

OTKA nyilvántartási szám: **K-72385**

Témavezető neve: **Dr. Gera István**

Téma címe: A parodontitis kialakulásában feltehetően szerepet játszó gének polimorfizmusainak vizsgálata

A kutatás időtartama: **2008-2013**

A KUTATÁS EREDMÉNYEI

Hipotézis és a kutatómunka háttere

Az emberi genom elsődleges feltérképezésének befejeztével a humán genetika is új irányt vett, a kutatások egyre inkább az eltérő összetételű gének, az egyszerű nukleotid polimorfizmus (Single Nucleotide Polymorphism, SNP) felé fordultak. Mára bizonyossá vált, hogy a genetikai tényezőknek kiemelkedő szerepe van számos betegség kialakulásában.

Az íny- és fogágybetegségek népbetegségnek tekinthetők, hiszen a felnőtt lakosság több mint 50%-a ínygyulladásban, megközelítőleg 20%-a pedig destruktív fogágybetegségben szenved. A korszerű epidemiológiai, klinikai és experimentális vizsgálatok nagyszámú rizikótényező szerepét valószínűsítik a betegség kialakulásában. Ezek között a rossz száj-higiéné, a plakkakkumulációt elősegítő helyi plakkretenciós tényezők, occlusalis túlterhelés, dohányzás, emocionális stressz, életkor és nemi hovatartozás, az immunvédekezést csökkentő általános betegségek, táplálkozási hiánybetegségek, az osteoporosis, és korábban már manifesztálódott parodontitis. Emellett megjelennek a genetikai tényezők, sőt az etnikai hovatartozás is. A hajlamosító gének hálózata, amely szerepet játszik a fogágybetegség kialakulásának pathomechanizmusában még azonosításra vár. Feltételezhetően több tucatra tehető azon gének száma, amelyek változékonysága, polimorfizmusa fogágybetegségekre hajlamosító tényezőként játszhat szerepet. Emellett tényleges megjelenésükben az adott populációra ható környezeti tényezők is szerepet játszanak (gén-környezet kölcsönhatás).

Vizsgálataink megkezdésekor csak az volt világos, hogy bizonyos populációkban az interleukin-1 (IL-1) gének és a tumor nekrozis faktor- α (TNF- α) azok, melyek a parodontitisre feltételezhetően hajlamosító genetikai tényezők. Az addig elvégzett vizsgálatok azonban különböző etnikai csoportokban nagyon különböző eredményeket mutattak. Ezért is volt fontos egy kifejezetten a közép-kelet európai populációt érintő átfogó genetikai-genomikai vizsgálat kivitelezése, amelytől azt vártuk, hogy a szájhygiénés szokásokon túlmutatóan a hazai populációban a genetikai faktorok szerepére is fény derül. Célunk az volt, hogy a magyar lakosság nagy hányadát érintő agresszív és krónikus parodontitis genetikai hátterét behatóbban megismerjük, a kialakulásukban esetlegesen szerepet játszó génpolimorfizmusokat és ezek kölcsönhatásait feltérképezzük. Azt reméltük, hogy eredményeink új diagnosztikus stratégiák megalapozásához vezethetnek, s elősegíthetik a betegségekre való hajlam korai felismerését, a betegség progressziójának primer kontrollját, és esetleg előrevetíthetik a rendellenességek jövőbeni gyógyítását a génterápia, valamint az egyénre szabott hatékony terápia elvek eszközrendszerével.

Mindezekkel szoros összefüggésben végeztük a parodontális gyulladás különböző formáinak diagnosztizálásával és kezelésével kapcsolatos klinikai vizsgálatainkat, amelyek közvetlenül vagy közvetve kapcsolódtak a mintagyűjtéshez. Ide kapcsolódnak sejtbiológiai vizsgálataink, amelyhez a vizsgálati anyagot úgy nyertük, hogy a megfelelő etikai engedélyek birtokában, természetesen a megfelelő klinikai indikáció esetén a páciensekből nemcsak genomikai vizsgálathoz szükséges nyálkahártya mintát, de fogak eltávolítása kapcsán nyerhető fogkörnyéki és fogból származó szövetmintákat is nyertünk, s ezeket különböző

aspektusok szerint jellemeztük. Ezek a kutatások fontos információkkal egészítik ki alapcélunkkal összefüggő vizsgálati eredményeinket.

Elért eredmények, kidolgozott módszerek, eljárások

1. Módszertani megalapozás

Első lépésként közel 100 önkéntestől gyűjtött nyálkahártya kaparékon történt a vizsgálataink megalapozása. A Semmelweis Egyetem Parodontológiai Klinikáján jelentkező páciensek szájüregéből speciális kefékkel vett kaparék mintákból történt a DNS kivonása, majd ezt követően az egyes kiválasztott SNP-kre specifikus kimutatási eljárás elvégzése. Kezdetben sajnos a genetikai információ kinyerése nem sikerült az izolált DNS-ek sérülése miatt. A degradáció kivédése érdekében beállítottuk és optimalizáltuk az alkalmazott NucleoSpin Tissue Kit-tel végzett izolálási, valamint a tárolási methodikát. A DNS oldataink intaktságát β -actinnal végzett vizsgálatokban ellenőriztük, melynek során minden esetben pozitív eredményt kaptunk erre a konstitutívan kifejeződő génre. Az egyszerű nukleotid polimorfizmusok (SNP-k) kimutatására a széles körben alkalmazot polimeráz láncreakciót követő restriktív fragmens hossz polimorfizmus (PCR-RFLP) módszert alkalmaztuk. Erre az eljárásra jellemző, hogy eredményessége a specifikus primerek által PCR reakció során felsokszorozott láncoknak a megfelelő enzimekkel történő emésztésével és az ezt követő gélelektroforézissel érhető el. Kiindulási alapul a témában már megjelent publikációk szolgálták, azonban az előkísérletek során megállapítottuk, hogy a leírt primerek közül többnek az oligonukleotid szekvenciája nem pontos, így azok módosítását elvégeztük. Optimalizáltuk a PCR reakciók paramétereit, valamint új restriktív enzimeket vontunk be vizsgálatainkba, így sikeresen beállítottuk az egyes SNP-k kimutatására alkalmas reakciósorozatokat. Utóbbiakkal nagyobb biztonsággal mutathatók ki a polimorfizmusaink. Időközben kutatólaborunk egy az Applied Biosystems által gyártott StepOne Real-time PCR készülékhez jutott, melynek segítségével gyorsabban és egyszerűbben végezhető el a genotipizálás, így a későbbiekben áttértünk ennek az alkalmazására. Az eszköz beállítása során újraelemztük a már genotipizált mintáinkat, és minden esetben a korábbival megegyező eredményeket kaptunk.

2. Kidolgozott és alkalmazott módszerek

Szövetminták.

A Semmelweis Egyetem Parodontológiai, Fogpótlástani, Konzerválófogászati Klinikáján, és az Orális Diagnosztika Tanszékén, továbbá a Pécsi Tudományegyetem Arc-, Állcsont és Szájsebészeti Tanszékén, valamint a Debreceni Egyetem Parodontológiai Tanszékén történt a mintagyűjtés, melynek során 432 önkéntes szájüregéből vettünk nyálkahártya kaparékot, melyeket a benne található DNS izolálásáig, majd azt követően is -20°C -on tároltuk. Vizsgálatainkhoz rendelkezünk a 23/2002 V.9-es humán kísérleteket szabályozó EüM rendeletben foglaltaknak megfelelő TUKEB által kiadott etikai engedéllyel (140/2006). Mintavételt megelőzően a tanulmányban résztvevő minden betegtől betegtájékoztató áttanulmányozása utáni aláírással hitelesített beleegyező nyilatkozatot kaptunk. A mintagyűjtést végző fogorvosok részletes klinikai vizsgálatnak vetették alá az önkénteseket, melynek részét képezte az általános és családi anamnesis felvétele, valamint panorámaröntgen felvételeik elemzése a besorolás érdekében. A beleegyező nyilatkozatok mellett a dokumentáció részét képezte egy klinikai adatlap kitöltése, melyen szextánsónként a legrosszabb értékeket feltüntetve rögzítettük az ínycresszió (GR), tasakmélység (PPD), tapadásvesztés (CAL) értékeit mm-ben, valamint a szondázáskor jelentkező esetleges vérzést (BOP) és a plakindexet (PI). A nyálkahártya kaparékot minden alkalommal jó általános egészségi állapotú, kraniofaciális abnormalitástól mentes önkéntesektől gyűjtöttük,

akiket a klinikai kép és a mért paraméterek alapján az alábbi 4 csoportba soroltuk: az agresszív és krónikus fogágybetegségben szenvedők, valamint a gingivitiszes és egészséges kontroll csoportok. Az egyes csoportok összetételét táblázatosan foglaltuk össze:

	Agresszív parodontitis (AgP) N (%)	Krónikus parodontitis (CP) N (%)	Gingivitis (Gin) N (%)	Kontroll (Con) N (%)
Elemszám	65 (15%)	166 (38,4%)	97 (22,5%)	104 (24,1%)
Nemi eloszlás				
férfi	19 (29,2%)	70 (42,2%)	41 (42,3%)	24 (23,1%)
nő	46 (70,8%)	96 (57,8%)	56 (57,7%)	80 (76,9%)
Életkor (átlag+ szórás)	42 ± 11	47 ± 13	35 ± 13	35 ± 11

(1) Az **agresszív parodontitis** jellemzően fiatalabb korban jelentkező, kifejezett vertikális csontpusztulással jellemezhető, gyorsan progrediáló fogágybetegség, melynél általában a páciens egyéni szájhigiénéje jó, így náluk általában kis mennyiségű dentális plakk és fogkő található (ebből is látszik, hogy háttérben feltételezhetően nagyobb szerephez jut az egyéni immunstátus, ezáltal az egyes komponenseire ható génpolimorfizmusok). (2) A **krónikus parodontitis**: látható, kifejezett horizontális csontpusztulással jellemezhető, rossz szájhigiénével és rendszerint sok supra-, subgingivalis fogkővel párosítható összetett klinikai kép, melyre a nevéből adódóan a lassú progresszió jellemző. Ez alkotja a fogágybetegségek legnépesebb csoportját. (3) A **gingivitis**: reverzibilis, általában a rossz szájhigiéné miatt hosszabb ideig jelen lévő plakk által kiváltott, csak az ínyszélre lokalizálódó, reverzibilis gyulladás jellemzi, melynél a mélyebb szövetek integritása megőrzött. Végül (4) az **egészséges kontroll** csoportba a megtartott, természetes fogazattal rendelkező egészséges parodontiummal rendelkező (mind gingivális, mind pedig parodontalis gyulladástól mentes) páciensek tartoznak.

DNS izolálás és SNP genotipizálás

A szájnnyálkahártya kaparékokat semianonimizálás céljából először speciális kódszámmal láttuk el. Mintáink időközben a Semmelweis Egyetem Biobank Hálózatának részévé váltak, egyúttal megfelelve az új feltételek által támasztott szakmai és etikai követelményeknek. A módosított protokoll szerint elvégeztük a Nucleospin Tissue Kit-tel a DNS- izolálást. A kapott oldatokat további felhasználásig -20°C-on tároltuk. A DNS oldatok intaktságát 1% agaróz gélen történő gélelektroforézissel ellenőriztük, míg koncentrációját eleinte Qubit fluorométerrel, a későbbiekben viszont NanoDrop ND1000 spektrofotométer segítségével határoztuk meg (utóbbi műszer nagyban leegyszerűsítette és gyorsította ezt a lépést). A genotipizálást 2 párhuzamossal végeztük speciális Applied Biosystems-Taqman genotipizáló tesztek segítségével StepOne AB Real Time PCR készüléken. A reakciókat 12,5 µl végtérfogatban végeztük, mely 3ng 1ng/µl koncentrációjú DNS oldatból, 6,25µl Taqman Universal PCR Master Mix-ből, 0,625 µl Taqman SNP assay-ből (20x) és 2,625µl PCR vízből tevődik össze. Az eredményeket az ABI által mellékelt software analizálta és tette számunkra láthatóvá.

3. Statisztikai analízis módszertani megalapozása.

Eredményeinket Excel táblázatokban rögzítettük, továbbá ennek segítségével kalkuláltuk a genotípus eloszlásokat, valamint az allélfrekvenciákat. A hagyományos, konvencionális statisztikai elemzéseket, nevezetesen a Khi2 próbákat a GraphPad Prism program (<http://www.graphpad.com/scientific-software/prism/>) segítségével kalkuláltuk. A bonyolultabb összefüggések elemzésére a Budapesti Műszaki Egyetem Méréstechnika és

Információs Rendszerek Tanszék munkatársaival kiépített kapcsolat révén nyílt lehetőségünk, melyhez ők biztosították a szakmai és számítógépes háttérrel. Segítségükkel alkalmaztuk a Bayes-i hálózat alapú többszintű valószínűségi analízist, mely lehetővé teszi az asszociációk analízisét különböző absztrakciós szinteken: modell alapú páros valószínűség (direkt asszociáció), változó készletek valószínűsége és releváns változók statisztikai együtthatásai. Elvégeztük a Bayes-i elemzés eredményét többváltozós statisztikai analízis logisztikai regressziós modellezéssel SPSS programmal is, elülső változó szelektálásos módszerrel PIN=0,05 valószínűségi küszöbvel a változó beválasztáshoz, valamint POUT=1 kizáró küszöbvel a változó kivételéhez.

4. A gyulladós fogágybetegség kialakulásában feltételezhetően szerepet játszó egyszerű nukleotid polimorfizmusok előfordulása a magyar populációban

A 4 csoportba (agresszív, krónikus parodontitis, gingivitis és egészséges kontroll csoport) sorolt 432 önkéntes DNS mintáin az alábbi 17 SNP genotipizálását végeztük el: *IL-1 α* -889 A/G, *IL-1 β* +3954 C/T, *IL-1 β* -511 A/G, *IL-10* -1082 C/T, *TNF- α* -308 A/G, *TLR4* 299 A/G, *TLR4* 399 C/T, *VDR* -1056 A/G, *TNF- α* -1031 C/T, *IL-10* -597 A/C, *IL-6* -1363 G/T, *CD14* -260 A/G, *COX2* -8474 A/G, *ASPORIN* -9659 C/T, *MMP8* -799 A/G, *VDR* C/T, *ANRIL* A/C. Az egyes SNP-k főbb adatait és a kimutatásukhoz felhasznált speciális próbákat az alábbi táblázat tartalmazza:

SNP	rs szám	TaqMan SNP Assay ID
IL-1α -889	rs1800587	C_9546481_20
IL-1β +3954	rs1143634	C_9546517_10
IL-1β -511	rs16944	C_1839943_10
IL-10 -1082(-1087)	rs1800896	C_1747360_10
TNF-α -308	rs1800629	C_7514879_10
TLR-4 Thr399Ile	rs4986791	C_11722237_20
TLR-4 Asp299Gly	rs4986790	C_11722238_20
VDR -1056 (TaqI)	rs731236	C_2404008_10
TNF-α -1031	rs1799964	C_7514871_10
IL-10 -597(-592)	rs1800872	C_1747363_10
IL-6 -1363	rs2069827	C_15860047_10
CD14 -260(-159)	rs2569190	C_16043997_10
COX2 -8474	rs5275	C_7550203_10

ASPORIN -9659	rs10992350	C_1899080_10
MMP8 -799	rs11225395	C_1366493_10
VDR	rs 7132324	C_30668769_10
ANRIL	rs1333048	C_1754667_10

Elemzéseink során minden esetben találtunk példát a ritka allél megjelenésére, mely alapján kimondhatjuk, hogy a fenti gének nevezett polimorfizmusai a hazai populációban is jelen vannak. Statisztikai próbákkal igazolt jelentősebb különbségeket az *IL-1 β +3954*, *CD14 -260*, *ANRIL*, *TNF- α -1031* és az *IL-6 -1363* esetében találtunk az egyes csoportjaink között.

A „**Statisztikai analízis módszertani megalapozása**” pontban ismertetetteknek megfelelően eredményeinket két részre bontva taglaljuk az alábbiakban: **Klasszikus statisztika és Bayes-statisztika.**

5. Eredmények

Klasszikus statisztika

A vizsgálatok négy különböző populáció analízisére terjedtek ki, melyek a krónikus parodontitis (CP), agresszív parodontitis (AgP) és gingivitis (Gin) tünetekkel rendelkező betegek, illetve egy egészséges kontroll csoport (Con) mintáit tartalmazta. A hagyományos statisztikai eszközök közül khi-négyzet próbát, illetve logisztikus regressziót alkalmaztunk a függőségek vizsgálatára.

A CP+Con populációban (n=270) egyedül az *IL-6 -1363* SNP mutatott függést a krónikus parodontitissel (p=0.043), amely gyengén szignifikánsnak tekinthető, többszörös hipotézistesztelés (THT) miatti korrekciónál nem marad szignifikáns. Logisztikus regressziós elemzésnél a nem, valamint a kor mint kovariánsok mellett az *IL-6 -1363* is bekerül a regressziós modellbe (SPSS forward method, Wald statistics) közepesen szignifikáns elemként (p=0.016).

A AgP+Con populációban (n=169) az *ANRIL* SNP mutatott nominálisan szignifikáns függést az agresszív parodontitissel (p=0.045), amely egy THT korrekciót követően szintén elveszíti szignifikanciáját.

A Gin+Con populációban (n=201) az *IL-6 -1363* (p=0.005) és a *TNF- α -1031* (p=0.011) SNP-k esetében detektálható szignifikáns függés a gingivitissel.

Bayes-statisztika

A hagyományos statisztikák mellett Bayes-háló alapú statisztikai módszerek alkalmazására is sor került, melynek használata lehetővé teszi a többváltozós statisztikai elemzést, és normatívan kezeli a többszörös hipotézis tesztelés miatti korrekciót. Ezáltal szemben a hagyományos statisztikai módszerekkel, lehetővé válik a gyengébb, trend jellegű eredmények kezelése. E speciális statisztikai eljárásokkal modellezhetők a vizsgált SNP-k közötti kölcsönhatások. Ezeket az értékeléseket kollaborációs munka keretében végeztük a Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem dolgozóival az Antal Péter és munkatársai által kidolgozott eszközrendszer alkalmazásával.

A BN-BMLA módszertan Bayes-háló alapú bayes-statisztikai elemzést végez, melynek célja az erősen releváns tényezők azonosítása. A módszer által számított egyik

mutató erős relevancia a posteriori valószínűsége (Pr), amely egy adott SNP-nek a célváltozó (jelen esetben krónikus vagy agresszív parodontitis, illetve gingivitis) Markov-takaró halmazába való tartozásának valószínűségét jelenti. Ez lényegében egy adott változóhoz tartozó modell alapú asszociációs mutató (a célváltozóhoz képest). Minél magasabb ez a valószínűségi érték (1-hez közelebbi), annál relevánsabb a változó a célváltozó szempontjából. A modellek kialakításánál mind a kor, mind pedig a nem részét képezte a vizsgált tényezőknek.

A CP+Con populációban az *IL-6 -1363* SNP bizonyult közepesen relevánsnak (Pr=0.475) a krónikus parodontitis viszonylatában a genetikai tényezők közül. Ez azt jelenti, hogy egy gyengébb, de jelenlévő hatásról van szó, amit a klasszikus asszociációs teszt is jelez.

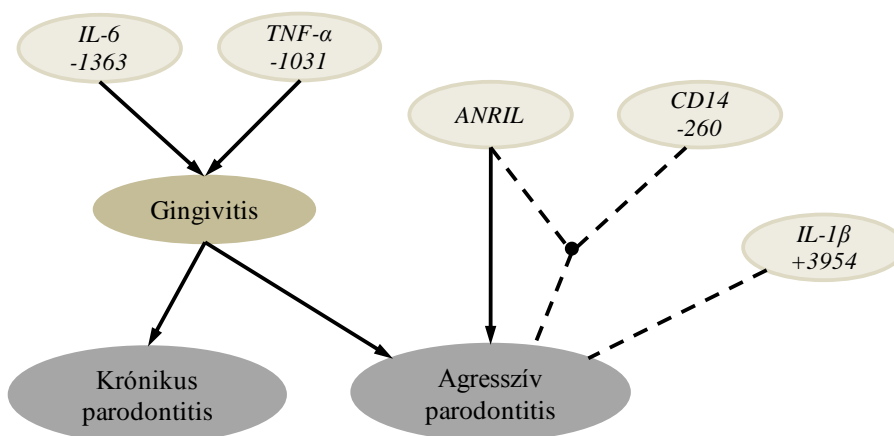
Az AgP+Con populációban három SNP bizonyult relevánsnak, az *ANRIL* (Pr=0.854), a *CD14 -260* (Pr=0.713) és az *IL-1 β +3954* (Pr=0.789). Ezek közül csak az *ANRIL* esetében jelzett függést a hagyományos asszociációs teszt, ami arra utal, hogy a további két SNP, a *CD14 -260* és az *IL-1 β +3954* interakciós tagként, tehát más tényezőkkel együttesen fejt ki hatást.

A Gin+Con populációban mind az *IL-6 -1363* (Pr=0.919), mind a *TNF- α -1031* (Pr=0.868) erősen releváns tényezőnek mutatkozott a gingivitis viszonylatában.

Komplex modellvizsgálat

A Bayes-háló alapú statisztikai módszerek, mint az alkalmazott BN-BMLA, lehetővé teszik a vizsgált tényezők közötti függőségek feltérképezését, a többváltozós függőségi mintázatok meghatározását. Mindez lehetővé teszi, hogy átfogóbb képet kapjunk a tárgyterület folyamatait meghatározó mechanizmusokról.

Ennek érdekében egy komplex modell kialakítását is megvizsgáltuk, amely együttesen kezeli a krónikus és agresszív parodontitis, továbbá a gingivitis tüneti leírókhöz kapcsolódó függési rendszert. A komplex modell alapvető feltevése az volt, hogy a gingivitis, mint megelőző/kísérő tünet jelen van krónikus illetve agresszív parodontitis esetében is, azonban nem feltétlenül azonos módon. Külön vizsgáltuk a krónikus parodontitis és a gingivitis, illetve az agresszív parodontitis és a gingivitis összefüggésrendszerét is a teljes populáció alapján (n=432), és ezek tükrében konstruáltunk egy lehetséges függőségi modellt.



A krónikus parodontitis és a gingivitis függésrendszerében az látható, hogy a *IL-6 -1363* SNP valójában közvetlenül a gingivitist befolyásolja, és ezen keresztül hat a krónikus parodontitisre. A BN-BMLA módszer lehetőséget ad a kapcsolattípusok részletes vizsgálatára, ami lehetővé teszi direkt (közvetlen oksági befolyás), tranzitív (más tényezőkön keresztül ható oksági befolyás) és mediált (interakciós együttműködések) kapcsolatok feltérképezését. Az alábbi táblázatból látható, hogy a krónikus parodontitis esetében sem az

IL-6 -1363, sem a *TNF- α -1031* esetében nem direkt a függőségi kapcsolat, mivel ennek valószínűsége alacsony (Pr=0.1034, illetve Pr=0.0483). Ehhez képest egy tranzitív kapcsolat valószínűsége jóval magasabb (Pr=0.5026, illetve Pr=0.4644). Mindemellett az említett SNP-k gingivitissel való kapcsolata pont ennek ellenkezőjét mutatja, ott a direkt kapcsolat a valószínűbb.

Fenotípus	SNP	Függőségi kapcsolatok	
		Direkt	Tranzitív
Krónikus parodontitis	<i>IL-6 -1363</i>	0.1034	0.5026
	<i>TNF-α -1031</i>	0.0483	0.4644
Gingivitis	<i>IL-6 -1363</i>	0.6239	0.0611
	<i>TNF-α -1031</i>	0.4447	0.0979

Eddigi megállapításainkat alátámasztják a korábbi eredmények, azaz, hogy mindkét SNP, a *IL-6 -1363* és a *TNF- α -1031* is erősen releváns volt a gingivitis viszonylatában, míg az *IL-6 -1363* gyengén, a *TNF- α -1031* pedig nem volt releváns a krónikus parodontitis viszonylatában. Mindez azt valószínűsíti, hogy ezen SNP-k a gingivitisre vannak közvetlen hatással, és gingivitisen keresztül hatnak a krónikus parodontitisre.

Az agresszív parodontitis és a gingivitis függőségi rendszerét tekintve az előzőhöz hasonló helyzet áll fenn *IL-6 -1363* és a *TNF- α -1031* SNP-k esetén, tehát a hatásuk közvetett, a gingivitisen keresztül érvényesül. Mindemellett vannak azonban olyan további SNP-k, melyek nem a gingivitis közvetítésével hatnak. Ilyen az *ANRIL*, mely egyfelől közvetlen hatást gyakorol az agresszív parodontitisre, másfelől a *CD14 -260* SNP-vel interakcióban fejt ki hatást. A *CD14 -260* SNP esetében jól látható, hogy sem a direkt, sem a tranzitív függőségi kapcsolat nem valószínű, ellenben a mediált, azaz interakciós kapcsolat valószínűsége relatíve magas (Pr=0.6968). Ebből következik, hogy a *CD14 -260* csak az *ANRIL* SNP-vel együttesen fejt ki hatást. Az *IL-1 β +3954* az előbb említett SNP-hez hasonlóan nincs közvetlen hatással az agresszív parodontitisre, hanem egy gyengébb mediált hatással rendelkezik.

Fenotípus	SNP	Függőségi kapcsolatok		
		Direkt	Tranzitív	Mediált
Agresszív parodontitis	<i>IL-6 -1363</i>	0.0285	0.4009	0.2431
	<i>TNF-α -1031</i>	0.0051	0.6115	0.1078
	<i>ANRIL</i>	0.4886	0.0490	0.1735
	<i>CD14 -260</i>	0.0088	0.0772	0.6968
	<i>IL-1β +3954</i>	0.0170	0.2575	0.4670
Gingivitis	<i>IL-6 -1363</i>	0.5996	0.0524	0.0245
	<i>TNF-α -1031</i>	0.3913	0.0000	0.0363

Összefoglalva eredményeiket, az *IL-6 -1363* és a *TNF- α -1031* SNP-ik erősen relevánsak a gingivitis viszonylatában és a gingivitisen keresztül hatnak az agresszív és a krónikus parodontitisre. Mindemellett vannak azonban olyan további SNP-k, melyek nem a gingivitis közvetítésével hatnak. Az *ANRIL* egyfelől közvetlen hatást gyakorol az agresszív parodontitisre, másfelől a *CD14 -260* SNP-vel interakcióban fejt ki a hatását. Az *IL-1 β +3954* agresszív parodontitisre szintén mediált, gyenge hatással rendelkezik. Fentiek mellett számos feltételezett SNP rizikótényezőről meg kellett állapítanunk, hogy nem rendelkeznek kimutatható hatással az agresszív és a krónikus parodontitis kialakulásában az általunk vizsgált magyarországi populációban. Adataink alátámasztják a populációsintű genomikai tanulmányok jelentőségét és bebizonyítják a

kockázati faktorok felmérésének szükségességét a különböző populációkban. Ezen túlmenően megerősítik, hogy a Bayes-i elemzés normatív megoldást nyújt a többszörös hipotézistesztelés korrekciójához. A Bayes-i hálózat alapú módszerek, főleg a Bayes-i statisztikai keret, megengedi az erős relevancia elemzését még többszörös célváltozók és viszonylag kis mintaszám esetében is.

7. Kiegészítő vizsgálatok eredményei

Humán herpes vírusok lehetséges szerepe a parodontitis különböző formáinak kialakulásában. Az utóbbi években egyes latensen az emberi szervezetben perzisztálni képes vírusok szerepét a krónikus gyulladós folyamatok kialakulásának hátterében egyre szélesebb körben vetették fel. A humán herpes vírusok szerepe több olyan betegségben felmerült, amit régebben kizárólag bakteriális eredetűnek hittek, így a parodontális gyulladásokban is. A víruscsalád tagjai részt vesznek a szövetkárosító citokinek felszabadulásában, parodontopathogén baktériumok felszaporodásában és cytotoxikus vagy immunopathogén folyamatok elindításában. A hipotézisünk annak kimutatására irányult, hogy a herpesvírusok és bizonyos egyszerű nukleotid polimorfizmusok (SNP) együttese/kölcsönhatása hogyan befolyásolja a fogágybetegségek kialakulását. Vizsgálatunkban tanulmányoztuk 5 herpeszvírus: HSV1-2 (human herpes vírus), CMV (cytomegalovírus), EBV (Apstein- Barr vírus) valamint a VZV (varicella zooster vírus) előfordulását az egyes csoportokban. A vírusok jelenlétének kimutatásához a már meglévő nyálkahártya kaparékokból izolált DNS mintákat használtuk. Ezeken alkalmaztuk a nagyon kis mennyiségű örökítő anyag specifikus és pontos kimutatására alkalmas, két lépésben 2 típusú primerrel végzett **nested PCR** reakciót és az ezt követő gélelektroforézist a különböző méretű termékek elkülönítésére. Vizsgálataink ebben a témában nem terjednek ki a teljes elemszámról, eredményeink ez esetben csupán tájékoztató jellegűek, bizonyos érdekességek azonban megfigyelhetők. Előzetes eredményeink arra utalnak, hogy a vírushordozás eltérő az egyes vizsgálati csoportok között, s ez ezen patogén vírusok szerepére utalhat az agresszív és a krónikus parodontitis kialakulásában. Ezen vizsgálataink folytatásához jelenleg támogatási forrást keresünk. A herpesvírusok szerepének megértése a destruktív fogágybetegségekben fontos lehet a prevenció és a hatékony terápia eredményességének tekintetében egyaránt.

Fentiek mellett vizsgáltuk egy rendkívül ígéretes bioaktív anyag, a BPC157 hatását a gyulladós folyamatokra és az alveoláris csontpusztulás mértékére kísérletes parodontitis során. A ligatúrával kiváltott kísérletes parodontitisben a megnövekedett gingivális ödémát és a felületi csontdestrukciót a BPC157 jelentősen gátolta. Tekintve, hogy ez a hatóanyag krónikus gyulladós bélbetegségben már emberi vizsgálatokban is hatásosnak bizonyult mások megfigyelései szerint, munkánk új utat nyithat a parodontitis kezelésének irányába.

Klinikai munka keretében humán vizsgálatokban természetes, autogén eredetű, a regenerációt elősegítő biológiailag aktív faktorok szerepét tanulmányoztuk parodontitis következtében elpusztult szövetek helyreállításában. A betegek saját véréből centrifugálással dúsított vérlemezkékben gazdag plazma (platelet rich plasma) több növekedési faktort hordoz (így TGF β , PDGF) amely pozitívan befolyásolja a parodontális sebgyógyulást és fokozza a beültetett csontpótló szervülését és átépülését. A vizsgálat szerint az anorganikus bovin eredetű csontpótló magában, illetve vérlemezke-dúsított plazmával (PRP-vel) kombinálva szignifikáns tasakmélység csökkenést, csontos telődést és tapadásnyereséget eredményezett. A PRP azonban szignifikánsan nem fokozta a hatást a csak anorganikus bovin eredetű csontpótlóval kezelt csoport értékeivel összehasonlítva.

A súlyos fogágybetegség fokozott rizikócsoportjába tartozó pácienseink körében, szorosan kapcsolódva a genetikai polimorfizmus vizsgálatainkhoz, klinikai korrekciós sebészi vizsgálatokat végeztünk, ill. multicentrikus vizsgálatsorozatban vettünk részt. Az egyik igen jelentős nemzetközi kooperációban végzett vizsgálatban egy a csontképzésben fontos szerepet játszó csont morfogénikus protein, egy újonnan izolált növekedési és differenciációs faktor (MDO5) szerepét írtuk le klinikai és humán hisztológiai anyagban. A **parodontális regeneráció** más fontos biológiai szabályozóival is végeztünk vizsgálatokat, különös tekintettel az alveoláris csontpusztulás korrekciójára.

Kiegészítő vizsgálataink során a parodontális csontléziók radiológiai diagnosztikájának érzékenységét és pontosságát határoztuk meg nemzetközi kollaboráció keretében. Ezen túl részletesen elemeztük a zománc mátrix derivátum (Emdogain®) alkalmazhatóságát a parodontális műtétek során.

Progenitor sejtek a fogban és fogkörnyéki szövetekben: a genomikai variabilitás potenciális szerepe - Szövettani és sejt kultúra vizsgálatok . Vizsgálataink stratégiai célja a fogfejlődésben, s így potenciálisan a fogmegújításban szerepet játszó tényezők felderítése. Ennek tükrében fenti vizsgálataink mellett, az esetek egy kis részében, a klinikai indikációnak megfelelően bölcsességfogakat távolítottunk el. Ezen eltávolított fogak fogbeléből és a **parodontális ligamentum**ából sikeresen készítettünk sejt kultúrát, melyekben progenitor sejt tulajdonságokkal rendelkező sejt populációt is sikerült kimutattunk. Az így nyert, alaphelyzetben fibroblast morfológiát mutató kultúrák differenciálhatóak osteogén irányba, sőt más sejt típusok felé is. Állatkísérletes eredményeink egyértelműen igazolják, hogy az így sikeresen differenciáltott humán fogeredetű sejtek osteogén irányba differenciálva befolyásolják az összeintegrációt, neuronális irányban pedig képesek sértett agyterületre beépülni. Új, háromlépéses neurodifferenciálódási protokollt dolgoztunk ki, és bizonyítékokat szolgáltatunk arra, hogy a sejtek jelentős része idegi irányba differenciálódott. Ezeket a differenciált sejteket kortikális sértés mellett patkányok agyába juttattuk, s sikerült kimutatnunk, hogy a beültetett sejtek még négy héttel a beültetés után is kimutathatók mind a progenitor zónákban, mind a sértett kortex területén, továbbá hisztokémiai, és elektrofiziológiai paraméterek alapján funkcionális idegsejtként viselkednek. Egyértelmű ugyanakkor, hogy az egyes emberi fogeredetű kultúrák proliferatív, differenciálódási és regenerációs képessége nagyfokú variabilitást mutat. Az így felderített különbségek **genomikai hátterét** elkövetkező kutatásaink során azonosítjuk.

Budapest, 2013. szeptember 29.

FOK/PAR/36/2013

Dr. Gera István
egyetemi tanár
témavezető

