulators and biomarkers of osteolytic bone metastasis. *Cancer cell*. 2013;24(4):542-56. doi:10.1016/j.ccr.2013.09.008.
134. Taganov KD, Boldin MP, Chang KJ, Baltimore D. NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006;103(33):12481-6. doi:10.1073/pnas.0605298103.
135. Cheng P, Chen C, He HB, Hu R, Zhou HD, Xie H, et al. miR-148a regulates osteoclastogenesis by targeting V-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog B. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 2013;28(5):1180-90. doi:10.1002/jbmr.1845.
136. Choi SW, Lee SU, Kim EH, Park SJ, Choi I, Kim TD, et al. Osteoporotic bone of miR-150-deficient mice: Possibly due to low serum OPG-mediated osteoclast activation. *Bone reports*. 2015;3:5-10. doi:10.1016/j.bonr.2015.06.003.
137. Wild JM, Krutzfeldt NO. Neocortical-like organization of avian auditory 'cortex'. Commentary on Wang Y, Brzozowska-Prechtl A, Karten HJ (2010): Laminar and columnar auditory cortex in avian brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 107:12676-12681. *Brain, behavior and evolution*. 2010;76(2):89-92. doi:10.1159/000320215.
138. Zhang J, Zhao H, Chen J, Xia B, Jin Y, Wei W, et al. Interferon-beta-induced miR-155 inhibits osteoclast differentiation by targeting SOCS1 and MITF. *FEBS Lett*. 2012;586(19):3255-62. doi:10.1016/j.febslet.2012.06.047.
139. Sugatani T, Hruska KA. Impaired micro-RNA pathways diminish osteoclast differentiation and function. *The Journal of biological chemistry*. 2009;284(7):4667-78. doi:10.1074/jbc.M805777200.
140. M'Baya-Moutoula E, Louvet L, Metzinger-Le Meuth V, Massy ZA, Metzinger L. High inorganic phosphate concentration inhibits osteoclastogenesis by modulating miR-223. *Biochim Biophys Acta*. 2015;1852(10 Pt A):2202-12. doi:10.1016/j.bbadis.2015.08.003.
141. Zhang Y, Li X. Lipopolysaccharide-regulated production of bone sialoprotein and interleukin-8 in human periodontal ligament fibroblasts: the role of toll-like receptors 2 and 4 and the MAPK pathway. *Journal of periodontal research*. 2015;50(2):141-51. doi:10.1111/jre.12193.
142. Sheedy FJ, Palsson-McDermott E, Hennessy EJ, Martin C, O'Leary JJ, Ruan Q, et al. Negative regulation of TLR4 via targeting of the proinflammatory tumor suppressor PDCD4 by the microRNA miR-21. *Nature immunology*. 2010;11(2):141-7. doi:10.1038/ni.1828.
143. Osta B, Benedetti G, Miossec P. Classical and Paradoxical Effects of TNF-alpha on Bone Homeostasis. *Frontiers in immunology*. 2014;5:48. doi:10.3389/fimmu.2014.00048.

144. Kapinas K, Kessler CB, Delany AM. miR-29 suppression of osteonectin in osteoblasts: regulation during differentiation and by canonical Wnt signaling. *Journal of cellular biochemistry*. 2009;108(1):216-24. doi:10.1002/jcb.22243.
145. Ma X, Becker Buscaglia LE, Barker JR, Li Y. MicroRNAs in NF-kappaB signaling. *Journal of molecular cell biology*. 2011;3(3):159-66. doi:10.1093/jmcb/mjr007.
146. Valastyan S, Weinberg RA. miR-31: a crucial overseer of tumor metastasis and other emerging roles. *Cell cycle (Georgetown, Tex)*. 2010;9(11):2124-9. doi:10.4161/cc.9.11.11843.
147. Itzstein C, Coxon FP, Rogers MJ. The regulation of osteoclast function and bone resorption by small GTPases. *Small GTPases*. 2011;2(3):117-30. doi:10.4161/sgtp.2.3.16453.
148. Honda T, Takahashi N, Miyauchi S, Yamazaki K. Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide induces miR-146a without altering the production of inflammatory cytokines. *Biochemical and biophysical research communications*. 2012;420(4):918-25. doi:10.1016/j.bbrc.2012.03.102.
149. Bala S, Csak T, Momen-Heravi F, Lippai D, Kodys K, Catalano D, et al. Biodistribution and function of extracellular miRNA-155 in mice. *Scientific reports*. 2015;5:10721. doi:10.1038/srep10721.
150. Mann M, Barad O, Agami R, Geiger B, Hornstein E. miRNA-based mechanism for the commitment of multipotent progenitors to a single cellular fate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;107(36):15804-9. doi:10.1073/pnas.0915022107.
151. Kagiya T. MicroRNAs: Potential Biomarkers and Therapeutic Targets for Alveolar Bone Loss in Periodontal Disease. *International journal of molecular sciences*. 2016;17(8). doi:10.3390/ijms17081317.
152. Yagnik K, Mahendra J, Kurian VM. The Periodontal-Cardiovascular alliance: Evaluation of miRNA-146a in subgingival plaque samples of chronic periodontitis patients with and without coronary heart disease. *Journal of investigative and clinical dentistry*. 2019;10(4):e12442. doi:10.1111/jicd.12442.
153. Papageorgiou N, Tousoulis D, Androulakis E, Siasos G, Briasoulis A, Vogiatzi G, et al. The role of microRNAs in cardiovascular disease. *Current medicinal chemistry*. 2012;19(16):2605-10. doi:10.2174/092986712800493048.
154. Sehic A, Tulek A, Khuu C, Nirvani M, Sand LP, Utheim TP. Regulatory roles of microRNAs in human dental tissues. *Gene*. 2017;596:9-18. doi:10.1016/j.gene.2016.10.009.
155. Lukiw WJ, Zhao Y, Cui JG. An NF-kappaB-sensitive micro RNA-146a-mediated inflammatory circuit in Alzheimer disease and in stressed human brain cells. *The Journal of biological chemistry*. 2008;283(46):31315-22. doi:10.1074/jbc.M805371200.
156. Malik R, Mushtaque RS, Siddiqui UA, Younus A, Aziz MA, Humayun C, et al. Association Between Coronary Artery Disease and MicroRNA: Literature Review and Clinical Perspective. *Cureus*. 2017;9(4):e1188. doi:10.7759/cureus.1188.
157. Beck JD, Offenbacher S. Relationships among clinical measures of periodontal disease and their associations with systemic markers. *Annals of periodontology*. 2002;7(1):79-89. doi:10.1902/annals.2002.7.1.79.
158. Tonetti MS, Jepsen S, Jin L, Otomo-Corgel J. Impact of the global burden of periodontal diseases on health, nutrition and wellbeing of mankind: A call for global action. *Journal of clinical periodontology*. 2017;44(5):456-62. doi:10.1111/jcpe.12732.

159. Offenbacher S. Periodontal diseases: pathogenesis. *Annals of periodontology*. 1996;1(1):821-78. doi:10.1902/annals.1996.1.1.821.
160. Libby P, Tabas I, Fredman G, Fisher EA. Inflammation and its resolution as determinants of acute coronary syndromes. *Circulation research*. 2014;114(12):1867-79. doi:10.1161/CIRCRESAHA.114.302699.
161. Hajishengallis G. Periodontitis: from microbial immune subversion to systemic inflammation. *Nature reviews Immunology*. 2015;15(1):30-44. doi:10.1038/nri3785.
162. Zenobia C, Hajishengallis G. *Porphyromonas gingivalis* virulence factors involved in subversion of leukocytes and microbial dysbiosis. *Virulence*. 2015;6(3):236-43. doi:10.1080/21505594.2014.999567.
163. Nahid MA, Pauley KM, Satoh M, Chan EK. miR-146a is critical for endotoxin-induced tolerance: IMPLICATION IN INNATE IMMUNITY. *The Journal of biological chemistry*. 2009;284(50):34590-9. doi:10.1074/jbc.M109.056317.
164. Park H, Huang X, Lu C, Cairo MS, Zhou X. MicroRNA-146a and microRNA-146b regulate human dendritic cell apoptosis and cytokine production by targeting TRAF6 and IRAK1 proteins. *The Journal of biological chemistry*. 2015;290(5):2831-41. doi:10.1074/jbc.M114.591420.
165. Motedayyen H, Ghotloo S, Saffari M, Sattari M, Amid R. Evaluation of MicroRNA-146a and Its Targets in Gingival Tissues of Patients With Chronic Periodontitis. *Journal of periodontology*. 2015;86(12):1380-5. doi:10.1902/jop.2015.150319.
166. Yang K, He YS, Wang XQ, Lu L, Chen QJ, Liu J, et al. MiR-146a inhibits oxidized low-density lipoprotein-induced lipid accumulation and inflammatory response via targeting toll-like receptor 4. *FEBS Lett*. 2011;585(6):854-60. doi:10.1016/j.febslet.2011.02.009.
167. Guo M, Mao X, Ji Q, Lang M, Li S, Peng Y, et al. miR-146a in PBMCs modulates Th1 function in patients with acute coronary syndrome. *Immunology and cell biology*. 2010;88(5):555-64. doi:10.1038/icb.2010.16.
168. Bagavad Gita J, George AV, Pavithra N, Chandrasekaran SC, Latchumanadhas K, Gnanamani A. Dysregulation of miR-146a by periodontal pathogens: A risk for acute coronary syndrome. *Journal of periodontology*. 2019;90(7):756-65. doi:10.1002/JPER.18-0466.
169. Santamaria-Jr M, Bagne L, Zaniboni E, Santamaria MP, Jardini MAN, Felonato M, et al. Diabetes mellitus and periodontitis: Inflammatory response in orthodontic tooth movement. *Orthodontics & craniofacial research*. 2020;23(1):27-34. doi:10.1111/ocr.12340.
170. Preshaw PM, Bissett SM. Periodontitis and diabetes. *British dental journal*. 2019;227(7):577-84. doi:10.1038/s41415-019-0794-5.
171. Elazazy O, Amr K, Abd El Fattah A, Abouzaid M. Evaluation of serum and gingival crevicular fluid microRNA-223, microRNA-203 and microRNA-200b expression in chronic periodontitis patients with and without diabetes type 2. *Archives of oral biology*. 2021;121:104949. doi:10.1016/j.archoralbio.2020.104949.
172. Miranda TS, Heluy SL, Cruz DF, da Silva HDP, Feres M, Figueiredo LC, et al. The ratios of pro-inflammatory to anti-inflammatory cytokines in the serum of chronic periodontitis patients with and without type 2 diabetes and/or smoking habit. *Clinical oral investigations*. 2019;23(2):641-50. doi:10.1007/s00784-018-2471-5.



173. Hatem SA, Nsaif ZN, AL-Rubaei EA. Evaluation of Interleukin IL-16, TNF- $\alpha$ , and VDB Protein Levels in Serum of Patients with Chronic Periodontitis. *Journal of Biochemical Technology*. 2020;11(1):14.
174. Acharya AB, Thakur S, Muddapur MV. Evaluation of serum interleukin-10 levels as a predictor of glycemic alteration in chronic periodontitis and type 2 diabetes mellitus. *Journal of Indian Society of Periodontology*. 2015;19(4):388-92. doi:10.4103/0972-124X.150876.
175. Acharya AB, Thakur S, Muddapur MV, Kulkarni RD. Cytokine ratios in chronic periodontitis and type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Metab Syndr*. 2017;11(4):277-8. doi:10.1016/j.dsx.2016.12.007.
176. Liu L, Xiao Z, Ding W, Wen C, Ge C, Xu K, et al. Relationship between microRNA expression and inflammatory factors in patients with both type 2 diabetes mellitus and periodontal disease. *Am J Transl Res*. 2022;14(9):6627-37.
177. Pan W, Wang Q, Chen Q. The cytokine network involved in the host immune response to periodontitis. *International journal of oral science*. 2019;11(3):30. doi:10.1038/s41368-019-0064-z.
178. Aziz F. The emerging role of miR-223 as novel potential diagnostic and therapeutic target for inflammatory disorders. *Cellular immunology*. 2016;303:1-6. doi:10.1016/j.cellimm.2016.04.003.
179. Bellavia D, De Luca A, Carina V, Costa V, Raimondi L, Salamanna F, et al. Deregulated miRNAs in bone health: Epigenetic roles in osteoporosis. *Bone*. 2019;122:52-75. doi:10.1016/j.bone.2019.02.013.
180. Pastar I, Stojadinovic O, Yin NC, Ramirez H, Nusbaum AG, Sawaya A, et al. Epithelialization in Wound Healing: A Comprehensive Review. *Advances in wound care*. 2014;3(7):445-64. doi:10.1089/wound.2013.0473.
181. Yang L, Engeland CG, Cheng B. Social isolation impairs oral palatal wound healing in sprague-dawley rats: a role for miR-29 and miR-203 via VEGF suppression. *PLoS one*. 2013;8(8):e72359. doi:10.1371/journal.pone.0072359.
182. Ke XF, Fang J, Wu XN, Yu CH. MicroRNA-203 accelerates apoptosis in LPS-stimulated alveolar epithelial cells by targeting PIK3CA. *Biochemical and biophysical research communications*. 2014;450(4):1297-303. doi:10.1016/j.bbrc.2014.06.125.
183. Al-Rawi NH, Al-Marzooq F, Al-Nuaimi AS, Hachim MY, Hamoudi R. Salivary microRNA 155, 146a/b and 203: A pilot study for potentially non-invasive diagnostic biomarkers of periodontitis and diabetes mellitus. *PLoS one*. 2020;15(8):e0237004. doi:10.1371/journal.pone.0237004.
184. Matsui S, Zhou L, Nakayama Y, Mezawa M, Kato A, Suzuki N, et al. MiR-200b attenuates IL-6 production through IKK $\beta$  and ZEB1 in human gingival fibroblasts. *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society [et al]*. 2018;67(11-12):965-73. doi:10.1007/s00011-018-1192-1.
185. Belgardt BF, Ahmed K, Spranger M, Latreille M, Denzler R, Kondratiuk N, et al. The microRNA-200 family regulates pancreatic beta cell survival in type 2 diabetes. *Nat Med*. 2015;21(6):619-27. doi:10.1038/nm.3862.
186. McArthur K, Feng B, Wu Y, Chen S, Chakrabarti S. MicroRNA-200b regulates vascular endothelial growth factor-mediated alterations in diabetic retinopathy. *Diabetes*. 2011;60(4):1314-23. doi:10.2337/db10-1557.
187. Dennison EM, Syddall HE, Aihie Sayer A, Martin HJ, Cooper C, Hertfordshire Cohort Study G. Lipid profile, obesity and bone mineral density: the Hertfordshire

- Cohort Study. *QJM : monthly journal of the Association of Physicians*. 2007;100(5):297-303. doi.10.1093/qjmed/hcm023.
188. Genco RJ, Grossi SG, Ho A, Nishimura F, Murayama Y. A proposed model linking inflammation to obesity, diabetes, and periodontal infections. *Journal of periodontology*. 2005;76(11 Suppl):2075-84. doi.10.1902/jop.2005.76.11-S.2075.
189. Genco RJ, Grossi SG, Ho A, Nishimura F, Murayama Y. A Proposed Model Linking Inflammation to Obesity, Diabetes, and Periodontal Infections. *Journal of periodontology*. 2005;76 Suppl 11S:2075-84. doi.10.1902/jop.2005.76.11-S.2075.
190. Virto L, Cano P, Jimenez-Ortega V, Fernandez-Mateos P, Gonzalez J, Esquifino AI, et al. Obesity and periodontitis: An experimental study to evaluate periodontal and systemic effects of comorbidity. *Journal of periodontology*. 2018;89(2):176-85. doi.10.1902/jop.2017.170355.
191. Dursun E, Akalin FA, Genc T, Cinar N, Erel O, Yildiz BO. Oxidative Stress and Periodontal Disease in Obesity. *Medicine (Baltimore)*. 2016;95(12):e3136. doi.10.1097/MD.00000000000003136.
192. Kalea AZ, Hoteit R, Suvan J, Lovering RC, Palmen J, Cooper JA, et al. Upregulation of gingival tissue miR-200b in obese periodontitis subjects. *Journal of dental research*. 2015;94(3 Suppl):59S-69S. doi.10.1177/0022034514568197.
193. Roos J, Enlund E, Funcke JB, Tews D, Holzmann K, Debatin KM, et al. miR-146a-mediated suppression of the inflammatory response in human adipocytes. *Scientific reports*. 2016;6:38339. doi.10.1038/srep38339.
194. Sanada T, Sano T, Sotomaru Y, Alshargabi R, Yamawaki Y, Yamashita A, et al. Anti-inflammatory effects of miRNA-146a induced in adipose and periodontal tissues. *Biochemistry and biophysics reports*. 2020;22:100757. doi.10.1016/j.bbrep.2020.100757.
195. Blasius AL, Beutler B. Intracellular toll-like receptors. *Immunity*. 2010;32(3):305-15. doi.10.1016/j.immuni.2010.03.012.
196. Yanez-Mo M, Siljander PR, Andreu Z, Zavec AB, Borrás FE, Buzas EI, et al. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *Journal of extracellular vesicles*. 2015;4:27066. doi.10.3402/jev.v4.27066.
197. Cheng L, Sharples RA, Scicluna BJ, Hill AF. Exosomes provide a protective and enriched source of miRNA for biomarker profiling compared to intracellular and cell-free blood. *Journal of extracellular vesicles*. 2014;3. doi.10.3402/jev.v3.23743.
198. Chen X, Ba Y, Ma L, Cai X, Yin Y, Wang K, et al. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell research*. 2008;18(10):997-1006. doi.10.1038/cr.2008.282.
199. Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL, et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008;105(30):10513-8. doi.10.1073/pnas.0804549105.
200. Kagiya T. MicroRNAs and Osteolytic Bone Metastasis: The Roles of MicroRNAs in Tumor-Induced Osteoclast Differentiation. *Journal of clinical medicine*. 2015;4(9):1741-52. doi.10.3390/jcm4091741.
201. Arroyo JD, Chevillet JR, Kroh EM, Ruf IK, Pritchard CC, Gibson DF, et al. Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011;108(12):5003-8. doi.10.1073/pnas.1019055108.

202. Montecalvo A, Larregina AT, Shufesky WJ, Stolz DB, Sullivan ML, Karlsson JM, et al. Mechanism of transfer of functional microRNAs between mouse dendritic cells via exosomes. *Blood*. 2012;119(3):756-66. doi.10.1182/blood-2011-02-338004.
203. Ratajczak J, Miekus K, Kucia M, Zhang J, Reca R, Dvorak P, et al. Embryonic stem cell-derived microvesicles reprogram hematopoietic progenitors: evidence for horizontal transfer of mRNA and protein delivery. *Leukemia*. 2006;20(5):847-56. doi.10.1038/sj.leu.2404132.
204. Valadi H, Ekstrom K, Bossios A, Sjostrand M, Lee JJ, Lotvall JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nature cell biology*. 2007;9(6):654-9. doi.10.1038/ncb1596.
205. Kosaka N, Iguchi H, Yoshioka Y, Takeshita F, Matsuki Y, Ochiya T. Secretory mechanisms and intercellular transfer of microRNAs in living cells. *The Journal of biological chemistry*. 2010;285(23):17442-52. doi.10.1074/jbc.M110.107821.
206. Kagiya T, Taira M. A new application for microarrays: Analysis of global microRNA expression profiles in the extracellular microvesicles of human macrophage-like cells. Nova Science Publishers: New York, NY, USA. 2014:69-80.
207. Cheng Q, Shi X, Han M, Smbatyan G, Lenz HJ, Zhang Y. Reprogramming Exosomes as Nanoscale Controllers of Cellular Immunity. *Journal of the American Chemical Society*. 2018;140(48):16413-7. doi.10.1021/jacs.8b10047.
208. Barile L, Vassalli G. Exosomes: Therapy delivery tools and biomarkers of diseases. *Pharmacology & Therapeutics*. 2017;174:63-78. doi.<https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2017.02.020>.
209. Qin Y, Sun R, Wu C, Wang L, Zhang C. Exosome: A Novel Approach to Stimulate Bone Regeneration through Regulation of Osteogenesis and Angiogenesis. *International journal of molecular sciences*. 2016;17(5). doi.10.3390/ijms17050712.
210. Wang T, Nasser MI, Shen J, Qu S, He Q, Zhao M. Functions of Exosomes in the Triangular Relationship between the Tumor, Inflammation, and Immunity in the Tumor Microenvironment. *Journal of immunology research*. 2019;2019:4197829. doi.10.1155/2019/4197829.
211. Kagiya T, Taira M. Expression of MicroRNAs in the Extracellular Microvesicles of Murine Osteoclasts. *Journal of Oral Tissue Engineering*. 2013;10(3):142-50. doi.10.11223/jarde.10.142.
212. Alexander M, Hu R, Runtsch MC, Kagele DA, Mosbrugger TL, Tolmacheva T, et al. Exosome-delivered microRNAs modulate the inflammatory response to endotoxin. *Nat Commun*. 2015;6:7321. doi.10.1038/ncomms8321.
213. Wang JF, Yu ML, Yu G, Bian JJ, Deng XM, Wan XJ, et al. Serum miR-146a and miR-223 as potential new biomarkers for sepsis. *Biochemical and biophysical research communications*. 2010;394(1):184-8. doi.10.1016/j.bbrc.2010.02.145.
214. Zhou H, Li X, Wu RX, He XT, An Y, Xu XY, et al. Periodontitis-compromised dental pulp stem cells secrete extracellular vesicles carrying miRNA-378a promote local angiogenesis by targeting Sufu to activate the Hedgehog/Gli1 signalling. *Cell proliferation*. 2021;54(5):e13026. doi.10.1111/cpr.13026.
215. Kalluri R, LeBleu VS. The biology, function, and biomedical applications of exosomes. *Science*. 2020;367(6478). doi.10.1126/science.aau6977.
216. Bayraktar R, Van Roosbroeck K, Calin GA. Cell-to-cell communication: microRNAs as hormones. *Molecular oncology*. 2017;11(12):1673-86. doi.10.1002/1878-0261.12144.

217. Gonzalez-King H, Garcia NA, Ontoria-Oviedo I, Ciria M, Montero JA, Sepulveda P. Hypoxia Inducible Factor-1 $\alpha$  Potentiates Jagged 1-Mediated Angiogenesis by Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes. *Stem Cells*. 2017;35(7):1747-59. doi:10.1002/stem.2618.
218. Zhou H, Li X, Yin Y, He XT, An Y, Tian BM, et al. The proangiogenic effects of extracellular vesicles secreted by dental pulp stem cells derived from periodontally compromised teeth. *Stem cell research & therapy*. 2020;11(1):110. doi:10.1186/s13287-020-01614-w.
219. Zhou H, Li X, Yin Y, He XT, An Y, Tian BM, et al. Correction: The proangiogenic effects of extracellular vesicles secreted by dental pulp stem cells derived from periodontally compromised teeth. *Stem cell research & therapy*. 2022;13(1):509. doi:10.1186/s13287-022-03192-5.
220. Xu F, Xiang Q, Huang J, Chen Q, Yu N, Long X, et al. Exosomal miR-423-5p mediates the proangiogenic activity of human adipose-derived stem cells by targeting Sufu. *Stem cell research & therapy*. 2019;10(1):106. doi:10.1186/s13287-019-1196-y.
221. Schroder S, Li Y, Yigit G, Altmuller J, Bader I, Bevot A, et al. Heterozygous truncating variants in SUFU cause congenital ocular motor apraxia. *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics*. 2021;23(2):341-51. doi:10.1038/s41436-020-00979-w.
222. Serpieri V, D'Abrusco F, Dempsey JC, Cheng YH, Arrigoni F, Baker J, et al. SUFU haploinsufficiency causes a recognisable neurodevelopmental phenotype at the mild end of the Joubert syndrome spectrum. *Journal of medical genetics*. 2022;59(9):888-94. doi:10.1136/jmedgenet-2021-108114.
223. Peng Y, Zhang X, Lin H, Deng S, Qin Y, Yuan Y, et al. SUFU mediates EMT and Wnt/beta-catenin signaling pathway activation promoted by miRNA-324-5p in human gastric cancer. *Cell cycle (Georgetown, Tex)*. 2020;19(20):2720-33. doi:10.1080/15384101.2020.1826632.
224. Ma L, Yang X, Wei R, Ye T, Zhou JK, Wen M, et al. MicroRNA-214 promotes hepatic stellate cell activation and liver fibrosis by suppressing Sufu expression. *Cell death & disease*. 2018;9(7):718. doi:10.1038/s41419-018-0752-1.
225. Chen J, Zhou X, Yang J, Sun Q, Liu Y, Li N, et al. Circ-GLI1 promotes metastasis in melanoma through interacting with p70S6K2 to activate Hedgehog/GLI1 and Wnt/beta-catenin pathways and upregulate Cyr61. *Cell death & disease*. 2020;11(7):596. doi:10.1038/s41419-020-02799-x.
226. He S, Yang F, Yang M, An W, Maguire EM, Chen Q, et al. miR-214-3p-Sufu-GLI1 is a novel regulatory axis controlling inflammatory smooth muscle cell differentiation from stem cells and neointimal hyperplasia. *Stem cell research & therapy*. 2020;11(1):465. doi:10.1186/s13287-020-01989-w.
227. Zhang Z, Shen L, Law K, Zhang Z, Liu X, Hua H, et al. Suppressor of Fused Chaperones Gli Proteins To Generate Transcriptional Responses to Sonic Hedgehog Signaling. *Molecular and cellular biology*. 2017;37(3). doi:10.1128/MCB.00421-16.
228. D'Amato C, Rosa R, Marciano R, D'Amato V, Formisano L, Nappi L, et al. Inhibition of Hedgehog signalling by NVP-LDE225 (Erismodegib) interferes with growth and invasion of human renal cell carcinoma cells. *British journal of cancer*. 2014;111(6):1168-79. doi:10.1038/bjc.2014.421.
229. Di Mauro C, Rosa R, D'Amato V, Ciciola P, Servetto A, Marciano R, et al. Hedgehog signalling pathway orchestrates angiogenesis in triple-negative breast cancers. *British journal of cancer*. 2017;116(11):1425-35. doi:10.1038/bjc.2017.116.

230. Nagase T, Nagase M, Machida M, Fujita T. Hedgehog signalling in vascular development. *Angiogenesis*. 2008;11(1):71-7. doi.10.1007/s10456-008-9105-5.
231. Luzuriaga J, Irurzun J, Irastorza I, Unda F, Ibarretxe G, Pineda JR. Vasculogenesis from Human Dental Pulp Stem Cells Grown in Matrigel with Fully Defined Serum-Free Culture Media. *Biomedicines*. 2020;8(11). doi.10.3390/biomedicines8110483.
232. Marrelli M, Codispoti B, Shelton RM, Scheven BA, Cooper PR, Tatullo M, et al. Dental Pulp Stem Cell Mechanoresponsiveness: Effects of Mechanical Stimuli on Dental Pulp Stem Cell Behavior. *Frontiers in physiology*. 2018;9:1685. doi.10.3389/fphys.2018.01685.
233. Ma PX. Biomimetic materials for tissue engineering. *Advanced drug delivery reviews*. 2008;60(2):184-98. doi.10.1016/j.addr.2007.08.041.
234. Stephan SB, Taber AM, Jileeva I, Pegues EP, Sentman CL, Stephan MT. Biopolymer implants enhance the efficacy of adoptive T-cell therapy. *Nature biotechnology*. 2015;33(1):97-101. doi.10.1038/nbt.3104.
235. Perica K, Bieler JG, Schutz C, Varela JC, Douglass J, Skora A, et al. Enrichment and Expansion with Nanoscale Artificial Antigen Presenting Cells for Adoptive Immunotherapy. *ACS nano*. 2015;9(7):6861-71. doi.10.1021/acsnano.5b02829.
236. Liu Q, Chen X, Jia J, Zhang W, Yang T, Wang L, et al. pH-Responsive Poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) Nanoparticles with Rapid Antigen Release Behavior Promote Immune Response. *ACS nano*. 2015;9(5):4925-38. doi.10.1021/nn5066793.
237. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Shimizu J, Yamazaki S, Sakihama T, Itoh M, et al. Immunologic tolerance maintained by CD25+ CD4+ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance. *Immunological reviews*. 2001;182:18-32. doi.10.1034/j.1600-065x.2001.1820102.x.
238. Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell*. 2008;133(5):775-87. doi.10.1016/j.cell.2008.05.009.
239. Liao W, Lin JX, Leonard WJ. IL-2 family cytokines: new insights into the complex roles of IL-2 as a broad regulator of T helper cell differentiation. *Current opinion in immunology*. 2011;23(5):598-604. doi.10.1016/j.coi.2011.08.003.
240. Li MO, Sanjabi S, Flavell RA. Transforming growth factor-beta controls development, homeostasis, and tolerance of T cells by regulatory T cell-dependent and -independent mechanisms. *Immunity*. 2006;25(3):455-71. doi.10.1016/j.immuni.2006.07.011.
241. Jeker LT, Zhou X, Gershberg K, de Kouchkovsky D, Morar MM, Stadthagen G, et al. MicroRNA 10a marks regulatory T cells. *PloS one*. 2012;7(5):e36684. doi.10.1371/journal.pone.0036684.
242. Liu Z, Chen X, Zhang Z, Zhang X, Saunders L, Zhou Y, et al. Nanofibrous Spongy Microspheres To Distinctly Release miRNA and Growth Factors To Enrich Regulatory T Cells and Rescue Periodontal Bone Loss. *ACS nano*. 2018;12(10):9785-99. doi.10.1021/acsnano.7b08976.
243. Kirtane AR, Panyam J. Polymer nanoparticles: Weighing up gene delivery. *Nature nanotechnology*. 2013;8(11):805-6. doi.10.1038/nnano.2013.234.
244. Nayak S, Herzog RW. Progress and prospects: immune responses to viral vectors. *Gene therapy*. 2010;17(3):295-304. doi.10.1038/gt.2009.148.

245. Choi KY, Silvestre OF, Huang X, Min KH, Howard GP, Hida N, et al. Versatile RNA interference nanoplatform for systemic delivery of RNAs. *ACS nano*. 2014;8(5):4559-70. doi.10.1021/nn500085k.
246. Zhang X, Li Y, Chen YE, Chen J, Ma PX. Cell-free 3D scaffold with two-stage delivery of miRNA-26a to regenerate critical-sized bone defects. *Nat Commun*. 2016;7:10376. doi.10.1038/ncomms10376.
247. Kuang R, Zhang Z, Jin X, Hu J, Gupte MJ, Ni L, et al. Nanofibrous spongy microspheres enhance odontogenic differentiation of human dental pulp stem cells. *Advanced healthcare materials*. 2015;4(13):1993-2000. doi.10.1002/adhm.201500308.
248. Feng G, Zhang Z, Dang M, Zhang X, Doleyres Y, Song Y, et al. Injectable nanofibrous spongy microspheres for NR4A1 plasmid DNA transfection to reverse fibrotic degeneration and support disc regeneration. *Biomaterials*. 2017;131:86-97. doi.10.1016/j.biomaterials.2017.03.029.
249. Graves DT, Li J, Cochran DL. Inflammation and uncoupling as mechanisms of periodontal bone loss. *Journal of dental research*. 2011;90(2):143-53. doi.10.1177/0022034510385236.
250. Garlet GP, Cardoso CR, Mariano FS, Claudino M, de Assis GF, Campanelli AP, et al. Regulatory T cells attenuate experimental periodontitis progression in mice. *Journal of clinical periodontology*. 2010;37(7):591-600. doi.10.1111/j.1600-051X.2010.01586.x.
251. Chen VJ, Ma PX. Nano-fibrous poly(L-lactic acid) scaffolds with interconnected spherical macropores. *Biomaterials*. 2004;25(11):2065-73. doi.10.1016/j.biomaterials.2003.08.058.
252. Wei G, Ma PX. Macroporous and nanofibrous polymer scaffolds and polymer/bone-like apatite composite scaffolds generated by sugar spheres. *Journal of biomedical materials research Part A*. 2006;78(2):306-15. doi.10.1002/jbm.a.30704.
253. Woo KM, Chen VJ, Ma PX. Nano-fibrous scaffolding architecture selectively enhances protein adsorption contributing to cell attachment. *Journal of biomedical materials research Part A*. 2003;67(2):531-7. doi.10.1002/jbm.a.10098.
254. Woo KM, Jun JH, Chen VJ, Seo J, Baek JH, Ryoo HM, et al. Nano-fibrous scaffolding promotes osteoblast differentiation and biomineralization. *Biomaterials*. 2007;28(2):335-43. doi.10.1016/j.biomaterials.2006.06.013.
255. Woo KM, Chen VJ, Jung HM, Kim TI, Shin HI, Baek JH, et al. Comparative evaluation of nanofibrous scaffolding for bone regeneration in critical-size calvarial defects. *Tissue engineering Part A*. 2009;15(8):2155-62. doi.10.1089/ten.tea.2008.0433.
256. Smith LA, Liu X, Hu J, Ma PX. The enhancement of human embryonic stem cell osteogenic differentiation with nano-fibrous scaffolding. *Biomaterials*. 2010;31(21):5526-35. doi.10.1016/j.biomaterials.2010.03.065.
257. Smith LA, Liu X, Hu J, Ma PX. The influence of three-dimensional nanofibrous scaffolds on the osteogenic differentiation of embryonic stem cells. *Biomaterials*. 2009;30(13):2516-22. doi.10.1016/j.biomaterials.2009.01.009.
258. Chen VJ, Smith LA, Ma PX. Bone regeneration on computer-designed nanofibrous scaffolds. *Biomaterials*. 2006;27(21):3973-9. doi.10.1016/j.biomaterials.2006.02.043.
259. Huynh A, DuPage M, Priyadharshini B, Sage PT, Quiros J, Borges CM, et al. Control of PI(3) kinase in Treg cells maintains homeostasis and lineage stability. *Nature immunology*. 2015;16(2):188-96. doi.10.1038/ni.3077.

260. Bhattacharya S, Dey D, Roy SS. Molecular mechanism of insulin resistance. *Journal of biosciences*. 2007;32(2):405-13. doi:10.1007/s12038-007-0038-8.
261. Demmer RT, Jacobs DR, Jr., Singh R, Zuk A, Rosenbaum M, Papapanou PN, et al. Periodontal Bacteria and Prediabetes Prevalence in ORIGINS: The Oral Infections, Glucose Intolerance, and Insulin Resistance Study. *Journal of dental research*. 2015;94(9 Suppl):201S-11S. doi:10.1177/0022034515590369.
262. Li Y, Lu Z, Zhang X, Yu H, Kirkwood KL, Lopes-Virella MF, et al. Metabolic syndrome exacerbates inflammation and bone loss in periodontitis. *Journal of dental research*. 2015;94(2):362-70. doi:10.1177/0022034514561658.
263. Gurav AN. Periodontitis and insulin resistance: casual or causal relationship? *Diabetes & metabolism journal*. 2012;36(6):404-11. doi:10.4093/dmj.2012.36.6.404.
264. Beklen A, Ainola M, Hukkanen M, Gurgan C, Sorsa T, Konttinen YT. MMPs, IL-1, and TNF are regulated by IL-17 in periodontitis. *Journal of dental research*. 2007;86(4):347-51. doi:10.1177/154405910708600409.
265. Nakajima T, Ueki-Maruyama K, Oda T, Ohsawa Y, Ito H, Seymour GJ, et al. Regulatory T-cells infiltrate periodontal disease tissues. *Journal of dental research*. 2005;84(7):639-43. doi:10.1177/154405910508400711.
266. Bozec A, Zaiss MM, Kagwiria R, Voll R, Rauh M, Chen Z, et al. T cell costimulation molecules CD80/86 inhibit osteoclast differentiation by inducing the IDO/tryptophan pathway. *Science translational medicine*. 2014;6(235):235ra60. doi:10.1126/scitranslmed.3007764.
267. Ernst CW, Lee JE, Nakanishi T, Karimbux NY, Rezende TM, Stashenko P, et al. Diminished forkhead box P3/CD25 double-positive T regulatory cells are associated with the increased nuclear factor-kappaB ligand (RANKL+) T cells in bone resorption lesion of periodontal disease. *Clinical and experimental immunology*. 2007;148(2):271-80. doi:10.1111/j.1365-2249.2006.03318.x.
268. Bozec A, Zaiss MM. T Regulatory Cells in Bone Remodelling. *Curr Osteoporos Rep*. 2017;15(3):121-5. doi:10.1007/s11914-017-0356-1.
269. Glowacki AJ, Yoshizawa S, Jhunjunwala S, Vieira AE, Garlet GP, Sfeir C, et al. Prevention of inflammation-mediated bone loss in murine and canine periodontal disease via recruitment of regulatory lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013;110(46):18525-30. doi:10.1073/pnas.1302829110.
270. Fleisch H, Russell RG, Francis MD. Diphosphonates inhibit hydroxyapatite dissolution in vitro and bone resorption in tissue culture and in vivo. *Science*. 1969;165(3899):1262-4. doi:10.1126/science.165.3899.1262.
271. Rogers MJ, Gordon S, Benford HL, Coxon FP, Luckman SP, Monkkonen J, et al. Cellular and molecular mechanisms of action of bisphosphonates. *Cancer*. 2000;88(12 Suppl):2961-78. doi:10.1002/1097-0142(20000615)88:12+<2961::aid-cncl12>3.3.co;2-c.
272. Fleisch H. Bisphosphonates in bone disease: from the laboratory to the patient: Elsevier; 2000.
273. Rodan GA, Martin TJ. Therapeutic approaches to bone diseases. *Science*. 2000;289(5484):1508-14. doi:10.1126/science.289.5484.1508.
274. Delmas PD. Treatment of postmenopausal osteoporosis. *Lancet*. 2002;359(9322):2018-26. doi:10.1016/S0140-6736(02)08827-X.

275. Barrett J, Worth E, Bauss F, Epstein S. Ibandronate: a clinical pharmacological and pharmacokinetic update. *Journal of clinical pharmacology*. 2004;44(9):951-65. doi:10.1177/0091270004267594.
276. Fromiguet O, Body JJ. Bisphosphonates influence the proliferation and the maturation of normal human osteoblasts. *J Endocrinol Invest*. 2002;25(6):539-46. doi:10.1007/BF03345497.
277. Im GI, Qureshi SA, Kenney J, Rubash HE, Shanbhag AS. Osteoblast proliferation and maturation by bisphosphonates. *Biomaterials*. 2004;25(18):4105-15. doi:10.1016/j.biomaterials.2003.11.024.
278. Reinholz GG, Getz B, Pederson L, Sanders ES, Subramaniam M, Ingle JN, et al. Bisphosphonates directly regulate cell proliferation, differentiation, and gene expression in human osteoblasts. *Cancer research*. 2000;60(21):6001-7.
279. Plotkin LI, Weinstein RS, Parfitt AM, Roberson PK, Manolagas SC, Bellido T. Prevention of osteocyte and osteoblast apoptosis by bisphosphonates and calcitonin. *The Journal of clinical investigation*. 1999;104(10):1363-74. doi:10.1172/JCI6800.
280. Hofbauer LC, Heufelder AE. Role of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and osteoprotegerin in bone cell biology. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*. 2001;79(5-6):243-53. doi:10.1007/s001090100226.
281. Miyamoto T, Suda T. Differentiation and function of osteoclasts. *The Keio journal of medicine*. 2003;52(1):1-7. doi:10.2302/kjm.52.1.
282. Nojima N, Kobayashi M, Shionome M, Takahashi N, Suda T, Hasegawa K. Fibroblastic cells derived from bovine periodontal ligaments have the phenotypes of osteoblasts. *Journal of periodontal research*. 1990;25(3):179-85. doi:10.1111/j.1600-0765.1990.tb01041.x.
283. Somerman MJ, Young MF, Foster RA, Moehring JM, Imm G, Sauk JJ. Characteristics of human periodontal ligament cells in vitro. *Archives of oral biology*. 1990;35(3):241-7. doi:10.1016/0003-9969(90)90062-f.
284. Nohutcu RM, McCauley LK, Koh AJ, Somerman MJ. Expression of extracellular matrix proteins in human periodontal ligament cells during mineralization in vitro. *Journal of periodontology*. 1997;68(4):320-7. doi:10.1902/jop.1997.68.4.320.
285. Zhou Q, Zhao ZN, Cheng JT, Zhang B, Xu J, Huang F, et al. Ibandronate promotes osteogenic differentiation of periodontal ligament stem cells by regulating the expression of microRNAs. *Biochemical and biophysical research communications*. 2011;404(1):127-32. doi:10.1016/j.bbrc.2010.11.079.
286. Luzi E, Marini F, Sala SC, Tognarini I, Galli G, Brandi ML. Osteogenic differentiation of human adipose tissue-derived stem cells is modulated by the miR-26a targeting of the SMAD1 transcription factor. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 2008;23(2):287-95. doi:10.1359/jbmr.071011.
287. Ohgawara T, Kubota S, Kawaki H, Kondo S, Eguchi T, Kurio N, et al. Regulation of chondrocytic phenotype by micro RNA 18a: involvement of Ccn2/Ctgf as a major target gene. *FEBS Lett*. 2009;583(6):1006-10. doi:10.1016/j.febslet.2009.02.025.
288. Kagiya T, Nakamura S. Expression profiling of microRNAs in RAW264.7 cells treated with a combination of tumor necrosis factor alpha and RANKL during osteoclast differentiation. *Journal of periodontal research*. 2013;48(3):373-85. doi:10.1111/jre.12017.