

علاقة التعدد الشكليّ 799T/C- لمعزاز جين MMP-8 بالتهاب النسيج حول السنّية لدى مرضى سوريين سكريين من النمط الثاني

علي أبو سليمان***

شادن حدّاد**

فاتن كفي*

الملخص

خلفية البحث وهدفه: تهدف هذه الدراسة إلى التحري عن الارتباط بين التعدد الشكليّ (799C/T-) في معزاز جين MMP-8، والتهاب النسيج حول السنّية المزمن عند مرضى سوريين مصابين بالسكري من النمط الثاني. تضمنت الدراسة 180 حالة توزعت إلى أربع مجموعات (40 مريض التهاب نسيج حول سنّية، و 40 مريض سكري، و 60 مريض التهاب وسكري، و 40 أصحاء)، واستُخلصَ الدنا المجيني من عينات الدم الكامل، وتضخيم شدف الدنا الحاوية على الموقع (799C/T-) في معزاز جين MMP-8، وإجراء الهضم باستخدام أنزيم القطع SfcI، وتمت دراسة توزع الأنماط الجينية، والأليلات بين مجموعات الدراسة باختبار كاي مربع. النتائج: أظهر توزع الأنماط الجينية بين كل مجموعة من المرضى ومجموعة الأصحاء فرقاً يعدّ به إحصائياً ($P < 0.05$)، والحالات التي تحمل الأليل T أكثر استعداداً 2.5 مرة تقريباً من حاملي الأليل C للإصابة بالتهاب النسيج حول السنّية مع السكري ($OR = 2.513$, $CI: 1.373$ to 4.598 , $P = 0.0018$) وبدون السكري ($OR = 2.645$, $CI: 1.420$ to 4.923 , $P = 0.0026$).

الاستنتاج: تقترح الدراسة أنّ للتعدد الشكليّ (799C/T-) دوراً هاماً في زيادة القابلية للإصابة بالتهاب النسيج حول السنّية عند المرضى السكريين من النمط الثاني في المجتمع السوري. الكلمات المفتاحية: التهاب النسيج حول السنّية، السكري نمط II، معزاز جين MMP-8، التعدد الشكليّ 799C/T-

* طالب دكتوراه في البيولوجيا الجزيئية والتقانة الحيوية - كلية الصيدلة - جامعة دمشق.

** أستاذ في قسم الكيمياء الحيوية والأحياء الدقيقة - كلية الصيدلة - جامعة دمشق.

*** أستاذ في قسم النسيج حول السنّية - كلية طب الأسنان - جامعة دمشق.

Association between -799C/T Polymorphism in MMP-8 Gene Promoter and Periodontitis among Type II Diabetic Syrian Population

Faten Kafa *

Shaden Haddad **

Ali Abou Sulaiman ***

ABSTRACT

Introduction: The goal of the present study is to investigate the association between (-799C/T) polymorphism in MMP-8 gene promoter and chronic periodontitis (ChP) in Syrian patients with type II diabetes mellitus (DM).

Materials and Methods: A total of 180 participants were recruited in the study, which included 40 ChP, 40 DM, 60 ChP with DM (ChPDM) and 40 healthy controls. Genomic DNA was extracted from the whole blood collected from the participants. DNA was amplified using specific primers flanking -799C/T point in MMP-8 gene promoter. The genotyping was performed by restriction fragment length polymorphism (RFLP) using SfcI enzyme. The distribution of genotypes and allele frequencies between the study groups was compared using the Chi-square test.

Results: The genotype frequencies showed significant differences between each patient group and healthy group ($P < 0.05$), and subjects carrying the T allele were significantly 2.5 times more likely to develop ChP with DM (OR= 2.513, CI:1.373 to 4.598, $P = 0.0018$) and without DM (OR= 2.645, CI:1.420 to 4.923, $P = 0.0026$) compared with C subjects.

Conclusion: The present study suggests that the MMP8 (-799C/T) polymorphisms has an important role in periodontitis susceptibility in Syrian diabetic population.

Keywords: Periodontitis, Diabetes Mellitus type II, MMP-8 gene Promoter, -799C/T Polymorphism

* PhD student in molecular biology and biotechnology-Pharmacy College- Damascus University

** professor in Pharmacy College - Damascus University

*** professor in Dentistry College - Damascus University

المقدمة:

تُعدُّ العلاقة بين التهاب النسيج حول السنّية والسكريّ ثنائية الاتجاه، فكما يحدث السكريّ تبدلات في اصطناع الكولاجين و glycosaminoglycan، وزيادة في إفراز السيتوكينات طليعة الالتهاب، يمكن للإنثان حول السنّية أن يؤثر على ضبط السكر، ويؤدي لزيادة سكر الدم hyperglycemia، وتفعيل سبل الإشارة التي تؤدي إلى مضاعفات الأوعية الدموية الدقيقة والكبيرة لدى السكريين (Costa, Trevisan et al. 2010, Teeuw, Gerdes et al. 2016, Rovai, Souto et al. 2010). يحدث السكريّ تغيرات استقلابية على مستوى الكولاجين، وتعدّ زيادة فعالية أنزيم الكولاجيناز MMP-8 من العوامل الكامنة المؤهبة للمرض حول السنّية لدى السكريين (Costa, Trevisan et al. 2010)، إذ يزداد التعبير عنه وتفعيله مؤدياً لتدرك غير مرغوب للأنسجة (Sorsa, Tjäderhane et al. 2004).

ويؤدي أنزيم الكولاجيناز MMP-8 90 - 95% من الفعالية الحالة للكولاجين في التهاب النسيج حول السنّية، لذا يمكن عدّه واصماً حيويّاً لتشخيص المرض (Zhang, Li et al. 2018)، فهو يتحرر من العدلات ويتفعل محفزاً تدرك الكولاجين من النمط I (Lahmi 2020)، والمطرس خارج الخلوي extracellular matrix عند تخرب النسيج حول السنّية، مما يؤدي إلى فقد الأسنان (Sorsa, Tervahartiala et al. 2011).

ويؤدي مستوى الإنزيم MMP-8 دوراً إمرضياً في فقد العظم وتخرب النسيج الضامة في التهاب النسيج حول السنّية، وقد أظهرت الدراسات نتائج متناقضة بالنسبة لعلاقته بالتهاب النسيج حول السنّية، فبعضها أشار إلى مستويات MMP-8 في اللعاب لدى المرضى أعلى منها لدى الأصحاء، إذ إنّ مستويات الرنا المرسال mRNA تكون مرتفعة بشكل ملحوظ في النسيج اللثويّ الملتهبة، بينما أظهرت دراسات

التهاب النسيج حول السنّية هو إنثان مزمن يتضمّن تخرب الأجزاء الداعمة للسنّ كالزباط حول السنّية والسنّخ Alveolar Socket (Xu, Li et al. 2016)، ويبدأ بتراكم اللويحة الجرثومية على الأسنان واللثة، محرّضة الاستجابة المناعية المسببة للأذية النسيجية (Zhang, Sun et al. 2011)، إذ تتحرّض الخلايا الظهارية لإنتاج وسائط التهابية منها (α -defensins, β -defensins, cathelicidins, saposins) (Mariano, Sardi et al. 2010)، وتتجذب الخلايا طليعة الالتهاب pro-inflammatory كالأرومات الليفية Fibroblasts، والخلايا البدينة، والخلايا البطانية، والخلايا التغصنية، والمفاويات إلى التلم اللثويّ Gingival Crevice، وتفرز السيتوكينات طليعة الالتهاب pro-inflammatory cytokines مثل (Gu and Ryan 2010) ($TNF-\alpha$, IL-1 β , IL-6, IL-12)، وجاذبات كيميائية (IL-8, MIP-1 α , MIP-2, MCP-1, MCP-5) ومستويات عالية من البروستاغلاندينات PGE₂ في النسيج الضام (Xu, Li et al. 2016)، محفزة زيادة التعبير عن أنزيمات مثل Matrix Metalloproteinases (MMPs) من خلايا اللثوي، وفعاليتها، إذ تخرب MMPs ألياف الكولاجين، وتغيّر من الشكل التشريحي الطبيعي للنسيج اللثويّ، ما يؤدي لهدم البنية النسيجية حول السنّية، وإذا بقي الالتهاب دون معالجة، فإنّه يؤدي لحبوب أكثر عمقاً، ويستمر ذروياً محفزاً الخلايا ناقضات العظم Osteoclasts لامتناص العظم السنّخي (Gu and Ryan 2010). يتأثر تطوّر العلامات السريرية لالتهاب النسيج حول السنّية بالعديد من عوامل الخطورة كالأمرض الجهازية ومنها السكريّ، والعوامل البيئية والوراثية (Kornman 2008, Lindhe, et al. 2008).

جامعة دمشق، والذين وُزِعوا إلى أربع مجموعات متطابقة من حيث العمر والجنس (p: value > 0.05)

1. مجموعة الأصحاء (H) Healthy control : تضمّ 40 شخصاً، مع غياب فقد الارتباط السريري clinical attachment loss (CAL)، وأعماق جيوب > 3 مم في جميع المواقع.

2. مجموعة مرضى التهاب النسيج حول السنّية غير السكريين (ChP) Chronic periodontitis : 40 مريضاً لديهم التهاب نسيج حول سنّية مزمن وفقاً للمعايير الموضوعية من قبل الجمعية الأمريكية لعلم النسيج حول السنّية 1999.

3. مجموعة المرضى السكريين Diabetes Mellitus (DM) : 40 مريضاً، ليس لديهم التهاب نسيج حول سنّية، وقيمة الخضاب الغلوكوزي $\leq 7\%$

4. مجموعة مرضى التهاب النسيج حول السنّية السكريين ChPDM : 60 مريضاً سكرياً، قيم الخضاب الغلوكوزي لديهم $\leq 7\%$ ، وشُخّصت إصابتهم بالتهاب النسيج حول السنّية المزمن وفق معايير 1999.

معايير الإدخال:

- العمر ٤٠ - ٧٠ عاماً
- عدد الأسنان الموجودة في الفم ٢٠ سنةً على الأقل (باستثناء الأرحاء الثالثة).

معايير الاستبعاد:

- المصابين بأمراض جهازية (غير السكريّ) أو موضعيّة فمويّة (غير التهاب اللثة)
- المعالجة بالصادات الحيويّة ومضادات الالتهاب اللاستيرويديّة NSAIDs أو معالجات سنّية خلال الأشهر الثلاثة الأخيرة
- الحمل والإرضاع
- التدخين والكحول

أخرى نتائج معاكسة (Li, Zhu et al. 2016, Zhang, Li et al. 2018).

ويتوضع جين MMP-8 على الصبغي 11 في عنقود cluster من جينات MMPs الأخرى التي تتضمّن MMP1,3,7,10,12,13,20,26 (Wang, Parry et al. 2004)، ويمكن للتعدّات الشكليّة single nucleotide polymorphisms (SNPs) الوظيفيّة في منطقة المعزاز promoter أن تؤثر في مستوى التعبير الجينيّ، وتغيّر من الفعالية الوظيفيّة، وبالتالي تغيّر في تأثيره في عمليّة تكوّن العظم، والاستجابة الالتهابيّة (Lindroth and Park 2013, Emingil, Han et al. 2014)، وترتبط مع الاستعداد لالتهاب النسيج وشدة المرض، ولكن هذا التأثير اختلف حسب مجتمع الدراسة فالتعدد الشكليّ 799- أظهر ارتباطاً بالمرض في تايوان وتركيا، في حين لم يكن هناك ارتباط في التشيك، وعلى الرغم من أن التعددين الشكليين - 799 و +17 لم يظهر ارتباطاً كلٌّ منهما على حدة، إلا أنهما كنمط فرداني haplotype كان لهما تأثير في الاستعداد للمرض، كذلك التعدد الشكليّ 381- لم يظهر ارتباطاً عند القوقازيين (Li, Zhu et al. 2016).

هدف البحث:

يهدف البحث للتحري عن التعدد الشكليّ 799T/C- في معزاز promoter جين MMP-8 لدى مرضى سوربيين سكريين مصابين بالتهاب النسيج حول السنّية، وعلاقته بزيادة القابليّة للإصابة بالتهاب النسيج.

مواد البحث وطرقه:

مجموعات الدراسة:

أجريت دراسة مقطعيّة cross sectional study تضمّنت مراجعي قسم النسيج حول السنّية في كلية طب الأسنان-

عينة الدراسة: مركز الدراسات الوبائية والبيولوجية لطفيليات اللشمانية، جُمعت عينات الدم المحيطي في أنابيب حاوية على EDTA كمضاد تخثر، واستخلص الدنا DNA بطريقة يدوية تعتمد على استخدام اليوريا (Chacon-Cortes and Griffiths 2014)، وحفظه في الدرجة -20 حتى وقت الاستخدام.

قياس تركيز ونقاوة الدنا: قيس تركيز ونقاوة الدنا باستخدام جهاز Nano drop2000 من شركة (Thermo scientific, USA) في

مركز الدراسات الوبائية والبيولوجية لطفيليات اللشمانية، وقراءة الامتصاصية عند أطوال موجة 260nm و 280nm.

تفاعل البوليميراز التسلسلي PCR: أُجري تفاعل البوليميراز التسلسلي PCR باستخدام زوج من المشرع (Eurofins Genomics, Germany) ذات التسلسل الموضَّح في الجدول التالي (جدول (1))، عند درجة حرارة annealing 52°.

الجدول (1): تسلسل المشرع وأنزيم القطع المستخدم وأطوال الشدف الناتجة (Izakovicova Holla, Hrdlickova et al. 2012)

SNP	Primers	PCR product (bp)/ enzyme	Alleles
-799C/T	F: 5'-CTGTTGAAGGCCTAGAGCTGCTGCC-3' R: 5'-GATCTTCTCTTCAAACCTACCC-3'	968/Sfc I	C: 894 bp + 74 bp T: 968 bp

وأجري رحلان كهربائي لنواتج لتضخيم على هلامة آغاروز بتركيز 2%، واستخدام دائرة الترحيل TBE X1.

الهضم بأنزيم القطع

هُضِمَت الشدَف الناتجة عن التضخيم باستخدام أنزيم Sfc I (Jena Bioscience®, Germany) الذي يقطع التسلسل في الموقع -799 عند وجود الأليل C، عند درجة حرارة 37°، وترحيل نواتج الهضم على هلامة الآغاروز 2%.

التحليل الإحصائي:

أُنجزَّ التحليل الإحصائي باستخدام برنامج SPSS (version 25, IBM, USA) وبرنامج GraphPad prism (version 9.1.2، وبرنامج Microsoft Excel 2016).

استُخدم اختبار كاي مربع Chi-square لتحليل المعطيات بين المجموعات لمعرفة ما إذا كانت الفروقات الملاحظة بين المجموعات يعتد بها إحصائياً ($P\text{-value} < 0.05$) أو أن هذه الفروقات ناتجة عن المصادفة ($P\text{-value} > 0.05$).

و حساب نسبة الأرجحية (ORs) (> 0.05)، ومجال ثقة (confidence intervals) 95% وقُورنت الأنماط الجينية وتواتر الأليلات بين مجموعات الدراسة.

النتائج:

تراوحت أعمار المرضى بين 40-70 عاماً، وقسمت شدة التهاب النسخ حول السنوية حسب عمق الجيب حول السنوي إلى: خفيف (PD=4-5mm)، ومتوسط (PD=6-7mm)، وشديد (PD>7mm).

ويظهر الجدول (2) توزع عينات المرضى والشواهد حسب الجنس، وشدة المرض في مجموعات التهاب النسخ حول السنوية مع السكري وبدونه، ولم يظهر هذا التوزع فروقاً إحصائية بين هذه المجموعات ($p\text{-value} > 0.05$).

الجدول (2): توزع عينات التهاب النسيج حول السنّة حسب الجنس وشدة المرض.

ChPDM		ChP		severity
female	male	female	male	
6	9	4	5	Primary
5	11	5	5	Moderate
14	15	9	12	Severe
25	35	18	22	Patients

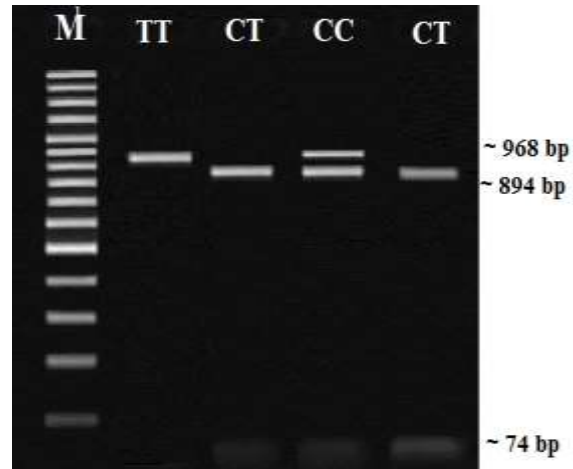
وقد حُسِبَ من خلال معادلة Hardy-Weinberg توزع تكرارات الأنماط الجينية المتوقعة في كل مجموعة (الجدول (3))، وباختبار كاي مربع chi-square لم نجد فارقاً يعتدّ به إحصائياً بين التكرارات الناتجة والمتوقعة P -value (>0.05)، أي إنّ المجموعات قابلة للدراسة جينياً.

الجدول (3): تواتر الأنماط الجينية الناتجة والمتوقعة في مجموعات الدراسة

	Genotypes	Expected Genotypes	Observed Genotypes	P-value
H	CC	16.9	18	0.199
	CT	18.2	16	
	TT	4.9	6	
ChP	CC	6.8	5	0.199
	CT	19.4	23	
	TT	13.8	12	
DM	CC	9.04	8	0.199
	CT	20	22	
	TT	11.04	10	
ChPDM	CC	10.8	9	0.199
	CT	30	33	
	TT	19.8	18	

أجري اختبار كاي مربع لحساب تواتر الأنماط الجينية والأليلات بين مجموعات الدراسة، مجموعة الأصحاء مع كل من المجموعات الثلاثة الأخرى (H vs ChP, H vs DM, H vs ChPDM) ويظهر الجدول (4) قيم P ، ونسب الأرجحية (OR) ومجال الثقة (95% confidence interval).

يوضّح الشكل (1) الشداف الناتجة عن هضم نواتج تضخيم تفاعل الـPCR، إذ إنّ الإنزيم Sfc I يقطع عند وجود الأليل C، فيعطي النمط الجيني متمائل الزوجات homozygous CC عصابتين 894bp، 74bp، والنمط متغاير الزوجات heterozygous ثلاث عصابات 968bp، 894bp، 74bp، بينما يعطي النمط الجيني متمائل الزوجات TT عصابة وحيدة غير مقطّعة 968bp.



الشكل (1): العصابات الناجمة عن الهضم بإنزيم SfcI على هلامية الأغاروز 2%، يظهر البئر M واصماً شاهداً Ladder 100bp

الجدول (4): تواتر الأنماط الجينية والأليلات بين مجموعات الدراسة

Genotypes -799C/T	H (N=40)	ChP (N=40)	DM (N=40)	ChPDM (N=60)	P (H v ChP)	P (H v DM)	P (H v ChPDM)
CC	18 (45%)	5 (12.5%)	8 (20%)	9 (15%)	0.0050	0.0552	0.0034
CT	16 (40%)	23 (57.5%)	22 (55%)	33 (55%)			
TT	6 (15%)	12 (30%)	10 (25%)	18 (30%)			
C	52 (65%)	33 (41.25%)	38 (47.5%)	51 (42.5%)	0.0026 OR= 2.645	0.0257 OR= 2.053	0.0018 OR= 2.513
T	28 (35%)	47 (58.75%)	42 (52.5%)	69 (57.5%)	CI= 1.420 to 4.923	CI= 1.106 to 3.932	CI= 1.373 to 4.598

حُدّد العديد من التعددات الشكلية الوظيفية في معزاز promoter جين MMP-8 التي تؤدي لتغير في تسلسل الحمض الأميني للبروتين الناتج وبالتالي تغيير فعالية الأنزيم (Emingil, Han et al. 2014). أعطت هذه المفاهيم مبرراً للدراسة وتحليل الارتباط بين التعددات الشكلية لجين MMP-8 والتهاب النسيج حول السنينة.

وتعدّ هذه الدراسة الأولى في سورية التي تربط بين SNPs في معزاز جين أنزيم MMP-8 و ChP عند المرضى السكريين من النمط الثاني، فكما أن MMP-8 ترتبط بChP، تشير الدراسات إلى أن ارتفاع سكر الدم يرتبط بزيادة فعالية MMP، ما يعطي علاقة إيجابية بين ارتفاع MMP المصلي وتركيز الخضاب الغلوكوزي، ولايزال تأثير السكري على مستويات التعبير عن MMP-8 لدى مرضى التهاب النسيج حول السنينة وعلاقته بمستوى شدة المرض غير معروف (de de Morais, Dantas et al. 2018).

أشارت دراستنا إلى وجود ارتباط قوي بين التعدد الشكلي -799C/T في جين MMP-8 والتهاب النسيج حول السنينة مع أو بدون السكري من النمط الثاني، وأن الأشخاص الذين يحملون الأليل الطافر T أكثر استعداداً للإصابة بChP 2.6 مرة عن حامل الأليل C ($P=0.0026$, $OR=2.645$, $CI=1.420$ to 4.923)، وتزداد احتمالية الإصابة عند مرضى السكري بمرتين ونصف تقريباً ($P=0.0018$, $OR=2.513$, $CI=1.373$ - 4.598)، توافقت دراستنا مع

تشير قيم P لوجود فروق يعنّد بها إحصائياً بين تواترات الأنماط الجينية والأليلات في مجموعة الأصحاء H وكلّ من المجموعات الثلاثة الأخرى، كما تبيّن نسبة الأرجحية OR أنّ الأليل الطافر T يزيد احتمال الإصابة بالتهاب النسيج حول السنينة مع/ أو بدون السكري تقريباً 2.5 مرة أكثر من الأليل C.

المناقشة:

تؤثر التعددات الشكلية SNPs في التهاب النسيج حول السنينة في العديد من الطرق المعقّدة التي تتأزر مع تنوّعات جينية genetic variants أخرى، وعوامل بيئية لزيادة القابلية وتطور المرض، ويعدّ إنزيم MMP-8 كواسم حيوي، يصطنع من الكريات البيضاء المحببة

المتمايزة granulocytes في نقيّ العظم، وتخزن في حبيبات خاصة في العدلات والبلاعم، ويعدّ اصطناع وتفعيل MMP-8 خطوة مهمة في التدرك المرضي للمطرس خارج الخلوي المرتبط بالتهاب النسيج حول السنينة (Rahimi, Zangeneh et al. 2018)، وتعدّ العدلات المصدر الرئيس لأنزيمات الكولاجيناز collagenase MMPs في الأمراض الالتهابية كالتهاب النسيج حول السنينة المزمن ChP، حيث تؤدي دوراً هاماً في آفات تدرك النسيج حول السنينة المتوسطة MMP-8 (Salminen) (2016, Murthykumar, Varghese et al. 2019)، وقد

دراسة Chou et al التي بيّنت وجود فرق إحصائيّ في تواتر الأنماط الجينيّة بين مجموعة الأصحاء و مرضى التهاب النسيج حول السنّة المزمن والجائح في المجتمع التايوانيّ، بينما أظهرت دراستان إحداها على جمهرة في الهند ، والأخرى في التشيك عدم وجود ارتباط أو فرق إحصائيّ في تواتر الأليلات والأنماط الجينيّة بين الأصحاء ومرضى ChP (Murthykumar, Varghese et al.)، على الرغم من أنّ تواجد الأليل 799T- كنمط فرداني مع الأليل C في الموقع +17 من جين MMP-8 يزيد احتمالية الإصابة بشكل ملحوظ (Holla, Hrdlickova et al. 2012).

تفسّر العديد من العوامل التناقضات الملاحظة في هذه الدراسات، إذ تعدّ الاختلافات البيئية والعرقية racial في المجتمعات عاملاً عالي الأهمية، فالتعدّات الشكلية قد تتفاعل مع العوامل البيئية لتؤثر على احتمالية الإصابة بالمرض، وبعض هذه العوامل أساسية في حدوث المرض

كنمط الغذاء، كذلك تؤثر معايير اختيار المجتمع المدروس في النتائج، والحجم الصغير لعينة المرضى والأصحاء. يؤثر التعدد الشكليّ C/799T- في التعبير عن جين MMP-8 بتغيير فعالية المعزاز promoter (Reddy and Rani 2017)، إذ تشير الدراسات في الزجاج إلى أنّ الأليل الطافر T يؤدي لفعالية أعلى للمعزاز أكثر من الأليل C في خلايا مختلفة (Rahimi, Zangeneh et al. 2018)، كما أظهرت بعض الأبحاث من خلال استخدام الرحلان الكهربائي وجود اختلافات في البروتين النووي المرتبط بعديدات النكليوتيد oligonucleotides التي تعبّر عن الأنماط الجينيّة C/799T- (Hu, Chang et al. 2018).

نستنتج من هذه الدراسة أنه يمكن عدّ التعدد الشكليّ - C/799T في معزاز جين MMP-8 أحد العوامل التي تزيد القابلية للإصابة بالتهاب النسيج حول السنّة، وتزداد احتمالية الإصابة عند مرضى السكريّ من النمط الثاني الحاملين لهذا التعدد الشكليّ.

References

1. Chacon-Cortes, D. and L. R. Griffiths (2014). "Methods for extracting genomic DNA from whole blood samples: current perspectives." *Journal of Biorepository Science for Applied Medicine* **2014**(2): 1-9.
2. Costa, P. P., G. L. Trevisan, G. O. Macedo, D. B. Palioto, S. L. Souza, M. F. Grisi, A. B. Novaes Jr and M. Taba Jr (2010). "Salivary interleukin-6, matrix metalloproteinase-8, and osteoprotegerin in patients with periodontitis and diabetes." *Journal of periodontology* **81**(3): 384-391.
3. de de Moraes, E. F., A. N. Dantas, J. C. Pinheiro, R. B. Leite, C. A. G. Barboza, B. C. de Vasconcelos Gurgel and R. de Almeida Freitas (2018). "Matrix metalloproteinase-8 analysis in patients with periodontal disease with prediabetes or type 2 diabetes mellitus: A systematic review." *Archives of oral biology* **87**: 43-51.
4. Emingil, G., B. Han, A. Gürkan, A. Berdeli, T. Tervahartiala, T. Salo, P. J. Pussinen, T. Köse, G. Atilla and T. Sorsa (2014). "Matrix Metalloproteinase (MMP)-8 and Tissue Inhibitor of MMP-1 (TIMP-1) Gene Polymorphisms in Generalized Aggressive Periodontitis: Gingival Crevicular Fluid MMP-8 and TIMP-1 Levels and Outcome of Periodontal Therapy." *Journal of periodontology* **85**(8): 1070-1080.
5. Gu, Y. and M. E. Ryan (2010). *Periodontal Disease and Overall Health: A Clinician's Guide*, Professional Audience Communications.
6. Holla, L. I., B. Hrdlickova, J. Vokurka and A. J. A. o. O. B. Fassmann (2012). "Matrix metalloproteinase 8 (MMP8) gene polymorphisms in chronic periodontitis." **57**(2): 188-196.
7. Hu, P.-S., W.-S. Chang, A.-K. Chou, N.-Y. Hsia, Y.-W. Hung, C.-W. Lin, C.-W. Wu, C.-Y. Huang, M.-F. Wu and C.-H. Liao (2018). "The association of MMP-8 genotypes with pterygium." *in vivo* **32**(1): 41-46.
8. Izakovicova Holla, L., B. Hrdlickova, J. Vokurka and A. Fassmann (2012). "Matrix metalloproteinase 8 (MMP8) gene polymorphisms in chronic periodontitis." *Arch Oral Biol* **57**(2): 188-196.
9. Kornman, K. S. (2008). "Mapping the pathogenesis of periodontitis: a new look." *Journal of periodontology* **79**(8S): 1560-1568.
10. Lahmi, B. (2020). "The prognostic value of MMP-2 and MMP-8 polymorphisms in breast cancer patients".
11. Li, W., Y. Zhu, P. Singh, D. H. Ajmera, J. Song and P. Ji (2016). "Association of common variants in MMPs with periodontitis risk." *Disease markers* **2016**.
12. Lindhe, J., J. Meyle and G. D. o. t. E. W. o. Periodontology (2008). "Peri-implant diseases: consensus report of the sixth European workshop on periodontology." *Journal of clinical periodontology* **35**: 282-285.
13. Lindroth, A. M. and Y. J. Park (2013). "Epigenetic biomarkers: a step forward for understanding periodontitis." *Journal of periodontal & implant science* **43**(3): 111-120.
14. Mariano, F. S., J. d. C. O. Sardi, C. Duque, J. F. Höfling and R. B. Gonçalves (2010). "The role of immune system in the development of periodontal disease: a brief review." *Revista Odonto Ciência* **25**(3): 300-305.
15. Murthykumar, K., S. Varghese and J. V. Priyadharsini (2019). "Association of MMP8 (-799C/T)(rs11225395) gene polymorphism and chronic periodontitis." *Drug invention today* **11**(7).
16. Rahimi, Z., M. Zangeneh, A. Rezaeyan, E. Shakiba and Z. Rahimi (2018). "MMP-8 C-799T and MMP-8 C+17G polymorphisms in mild and severe preeclampsia: Association between MMP-8 C-799T with susceptibility to severe preeclampsia." *Clin Exp Hypertens* **40**(2): 175-178.
17. Reddy, G. S. and H. S. Rani (2017). *Matrix Metalloproteases: Potential Role in Type 2 Diabetic Nephropathy. Pathophysiological Aspects of Proteases*, Springer: 605-616.
18. Rovai, E. S., M. L. S. Souto, J. A. Ganhito, M. Holzhausen, L. Chambrone and C. M. Pannuti (2016). "Efficacy of Local Antimicrobials in the Non-Surgical Treatment of Patients With Periodontitis and Diabetes: A Systematic Review." *Journal of periodontology* **87**(12): 1406-1417.
19. Salminen, A. (2016). "Matrix metalloproteinase 8: genetic, diagnostic, and therapeutic approaches." *Dissertationes Scholae Doctoralis Ad Sanitatem Investigandam Universitatis Helsinkiensis*.
20. Sorsa, T., T. Tervahartiala, J. Leppilähti, M. Hernandez, J. Gamonal, A. M. Tuomainen, A. Lauhio, P. J. Pussinen and P. Mäntylä (2011). "Collagenase) 2-MMP-8) as a point-of-care biomarker in periodontitis

- and cardiovascular diseases. Therapeutic response to non-antimicrobial properties of tetracyclines." Pharmacological Research **63**(2): 108-113.
21. Sorsa, T., L. Tjäderhane and T. Salo (2004). "Matrix metalloproteinases (MMPs) in oral diseases." Oral diseases **10**(6): 311-318.
 22. Teeuw, W. J., V. E. Gerdes and B. G. Loos (2010). "Effect of periodontal treatment on glycemic control of diabetic patients: a systematic review and meta-analysis." Diabetes care **33**(2):427-421 :(
 23. Wang, H., S. Parry, G. Macones, M. D. Sammel, P. E. Ferrand, H. Kuivaniemi, G. Tromp, I. Halder, M. D. Shriver and R. Romero (2004). "Functionally significant SNP MMP8 promoter haplotypes and preterm premature rupture of membranes (PPROM)." Human Molecular Genetics **13**(21): 2659-2669.
 24. Xu, Q.-a., Z.-f. Li, P. Zhang, L.-h. Cao and M.-w. Fan (2016). "Effects of 1, 25-dihydroxyvitamin D3 on macrophage cytokine secretion stimulated by Porphyromonas gingivalis." Japanese journal of infectious diseases **69**(6): 482-487.
 25. Zhang, J., X. Sun, L. Xiao, C. Xie, D. Xuan and G. Luo (2011). "Gene polymorphisms and periodontitis." Periodontology 2000 **56**(1): 102-124.
 26. Zhang, L., X. Li, H. Yan and L. Huang (2018). "Salivary matrix metalloproteinase (MMP)-8 as a biomarker for periodontitis: A PRISMA-compliant systematic review and meta-analysis." Medicine **97**(3).