

## بررسی ارتباط بین حضور پلی مورفیسم با rs1799750 و ایجاد بیماری پریودنتیت با روش Tetra arms-PCR

محدثه بغدادچی<sup>۱</sup> - الهام سیاسی تربتی<sup>۲</sup> - کیومرث امینی<sup>۳</sup>

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه آموزشی ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، تهران، ایران

۲- استادیار گروه آموزشی ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، تهران، ایران

۳- دانشیار گروه آموزشی میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ساوه، ساوه، ایران

### Association study between (rs1799750) polymorphism and periodontal by Tetra arms-PCR

Mohadese Baghdadchi<sup>1</sup>, Elham Siasi Torbati<sup>2†</sup>, Kumars Amini<sup>3</sup>

1- Master of Genetics, Department of Genetic, Faculty of Sciences, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

2<sup>†</sup>- Assistant Professor, Department of Genetic, Faculty of Sciences, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran (emi\_biotech2006@yahoo.ca)

3- Associate Professor, Department of Microbiology, Faculty of Sciences, Saveh Branch, Islamic Azad University, Saveh, Iran

**Background and Aims:** Periodontitis is one of the most common causes of damage to the gums and retaining structures of the teeth. Matrix protein, a metalloproteinase, is known as intermediate collagenase and the enzyme collagenase fibroblast, which is encoded in humans by the MMP-1 gene. The aim of this study was to investigate 1G/2G polymorphism in the MMP-1 gene and its association with the periodontal disease in the Iranian patients.

**Materials and Methods:** In this study, 50 patients with periodontal disease and 50 patients were selected as the control group in Kerman city. DNA was extracted from a person's blood sample using a kit. The desired primers were controlled by the NCBI site. Then, with the Tetra arms PCR technique, the desired polymorphism was multiplied. In the next step, the samples were transferred to electrophoresis gel and examined. The results were analyzed with SPSS software using T-test or Squer Chi-(X<sup>2</sup>).

**Results:** The percentage of 1G/1G genotype in the patients group was 8% and for the controls group was 0%. The percentage of 2G/2G genotype for the patients group was 24% and for the controls group was 18%. In addition, the 1G/2G genotype frequency was 68% for the patients group, and for the controls group was 82% (P=0.83). The results of Tetra-arms PCR genotyping of the samples were confirmed by sequencing.

**Conclusion:** The findings indicated that in Iranian patients, MMP-1 -1607 1G/2G (rs1799750) was not significantly associated with periodontal disease. It is recommended to take more samples from different parts of Iran to confirm the results.

**Key Words:** Periodontitis, Gene, Sequencing, Single nucleotide polymorphism

Journal of Dental Medicine-Tehran University of Medical Sciences 2020;33(1):17-25

† مؤلف مسؤول: تهران- میدان هروی- مکران جنوبی- بوستان دهم- دانشکده علوم زیستی دانشگاه آزاد اسلامی- واحد تهران شمال- گروه آموزشی ژنتیک  
تلفن: ۰۹۱۲۴۰۵۶۷۴۶ نشانی الکترونیک: emi\_biotech2006@yahoo.ca

## چکیده

**زمینه و هدف:** بیماری پریودنتیت (periodontitis) یکی از عواملی است که باعث آسیب زدن به لثه‌ها و ساختارهای نگه دارنده دندان‌ها می‌شود. پروتئین ماتریکس متالوپروتئینازیک (Matrix-metallo-proteinase)، به عنوان کلاژناز بینابینی شناخته شده و کلاژناز فیبروبلاست (Fibroblast) آنزیمی است که در انسان توسط ژن MMP-1 کد گذاری می‌شود. هدف از این مطالعه بررسی پلی مورفیسم 1G/2G در ژن MMP-1 و ارتباط آن با بیماری پریودنتال در جمعیت ایرانی بود.

**روش بررسی:** در این پژوهش ۵۰ نفر بیمار مبتلا به بیماری پریودنتال و ۵۰ نفر به عنوان گروه کنترل از شهر کرمان انتخاب شدند. DNA از نمونه خون افراد با استفاده از کیت استخراج شد. پرایمرهای مورد نظر توسط سایت NCBI کنترل شدند. سپس با تکنیک Tetra arms PCR تکثیر پلی مورفیسم مورد نظر انجام شد. در مرحله بعد نمونه‌ها بر روی ژل الکتروفورز منتقل و بررسی انجام پذیرفت. نتایج با نرم افزار SPSS آنالیز شد ( $P < 0/001$ ). در این تحقیق از آزمون T-test یا همان Squer ( $X^2$ ) استفاده شده است.

**یافته‌ها:** درصد ژنوتیپ 1G/1G در گروه بیمار ۸٪ و در مقابل برای گروه کنترل ۰٪، درصد ژنوتیپ 2G/2G برای گروه بیمار ۲۴٪ و برای گروه کنترل ۱۸٪ و در نهایت درصد ژنوتیپ 1G/2G برای گروه بیمار ۶۸٪ و گروه کنترل ۸۲٪ گزارش شده است. نتایج Tetra-arms PCR ژنوتایپینگ نمونه‌ها با روش تعیین توالی تأیید شدند.

**نتیجه‌گیری:** یافته‌ها حاکی از آن است که در این پژوهش 1G/2G (rs1799750) MMP-1-1607 با بیماری پریودنتال در جمعیت ایرانی رابطه معنی داری وجود ندارد. بهتر است برای تأیید نتایج نمونه‌گیری از نقاط مختلف ایران با تعداد نمونه‌های بیشتری انجام پذیرد.

**کلیدواژه‌ها:** پریودنتیت، ژن، تعیین توالی، پلی مورفیسم

وصول: ۹۸/۰۵/۳۰ اصلاح نهایی: ۹۹/۰۱/۲۵ تأیید چاپ: ۹۹/۰۲/۰۱

## مقدمه

است و در همه جمعیت‌ها باعث بیماری‌های مختلف مزمن از جمله پریودنتال می‌شود. این پلی مورفیسم (rs1799750) در منطقه‌ی پرموتور قرار دارد و باعث افزایش بیان و رونویسی ژن MMP-1 می‌شود (۳). پریودنتیت با افزایش التهاب در بدن ارتباط دارد، مثلاً با افزایش سطح پروتئین C (C-reactive) و اینترلوکین شش این بیماری تشدید می‌شود (۹-۴). این بیماری با افزایش ضربان قلب، انفارکتوس میوکارد (۱۰)، آترواسکلروز (۱۷-۱۱)، فشار خون بالا (۱۸) ارتباط دارد و باعث افزایش خطر سکته مغزی می‌شود. همچنین در افرادی که بیش از ۶۰ سال سن داشته‌اند، در ارتباط با اختلالات حافظه با تأخیر و توانایی محاسبه ارتباط دارد (۲۰، ۱۹). اگر چه تاکنون دلیل بروز پریودنتیت با این بیماری‌ها کشف نشده است اما دیده شده که بین پریودنتیت مزمن و اختلال نعوظ (۲۱)، بیماری قلب (۲۲) و سرطان پانکراس رابطه وجود دارد (۲۳). افراد مبتلا به اختلال قندخون ناشتا، دیابت و بیماری قلبی دارای ریسک بالاتری از التهاب پریودنتال هستند و اغلب با تنظیم کردن سطح قند خون خود به علت حالت التهابی سیستمیک ناشی از پریودنتال مشکل دارند (۲۴، ۲۵). هدف از انجام این مطالعه ارتباط پلی مورفیسم با rs1799750 در ژن MMP-1 و ایجاد بیماری پریودنتیت در جمعیتی از بیماران ایرانی می‌باشد و از آن جهت در تشخیص زود هنگام بیماری کمک خواهد کرد. چرا که این

بیماری پریودنتال یکی از عوامل اصلی از دست رفتن دندان‌ها در بالغین محسوب می‌شود (۱). چه پوسیدگی‌های دندانی و چه انواع بیماری‌های پریودنتال از یک ژنوتیپ ساده (التهاب لثه) گرفته تا یک پریودنتیت پیشرفته (پیوره) همه بیماری محسوب می‌شوند و عواملی نظیر ارث، تغذیه پلاک میکروبی باعث بروز و تشدید بیماری پریودنتیت می‌شوند (۱). ماتریکس متالوپروتئیناز خانواده‌ای از آنزیم‌های پروتئولیتیک است که باعث تخریب اجزا خارج سلولی، غشاء ماتریکس و لایه‌های زیرین بافت دندانی می‌شود. پلی مورفیسم‌ها تغییرات توالی DNA هستند که آلترنیتیو آن‌ها سبب ایجاد تغییرات در جمعیت‌های مختلف شده است. ماتریکس متالوپروتئیناز بیشترین پروتئین جزء ماتریکس خارج سلولی در بیماری پریودنتال است این پلی مورفیسم با rs1799750 (1G/2G) (-1607) منطقه‌ای از ژنوم انسانی است که دارای دو آلل 1G و 2G است که به دلیل درج و حذف شدن (Insertion/ Deletion) باز گوانین در منطقه ۱۶۰۷- پرموتور به این دو شکل وجود دارد (۲). این آلل‌ها دارای یک جایگاه اتصال برای خانواده‌ی Ets (Ets - Transformation - specific or E-26) در منطقه پرموتوری است که باعث افزایش بیان MMP-1 می‌شود. این آلل‌ها در جمعیت‌های مختلف مطالعه شده

بیماری سبب لق شدن دندان‌ها و از دست دادن آن‌ها می‌شود.

## روش بررسی

مطالعه حاضر از نوع مورد-شاهدی بود. در این مطالعه نمونه‌های خون محیطی از ۵۰ نفر بیمار مبتلا به بیماری پریودنتال که بیماری آنها توسط متخصص دندانپزشک تشخیص داده شده بود و ۵۰ نفر فرد سالم از نظر بیماری پریودنتال که به طور تصادفی از اهالی شهر کرمان انتخاب شده بودند و در زمستان ۱۳۹۸ به دندانپزشکی مراجعه کرده بودند تهیه شد. بعد از تشخیص پریودنتیست بیماران برای دریافت نمونه خون به آزمایشگاه معرفی شدند نمونه خون محیطی تهیه شد و در آزمایشگاه علمی- تخصصی پاسارگاد مورد پژوهش قرار گرفت. افراد کنترل از نظر بیماری پریودنتال سالم و برای استفاده از سایر خدمات دندانپزشکی مراجعه کرده بودند و افراد بیمار توسط دندانپزشک متخصص تشخیص داده شده بودند. نمونه خون از دو گروه سالم و بیمار با کسب رضایت و اطلاعاتی همچون سن و جنس بیماران اخذ شد. به منظور گرفتن نمونه‌های خون ۵ CC خون از هر فرد گرفته و در لوله‌های آغشته به EDTA (EDTA Cotead) منتقل و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد ذخیره شد. معیارهای انتخاب افراد شامل پنج مورد بود که افراد بیمار باید تمام این علائم را بروز می‌دادند که این موارد شامل: حضور یک ناحیه با عمق پروبینگ-Probing depth (PD) بیشتر یا مساوی ۶ میلی‌متر، عدم وجود بیماری سیستمیک (۲۶)، عدم درمان با آنتی‌بیوتیک حداقل در ۶ ماه گذشته، ایندکس لته‌ای بالای ۳، وجود التهاب (۲۶) بودند. نمونه‌های خون از دو گروه کنترل و بیمار تهیه شده بود. افراد کنترل هیچ گونه علامتی از بیماری پریودنتال را نداشتند و افراد بیمار درجه‌ای از این بیماری را داشتند اما متأسفانه در این پژوهش اطلاعاتی در مورد سطوح بیماری این افراد در دسترس نبود. در این مطالعه حداقل سن فرد بیمار ۲۱ سال و حداکثر سن بیمار ۶۰ سال بوده است. در مورد جنسیت که با بروز بیماری می‌تواند برهم‌کنش داشته باشد نیز در این مطالعه اکثر افراد بیمار جنس مؤنث داشته‌اند. میانگین سنی افراد بیمار در این تحقیق  $35 \pm 8$  و میانگین سنی افراد کنترل  $28 \pm 9$  بود. در ابتدا نمونه‌های خون تهیه شد و سپس پرایمرهای مدنظر از مقالات معتبر خارجی که در همین زمینه (ژن و پلی‌مورفیسم مشترک) کار کرده بودند اقتباس شد و برای سنتز

به شرکت سیناکلون سفارش داده شد. در این تحقیق بعد از استخراج DNA به وسیله تکنیک Tetra-arms PCR تکثیر پلی‌مورفیسم انجام شد. برای تأیید نتایج نمونه‌ها (نمونه هموزیگوت از هر آلی و نمونه هتروزیگوت) به شرکت بایونیر کره جنوبی فرستاده شد. نمونه برداری از دهان- این نمونه برداری برای تشخیص بیماری پریودنتیت توسط متخصص دندانپزشک انجام گرفته است. بعد از برداشت پلاک فوق لته، یک ظرف مخصوص نمونه‌گیری استریل پریودنتال به آرامی داخل پاکت پریودنتال مورد بررسی فرو برده شد و از پلاک زیر لته‌ای به منظور حضور باکتری ژینوئیت با یک حرکت ضربه‌ای برداشته شد. سپس نمونه‌های پلاک به لوله اپندروف حاوی ۵۰۰ میکرو لیتر بافر EDTA یک میلی‌مولار با  $\text{pH}=8$  انتقال داده شده و سپس توسط دستگاه ورتکس هموژن گردید و نمونه‌ها تا قبل از آزمایشات بعدی در فریزر ۷۰- درجه سانتی‌گراد ذخیره شدند.

## استخراج DNA از نمونه‌ها: برای استخراج DNA از کیت

شرکت سیناکلون با نام (CAT NO: Cinna Pure-DNA PR881612) استفاده شد. کیفیت DNA با استفاده از دستگاه نانودراپ با  $\text{OD}=260/280=1.8-2 \text{ nm}$  آنالیز گردید.

## واکنش زنجیره ای پلیمر از Tetra-Arms-PCR: پس از

بررسی کیفیت DNA استخراج شده تکنیک Tetra-Arms-PCR انجام شد. در این تکنیک از MasterMix متعلق به شرکت فرمنتاز برای انجام واکنش تکثیر ژن MMP-1 استفاده شد. پرایمرهای موردنظر از مقاله‌های معتبر استخراج و به شرکت سیناکلون جهت سنتز ارسال شد (جدول ۱). مواد موردنیاز PCR به حجم نهایی  $25 \mu\text{l}$  رسید و در دمای آنلینگ  $58/5$  درجه سانتی‌گراد (جدول ۲ و ۳) در دستگاه ترموسایکلر متعلق به شرکت Bio-Rad قرار گرفت. کیفیت نمونه DNA استخراج شده توسط تکنیک الکتروفورزیس مورد بررسی قرار گرفت. در این تکنیک بعد از حرکت نمونه‌ها بر روی ژل آگارز، توسط اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی شد و به وسیله دستگاه ژل‌داک عکس برداری صورت پذیرفت. در نهایت ارزیابی محصول PCR تکثیر شده توسط بافر TAE (Tris Aceticacid EDTA) با غلظت IX بر روی ژل آگارز  $1/2\%$  مورد بررسی قرار گرفت.

### کنترل صحت نمونه‌های DNA:

۱- کنترل کیفیت با نانودراپ: برای این منظور جذب را بایستی یکبار در طول موج ۲۶۰ نانومتر (طول موجی که در آن DNA حداکثر جذب را دارد) و بار دیگر در طول موج ۲۸۰ نانومتر (که پروتئین حداکثر جذب را دارد) اندازه گرفت و با استفاده از نسبت جذب در ۲۶۰ نانومتر به جذب در ۲۸۰ نانومتر مقدار ناخالصی را بررسی کرد. هرچه این نسبت از ۱/۸ کمتر باشد شدت آلودگی DNA به پروتئین بیشتر است. اگر ناخالصی زیاد باشد (نسبت حدود ۱/۳ باشد) بهتر است از آنزیم پروتئیناز K در استخراج استفاده گردد. نسبت کسری در این تحقیق ۱/۸ محاسبه شد. برای کنترل کیفیت DNAی که توسط کیت سیناکلون استخراج شد، با استفاده از دستگاه نانودراپ جذب نوری DNA مورد بررسی قرار گرفت. این روش یک روش کمی بوده و می‌تواند غلظت DNA را با استفاده از جذب نوری در طول موج ۲۶۰ نانومتر را محاسبه کند. جذب برای یک OD در ۲۶۰ نانومتر نشان دهنده حضور ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر DNA دو رشته‌ای در محلول می‌باشد. با استفاده از این روش می‌توان مقدار ناخالصی

ناشی از وجود پروتئین را در محلول DNA تشخیص داد.

۲- کنترل کیفیت با الکتروفورز: بعد از انجام این تکنیک که در روش کار اشاره شده است، نمونه‌ها در دستگاه ژل داک بررسی و عکسبرداری شدند. مورد دوم برای کنترل کیفیت DNA استخراج شده تکنیک الکتروفورز می‌باشد. که در این روش ابتدا ژل تهیه می‌شود. سپس دستگاه الکتروفورز بسته و بافر اضافه شد. نمونه‌های DNA با بافرلودینگ ترکیب شده و درون چاهک‌ها لود می‌شوند. با وصل کردن جریان الکتریسته نمونه‌ها حرکت می‌کنند. در نهایت رنگ‌آمیزی انجام شد. تکنیک تعیین توالی - پس از مشاهده باند اختصاصی، محصولات PCR به دست آمده به همراه پرایمرهای مورد استفاده به منظور ترادف یابی به شرکت Bionner کره جنوبی ارسال گردید و نتایج سکانس نمونه‌ها توسط نرم افزار Sequencer آنالیز شد.

آنالیز آماری - در نهایت ارتباط بین داده‌ها با تست آماری T-test SPSS OR Chi-X<sup>2</sup> Squer بررسی شد. آنالیز آماری توسط نرم افزار انجام پذیرفت و سطح معنی‌داری برای آزمون P-value کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد (جدول ۴).

جدول ۱- توالی پرایمرهای مورد استفاده

| ژن               | پرایمرهای تشخیصی انواع پلی مورفیسم‌ها | پرایمر                               |
|------------------|---------------------------------------|--------------------------------------|
| MMP-1-1607-1G/2G | پرایمر رفت خارجی                      | 5'-gtatatctgccactccttgactttt-3'      |
| MMP-1-1607-1G/2G | پرایمر برگشت خارجی                    | 5'-gtttatcacttcagcaccttatgg-3'       |
| MMP-1-1607-1G/2G | پرایمر رفت داخلی                      | 5'-gaggaaattgtagttaaataattagaaaGa-3' |
| MMP-1-1607-1G/2G | پرایمر برگشت داخلی                    | 5'-tggattgattgagataagtcatatCC-3'     |

جدول ۲- مقادیر مورد استفاده در واکنش Tetra arms-PCR

| مقدار میکرولیتر (μl) | مواد مورد نیاز  |
|----------------------|-----------------|
| ۴/۶                  | آب دو بار تقطیر |
| ۰/۸ (۴)              | پرایمر چپ       |
| ۰/۸ (۴)              | پرایمر راست     |
| ۴                    | DNA             |
| ۱۰                   | Master Mix (2X) |
| ۲۵                   | حجم نهایی       |

جدول ۳- چرخه حرارتی واکنش Tetra-arms-PCR

| مراحل                       | زمان     | دما (درجه ی سانتی گراد) |
|-----------------------------|----------|-------------------------|
| واسرشت سازی اولیه           | ۳ دقیقه  | ۹۵                      |
| واسرشت سازی                 | ۳۰ ثانیه | ۹۵                      |
| اتصال آغازگر به رشته ی الگو | ۳۰ ثانیه | ۵۸/۵                    |
| بسط پلی مرز                 | ۶۰ ثانیه | ۷۲                      |
| بسط نهایی                   | ۵ دقیقه  | ۷۲                      |

- تعداد چرخه های واکنش ۳۵ سیکل می باشد.

جدول ۴- اطلاعات کلی آنالیز آماری

| نمونه ها    | فراوانی ژنوتیپی 1G/1G | فراوانی ژنوتیپی 2G/2G | فراوانی ژنوتیپی 1G/2G | فراوانی آلل 1G | فراوانی آلل 2G | P-value |
|-------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|----------------|----------------|---------|
| نمونه بیمار | ۴                     | ۱۲                    | ۳۴                    | ۲۱             | ۲۹             |         |
| ۵۰          | ۸٪                    | ۲۴٪                   | ۶۸٪                   | ۴۲٪            | ۵۸٪            |         |
| نمونه کنترل | ۰                     | ۹                     | ۴۱                    | ۲۰             | ۳۰             | ۰/۸۳    |
| ۵۰          | ۰٪                    | ۱۸٪                   | ۸۲٪                   | ۴۰٪            | ۶۰٪            |         |
| تعداد کل    | ۴                     | ۲۱                    | ۷۵                    | ۴۲             | ۵۸             |         |
| ۱۰۰         |                       |                       |                       |                |                |         |

## یافته ها

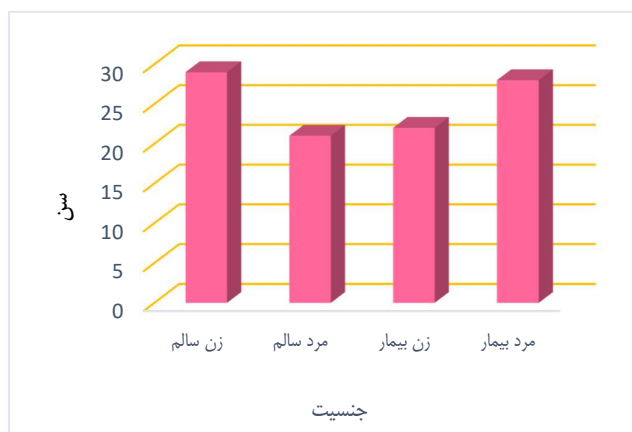
در این پژوهش ۵۰ نمونه از افراد سالم و ۵۰ نفر از بیماران مبتلا به پریودنتال بودند مورد بررسی قرار گرفتند. در نمودار ۱ این افراد بر اساس سن و جنسیت به تفکیک بیان شده اند. نتایج واکنش Tetra-arms PCR ژن MMP-1 (1G/2G, rs1799750) همراه با پرایمرهای انتخاب شده و همچنین به وسیله آنزیم Taq Polymerase در دستگاه ترموسایکلر تکثیر شد. نتایج بررسی ژنوتیپ نمونه های بیمار و کنترل پس از انجام تکنیک Tetra-arms PCR با الکتروفورز و رنگ آمیزی اتیدیوم بروماید در شکل ۱ که شامل ۱۵ چاهک بوده، (یک عکس از نمونه بیمار) آمده است.

## نتایج تکنیک تعیین توالی:

نمونه هایی که برای تعیین توالی ارسال شدند شامل نمونه هموزیگوت 1G/1G، 2G/2G و نمونه هتروزیگوت 1G/2G بود. نتایج تعیین توالی ژن MMP-1 با شماره rs(1799750) و آلل های 1G/2G

در سایت NCBI بلست و تأیید شد.

نتایج آنالیز آماری: با توجه به میزان P-value برای آلل های 1G و 2G در پلی مورفیسم با rs1799750 در دو گروه کنترل و بیمار که ۰/۸۳ بدست آمد می توان نتیجه گرفت که بین این پلی مورفیسم و بیماری پریودنتال در جمعیت ایرانی مورد مطالعه ارتباط معنی داری مشاهده نشد.

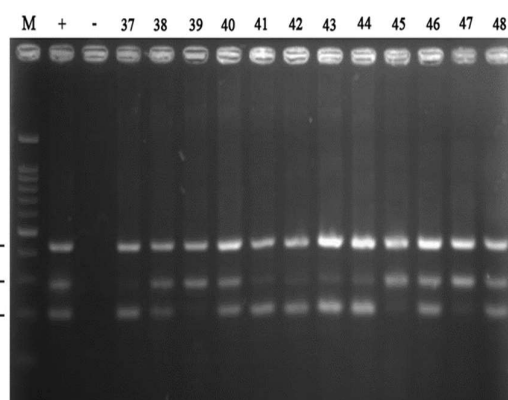


نمودار ۱- نمودار افراد بیمار و سالم بر حسب سن و جنسیت

می شود و باعث اتصال خانواده Ets شده که منجر به افزایش رونویسی ژن MMP-1 می شود (۲۹). یکی از عللی که باعث اهمیت این بیماری می شود این است که عوارض جانبی پریدنتال بر روی بارداری، دیابت، بیماری های قلبی - عروقی و برخی از بیماری های دیگر دخیل است (۳۰). آنزیم MMP به دلیل این که خاصیت پروتئولیتیکی دارد می تواند در بروز این بیماری تاثیر به سزایی داشته باشد (۳۱). این مطالعه بر روی جمعیت ایرانی و اهالی شهر کرمان انجام شد. در این پژوهش ارتباط معنی داری بین MMP-1 با rs1799750 در پریدنتال در جمعیت ایرانی مشاهده نشد، هر چند نیاز است که بررسی های بیشتری انجام پذیرد چرا که موقعیت جغرافیایی و تفاوت قومیتی و نژادی می تواند در نتیجه به دست آمده تاثیر بگذارد. در نتیجه می توان دریافت که ژن MMP-1 و پلی مورفیسم با rs1799750 در جمعیت ایرانی مارکر شناخته نشده است. هر چند می توان برای قطعی شدن این موضوع از نمونه ها با سایز بزرگ تر استفاده نمود.

Balli و همکاران (۳۲) در سال ۲۰۱۶ ارزیابی ژن های MMP-1 و MMP-8 و TIMP-2 در بیماری پریدنتال تحت درمان با kaempferol را انجام داده اند. در این مطالعه اثر فلاونوئیدها و kaempferol بر بیماری پریدنتال و با استفاده از ارزیابی ژن های MMP-1، MMP-8 و TIMP-2 مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه ۶۰ موش ویستار به طور تصادفی به ۶ گروه ۱۰ تایی تقسیم شدند. سطح استخوان آلوئولار با استفاده از آنالیز هیستومورفومتری تعیین شد و سطوح بافت مزانشیمی ژن های MMP-1، MMP-8 و TIMP-2 با استفاده از آنالیز بیوشیمیایی تشخیص داده شد. در نتیجه دریافتند که مصرف kaempferol در کاهش میزان جذب استخوان آلوئولار و تولید ژن های MMP-1 و MMP-8 در پریدنتیت آزمایشی سودمند است. تفاوت اصلی این پروژه با تحقیق دانشمند Balli در نوع نمونه مورد بررسی می باشد. در تحقیق Balli روی حیوان آزمایشگاهی موش پژوهش شده است.

Li و همکاران (۳۳) در سال ۲۰۱۶ بر روی وابستگی انواع MMPs با بیماری پریدنتال تحقیق و بررسی کرده اند. آن ها با توجه به تجزیه و تحلیل های دقیق آماری به طور منظم داده ها را بررسی کردند. این مطالعه شامل ۲۰۳۹ مورد بیمار و ۲۰۰۲ مورد سالم بوده است. در نتیجه دریافتند که: MMP-8 با پلی مورفیسم C/T در موقعیت ۷۹۹- حساسیت زیادی



شکل ۱- M: مارکر مولکولی 1

00bp، نمونه کنترل، +: نمونه ی کنترل مثبت، -: نمونه کنترل منفی،  
نمونه های ۳۸، ۴۰، ۴۱، ۴۲، ۴۳، ۴۴، ۴۶ و ۴۸: 1G/2G (431bp،  
224bp، 202bp، نمونه ۳۷: 1G/1G (202bp، نمونه های ۳۹، ۴۵ و ۴۷:  
2G/2G (284bp)

## بحث و نتیجه گیری

در زمینه سلامت، ماتریکس متالوپروتئیناز (MMPs) در توسعه بافت، هوموستازیس و بازسازی، مهاجرت سلولی و بهبود زخم، فعال سازی سلول های ایمنی بدن و دفاع ضد میکروبی عمل می کند و فعالیت آن ها توسط مهارکننده های بافت متیل پروپروتئیناز ماتریکس تنظیم می شود. با این حال، ممکن است منجر به تخریب غیر قابل برگشت بافت شود، همانطور که در آنژیوزنز تومور و متاستاز، بیماری های عروقی، پریدنتیت دخیل می باشد (۲۷).

پریدنتیت مزمن شایع ترین بیماری مزمن است و بیماری پریدنتال، بیش از ۳۰٪ از جمعیت بزرگسال را تحت تاثیر قرار می دهد. هر دو عوامل ژنتیک و محیطی در این التهاب دخیل هستند. بیماری پریدنتال مرتبط با تولید نامتعادل بین MMPs و مهارکننده های داخلی درون بافت آن می باشد. خانواده MMPs در واقع نوعی اندوپپتیدازهای وابسته به روی هستند (۲۸). آنزیم MMP-1 دارای وزن مولکولی ۵۵ kDa می باشد و توسط سلول های بافت همبند (Connective)، ماکروفاژ و سلول های متعدد سرطانی ترشح می شود. تنوع ژنتیکی MMP-1 در منطقه پروموتری ۱۶۰۷- بر سطح رونویسی MMP-1 تاثیر می گذارد. در منطقه ۱۶۰۷- یک باز گوانین در منطقه 5'-GAT-3' اضافه می شود، جایگزینی باز G در موقعیت ۵۱۹- با باز A و هم چنین در موقعیت ۴۴۲- به دلیل یک جهش باز A تبدیل به T می شود که به صورت 5'-GAT-3' مبدل

است. در نهایت این مطالعه نشان داد که پلی مورفیسم rs1799750 در ژن MMP-1 با پروتئین C با rs2794521 با بیماری پریودنتال رابطه معنی‌داری ندارد (۳۵). شباهت این پروژه با تحقیق پیش رو در انتخاب ژن MMP-1 با rs1799750 می‌باشد. همچنین نتیجه حاصل از این پژوهش کاملاً شبیه نتایج این پژوهش می‌باشد اما تکنیک انجام شده و بررسی پروتئین C تفاوت دارد. با توجه به نتایج تحقیق می‌توان دریافت که ژن MMP-1 و پلی‌مورفیسم 1G/2G عوامل مهمی برای بررسی بیماری پریودنتال در سطح مولکولی می‌باشند. در شناخت این ژن می‌توان به میزان اثری بودن بیماری پریودنتال و حتی پیشگیری استفاده کرد با توجه به مطالعات گذشته صورت پذیرفته در اکثر کشورها (به ویژه کشورهای آسیایی) ژن MMP-1 و پلی‌مورفیسم با rs1799750 با ایجاد بیماری پریودنتال رابطه مستقیمی داشته (۳۴-۳۳، ۲۰۳).

همچنین هاپلوتایپ‌های دیگری از خانواده MMPs و پلی‌مورفیسم‌های متفاوتی در بروز این بیماری نقش به‌سزایی داشته‌اند. در پریودنتیت شدید بافت لثه دچار عقب‌نشینی شده و تحلیل می‌رود. در این زمان گاهی ریشه دندان مشخص و همراه با درد و خون‌ریزی می‌باشد (۱). در اثر پیشرفت جدی در این مرحله استخوان‌های نگه دارنده دندان‌ها دچار آسیب شده و دندان لق و نهایتاً منجر به از دست دادن آن می‌شود. این مرحله به عوامل محیطی ارتباطی نداشته (۱) و مهم‌ترین عامل آن ژنتیک و ارث می‌باشد. بنابراین شناخت عوامل ژنتیکی و موروثی این بیماری برای پیشگیری و درمان بسیار قابل اهمیت می‌باشد. یکی از عواملی که می‌تواند توجیح‌کننده تفاوت نتیجه پروژه حاضر با سایر تحقیقات اشاره باشد حجم نمونه‌ها است. همچنین این تحقیق باید بر روی قومیت‌های مختلف کشور ایران و رده‌های سنی گسترده‌تر انجام پذیرد. بررسی و کسب اطلاعات زمینه‌ای همچون ابتلا به بیماری‌های زمینه‌ای مرتبط، مصرف و یا عدم مصرف سیگار، عواملی محیطی و رعایت بهداشت فردی و دهان و دندان می‌تواند نتیجه‌ای متفاوت با نتیجه حاصل از این تحقیق را به همراه داشته باشد. پس تهیه پروفایل ژنتیکی برای جمعیت ایرانی در پیشبرد این تحقیق می‌تواند مؤثر واقع شود.

### تشکر و قدردانی

این مقاله بخشی از پایان نامه دانشجوی کارشناسی ارشد رشته ژنتیک در دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال با شماره ثبت

با بروز پریودنتال ندارد و MMP-1 با آلل‌های 1G/2G و جایگاه پروموتوری ۱۶۰۷- و rs1799750 و آلل A/G در منطقه پروموتوری ۵۹۹- و همچنین آلل A/T با جایگاه پروموتوری ۴۲۲-، آلل A/T با جایگاه پروموتوری ۴۲۲-، ژن MMP-2 با آلل G/A در منطقه پروموتوری ۱۵۷۵- و آلل C/T در منطقه پروموتوری ۱۳۰۶- و آلل T/G با جایگاه پروموتوری ۷۱۰- و آلل C/T با جایگاه پروموتوری ۷۳۵-، ژن MMP-3 با آلل‌های A/6A در منطقه پروموتوری ۱۷۱-، ژن MMP-8 با آلل‌های A/G در جایگاه پروموتوری ۳۸۱- و آلل‌های C/G در منطقه پروموتوری ۱۷+، MMP-9 با آلل‌های C/T در جایگاه پروموتوری ۱۵۶۲- و آلل‌های R/Q با جایگاه پروموتوری ۲۷۹+، ژن MMP-12 با ژنوتیپ Asn/Ser با جایگاه پروموتوری با جایگاه پروموتوری ۳۵۷- و ژن MMP-13 با آلل‌های A/G در منطقه پروموتوری ۷۷- در بروز پریودنتال نقش بسزایی دارند. از جمله تفاوت‌های این پژوهش به تنوع آلی است که مورد بحث قرار داده است. همچنین تعدادی از ژن‌های دیگر نیز تحقیق شده که با این پروژه تفاوت داشته است.

Charles و همکاران (۳۴) در سال ۲۰۱۸ بر روی نقش ماتریکس متالوپروتینازها (MMPs) در بیماری پریودنتال پژوهشی انجام داده‌اند. این تحقیق به طور کلی بر روی MMPs کار کرده که نتیجه آن کاملاً با تحقیق حاضر متفاوت بوده است.

Heikkinen و همکاران (۲۷) در سال ۲۰۱۸ به بررسی تأثیر عوامل مختلف ریسک مربوط به بیمار به احتمال وقوع پریودنتیت در نوجوانان پرداختند. در این مطالعه مقطعی اثر سیگارکشیدن، ژن MMP-8 و پروتئین آلبومین، ایمونوگلوبولین A، ایمونوگلوبولین G و ایمونوگلوبولین M را بررسی کردند. در نتیجه دریافتند که پریودنتیت در نوجوانان به طور معنی‌داری با افزایش بیان MMP-8 رابطه مستقیمی دارد. پروژه فوق در محدود کردن رده سنی با تحقیق ما تفاوت دارد و البته نوع ژن مورد بررسی نیز کاملاً متفاوت می‌باشد. از دیگر تفاوت‌ها بررسی عوامل محیطی و بررسی چندین پروتئین می‌توان اشاره کرد.

Vahabi و همکاران (۳۵) در سال ۲۰۱۹ به بررسی ارتباط بین پلی‌مورفیسم rs1799750 و ژن MMP-1 در منطقه ۱۶۰۷- پروموتوری و پروتئین C (CRP) با بیماری پریودنتال پرداختند. این تحقیقات بر روی جمعیت ایرانی انجام شده است. تکنیک مورد استفاده RFLP-PCR بوده

تمامی کارکنان محترم آزمایشگاه تحقیقاتی پاسارگاد که ما را در این مجموعه یاری رساندند صمیمانه تقدیر و تشکر به عمل می‌آید.

۱۵۷۳۰۵۰۳۹۶۲۰۱۴ با عنوان (بررسی ارتباط بین پلی‌مورفیسم rs1799750 در ژن ماتریکس متالوپروتئینازیک (MMP-1) و بیماری پرپودنتال با روش Tetra-Arms PCR) بوده است. بدین وسیله از

### منابع:

- 1- Gholami GA, Gholami H. Necessary knowledge about periodontal diseases, gums and dental implants. First edition, Tehran: shayan chart publications. Spring 2009;8-31.
- 2- De Souza AP, Trevilatto PC, Scarel-Caminaga RM, Brito RB, Line SR. MMP-1 promoter polymorphism: association with chronic periodontitis severity in a Brazilian population. *J Clin Periodonl.* 2003;30(2):154-8.
- 3- Ustun K, Ustun K, Alptekin NO, Hakki SS, Hakki EE. Investigation of matrix metalloproteinase-1- 1607 1G/2G polymorphism in a Turkish population with periodontitis. *J Clin Periodonl.* 2008;35(12):1013-9.
- 4- D'Aiuto F, Parkar M, Andreou G, Suvan J, Brett PM, Ready D, et al. Periodontitis and systemic inflammation: control of the local infection is associated with a reduction in serum inflammatory markers. *J Dent Res.* 2004;83(2):156-60.
- 5- Nibali L, D'Aiuto F, Griffiths G, Patel K, Suvan J, Tonetti MS. Severe periodontitis is associated with systemic inflammation and a dysmetabolic status: a case-control study. *J Clin Periodont.* 2007;34(11):931-7.
- 6- Paraskevas S, Huizinga JD, Loos BG. A systematic review and meta-analyses on C-reactive protein in relation to periodontitis. *J Clin Periodonl.* 2008;35(4):277-90.
- 7- D'Aiuto F, Ready D, Tonetti MS. Periodontal disease and C-reactive protein-associated cardiovascular risk. *J Periodonl Res.* 2004;39(4):236-41.
- 8- Pussinen PJ, Alfthan G, Jousilahti P, Paju S, Tuomilehto J. Systemic exposure to Porphyromonas gingivalis predicts incident stroke. *Atherosclerosis.* 2007;193(1):222-8.
- 9- Pussinen PJ, Alfthan G, Rissanen H, Reunanen A, Asikainen S, Knekt P. Antibodies to periodontal pathogens and stroke risk. *Stroke.* 2004;35(9):2020-3.
- 10- Pussinen PJ, Alfthan G, Tuomilehto J, Asikainen S, Jousilahti P. High serum antibody levels to Porphyromonas gingivalis predict myocardial infarction. *European J Cardio Preven Rehab.* 2004.11(5):408-11.
- 11- Ford P, Gemmell E, Timms P, Chan A, Preston FM, Seymour GJ. Anti-P. gingivalis response correlates with atherosclerosis. *J Dental Res.* 2007;86(1):35-40.
- 12- Beck JD, Eke P, Heiss G, Madianos P, Couper D, Lin D, et al. Periodontal disease and coronary heart disease: a reappraisal of the exposure. *Circulat.* 2005. 112(1):19-24.
- 13- Scannapieco FA, Bush RB, Paju S. Associations between periodontal disease and risk for atherosclerosis, cardiovascular disease, and stroke, A systematic review. *Annal Periodont.* 2003. 8(1):38-53.
- 14- Wu T, Trevisan M, Genco RJ, Dorn JP, Falkner KL, Sempos CT. Periodontal disease and risk of cerebrovascular disease: the first national health and nutrition examination survey and its follow-up study. *Arch Inter Med.* 2000. 160(18):2749-55.
- 15- Beck JD, Elter JR, Heiss G, Couper D, Mauriello SM, Offenbacher S. Relationship of periodontal disease to carotid artery intima-media wall thickness: the atherosclerosis risk in communities (ARIC) study. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascul bio,* 2001. 21(11):1816-22.
- 16- Elter JR, Champagne CM, Offenbacher S, Beck JD. Relationship of periodontal disease and tooth loss to prevalence of coronary heart disease. *J Periodont.* 2004. 75(6):782-90.
- 17- Humphrey LL, Fu R, Buckley DI, Freeman M, Helfand M. Periodontal disease and coronary heart disease incidence: a systematic review and meta-analysis. *General Inter Med.* 2008;23(12):2079.
- 18- Martin-Cabezas R, Seelam N, Petit C, Agossa K, Gaertner S, Tenenbaum H, et al. Association between periodontitis and arterial hypertension: A systematic review and meta-analysis. *A H J.* 2016;180:98-112.
- 19- Noble JM, Borrell LN, Papanou PN, Elkind MS, Scarmeas N, Wright CB. Periodontitis is associated with cognitive impairment among older adults: analysis of NHANES-III. *J Neuro.* 2009;80(11):1206-11.
- 20- Kaye EK, Valencia A, Baba N, Spiro A, Dietrich T, Garcia RI. Tooth loss and periodontal disease predict poor cognitive function in older men. *J American Geria Soci.* 2010. 58(4):713-8.
- 21- Zadik Y, Bechor R, Galor Sh, Justo D, Rafi J, Heruti MD. Erectile dysfunction might be associated with chronic periodontal disease: two ends of the cardiovascular spectrum. *J Sex med.* 2009;6(4):1111-6.
- 22- Perk J, Backer GD, Gohlke H, Graham I, Reiner Z, Verschuren M, et al. European guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice (version 2012) The Fifth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice (constituted by representatives of nine societies and by invited experts) Developed with the special contribution of the European Association for Cardiovascular Prevention & Rehabilitation (EACPR). *European Heart J.* 2012;33(13):1635-701.
- 23- Michaud DS, Izard J. Microbiota, oral microbiome, and pancreatic cancer. *Cancer J,* 2014;20(3):203.
- 24- Zadik Y, Bechor R, Galor S, Levin L. Periodontal disease might be associated even with impaired fasting glucose. *British dental J,* 2010. 208(10): E20.
- 25- Soskolne, W.A. and A. Klinger, The relationship between periodontal diseases and diabetes: an overview. *Annals of Periodont.* 2001. 6(1):91-8.
- 26- Rezaei F, Chalbi M, Moghimi S, Maghareh Abed A, Faghri



- J. The Prevalence of Anaerobic bacteria in patients with periodontitis Yakhteh. 2009;10(2);13-9.
- 27- Heikkinen AM, Nwhator SO, Rathnayake N, Mäntylä P, Vatanen P, Sorsa T. Pilot study on oral health status as assessed by an active matrix metalloproteinase-8 chairside Mouthrinse test in adolescents. *J Periodont.* 2016;87(1):36-40.
- 28- Izakovičová Hollá L, Jurajda M, Fassmann A, Dvorakova N, Znojil V, Vacha J. Genetic variations in the matrix metalloproteinase-1 promoter and risk of susceptibility and/or severity of chronic periodontitis in the Czech population. *J Clin Periodont.* 2004;31(8):685-90.
- 29- Cao Z, Li C, Zhu G. MMP-1 promoter gene polymorphism and susceptibility to chronic periodontitis in a Chinese population. *Tissue Anti.* 2006;68(1):38-43.
- 30- Gürsoy UK, Könönen E, Tervahartiala T, Gürsoy M, Pitkänen J, Torvi P, et al. Molecular forms and fragments of salivary MMP-8 in relation to periodontitis. *J Clinical Periodonl.* 2018;45(12):1421-8.
- 31- Li D, Cai Qi, Lan Ma, Wang M, Junqing Ma, Zhang W, et al. Association between MMP-1 g.-1607dupG polymorphism and periodontitis susceptibility: a meta-analysis. *Plos one.* 2013;8(3):e59513.
- 32- Balli U, Cetinkayab BO, Keles GC, Keles ZP, Guler S, Sogut MU, et al. Assessment of MMP-1, MMP-8 and TIMP-2 in experimental periodontitis treated with kaempferol. *J Periodont Implant Sci.* 2016;46(2):84-95.
- 33- Li W, Zhu Y, Singh P, Ajmera DH, Song J, Ji P. Association of common variants in MMPs with periodontitis risk. *Dis Markers.* 2016;1-20
- 34- Charles K, Honibald EN, Reddy NR, Palani A, Ramamurthy RD, et.al. Role of matrix metalloproteinases (MMPS) in periodontitis and its management. *J India Acade Dental Specit Res.* 2014;1(2):65.
- 35- Vahabi S, Nazemialman B, Kalantari M, Hosseinpour S. Association of Matrix Metalloproteinase-1 -1607 1G/2G and C-Reactive Protein -717 C/T Gene Polymorphisms in Iranian Patients with Chronic Periodontitis: A Clinical Trial. *Iran Red Crescent Med J.* 2019;e84396.