الجمهورية العربية السورية

جـــــامعـــــــة دمشـــــــــق

كليــــة طـــب الأســـــــنان

قسم علم النسج حول السنية

دراسة التعـدد الشكلـي لمورثـات عامـل النمو المحول ـ بيتا 1 عند المرضى السوريين المصابين بإلتهاب النسج حول السنية الجائح

Study of the Transforming Growth Factor - beta 1 Gene Polymorphisms in Syrian Patients with Aggressive Periodontitis

أطروحة قدمت إلى جامعة دمشق لنيل درجة الماجستير في كلية طب الأسنان

في اختصاص علم النسج حول السنية

إعداد

حسين سعيد علّيق

إشراف

الدكتور علي أبو سليمان

ماجستير

2013 م –1434 هـ

قائمة المحتويات	الصفحة

قائمة الجداول 6

قائمة المخططات..... 7

قائمة الأشكال والصور..... 8

الملخص..... 9

Abstract..... 11

تصريح..... 13

إهداء..... 14

كلمة شكر وعرفان..... 15

الاختصارات..... 17

1.مراجعة الأدبيات..... 19

1. 1. تصنيف الأمراض حول السنية..... 20

1. 2. المرض حول السني الجائح..... 23

1. 3. المرض حول السني المزمن..... 25

1. 4.وبائيات المرض حول السني الجائح..... 28

1. 5. عوامل الخطر في المرض حول السني..... 30

1. 5. 1. محددات الخطر 30

1. 5. 1. 1. العمر 30

1. 5. 1. 2. الجنس..... 31

1. 5. 1. 3. العرق..... 32

1. 5. 1. 4. الحالة الإجتماعية الإقتصادية 33

1. 5. 1. 5. المنطقة الجغرافية..... 33

1. 5. 1. 6. العوامل الوراثية..... 34

1. 5. 2. مؤشرات الخطر 36

1. 5. 2. 1. مستوى الصحة الفموية 36

1. 5. 2. 2. العوامل الموضعية..... 37
1. 5. 2. 3. العوامل النفسية الإجتماعية..... 37
1. 5. 2. 4. البدانة 38
1. 5. 2. 5. السكري..... 39
1. 5. 2. 6. إستهلاك الكحول..... 39
1. 5. 2. 7. التدخين..... 40
1. 5. 2. 8. الجراثيم الممرضة حول السنية 42
1. 6. الإستعداد الوراثي لإلتهاب النسج حول السنية الجائح..... 45
1. 6. 1. الأساس الوراثي لإلتهاب النسج حول السنية الجائح..... 45
1. 6. 2. التباين الوراثي في إلتهاب النسج حول السنية الجائح..... 47
1. 6. 3. التعددات الشكلية وحيدة النيكلوتيد..... 48
1. 6. 4. الدليل على دور الوراثة في إلتهاب النسج حول السنية... 48
1. 6. 4. 1. الدراسات العائلية 49
1. 6. 4. 2. الدراسات على التوائم..... 50
1. 6. 4. 3. تحاليل التوزع 51
1. 6. 4. 4. تحاليل الإرتباط 53
1. 6. 5. المورثات المرشحة للإستعداد للإصابة بالتهاب النسج حول السنية الجائح 54
1. 7. الإستجابة المناعية للمضيف في المرض حول السني 56
1. 7. 1. دور الخلايا المناعية في النسج حول السنية..... 58
1. 7. 2. دور شبكة السيتوكينات في المرض حول السني..... 61
1. 8. عامل النمو المحول- بيتا 1 63
1. 8. 1. بنية مورثة TGF- ß1 وتعدداتها الشكلية..... 64
1. 8. 2. الفعالية الحيوية لعامل النمو المحول- بيتا 1..... 64
1. 8. 3. علاقة TGF- ß1 بالأمراض العامة 65

1. 8. 4. علاقة TGF- ß1 بالمرض حول السني..... 66
1. 8. 5. التعدد الشكلي لمورثة TGF- ß1 وعلاقته بالمرض حول السني 66
2. الهدف من البحث..... 69
3. المواد والطرق 71
3. 1. تصميم الدراسة 72
3. 2. مجتمع الدراسة..... 73
3. 3. التقييم السريري والتشخيص..... 74
3. 4. الفحص الشعاعي..... 76
3. 5. الدراسة المخبرية..... 77
3. 5. 1. جمع العينة..... 77
3. 5. 2. المواد والأدوات المستخدمة في الدراسة المخبرية 77
3. 5. 3. إستخلاص DNA 83
3. 5. 4. التنميط الجيني للتعدد الشكلي لمورثة TGF- ß1 85
3. 5. 4. 1. تحضير المبدئات..... 85
3. 5. 4. 2. تفاعل ARMS – PCR 85
3. 5. 4. 3. الرحلان الكهربائي..... 87
3. 5. 4. 4. التحليل الإحصائي..... 88
4. النتائج 89
4. 1. المعايير السريرية لعينة الدراسة..... 90
4. 2. تحليل نتائج التعدد الشكلي لمورثة عامل النمو المحول- بيتا1..... 95
4. 2. 1. تحليل التعدد الشكلي في الموقع codon 25..... 97
4. 2. 1. تحليل التعدد الشكلي في الموقع codon 10 100
5. المناقشة..... 103
5. 1. منهجية الدراسة 105
5. 2. التعدد الشكلي لمورثة عامل النمو المحول- بيتا1 وعلاقته بالمرض حول السني الإجتياحي 106
6. الإستنتاجات 109
7. الأعمال المستقبلية..... 110
8. المراجع 113

قـائمة الجـداول

1.1. مقارنة الخصائص الرئيسة لأنواع المرض حول السني المزمن والجائح الموضـع والجائـح المعمـــم 27

3. 1. التعددات الشكلية لمورثة TGF- ß1، تسلسل مبدئات ARMS-PCR، حجم ناتج PCR وحرارة التفاعـل 87

4. 1. المعايير السريرية لعينة الدراسـة 91

4. 2. نسب المدخنين ضمن عينة الدراسة 92

4. 3. النسبة المئوية لرتب مشعر عمق السبر في مجموعات الدراسة 93

4. 4. النسبة المئوية لرتب مشعر فقد الإرتباط البشري في مجموعات الدراسة 94

4. 5. تكرار النماط الوراثية المشاهد والمتوقع حسب مبدأ توازن Hardy-Weinberg equilibrium 96

4. 6. تـوزع الـنمط المـورثي والألـيلات للتعـدد الشـكلي لمورثـة TGF-ß1 (codon25) ضمن عينـات الدراســة 99

7.4. توزيـع الأنمـاط الجينيـة والألـيلات للتعـددات الشـكلية لمورثـة TGF-β1 (codon10) ضمن مجموعات الدراســة 102

قـائمة المخططـات

3. 1. تصميم الدراسة 72

4. 1. توزع أفراد العينة ضمن المجموعات حسب الجنس 90

4. 2. توزع أفراد العينة ضمن المجموعات حسب التدخين 92

3.4. نسب الأليلات والأنماط الوراثية للتعددات الشكلية لمورثةTGF-β1 (codon25) 98

4. 4. نسب الأليلات والأنماط الوراثية للتعددات الشكلية لمورثةTGF-β1 (codon10) 101

قـائمة الأشكال والصور

1. 1. العلاقة التقليدية للنمط الظاهري ، البيئة والنمط الوراثي 46

3. 1. عينة دم ضمن أنبوب يحتوي EDTA 80

3. 2. غرفة معزولة يجرى ضمنها العمل 80

3. 3. المثفلة 81

3. 4. Vortex 81

3. 5. جهاز تحليل PCR 82

3. 6. جهاز الرحلان الكهربائي 82

3. 7. UV Transilluminator 83

الملخص

المقدمة: شهدت السنوات الأخيرة ازدياداً مضطرداً في عدد الدراسات التي تقترح علاقةً محتملةً بين التعدد الشكلي لمورثات عامل النمو المحول- بيتا 1 والإصابة بإلتهاب النسج حول السنية الجائح.

الهدف: دراسة نسب إنتشار الأشكال الجينية لعامل النمو المحول- بيتا1 في الموقعين الوراثيين (codon25) 915+و (codon10)869+ عند الأشخاص المصابين وغير المصابين بالمرض حول السني الجائح، والتحقق إذا كان أحد هذه الأنماط يهيئ لزيادة الإصابة.

المواد والطرق: شملت الدراسة 212 شخصاً من مراجعي قسم علم النسج حول السنية-كلية طب الأسنان-جامعة دمشق. تم توزيع المرضى ضمن المجموعات التالية: مجموعة إلتهاب النسج حول السنية الجائح (75 مريضاً)، مجموعة شاهدة غير مصابة مطابقة للمجموعة الأولى (75 فرداً)، مجموعة مقاومة للإصابة (62 فرداً). تم قياس المشعرات السريرية التالية: مشعر عمق السبر، ومشعر مستوى الإرتباط البشري، ومشعر النزف عند السبر، ومشعر إلتهاب اللثة ومشعر اللويحة السنية. تم الحصول على عينة دم وريدي لكل مشارك وتم إستفراد DNA من العينات. إستخدمت تقنية ARMS-PCR للتنميط الوراثي للمورثة لموقعي الدراسة في مورثة عامل النمو المحول- بيتا1، وقد تم ذلك في مخبر الدراسات العليا في قسم علم الحياة الحيوانية- كلية العلوم- جامعة دمشق.

النتائج: لم يكن للفروقات في توزع النمط الوراثي أي دلالة إحصائية بين مجموعات الدراسة ($p>0.05$) وذلك في الموقع(codon 25)915+، بينما في الموقع (codon10)869+ فكان هناك فارق ذو دلالة إحصائية بين نسب الأليلات بين مجموعة المرض حول السني الجائح والمجموعة الشاهدة المطابقة ($p=0,022$) وكذلك بين مجموعة المرض حول السني الجائح والمجموعة المقاومة ($p=0,015$).

الإستنتاجات: تزداد قابلية الإصابة بالمرض حول السني الجائح عند المرضى السوريين الذين لديهم تعدد شكلي لمورثة عامل النمو المحول- بيتا1 في الموقع (codon 10)869+ بينما لا يوجد علاقة بين التعدد الشكلي لمورثة عامل النمو المحول- بيتا 1 في الموقع codon)915+ (25 وزيادة قابلية الإصابة بالمرض حول السني الجائح.

Abstract

Background: There was an exponential increase during recent years in the number of studies investigating a possible relation between the Transforming Growth Factor- beta1 gene polymorphism and aggressive periodontitis.

Aim of the study: To study the prevalence rates of genetic forms of transforming growth factor - beta 1 at positions +915 (codon25) and +869 (codon10) in people infected and non-infected about aggressive periodontitis, and check if one of these patterns lead to increased injury.

Materials and methods: The study included 212 people from the auditors of the Department of periodontology department - Faculty of Dentistry at Damascus University. Patients were distributed among the following groups: aggressive periodontitis group (75 patients), a matched control group (75 individuals) and a resistant group (62 individuals). The following clinical parameters were measured: probing depth index, clinical attachment level index, bleeding on probing index, Gingivitis index and dental plaque index. A venous blood sample has been taken for each participant and the extraction of DNA from the samples was done. ARMS-PCR technique was used for genetic profiling. Our genetic study has been done at the Laboratory of Graduate Studies in the department of animal life - Faculty of Science - University of Damascus.

Results: There was no significant statistical difference in the distribution of genotype between the study groups (p> 0.05) on-site +915 (codon 25), while on-site +869 (codon10) there was a statistically significant difference between the rates of alleles among the aggressive group and matched control group (p=0,022) and among the aggressive group and resistant group (p=0,015).

Conclusion: There was an increased susceptibility of aggressive periodontitis in Syrians who have gene polymorphism of transforming growth factor - Beta 1 on site +869 (codon 10) While there is no relationship between the gene polymorphism of transforming growth factor - Beta 1 on site +915 (codon 25)and increased susceptibility to aggressive periodontitis.

Key words: aggressive periodontitis, TGF-ß1 polymorphism, ARMS-PCR.

تصريح

لا يوجد أي جزء من هذه الأطروحة تم أخذه بالكامل من عمل آخر أو أنجز للحصول على شهادة أخرى في هذه الجامعة أو في أي جامعة أخرى أو أي معهد تعليمي

إهداء

مليكة الدنيا عقيلة النسا.. عديلة الخامس من أهل الكسا..
شريكة الشهيد في مصائبه.. كفيلة السجاد في نوائبـــــه..

مولاتي زينب الكبرى (ع)

لحارسة الشرق ونجمة السماء، التي تفتح يديها للضيف، وترد كيد أعدائها بالسيف..

سوريا الحبيبة

إلى من رعياني بنور قلبهما، وحمياني بحكمتهما، وفرشا طريقي بالورود، ورافقاني في الصعود..

أمـــــي وأبـــــي

جناحاي اللذان بهما أحلّق عالياً، والذخر للصعب من الدهر..

أخواي محمد وعلي

إلى القلوب الطاهرة الرقيقة والنفوس البريئة، إلى ريحانتي حياتي..

أختاي فاطمة وزينب

إن قلت شكراً فشكري لن يوفيكم، كل التحايا والتقدير أهديكم..

ليال جباعي، ازهار الخضر، محمد شكر، محمد صادق الغروي

إلى من آنسني في دراستي، وشاركني أجمل الذكريات..

صديقي د. محمد الحريسي

لرفاق صباحاتي الجميلة، وأصدقائي على الأيام.

د. محمد مهدي، د. فادي اسماعيل، د. هادي اسماعيل،
فؤاد عواضة، وسيم فتوني، علي نصار

كلمة شكر وعرفان

بعض كلمات من القلب، لأهل العلم والفضل...

الدكتور علي أبو سليمان: أجمع ياسمين الشام.. وقندول الجنوب..

وكل ما طاب من شعر ونثر وفخر لأكتب..

على مدى الشام والأيام والأحلام كلها..

وبين الدفاتر والمحابر والمخابر..

وحيث تكون أنت.. يكون العلم والحلم والعطاء..

فشكراً لك أستاذي ومشرفي على ما بذلته معي من

وقت وجهد وتعب أثمر ..

الأستاذة رزان خطاب: وهنا يسكت الكلام وتعجز الأقلام..

فأستاذتي بحر علم وفير وقلب حنون كبير..

فلو أنني أوتيت كل بلاغة وأفنيت بحر النطق في النظم والنثر..

لما كنت بعد القول إلا مقصراً في شكرك أستاذتي الفاضلة..

الدكتور شادي سكرية: غمرني بفضله إذ قبل بإجراء البحث في مخابر الدراسات

العليا في قسم علم الحياة الحيوانية بكلية العلوم، فلولاه لما

أبصر بحثي النور، سهل علي ما صعب من مهمتي، وقدم لي بكل صدق نصائحه العلمية والأكاديمية.. ستبقى في ذاكرتي كوكباً أنار لي الطريق..

كما أتقدم بجزيل الشكر والعرفان والإمتنان للأستاذ المساعد الدكتور سليمان ديوب رئيس قسم علم النسج حول السنية، وكل المحبة والتقدير للأساتذة في القسم على ما تابعونا به خلال دراستنا ولم يبخلوا بالعطاء والتوجيه.

وكل الشكر والمحبة لزملائي وإخوتي طلاب الدراسات العليا في قسم علم النسج حول السنية بكلية طب الأسنان، وطلاب الدراسات العليا في قسم علم الحياة الحيوانية بكلية العلوم.

الإختصارات

A.a	*Aggregatibacter actinomycetemomitans*
AAP	American Academy of Periodontology
AgP	Aggressive periodontitis
BMI	Body mass index
C.r	*Compylobacter rectus*
ChP	Chronic periodontitis
DNA	Deoxyribonucleic acid
E.n	*Eubacterium nodatum*
EOP	Early onset periodontitis
F.n	*Fusobacterium nucleatum*
GAgP	Generalized aggressive periodontitis
GI	Gingival index
GJP	Generalized juvenile periodontitis
IFN	Interferon
IgG	Immunoglobulin G
IgM	Immunoglobulin M
IL-	Interleukin
LAgP	Localized aggressive periodontitis
LJP	Localized juvenile periodontitis
MCP	monocyte chemotaxis protein
MHC	Major histocompatibility complex
NHANES	National Health And Nutrition Examination Survey
NK	Natural killer
OR	Odds ratio
P.g	*Porpyhromonas gingivalis*
P.i	*Prevotella intrmedia*
P.n	*Prevotella nigrescens*
PAL	Periodontal attachment level
BI	Bleeding index
PCR	Polymerase chain reaction
PGE2	Prostaglandin E2
PMNs	Polymorphonuclear leukocytes
PPD	Probing pocket depth
RPP	Rapidly progressive periodontitis
T.d	*Treponema denticola*
T.f	*Tannerella forsythia*

Tc	T cytotoxic
TGF	Transforming growth factor
Th	T helper
TNF	Tumor necrosis factor

1. مراجعة الأدبيات Literature Review

1. 1. تصنيف الأمراض حول السنية Classification of periodontal diseases

أدّى تطوّر فهم الإمراضية السببية للمرض حول السني ، وتطور تقنيات تشخيص حديثة متنوعة إلى تغير تصنيف الأمراض حول السنية على مرّ السنين . تم الإتفاق على تصنيف حديث للمرض في الورشة العالمية لتصنيف المرض حول السني المعقودة بين 30 أكتوبر – 2 نوفمبر 1999 ، ولا يزال هذا التصنيف معتمداً حتى الآن (Armitage 1999) ويشمل:

I. الأمراض اللثوية Gingival Diseases

II. المرض حول السني المزمن Chronic Periodontitis

A. موضع Localized

B. معمم Generalized

III. المرض حول السني الجائح Aggressive Periodontitis

A. موضع Localized

B. معمم Generalized

IV. المرض حول السني كتظاهر لمرض جهازي Periodontitis as a Manifestation of Systemic Diseases

V. إلتهاب النسج حول السنية التموتي Necrotizing Periodontal Disease

VI. خراجات النسج حول السنية Abscesses of the Periodontium

VII. الآفات حول السنية المترافقة مع الآفات اللبية Periodontitis Associated With Endodontic Lesions

VIII. التشوهات والحالات التطورية أو المكتسبة Developmental or Acquired Deformities and Conditions

أول تغيير هام طرأ على هذا التصنيف كان إضافة فقرة جديدة تحت إسم " الأمراض اللثوية " ، من التعديلات الهامة الأخرى، إلغاء التصنيف إعتماداً على العمر والحاجة إلى معرفة معدل تقدم المرض (Armitage 1999) .

إعتماداً على ما سبق تحول مصطلح " التهاب النسج حول السنية الكهلي " Adult Periodontitis إلى " التهاب النسج حول السنية المزمن " Chronic Periodontitis ، إنطلاقاً من أنّ المرض حول السني بطيء التقدم يمكن أن يشاهد في أي عمر ، أما باقي معايير تعريف المرض حول السني الكهلي فبقيت كما هي في المرض حول السني المزمن .

تغير مصطلح " المرض حول السني المبكر " Early – Onset Periodontitis (EOP) ليصبح " التهاب النسج حول السنية الجائح " Aggressive Periodontitis . لقد استعمل مصطلح EOP سابقاً كتعبير وصفي لمجموعة من أمراض النسج حول السنية المخرّبة التي تصيب صغار العمر (قبل البلوغي prepubertal ، والشبابي juvenile ، والمرض حول السني سريع التقدم rapidly progressive periodontitis) فقد دفع ظهور هذه الأمراض لدى صغار السن الباحثين للاعتقاد أنها ذات نشوء مبكر ، لكن مصطلح " مبكر " يتطلب

معرفة عمر المريض عند بدء المرض ، كما أدى إلى وضع حد عمري للمريض حتى يمكن تصنيف إصابته بالمرض حول السني المبكر مما أدى بدوره إلى إرباك الأخصائيين .

بشكل عام فإن المرضى الذين تنطبق عليهم المعايير السريرية لالتهاب النسج حول السنية الشبابي الموضع (Localized Juvenile Periodontitis (LJP أو لإلتهاب النسج حول السنية الشبابي المعمم (Generalized Juveile Periodontitis (GJP أصبحوا الآن يندرجون تحت تصنيف " التهاب النسج حول السنية الجائح الموضع " Localized Aggressive Periodontitis (LAgP) و " إلتهاب النسج حول السنية الجائح المعمم Generalized Aggressive Periodontitis (GAgP) .

لم يعد يستعمل " التهاب النسج حول السنية سريع التقدم " Rapidly Progressive Periodontitis (RPP) ، المرضى الذين كانوا يشخصون سابقاً بالإصابة بهذا المرض أصبحوا يصنفون الآن ضمن مجموعتي التهاب النسج حول السنية الجائح أو المزمن اعتماداً على مجموعة معايير .

اتفق المشاركون في الورشة العالمية على أن الأطفال المصابين بالمرض حول السني دون وجود أي أمراض جهازية ، سوف يصنفون ضمن مجموعتي المرض حول السني الجائح أو المرض حول السني المزمن في التصنيف الحديث ، وذلك اعتماداً على مجموعة من المواصفات الثانوية.

ستعتمد المصطلحات المستخدمة في التصنيف العالمي الحديث للأمراض حول السنية في سياق مراجعة الأدبيات ، لذا عند استعمال بيانات مأخوذة من دراسات ومراجع استعملت المصطلحات القديمة ، سيشار إلى المصطلح القديم بجوار المصطلح الحديث تجنباً للإرباك ، مثلاً سيشار إلى " التهاب النسج حول السنية الشبابي " بمصطلح " التهاب النسج حول السنية الجائح (الشبابي) " .

1. 2. المرض حول السني الجائح Aggressive periodontitis (AgP)

يشمل المرض حول السني الجائح مجموعة من الأمراض المشخّصة لدى مرضى تحت عمر 35 سنة ، ويتصف بوجود تخرب عظمي متقدم ، توزّع مختلف للآفات حول السنية من تلك المشاهدة في المرض حول السني المزمن وميلٌ لحدوث الإصابة في العائلات (Kinane 2001) . عرّفت الاكاديمية الأميركية للعلوم حول السنية عام 2000 (AAP2000) التهاب النسج حول السنية الجائح على أنه مرض يشمل أنواعاً صريحة من التهاب النسج حول السنية ، يصيب أشخاصاً يبدون فيما عدا ذلك وفي أغلب الحالات بصحة جيدة ، وهو يميل للتجمع العائلي وهناك تقدم سريع للمرض . هناك بعض الخصائص الثانوية التي تشاهد بشكل عام في التهاب النسج حول السنية الجائح ولكن ليس في جميع الحالات (Lang et al.1999) ، من ضمن هذه الخصائص الثانوية : خلل في عملية البلعمة ، وفرط استجابة من النمط الظاهري للبالعات الكبيرة، وتقدم في خسارة الارتباط وخسارة العظم قد يمر بمراحل هدوء ذاتي ، وحمل جرثومي غير متناسب مع شدة التخرب في النسج حول السنية .

يمكن أن يحدث المرض حول السني الجائح بشكلين معمم أو موضع يختلفان في عدة نواح من حيث الآلية الإمراضية (Armitage 1999) . تبدأ الإصابة بالمرض حول السني الجائح الموضع (LAgP) في فترة البلوغ عادة ، وتتوضع الإصابة على سنّين أحدهما رحى أولى على الأقل أو على الأرحاء الأولى والقواطع وسنين آخرين على الأكثر ، وغالباً ما تلاحظ استجابة شديدة للأجسام الضدية في المصل تجاه العوامل الإمراضية ، أما المرض حول السني الجائح المعمم (GAgP) ، فيظهر لدى أشخاص تحت عمر الثلاثين ، لكن يمكن أن يشاهد في أعمار أكبر ، وتظهر خسارة معمّمة في الارتباط على ثلاثة أسنان أو أكثر بالإضافة إلى الأرحاء الأولى والقواطع ، وغالباً ما تلاحظ استجابة ضعيفة للأجسام الضدية في المصل تجاه العوامل الممرضة (Tonetti & Mombelli 1999) . يشاهد في كلا النمطين تقدمٌ سريع للتخرب في النسج حول السنية ، وبسبب عدم توفر تشخيص أو علاج مبكر قد يؤدي إلى حدوث حركة واضحة في الأسنان المصابة بسبب التراجع الشديد في الدعم العظمي، وقد يؤدي إلى فقد الأسنان . وجدت بعض الدراسات ارتباطاً بين عدد المواقع المصابة والعمر لدى مجموعات المرض حول السني الموضع ، مما يقترح وجود تحول أو نقلة معتمدة على العمر من الإصابة بالشكل الموضع إلى المعمم (Burmeister *et al.*1984).

تعد الجراثيم ذات دور إمراضي في غاية الأهمية في المرض حول السني الجائح ، ربطت عدة دراسات المرض حول السني الجائح الموضع بانواع من الجراثيم كـ *Aggregatibacter actinomycetemcomitans (A.a) (Actinobacillus)* (Asikainen *et al.*1991).

بينما نفت دراسات أخرى هذه العلاقة (Han *et al.* 1991) . من الفصائل الأخرى المرتبطة بالشكل الموضع من المرض *Tannerella forsythia (Bacteriodes) & Porpyhromonas gingivalis (P.g) Fusobacterium nucleatum & Treponema denticola (T.d) & forsythus (T.f) Prevotella intrmedia(P.i)* .(Darby & Curtis 2001)

كذلك وجد Albandar *et al.* (1997 c) أن النوعين *T.d&P.g* كانت موجودة بنسب مرتفعة جداً لدى مرض التهاب النسج حول السنية الجائح (المبكر) المعمم .

1. 3. المرض حول السني المزمن Chronic periodontitis (ChP)

يعرّف المرض حول السني المزمن بأنه التهاب لثوي يمتد إلى النسج حول السنية ويؤدي إلى تقدم في فقد الارتباط وخسارة العظم (Novak 2002) . تظهر خسارة في الإرتباط السريري بسبب تخرب الرباط والعظم السنخي المجاور ويشخص بتقدم متوسط أو بطيء للمرض قد تتخلله فترات أو مراحل من التخرب السريع (AAP1999) ، في حين كان يعتقد سابقاً أن المرض يمر بمراحل هدوء تتخللها مراحل تخرب شديد وأطلق Socransky *et al.*(1984) على هذه الفرضية فرضية الطور النشط burst hypothesis . يبدأ المرض حول السني بالتهاب لثوي مسبّب باللويحة ، وهي حالة عكوسة قد تتطور إذا لم تعالج إلى المرض حول السني . تشاهد مجموعة من العلامات السريرية من بينها الوذمة والحمامى والنزف اللثوي عند السبر و/أو التقليح ، وتشكل الجيوب حول السنية وفقد الارتباط السريري ، يشاهد بالفحص

الشعاعي فقدٌ في العظم السنخي بشكل أفقي أو زاوي ، وقد تشاهد حركة أو هجرة في الأسنان في المراحل المتقدمة . إن مقدار التخرب في النسج حول السنية متوافق مع مستوى العناية الفموية وحجم اللويحة والعوامل الموضعية المراكمة لها والتدخين وعوامل الخطر الجهازية ، كما أن مقدار الامتصاص العظمي قد يختلف من موقع إلى آخر عند نفس المريض ، حيث يمكن أن يشاهد تخرب شديد في بعض المواقع في حين تكون مواقع أخرى بالكاد مصابة . تحوي اللويحة تحت اللثوية أنواعاً مختلفة من الجراثيم وقد يختلف تركيبها من مريض إلى آخر ومن موقع إلى آخر ، يمكن أن يكون المرض حول السني المزمن موضعاً أو معمماً (Armitage 1999) . تكون الإصابة في المرض حول السني المزمن الموضع (Localized ChP) مقتصرة على 30 % أو أقل من الأسنان ، في حين تشمل الإصابة أكثر من 30 % من الأسنان في المرض حول السني المزمن المعمم (Generalized ChP).

كان المرض حول السني المزمن يسمى التهاب النسج الداعمة الكهلي ، لأنه كان يعتقد أنه لا يشاهد سوى في الأعمار المتقدمة ، لكن الدراسات الوبائية أظهرت أنه أكثر شيوعاً في الأعمار المتقدمة لكنه قد يصيب الأطفال والمراهقين أيضاً وهذا ما اعتمدته الورشة العالمية لعام 1999 ، لذلك من الضروري أن يكون هناك تفريق تشخيصي بين نوعي المرض حول السني المزمن والجائح ، وبحسب (Armitage (2004 فإن عملية التفريق التشخيصي للتمييز بين النوعين تبدأ من خلال التركيز أولاً على كمية ونموذج التخرب حول السني ، وثانياً على عمر المريض وحالته الطبية (الجدول 1.1) .

الجدول 1.1 : مقارنة الخصائص الرئيسة لأنواع المرض حول السني المزمن والجائح الموضع والجائح المعمم

المرض حول السني المزمن	المرض حول السني الجائح الموضع	المرض حول السني الجائح المعمم
أكثر شيوعاً لدى البالغين لكن يمكن مشاهدته لدى الأطفال والمراهقين	عادة ما يظهر في عمر البلوغ	عادة ما يصيب الأشخاص تحت سن الثلاثين لكن يمكن أن يشاهد في أعمار أكبر
سرعة تقدم المرض بطيئة إلى متوسطة	المرض سريع التقدم	المرض سريع التقدم (مراحل متقطعة صريحة للتخرب)
شدة التخرب النسيجي متوافقة مع مستوى اللويحة	شدة التخرب غير متوافقة مع مستوى اللويحة	أحياناً تتوافق كمية اللويحة مع مقدار التخرب النسيجي
التخرب حول السني يختلف من موقع إلى آخر	تتوضع الإصابة في منطقة الأرحاء الأولى والقواطع الدائمة	تشمل الإصابة العديد من الأسنان بالإضافة إلى الأرحاء الأولى والقواطع
لا يلاحظ تجمع عائلي للإصابة	تجمع عائلي واضح	تجمع عائلي واضح
القلح تحت اللثوي موجود في أغلب الحالات	عادة لا يوجد قلح تحت لثوي	قد يشاهد القلح تحت اللثوي وقد لا يشاهد

(مقتبس عن Armitage 2004)

1. 4. وبائيات المرض حول السني الجائح Epidemiology of aggressive periodontitis

عرفت American Academy of periodontology (AAP2005) الوبائيات بأنها " دراسة الصحة والمرض في المجموعات السكانية وكيف تتأثر هاتان الحالتان بالوراثة ، البيئة الفيزيائية ، البيئة الإجتماعية والسلوك الشخصي" .

هناك اختلافات في معدل الإصابة بأمراض النسيج حول السنية في التجمعات السكانية المؤلفة من الشبان أو البالغين في العالم. أوضحت البيانات الوبائية العالمية أن أنماطاً متنوعة من إلتهاب النسج الداعمة الجائح تكون أكثر شيوعاً في البلدان النامية منها في البلدان المتطورة . وكذلك هناك إختلافات هامة في انتشار هذه الأمراض تبعاً للمجموعات العرقية . عمل Albandar & Tinoco (2002) على إجراء دراسة شاملة من أجل تحري البيانات المنشورة حول معدلات إنتشار التهابات النسج الداعمة عند الأفراد في عمر 11–25 سنة وذلك للوصول إلى تقديرات عالمية عن إنتشار التهاب النسج الداعمة الجائح في التجمعات السكنية في مختلف الدول ، وقد ذكروا معدلات الإنتشار التالية :

- 0.5 – 5.0% في أفريقيا
- 0.4 – 1.0% في آسيا
- 0.3 – 1.0% في أميركا الجنوبية
- 0.4 – 0.8% في أميركا الشمالية
- 0.1 – 0.5% في أوروبا الغربية

تم إجراء عدة دراسات وبائية لانتشار المرض حول السني الجائح في سوريا. ففي دراسة (بولص 1996) بلغت نسبة إلتهاب النسج حول السنية الجائح الموضع (الشبابي) في دمشق 5,9% و9,25% في ريفها و 11,38% في محافظات حماه، السويداء وطرطوس.

وفي دراسة (أبو سليمان 2001) وصلت نسبة إلتهاب النسج الداعمة المبكر إلى 20% من مراجعي المراكز الصحية في المحافظات الجنوبية وعيادات أمراض النسج حول السنية في جامعة دمشق.

ووجد (كاظم 2005) أن نسبة الإصابة الإجتياحية في المناطق الوسطى والساحلية من سوريا تصل إلى 2,74% وهذا يؤكد إنتشار المرض من خلال توزع جغرافي معين حيث بلغت نسبة الإصابة الإجتياحية في حماه 4,67%، وفي حمص 2,9%، وفي اللاذقية 2,24% وأخيراً في طرطوس 1,22%.

درس (الشيباني 2011) 1216 طالباً وطالبةً من المرحلة الإعدادية والثانوية في محافظتي السويداء ودرعا وبلغت نسبة المصابين 2,8% من مجمل العينة يتوزعون إلى 1,1% مصاباً بالشكل الموضع و1,7% مصاباً بالشكل المعمم.

1. 5. عوامل الخطر في المرض حول السني Risk Factors for periodontal disease

عرّف Albandar 2002 خطر الإصابة بالمرض حول السني periodontal risk بأنها احتمال الإصابة بالمرض حول السني ، أو حدوث خسارة قابل للقياس في النسج حول السنية خلال فترة زمنية معينة . يستعمل مصطلح محددات الخطر risk determinants لوصف عوامل الخطر التي لا يمكن تعديلها ، في حين يستعمل مصطلح مؤشرات الخطر risk indicators ، لوصف عوامل الخطر القابلة للتعديل (البيئة والعوامل السلوكية والمكتسبة) ، لكن يجب الإشارة إلى أن بعض مؤشرات الخطر التي تم التعرف عليها في الدراسات المقطعية cross sectional studies لم يؤكّد دورها كعامل خطر في الدراسات المطولة longitudinal studies (Beck 1994).

1. 5. 1. محددات الخطر Risk determinants

1. 5. 1. 1. العمر Age :

قدّر Loe & Brown (1991) أن الأطفال بعمر 15 سنة معرضون بشكل أكبر بـ2.3 مرة من الأطفال بعمر 14 سنة للإصابة بالتهاب النسج حول السنية الجائح (المبكر) المعمم ، بينما الأطفال بعمر 16 – 17 سنة معرضون بأكثر بـ 3.3 مرة للإصابة بالتهاب النسج حول السنية الجائح الموضع بالمقارنة مع الذين عمرهم 14 سنة ، بينما وجدا ارتباطاً ضعيفاً بين العمر والتهاب النسج حول السنية المزمن ، ووصلا إلى الاستنتاج أن العمر مؤشر خطر فعال في التهاب النسج حول السنية الجائح . ذكر نموذج مشابه للارتباط بين العمر والمرض حول

السني الجائح في مسح أجراه Albandar *et al.* (2002) على طلاب المدارس في أوغندا . لكن من ناحية أخرى فإن بعض الدارسين يعتبرون أن استعداد الشخص للإصابة بالتهاب النسج حول السنية أكثر أهمية من العمر ، وأن الأشخاص ذوي الاستعداد المرتفع للإصابة يتظاهر لديهم المرض بعمرٍ أبكر (Borrell & Papapanou 2005) .

1. 5. 1. 2. الجنس Gender

أظهرت المسوحات الوبائية epidemiological surveys لدى البالغين بشكل متكرر أن التهاب النسج حول السنية أكثر انتشاراً لدى الذكور منه لدى الإناث في مختلف المجتمعات السكانية، وعزي السبب تقليدياً إلى العناية الفموية الأفضل لدى الإناث و/أو اهتمام النساء بشكل أكبر بالطبابة السنية والفموية (Yu *et al.* 2001) .

من ناحية أخرى فإن هناك اختلافاً كبيراً في الرأي حول ما إذا كان الجنس عامل خطر في التهاب النسج حول السنية لدى الأطفال والمراهقين . أظهرت عدة دراسات حديثة أن هناك انتشاراً أكبر للمرض حول السني الجائح لدى الإناث ، فقد ذكر Lopez *et al.*(1991) نسبة وصلت إلى 1:7 إناث إلى ذكور بين طلاب المدارس بعمر 15 سنة في تشيلي . وبالمثل ذكر Albandar (1993) نسبة 1 : 3.5 بين طلاب المدارس العراقيين بعمر 14 سنة . راجع (Albandar & Rams 2002) عوامل الخطر لدى الأطفال واليافعين ، واقترحا أن وصول الإناث إلى البلوغ في سنّ أبكر من الذكور ، بالإضافة إلى البزوغ الأبكر للأسنان الدائمة لديهم

، قد يكون عاملاً مساهماً في وجود التهاب النسج حول السنية الجائح والمزمن بشكل أكبر لديهن من الذكور خلال المرحلة العمرية البلوغية .

1. 5. 1. 3. العرق Race – Ethnicity :

تظهر المجموعات العرقية المختلفة ضمن الفئات السكانية اختلافاً واضحاً في انتشار المرض حول السني . قيّم Albandar *et al.*(1997a) انتشار التهاب النسج حول السنية الجائح (الشبابي) ، والمزمن (العرضي) ، بين طلاب المدارس في عينة حجمها 14000 طالباً في مدارس الولايات المتحدة الأميريكية ، وجدت الدراسة أن نسبة انتشار الأشكال المبكرة من التهاب النسج حول السنية كانت 7.7 لدى المراهقين من أصل افريقي ، و 3.9 لدى المراهقين من أصل لاتيني ، بالمقارنة مع نسبة 1.3 لدى البيض . راجع Albandar & Tinoco (2002) البيانات المنشورة حول نسب انتشار التهاب النسج حول السنية في الأعمار 11 – 25 سنة في محاولة للوصول إلى تقدير عالمي حول انتشار التهاب النسج حول السنية الجائح (المبكر) في مجموعات عرقية مختلفة حول العالم ، ووصلا إلى النتائج التالية :

1 – 3 % لدى الأفارقة والأمريكيين من أصل أفريقي

0.5 – 1 % لدى اللاتينيين وسكان أميركا الجنوبية

0.4 – 1 % لدى الآسيويين

0.1 – 0.2 % لدى القوقازيين

1. 5. 1. 4. الحالة الإجتماعية الإقتصادية Socio-Economic status

ذكرت عدة دراسات أن الجماعات ذات المستوى الإجتماعي الإقتصادي المتدني (ذوي الدخل المنخفض و/أو التعليم المتدني) لديهم مستوى خطر أعلى للإصابة بالتهاب النسج حول السنية من الأشخاص ذوي المستوى الاجتماعي الاقتصادي المرتفع . قد يعزى ارتفاع مستوى الخطر لدى هذه المجموعات إلى اختلاف القدرة على الحصول على الفرص والموارد التي تؤدي إلى إجراءات وسلوكيات وقائية (Borrel & Papapanou 2005) . فحص Drury *et al.* (1999) البيانات من المسح الوطني الثالث لدراسة الصحة والتغذية في الولايات المتحدة (NHANES) ، وقيّموا المستوى الاجتماعي الاقتصادي للأفراد على مقياس يحدّد مستوى الفرد التعليمي ومستوى العائلة المادي ، ووجدوا مستوىً ذو دلالة إحصائية في فقد الارتباط والنزف اللثوي لدى المجموعات ذات المستوى الاجتماعي الاقتصادي المتدني .

1. 5. 1. 5. المنطقة الجغرافية Geographic region

تظهر المناطق الجغرافية المختلفة اختلافات ملحوظة في البيئة الديموغرافية ، وكذلك قد تختلف في خصائص البيئة المحيطة ، مما قد يسبب اختلافات ملحوظة في حدوث المرض حول السني بين المجتمعات السكانية في هذه المناطق (Loe *et al.*1986) .

إن النتائج من دراسات مثل دراسة Baelum *et al.*(1996) على فقد النسج حول السنية لدى المجتمعات الصينية والكينية ، ودراسة Gjermo *et al.* (2002) على المرض حول السني في أميركا الوسطى والجنوبية ، ودراسة Corbet *et al.* (2002) على المرض حول

السني في آسيا ، تؤكد أن المجتمعات السكانية من مناطق مختلفة في العالم قد يكون لديها مستويات مختلفة من الاستعداد للمرض حول السني .

1. 5. 1. 6. العوامل الوراثية Genetic factors

يعد المرض حول السني من الأمراض المعقدة . تتميز الآلية الإمراضية الفزيولوجية للأمراض المعقدة بوجود عدة مسارات حيوية تؤدي إلى ذات الظاهرة المرضية ، تترافق الأمراض المعقدة بتغيرات في عدة مورثات تساهم كل مورثة منها بشكل بسيط في رفع احتمال خطر تطور المرض ، بالتالي تعد المورثات الممرضة في الأمراض المعقدة مورثات معدلة للمرض ويقدر أن هناك عشرة إلى عشرين مورثة معدّلة للمرض مرتبطة بالمرض حول السني (Hart *et al.* 2000) .

لم يبدأ الاهتمام بوجود دور وراثي في المرض حول السني حديثاً ، فقد أشار Trott & Cross 1966 إلى وجود استعداد أكبر لدى مجموعات معينة من الأشخاص لفقد الأسنان بسبب المرض حول السني من غيرهم من الأشخاص . كما أظهرت عدة دراسات وجود ميل للتجمع العائلي للمرض حول السني ، حيث وجد Loe & Brown 1991 في مسح وبائي في الولايات المتحدة أن الإصابة بالتهاب النسج حول السنية الجائح (المبكر) تميل للتجمع في عائلات معينة مما اقترح وجود أساس وراثي لهذا المرض .

ظهر عدد كبير من الأبحاث منذ أواخر التسعينات حول دور الوراثة كعامل خطر في الإستعداد للإصابة بالمرض حول سني وشدته (Hart & Kornman 1997 ; page 1999) . وجد

Michalowicz *et al.*(2000) في دراسة على 117 زوجاً من التوائم أن احتمال الإصابة بالمرض حول السني المزمن (الكهلي) كان وراثياً بنسبة النصف بعد تعديل عامل اللويحة والتدخين، كما استنتجوا أن الحالة السريرية للنسج حول السنية كانت أكثر تشابهاً لدى التوائم الحقيقين monozygous منها لدى التوائم غير الحقيقين dizygous . كذلك أجريت دراسات مشابهة على المرض حول السني الجائح عند التوائم (Michalowicz 1994) واستنتجت أن الوراثة تؤدي دوراً أهم في الآلية الإمراضية لالتهاب النسج حول السنية الجائح منه في المزمن .

بدأ مؤخراً الاهتمام بالأساس الجزيئي molecular basis للإستعداد للمرض حول السني ، وقد درس ولا زال يُدرس التعدد الشكلي polymorphism للمورثات المسؤولية عن تصنيع البروتينات الهامة في سياق تطور المرض حول السني مثل (Kornman *et al.* 1997a) IL-1 و TNF- α (Soga *et al.*2003) ، حيث وجد أن هذه التغيرات الشكلية تؤدي إلى ارتفاع تراكيز IL-1 TNF-α والتي تلعب دوراً في الآلية الإمراضية لالتهاب النسج حول السنية . شهد العقد الماضي ازدياداً مضطرداً في دراسات التعدد الشكلي لمورثات السيتوكينات وكان من أهم السيتوكينات المدروسة IL-10, IL-4, TGF-β, INF-ɤ (Abou Sulaiman 2006)

1. 5. 2. مؤشرات الخطر Risk indicators

1. 5. 2. 1. مستوى الصحة الفموية Oral hygiene level

أظهرت عدة دراسات بشكل واضح أن مستوى الصحة الفموية في مجتمع ما مرتبط إيجابياً بانتشار وشدة المرض حول السني . أشارت الدراسات الوبائية إلى أن المجموعات ذات مستوى العناية المتدنية بالصحة الفموية لديها انتشاراً أكبر وأشد للمرض حول السني من المجموعات ذات مستوى العناية الفموية الجيدة (Loe et al. 1965) كما وجد Abdellatif *et al*. 1987 أن مستوى العناية الفموية في المجتمع مؤشر خطر مهم للمرض حول السني بغض النظر عن العمر . ووصفت دراسة (Genco *et al*. 1986) ملامح سريرية تضمنت نسبة انتشار وشدة تخرب حول سني غير متوافقة مع كمية اللويحة والقلح فوق وتحت اللثوي . قام Albandar *et al*. (1997b) بتقييم العناية الفموية وارتباطها بالتهاب النسج حول السنية الجائح والمزمن في مجموعة تضمنت 14000 أميركي أعمارهم بين 13− 20 سنة ، ووجدوا أن الأشخاص المصابين بالمرض حول السني لديهم قلح تحت لثوي والتهاب لثوي أكثر من العينة الشاهدة ، بالإضافة إلى ذلك فإن الأشخاص المصابين بالمرض حول السني الجائح لديهم قلح تحت لثوي أكثر من الأشخاص المصابين بالمرض حول السني المزمن .

1. 5. 2. 2. العوامل الموضعية Local factors

يمكن ربط إختلاف مستوى الفقد في النسج حول السنية لدى الشخص نفسه بعدة عوامل ، منها شكل السن ، اصطفاف الأسنان ، شكل وموقع مفترق الجذور ، وتشكل القلح والنخور السنية القريبة من النسج اللثوية ، والرضوض الإطباقية ، نموذج العناية الفموية ، الشكل التشريحي للعظم السنخي ، شكل اللثة ، والتماس بين الأسنان (Kornman & Loe 1993).

قام Albandar *et al*. 1995 بمتابعة مجموعة من المراهقين لثلاث سنوات لدراسة تأثير وجود ونوعية الترميمات السنية ووجود النخور على تشكل وتطور المرض حول السني . أظهرت النتائج أن النخور غير المعالجة المجاورة للنسج اللثوية والترميمات السنية السيئة كانت مترافقة بزيادة حدوث التهاب اللثة وفقد النسج حول السنية خلال فترة الدراسة .

1. 5. 2. 3. العوامل النفسية الاجتماعية Psychosocial factors

إنّ الآلية التي تؤثر فيها الضغوط النفسية الاجتماعية على صحة النسج حول السنية معقدة (Borrell & Papapanou 2005) . لقد اقترح أن إحدى الآليات الممكنة هي أن الضغط النفسي الاجتماعي يؤدي الى خفض تنظيم الاستجابة المناعية الخلوية ، وإعاقة شبكة اتصال الإشارات التي تربط بين الجهاز العصبي والصماوي والمناعي مما يؤدي إلى تراجع استجابة المضيف تجاه المرض حول السني (Breivik *et al*. 1996) من الآليات الأخرى الممكنة المقترحة لتأثير الشدة النفسية على المرض حول السني التغيير في السلوكيات ونمط الحياة التي تؤدي إلى التدخين (Genco *et al*. 1999) ، أو تراجع العناية الفموية ومستوى المتابعة في

المنزل (Deinzer *et al*. 2001) . أشار Sheiham & Nicolau (2005) في مراجعة لتقييم تأثير الشدة النفسية الاجتماعية على المرض حول السني ، إلى بعض العوامل المحرّضة نفسياً والمتعلقة بالإستعداد للمرض حول السني الشديد ، منها التدخين وتراجع العناية الفموية ، وتوصلا إلى أنّ هناك ارتباطاً واضحاً بين المرض حول السني من جهة ، والتوتر والانزعاج والقدرة على التأقلم من جهة أخرى .

1. 5. 2. 4. البدانة Obesity

وثّقت مجموعة من الدراسات ارتباطاً إيجابياً بين البدانة والمرض حول السني . فحص Wood *et al*. 2003 قوقازيين بعمر > 18 سنة من الذين شاركوا في المسح الوطني الثالث للصحة والتغذية (NHANES III) في الولايات المتحدة ، وذكروا أن مشعر كتلة الجسم body mass index (BMI) ، ومعدل الخصر للورك waist-to-hip ratio (WHR) كانا مرتبطين بالتهاب النسج حول السنية (كان مشعر WHR أكثرها ارتباطاً) ، وذلك بعد تعديل عوامل العمر والجنس والتدخين والسكري والوضع الاجتماعي الاقتصادي .

وجد Al-Zahrani *et al*.2003 ارتباطاً ذي دلالة بين BMI و WHR من جهة ، والمرض حول السني من جهة أخرى لدى البالغين الشباب (بعمر 18 – 34 سنة) ، وعلى العكس لم يجدوا ارتباطاً مماثلاً لدى البالغين متوسطي العمر (35 – 59 سنة) والبالغين المتقدمين في العمر (60 – 90 سنة) ، كذلك وجد Alabdulkarim *et al*. 2005 ارتباطاً ذي دلالة بين البدانة والمرض حول السني خاصة لدى الأشخاص الأصغر سناً .

1. 5. 2. 5. السكري Diabetes Mellitus

إن كماً كبيراً من الأدبيات الطبية يطرح ارتباطاً وثيقاً بين السكري والمرض حول السني ، خاصة لدى المرضى ضعاف السيطرة على السكري ، أو المصابين به منذ فترة طويلة (Borrell & Papapanou 2005) . لقد وجد أن قدرة الخلايا الرباطية على تشكيل النسج المتمعدنة منخفضة وتظهر استجابة مشوهة لعوامل النمو لدى المرضى المعتمدين على الإنسولين لمدة طويلة (Hobbs *et al.* 1999) . ظهرت عدة دراسات مؤخراً تشير إلى وجود علاقة متبادلة بين السكري والمرض حول السني ، حيث أن هناك تخرباً حول سني واضح لدى مرضى السكري سواء كانوا معتمدين على الأنسولين أو غير معتمدين عليه (Taylor 2001) . وبشكل عكسي فإن شدة المرض حول السني قد تؤثر في السيطرة على مستوى السكري لدى مرضى السكري المصابين بالتهاب النسج حول السنية .(Grossi 2001)

1. 5. 2. 6. استهلاك الكحول Alcohol consumption

إن المعلومات حول ارتباط تناول الكحول بالمرض حول السني لا تزال قليلة ، أظهرت دراسات قليلة ارتباطاً إيجابياً بين تناول الكحول والمرض حول السني ، لكن على أي حال لا توجد بيانات من دراسات طويلة الأمد متوفرة حالياً حول هذه العلاقة . هناك عدة تفسيرات بيولوجية لتبرير تأثير الكحول على المرض حول السني ، يقوم الكحول بإعاقة وظائف العدلات والبالعات الكبيرة والتائيات مما يؤدي إلى زيادة احتمال حدوث الالتهابات ومنها التهاب النسج حول السنية (Szabo *et al.* 1999) . كما أنه قد يملك تأثيرات سمية مباشرة على النسج حول السنية

(Ogden *et al*. 1999) . أجرى Tezal *et al*. 2004 مسحاً على 13198 شخصاً أعمارهم > 20 سنة في المسح الوطني الثالث للصحة والتغذية في الولايات المتحدة (NHANES III) ، واستنتجوا أن استهلاك الكحول قد يكون مرتبطاً مع الفقد المتزايد للارتباط السريري بنمط معتمد على الجرعة .

1. 5. 2. 7. التدخين Smoking

أصبح معروفاً جيداً من خلال الكم الكبير للأدبيات الطبية أن التدخين عامل خطر مهم في حدوث وتقدم المرض حول السني (Albandar 2002) . في مراجعة للأدبيات الوبائية توصل Gelskey 1999 إلى أن هناك أدلة مؤكدة لارتباط التدخين بالمرض حول السني . في تقرير مأخوذ من المسح الوطني NHANES III قام Tomar & Asma 2000 بالإستفادة من بيانات 12329 أميريكي أعمارهم > 18 سنة لدراسة تأثير تدخين السجائر على انتشار المرض حول السني ، وقدرا أن 41.9 % من معدل انتشار المرض حول السني لدى البالغين الأميريكيين يعزى إلى التدخين الحالي ، و 10.9 % للتدخين سابقاً . بالإضافة الى ذلك وبعد تعديل عوامل العمر والجنس والعرق ومستوى التعليم والدّخل ، وجدا أن التدخين كان مترافقاً مع احتمال خطر أكبر للإصابة بالمرض حول السني لدى المرضى الذين يدخنون حالياً (OR = 4) ، والمرضى الذين كانوا يدخنون في السابق (OR = 1.7). وجد Susin & Albandar 2005 أن المدخنين باعتدال (< 9 سجائر في اليوم) ، أو المدخنين بشدة (> 31 سيجارة يومياً) ، لديهم احتمال اصابة 3.2 بالمرض حول السني الجائح بالمقارنة مع غير المدخنين

لدى مجموعة من سكان الضواحي في البرازيل تتألف من 612 شخصاً أعمارهم 14 – 29 سنة.

1. 5. 2. 8. الجراثيم الممرضة حول السنية Periodontal pathogenic bacteria

أصبح دور جراثيم اللويحة في تسبيب المرض حول السني معروفاً بشكل واسع ، كما أن تركيب الفلورا الجرثومية في الجيوب حول السنية يلعب دوراً مهماً في تحديد شدة وتطور المرض حول السني . تحوي الحفرة الفموية على أعداد هائلة من الجراثيم كجزء من النظام الطبيعي للبيئة الفموية، وتتألف هذه الجراثيم من أنواع عديدة تختلف بشدة في عوامل فوعتها وقدرتها الإمراضية (Haffajee & Socransky 1994) . إقترحت دراسات على المرض حول السني الجائح أن الجراثيم اللاهوائية سلبية الغرام والجراثيم المخيّرة تلعب دوراً مهماً في الآلية الإمراضية لهذا المرض (Slots 1976) . استنتجت الدراسات المبكرة التي بحثت الدور الذي تؤديه الجراثيم في الآلية الإمراضية للمرض حول السني المزمن ، أن كمية الحمل الجرثومي ونواتجها التي تتوضع في النسج حول السنية تلعب دوراً أساسياً في الالتهاب اللثوي والمرض حول السني المزمن والخسارة التالية في الارتباط (Theilade 1986) . وبالرغم من ذلك ظهرت أدلة هامة على أن أنواعاً محددة فقط من الجراثيم هي المسؤولة عن إحداث التخرب النسيجي في المرض حول السني المزمن (Loesche 1988) .

اقتبس Socransky & Haffajee 1994 عن فرضية كوخ واقترحا المعايير المعدّلة التالية لتحديد الجراثيم حول السنية الممرضة :

- يجب أن تظهر العضوية بأعداد أكبر في المواقع حول السنية الفعالة من المواقع حول السنية غير الفعالة .
- إزالة العضوية يجب أن يؤدي إلى إيقاف تقدم المرض .
- يجب أن تملك العضوية عوامل فوعة ذات علاقة بآلية المرض .
- أن تكون العضوية محرّضة لاستجابة مناعية خلوية أو خلطية .
- يجب أن تدل الاختبارات الإمراضية على الحيوانات على امتلاكها قدرة إمراضية.

أشارت الدراسات التي اعتمدت طرق الزرع الجرثومي والفحص المجهري التي كانت سائدة الى مجموعة من العضويات التي يعتقد أن لها دوراً في الأشكال المخربة للمرض حول السني .

ارتبطت ثلاثة أنواع بقوة بالمرض حول السني ، وبتقدم المرض ، والمعالجة غير الناجحة ، هي : *A.a* و *P.g* و *T.f* ، بالتالي أجمع تقرير ورشة العمل العالمية لعلم النسج حول السنية 1996 أن هذه الجراثيم هي عوامل مسببة للمرض حول السني (Offenbacher & Zambon 1996 .)

بالطبع لا يمكن أن تكون هذه الأنواع الثلاثة العوامل الممرضة الوحيدة إنما هي التي جمع عنها الكم الأكبر من الأدلة ، توجد أيضاً أنواع أخرى مرتبطة بالآلية المرضية للمرض حول السني لكن المعلومات حولها ليست بنفس الغزارة والحسم ، من هذه الأنواع :

Eubacterium , P.nigrescens (P.n) , P.i , F.n , Compylobacter rectus (C.r) و *ملتويات* , *Micromanos (Peptostreptococcus) micros , nodatum (E.n)* مختلفة *Spirochetes* (Zambon 1996) .

في دراسة حديثة شكلت حجر الأساس في المفهوم الجديد لدور الجراثيم في الأمراض حول السنية استخدمت تقنية التهجين الوراثي checkerboard DNA – DNA hybridization ، قام Socransky et al. 1998 بتوزيع وتصنيف الجراثيم في مجموعات تضم جراثيم ذات خواص إمراضية مشتركة وقاموا بتصنيفها في مجموعات لونية على الشكل التالي :

- المعقد الأزرق : *Actinomyces*
- المعقد الأصفر : جنس *Streptococcus*
- المعقد الأخضر : فصيلة *Capnocytophaga* و *A.a* و *Eikenella corrodens* و *Campylobacter concisus* .
- المعقد الأرجواني : *Veillonella parvula* و *Actinomyces odontolytics*
- المعقد البرتقالي : فصيلة *Campylobacter* و *Fusobacterium* و *فصيلة Prevotella* و *Eubacterium nodatum* و *Streptococcus constellatos* و *Micromanos micros* .
- المعقد الأحمر : *T.f , P.g , T.d* .

تعد جراثيم المعقدات الأزرق والأصفر والأخضر والأرجواني أولى المستعمرين على سطح السن ، تأتي بعدها جراثيم المعقد البرتقالي التي تشكل الجسر الواصل مع المعقد الأخير ، وهو المعقد الأحمر الذي يلعب الدور الأساسي في تقدم المرض حول السني .

بالرغم من أهمية دور الجراثيم السابقة في المرض حول السني ، إلا أن وجودها وحده لا يكفي لتطور المرض حول السني المتقدم ، لأن ذلك سيعني أن المرض سيشاهد لدى جميع المصابين بها ، لكن على العكس فقد وجدت لدى أشخاص مصابين بالتهاب اللثة فقط أو لديهم تخرب بسيط في النسج حول السنية ، فمثلاً في دراسة موسعة وجد Wolff *et al.* 1993 جراثيم A.a بنسبة 38% و P.i بنسبة 42% لدى 938 مريضاً لم يعانوا من أشكال متقدمة من المرض حول السني وإنما شوهد لديهم إلتهاب لثوي أو درجات بسيطة من المرض حول السني .

نجد مما تقدم أن هناك ضرورة لاستمرار البحث في عوامل الخطر المعروفة وعن عوامل خطر أخرى محتملة ، كما نجد أن التخرب الحاصل في النسج حول السنية لا يمكن ربطه بعامل خطر وحيد ، إنما ينجم عن تضامن مجموعة من عوامل الخطر والتي يختلف تأثيرها من شخص إلى آخر بحسب استعداد susceptibility هذا الشخص للإصابة ، وينجم التخرب النسيجي عن التأثير المباشر لهذه العوامل و/أو عن رد فعل الجهاز المناعي في سياق الاستجابة الالتهابية ضد بعض هذه العوامل .

1. 6. الإستعداد الوراثي لإلتهاب النسج حول السنية الجائح

Genetic predisposition for Aggressive periodontitis

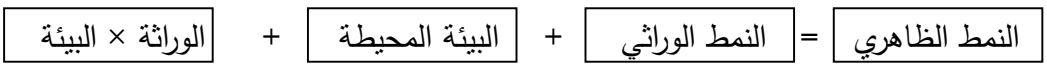
1. 6. 1. الأساس الوراثي لإلتهاب النسج حول السنية الجائح

Genetic basis for aggressive periodontitis

يعد مخطط الجينوم البشري من أهم الإنجازات العلمية التي توصل إليها الإنسان وذلك في العام 2003 . " هذا التسلسل يتضمن شيفرة وراثية في نواة كل خلية من 10 تريليون خلية تؤثر على أجسامنا وسلوكنا وتفكيرنا . ساعد هذا التحديد الوراثي في زيادة الاهتمام والفهم العميق لتشخيص ومعالجة العديد من الأمراض التي تؤثر على الجنس البشري متضمنة الأمراض التي تصيب الحفرة الفموية ". (Nares 2003) كثرت بشكل كبير خلال العشر سنوات الماضية الدراسات التي تناولت تأثير المورثات على أمراض النسج حول السنية . تظهر معظم الأشكال الشائعة لإلتهابات النسج حول السنية كحصيلة لتفاعل الوراثة مع سلوكنا وبيئتنا . يتشارك البشر ويتماثل بحوالي 99.9% من تسلسل DNA ، بينما تختلف ال 0.1% الباقية من شخص لآخر (Stephens *et al.* 2001). على ما يبدو ، فإن هناك إختلافاً صغيراً يمكن أن يتدخل بشكل واضح في قابلية حدوث المرض حول السني إلى فترة زمنية طويلة . إقترحت الدراسات العلمية بالإضافة إلى المشاهدات السريرية أن المخطط الوراثي للمضيف يشكل عاملاً مهماً في قابلية حدوث المرض حول السني وتطوره (Hassell & Harris 1995) من جهة ، يعد إلتهاب النسج حول السنية الجائح كمجموعة مختلفة من الأمراض تشترك بالعلامات السريرية والأعراض

، وبصورة رئيسية بالإلتهاب والتخرب حول السني (Armitage 1999) . كما يعتقد أن جراثيم معينة يجب توافرها لإحداث الإلتهابات حول السنية ، ولكن في معظم الحالات ، تعد الجراثيم النوعية غير كافية لإحداث المرض (Ximene Fyvie *et al.* 2000).

علم الجينوم وهو فرع من علم الوراثة يدرس بنية ووظيفة الجينات بالنظر إلى تسلسل النيكليوتيدات للـ DNA ويقود إلى إكتشاف العوامل الوراثية المتورطة بالمرض . إلا أن المورثات ليست وحدها المؤثرة ، بل هناك تشارك بينها وبين العوامل البيئية في تحديد النمط الظاهري (Guttmacher & Collins 2003) . تظهر المجتمعات البشرية قابلية مختلفة لحدوث عدة أمراض تكون العوامل الوراثية مسؤولة عنها منفردة أو بالتشارك مع العوامل البيئية (صورة 1.1).



صورة 1.1 : العلاقة التقليدية للنمط الظاهري بالبيئة والنمط الوراثي ، يتضمن النمط الظاهري الأمراض حول السنية (موجودة أو غير موجودة) ، بينما يتضمن النمط الوراثي تفاعل الجينات فيما بينها وبين البيئة (مقتبس من Kinane *et al*. 2001)

يستجيب الأشخاص بشكل مختلف للتحديات البيئية ، وهذه الإستجابة المختلفة تتأثر بالمورثات الخاصة بكل فرد ، وبشكل أكثر تحديداً ، فإن الأنماط المختلفة من الجينات (الإختلافات الأليلية) يمكن أن تنتج إختلافات في بنية النسيج (المناعة الخلقية) ، وفي إستجابة الأجسام الضدية (المناعة المكتسبة) وفي الوسائط الإلتهابية . إن الإختلافات الجينية العديدة في

المواقع الجينية المختلفة يمكن أن تؤثر بقابلية الإصابة بالمرض حول السني (Kindane & Hart 2003) .

1. 6. 2. التباين الوراثي في التهاب النسج حول السنية الجائح

Genetic Variance in aggressive periodontitis

قدر عدد المورثات في الجينوم البشري بـ 20000 إلى 25000 مورثة مختلفة في الجينوم البشري والتي يمكن أن تتواجد بأشكال مختلفة (Parra *et al*. 2003) . إستخدم علماء الوراثة مصطلح " Allele" " أليل " للدلالة على الأشكال المختلفة أو تسلسلات DNA التي تتواجد عليها المورثة لدى المجموعات . يشير مصطلح " الطفرات " الوراثية إلى أليلات نادرة تتكرر بنسبة أقل من 1 % . وهي بشكل حتمي تسبب المرض وتؤثر على شكل ووظيفة منتجات هذه المورثات . بينما الاختلافات التي تتكرر في المجتمعات بنسبة أكثر من 1 % يصطلح تسميتها بالتعدد الشكلي تكون الطفرات الوراثية مسؤولة عن معظم الأمراض الوراثية البسيطة ، بينما الأمراض الوراثية المعقدة يمكن أن تنتج عن التأثير المشترك للتعددات الشكلية الوراثية الوظيفية متداخلة مع بعضها ومع العوامل البيئية ، وهي مع مرور الوقت تخفف من خطورة المرض . في هذا النمط من الأمراض المعقدة ، فإن تعدد شكلي وظيفي مفرد مترافق مع مرض (على مستوى المجتمع) ، هو غير كافٍ ليكون سبباً المرض ، ولذلك فهو غير حتمي لحدوث المرض . وبالتالي يمكن مشاهدة هذه التعددات الشكلية الوظيفية عند أشخاص دون أي دليل على وجود المرض أو دون أن يكون هناك خطورة لحدوث المرض . إن الصفات الأساسية أو الجوهرية

للنموذج الوراثي هي أن التعدد الشكلي الوراثي أكثر ظهوراً في المجتمع من الطفرات ، والإرتباط بين التعدد الشكلي الوراثي والمرض هو بشكل عام أضعف من العلاقة بين الطفرات الوراثية الوظيفية والنمط الظاهر للمرض (Hodge & Michalowiz 2001) .

1. 6. 3. التعددات الشكلية وحيدة النيكلوتيد Single nucleotide polymorphisms

إن التعددات الشكلية وحيدة النيكلوتيد SNPs هي موضوع بحث مكثف في الطب وفي علم النسج حول السنية ، تقدر هذه التعددات بحوالي 10 مليون في الجينوم البشري ، حددت دراسة حديثة 1.42 مليون تعدد شكلي وحيد النيكلوتيد في الجينوم البشري (Sachidanandam *et al.* 2001) . يظهر SNP في موقع زوج أساسي وحيد في الجينوم البشري كل 100 – 1000 زوج أساسي ، ويختلف من شخص لآخر نتيجة الحذوفات ، الإدخالات أو الاستبدالات. تحدث هذه التعددات بالحد الأدنى عند 1% من المجتمع ، وبالحقيقة فإن أمراض كثيرة مرتبطة بالتعدد الشكلي للمورثات في الجينوم البشري ، وأن معدل الطفرات للتعددات الشكلية وحيدة النيكلوتيد ينخفض من جيل لآخر (Kurk & Gu 1999) .

تظهر SNPs في الجينوم البشري ، وربما تظهر في مناطق ترميز البروتين (exons) أو في المناطق غير المرمزة (الإنترونات والمنطقة المرمزة). معظم SNPs التي تظهر في الجينات ليس لها تأثير على البروتينات المرمزة ، ولكن هناك عدد كبير من SNPs لديها تأثير على ناتج المورثة .

1. 6. 4. الدليل على دور الوراثة في التهاب النسج حول السنية Evidence for a genetic role in aggressive periodontitis

1. 6. 4. 1. الدراسات العائلية Family Studies

إن التجمع العائلي للمرض يقترح وجود آلية إمراضية وراثية ، يمكن تقييم مقدار التجمع العائلي للمرض أو خطر إصابة العائلة من خلال مقارنة خطورة حدوث المرض عند أقرباء المريض من الدرجة الأولى مع إمكانية حدوثه في بقية المجتمع . إن معدل خطورة يساوي "1" لا يشير إلى وجود تجمع عائلي للمرض . انطلاقاً من أن أفراد العائلة يشاركون في المورثات والبيئة المحيطة ، فإن المعلومات المستقاة من العائلات الكبيرة يمكن استخدامها لفهم التأثيرات النسبية للعوامل الوراثية والبيئية على المرض أو الإضطراب (Vyse & Todd1996) يوجد في الأدب الطبي مقالات عديدة معتبرة حول التجمع العائلي للمرض حول السني . إن الصفة العائلية لإلتهاب النسج حول السنية الجائح قد سجلت في عدد من الدراسات خلال العقود الماضية (Butler 1969 ; Jorgenson *et al*. 1975 ; Beaty *et al.*1987 ; Marazita *et al*. 1994)

أفادت بعض الدراسات أن إلتهاب النسج حول السنية الجائح (المبكر) المعمم والموضع ، والتهاب النسج حول السنية المزمن (الكهلي) يمكن أن يتواجد ضمن نفس العائلة (Spektor *et al*.1985 ; Lopez 1992 ; Boughman *et al.*1992)

إضافة إلى ذلك ، فإن التجمع العائلي للمرض حول السني يمكن أن يعكس تعرض الأشخاص لعوامل بيئية مشتركة تتضمن هذه العوامل البيئية المشتركة : الحمية، والتغذية، والثقافة،

والتأثيرات الإجتماعية الإقتصادية، والصحة الفموية، والملوثات، والأمراض (كالسكري) والسلوك الشخصي (كالتدخين). بعض مظاهر هذا السلوك لا يتم تحديدها من قبل علم الوراثة ، والتي يمكن أن تؤثر على العوامل المعدلة كالثقافة ونمط الحياة والصحة الفموية (Kinane *et al*. 2005)

1. 6. 4. 2. الدراسات على التوائم Twin Studies

تؤمن دراسات التوائم وسيلة قيمة من أجل فحص الأسس الوراثية للمرض ومن أجل توزيع المساهمة النسبية للمورثات والعوامل البيئية . تنشأ التوائم الحقيقية من بيضة ملقحة واحدة ، وهي متماثلة وراثياً بشكل تام ، بينما تنشأ التوائم غير الحقيقية من بيضتين مختلفتين وتشترك في المورثات بنسبة 5 % فقط . إن إختلاف التوافق بين التوائم الحقيقية وغير الحقيقية من أجل نمط ظاهري معين يمكن إستخدامه لتقدير التوزع النسبي للجينات والعوامل البيئية المحدثة للمرض . تناولت معظم دراسات التوائم الشكل الأكثر شيوعاً للمرض حول السني وهو التهاب النسج حول السنية المزمن .

درس (Corey *et al*. 1993) الصحة حول السنية عند 4908 زوجاً من التوائم ووجدوا أن 420 عنصراً (متوسط العمر 31.4 ± 5.7 سنوات) مؤلفين من 116 توأم حقيقي و 233 توأم غير حقيقي لديهم قصة مرض حول سني . إن مستوى التشابه في حدوث المرض تراوح من 0.23 إلى 0.38 عند التوائم الحقيقية بينما كان أقل بكثير عند التوائم غير الحقيقية (0.08 – 0.16) .

وهذا ما جعلهم يقترحون أن العوامل الوراثية ضرورية ومهمة لتسجيل حدوث المرض ، على أية حال لم يؤخذ التدخين بالإعتبار في هذه الدراسة ، كذلك لم يتم ضبط عاملي العمر والجنس والذي يمكن أن يظهر تحيز الدراسة حيال معرفة مدى الارتباط بين التوائم .

قدر (Michalowicz *et al*.1991) أن 38 إلى 82 % من الإختلاف في المشعرات السريرية للمرض حول السني يمكن أن يكون على صلة بالعوامل الوراثية عند التوائم الحقيقية مع قصة مرض حول سنية مقارنة مع التوائم غير الحقيقية بعلاقة مع كلاً من شدة المرض وانتشاره . وفي دراسة لاحقة ، توصل (Michalowicz *et al*. 2000) الى أن حالة النسج حول السنية كانت أكثر تشابهاً عند التوائم الحقيقية منها عند التوائم غير الحقيقية . على الرغم من أن هذا يقترح دوراً مهماً للعوامل الوراثية في التهاب النسج حول السنية المزمن ، فإن معلومات أخرى تقترح أن العوامل الوراثية يمكن أن تلعب دوراً أكبر في الآلية الإمراضية لفقدان النسج حول السنية في إلتهابات النسج حول السنية الجائحة (Michalowicz 1994)

1. 6. 4. 3. تحاليل التوزع Segregation Analysis

تمر الجينات من الآباء إلى الأبناء بطريقة متنبأ بها ، فغالباً ما تتجزأ وتتوزع ضمن العائلات حسب قوانين مندل . تقيّم تحاليل الفصل العلاقة الداعمة لطرق الانتقال المختلفة وذلك لتحديد أية طريقة يمكن أن تفسر سمات العائلة ، يطبق إختصاصيو الوراثة تحاليل الفصل لتحديد فيما إذا كان انتقال السمات يتبع قوانين مندل أو نوع آخر من أنواع الانتقال الجيني (Kinane *et al*. 2005) .

تعتمد تحاليل الفصل على افتراضات التحاليل وتحتاج إلى تعرف سريري دقيق بين العينات المصابة والروابط العائلية ، وإذا استخدمت معلومات أو افتراضات غير صحيحة فإن النتائج ستعكس ذلك . فحص (Melnick *et al.* 1976) معلومات عن 19 قريب من عائلة واحدة مصابين بالمرض فوجد أنه لا توجد انتقالات من الآباء إلى الأبناء وأن نسبة الإناث المصابين للذكور هي 1:2 . وبناءً عليه اقترحوا أن التهاب النسج حول السنية الجائح (المبكر) هو صفة غالبة مرتبطة بالمورثة X مع قابلية انتقال ضعيفة . وقد أكدت هذه النتيجة الدراسات على العائلات الكبيرة مع نسبة ظهور كبيرة للإلتهاب النسيج حول السنية الجائح (Page et al. 1985 ; Spektor *et al.* 1985) . لكن تم انتقاد هذه الدراسات المبكرة لإلتهاب النسج حول السنية الجائح نظراً لكونها قد أعيقت بسبب مشاكل التصنيف التشخيصي والمبالغة في إظهار إصابة الإناث (Hark *et al.* 1991) ، أو بالدعم الخاطئ للإنتقال على المورثة X (Hark *et al.* 1992)

فحص (Saxen 1980) 31 عائلة واستنتج أن إلتهاب النسج حول السنية الجائح (المبكر) يبدو أنه موروث كصفة متنحية متعلقة بالصبغيات الجسدية مع قابلية عالية في اللواقح المتماثلة.

تم تأكيد هذه النتائج في دراسات لاحقة لثلاثين عائلة (Saxen & Nevanlinna 1984) أما النظرة الحالية لأخصائيي الوراثة هي أن التهاب النسج حول السنية الاجتياحي الموضع والمعمم

يعود على الأغلب لانتقال جيني موضع على الصبغي الجسدي وبنمط سائد مع قابلية نفوذ متدنية (Kinane *et al*. 2005 ; Hodge & Michalowicz 2001) .

1. 6. 4. 4. تحاليل الإرتباط Linkage Analysis

تحاليل الربط هي آلية تستخدم لتحديد المورثة المسؤولة عن صفة معينة وتحديد موقعها الكروموزومي ، ترتكز الدراسات الوراثية الارتباطية على حقيقة كون الآليات في المورثات الموجودة على نفس الكروموزوم في مناطق متجاورة تميل لأن تنتقل من جيل لآخر كوحدة ، وتسمى هذه المورثات " المرتبطة " وهي تخرق قوانين مندل حول التصانيف المستقلة (Greenberg 1993) .

يستطيع العلماء اختبار فيما إذا كانت السمة تظهر بشكل معزول في أسلوب ثابت للترابط بالنسبة لعلاقة وراثية معروفة ، يستطيع تحليل الترابط إثبات الأسس الوراثية لمرض ما، عندما يكتشف الربط فإن المورثة المسؤولة عن السمة يمكن أن تتوضع إلى جانب التعدد الشكلي المورثي بسبب كون الموقع الكروموزومي الدقيق للعلاقة المورثية معروف ، ويستخدم الارتباط غالباً كخطوة أولى لتحديد الموقع التقريبي للمورثة التي نريد معرفتها ، سامحة بذلك للدراسات اللاحقة بتحديد الطفرة المسؤولة عن السمة المرضية (Kinane *et al*.2005)

تمت دراسة الإرتباط لإلتهاب النسج حول السنية الجائح لعدد قليل من العائلات ، حدد (Boughman *et al*.1986) النمط السائد المتعلق بالصبغي الجسدي لإلتهاب النسج حول السنية الجائح عند خمسة أجيال من عائلة من ماري لاند الجنوبية في الولايات المتحدة

الأميريكية ، وقد وجدوا أن كلا من النمط III لسوء تكون العاج والتهاب النسج حول السنية الجائح الموضع يمكن فصلهما كمظاهر سائدة ، وبما أن المورثة المسؤولة عن سوء تكون العاج نمط III قد ربطت الى الكروموزوم 4 ، فقد تم تطبيق إختبارات الإرتباط على هذا الكروموزوم ، وقد أظهر ارتباطاً وثيقاً مع التهابات النسج حول السنية الجائحة الموضعة. حديثاً ، وصف (Li *et al.*2004) مورثة مسؤولة عن التهاب النسج حول السنية الجائح الموضع موجودة على الكروموزوم1q 25 .

1. 6. 5. المورثات المرشحة للإستعداد للإصابة بإلتهاب النسج حول السنية الجائح

Candidate genes for susceptibility to aggressive periodontitis

إن تواتر التعدد الشكلي للمورثات المرشحة والتي يلعب بروتينها المنتج دوراً في الإستجابة المناعية أو الإلتهابية يمكن مقارنته بين الحالات المرضية والحالات الشاهدة ، إن فرقاً ذو دلالة لتعدد شكلي محدد بين مجموعة مريضة ومجموعة شاهدة هو دليل على أن هذه المورثة تلعب دوراً في تحديد قابلية الإصابة بالمرض ، وتشير هذه المشاركة إلى إما كون المورثة تؤثر مباشرة بالإصابة بالمرض أو أنها تكون خلل توازن إرتباطي (قريب جداً) للموقع المصاب (Safaer 1990) .

وجدت عدة تعددات شكلية لمورثات ذات إرتباط بإلتهاب النسج حول السنية الجائح. أفاد (Hening *et al.*1999) أن التعدد الشكلي لمورثة مستقبل فيتامين د (VDR) له علاقة مع كل

من الكثافة المعدنية العظيمة ومعدل استقلاب العظم وتم ربطهما بإلتهاب النسج حول السنية الجائح الموضع وليس المعمم .

وقد تم مقارنة وجود التعدد الشكلي لمورثة (N-formyl – methyl – leucyl – plenylolanine) f M L P مع عدة أنماط من المرض حول السني ، ووجد أن مرضى إلتهاب النسيج حول السنية الجائح الموضع لديهم بشكل دائم تغيرين في نيكلوتيدين مفردين غير موجودين عند العينة الشاهدة ، وبناء على هذه النتائج ، فقد استنتج (Gwinn *et al*. 1999) أن التعدد الشكلي لهذه المورثة يمكن أن يسبب تغيراً في الحمض الأميني وبالتالي تغير في بنية مستقبل fMLP ، وهذا بدوره يؤثر على تفعيل البروتين G وارتباط الربيطة ، والتي تؤدي إلى انخفاض في الجذب الكيميائي للعدلات وجنوح نحو الإصابة بالمرض حول السني .

فحص (Kobayashi *et al*. 2000) مستقبلات Fc Gamma عند المرضى اليابانيين ووجد أن التعددات الشكلية لمورثات FcɣRIIIa (158F) & FcɣRIIIb (NA2) مرتبطة بإرتفاع خطورة الإصابة بإلتهاب النسج حول السنية الجائح .

وقد تم الكشف عن إرتباط ما بين التعدد الشكلي لمورثات مستضدات HLA النمط I و II وبين المرض حول السني . وجد (Bonfil *et al*. 1999) إرتباطاً بين التعدد الشكلي لمورثة HLA – DR4 وإلتهاب النسج حول السنية الجائح المعمم (الشبابي) فيما أفادت دراسات أخرى عن إرتباط واضح بين مورثات (Takashiba *et al*.1996) HLA-DQß1 (Obyama *et al*.1999)HLA-DRß1 وبين التهاب النسيج حول السنية الجائح .

خلال العقد الماضي هناك الكثير من الدراسات التي تحرت عن ارتباط التعدد الشكلي لمورثات السيتوكينات مع زيادة توقع الإصابة بإلتهاب النسج حول السنية المزمن أو الجائح ، وهذا ما سيتم مناقشته بشكل مفصل لاحقاً في هذه المراجعة .

1. 7. الإستجابة المناعية للمضيف في المرض حول السني

Host immune response in periodontal disease

تنقسم الإستجابة المناعية إلى قسمين رئيسين هما المناعة الطبيعية (غير النوعية) ، والمناعة المكتسبة (النوعية) . تكون المناعة الطبيعية موجودة منذ الولادة ، قبل التعرض للعوامل والأجسام الممرضة مثل الجراثيم وغيرها من الأجسام الأجنبية ، وتشكل الخط الدفاعي الأول ضد العوامل الإمراضية . تتميز هذه المناعة بالسرعة ، لكن ينقصها النوعية والذاكرة وقد تسبب الأذية النسيجية للمضيف (Kinane *et al.* 2001) . تتضمن المناعة الطبيعية مجموعة من العناصر ، منها الحواجز الفيزيائية والخلايا البالعة phagocytic cells والكريات البيضاء الحمضية eosinophils والخلايا الفاتكة الطبيعية natural killers (NK) والعديد من الجزئيات المحمولة في الدم. ينبغي للعوامل الإمراضية أن تجتاز حاجزاً ظهارياً فعالاً مؤلفاً من اللثة والظهارة الميزابية وظهارة الارتباط لكي تغزو النسج حول السنية . تعتبر البروتينات والحموض الدسمة التي يفرزها الجدار الخلوي في النسج الظهارية سامة للعديد من الجراثيم ، كما أن الإفراز المستمر للعاب يؤمن نوعاً من الغسل للحفرة الفموية ، وكذلك يؤمن مردوداً مستمراً من الراصات agglutinits والأجسام الضدية النوعية specific antibodies . بالمثل فإن السائل الميزابي

اللثوي يغسل الميزاب اللثوي ويوصل جميع مكونات المصل ومنها عناصر المتممة complements والأجسام الضدية النوعية (Sahingur & Cohen 2004) .تعد الخلايا البالعة أحد العناصر الرئيسة القادرة على تدمير العناصر الغازية في الدم والنسج والتي تتضمن الكريات البيضاء عديدة النوى polymorphonuclear leukocytes (PMNs) أو العدلات neutrophils ، ووحيدات النوى monocytes البالعات الكبيرة macrophages ، والفاتكة الطبيعية. ومن العناصر أيضاً المركبات المنحلة تتضمن الليزوزيمات والببتيدات المضادة للجراثيم والسيتوكينات وبروتينات المرحلة الحادة وعناصر المتممة . هذه المركبات قادرة على تدمير جدران الخلايا الجرثومية أو المساعدة في عملية البلعمة أو استدعاء الخلايا الدفاعية .

نواتج الإستقلاب وعديدات السكاكر الشحمية للجراثيم سلبية الغرام قادرة على تحريض الاستجابة الالتهابية والمناعية ، الاستجابة المناعية ستؤدي إلى تحرير السيتوكينات والوسائط المعززة للإلتهاب proinflamatory والتي بدورها ستؤدي إلى زيادة الالتهاب وبالتالي تكون أكثر إيذاءً للمضيف (Kornman *et al*. 1997b). تتمثل الاستجابة المناعية الأولية النموذجية التالية للعدوى في النسج حول السنية باستدعاء وهجرة الكريات البيضاء عديدة النوى إلى موقع العدوى ، يمكن أن تنحصر النتائج السريرية بالتهاب اللثة إذا استطاعت عديدات النوى أن تدمر العناصر الممرضة بنجاح من خلال البلعمة الخلوية phagocytosis وآليات القتل داخل الخلوي . ولكن يمكن للإلتهاب أن ينتقل من التهاب لثة إلى التهاب نسج حول سنية إذا تم تجنب الآليات السابقة . في هذه المرحلة يمكن لإنتاج الأجسام الضدية من قبل الخلايا البلازمية plasma

cells أن يحد من الالتهاب . في النهاية إذا فشلت عديدات النوى والأجسام الضدية في إزالة الجراثيم ، فإن المستضدات ونواتجها يمكن أن تؤدي إلى تفعيل البالعات الكبيرة واللمفاويات التائية T-lymphocytes . إن استمرار الالتهاب بالرغم من استجابة المناعة الطبيعية يؤدي إلى تحريض الإستجابة المناعية المكتسبة . يمكن أن تقسم استجابة المناعة المكتسبة إلى مناعة خلطية (تتواسطها الأجسام الضدية) ومناعة خلوية . تتميز المناعة المكتسبة بالنوعية تجاه المستضدات الغازية وبالذاكرة التي تسمح باستجابة أسرع وأشد عند التعرض التالي لنفس المستضد ، أو لمستضد آخر قريب منه أو مرتبط به (Kinane *et al*. 2001) .

يفترض أن تحقق الإستجابة المناعية تجاه العناصر الممرضة أهدافها مع أذية في الحدود الدنيا لنسج المضيف ، لكن بالرغم من أن هدفها الرئيسي هو منع وإيقاف الغزو الجرثومي للنسج فإن الاستجابات المناعية للمضيف هي كذلك مؤذية ، فهي قد تكون مزمنة ومشوشة وغير فعالة وتسبب الضرر الأكبر للنسج في أمراض النسج حول السنية ، لذلك فإن جودة ونوعية الاستجابة المناعية للمضيف ضرورية خلال سير العملية المرضية (Genco 1992) .

1. 7. 1. دور الخلايا المناعية في النسج حول السنية

The role of immune cells in the periodontal tissue

تهاجر التائيات غير المتمايزة naive T cells من خلال العقد اللمفاوية تحت سيطرة أنواع مختلفة من جزيئات الالتصاق وتحت تأثير التفاعلات غير النوعية للمفاويات التائية مع الخلايا الأخرى . بعدها تتفاعل مع الخلايا المقدمة للمستضد ، وبعد التفعيل النوعي تتحرك أخيراً نحو

النسج المحيطة حيث تستطيع أن تتفاعل مع الخلايا الهدف . يعتقد بأن هذا هو الحال خلال نضج التائيات في المرض حول السني وتوجيه الخلايا التائية النوعية إلى النسج اللثوية حيث تستطيع أن تؤدي وظيفتها الدفاعية (Kinane *et al.* 2001). التائيات الفعالة تستشعر المستضدات المشتقة من أنواع مختلفة من العناصر الممرضة ، وتقدّم لها بواسطة النمطين المختلفين من معقد التوافق النسيجي الكبير major histocompatibility complex (MHC) .

تصنّف التائيات إلى :

- CD8 المعروفة أيضاً بالتائيات السامة cytotoxic T cells (Tc) ، وتستشعر المستضدات المشتقة من العوامل الممرضة التي تتكاثر في العصارة الخلوية cytosol و التي تحمل إلى سطح الخلية بواسطة جزيئات معقد التوافق النسيجي الكبير النمط الأول MHC I .
- CD4 و التي يشار لها عادة بالتائيات المساعدة helper T cells (Th) وتستشعر المستضدات المشتقة من الجراثيم وسمومها والتي تنقل إلى سطح الخلية بواسطة جزئيات معقد التوافق النسيجي الكبير النمط الثاني MHC II . يمكن لهذه الخلايا (CD4) أن تقسم أيضاً إلى قسمين آخرين من الخلايا التائية المساعدة هما TH1 و TH2 .

بالإضافة إلى ذلك تم التعرف على التائية TH0 والتي لم يؤكد دورها بعد ولكن يعتقد بأنها تلعب دور خلية ابتدائية للخلايا التائية المساعدة ، والتي ستتمايز إلى Th1 و Th2 كما يعتقد أنها تفرز الإنترلوكين −4 والإنترفيرون ɣ (Modlin & Nutman 1993) . من وجهة نظر متعلقة بالنسج حول السنية ، فإن تقديم المستضدات للخلايا التائية غير المتمايزة سيؤدي إلى تفعيل مستعمرات تجاه المستضد حيث تصبح بعض الخلايا المفعّلة خلايا مؤثّرة effector وبعضها يبقى في الدوران كخلايا ذاكرة والأدلة تشير إلى أن الخلايا التائية الذاكرة تفوق أعدادها بكثير التائية غير المتمايزة في النسج حول السنية (Lappin *et al*. 1999). من المقترح أن الآفات حول السنية البدئية تحوي بشكل أساسي اللمفاويات التائية ، في حين تسيطر اللمفاويات البائية B-lymphocytes والخلايا البلازمية في مرحلة لاحقة (Seymour *et al*. 1993) بحثت مجموعة من الدراسات توزع أنماط التائيات في النسج حول السنية ، وجدت دراسة Syrjanen *et al*.1984 أن نسبة CD4:CD8 في نسج مرضى التهاب النسج حول السنية الجائح وحتى عائلاتهم تميل للإرتفاع . لكن على أي حال فإن دراسات أخرى عديدة أشارت الى أن هذه النسبة متغيرة بشدة باختلاف المريض مع وجود نفس المرض ، فقد شوهد ارتفاع في نسبة CD4:CD8 لدى المرضى الذين لديهم درجة أكبر من الاختراق الخلوي الالتهابي ، في حين أن انخفاض نسبة CD4:CD8 كانت في نسج أقل التهاباً ، وقد اقترح أن التعبير عن الخلايا التائية في النسج اللثوية مختلف عن التعبير الحاصل في النظام الدموي المحيطي ، وأن هناك عدم توازن موضعي للتنظيم المناعي في المرض حول السني (Meng & Zheng 1989) .

1. 7. 2. دور شبكة السيتوكينات في المرض حول السني

The role of cytokines network in periodontal disease

إن كماً كبيراً من الابحاث التي شملت حيوانات التجربة بالاضافة الى التحاليل التي استخدمت النسج البشرية يؤيد بقوة فكرة كون السيتوكينات تلعب دوراً رئيساً في كل مراحل الاستجابة المناعية في المرض حول السني (Berglundh & Donati 2005). من المعروف أن هناك غزارة وتداخلاً كبيراً بين فعاليات السيتوكينات المختلفة ، وبالتالي فإن النتيجة هي أن السيتوكينات لا تعمل بمعزل عن بعضها بل تعمل كشبكة معقدة مرنة تربط عناصر من كلا المناعتين الطبيعية والمكتسبة مع بعضها في مواجهة الأذية التي تسببها الجراثيم (Banyer *et al*. 2000). إن السيتوكينات الالتهابية المسيطرة في المراحل الأولى المبكرة من الالتهاب هي تلك التي تفرزها الوحيدات والبالعات الكبيرة وغيرها من الخلايا التي تدخل في تركيب النسج (مثل مصورات الليف والخلايا الظهارية والخلايا البطانية) . لكن اللمفاويات ومنها البائية قد تكون المصدر الرئيس للسيتوكينات في التهاب النسج حول السنية المتقدم (Seymour & Gemmell 2001)

يعرّف السيتوكين الالتهابي بأنه السيتوكين الذي يفرز خلال مسار الاستجابة الالتهابية والمقترن بشكل كبير ببداية الالتهاب و /أو استمراره (Okada & Murakami 1998) . تلعب السيتوكينات الالتهابية (مثل IL-1α و IL-1β و IL-6 و IL-8 و TNF-α) دوراً حيوياً في بدء وتنظيم واستمرارية الاستجابة المناعية في النسيج حول السني . من المعروف عن IL-1β

أنه عامل محرض فعال للتخرب في النسج الضامة بما فيها العظم السنخي والرباط السني (Kornman *et al.* 1997 b) بالإضافة إلى ذلك فإنه يحرض خلايا مثل العدلات ومصورات الليف على إنتاج البروستاغلاندين والأنزيمات الحالة لبروتينات القالب المعدني matrix metalloproteinases ، مما يؤدي إلى تخرب أكبر في النسج حول السنية (Offenbacher *et al.* 1993) . عثر على مستويات مرتفعة من IL-1β في السائل الميزابي اللثوي لدى مرضى التهاب النسج حول السنية بالمقارنة مع عينة شاهدة غير مريضة (Masada *et al.* 1990) كذلك عثر على نسب أعلى من IL-1β في مواقع المرض حول السني الفعال بالمقارنة مع المواقع المستقرة (Stashenko *et al.* 1991) . كما ذكر أن TNF – α يملك تأثيرات مؤازرة لسيتوكينات IL-1 بالرغم من أن TNF-α أقل قوة من IL-1 (Okada &Murakami 1998) يفرز IL-6 من قبل مجموعة واسعة من الخلايا في الآفات حول السنية ووجد أنه يزيد الامتصاص العظمي (Irwin & Myrillas 1998) .

يملك IL-8 دوراً التهابياً في التهاب حول السنية من خلال التفعيل والجذب الكيميائي للعدلات (Tonetti *et al.* 1998) .

يمكن الحد والإنقاص من شدة وامتداد الالتهاب من خلال دارات التنظيم المناعي حيث يمكن للسيتوكينات المضادة للإلتهاب أن تعارض السيتوكينات الإلتهابية . إن السيتوكينات المضادة للإلتهاب مثل IL-10 و IL-4 و IL-13 و TGF-β وفي بعض الأحيان IL-11 تؤثر من خلال خفض إنتاج السيتوكينات الالتهابية من البالعات الكبيرة (IL-1 و IL-12 و TNF- α و

IFN-α ...) كما أنها تثبط إنتاج الخلايا التائية لـ IFN-ɤ , IL-2 . إن تقدم المرض حول السني يحدّد بشكل كبير من خلال طبيعة استجابة السيتوكينات ، بالتالي فإن الإستجابة الملائمة للسيتوكينات ستؤدي إلى استجابة مناعية دفاعية وآفة حول سنية مستقرة ، في حين أن استجابة غير ملائمة للسيتوكينات ستؤدي إلى استجابة مناعية مخرّبة واستمرار المرض حول السني . (Seymour & Gemmell 2001)

1. 8. عامل النمو المحول بيتا – 1 Transforming growth factor – β1

إن عامل النمو المحول بيتا – 1 TGF-β1 هو أحد السيتوكينات متعددة الوظائف والذي ينظم نمو الخلية، والتمايز، وتشكيل القالب. يوجد لـ TGF-β1 خمسة أنماط متشابهة على الأقل تعرف بـ TGF-β1 ، TGF-β2 ، TGF-β3 ، TGF-β4 و TGF-β5 وهي غير مرتبطة بـ TGF-α . تبدي حموضها الأمينية تشابهاً بحدود 70 – 80 % ، يعتبر TGF-β1 هو الشكل الشائع وبقية الأشكال تتواجد في طيف ضيق من الخلايا والأنسجة (Burt 1992) . تتشكل كل أنماط TGF-β كمركب حيوي غير فعال ويعرف عامل النمو المحول بيتا الكامن Latent TGF – β ، ويقوم التحفيز الحمضي بتحرير TGF-β الفعال في هذا المعقد (Miyazono & Heldin 1992) . يتم إفراز TGF-β1 من قبل عدة خلايا ومن ضمنها البالعات الكبيرة، واللمفاويات، والخلايا البطانية والخلايا الغضروفية (Sporn & Roberts 1992) .

1. 8. 1. بنية مورثة TGF-β1 و تعدداتها الشكلية

TGF – β1 Gene Structure & Polymorphisms

تتوضع مورثة TGF-β1 على الصبغي 19q13 (Fuji *et al.* 1986) . وقد حدد (Derynek *et al.* 1987) بأن طول مورثة TGF-β1 هو أكبر من 100kb وتحتوي على سبع محاور خارجية والعديد من المحاور الداخلية .

فحص (Cambien *et al.* 1996) مورثة TGF-β1 وحددوا سبعة تعددات شكلية وحيدة النيكلوتيد SNPs ، يتوضع أحدها في المنطقة المرمزة لطليعة البروتين ، وواحد في الموقع +72 في المنطقة غير المترجمة ، وثلاثة في منطقة upstream المرتبطة بموقع بداية الانتساخ (-509*C/T,-800*G/A,-988*C/A) ، وإثنين في تسلسل الببتيد الوحيد على الموقع +869 , (+915G/C codon 25)*T/C(codon 10) وأفادوا بأن التعدد الشكلي على +915 الذي يغير codon 25 (أرجنين إلى برولين) هو مرتبط بالتغير الداخلي لإنتاج TGF-β1 . تحرى (Awad *et al.* 1998) مورثة TGF-β1 ووجدوا أن النمط المورثي G/G*+915 مرتبط بإرتفاع مستويات إنتاج TGF-β1 مقارنة مع النمط المورثي G/C*+915 .

1. 8. 2. الفعالية الحيوية لعامل النمو المحول بيتا −1 TGF-β1 Biological Activities

يعتمد إفراز TGF-β1 على نمط الخلية والتي تتحرض بالعديد من المثيرات متضمنة السيتروئيدات، والرينوتئيدات EGF، NGF ، ومحرضات اللمفاويات وفيتامين د3 . وعلى

العكس ، فإن إفراز TGF-β1 يتم كبحة من قبل FGFوالديكساتيازون (Sporn & Roberts 1992) .

- كان TGF-β1 يسمى " عامل كابح للمناعة " و " كابح نمو الخلايا البطانية المشتق من الصفيحات " ، يملك القدرة على كبح نمو العديد من أنماط الخلايا وله دور واضح في العديد من الفعاليات الفيزيولوجية كالتليف، وشفاء الجروح، والتشكل الغضروفي، والتشكل العظمي، وإعادة قولبة النسيج والتطور الجنيني (Roberts & Sporn 1993) .
- بشكل خاص ، يملك TGF-β1 قدرة كابحة للمناعة ويضعف تنظيم انتساخ السيتوكينات قبيل الالتهابية متضمنة TNF-α,IL-1 (Musso *et al*. 1990) كما يتحكم بالمشاركة مع IL-1 بإنتاج IgA من قبل اللمفاويات البائية (Defrance *et al*. 1992) .

1. 8. 3. علاقة TGF-β1 بالأمراض العامة :

ربط كل من (Mercado *et al*. 2003 , Gracia *et al*. 2001 , Suguria et al. 2002, Yokota *et al*. 2000 , Cambien *et al*. 1997) بين التعدد الشكلي لمورثة TGF-β1 وخطر الإصابة بالأمراض الجهازية متضمنة الأمراض القلبية الوعائية والتهاب المفاصل الرثياني والتي ترتبط بدورها بالمرض حول السني .

1. 8. 4. علاقة TGF-β1 بالمرض حول السني TGF-β1 and periodontal diseases

وجد (Skalenic *et al*. 1997) مستويات مرتفعة من TGF-β1 في عينات السائل الميزابي اللثوي المأخوذة من مواقع عميقة الجيوب مقارنة بجيوب ذات عمق أقل ، وبشكل مشابه وجد (Stein svoll *et al*. 1999) كثافة في الخلايا المنتجة لـ TGF-β1 في التهاب النسج حول السنية المزمن وذلك بشكل كبير في النسيج الضام القريب من بطانة الجيب حول السني . وأفاد (Chang *et al*. 2002) بأن TGF-β1 لديه القدرة على كبح MMP-2 ويمكن إستخدامه كطريقة علاجية لتعديل آليات استجابة المضيف أو كبح تدمير النسج حول السنية من قبل MMP . ووجد (Nahajima *et al*. 2005) مستويات مرتفعة من TGF-β1 و IL-10 في الخزعات المأخوذة من مرضى التهاب النسج حول السنية مقارنة مع مرضى التهاب اللثة .

1. 8. 5. التعدد الشكلي لمورثة TGF-β1 وعلاقته بالمرض حول السني

TGF-β1 gene polymorphisms and periodontal diseases

درس (Holla *et al*. 2002) التعدد الشكلي لمورثة TGF-β1 عند 90 مريضاً مصابين بإلتهاب نسج حول سنية مزمن و 108 شخصاً كعينة شاهدة ، تم تحري ثلاث تعددات شكلية متوضعة في المنطقة 5 (في المواقع C/A* 988− ، C/T 509*− و G/A* 800 −) وتعددين شكلين متوضعين على الرامزة 10 (لوسين إلى برولين) والرامزة 25 (أرجنين إلى برولين) من الإكسون 1 ، ولم يوجد بالنتيجة أي فارق إحصائي ذو دلالة بين النمط المورثي

وتواتر توزيع الأليل بين مجموعة المرض والمجموعة الشاهدة ، وبالتالي استنتجوا أن لا علاقة بين التعددات الشكلية المدروسة والتهاب النسج حول السنية المزمن .

وفي دراسة أخرى ، تحرى (desouza *et al*. 2003) الارتباط بين التعدد الشكلي C/T 509- لمورثة TGF-β1 وشدة التهاب النسج حول السنية المزمن واستنتجوا بأن لهذا التعدد الشكلي تأثير بسيط على تعديل الآلية الإتهابية في التهاب النسج حول السنية المزمن .

وفي دراسة (Atilla *et al*. 2006) لم يتم إيجاد أي فارق ذو دلالة بين 43 مريضاً مصاباً بالتهاب الأنسجة حول السنية الجائح و 40 عينة شاهدة عند التعدد الشكلي لمورثة TGF-β1 في الموقع C 915+.

أما أبو سليمان 2006 فقد وجد في دراسته التي أجراها حول التعدد الشكلي لمورثات السيتوكينات عند مرض التهاب النسج حول السنية الجائح قابلية أعلى للإصابة بالمرض حول السني الجائح عند المرض القوقازيين البريطانيين الذين لديهم التعدد الشكلي في الموقع (codon10)869+ للمورثة TGF-β1 ، ولم يجد في نفس الوقت أي علاقة للتعدد الشكلي في الموقع (codon25)915+ للمورثة نفسها .

وفي دراسة (Babel *et al*. 2006)، تم تحري علاقة التعدد الشكلي لمورثةTGF-β1 في الموقعين codon 10 وcodon 25 ، ووجدت الدراسة علاقة للتعدد الشكلي في الموقع codon 25 مع زيادة إحتمال الإصابة بالمرض حول السني المزمن بينما لم تجد علاقة مع الموقع الآخر.

ووجد (Aneta *et al*. 2008) في دراسة على المرضى المقدونيين المصابين بالمرض حول السني المزمن علاقة بين التعدد الشكلي لمورثةTGF-β1 في الموقعين (C/G) codon 25و (T/G) codon 10مع إرتفاع نسبة الإصابة بالمرض المزمن.

أما (Zhao *et al*. 2010)، ففي دراسته على المرضى الصينيين المصابين بالمرض حول السني المزمن فوجدوا ارتباطاً بين التعدد الشكلي لمورثةTGF-β1 في الموقعC/T * 509- مع المرض حول السني المزمن وأن الحاملين للأليل C هم عرضة أكثر للإصابة بالمرض.

2. الهــدف مــن البحــث Aim of Study

يهدف بحثنا هذا إلى:

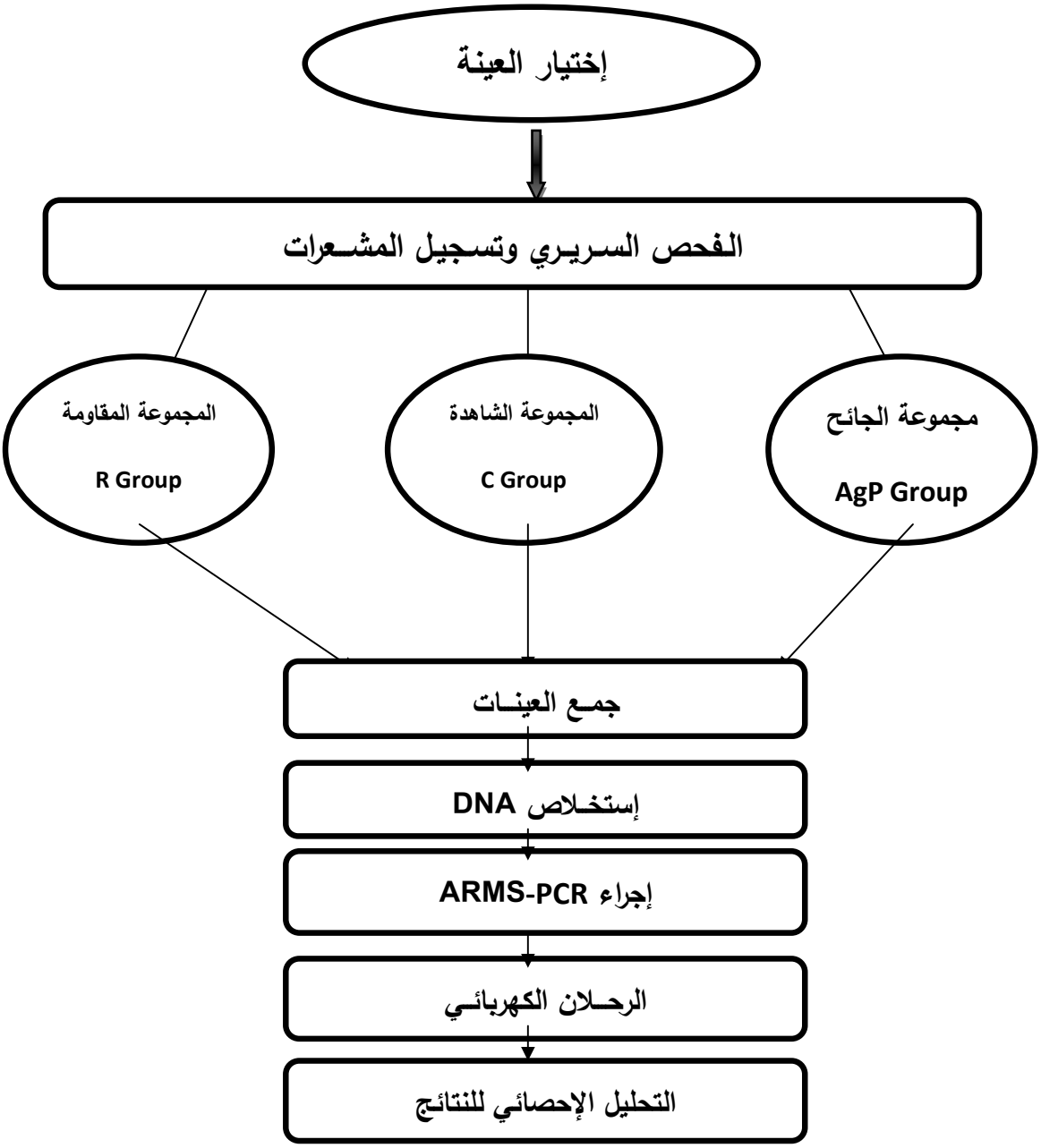
1. دراسة نسب إنتشار الأشكال الجينية (alleles) لعامل النمو المحول_ بيتا 1 TGF-ß1 في الموقعين املورثيين (codon 25) +915 و (codon 10) +869 عند الأشخاص غير المصابين بالمرض حول السني ومرضى التهاب النسج حول السنية الجائح.
2. التحقق إذا كان أحد الأنماط الوراثية لعامل النمو المحول_ بيتا1 في الموقعين المورثيين (codon 25) +915 و (codon 10) +869 يؤدي إلى زيادة قابلية الإصابة بإلتهاب النسج الداعمة الجائح.

3. المواد والطرق

Materials and Methods

3. 1. تصميم الدراسة Study Design

يوصّف المخطط 3. 1 مراحل العمل التي اتبعت لإجراء البحث.



المخطط (3. 1.)تصميم الدراسة

3. 2. مجتمع الدراسة Study Population

تم دعوة المرضى السوريين المحولين إلى عيادة علم النسج حول السنية في كلية طب الأسنان بجامعة دمشق ضمن الفترة الممتدة من عام 2011 حتى عام 2013 للمشاركة في هذه الدراسة وتم توزيعهم وفق معايير تشخيصية وسريريه محددة ضمن ثلاث مجموعات:

1. 75 مريضاً في مجموعة إلتهاب النسج الداعمة الجائح AgP Group
2. 75 فرداً في المجموعة الشاهدة المطابقة Matched Control Group (C) (تم أخذ هذه العينة من طلاب كلية طب الأسنان في السنوات الدراسية الأولى حتى الخامسة).
3. 62 فرداً في المجموعة المقاومة(R) Resistant Group (تم أخذ هذه العينة من مراجعي الكلية)

تم إستبعاد المرضى الذين يحققون المعايير التالية:

- أقل من 20 سن طبيعي
- المصابين بأمراض جهازية
- الحوامل والمرضعات
- استخدام الصادات الحيوية خلال الأشهر الثلاثة الأخيرة
- خضعوا لعلاجات حول سنية خلال الأشهر الثلاثة الأخيرة

- لا يحملون الجنسية العربية السورية.

3. 2. التقييم السريري والتشخيص Clinical assessment and diagnosis

تـم إنشـاء اسـتمارة للمرضـى ومـن خلالهـا تـم السـؤال عـن التـاريخ الطبـي المرضـي والحالـة الصـحية العامـة والمعالجـات السـابقة العامـة وحـول السـنية والتـدخين. وإعتمدت المشعرات السريرية التالية:

1. مشعر عمق السبر Pocket Probing Depth (Papapanou &Lindhe 2008) (PPD)

استعمل مسبر (PC PU NC- 15®, Hu Friedy ™, Chicago, IL, USA)، أجري السبر لجميع الأسنان الموجودة في الفكين عن طريق إدخال المسبر ليصبح موازياً للمحور الطولي للسن وعلى تماس مع السن دون تطبيق أي ضغط زائد ودون إزعاج أو إيلام المريض، ويؤخذ القياس مقرباً إلى أقرب 0.5 ملم، يحسب عمق السبر من الحافة الحرة للثة حتى عمق السبر.

2. مشعر مستوى الإرتباط البشري Periodontal Attachment Level (PAL) (Papapanou &Lindhe 2008)

كان يعرف حتى فترة قريبة بمشعر مستوى الارتباط السريريClinical Attachment Level تم أخذه بنفس مراحل مشعر عمق السبر لكن يؤخذ القياس من الملتقى المينائي الملاطي وحتى عمق السبر.

3. مشعر النزف عند السبر Bleeding on Probing (Papapanou &Lindhe 2008) (BoP)

أخذ لجميع الأسنان أيضاً، و سجلت قيمة صفر للمواقع غير النازفة و قيمة واحد للمواقع النازفة عند السبر.

4. مشعر إلتهاب اللثة Gingival Index (GI) (Loe & Silness 1963)

أخذ لجميع الأسنان وأعطيت القيم على الشكل التالي:

0= اللثة سليمة وطبيعية سريرياً

1= إلتهاب لثة بسيط، تغير بسيط في اللون ولا يوجد نزف بالسبر أو الضغط.

2= إلتهاب لثة متوسط، إحمرار، وذمة، لمعان السطح ونزف بالسبر أو الضغط.

3= إحمرار شديد واضح، وذمة وتقرح في اللثة مع نزف عفوي.

5. مشعر اللويحة السنية Dental Plaque Index (silness & loe 1964) (Carranza et al. 2003):

نقيس كمية اللويحة على أربع مواقع لكل سن وهي: الدهليزي- اللساني أو الحنكي- الأنسي الدهليزي- الوحشي الدهليزي، ثم نقسم على أربعة ونقسم المجموع على عدد الأسنان. ويتم القياس حسب التالي:

0 لا يوجد لويحة.

1 طبقة خفيفة من اللويحة على الحافة اللثوية تظهر لدى السبر .

2 طبقة معتدلة من اللويحة ترى بالعين المجردة، لا وجود للويحة في المسافات بين السنية.

3 تراكم شديد للويحة على الحافة اللثوية مع تراكمها في المسافات بين السنية.

بعد إجراء التشخيص السابق يتم توزيع المشاركين على المجموعات حسب الشروط التالية:

- يشترط في مجموعة (AgP) : – عدد الأسنان الموجودة في الفم أكثر من 20 سن

  – العمر من 15 سنة إلى 35 سن

- يشترط في مرضى مجموعة (C) أن تكون: – أعمارهم بين 15–35 سنة

  – لا يوجد مرض حول سني

- يشترط في مرضى مجموعة (R) أن تكون: – أعمارهم أكبر من 40 سنة

  –لا وجود لجيوب أعمق من 4 ملم

  – لا وجود للمرض حول السني

3. 4. الفحص الشعاعي Radiographic Examination

تم إجراء صورة شعاعية بانورامية لتأكيد التشخيص وتحري مستوى العظم.

3. 5. الدراسة المخبرية

أجريت الدراسة المخبرية في مخبر الدراسات العليا، قسم علم الحياة الحيوانية بكلية العلوم في جامعة دمشق.

3. 5. 1. جمع العينة

تم سحب 3 ملل من الدم الوريدي لكل مشارك في البحث بعد شرح طبيعة العمل لكل مشارك وأخذ موافقته، وتم وضع الدم المسحوب في أنبوب يحتوي EDTA لمنع التخثر، ومن ثم وضعه في البراد بانتظار مرحلة استخلاص DNA.

3. 5. 2. المواد والأدوات المستخدمة في الدراسة المخبرية

3. 5. 2. 1. عتيدة استخراج DNA:

تم استخدام مجموعة Wizard® Genomic DNA Purification Kit, Promega, USA، وتحتوي على:

100 ملل– محلول حل الخلية

50 ملل– محلول حل النواة

25 ملل– محلول ترسيب البروتين

50 ملل– محلول إماهة DNA

250 ملل– محلول RNase

أما المواد غير الموجودة ضمن العتيدة والمستخدمة:

- أنابيب إيبيندورف
- كحول إيزوبروبانول
- كحول إيثانول 70%

3. 5. 2. 2. مجموعة تحليل ARMS- PCR:

تم استخدام مجموعة Go Taq® DNA Polymerase, Promega, USA، وتحتوي على:

المكون	الحجم النهائي
Go Taq® reaction buffer	10µl
dNTP Mix	1µl
Upstream primer	x µl
Downstream primer	y µl
Go Taq® DNA polymerase	0,25µl
Template DNA	z µl
Nuclease- free water	لحجم نهائي 50µl

3. 5. 2. 3. الرحلان الكهربائي

تم استخدام Agarose LE, Analatyical Grade, Promega, USA، وكذلك 1Kb DNA Ladder, Promega, USA.

3. 5. 2. 4. الأجهزة المستخدمة

- مثقلة Hettich Zentrifugen D-78532, Germany
- جهاز Microwave
- Vortex: VELP scientifica, Europe
- جهاز PCR: PeqLab- Peqstar, UK
- ميزان إلكتروني حساس
- جهاز رحلان كهربائي Cosmo Bio Co., – *M*upid – *i*
- UV Transilluminator- Cleaver scientific LTD

3. 1. عينة دم ضمن أنبوب يحتوي EDTA

3. 2. غرفة معزولة يجرى ضمنها العمل

3. 3. المثفلة

3. 4. Vortex

3. 5. جهاز تحليل PCR

3. 6. جهاز الرحلان الكهربائي

UV Transilluminator .7 .3

3. 5. 3. إستخلاص DNA

تمت عملية استخراج DNA من عينات الدم وفق البروتوكول التالي:

1. نضع في أنبوب تثفيل صغير 300 ميكروليتر من عينة الدم ونضيف فوقه 900 ميكروليتر من محلول حل الخلية.

2. نقلب الأنبوب من 5–6 مرات ليتم المزج بشكل جيد.

3. يتم حضن الخليط على درجة حرارة الغرفة لمدة 10 دقائق (يتم خلالها قلب الأنبوب 2–3 مرات) وذلك حتى يتم حل الخلايا. نجري تثفيل لمدة 20 ثانية على 13000–16000g

4. نتخلص من الطافي من دون تخريب الحبيبة البيضاء المتشكلة على قعر الأنبوب، ويبقى حوالي 10–20 ميكروليتر سائل.

5. نقوم بعملية Vortex للأنبوب لمدة 10–15 ثانية حتى إعادة حل الحبيبة.

6. نضيف 300 ميكروليتر من محلول حل النواة. نقوم باستخدام الماصة 5–6 مرات ضمن الأنبوب لحل الخلايا البيضاء.

7. نضيف 100 ميكروليتر من محلول ترسيب البروتين ونقوم بعملية Vortex لمدة 10–20 ثانية.

8. نثفل لمدة 3 دقائق على درجة حرارة الغرفة على 13000–16000 g.

9. ننقل الناتج الطافي إلى أنبوب حجمه 1,5 مل نظيف يحتوي على 300 ميكروليتر إيزوبروبانول.

10. نخلط المزيج بلطف حتى تشكل خيوط بيضاء وهي خيوط DNA بشكل مرئي.

11. نثفل لمدة 1 دقيقة على درجة حرارة الغرفة على 13000–16000g.

12. نتخلص من السائل الطافي ونضيف 100 ميكروليتر من كحول إيثانول 70% ونمزج الأنبوب بلطف ونثفل كما في المرحلة السابقة.

13. بلطف نسحب الإيثانول ونقلب الأنابيب على ورق نشاف لمدة 10 دقائق.

14. نضيف 100 ميكروليتر من محلول إماهة DNA.

15. نحفظ الناتج على حرارة 2–8 درجات مئوية.

3. 5. 4. التنميط الجيني للتعدد الشكلي لمورثة TGF- ß1

3. 5. 4. 1. تحضير المبدئات

تـــم شـــراء جميـــع المبـــدئات مـــن شـــركة Canada , Alpha DNA . تم الحصول المبدئات بشكل محفز. حلت هذه الأوليغونيكلوتيدات في ماء معقم ثنائي التقطير بكمية كافية للوصول إلى تركيز 100 ميكرومول. وبعد التمديد، تم حفظ المبدئات في درجة حرارة –20 درجة مئوية.

3. 5. 4. 2. تفاعل ARMS-PCR

يعتمد هذا النوع من PCR على خاصية أنزيم تضخيم GoTaq DNA Polymerase حيث لا يعمل إلا إذا كان هناك تطابق كامل بين البرايمر والشدفة المراد تضخيمها فإذا كان هناك عدم تطابق في نهاية 3 بالنكليوتيد الأخير فإن الأنزيم لا يعمل، لذلك يستخدم هذا PCR للكشف عن الطفرات النقطية. يتم إجراء تفاعلين PCR، يستخدم فيهما برايمر عام مع أحد برايمرين يكونان متطابقين فيما بينهما ويختلفان فقط بالنكليوتيد الأخير ثم يتم ترحيل ناتج تفاعل PCR1 في البئر الأول وناتج تفاعل PCR2 في البئر الثاني وتقرأ النتيجة التي تدل على أن العينة المدروسة متماثلة اللواقح أو متخالفة اللواقح (Little S 2001). تم وصف بروتوكول العمل من قبل Perry *et al.* (1999) على النحو التالي:

1. في الأنابيب المخصصة لتفاعل PCR نضع 10 ميكروليتر من Buffer 5x

2. نضيف 1 ميكروليتر DNTPs

3. نضيف 3 ميكروليتر DNA

4. نضيف 5 ميكروليتر مبدئGeneric

5. نضيف 5 ميكروليتر مبدئ حسب الموقع

6. نضيف إنزيم Taq Polymerase بكمية 0,25 ميكروليتر

7. نضع الأنابيب في جهاز PCR ونغلق الغطاء بإحكام

8. تم ضبط الجهاز حسب البرنامج التالي:

95°c	1 min.	
95°c	15 sec.	10 cycles
95°c	50 sec.	10 cycles
72°c	40 sec.	10 cycles
95°c	20 sec.	20 cycles
T	50 sec.	20 cycles
72°c	50 sec.	20 cycles

حيث تكون T هي درجة الحرارة الخاصة بالمبدئ وكانت هنا 59°c.

9. بعد إنتهاء الجهاز من العملية، سيتم تبريده تلقائياً حتى 10 درجات مئوية وبعد ذلك يمكن إزالة الأنابيب من الجهاز.

تم التنميط الوراثي للتعدد الشكلي لمورثات عامل النمو المحول– بيتا 1 لموقعين، الأول على codon 10 والذي يمثل استبدال أليل C بأليل T ، والثاني هو codon 25 والذي يمثل استبدال أليل C بأليل G. تم توضيح شروط وتسلسل المبدئات في الجدول 3. 1.

جدول 3. 1. التعددات الشكلية لمورثة TGF- ß1، تسلسل مبدئات ARMS-PCR، حجم ناتج PCR وحرارة التفاعل

المورثة	التعدد الشكلي	موقع SNP	المبدئ	التسلسل (´5 إلى ´3)	حجمDNA	الحرارة T
TGF- ß1	T → C	codon 10	Generic(antisense)	tccgtgggatactgagaca	bp241	59°c
			T (sense)	gcagcggtagcagcagcT		
			C (sense)	gcagaggtagcagccgaC		
	C → G	codon 25	Generic(antisense)	ggctccggttctctgcactc	bp233	59°c
			C (sense)	gtgctgacgccttggccC		
			G (sense)	gtgctgacgcctggccG		

3. 5. 4. 3. الرحلان الكهربائي

– نحضر هلام الأغاروز بتركيز 2% عبر مزج 2غ من بودرة الأغاروز مع 100مل من محلول TBE 1x، ويوضع الخليط في فرن ميكرويف لمدة 1,5 دقيقة ثم يحرك ويوضع مرة أخرى لمدة دقيقة واحدة.

– نضيف إثيديوم برومايد (3–5 ميكروليتر) للجل السائل.

– نصب برفق في قالب الرحلان الكهربائي المخصص ونضع الأمشاط المناسبة ونتركها حتى يجمد الهلام.

– نسحب الأمشاط برفق ونضع الهلام في حجرة الترحيل الكهربائي ونغمره بالمحلول الموقي TBE 1x.

– نوزع 10 ميكروليتر من كل ناتج PCR على أنابيب مخروطية صغيرة تحوي 2 ميكروليتر من دارئة التحميل Loading Buffer.

– نمزج 10 ميكروليتر من DNA marker في 2 ميكروليتر من الملون ضمن أنبوب صغير.

– نحقن العينات بالتساوي ضمن آبار الهلام.

– نرحل باستخدام جهاز الرحلان الأفقي على فولطية 100V لمدة لا تتجاوز الساعة.

– نفحص الهلام على جهاز UV Transilluminator , ونصور باستخدام آلة تصوير خاصة.

3. 5. 5. التحليل الإحصائي

– تم إدخال البيانات إلى الحاسوب بواسطة برنامج SPSS.

– استخدم تحليل كاي مربع Chi-square Test في مقارنة الاختلافات في توزع الأنماط الوراثية والـ alleles بين المجموعات.

– تم حساب OR و CI 95%.

– قمنا بتطبيق إختبار Logistic Regression من اجل تصحيح الفوارق الناتجة عن العمر، الجنس والتدخين.

– تعتبر قيمة p value < 0,05 هامة احصائياً.

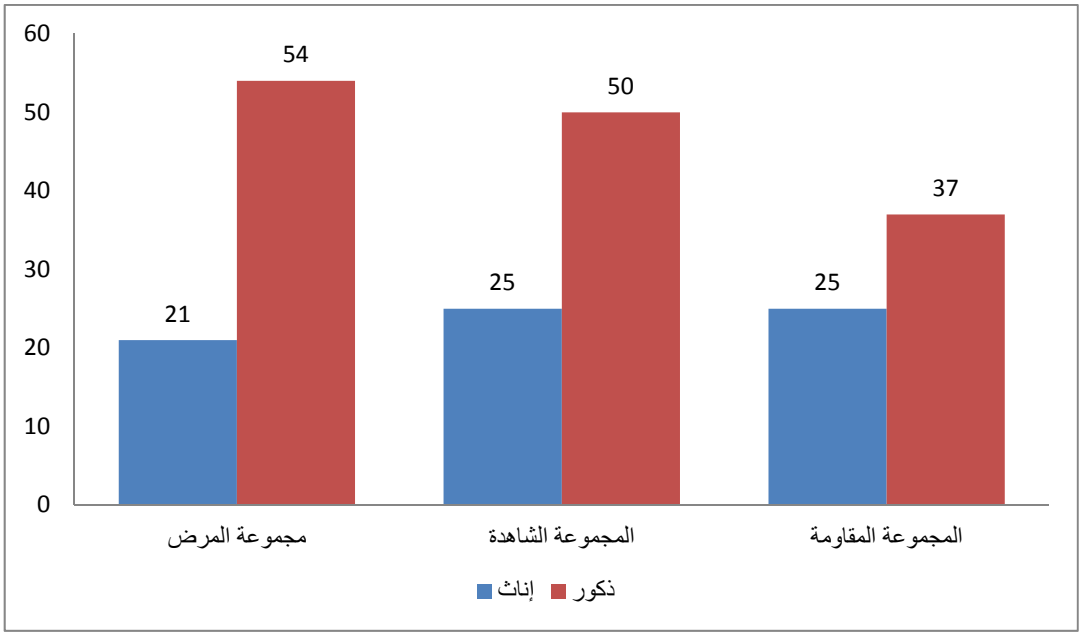
4. النتـــــائج *Results*

4. 1. المعايير السريرية لعينة الدراسة

تألفت عينة الدراسة في هذا البحث من 200 مواطناً عربياً سورياً موزعين إلى ثلاث مجموعات (جدول 4. 1):

- مجموعة المرض حول السني الإجتياحي: n= 75 ، متوسط الأعمار: 25,9
- مجموعة شاهدة مطابقة: n= 75 ، متوسط الأعمار: 22,35
- مجموعة مقاومة: n= 62 ، متوسط الأعمار: 45,45

وكان توزع المجموعات حسب نسبة الذكور للإناث فكانت 72%، 66,67% و 59,7% وذلك للمجموعات الإجتياحي، والشاهدة والمقاومة على التوالي.



المخطط 4. 1. توزع أفراد العينة ضمن المجموعات حسب الجنس

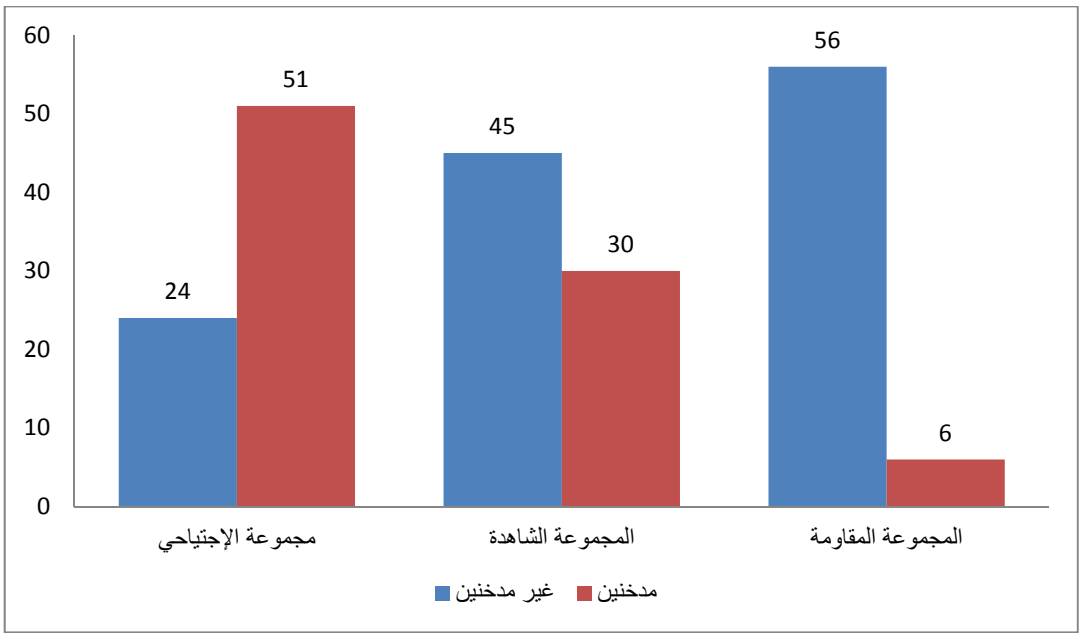
جدول 4. 1. المعايير السريرية لعينة الدراسة

	مجموعات الدراسة		
	مجموعة الإجتياحي	مجموعة شاهدة	مجموعة مقاومة
n	75	75	62
متوسط العمر (سنوات) (الحد الأدنى– الحد الأعلى)	**25,9** (35−16)	**22,35** (30−18)	**45,45** (60−35)
الجنس	n(%)	n(%)	n(%)
إناث	21 (28)	25 (33,3)	25 (40,3)
ذكور	54 (72)	50 (66,67)	37 (59,7)

أما نسبة المدخنين لغير المدخنين فكانت أعلى بشكل واضح في مجموعة الإجتياحي مقارنة بالمجموعة الشاهدة والمجموعة المقاومة (جدول 4. 2).

جدول 4. 2. نسب المدخنين ضمن عينة الدراسة

	مجموعات الدراسة		
	مجموعة الإجتياحي n(%)	**مجموعة شاهدة n(%)**	**مجموعة مقاومة n(%)**
غير مدخنين	24 (32)	45 (60)	56 (90,3)
مدخنين	51 (68)	30 (40)	6 (9,7)



المخطط 4. 2. توزع أفراد العينة ضمن المجموعات حسب التدخين

أما بالنسبة لمشعر عمق السبر فقد تبين عدم وجود جيوب أعمق من 4مم في كل من المجموعتين الشاهدة والمقاومة بينما تباينت النسب في مجموعة الإجتياحي بين 4–6مم و >6 مم وذلك حسب شدة المرض حول السني (جدول 4. 3.).

جدول 4. 3. النسبة المئوية لرتب مشعر عمق السبر في مجموعات الدراسة

المجموعة المدروسة	رتب مشعر عمق السبر	المتوسط الحسابي
الإجتياحي	PD 1-3	%60
	PD 4-6	%29,3
	PD >6	%10,7
الشاهدة	PD 1-3	%100
	PD 4-6	%0
	PD >6	%0
المقاومة	PD 1-3	100%
	PD 4-6	%0
	PD >6	%0

وبالنسبة لمشعر فقد الإرتباط البشري فقد تبين عدم وجود فقد إرتباط أكثر من 4مم في كل من المجموعتين الشاهدة والمقاومة بينما تباينت النسب في مجموعة الإجتياحي بين 4–6مم و >6 مم وذلك حسب شدة المرض حول السني (جدول 4. 4.).

جدول 4. 4. النسبة المئوية لرتب مشعر فقد الإرتباط البشري في مجموعات الدراسة

المجموعة المدروسة	رتب مشعر عمق السبر	المتوسط الحسابي
الإجتياحي	PAL 1-3	%66,6
	PAL 4-6	%28
	PAL >6	%5,4
الشاهدة	PAL 1-3	%100
	PAL 4-6	%0
	PAL >6	%0
المقاومة	PAL 1-3	100%
	PAL 4-6	%0
	PAL >6	%0

4. 2. تحليل نتائج التعدد الشكلي لمورثة عامل النمو المحول- بيتا1

تم استخدام تقنية ARMS-PCR لدراسة التعدد الشكلي لموقعين معروفين لمورثة TGF-ß1 هما +915(25 codon), والموقع +869(codon10). تمت مشاهدة ناتج تفاعل PCR هلامة أغاروز 2%.

تم تحديد النمط المورثي وتواتر الأليلات للتحول من G إلى C في الإكسون الأول لمورثة TGF-β1 على الموقع +915 (25 codon)، والتحول من T إلى C على الموقع +869 (codon10). هناك توافق بين توزيع النمط المورثي والأليلات لكلا التعددين الشكلين مع معادلة هاردي- وينبرغ في كافة مجموعات الدراسة (جدول 4. 5.).

جدول 4. 5. تكرار الأنماط الوراثية المشاهدة والمتوقعة حسب مبدأ توازن Hardy-Weinberg equilibrium

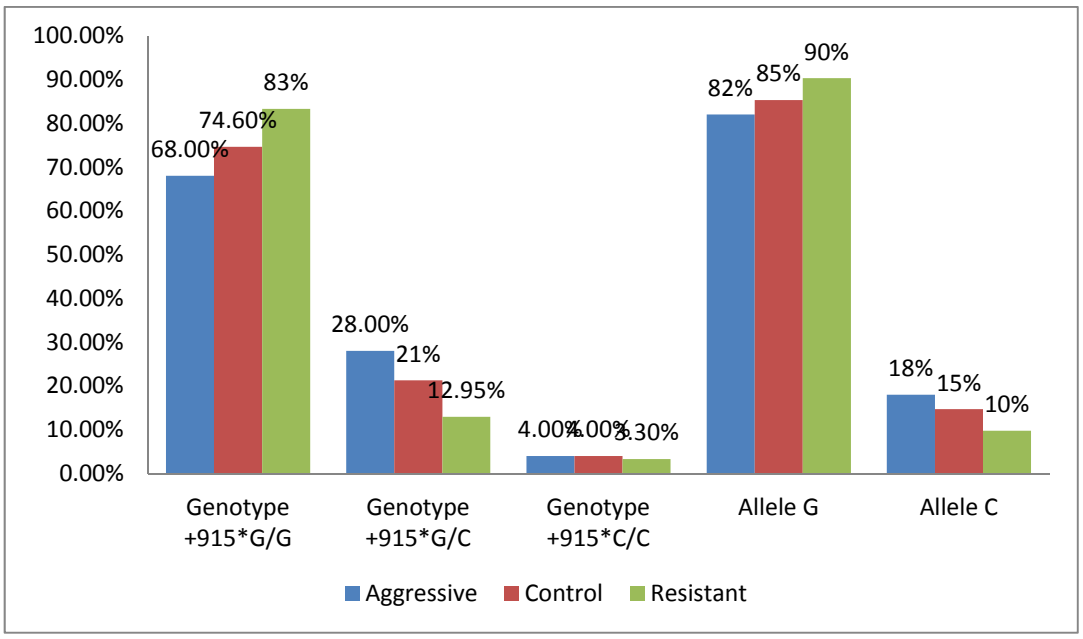
	الأنماط الوراثية	التكرار المشاهد	التكرار المتوقع حسب HWE	معنوية HWE *P value*	الدلالة
915+	GG	159	155,39	0,86	غير دال إحصائياً
	GC	45	52,22		
	CC	8	4,39		
869+	TT	73	73,11	0,59	غير دال إحصائياً
	TC	103	102,77		
	CC	36	36,11		

يبين الجدول السابق أن قيمة $p>0,05$ في الموقعين المدروسين وبالتالي نستنتج أنه عند مستوى الثقة 95% لا توجد فروقات ذات دلالة إحصائية في تكرار الأنماط الوراثية المشاهد في عينة البحث وتكرار الأنماط الوراثية المتوقع حسب توازن هاردي– وينبرغ، مما يؤكد توافق عينتنا مع HWE.

4. 2. 1. تحليل التعدد الشكلي في الموقع codon 25

تم عرض نتائج تقييم التعدد الشكلي لمورثة TGF-β1 (codon25) لكافة مجموعات الدراسة في الجدول 6.4 . وجدنا نسبة 68% للنمط المورثي G/G*915+ ضمن مجموعة المرض حول السني الإجتياحي يقابلها نسبة 74,6% ضمن المجموعة الشاهدة و 83,8% ضمن المجموعة المقاومة. ضمن مجموعة المرض حول السني الإجتياحي، كانت نسبة النمط المورثي G/C*915+ 28%، بينما انخفضت نسبتها قليلاً إلى 21,34% في المجموعة الشاهدة و 12,9% في المجموعة المقاومة. كان النمط المورثي C/C*915+ الأقل تواجداً في المجموعات الثلاث بحيث بلغت نسبته 4%، 4% و 3,3% في مجموعة الإجتياحي والمجموعة الشاهدة والمجموعة المقاومة على التوالي. لم يكن لهذه الفروقات في توزع النمط المورثي أي دلالة إحصائية بين مجموعات الدراسة ($p>0,05$).

من ناحية ثانية، فإن الأليل G*915+ كان تواتره أقل بنسبة بسيطة في مجموعة مرضى الإجتياحي مقارنة مع المجموعة الشاهدة والمجموعة المقاومة (82% مقابل 85,3% و 90,3% على التوالي). وبالتالي، فإن الأليل C*915+ كان متواجداً أكثر بنسبة قليلة في مجموعة مرضى الإجتياحي (18%) مقارنة مع المجموعة الشاهدة (14,7%) والمجموعة المقاومة (9,7%). لم يكن لهذه الفروقات في توزع النمط المورثي أي دلالة إحصائية بين مجموعات الدراسة ($p>0,05$). تم إدراج نسب الأليلات والأنماط الوراثية على codon25 في المخطط 3.4.



المخطط 4. 3. نسب الأليلات والأنماط الوراثية للتعددات الشكلية لمورثة TGF-ß1 (codon25)

جدول 4. 6. توزع النمط المورثي والأليلات للتعدد الشكلي لمورثة TGF-ß1 (codon25) ضمن عينات الدراسة

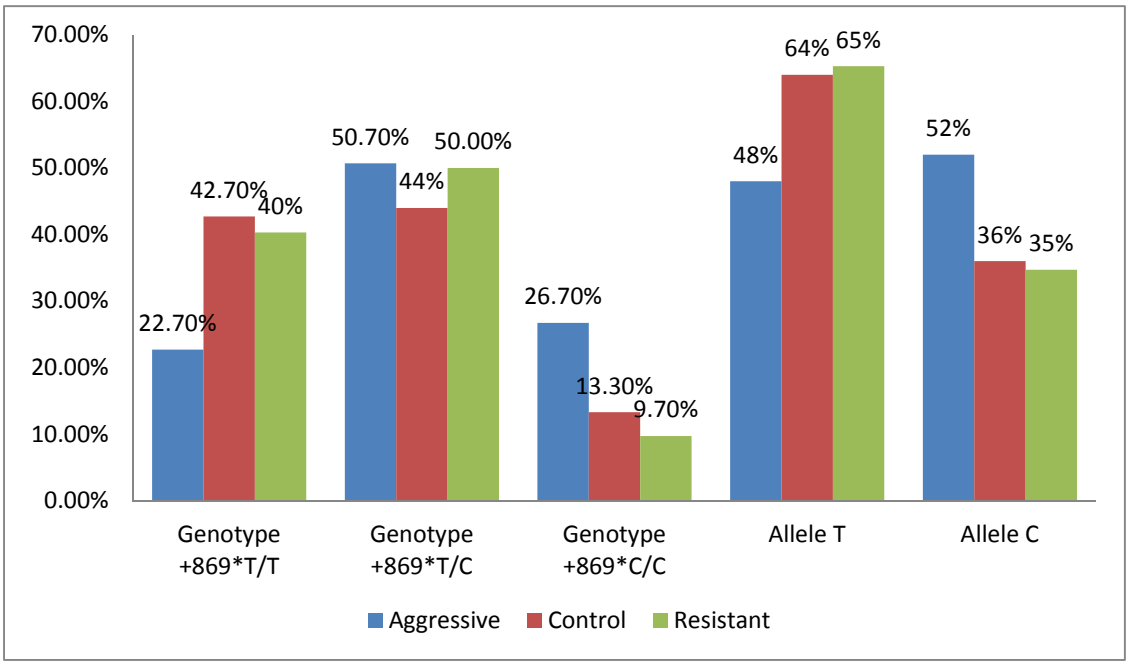
	مجموعة الإجتياحي (n=75)	مجموعة شاهدة (n=75)	مجموعة مقاومة (n=62)	قيمة *p*
النمط الجيني				
+915*G/G	51(%68)	56(%74,66)	52(%83,8)	0,327
+915*G/C	21(%28)	16(%21,34)	8(%12,9)	0,526
+915*C/C	3(%4)	3(%4)	2(%3,3)	0,543
الأليلات				
+915*G	123(%82)	128(%85,3)	112(%90,3)	0,468
+915*C	27(%18)	22(%14,7)	12(%9,7)	0,326

4. 2. 2. تحليل التعدد الشكلي في الموقع codon10

تم عرض نتائج تقييم التعدد الشكلي لمورثة TGF-β1 (codon10) لكافة مجموعات الدراسة في الجدول 7.4 . وجدنا نسبة 22,7% للنمط المورثي T/T*869+ ضمن مجموعة المرض حول السني الإجتياحي يقابلها نسبة 42,7% ضمن المجموعة الشاهدة و 40,3% ضمن المجموعة المقاومة، وبالتالي نلاحظ انخفاض نسبة هذا النمط المورثي في مجموعة المرض حول السني الإجتياحي مقارنة بالمجموعة الشاهدة والمجموعة المقاومة. ضمن مجموعة المرض حول السني الإجتياحي، كانت نسبة النمط المورثي C/C*869+ 26,7%، بينما انخفضت نسبتها إلى 13,3% في المجموعة الشاهدة و 9,7% في المجموعة المقاومة.بالمقابل بلغت نسبة تواجد النمط المورثي T/C*869+ في المجموعات الثلاث 50,7%، 44% و 50% في مجموعة الإجتياحي والمجموعة الشاهدة والمجموعة المقاومة على التوالي، وكنتيجة لم يكن لهذه الفروقات البسيطة في توزع النمط المورثي الأخير أي دلالة إحصائية بين مجموعات الدراسة ($p>0,05$).

من ناحية ثانية، كانت نسبة تواتر الأليل T*869+ في مجموعة مرضى الإجتياحي48% مقارنة مع المجموعة الشاهدة بنسبة 64% والمجموعة المقاومة بنسبة 65,3%. أما الأليل C*869+ كان متواجداً بنسبة 52% في مجموعة مرضى الإجتياحي مقارنة مع المجموعة الشاهدة 36% والمجموعة المقاومة 34,7%. وبالتالي كان هناك فارق ذو دلالة إحصائية بين نسب الأليلات T*869+ و C*869 بين مجموعة المرض حول السني الإجتياحي والمجموعة

الشاهدة المطابقة (p=0,021) وكذلك بين مجموعة المرض حول السني الإجتياحي والمجموعة المقاومة للمرض (p=0,013)، بينما لم يكن هناك أي فارق ذو دلالة إحصائية بين المجموعة الشاهدة المطابقة والمجموعة المقاومة للمرض (p>0,05). تم إدراج نسب الأليلات والأنماط الوراثية على codon10 في المخطط 4.4.



المخطط 4.4. نسب الأليلات والأنماط الوراثية للتعددات الشكلية لمورثة TGF-β1 (codon10)

جدول 7.4. توزيع الأنماط الجينية والأليلات للتعددات الشكلية لمورثة TGF-β1 (codon10) ضمن مجموعات الدراسة

C vs R	AgP vs R			AgP vs C			مجموعة R	مجموعة C	مجموعة AgP	
P*	95% CI	OR	P*	95% CI	OR	P*				
										الأنماط الوراثية
0,763	1,06-4,12	2,13	0,009	1,35-4,28	2,73	0,002	27(40,3%)	31(42,7%)	17(22,7%)	**+869*T/T**
0,465	-	-	0,778	-	-	0,321	33(49,3%)	34(44%)	38(50,7%)	**+869*T/C**
0,616	1,23-7,52	3,32	0,002	1,13-5.49	2,48	0,013	7(10,4%)	10(13,3%)	20(26,7%)	**+869*C/C**
										الأليلات
0,752	1.10-3,70	2,02	0,015	1,05-3,63	1,83	0,021	87(65%)	96(64%)	72(48%)	**+869*T**
							47(35%)	54(36%)	78(52%)	**+869*C**

AgP= مجموعة المرض حول السني الجائح، C= المجموعة الشاهدة، R= المجموعة المقاومة

*إختبار كاي مربع

OR= odds ratio، CI= 95% confidence intervals

5. المناقشـــــة *Discussion*

تتـأثر النتـائج السـريرية النهائيـة للأمـراض الإنتانيـة، المناعيـة الذاتيـة والخبيثـة بـالتوازن النهـائي لإنتـاج السيتوكينات قبيل الإلتهابيـة والمضـادة للإلتهـاب. وبشـكل محـدد، فقد أوضـحت مجموعـة دراسات أن التعددات الشكلية للمورثات يمكن أن تؤثر على مستوى التعبير عنها وبالتالي على الإستجابة المناعية النهائية (Bidwell *et al.* 1999a). يبدو أن الإختلافات بين الأفراد في أنماط السيتوكينات على أنها بسبب – على الأقل جزء منها – للتغيرات الشكلية في الأليلات ضـمن المنـاطق الجينيـة المنظمـة للسـيتوكينات والتـي تكـون مهمـة عـادة فـي تطـور المـرض .(Bidwell *et al.* 1999b)

لم يتم تحديد الآليات الدقيقة لتخرب النسج في المرض حول السني المزمن والجائح على الرغم من اعتبار العديد من الوسائط الإلتهابية كالسيتوكينات ذات دور مهم (Offenbacher 1996 ;Gemmell *et al.* 1997). شهدت السنوات الماضية العديد من الدراسات التي حاولت إيجاد علاقة بين التعدد الشكلي الوحيد والأنماط المختلفة من المرض حول السني. تم ربط عدد من هذه التعددات الشكلية مع تزايد إحتمال الإصابة بالمرض حول السني (Kinane *et al.* 2005). في هذه الدراسة تحرينا العلاقة بين التعدد الشكلي لمورثة عامل النمو المحول- بيتا 1 مع المرض حول السني الجائح.

5. 1. منهجية الدراسة

في هذه الدراسة، تم توزيع 212 فرداً ضمن ثلاث مجموعات: 75 فرداً ضمن مجموعة المرض حول السني الجائح، 75 فرداً ضمن المجموعة المطابقة الشاهدة و 62 فرداً ضمن المجموعة المقاومة. تم استخدام عينة من الدم الوريدي للحصول على DNA ، الذي تمت دراسته باستخدام تقنية ARMS-PCR.

كان لاستخدام عينة الدم الوريدي لاستخراج DNA الميزات التالية:

- التقنية سهلة الإجراء.
- لا تحتاج إلى خبرات عالية للتنفيذ.
- غير مكلفة مادياً.
- إمكانية الحصول على كميات ضخمة من DNA مقارنة بأخذ مسحات من الخد.

أما الصعوبات التي واجهتنا نتيجة استخدام عملية سحب الدم الوريدي فكانت:

- تراجع عدد من المرضى عن المشاركة في البحث وخصوصاً من النساء وذلك خوفاً من عملية سحب الدم.
- سرعة تخرب الدم في حال عدم حفظه بشكل جيد.
- قلة كمية DNA في حال تأخرت عملية الإستخلاص.

أما بالنسبة لتقنية ARMS-PCR فقد كانت ناجحة لدراسة التعدد الشكلي للمورثات التي ترتبط بشكل مباشر في تنظيم التعبير عن المورثة (Pravica *et al.* 1999). وتم التحقق من مصداقية التحليل باجراء عدة تحاليل منفصلة لنفس العينات والتأكد من تكرار نفس النتائج.

5. 2. التعدد الشكلي لمورثة عامل النمو المحول- بيتا1 وعلاقته بالمرض حول السني الإجتياحي

ينتمي عامل النمو المحول- بيتا 1 إلى عائلة عوامل النمو متعددة الوظائف، والتي تملك تأثيرات منظمة على العديد من العمليات التطورية والفيزيولوجية (Sporn & Roberts 1992). يملك TGF- ß1 صفات مضادة للإلتهاب وكابحة للمناعة والتي من المتوقع وجود دور منظم لها في المرض حول السني بسبب تأثيراتها على إعادة تشكيل النسيج الضام والأيض العظمي (Chang *et al.* 2002).

تم تحديد سبعة تعددات شكلية وحيدة SNPs بعد فحص مورثة TGF- ß1 (Cambien *et al.* 1996). وتم تأكيد دور إثنين من هذه التعددات الشكلية الوحيدة في التأثير على مستويات إنتاج TGF- ß1 بين الأفراد (Awad *et al.* 2002). يغير التعدد الشكلي في تسلسل DNA في الموقع +869 مع تبدل أليل T إلى أليل C الحمض الأميني على codon10 من لوسين إلى برولين. بشكل مشابه، التعدد الشكلي ثنائي الأليل في الموقع +915 مع تبديل أليل G إلى أليل C يغير الحمض الأميني على codon25 من أرجنين إلى برولين. في كلا التعددين الشكليين فإن ترميز البرولين يؤدي إلى قلة تصنيع TGF- ß1 في الدراسات المخبرية وعلى البشر.

في هذه الدراسة، تم تحري وجود علاقة بين تعددين شكليين في الموقعين +869 و +915 مع المرض حول السني الجائح. إن تواتر التعددات الشكلية المشاهد في هذه الدراسة مشابه لما ورد في الدراسات السابقة على الأوروبيين القوقازيين (Cambien *et al.* 1996; Arkwright *et al.* 2000). لم نجد علاقة ذات دلالة بين المرض حول السني الجائح والتعدد الشكلي في الموقع +915. لم يكن هناك فرق ذو دلالة بين مجموعة المرض حول السني الجائح والمجموعتين الشاهدتين في تواتر الأليلات +915*G و +915*C ($p>0,05$). هذه النتائج تتوافق مع دراسة Holla *et al.* (2002) التي لم تجد علاقة بين التعدد الشكلي في +915 والمرض حول السني المزمن عند المرضى التشيكيين القوقازيين. وكذلك تتوافق هذه النتائج مع نتائج دراسة Abou Sulaiman (2006) على المرضى البريطانيين القوقازيين من حيث عدم وجود علاقة بين التعدد الشكلي في الموقع +915 والمرض حول السني الجائح.

تم إيجاد علاقة بين التعدد الشكلي في الموقع +869 وزيادة الإصابة بالمرض حول السني الجائح ($p<0,05$). كان تواجد الأليل +869*C أعلى في مجموعة المرض حول السني الجائح (52%) مقارنة مع المجموعة الشاهدة (36%) والمجموعة المقاومة(35%). وعلى العكس، فقد كان تواتر وجود الأليل +869*T سائداً في المجموعتين الشاهدة والمقاومة مقارنة مع المجموعة المصابة بالمرض حول السني الجائح. هذه النتائج لا تتوافق مع نتائج Holla *et al.* (2002) الذي لم يجد علاقة بين التعدد الشكلي في الموقع +869 والمرض حول السني المزمن. يمكن أن نعزو هذا الإختلاف إلى سببين الأول هو إختلاف العرق المدروس وإختلاف طبيعة المرض حول السني حيث انه درس العلاقة مع المرض المزمن وليس الجائح. وقد توافقت

نتائجنا مع نتائج دراسة Abou Sulaiman 2006 بالنسبة لهذا الموقع وعلاقته بالمرض حول السني الجائح.

في النسج المحيطة بالسن، يكبح عامل النمو المحول- بيتا1 الفعالية البروتينية عبر تخفيف تنظيم الفعالية النسخية للـ MMPs (Birkedal-Hansen 1993). يمكنه أيضاً تحفيز تصنيع قالب النسيج الضام عبر الخلايا الصانعة لليف والخلايا الصانعة للعظم (Overall *et al.* 1991). وهذا بدوره يؤدي إلى تشكل قالب خارج خلوي ويحرض التليف (Page 1992; Hobbs *et al.* 1991). من جهة أخرى، يحرض عامل النمو المحول- بيتا1 الجذب الكيميائي للعدلات، ووحيدات النوى، والخلايا البدينة واللمفاويات (Wahl *et al.* 1993) ويمكنه أيضاً زيادة تحرير السيتوكينات التي تؤدي إلى تخريب النسج حول السنية، خصوصاً في المراحل المبكرة من الإستجابة الإلتهابية (Wahl *et al.* 1993).

بناءً على هذا الدور ثنائي الوظيفة لعامل النمو المحول- بيتا1، فإن العلاقة التي وجدت في دراستنا بين التعدد الشكلي في الموقع +869 والمرض حول السني الجائح يمكن تفسيرها. إن سيادة النمط الجيني C/C*869+ في مجموعة المرض حول السني الجائح يؤشر إلى قلة في إفراز TGF-ß1. وبالتالي، يكون لدى هؤلاء المرضى سيطرة ضعيفة على الإلتهاب مع زيادة في السيتوكينات قبيل الإلتهابية و MMPs والذي يؤدي إلى زيادة في تخرب الكولاجين وتحرض أيضاً الإمتصاص العظمي والتخرب النسيجي. هذا يدعمه أيضاً حقيقة أن مستويات عامل النمو المحول- بيتا1 إرتفعت في المرض المعتدل، وانخفضت مستوياتها في السائل الميزابي اللثوي مع المرض حول السني المتقدم (Skaleric *et al.* 1997).

6. الإستنتاجات *Conclusions*

أظهرت الدراسة الحالية النتائج التالية:

- تزداد قابلية الإصابة بالمرض حول السني الجائح عند المرض السوريين الذين لديهم تعدد شكلي لمورثة عامل النمو المحول- بيتا1 في الموقع (codon 10)869+ وذلك للنمط الجيني C\C.

- لا يوجد علاقة بين التعدد الشكلي لمورثة عامل النمو المحول- بيتا 1 في الموقع (codon 25)915+ وزيادة قابلية الإصابة بالمرض حول السني الجائح.

7. الأعمال المستقبلية *Future Work*

تتضـمن الأعمـال المسـتقبلية التـي يمكـن إجراؤهـا بنـاءً علـى الأسـئلة المطروحـة مـن هـذه الدراسة:

- دراسة تعددات شكلية لمورثات السيتوكينات الأخرى.

- دراسـة الإرتبـاط والعلاقـة فيمـا بـين التعـددات الشـكلية لمورثـات السـيتوكينات وعلاقتها بالمرض حول السني الجائح.

- دراسـة علاقـة التعـدد الشـكلي لمورثـة عامـل النمـو المحـول- بيتـا1 والمـرض حول السني المزمن.

8. المـــراجـــع Bibliography

المراجع العربية

أبـو سـليمان، علـي. دراسـة جرثوميـة وبائيـة لإلتهـاب النسـج الداعمـة المبكرة فـي سـوريا وتطبيق الدوكسي سيكلين والطعوم العظمية في المعالجة باستخدام المسابر. رسالة ماجستير 2001.

الشيباني، كنان. دراسة وبائية وراثية لإلتهاب النسج حول السنية الإجتياحي عند طلاب مدارس المنطقة الجنوبية في سوريا. رسالة ماجستير 2011.

بـولص، وفـاء. إنتشـار إلتهـاب النسـج الداعمـة الشـبابي الموضـع والمعمـم فـي سـوريا وتـأثير الصـادات الحيويـة فـي معالجـة إلتهـاب النسـج الداعمـة الشـبابي الموضـع وسـريع التطـور. رسـالة دكتوراه 1996.

كـاظم، مهنـد. دراسـة وبائيـة لإلتهـاب النسـج حول السنية الإجتياحي وعوامل خطورة إنتشاره فـي منطقتين جغرافيتين في سوريا. ماجستير 2005.

Abdellatif, H. M. & Burt, B. A. (1987).An epidemiological investigation into the relative importance of age and oral hygiene status as determinants of periodontitis. *J Dent Res* **66,** 13-18.

Abou Sulaiman, A. (2006). Studies in microbiology and cytokine gene polymorphisms in patients with aggressive periodontitis. PhD thesis. UK.University of Manchester. 13 & 123-125.

Al-Zahrani, M. S., Bissada, N. F. & Borawskit, E. A. (2003). Obesity and periodontal disease in young ,middle-aged, and older adults. *J Periodontol* **74,** 610-615.

Alabdulkarim, M., Bissada, N., Al-Zahrani, M., Ficara, A. & Siegel, B. (2005). Alveolar bone loss in obese subjects. *J Int Acad Periodontol* **7,** 34-38.

Albandar, J. M. (1993). Juvenile periodontitis--pattern of progression and relationship to clinical periodontal parameters. *Community Dent Oral Epidemiol* **21,** 185-189.

Albandar, J. M. (2002). Global risk factors and risk indicators for periodontal diseases. *Periodontol 2000* **29,** 177-206.

Albandar, J. M ,.Brown, L. J., Genco, R. J. & Loe, H. (1997a). Clinical classification of periodontitis in adolescents and young adults. *J Periodontol* **68,** 545-555.

Albandar, J. M., Brown, L. J. & Loe, H. (1997b). Clinical features of early-onset periodontitis. *J Am Dent Assoc* **128,** 1393-1399.

Albandar, J. M., Brown, L. J. & Loe, H. (1997c). Putative periodontal pathogens in subgingival plaque of young adults with and without early-onset periodontitis. *J Periodontol* **68,** 973-981.

Albandar, J. M., Buischi, Y. A. & Axelsson, P. (1995). Caries lesions and dental restorations as predisposing factors in the progression of periodontal diseases in adolescents. A 3-year longitudinal study. *J Periodontol* **66,** 249-254.

Albandar, J. M., Muranga, M. B. & Rams, T. E. (2002). Prevalence of aggressive periodontitis in school attendees in Uganda. *J Clin Periodontol* **29,** 823- 831.

Albandar, J. M. & Rams, T. E. (2002). Global epidemiology of periodontal diseases: an overview. *Periodontol 2000* **29,** 7-10.

Albandar, J. M. & Tinoco, E. M. (2002). Global epidemiology of periodontal diseases in children and young persons. *Periodontol 2000* **29,** 153-176.

American Academy of Periodontology. (1999). Consensus report: aggressive periodontitis. *Ann Periodontol* **4**: 53.

American Academy of Periodontology. (2000). Parameter on aggressive periodontitis. *J Periodontol* **71,** 867-869.

American Academy of Periodontology. (2005). Epidemiology of Periodontal Diseases. *J Periodontal,* **76,** 1406- 1419.

Aneta, Atanasovska-Stojanovska., Dejan, Trajkov., Mirjana, Popovska., Mirko, Spiroski. (2009). Analysis of Transforming Growth Factor-Beta1 Gene Polymorphisms in Macedonian Patients with Chronic Periodontitis. *Macedonian Journal of Medical Sciences,***2,** 30-35.

Arkwright, P. D., Laurie, S., Super, M., Pravica, V., Schwarz, M. J., Webb, A. K., Hutchinson, I. V. (2000). TGF-beta (1) genotype and accelerated decline in lung function of patients with cystic fibrosis. *Thorax*, **55(6)**, 459-462.

Armitage, G. C. (1999). Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol* **4,** 1-6.

Armitage, G. C. (2004). Periodontal diagnoses and classification of periodontal diseases. *Periodontol 2000* **34,** 9-21.

Asikainen, S., Lai, C. H., Alaluusua, S. & Slots, J. (1991). Distribution of Actinobacillus actinomycetemcomitans serotypes in periodontal health and disease. *Oral Microbiol Immunol* **6,** 115-118.

Atilla, G., Emingil, G., Köse, T. & Berdeli, A. (2006). TGF-β1 gene polymorphisms in periodontal diseases, *J Clinical Biochemistry*, **39**, 929-934.

Awad, M. R., El-Gamel , A., Hasleton, P., Turner, D. M., Sinnott, P.J. & Hutchinson, I. V.(1998). Genotypic variation in the transforming growth factor-beta1 gene: association with transforming growth factor-beta1 production, fibrotic lung disease, and graft fibrosis after lung transplantation. *Transplantation***, 66**, 1014-1020.

Baelum, V., Chen, X ,.Manji, F., Luan, W. M. & Fejerskov, O. (1996). Profiles of destructive periodontal disease in different populations. *J Periodontal Res* **31,** 17-26.

Banyer, J .L., Hamilton, N. H., Ramshaw, I. A. & Ramsay, A. J. (2000). Cytokines in innate and adaptive immunity. *Rev Immunogenet* **2,** 359-373.

Beaty, T. H., Boughman, J. A., Yang, P., Astemborski, J.A. & Suzuki, J. B. (1987). Genetic analysis of juvenile periodontitis in families ascertained through an affected proband. *Am J Hum Genet*, **40**, 443-452.

Beck, J. D. (1994). Methods of assessing risk for periodontitis and developing multifactorial models. *J Periodontol* **65,** 478-468.

Bidwell, J., Keen, L., Gallagher, G., Kimberly, R., Huizinga, T., McDermott, M. F., Oksenberg, J., McNicholl, J., Pociot, F., Hardt, C., D'Alfonso, S. (1999). Cytokine gene polymorphism in human disease: on-line databases. *Genes Immun*, **1(1),** 3-19.

Bidwell, J. L., Wood, N. A., Morse, H. R., Olomolaiye, O. O., Keen, L. J., Laundy, G. J.(1999). Human cytokine gene nucleotide sequence alignments: supplement 1. *Eur J Immunogenet*, **26(2-3)**, 135-223.

Birkedal-Hansen, H. (1993). Role of cytokines and inflammatory mediators in tissue destruction. *J Periodontal Res*, **28**, 500-510.

Bonfil, J. J., Dillier, F. L., Mercier, P., Reviron, D., Foti, B., Sambuc, R., Brodeur, J. M. & Sedarat, C. (1999).A "case control" study on the rôle of HLA DR4 in severe periodontitis and rapidly progressive periodontitis. Identification of types and subtypes using molecular biology (PCR.SSO). *J Clin Periodontol*, **26**, 77-84.

Borrell, L. N. & Papapanou, P. N. (2005). Analytical epidemiology of periodontitis. *J Clin Periodontol* **32 Suppl 6,** 132-158.

Breivik, T., Thrane, P. S., Murison, R. & Gjermo, P. (1996). Emotional stress effects on immunity, gingivitis and periodontitis. *Eur J Oral Sci*, **104**, 327-334.

Boughman, J. A., Astemborski, J. A. & Suzuki, J. B. (1992). Phenotypic assessment of early onset periodontitis in sibships. *J Clin Periodontol,* **19**, 233-239.

Boughman, J. A., Halloran, S. L., Roulston, D., Schwartz, S., Suzuki, J. B., Weitkamp, L. R., Wenk, R. E., Wooten, R. & Cohen, M. M. (1986). An autosomal-dominant form of juvenile periodontitis: its localization to chromosome 4 and linkage to dentinogenesis imperfecta and Gc. *J Craniofac Genet Dev Biol*, **6**, 341-350.

Burmeister, J. A., Best, A. M., Palcanis, K. G., Caine, F. A. & Ranney, R. R. (1984). Localized juvenile periodontitis and generalized severe periodontitis: clinical findings. *J Clin Periodontol* **11,** 181-192.

Burt, D. W. (1992). Evolutionary grouping of the transforming growth factor-beta superfamily. *Biochem Biophys Res Commun*, **184**, 590-595.

Butler, J. H. (1969). A familial pattern of juvenile periodontitis (periodontosis). *J Periodontol*, **40**,115-118.

Cambien, F., Ricard, S., Troesch, A., Mallet, C., Generenaz, L. and Evans, A. *et al.*, (1996), Polymorphisms of the transforming growth factor-beta1 gene in relation to myocardial infarction and blood pressure: the Etude Cas-Temoin de I'Infarctus du Myocarde (ECTIM) study, *Hypertension*, **28**, 881–887.

Carranza, F. A., Newman, M. G., Takei, H. H., (2003). Clinical Periodontology, 9th edition, Company Pennsylvania.

Chang, Y. C., Yang, S. F., Lai, C. C., Liu, J. Y., & Heish, Y. S. (2002), Regulation of matrix metalloproteinase production by cytokines, pharmacological agents and periodontal pathogens in human periodontal ligament fibroblast cultures. *J Periodontal Res,* **37**, 196-203.

Corbet, E. F., Zee, K. Y. & Lo, E. C. (2002). Periodontal diseases in Asia and Oceania. *Periodontol 2000* **29,** 122-152.

Corey, L. A., Nance, W. E., Hofstede, P. & Schenkein, H. A. (1993). Self-reported periodontal disease in a Virginia twin population. *J Periodontol,* **64**, 1205-1208.

Darby, I. & Curtis, M. (2001). Microbiology of periodontal disease in children and young adults. *Periodontol 2000* **26,** 33-53.

de Souza, A. P., Trevilatto, P. C., Scarel-Caminaga, R. M., de Brito, R. B. & Line, S. R. (2003). Analysis of the TGF-beta1 promoter polymorphism (C-509T) in patients with chronic periodontitis. *J Clin Periodonto,* **30**, 519-523.

Defrance, T., Vanbervliet, B., Brière, F., Durand, I., Rousset, F., Banchereau, J. J. (1992). Interleukin 10 and transforming growth factor beta cooperate to induce anti-CD40-activated naive human B cells to secrete immunoglobulin A. *Exp Med*, **175(3),** 671-682.

Deinzer, R., Hilpert, D ,.Bach, K., Schawacht, M. & Herforth, A. (2001). Effects of academic stress on oral hygiene--a potential link between stress and plaque-associated disease? *J Clin Periodontol* **28,** 459-464.

Derynck, R., Rhee, L., Chen, E. Y. and A. Van Tilburg, (1987). Intron–exon structure of the human transforming growth factor-beta precursor gene, *Nucleic Acids Res,* **15,** 3187–3189.

Drury, T. F., Garcia, I. & Adesanya, M. (1999). Socioeconomic disparities in adult oral health in the United States. *Ann N Y Acad Sci* **896,** 322-324.

Fujii, D., Brissenden, J. J., Derynck, R. and Francke, U. (1986). Transforming growth factor beta gene maps to human chromosome 19 long arm and to mouse chromosome 7, *Somat Cell Mol Genet,* **12**,pp. 281–288.

Garcia, R. I., Henshaw, M. M. and Krall, E. A. (2001), Relationship between periodontal disease and systemic health, *Periodontology 2000*, **25,** 21–36.

Gelskey, S. C. (1999). Cigarette smoking and periodontitis: methodology to assess the strength of evidence in support of a causal association. *Community Dent Oral Epidemiol* **27,** 16-24.

Gemmell, E., Marshall, R. I., Seymour, G. J. (1997). Cytokines and prostaglandins in immune homeostasis and tissue destruction in periodontal disease. *Periodontol 2000*, **14**,112-143.

Genco, R. J. (1992). Host responses in periodontal diseases: current concepts. *J Periodontol* **63,** 338-355.

Genco, R. J., Christersson, L. A. & Zambon, J. J. (1986). Juvenile periodontitis. *Int Dent J* **36,** 168-176.

Genco, R. J., Ho, A. W., Grossi, S. G., Dunford, R. G. & Tedesco, L. A. (1999). Relationship of stress, distress and inadequate coping behaviors to periodontal disease. *J Periodontol* **70,** 711-723.

Gjermo, P., Rosing, C. K., Susin, C. & Oppermann, R. (2002). Periodontal diseases in Central and South America. *Periodontol 2000* **29,** 70-78.

Greenberg, D. A. (1993). Linkage analysis of "necessary" disease loci versus "susceptibility" loci. *J Hum Genet*, **52(1),**135-143.

Grossi, S. G. (2001). Treatment of periodontal disease and control of diabetes: an assessment of the evidence and need for future research. *Ann Periodontol* **6,** 138-145.

Guttmacher, A. E., Collins, F. S.(2003). Welcome to the genomic era. *N Engl J Med*, **349(10),** 996-998.

Gwinn, M. R., Sharma, A., De Nardin, E.(1999). Single nucleotide polymorphisms of the N-formyl peptide receptor in localized juvenile periodontitis. *J Periodontol*, **70(10),**1194-1201.

Haffajee, A. D. & Socransky, S. S. (1994). Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontol 2000* **5,** 78-111.

Hart, T. C. & Kornman, K. S. (1997). Genetic factors in the pathogenesis of periodontitis. *Periodontol 2000* **14,** 202-215.

Hart, T. C., Marazita, M. L., Schenkein, H. A., Brooks, C. N., Gunsolley, J. G., Diehl, S. R. (1991). No female preponderance in juvenile periodontitis after correction for ascertainment bias. *J Periodontol*, **62(12)**, 745-749.

Hart, T. C., Marazita, M.L., Schenkein, H. A., Diehl, S. R.(1992). Re-interpretation of the evidence for X-linked dominant inheritance of juvenile periodontitis. *J Periodontol*, **63(3),** 169-173.

Hart, T. C., Marazita, M. L. & Wright, J. T. (2000). The impact of molecular genetics on oral health paradigms. *Crit Rev Oral Biol Med* **11,** 26-56.

Hassell, T. M., Harris, E. L.(1995). Genetic influences in caries and periodontal diseases. Crit *Rev Oral Biol Med*, **6(4),** 319-342.

Hennig, B. J., Parkhill, J. M., Chapple, I. L., Heasman, P. A., Taylor, J. J. (1999). Association of a vitamin D receptor gene polymorphism with localized early-onset periodontal diseases. *J Periodontol*, **70(9),** 103-128.

Hobbs, H .C., Rowe, D. J. & Johnson, P. W. (1999). Periodontal ligament cells from insulin-dependent diabetics exhibit altered alkaline phosphatase activity in response to growth factors. *J Periodontol* **70,** 736-742.

Hodge, P., Michalowicz, B. (2000). Genetic predisposition to periodontitis in children and young adults. *J Periodontol*, **26**,113-134.

Holla, L. I., Fassmann, A., Benes, P., Halabala, T. and Znojil, V. (2002), 5 polymorphisms in the transforming growth factor-β1 gene (TGF-β1) in adult periodontitis, *J Clin Periodontol,* **29(4),** 336-341.

Irwin, C. R. & Myrillas, T. T. (1998). The role of IL-6 in the pathogenesis of periodontal disease. *Oral Dis* **4,** 43-47.

Jorgenson, R. J., Levin, L. S., Hutcherson, S. T., Salinas, C. F. (1975). Periodontosis in sibs. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol,* **39(3)**, 396-402.

Kinane, D. F. (2001). Causation and pathogenesis of periodontal disease. *Periodontol 2000* **25,** 8-20.

Kinane, D. F., Hart, T. C. (2003). Genes and gene polymorphisms associated with periodontal disease. *Crit Rev Oral Biol Med*, **14(6),** 430-449.

Kinane, D. F. & Lappin, D. F. (2001). Clinical, pathological and immunological aspects of periodontal disease. *Acta Odontol Scand*, **59**, 154-160.

Kinane, D. F., Podmore, M., Murray ,M. C., Hodge, P. J. & Ebersole, J. (2001). Etiopathogenesis of periodontitis in children and adolescents. *Periodontol 2000* **26,** 54-91.

Kinane, D. F., Shiba, H., Hart, T. C. (2005). The genetic basis of periodontitis. *Periodontol 2000*, **39**, 91-117.

Kobayashi, T., Sugita, N., van der Pol, W. L., Nunokawa, Y., Westerdaal, N. A., Yamamoto, K., van de Winkel, J. G., Yoshie, H. (2000). The Fcgamma receptor genotype as a risk factor for generalized early-onset periodontitis in Japanese patients. *J Periodontol*, **71(9)**,1425-1432.

Kornman, K. S., Crane, A., Wang, H. Y., di Giovine, F. S., Newman, M. G., Pirk, F. W., Wilson, T. G., Jr., Higginbottom ,F. L. & Duff, G. W. (1997). The interleukin-1 genotype as a severity factor in adult periodontal disease. *J Clin Periodontol* **24,** 72-77.

Kornman, K. S. & Loe, H. (1993). The role of local factors in the etiology of periodontal diseases. *Periodontol 2000* **2,** 83-97.

Lang, N. P., Joss, A. & Tonetti, M. S. (1996). Monitoring disease during supportive periodontal treatment by bleeding on probing. *Periodontol 2000* **12,** 44-48.

Lappin, D. F., Koulouri, O., Radvar, M., Hodge, P. & Kinane, D. F. (1999). Relative proportions of mononuclear cell types in periodontal lesions analyzed by immunohistochemistry. *J Clin Periodontol* **26,** 183-189.

Li, Q. Y., Zhao, H. S., Meng, H. X., Zhang, L., Xu, L., Chen, Z. B. (2005). Interleukin-1 polymorphisms in patients with aggressive periodontitis. *Shanghai Kou Qiang Yi Xue*, **14(4),** 333-337.

Little, S. (2001). Amplification-refractory mutation system (ARMS) analysis of point mutations. *Curr Protoc Hum Genet.*, Chapter 9.

Loe, H., Anerud, A., Boysen, H & .Morrison, E. (1986). Natural history of periodontal disease in man. Rapid, moderate and no loss of attachment in Sri Lankan laborers 14 to 46 years of age. *J Clin Periodontol* **13,** 431-445.

Loe, H. & Brown, L. J. (1991). Early onset periodontitis in the United States of America. *J Periodontol* **62,** 608-616.

Loe, H. & Silness, J. (1963). Periodontal Disease in Pregnancy. I. Prevalence and Severity. *Acta Odontol Scand* **21,** 533-551.

Loe, H., Theilade, E. & Jensen, S. B. (1965). Experimental Gingivitis in Man. *J Periodontol* **36,** 177-187.

Loesche, W. J. (1988). The role of spirochetes in periodontal disease. *Adv Dent Res* **2,** 275-283.

Lopez, N. J., Rios, V., Pareja, M. A. & Fernandez, O. (1991). Prevalence of juvenile periodontitis in Chile. *J Clin Periodontol* **18,** 529-533.

Marazita, M. L., Burmeister, J. A., Gunsolley, J. C., Koertge, T. E., Lake, K. & Schenkein, H. A. (1994). Evidence of autosomal dominant inheritance and race-specific heterogeneity in early onset periodontitis. *J Periodontol*, **65**, 623-630.

Masada, M. P., Persson, R., Kenney, J. S., Lee, S. W., Page, R. C. & Allison, A. C. (1990). Measurement of interleukin-1 alpha and -1 beta in gingival crevicular fluid: implications for the pathogenesis of periodontal disease. *J Periodontal Res* **25,** 156-163.

Melnick, M., Shields, E. D., Bixler, D. (1976). Periodontosis: a phenotypic and genetic analysis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, **42(1),** 32-41.

Meng, H. X. & Zheng, L. F. (1989). T cells and T-cell subsets in periodontal diseases. *J Periodontal Res* **24,** 121-126.

Mercado, F. B., Marshall, R. I. and Bartold, P. M. (2003), Inter-relationships between rheumatoid arthritis and periodontal disease. A review, *J Clin Periodontol,* **30**, 761–772.

Michalowicz, B. S. (1994). Genetic risk factors for the periodontal diseases. *Compendium* **15,** 1036, 1038, 1040 passim.

Michalowicz, B. S., Aeppli, D., Virag, J. G., Klump, D. G., Hinrichs, J. E., Segal, N. L., Bouchard, T. J. Jr., Pihlstrom, B. L. (1991). Periodontal findings in adult twins. *J Periodontol*, **62(5),** 293-299.

Michalowicz, B. S., Diehl, S. R., Gunsolley, J. C., Sparks, B. S., Brooks, C. N., Koertge, T. E., Califano, J. V., Burmeister, J. A. & Schenkein, H. A. (2000a). Evidence of a substantial genetic basis for risk of adult periodontitis. *J Periodontol* **71,** 1699-1707.

Michalowicz, B. S., Ronderos, M., Camara-Silva, R., Contreras, A. & Slots, J. (2000b). Human herpesviruses and Porphyromonas gingivalis are associated with juvenile periodontitis. *J Periodontol* **71,** 981-988.

Miyazono, K., Heldin, C. H. (1992). Structure, function and possible clinical application of transforming growth factor-beta. *J Dermatol*, **19(11),** 644-647.

Modlin, R. L. & Nutman, T. B. (1993). Type 2 cytokines and negative immune regulation in human infections. *Curr Opin Immunol* **5,** 511-517.

Musso, T., Espinoza-Delgado, I., Pulkki, K., Gusella, G. L., Longo, D. L. and Varesio, L. (1990). Transforming growth factor beta downregulates interleukin-1 (IL-1)-induced IL-6 production by human monocytes, *Blood*, **76**, 2466–2469.

Nakajima, T., Ueki-Maruyama, K., Oda, T., Ohsawa, Y., Ito, H., Seymour, G. J., Yamazaki, K. (2005). Regulatory T-cells infiltrate periodontal disease tissues. *J Dent Res*, **84(7),** 639-643.

Nina, Babel., Georgy, Cherepnev., Daniel, Babel., Alla, Tropmann., Markus, Hammer., Hans-Dieter, Volk., Petra, Reinke. Analysis of Tumor Necrosis Factor-α, Transforming Growth Factor-β, Interleukin-10, IL-6, and Interferon-γ Gene Polymorphisms in Patients With Chronic Periodontitis. (2006). *Journal of Periodontology,* **77**, 1978-1983.

Novak, N. G. (2002). Classification of diseases and conditions affecting the periodontium . In: Newman, M. G., Takei, H. H., Carranza, F. A. Clinical periodontology. Ninth edition. W.B.Saunders company. Chapter 4. pp 76- 86.

Offenbacher, S., Heasman, P. A. & Collins, J. G. (1993). Modulation of host PGE2 secretion as a determinant of periodontal disease expression. *J Periodontol* **64,** 432-444.

Offenbacher, S. & Zambon, J., J. (1996). Consensus report for periodontal disease: pathogenesis and microbial factors. *Ann Periodontol* **1**, 926-932.

Ogden, G. R., Wight, A. J. & Rice, P. (1999). Effect of alcohol on the oral mucosa assessed by quantitative cytomorphometry. *J Oral Pathol Med* **28,** 216- 220.

Ohyama, H., Takashiba, S., Oyaizu, K., Nagai, A., Naruse, T., Inoko, H., Kurihara, H., Murayama, Y. (1996). HLA Class II genotypes associated with early-onset periodontitis: DQB1 molecule primarily confers susceptibility to the disease. *J Periodontol*, **67(9),** 888-894.

Okada, H. & Murakami, S. (1998). Cytokine expression in periodontal health and disease. *Crit Rev Oral Biol Med* **9,** 248-266.

Overall, C. M., Wrana, J. L., Sodek, J. (1991). Induction of formative and resorptive cellular phenotypes in human gingival fibroblasts by TGF-beta 1 and concanavalin A: regulation of matrix metalloproteinases and TIMP. *J Periodontal Res*, **26(3 Pt 2),** 279-282.

Page, R. C. (1992). Host response tests for diagnosing periodontal diseases. *J Periodontol*, **63(4 Suppl),** 356-366.

Page, R. C. (1999). Milestones in periodontal research and the remaining critical issues. *J Periodontal Res* **34,** 331-339.

Page, R. C., Vandesteen, G. E., Ebersole, J. L., Williams, B. L., Dixon, I. L., Altman, L. C. (1985). Clinical and laboratory studies of a family with a high prevalence of juvenile periodontitis. *J Periodontol*, **56(10),** 602-610.

Papapanou, N. P., & Lindhe, J. (2008). Examination of patients with periodontal disease. In: Lindhe J, Lang N, P. & Karring T. Clinical periodontology and implant dentistry. Fifth edition. Blackwell Munksgaard. Chapter 26, pp 573- 586.

Parra, G., Agarwal, P., Abril, J. F., Wiehe, T., Fickett, J. W., Guigó, R. (2003). Comparative gene prediction in human and mouse. *Genome Res*, **13(1),** 108-117.

Perrey, C., Turner, S. J., Pravica, V., Howell, W. M., Hutchinson, I. V. (1999). ARMS-PCR methodologies to determine IL-10, TNF-alpha, TNF-beta and TGF-beta 1 gene polymorphisms. *Transpl Immunol*, **7(2),**127-128.

Pravica, V., Asderakis, A., Perrey, C., Hajeer, A., Sinnott, P. J., Hutchinson, I. V. (1999). In vitro production of IFN-gamma correlates

with CA repeat polymorphism in the human IFN-gamma gene. *Eur J Immunogenet,* **26(1),** 1-3.

Roberts, A. B., Sporn, M. B. (1993). Physiological actions and clinical applications of transforming growth factor-beta (TGF-beta). *Growth Factors*, **8(1),** 1-9.

Sachidanandam, R., Weissman, D., Schmidt, S. C., Kakol, J. M., Stein, L. D., Marth, G., Sherry, S., Mullikin, J. C., Mortimore, B. J., Willey, D. L., Hunt, S. E., Cole, C. G., Coggill, P. C., Rice, C. M., Ning, Z., Rogers, J., Bentley, D. R., Kwok, P. Y., Mardis, E. R., Yeh, R. T., Schultz, B., Cook, L., Davenport, R., Dante, M., Fulton, L., Hillier, L., Waterston, R. H., McPherson, J. D., Gilman, B., Schaffner, S., Van Etten, W. J., Reich, D., Higgins, J., Daly, M. J., Blumenstiel, B., Baldwin, J., Stange-Thomann, N., Zody, M. C., Linton, L., Lander, E. S., Altshuler, D.; International SNP Map Working Group. (2001). A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature*, **409(6822),** 928-933.

Sahingur, S. E. & Cohen, R. E. (2004). Analysis of host responses and risk for disease progression. *Periodontol 2000* **34,** 57-83.

Saxén, L. (1980). Heredity of juvenile periodontitis. *J Clin Periodontol*, **7(4),** 276-288.

Saxén, L., Nevanlinna, H. R. (1984). Autosomal recessive inheritance of juvenile periodontitis: test of a hypothesis. *Clin Genet*, **25(4),** 332-335.

Seymour, G. J., Gemmell, E., Reinhardt, R. A., Eastcott, J. & Taubman, M. A. (1993). Immunopathogenesis of chronic inflammatory periodontal disease: cellular and molecular mechanisms. *J Periodontal Res* **28,** 478-486.

Seymour, G. J. & Gemmell, E. (2001). Cytokines in periodontal disease: where to from here? *Acta Odontol Scand*, **59**, 167-173.

Sheiham, A. & Nicolau, B. (2005). Evaluation of social and psychological factors in periodontal disease. *Periodontol 2000* **39,** 118-131.

Skaleric, U., Kramar, B., Petelin, M., Pavlica, Z. and Wahl, S. M. (1997), Changes in TGF-β1 levels in gingival, crevicular fluid and serum associated with periodontal inflammation in humans and dogs, *Eur J Oral Sci,* **105**, 136–142.

Slots, J. (1976). The predominant cultivable organisms in juvenile periodontitis. *Scand J Dent Res* **84,** 1-10.

Socransky, S. S. & Haffajee, A. D. (1994). Evidence of bacterial etiology: a historical perspective. *Periodontol 2000* **5,** 7-25.

Socransky, S. S., Haffajee, A. D., Cugini, M. A., Smith, C. & Kent, R. L., Jr. (1998). Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol* **25,** 134-144.

Soga, Y., Nishimura, F., Ohyama, H., Maeda, H., Takashiba, S. & Murayama, Y. (2003). Tumor necrosis factor-alpha gene (TNF-alpha) -1031/-863, -857 single-nucleotide polymorphisms (SNPs) are associated with severe adult periodontitis in Japanese. *J Clin Periodontol* **30,** 524-531. doi:287 [pii].

Spektor, M. D., Vandesteen, G. E., Page, R. C. (1985). Clinical studies of one family manifesting rapidly progressive, juvenile and prepubertal periodontitis. *J Periodontol,* **56(2),** 93-101.

Sporn, M. B., Roberts, A. B. (1992). Transforming growth factor-beta: recent progress and new challenges. *J Cell Biol*, **119(5),** 1017-1021.

Stashenko, P., Fujiyoshi, P., Obernesser, M. S., Prostak, L., Haffajee, A. D. & Socransky, S. S. (1991). Levels of interleukin 1 beta in tissue from sites of active periodontal disease. *J Clin Periodontol* **18,** 548-554.

Stein, S. H., Hart, T. E., Hoffman, W. H., Hendrix, C. L., Gustke, C. J., Watson, S. C. (1997). Interleukin-10 promotes anti-collagen antibody production in type I diabetic peripheral B lymphocytes. *J Periodontal Re,* **32(1 Pt 2),** 189-195.

Stephens, J. C., Schneider, J. A., Tanguay, D. A., Choi, J., Acharya, T., Stanley, S. E., Jiang, R., Messer, C. J., Chew, A., Han, J. H., Duan, J., Carr, J. L., Lee, M. S., Koshy, B., Kumar, A. M., Zhang, G., Newell, W. R., Windemuth, A., Xu, C., Kalbfleisch, T. S., Shaner, S. L., Arnold, K., Schulz, V., Drysdale, C. M., Nandabalan, K., Judson, R. S., Ruano, G., Vovis, G. F. (2001). Haplotype variation and linkage disequilibrium in 313 human genes. *Science*, **293(5529),** 489-493.

Sugiura, Y., Niimi, T., Sato, S., Yoshinounchi, T., Banno, S. and Naniwa, T. *et al.*, (2002), Transforming growth factor β1 gene polymorphism in rheumatoid arthritis, *Ann Rheum Dis,* **61,** 826–828.

Susin, C. & Albandar, J. M. (2005). Aggressive periodontitis in an urban population in southern Brazil. *J Periodontol* **76,** 468-475.

Syrjanen, S., Markkanen, H. & Syrjanen, K. (1984). Inflammatory cells and their subsets in lesions of juvenile periodontitis. A family study. *Acta Odontol Scand,* **42,** 285-292.

Szabo, G., Chavan, S., Mandrekar, P. & Catalano, D. (1999). Acute alcohol consumption attenuates interleukin-8 (IL-8) and monocyte chemoattractant peptide-1 (MCP-1) induction in response to ex vivo stimulation. *J Clin Immuno,l* **19,** 67-76.

Takashiba, S., Ohyama, H., Oyaizu, K., Kogoe-Kato, N., Murayama, Y. (1999). HLA genetics for diagnosis of susceptibility to early-onset periodontitis. *J Periodontal Res,* **34(7),** 374-378.

Taylor, G. W. (2001). Bidirectional interrelationships between diabetes and periodontal diseases: an epidemiologic perspective. *Ann Periodontol* **6,** 99- 112.

Tezal, M., Grossi, S. G., Ho, A. W. & Genco, R. J. (2004). Alcohol consumption and periodontal disease. The Third National Health and Nutrition Examination Survey. *J Clin Periodontol* **31,** 484-488.

Theilade, E. (1986). The non-specific theory in microbial etiology of inflammatory periodontal diseases. *J Clin Periodontol* **13,** 905-911.

Tomar, S. L. & Asma, S. (2000). Smoking-attributable periodontitis in the United States: findings from NHANES III. National Health and Nutrition Examination Survey. *J Periodontol* **71,** 743-751.

Tonetti, M. S., Imboden, M. A. & Lang, N. P. (1998). Neutrophil migration into the gingival sulcus is associated with transepithelial gradients of interleukin-8 and ICAM-1. *J Periodontol* **69,** 1139-1147.

Tonetti, M. S. & Mombelli, A. (1999). Early-onset periodontitis. *Ann Periodontol* **4,** 39-53.

Trott, J. R. & Cross, H. G. (1966). An analysis of the principle reasons for tooth extractions in 1813 patients in Manitoba. *Dent Pract Dent Rec* **17,** 20-27.

Vyse, T. J., Todd, J. A. (1996). Genetic analysis of autoimmune disease. *Cell*, **85(3),** 311-318.

Wahl, S. M., Costa, G. L., Mizel, D. E., Allen, J. B., Skaleric, U., Mangan, D. F. (1993). Role of transforming growth factor beta in the pathophysiology of chronic inflammation. *J Periodontol*, **64(5 Suppl),** 450-455.

Wolff, L. F., Aeppli, D. M., Pihlstrom, B., Anderson, L., Stoltenberg, J., Osborn, J., Hardie, N ,.Shelburne, C. & Fischer, G. (1993). Natural distribution of 5 bacteria associated with periodontal disease. *J Clin Periodontol* **20,** 699- 706.

Wood, N., Johnson, R. B. & Streckfus, C. F. (2003). Comparison of body composition and periodontal disease using nutritional assessment techniques: Third National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III). *J Clin Periodontol* **30,** 321-327.

Ximénez-Fyvie, L. A., Haffajee, A. D., Socransky, S. S.(2000). Comparison of the microbiota of supra- and subgingival plaque in health and periodontitis. *J Clin Periodontol*, **27(9),** 648-657.

Yokota, M., Ichiara, S., Lin, T. L., Nakashima, N. and Yamada, Y. (2000), Association of a T29 AEC polymorphism of the transforming growth factor-b1 gene with genetic susceptibility to myocardial infarction in Japanese, *Circulation,* **101,** 2783–2787.

Yu, S. M., Bellamy, H. A., Schwalberg, R. H. & Drum, M. A. (2001). Factors associated with use of preventive dental and health services among U.S. adolescents. *J Adolesc Health* **29,** 395-405.

Zambon, J. J., Grossi, S. G., Machtei, E. E., Ho, A. W., Dunford, R., Genco, R. J. (1996). Cigarette smoking increases the risk for subgingival infection with periodontal pathogens. *J Periodontol*, **67(10 Suppl),** 1050-1054.

Zhao, XZ., Guan, ZM., Zhang, YM. (2010). Relationship between transforming growth factor beta-1 gene-509C/T polymorphism and severe chronic periodontitis. *Journal of Periodontology,***45(10),** 610-613.