

# **GENETISK PREDISPOSISJON FOR PERIODONTITT I SAMMENHENG MED ATEROSKLEROTISKE KARDIOVASKULÆRE SYKDOMMER**



**Masteroppgave i odontologi,  
Stud.odont Awais A. Mushtaq, Umair Zia og Temoor Ilyas  
Kull H-07**

**Veiledere: Prof. dr. med. Zlatko Dembic, og PhD-stipendiat  
Zahra Armingohar**



**Institutt for oral biologi, Odontologisk fakultet, UiO**

# Sammendrag

Vi har analysert assosiasjonen av single nukleotid polymorfismer (SNPs) i genene som koder for IL-10, IL-12 subenheten p40, IL-17, og IL-23 reseptor med periodontitt og kardiovaskulære sykdommer. Vi sammenliknet SNPs alleliske og genotypiske frekvenser mellom pasienter med kardiovaskulær sykdom, periodontitt og de som både har periodontitt og kardiovaskulære sykdommer, i et case-case studie. Blant de pasientene som hadde homozygot overordnet allel (GG) av IL10 SNP, var det signifikant høyere antall personer med kardiovaskulær sykdom enn med periodontitt\*. En tendens til signifikans ble observert ved analyse av forskjellen på en rekke GG homozygoter mellom pasienter med både periodontitt og kardiovaskulære sykdom, og pasienter med kun kardiovaskulær sykdom. Disse resultatene kan tyde på en assosiasjon av IL10 genpolymorfisme med periodontal sykdom.

\*Resultatene av dette studiet vil bli publisert i en tidsskrift og presentert mer omfattende.

**Nøkkelord:** IL10, IL12B, IL17, IL23R, kardiovaskulær sykdom, periodontitt, SNP, genotype



# Forord

I mai 2011 startet vi å forske ved Institutt for oral biologi. Vi deltok på et påbegynt prosjekt med PhD-stipendiat Zahra Armingohar og professor dr. med. Zlatko Dembic som veileder. Dette var en kontrollstudie om kronisk periodontitt i sammenheng med aterosklerotisk kardiovaskulære sykdommer. De hadde allerede begynt å studere predisposisjon av disse to sykdommene ved å analysere genetiske polymorfismer i gener for proinflammatoriske cytokiner som IL-1, TNF-a og IL-6. Prosjektet foregår i samarbeid med professor Ingar Olsen (IOB, UiO) og professor Jørgen J. Jørgensen (Oslo Universitetssykehus, Aker)

Vi synes dette var et veldig spennende prosjekt og ønsket derfor å skrive vår masteroppgave relatert til denne forskningen. Periodonti er et interessant fagemne, særlig med tanke på dets relasjon til resten av kroppen og andre viktige systemer som hjerte- og karsystemet. Vi er opptatt av at en som tannlege ser på hele pasienten, ikke bare munnhulen som en adskilt del fra resten av kroppen. Dette er en betydningsfull faktor for at vi valgte å skrive vår masteroppgave om dette emnet. I tillegg finner vi det lærerikt og nyttig å få vite litt mer om hvilke genetiske faktorer som er avgjørende for utviklingen for sykdommen.

Til slutt ønsker vi å benytte anledningen til å takke våre veiledere – Professor dr. med. Zlatko Dembic og PhD-stipendiat Zahra Armingohar – for å ha latt oss delta i et spennende prosjekt og for all hjelp vi har fått underveis.

# Innholdsfortegnelse

|          |                                                |             |
|----------|------------------------------------------------|-------------|
| <b>1</b> | <b>Forkortelser</b> .....                      | <b>s.4</b>  |
| <b>2</b> | <b>Innledning</b> .....                        | <b>s.5</b>  |
| <b>3</b> | <b>Bakgrunn og teori</b>                       |             |
|          | 3.1 Hva er periodontitt?.....                  | <b>s.7</b>  |
|          | 3.2 Hva er CVD?.....                           | <b>s.9</b>  |
|          | 3.3 Sammenheng mellom periodontitt og CVD..... | <b>s.11</b> |
|          | 3.4 Interleukin – 10.....                      | <b>s.14</b> |
|          | 3.5 Interleukin – 12.....                      | <b>s.16</b> |
|          | 3.6 Interleukin – 17.....                      | <b>s.18</b> |
| <b>4</b> | <b>Materiale og metode</b>                     |             |
|          | 4.1 Mål.....                                   | <b>s.20</b> |
|          | 4.2 Material og metode.....                    | <b>s.21</b> |
|          | 4.3 Real time PCR.....                         | <b>s.23</b> |
|          | 4.4 TaqMan.....                                | <b>s.26</b> |
| <b>5</b> | <b>Resultat</b> .....                          | <b>s.27</b> |
| <b>6</b> | <b>Diskusjon</b> .....                         | <b>s.29</b> |
| <b>7</b> | <b>Konklusjon</b> .....                        | <b>s.31</b> |
| <b>8</b> | <b>Referanser</b> .....                        | <b>s.32</b> |

# 1 Forkortelser

BOP – Bleeding on probing

CHD – Koronal hjertesykdom

CP – Kronisk periodontitt

CRP – C-reaktivt protein

CSIF – Cytokin-syntese hemmende faktor

CVD – Kardiovaskulær sykdom

GM-CSF – Granulocyte/macrophage colony stimulating factor

IL – Interleukin

IFN- $\gamma$  – Interferon-gamma

IOB – Institutt for Oral Biologi

LDL – Low density lipoprotein

HDL – High density lipoprotein

mRNA – messengerRNA

MHC – Major histocompatibility complex

NF- $\kappa$ B – nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells

PAD – Perifer artriell sykdom

PCR – Polymerase kjedereaksjon

SNP – Single nukleotid polymorfisme

TGF – Transforming growth factor

Th – T-hjelpecelle

TR – T-regulatorisk



## 2 Innledning

Det er sterke bevis for at genetiske-, på lik linje med miljømessige faktorer, påvirker utviklingen av kroniske sykdommer, som periodontitt. Dette i tillegg til en rekke tegn på at aggressiv og kronisk form av sykdommen har samme genetisk predisposisjon. Det er en T-celle drevet immunologisk sammenheng mellom periodontitt og arteriosklerose <sup>[1]</sup>. En økende antall studier har vist at arteriosklerose er en kroniske betennelsessykdom. Cytokiner, som interleukiner, er viktige mediatorer og modulatorer av inflammasjoner, så vel som av spesifikke immunreaksjoner, som T- og B-celle reaksjoner. Medfødte celler av myelocytisk-lymfoid opprinnelse som dendritiske celler, makrofager, granulocytter og mastceller, skiller ut en rekke inflammatoriske mediatorer inkludert IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-6.

Noen ganger vil medfødte immunceller som monocytter og mastceller skille ut IL-10. Det er også spesifikke T-celle undergrupper som kan produsere og skille ut IL-10: Th2, Th3, Tr1 og CD4+CD25+Foxp3+ regulatoriske T celler (Tregs). Uttrykket av IL-10 er regulert av seg selv, IL-4 eller av TGF $\beta$ . Det er fortsatt uklart eksakt hvordan dette skjer. Det er mulig at ulike vevsrelaterte hendelser under initieringen av den spesifikke antigendrevete immunresponsen kan forårsake variable reaksjoner fra dendritiske celler og makrofager som til slutt kan føre til enten aktivering (produksjon av stimulerende cytokiner) eller inaktivering (undertrykkelse via IL-10, TGF- $\beta$  og/eller celle-celle kontakt) av immunresponsen.

IL-17er et velkjent mobiliserende cytokin for nøytrofile leukocytter. Bare en spesifikk T-celle undergruppe skiller ut IL-17, og har fått det tilsvarende navnet Th17. Uttrykket av IL-17 er regulert av enten IL-23 eller TGF- $\beta$  og IL-6 som utskilles under initiering av den spesifikke immunresponsen ved dendritiske celler og makrofager, såkalte antigen-presenterende celler. Det er mulig at en del av IL-23 også er produsert av en annen type celle. Sannsynligvis skjer dette tidlig i immunresponsen og vil dermed forvrengte responsen på en annen type inflammatorisk respons.

De medfødte immuncellers uttrykk kan oppreguleres ved at IFN- $\gamma$  skilles ut av Th1. Denne generasjonen av Th1 er regulert av cytokinet IL-12, som skilles ut under initiering av den spesifikke antigendrevne immunresponsen ved dendritiske celler og makrofager.

IL-10 er en homodimerisk glykoprotein med mange virkningsmekanismer. Oppsummert kan vi si at IL-10, i overensstemmelse med TGF- $\beta$  kan hemme inflammasjon og regulere utvikling av alle andre T-celle undergrupper.

Cytokin genpolymorfismer kan ha en innvirkning på følsomheten og progresjon av kronisk periodontitt. Genpolymorfismer av IL-10 genotyper (-592C>A, -819C>T og -1082G>A), er assosiert med periodontitt.<sup>[2-4]</sup> Ingen slik assosiasjonen er funnet ved CVD og periodontitt.

IL-12 er en heterodimer glykoprotein bestående av p40 og p35 subenhetene. Celler fra det medfødte immunforsvaret trenger ikke nødvendigvis å produsere begge subenhetene, noe som gjør det interessant vedrørende regulering av IL-12s handlinger. En annen enhet, kalt p19 (en del av IL-23) kan assosieres med p40 subenheten og danne IL-23, som har et helt annet sett av handlinger (den kan generere IL-17 som pro-inflammatorisk respons). Siden p19 også kan produseres separat, kan disse subenhetene samles ekstracellulært under fortsatt ukjente forhold, og dermed gjøre en endring i den inflammatoriske responsen (fra Th1 - IFN $\gamma$  type til Th17 - IL-17 type) av en organisme. Senere har man funnet at TGF- $\beta$  sammen med IL-6 kan også stimulere utvikling av Th17 undergruppe.

IL-23 i seg selv er en heterodimerisk glykoprotein bestående av p40 og p19 subenheter. p40 deles med IL-12, og disse to cytokinene deler også halvparten av sine heterodimeriske reseptorer.

En SNP i IL-12 genotyper (1188 A/C) har vært assosiert med en endret produksjon av cytokiner. Derfor kan de være en indikasjon på forekomsten av kronisk periodontitt eller i kombinasjon med CVD, til tross for de ikke var forenelig med kronisk periodontitt i den tyske befolkningen<sup>[5]</sup>. Imidlertid ble en annen genetisk variant, SNP, av IL-12B i posisjon +16974 assosiert med følsomhet for kronisk periodontitt<sup>[3]</sup>. Ingen resultat ble imidlertid rapportert for genetisk risiko som påvirker kombinasjonen av CP og CVD.



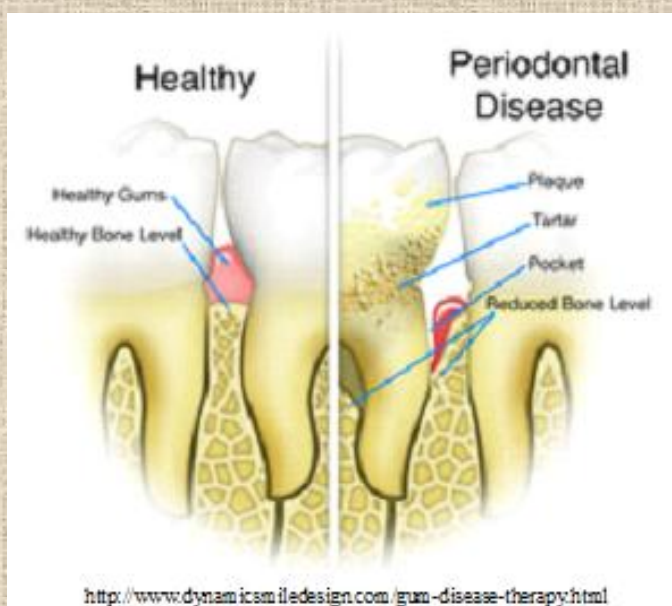
## 3 Bakgrunn og teori

### 3.1 Hva er periodontitt?

Periodontitt er en inflammatorisk sykdom som rammer periodontiet – vevet som fungerer som feste, og omgir tennene.<sup>[6]</sup> Periodontiet består av gingiva, periodontale ligamenter, rotsement og alveolært ben.<sup>[7]</sup> Inflammasjon i periodontitet oppstår ved plakkdannelse, hvor mikrobielle produkter initierer til betennelsen i tannkjøtt. Dette karakteriseres som gingivitt. Gingivitt kan vedvare i mange år uten å medføre tap av periodontalt feste, ødeleggelse av periodontale ligamenter, eller bentap.<sup>[8]</sup> I motsetning til gingivitt, som er reversibel, er periodontitt irreversibel og ødelegger altså festet for tennene. Marginal periodontitt og gingivitt er to ulike sykdommer.<sup>[9]</sup> Tidligere trodde man at enhver ubehandlet gingivitt ville føre til periodontitt, noe som ikke stemmer.

Periodontitt er en multifaktoriell tilstand. Bakterier starter en prosess, men immunforsvaret står for mye av destruksjonen av feste og ben rundt tannen. De ulike risikofaktorene har også innvirkning på denne prosessen.<sup>[10]</sup> Bakteriene som hovedsakelig forbindes med periodontitt er *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans*, og *T. forsythia*.<sup>[11]</sup>

Man får ikke periodontitt uten at plakk er tilstede subgingivalt. Dentalt plakk er en biofilm som består av ca. 700 ulike arter. Biofilm er naturlig forekommende, tredimensjonale samfunn av mikroorganismer som vokser på overflater i en matriks. Gingivitt og periodontitt



er tilstander hvor den normale bakteriefloraen koloniserer som dentalt plakk og er essensielt for utvikling av sykdommen. Plakk består av mikrobielle mikrokolonier som er omgitt av en ekstracellulær matriks.<sup>[12]</sup> Allerede etter 24 timer med eksponering av plakk på rotoverflaten kan man se mikroskopiske forandringer som viser inflammasjon. Hvis det blir værende nok plakk, utvikler det seg til gingivitt i løpet av 3 uker. Dette kan



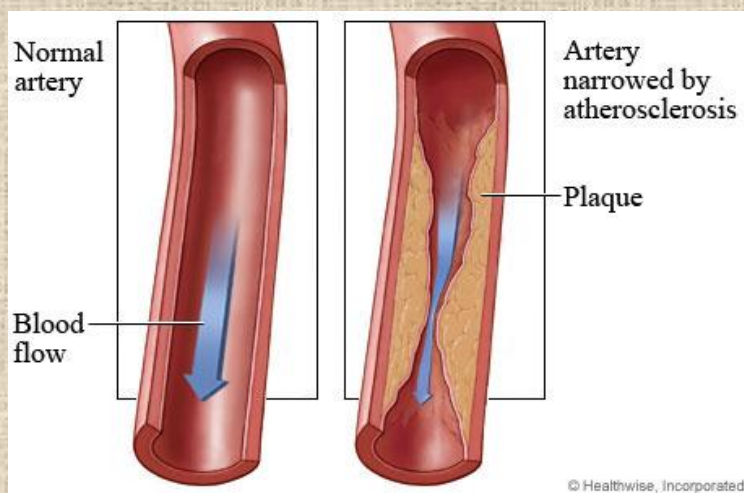
ses klinisk som rødhet, økt utsivning av gingival væske og blødning ved sondering.<sup>[8]</sup>  
Hvordan verten responderer på plakk, avhenger av immunresponsen.

Mennesker er ulike med tanke på mottagelighet av periodontal sykdom. Riskofaktorene kan karakteriseres som mikrobielle-, systemiske-, lokale- og miljøbetingede.<sup>[10]</sup> De vanligste risikofaktorene er røyking (miljøbetinget) og diabetes (systemisk), i tillegg til genetikk. Vi har valgt å vektlegge det genetiske aspektet, og har fokusert på spesifikke polymorfismer for gener som kontrollerer produksjonen av cytokiner involvert i inflammasjonsreaksjonen.

### 3.2 Hva er kardiovaskulær sykdom?

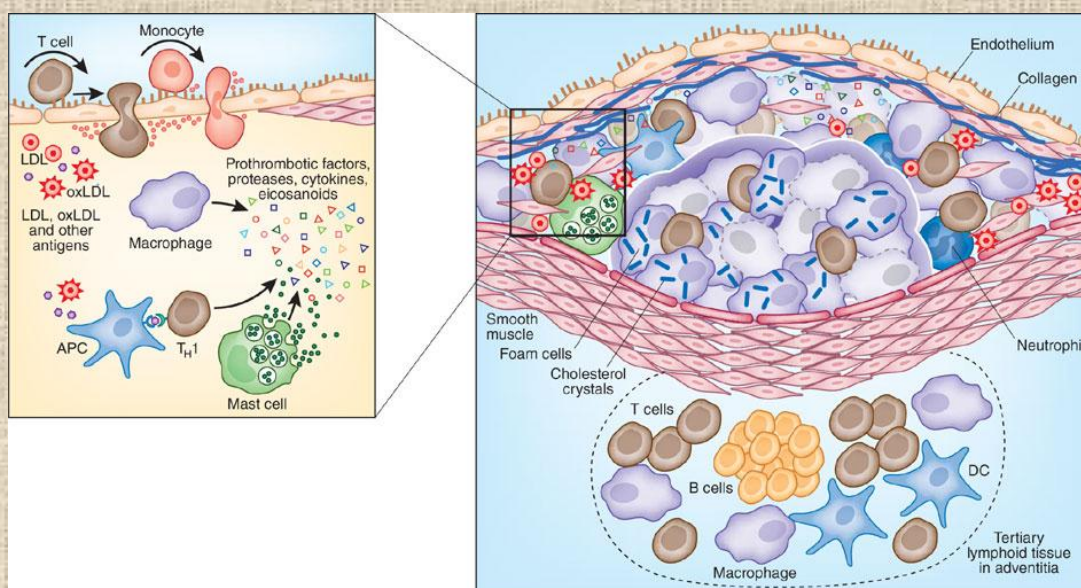
Kardiovaskulære sykdommer er et annet ord for hjerte- og karsykdom hvor åreforkalkning nedsetter blodstrømmen til ulike organer i kroppen. CVD er ikke én enkel tilstand, men en samling sykdommer som påvirker hjertet og blodkarene, altså vaskulært <sup>[13]</sup>.

Aterosklerose er en tilstand hvor arterieveggen blir fortykket grunnet akkumulasjon av fettholdige stoffer, som kolesterol og hvite blodceller. Denne inflammasjonsprosessen i arterieveggene vil kunne føre til nedsatt sirkulasjon og oksygen tilførsel, og komplikasjoner som koronarkarsykdom, hjertesvikt og slag.



Aterosklerotiske lesjoner inneholder makrofager, T-celler og andre celler i immunforsvaret som sammen med kolesterol infiltrerer fra blodbanen. Medfødte og adaptivt immunrespons er blitt identifisert i aterosklerose. Komponenter av LDL utløser betennelse, T-celle

aktivering og antistoff produksjon i løpet av sykdomsforløpet.



[http://www.nature.com/ni/journal/v12/n3/fig\\_tab/ni.2001\\_F1.html](http://www.nature.com/ni/journal/v12/n3/fig_tab/ni.2001_F1.html)



Kjente eller tilknyttete årsaker til hjerte- og karsykdommer omfatter usunne forhold til de to minste lipoproteiner - LDL og HDL, som hyperlipidemi, inkludert hyperkolesterolemi, forhøyet blodsukker, dvs. diabetes mellitus, og øvre normal og høyt blodtrykk (hypertensjon).

Kardiovaskulære sykdommer er hovedårsaken til sykdom og død i Europa og utgjør 23 % av hele sykdomsbyrden, og er den nest største årsaken til sykdomsbyrden i EU <sup>[14]</sup>. Ifølge verdens helseorganisasjon (WHO), dør 16,7 millioner mennesker på verdensbasis av CVD hvert år <sup>[15]</sup>. CVD forårsaker nesten halvparten av alle dødsfall i Europa - 49 %, noe som utgjør over 4,3 millioner dødsfall hvert år <sup>[16]</sup>. I Europa dør én av fire menn - 26 % og én av seks kvinner – 17 % - av CVD før de er 75 år <sup>[17]</sup>.

Makrofager spiller en sentral rolle i alle stadier av aterosklerose <sup>[18]</sup>. De er svært viktig kilde til cytokinproduksjon i aterosklerotiske lesjoner <sup>[19]</sup> og kan produsere proinflammatoriske cytokiner som TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-12, IL-15, IL-18, samt anti-inflammatoriske cytokiner som IL-10 og TGF- $\beta$ .

Gjennom en rekke studier er det dokumentert at proinflammatoriske cytokiner kan fremme utvikling av aterosklerose <sup>[20]</sup> mens anti-inflammatoriske cytokiner som TGF- $\beta$  og IL-10 <sup>[21]</sup> kan ha en anti-aterogenisk effekt.

Ubalansen mellom pro- og anti-inflammatoriske krefter påvirker plakkforstyrrelse og tilbakevendende kardiovaskulære hendelser med en dreining mot Th1 dominans sett i pasienter med åreforkalkning <sup>[22]</sup>.

### 3.3 Sammenheng mellom periodontitt og CVD

Det er flere ulike teorier for sammenheng mellom periodontitt og CVD. Patogener som i *E.coli* og *Helicobacter pylori* er blitt knyttet til aterosklerose og kardiovaskulære sykdommer<sup>[28]</sup>. Periodontitt ser også ut til å forstyrre systemisk homeostase, men en direkte sammenheng mellom periodontitt og kardiovaskulære sykdommer er ennå ikke klarlagt på lik linje.

Periodontitt vil føre til kronisk skade av epiteliat vev, ulcerering i periodontale lommer, og dermed tilgang til blodbanen<sup>[27]</sup>. Bakterier og deres toksiner, lokalisert vevsrespons med cytokiner (proteiner som regulerer andre celler i blodet), og flere andre mediatorer for inflammasjon kan sammen forstyrre homeostase når toksiner får tilgang til systemisk sirkulasjon<sup>[28]</sup>.

Risikofaktorer for periodontitt kan deles inn i to grupper: Ikke-modifiserbare eller modifiserbare<sup>[29]</sup>. Siden ikke-modifiserbare risikofaktorer, for eksempel økende alder eller genetik ikke kan endres, vil de forbli potensielle årsaker til sykdomsutvikling hos individet. Imidlertid kan en redusere sannsynligheten for å utvikle sykdommen ved å kontrollere modifiserbare risikofaktorer, slik som vekt, mangel på mosjon, kolesterolnivå, natrium inntak og røyking. Ikke alle individer med periodontal infeksjon er i like store faresone for utvikling av CVD, ettersom disse sykdommene har en multifaktoriell opprinnelse. Risikoen kan endres av miljømessige eller genetiske faktorer. For eksempel kan røyking eller fedme forverre prognosen, mens en gunstig genetisk profil kan redusere ømfintlighet.

I en studie ble 94 pasienter som var systemisk friske, men som hadde alvorlig generalisert periodontal sykdom undersøkt. Disse pasientene hadde periodontale lommer dypere enn 6 mm og tap av marginal alveolarben større enn 30 % som påvirket 50 % eller mer av tannsettet<sup>[27]</sup>. De målte nivå av CRP, en følsom markør for inflammatorisk status og en prediktor for fremtidige kardiovaskulære hendelser f.eks. atherogenesis<sup>[23]</sup>. Mer alvorlig og utbredt periodontitt gir økt risiko for CRP-assosiert CVD.

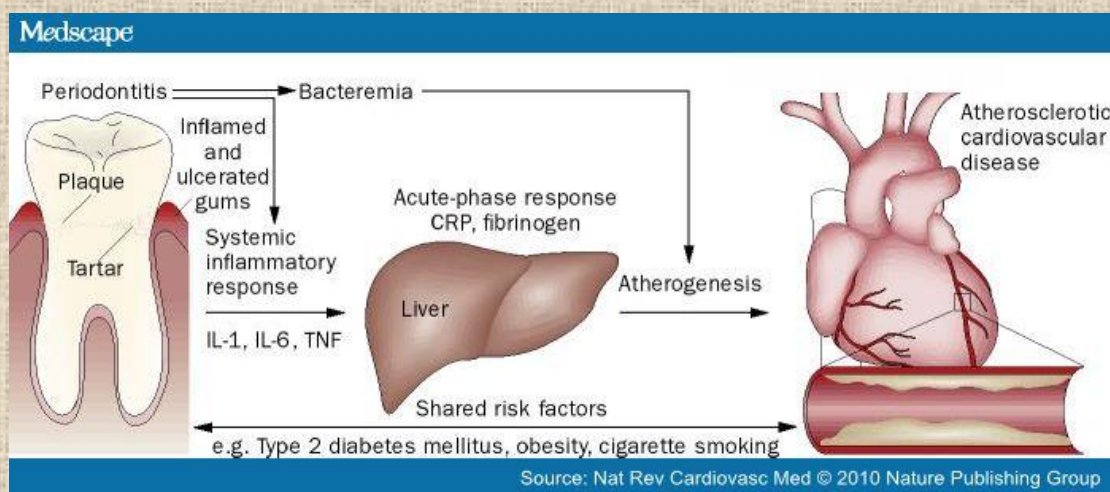
Slag er en manifestasjon av CVD. I en studie studerte forskerne 173 pasienter som hadde hatt slag, og oppdaget at 41,3 % var seropositive for *A. actinomycetemcomitans*, mot bare 29,3 % av en kontrollgruppe<sup>[26]</sup>. Seropositiviteten til *P. gingivalis* var 79,7 % hos slagpasienter versus 70,2 % hos dem uten historie med slag. De konkluderte med at pasienter med periodontal sykdom vil ha 1,6 ganger større sannsynlighet for å oppleve slag.



I en annen studie ble 88 pasienter som nylig hadde gjennomgått akutt hjerteinfarkt og en tilsvarende gruppe uten en sykehistorie med akutt hjerteinfarkt undersøkt<sup>[30]</sup>. De oppdaget en sterk kobling mellom en sykehistorie med akutt hjerteinfarkt og fem periodontale risiko faktorer: prosentandelen av stedene med BOP, antall lommer med dybde på 6 mm eller mer, antall tenner tapt og andelen mesiale/distale områder med betydelig tap av beinnivå målt med avstand målt fra emalje-cement grensen til det marginale bennivået.

Flere studier har undersøkt sammenhengen mellom periodontal sykdom og CHD, en underkategori av CVD. I en studie forklarte forskerne at CHD er antatt å være forbundet med forhøyede nivåer av systemiske inflammatoriske faktorer (CRP, leukocytter, fibrinogen, homocystein), og hemostatiske faktorer (von Willebrands faktor, fibrin D-dimer, plasminogen aktivator hemmer type I, og serum antistoffer mot oksidert LDL)<sup>[31]</sup>. De fastslo senere at dårlig tannhelse økte nivåer av leukocytter, von Willebrands faktor, anti-Ox-LDL, og plasminogen aktivator hemmer type 1. Dermed utredet de at dårlig tannhelse økte risikoen for CHD. I en annen studie fastslo forskerne at periodontal sykdom er assosiert med utbredt CHD, men bare når pasientene også hadde tap av tenner<sup>[25]</sup>. I en meta-analyse av forholdet mellom periodontale sykdommer og CHD, oppdaget forskerne at periodontal sykdom øker risikoen for både CHD og cerebrovaskulære sykdommer<sup>[24]</sup>.

Aterosklerose gir PAD og kan også føre til CHD og slag. Forskerne innså at en hypotetisk periodontal kobling til de to sistnevnte vil naturligvis føre til den konklusjon at periodontitt også ville øke risikoen for PAD. En gruppe fulgte 45,136 helsearbeidere i 12 år for å avgjøre om et slikt forhold var til stede<sup>[32]</sup>. De oppdaget at tanntap var assosiert med PAD, spesielt når tapet skyldes periodontal sykdom.



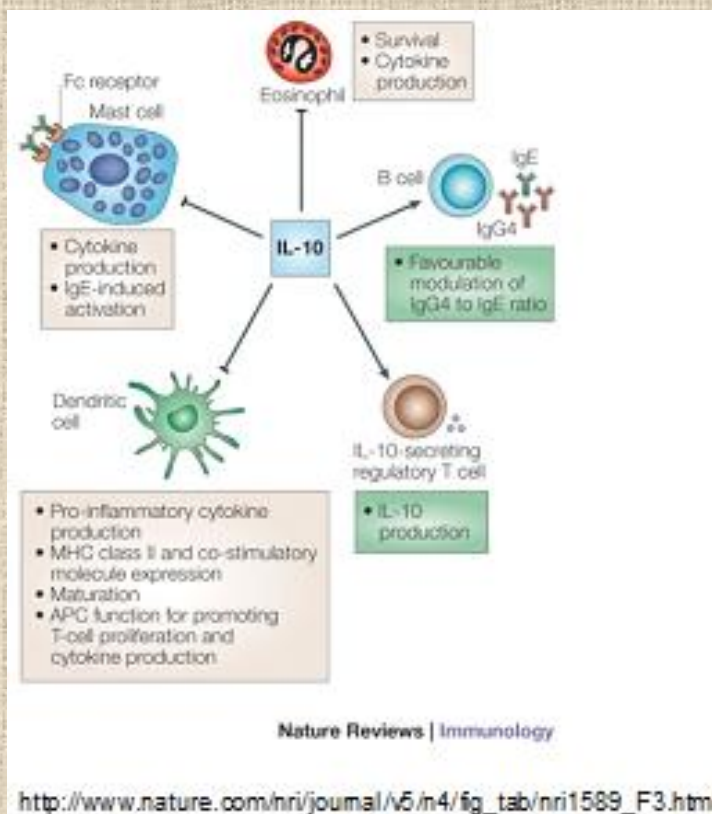
Tannleger møter pasienter som ikke jevnlig søker rutinemessig tannpleie. Det er viktig å gjøre disse pasientene oppmerksomme på at deres helserisiko synes å være utvidet utover de orale helseplager. Ifølge mange forskere, kan periodontitt være en signifikant assosiasjon for flere typer CVD, med potensial for å redusere livskvaliteten eller forkorte det betydelig. God oral helse kan muligens redusere risikoen for tidlig uførhet og død.



### 3.4 Interleukin 10

Interleukin 10 (IL-10) også kjent som cytokin-syntese hemmende faktor (CSIF), er et anti-inflammatorisk cytokin. Hos mennesker er IL-10 kodet av IL10-genet. <sup>[33]</sup>

IL-10 er produsert hovedsakelig av monocyter og i mindre grad av lymfocytter. Dette cytokinet har en pleiotropisk effekt i immun-reguleringen og i betennelser. Den nedregulerer uttrykket av Th1 cytokiner, MHC klasse II antigener, og kostimulatoriske molekyler på makrofager.



IL-10 er også i stand til å hemme syntesen av proinflammatoriske cytokiner som IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-3, TNF- $\alpha$  og GM-CSF laget av celler som makrofager og regulatoriske T-celler. Den viser også en potent evne til å undertrykke antigen-presentasjon kapasiteten på antigenpresenterende celler. IL-10 er også stimulerende mot visse T-celler og mastceller og stimulerer B-celle modning og antistoffproduksjon.

IL-10 kan blokkere NF- $\kappa$ B aktivitet, og er involvert i reguleringen av

JAK-STAT signalveien. Knockout studier på mus antydde funksjonen til dette cytokinet som en vesentlig immunoregulator i tarmkanalen. <sup>[34]</sup> Pasienter med Crohns sykdom reagerer gunstig mot behandling med bakterier som produserer rekombinant IL-10. Dette viser viktigheten av IL-10 for å motvirke overdreven immunitet i menneskekroppen. <sup>[35]</sup>

Ifølge en studie førte overuttrykket IL-10 lokalt, systemisk, eller ved aktiverte T-celler, til å redusere ateroskleroseutvikling i musmodeller, <sup>[36]</sup> og at IL-10 mangelfulle mus raskere utviklet plakk sammenlignet med kontrollgruppens mus. <sup>[37]</sup>

Ifølge en annen studie er sirkulerende nivåer av betennelsesdempende IL-10 positivt assosiert med risiko for hjerte- og karsykdom hos eldre uten forutgående CVD hendelser, men assosiasjon er mindre tydelig i de med en historie av CVD. <sup>[38]</sup>



### 3.5 Interleukin 12

Interleukin12 (IL-12) er en interleukin som er produsert av dendrittske celler<sup>[39]</sup>, monocytter, makrofager og nøytrofile granulocytter i respons på vevskade og patogene mikroorganismer eller av en undergruppe av T celler pga antigenstimulering.

IL-12 er involvert i differensiering av naive CD4+ T-celler til Th0 cellene, som videre utvikles inn i enten Th1- eller Th2-celler. IL-12 er kjent som en T-cellestimulerende faktor, som stimulerer vekst og funksjon av Th1-celler sammen med IFN- $\gamma$ . IL-12 stimulerer produksjonen av IFN- $\gamma$  og TNF- $\alpha$  fra T- og NK-celler og reduserer IL-4 mediert hemming av IFN- $\gamma$ . T-celler som produserer IL-12 har en koreseptor, CD30, som er forbundet med IL-12 aktivitet.

IL-12 spiller en viktig rolle i handlingene til NK-celler og T-lymfocytter. IL-12 formidler forbedring av cytotoxisk aktivitet av NK-celler og CD8 + cytotoxiske T-lymfocytter. Det synes også å være en forbindelse mellom IL-2 og signaltransduksjon av IL-12 i NK-celler. IL-2 stimulerer til uttrykk av to IL-12 reseptorer: IL-12R- $\beta$ 1 og IL-12R- $\beta$ 2, samt å opprettholde uttrykk for et kritisk protein involvert i IL-12 signalering i NK-celler. Forbedret funksjonell respons er demonstrert av IFN- $\gamma$  produksjon og nekrose av målcellene.

IL-12 har også anti-angiogenisk effekt, altså den kan blokkere dannelsen av nye blodkar. Den gjør dette direkte og også indirekte ved å øke produksjonen av IFN- $\gamma$ , som igjen øker produksjonen av en kjemokin kalt induserbar protein-10 (IP-10). IP-10 formidler deretter dens anti-angiogenisk effekt.

IL-12 er knyttet til autoimmunitet (reumatoid artritt, type I diabetes mellitus, multipel sklerose og Crohn's sykdom). Administrasjon av IL-12 til folk som lider av autoimmune sykdommer har vist seg å forverre autoimmune fenomener. Dette antas å skyldes dens nøkkelrolle i induksjon av Th1 immunreaksjoner. Motsetning til i IL-12 genet knock-out på mus eller en behandling av mus med IL-12 spesifikke antistoffer hvor man ser forbedring av sykdommen.

[40]

En studie, utført ved Graduate Institute of Dental Science i Taiwan, viser at blant ikke-røykere og ikke-alkohol-drikkere er den totale mengden av IL-12 signifikant høyere ved kronisk periodontitt enn ved gingivitt eller friskt tannkjøtt. Studiene viser også at områdene med periodontitt eller gingivitt har en signifikant høyere total mengde IL-12 enn de friske. Altså

kan IL-12 være relatert til patogenesen av periodontal sykdom. <sup>[41]</sup> Dette er likevel imidlertid ikke klart, noe som gjør det interessant å forske på dette cytokinet.



### 3.6 Interleukin 17

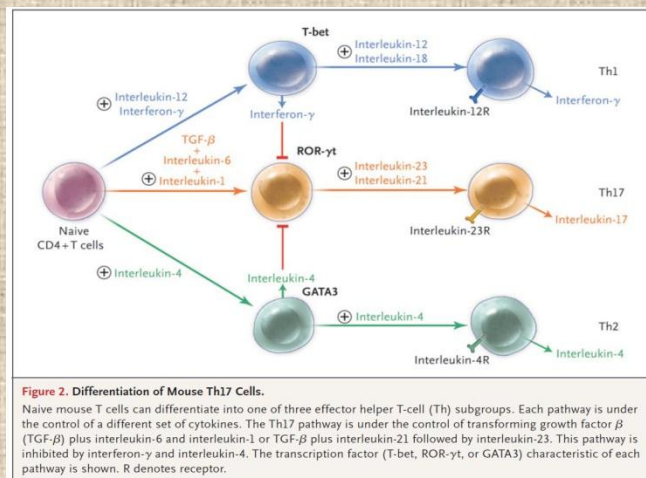
Interleukin 17 er et cytokin som fungerer som en potent mediator i forsinkende reaksjoner ved å øke kjemokinproduksjon i ulike vev for å rekruttere, i likhet med IFN- $\gamma$ , monocytter og nøytrofile til det betente stedet. IL-17 er produsert av T-hjelpeceller og er induisert av IL-23 eller TGF- $\beta$  og IL-6 som resulterer i destruktiv vevsskade i forsinkende reaksjoner <sup>[42]</sup>. Som en familie fungerer IL-17 som et proinflammatorisk cytokin. Den responderer til invasjonen av patogene mikroorganismer og inducerer ødeleggelse av patogenets cellulær-matrix. IL-17 virker synergistisk med TNF og IL-1 <sup>[43]</sup>.

For å trigge fram dens funksjoner, binder IL-17 (A eller F) til celleoverflate reseptor kalt IL-17RA

Tallrike immunregulatoriske funksjoner er rapportert for IL-17, antageligvis på grunn av deres induksjon av mange immunsignalmolekyler. Den mest

bemerkelsesverdige rollen til IL-17 er indusering og formidling av proinflammatoriske responser, og er vanligvis forbundet med allergiske reaksjoner. IL-17 induserer produksjon av mange andre cytokiner (som IL-6, G-CSF, GM-CSF, IL-1 $\beta$ , TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ ), kjemokiner (inkludert IL-8, GRO- $\alpha$ , og MCP-1), og prostaglandiner (f.eks PGE2) fra mange celletyper (som fibroblaster, endotelceller, epitelceller, keratinocytter og makrofager). Økning i uttrykket av kjemokiner tiltrekker andre celler, inkludert nøytrofile, men ikke eosinofile. IL-17s funksjon er også avgjørende for en undergruppe av CD4 + T-celler som kalles Th17. Som et resultat av disse rollene, har IL-17 familien vært knyttet til mange immunrelaterte/autoimmune sykdommer inkludert revmatoid artritt, astma, lupus og anti-tumor immunitet <sup>[43]</sup>.

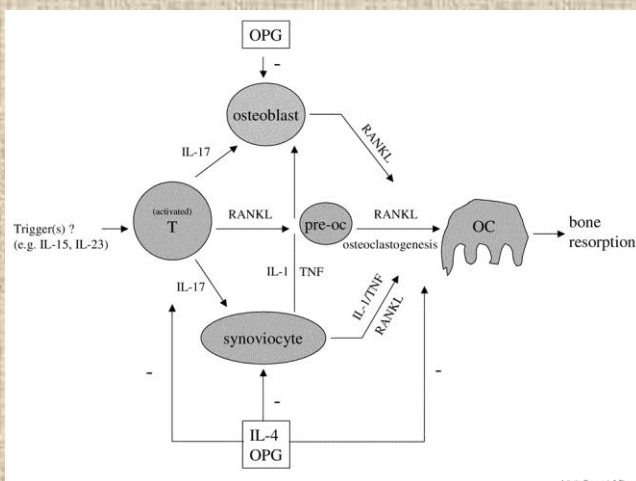
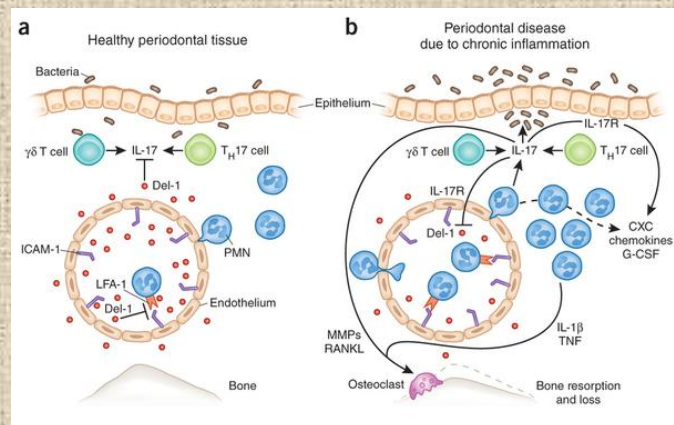
Hvert medlem av IL-17 familie har et bestemt mønster av cellulær uttrykket. Uttrykket av IL-17A og IL-17F synes å være begrenset til en liten gruppe av aktiverte T-celler, og oppregulert under betennelse. IL-17B er uttrykt i flere perifere vev og immune vev. IL-17C er også svært oppregulert i inflammatoriske tilstander. IL-17D er høyt uttrykt i nervesystemet og i skjelettmuskulatur, mens IL-17E er funnet med lave nivåer i ulike perifere vev. <sup>[45]</sup>



Mye forskning har blitt gjort for å forstå reguleringen av IL-17. Aggarwal et al. viste først at produksjonen av IL-17 var avhengig IL-23 [46]. Senere oppdaget en koreansk gruppe at STAT3 og NF- $\kappa$ B signalveier er nødvendig for at denne IL-23-medierte IL-17 produksjon [47]. Samsvar med dette funnet, viste Chen et al. at et annet molekyl, SOCS3, spiller en viktig rolle i IL-17 produksjon [48]. Andre forskere mener IL-17 induksjon er uavhengig av IL-23. Flere grupper har identifisert måter å inducere IL-17 produksjon både in vitro [49] og in vivo [50] [52] av bestemte cytokiner, TGF- $\beta$  og IL-6, uten behov for IL-23 [49] [50] [51]. Selv om IL-23 ikke er nødvendig for IL-17 uttrykk i denne situasjonen, kan IL-23 spille en rolle i å fremme overlevelse og proliferasjon av IL-17 produserende T-celler. Nylig fant Ivanov et al. at thymus spesifikk kjernefysiske reseptor, ROR- $\gamma$ , regisserer differensiering av IL-17-produserende T-celler [52].

Denne IL-17 reseptor familien består hovedsakelig av fem, bredt fordelte reseptorer som representerer ulike ligandspesifisiteter. Innenfor denne familien av reseptorer, er IL-17R mest studert. IL-17R binder både IL-17A og IL-17F og uttrykkes i flere vev: vaskulære endotelceller, perifere T-celler, B-celle linjer, fibroblast, lunge, myelomonocytiske celler, og stromale celler i ben-marg [44] [53] [54].

Interleukin-17 (IL-17) er som tidligere nevnt produsert av aktiverte T-celler, og dette cytokinet kan inducere både inflammatoriske responser og støtte immunreaksjoner (Th1). I tillegg kan det stimulere osteoklastisk benresorpsjon i kombinasjon med reseptor-aktivator av NF-kappaB (RANK) og RANK ligand (RANKL). Disse biologiske funksjoner er relevante



for patogenesen av periodontitt. IL-17 kan bli produsert i periodontale lesjoner og kan være involvert i Th1 modulasjon. Det kan forberede betennelsesreaksjoner via gingivale fibroblast-deriverte mediatorer i periodontal sykdom. Dermed har IL-17, sammen med andre cytokiner, en potensiell rolle i patogenese av periodontal sykdom.



## 4 Materiale og metode

### 4.1 Mål

Målet med forskningen er å studere genetisk predisposisjon for periodontitt i kombinasjon med aterosklerotisk kardiovaskulær sykdom. Vi ønsker å undersøke personer med kronisk periodontitt, i kombinasjon med kardiovaskulære sykdommer, sin forekomst av funksjonelle polymorfismer innen fire gener involvert i immunforsvaret. Tidligere i dette prosjektet har funksjonelle gen polymorfismene i IL1A, IL1B, IL6, og TNF- $\alpha$  blitt undersøkt.

Vi ønsker å utvide den påbegynte forskningen ved å øke antall kandidatgener og analysere en ny gruppe cytokiner - IL-23(78790 G>A), IL-17(-197 G>A) - som stimulerer betennelser og kan føre til en betennelsesreaksjon forskjellig fra en IL-1/TNF-drevet reaksjon. Et eksempel på det kan være at cytokinene stimulerer betennelser og kan føre til økt positiv feedback etter en tidligere inflammatorisk respons. Dette er en uspesifikk immunrespons. Det ble også nylig funnet at disse cytokinene spiller en rolle i periodontitt <sup>[55,56]</sup>. Forskningen utvides også med IL-10, som undertrykker betennelse og kan være involvert i nedregulering av inflammatorisk respons av både IL-1/TNF type (Th1) og IL-17 type (Th17).

I tillegg ønsker vi også å undersøke sammenhengen mellom loci som koder pro-Th1 genererende cytokiner (IL-12), pro-Th17 genererende cytokiner (IL-23) og uttrykket av periodontitt med eller uten kardiovaskulære funksjoner. Spesielt ønsker vi å kartlegge SNPs på IL12B (-1188 T>G) hos pasienter med kronisk periodontitt og hjerte-og karsykdom.

Dette prosjektet omhandler helse og den forebyggende helsetjenestens forskningsområde, samt forskningsområde for Det odontologisk fakultetets faglige engasjement. I tillegg til direkte forskningsresultater og ny informasjon om patofysiologien til periodontitt, kan dette frem i tid føre til utvikling av nye diagnoser, sykdomsprogresjon eller forebyggende tester på et molekylært nivå.

## 4.2 Materiale og metode

Metoden omfatter utførelse av real-time PCR ved hjelp av prøber fra de kjente polymorfismer i de genetiske regionene. Vi vil også etablere en ny SNP-analyse for IL-12-genet: IL12B (-1188 T>G) som har blitt rapportert tidligere i litteraturen <sup>[3]</sup>.

I tillegg ønsker vi å etablere tre nye TaqMan SNP-analyser: en for IL10 gen ( $-819C>T$ ) <sup>[2]</sup>, en for IL17 gen ( $-197G>A$ ), og en for IL23 reseptor gen ( $78790 G>A$ ). Det er en sterk sammenslutning av SNP av IL-23R, med en autoimmun sykdom som Behcet <sup>[57]</sup> og en svak sammenheng mellom revmatoid artritt og IL-17A gen i den norske befolkningen <sup>[58]</sup>.



Vi planlegger å bruke prøvene som allerede er samlet inn og utarbeidet av PhD-stipendiat Zahra Armingohar, som også vil være involvert i analyse og evalueringsprosessen, og tillater derfor ytterligere informasjon for å være forbundet med hennes forskning. Metoden omfatter utførelse av Taqman-basert real-time kvantitativ PCR. Resultatene kan vise hvor mye forening det er mellom periodontitt og hjerte-karsykdommer. Siden denne studien innebærer case-case sammenligninger, kan resultatene vise nivået av sammenhengen av periodontitt og hjerte-karsykdommer.

Blod, saliva eller vevsprøver er tatt fra pasienter og genomisk DNA er ekstrahert. Genotyping av SNP i IL10 ( $-819C>T$ ), IL12B ( $-1188 T>G$ ), IL17 ( $-197G>A$ ), og IL23R ( $78790 G>A$ ) gen ble utført med real-time PCR ved hjelp av Taqman metode for allel-spesifikk påvisning (Applied Biosystems, San Diego, USA) i henhold til instruksjonene fra produsenten til MX3005 PCR-maskin med egen programvare for analyse (Stratagene, San Diego, USA).





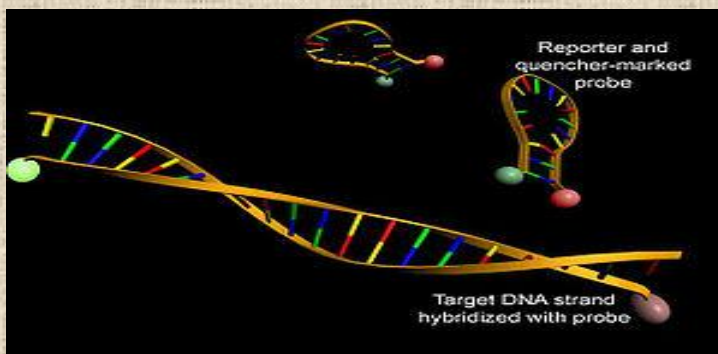
Mx3005 PCR-maskiner brukt på laboratorium ved IOB

Alle spesifikke probe- og primerblandinger ble bestilt fra Applied Biosystems hjelpetjeneste, som inkluderte syntesen av oligonukleotider som er oppført i tabellene under «Resultater». Påvisning av SNP ble gjort ved hjelp av allel spesifikke prober som kunne oppdage komplementære nukleotider på SNP stedet. Probene var 5' merket med VIC eller FAM fargestoffer.

### 4.3 Real-time PCR

I molekylær biologi, er real-time PCR, også kalt kvantitativ real-time PCR, en laboratorieteknikk basert på PCR og som blir brukt til å forsterke og samtidig å kvantifisere et bestemt DNA molekyl. For en eller flere spesifikke sekvenser i en DNA- prøve muliggjør real-time PCR både påvisning og kvantifisering.

Prosedyren følger det generelle prinsippet av PCR. Nøkkeltrekket er at det forsterkede DNA er påvist mens reaksjonen avanserer i Real-Time. Dette er en ny tilnærming sammenliknet med normal PCR, hvor produktet av reaksjonen er oppdaget på slutten. To felles metoder for påvisning av produktene i real-time PCR er: ikke-spesifikke fluorescerende fargestoffer som settes inn med noen dobbel-kjedet DNA, og sekvens-spesifikke DNA prober bestående av oligonukleotider, merket med en fluorescerende reporter som tillater påvisning først etter hybridisering av proben med sin komplementære DNA mål.



Real-timePCRbenytterfluorogenerfor å oppdage nivåer av genuttrykk.

Celler i alle organismer regulerer genuttrykk og omsetning av gentranskripsjoner (messenger RNA, forkortet til mRNA), og antall kopier av mRNA transkripsjon av et gen i en celle eller vev bestemmes av uttrykk og nedbrytning.

Celler i alle organismer regulerer genuttrykk og omsetningen av gentranskripsjoner (mRNA), og antall kopier av en mRNA transkripsjon av et gen i en celle eller vev er bestemt av hastigheten til uttrykket og nedbrytningen. Eldre metoder ble brukt for å måle mRNA overflod. Northern blotting er ofte brukt til å estimere uttryknivået av et gen ved å visualisere overflod av mRNA transkripsjonen i en prøve. Selv om denne teknikken fortsatt brukes til å vurdere genuttrykk, krever det relativt store mengder RNA og bidrar bare med kvalitativ eller semikvantitativ informasjon av mRNA nivåer.

For å oppdage og kvantifisere genuttrykk fra små mengder RNA på en robust måte, er forsterkning av gentranskripsjon nødvendig. PCR er en vanlig metode for å forsterke DNA. Utvikling av PCR teknologier basert på revers transkripsjon og fluorogen tillater måling av



DNA-amplifikasjon ved PCR i real time, dvs. det amplifiserte produktet blir målt ved hver PCR syklus. Real-time PCR kan også brukes til påvisning og kvantifisering av DNA i prøver for å fastslå tilstedeværelse og overflod av en bestemt DNA sekvens i disse prøvene.



1) Intakte prober hvor reporter fluorescens er undertrykket 2) Prober og den komplementære DNA-tråden blir hybridisert og reporter fluorescens er fortsatt undertrykket 3) Under PCR, er proben degradert av Taq polymerase og fluorescerende reporter frigjørt.

Metoden baserer seg på en DNA-basert probe med «fluorescent reporter» i den ene enden og en «quencher» av fluorescens i motsatt ende av proben. Nærheten av reporter til quencher hindrer påvisning av fluorescensen og nedbrytningen av proben ved 5' til 3' exonuclease aktivitet av Taq polymerase bryter nær relasjon mellom reporter-quencher og dermed lar utstråling unquenched utslipp av fluorescens, som kan oppdages etter eksitasjon med en laser. En økning i produktet målrettet av «reporter probe» ved hver PCR syklus fører derfor til en proporsjonal økning i fluorescens som følge av nedbryting av proben og frigjørelsen av reporteren.

1. PCR forberedes som vanlig, og «reporteren-proben» legges til.
2. Reaksjonen starter, og under avkjølingsfase herdes både primer og proben til DNA-målet.
3. Polymerisering av en ny DNA tråd er initiert fra primere, og når polymerase når proben, vil dens 5'-3'-exonuclease nedbryte proben. Dette vil fysisk separere den fluorescerende reporter fra quencher → gir en økning i fluorescens.
4. Fluorescence oppdages og måles i en real-time PCR maskin, og dens geometriske økning tilsvarende eksponensiell økning av produktet brukes til å bestemme «terskel syklus ( $C_T$ )» i hver reaksjon.

Kvantifisering av genekspresjon ved tradisjonelle DNA deteksjonsmetoder er upålitelig. Påvisning av mRNA på en Northern blot eller PCR-produkter på en gel eller Southern blot tillater ikke presis kvantifisering. For eksempel, i løpet av de 20-40 syklusene av en typisk

PCR vil mengden av DNA produkt nå et platå som ikke er direkte korrelert med mengden av DNA målet i den initielle PCR.

Real-time PCR kan brukes til å kvantifisere nuklinsyrer av to metoder: relativ kvantifisering og absolutt kvantifisering. Relativ kvantifisering er basert på interne referanse gener for å bestemme innfellbare forskjeller i uttrykk av target genet. Absolutt kvantifisering gir nøyaktige antall target DNA-molekyler sammenliknet med DNA-standarder<sup>[59]</sup>.

Det finnes mange bruksområder for real-time PCR i laboratoriet. Det er ofte brukt for både diagnostikk og grunnforskning.

Diagnostisk brukes real-time PCR til å oppdage effektivt nuklinsyrer som er av betydning for, f.eks, smittsomme sykdommer, kreft og genetiske misdannelser. Innføringen av real-time PCR analyser til klinisk mikrobiologi har forbedret diagnostisering av smittsomme sykdommer<sup>[60]</sup>, og er distribuert som et verktøy for å oppdage nye fremvoksende sykdommer, slik som nye stammer av influensa i diagnostiske tester<sup>[61]</sup>.

I forbindelse med forskning er real-time PCR i hovedsak brukt til å gi kvantitative målinger av gentranskripsjoner. Teknologien kan brukes til å bestemme hvordan det genetiske uttrykket av et bestemt gen endrer seg over tid.

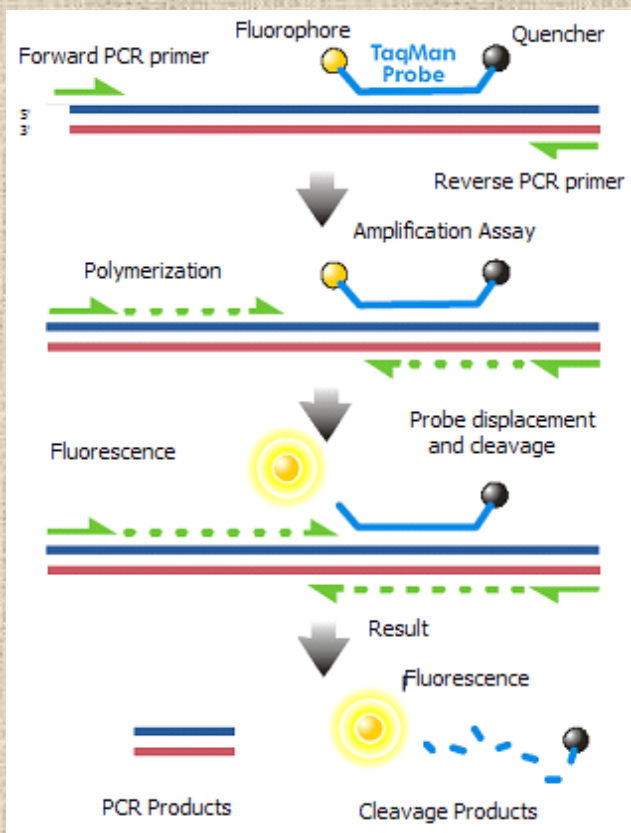


#### 4.4 Taqman

TaqMan probe er hydrolyserbare prober, designet for å øke spesifisiteten av real-time PCR analyser. Metoden ble først rapportert i 1991 av forskere ved Cetus Corporation <sup>[62]</sup>.

TaqMan prinsipp er bygget på 5'-3' exonuclease aktivitet av Taq polymerase for å splitte et dobbelt-merket probe under hybridisering, og fluorogenbasert registrering. Som i andre real-time PCR metoder, tillater den resulterende fluorescens signal kvantitative målinger av akkumulerte produkter under eksponentielle stadier av PCR. TaqMan probe øker imidlertid signifikant spesifisiteten av registreringen.

Prinsippet for TaqMan er som følgende:



TaqMan probe består av en «fluorophore» kovalent bundet til 5'-enden av oligonukleotid probe og en «quencher» på 3'-enden.

Det finnes en rekke forskjellige «fluorophores», dvs. 6-carboxyfluorescein, acronym: FAM, eller tetrachlorofluorescein, acronym: TET, og «quenchers», dvs. tetramethylrhodamine, acronym: TAMRA, or dihydrocyclopyrroloindole tripeptide minor groove binder, acronym: MGB <sup>[63]</sup>.

## 5 Resultat

Tabell 1 viser en oversikt over allel frekvensanalysene. Det dominerende allelet (G) for IL10 genotyper (-819, G>A) viste en tendens til forskjell mellom CV (64 %) og P (79 %) pasienter.

Tabell 2 viser en oversikt over genotype frekvensene. Genotypisk frekvens av IL10 SNP homozygot for G allelet (G/G), viser en signifikant høyere forskjell i P gruppen (63 %) sammenliknet med CV gruppen (37 %)

I tillegg ser vi også en tendens til forskjell mellom disse to gruppene blant IL10 SNP heterozygot allel (G/A), henholdsvis CV (55 %) og P (32 %).

Ved sammenlikning av CVP og CV gruppen ser vi en tendens til forskjell både blant homozygot allel av IL10 SNP av G allelet (G/G) henholdsvis CVP (61 %) og CV (37 %). I samme gruppe ser vi en tendens blant heterozygot allel (G/A) henholdsvis CVP (33 %) og CV (55%).

Allelfrekvensene for IL12B-, IL17- og IL23R genene sine SNPs hadde ingen forskjell mellom periodontitt pasienter og pasienter med kardiovaskulær sykdom, eller mellom periodontitt pasienter med kardiovaskulær sykdom og pasienter med kun periodontitt.



**Table 1.** ALLELIC ASSOCIATION ANALYSIS OF SNPs IN IL10, IL12B, IL-17 AND IL-23R GENES IN PATIENTS WITH CARDIOVASCULAR DISEASE (CV), PERIODONTITIS (P), AND CVP IN THE NORWEGIAN POPULATION

|                          |       | Allele frequency <sup>1</sup> |         |                   | A             | B            | C           |
|--------------------------|-------|-------------------------------|---------|-------------------|---------------|--------------|-------------|
|                          |       | Pt (CVP)                      | Pt (CV) | Periodontitis (P) | p (CVP vs CV) | p (CVP vs P) | p (CV vs P) |
| <b>IL10<sup>2</sup></b>  | -819  |                               |         |                   |               |              |             |
| <b>1</b>                 | G     | 0,78                          | 0,64    | 0,79              | 0,08          | 0,82         | 0,04        |
| <b>2</b>                 | A     | 0,22                          | 0,36    | 0,21              |               |              |             |
| <b>IL12B<sup>2</sup></b> | -1188 |                               |         |                   |               |              |             |
| <b>1</b>                 | A     | 0,85                          | 0,75    | 0,82              | 0,14          | 0,62         | 0,31        |
| <b>2</b>                 | C     | 0,15                          | 0,25    | 0,18              |               |              |             |
| <b>IL17<sup>2</sup></b>  | -197  |                               |         |                   |               |              |             |
| <b>1</b>                 | G     | 0,57                          | 0,67    | 0,6               | 0,2           | 0,72         | 0,34        |
| <b>2</b>                 | A     | 0,43                          | 0,33    | 0,4               |               |              |             |
| <b>IL23R<sup>2</sup></b> | 78790 |                               |         |                   |               |              |             |
| <b>1</b>                 | G     | 0,94                          | 0,95    | 0,96              | 1             | 0,71         | 0,71        |
| <b>2</b>                 | A     | 0,06                          | 0,05    | 0,04              |               |              |             |

<sup>1</sup> Frequency (number)  
<sup>2</sup> Allele designation (1 - major, 2- minor allele)

**Table 2.** GENOTYPIC ASSOCIATION ANALYSIS OF SNPs IN IL10, IL12B, IL-17 AND IL-23R GENES IN PATIENTS WITH CARDIOVASCULAR DISEASE (CV), PERIODONTITIS (P), AND CVP IN THE NORWEGIAN POPULATION

|                          |       | Genotype frequency <sup>1</sup> |         |               | p (CVP vs CV) | p (CVP vs P) | p (CV vs P)       |
|--------------------------|-------|---------------------------------|---------|---------------|---------------|--------------|-------------------|
|                          |       | Pt (CVP)                        | Pt (CV) | Periodontitis |               |              |                   |
| <b>IL10<sup>2</sup></b>  | -819  |                                 |         |               |               |              |                   |
| <b>1/1</b>               | G/G   | 0,61                            | 0,37    | 0,63          | 0,04          | 0,84         | 0,02 <sup>4</sup> |
| <b>1/2</b>               | G/A   | 0,33                            | 0,55    | 0,32          | 0,06          | 0,88         | 0,04              |
| <b>2/2</b>               | A/A   | 0,06                            | 0,08    | 0,05          | 1             | 1            | 0,67              |
| <b>IL12B<sup>2</sup></b> | -1188 |                                 |         |               |               |              |                   |
| <b>1/1</b>               | A/A   | 0,69                            | 0,55    | 0,66          | 0,21          | 0,74         | 0,34              |
| <b>1/2</b>               | A/C   | 0,31                            | 0,4     | 0,32          | 0,42          | 0,91         | 0,47              |
| <b>2/2</b>               | C/C   | 0                               | 0,05    | 0,02          | 0,49          | 1            | 0,61              |
| <b>IL17<sup>2</sup></b>  | -197  |                                 |         |               |               |              |                   |
| <b>1/1</b>               | G/G   | 0,28                            | 0,4     | 0,34          | 0,29          | 0,55         | 0,62              |
| <b>1/2</b>               | G/A   | 0,58                            | 0,55    | 0,51          | 0,79          | 0,53         | 0,72              |
| <b>2/2</b>               | A/A   | 0,14                            | 0,05    | 0,15          | 0,21          | 0,93         | 0,27              |
| <b>IL23R<sup>2</sup></b> | 78790 |                                 |         |               |               |              |                   |
| <b>1/1</b>               | G/G   | 0,89                            | 0,89    | 0,93          | 1             | 0,7          | 0,7               |
| <b>1/2</b>               | G/A   | 0,11                            | 0,11    | 0,07          | 1             | 0,7          | 0,7               |
| <b>2/2</b>               | A/A   | 0                               | 0       | 0             | -             | -            | -                 |

<sup>1</sup> Frequency (number)  
<sup>2</sup> Allele designation (1 - major, 2- minor allele)  
<sup>3</sup> Genotype designation  
<sup>4</sup> OR: 0.34, 95% CI: 0.12-0.92

## 6 Diskusjon

Allel og genotype analyser viste ingen signifikante forskjeller i polymorfismer av SNPs i IL-12B, IL-17 eller IL23R gener blant alle tre grupper av pasienter (Tabell 1 og Tabell 2).

Polymorfismer i en rekke gener som spiller en rolle i inflammatoriske responser kan være viktig for følsomhet eller resistens mot periodontitt. De kan også påvirke forekomsten av hjerte- og karsykdommer. En gruppe gener som inkluderer cytokiner som IL-1, IL-6 og TNF- $\alpha$  har vært ansett som klassiske faktorer som fremmer lokal betennelse.

Vi har studert cytokiner som kan regulere immunresponser som: IL-12, IL-17, og IL-23 som pro-inflammatoriske, og IL-10 og TGF- $\beta$  som anti-inflammatoriske faktorer. Det synes rimelig å anta at polymorfismer i gener som regulerer betennelse kan bidra til mottakelighet for sykdommer som har betennelse som en risikofaktor for deres utvikling. Vi har derfor forsøkt å relatere den mulige påvirkningen av slike gener på sykdoms utvikling ved å analysere hyppigheten av markører i disse genene. Selv om de kan være forbundet med risiko for en sykdom, trenger de ikke nødvendigvis å være årsaken til at slik sykdom utvikler seg eller bidra til patogenese. Det kan være at andre gener, mikroRNA eller ukjente genetiske regulatoriske elementer i nærheten av disse som er de reelle risikofaktorer.

IL-10 spiller en anti-inflammatorisk rolle i den adaptive immunresponsen mot patogener. Den utskilles av Th2 typen av CD4+ T-celler, Tr1 og Tregs, men også av ustimulerte makrofager. Den kan modulere og hemme Th1 respons og nedregulere Th17 (IL-17 produserende CD4+ T-celle respons), under immunrespons mot ulike patogener.

I periodontitt, kan IFN- $\gamma$  avhengige inflammatoriske responser spille en viktig rolle i bentap. Som en viktig aktivator av makrofager i periodontal vev kan IFN- $\gamma$  stimulere de til å produsere mer av IL-1, IL-6 og TNF- $\alpha$ , som deretter vil føre til aktivering av osteoklaster i ben <sup>[64]</sup>. IL-1 er muligens den viktigste formidleren av vev ødeleggelse i periodontal sykdom. I analyser av gingivale vev har det blitt identifisert økte konsentrasjoner av både IL-1  $\alpha$  og  $\beta$  på protein eller mRNA nivå <sup>[65, 66]</sup>.



Alvorlig kronisk periodontitt har blitt assosiert med en polymorfisme i IL-10 genet (G til A overgang ved -1087 posisjon) blant den svenske befolkningen. Denne assosiasjonen ble signifikant økt hos røykere <sup>[67]</sup>. IL10 SNP brukt i nåværende arbeid ble kartlagt i henhold til denne polymorfisme på -795 (tidligere -819). Den rapporterte studien synes å være forenlig med våre funn av en lignende sammenheng mellom IL10 genets SNP og periodontitt.

Hvis vi skulle spekulere om virkningen av IL-10 og hvordan det kan ha påvirket frekvensen av periodontitt, vil vi foreslå at IL-10 motvirker handlingene til Th1-type cytokiner som IL-12 og IFN- $\gamma$  og i tillegg muligens Th-17 typen cytokiner som inkluderer IL-23 og IL-17. Dermed er det mulig at en mindre effektiv allel av IL-10 kan gi en mer intens Th1/Th17 type respons, for eksempel i immunreaksjoner til periodonto-patogene bakterier. Dette kan medføre større bendestruksjon.

I en ny studie utført i Jordan har man sett på assosiasjon av IL-10 gen promoter polymorfismer i kronisk og aggressiv periodontitt. Målet med studiet var å undersøke om IL-10 SNPs i posisjonene -1087 (G/A) og -597 (C/A) var assosiert med generell kronisk periodontitt og lokalisert aggressiv periodontitt. De hadde 105 pasienter med generell kronisk periodontitt, 86 pasienter med lokal aggressiv periodontitt, og 86 kontrollpasienter uten periodontitt. Resultatene fra studien er som følgende:

Frekvenser for-1087A og-597A alleler var signifikant vanligere i kronisk periodontitt pasienter enn kontrollgruppen. De A-positive allel genotypene (GA, AA) i posisjon -1087 og A-positive allel genotyper (CA, AA) ved posisjon -597 syntes å øke risikoen for å ha kronisk periodontitt <sup>[69]</sup>.

Rapportene over, sett i samsvar med våre funn tyder på at det er en interaksjon mellom multigenetiske og miljømessige risikofaktorer i mottakelighet for periodontitt. Vi foreslår dermed at IL10 SNP allelet selv ikke kan ha en etiologisk rolle i periodontitt hos den norske befolkningen, men fungerer heller som modifikasjon av miljømessige faktorer, inkludert infeksjon og antageligvis andre, som for eksempel røyking.

## 7 Konklusjon

Resultatene vi fikk i alleliske frekvensanalyser av det dominerende allelet (G) for IL10 genotyper (-819, G>A) viste en tendens til forskjell mellom CV (64 %) og P (79 %) pasienter, samt en tendens til signifikant forskjell mellom CVP (78 %) og CV (64 %) gruppene.

Vi fant også at genotypisk frekvens av IL10 SNP homozygot for G allelet (G/G), viste en signifikant høyere forskjell i P gruppen (63 %) sammenliknet med CV gruppen (37 %) og en tendens til forskjell mellom disse to gruppene blant IL10 SNP heterozygot allel (G/A), henholdsvis på CV (55 %) og P (32 %).

Ved sammenlikning av CVP og CV gruppen så vi en tendens til forskjell både blant homozygot allel av IL10 SNP av G allelet (G/G) henholdsvis CVP (61 %) og CV (37%). I samme gruppe så vi en tendens blant heterozygot allel (G/A) henholdsvis CVP (33 %) og CV (55 %).

Allelfrekvensene for IL12B-, IL17- og IL23R genene sine SNPs hadde ingen forskjell mellom periodontitt pasienter og pasienter med kardiovaskulær sykdom, eller mellom periodontitt pasienter med kardiovaskulær sykdom og pasienter med kun periodontitt.

Som nevnt under diskusjonen, konkluderer vi med at det tyder på at det er en interaksjon mellom multigenetiske og miljømessige risikofaktorer i mottakelighet for periodontitt. Vi tenker dermed altså at IL10 SNP allelet ikke er en enestående risikofaktor, men som kan fungere i samspill med de andre miljømessige faktorer, som røyking. Forskningen fra Jordan er med på å understøtte denne konklusjonen



## 8 Referanser:

1. Choi J, Lee SY, Kim K, Choi BK. Identification of immunoreactive epitopes of the *Porphyromonas gingivalis* heat shock protein in periodontitis and atherosclerosis. *J Periodontal Res.* 2011 Jan 18
2. Scarel-Caminaga RM, Trevilatto PC, Souza AP, Brito RB, Camargo LE, Line SR. Interleukin 10 gene promoter polymorphisms are associated with chronic periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2004 Jun;31:443-8
3. Hu KF, Huang KC, Ho YP et al. Interleukin-10 (-592 C/A) and interleukin-12B (+16974 A/C) gene polymorphisms and the interleukin-10 ATA haplotype are associated with periodontitis in a Taiwanese population. *J Periodontal Res.* 2009 Jun;44:378-85.
4. Babel N, Cherepnev G, Babel D et al. Analysis of tumor necrosis factor-alpha, transforming growth factor-beta, interleukin-10, IL-6, and interferon-gamma gene polymorphisms in patients with chronic periodontitis. *J Periodontol.* 2006 Dec;77:1978-83
5. Reichert S, Machulla HK, Klapproth J et al. Interferon-gamma and interleukin-12 gene polymorphisms and their relation to aggressive and chronic periodontitis and key periodontal pathogens. *J Periodontol.* 2008 Aug;79:1434-43
6. Wikipedia, the free encyclopedia; "Periodontitis"
7. Lindhe J, Karring T & Araujo M; Anatomy of the periodontium. I: Linde J, Karring T and Lang NP. *Clinical periodontology and implant dentistry 4th edition 2003; 1:3*
8. Kinane DF, Berglundh T & Lindhe J; Host-parasite interactions in periodontal disease. I: Linde J, Karring T and Lang NP. *Clinical periodontology and implant dentistry 4th edition 2003; 5:154-5*
9. Hansen BF. Diagnostikk av periodontale sykdommer. *Tandlægebladet 2004; 108 Nr1:26-37*
10. Lamster IB. Antimicrobial mouthrinses and the management of periodontal diseases, Introduction to the supplement. *J Am Dent Assoc 2006 Nov; 137:5S-9S*
11. Papapanou PN & Lindhe J; Epidemiology of periodontal diseases. I: Linde J, Karring T and Lang NP. *Clinical periodontology and implant dentistry 4th edition 2003; 2:70*
12. Giertsen E. Orale biofilmodeller – nye muligheter for plakkstudier. *Nor Tannlegeforen Tid 2007; 117: 794-802*
13. Mayo Foundation for Medical Education and Research. *Cardiovascular Disease: A Blueprint for. Understanding the Leading Killer. Mayo Clinic. 2003.*
14. European Heart Network og British Heart Foundation, 2005. *European Cardiovascular Disease Statistics: 2005-utgaven. European Heart Network and British Heart Foundation, 2005. (Side 7)*
15. Verdens helseorganisasjon (WHO). *Neglected Global Epidemics: Three Growing Threats.* URL: <http://www.who.int/whr/2003/en/Chapter6.pdf>. Besøkt 26. juli, 2007. (Side 85)

16. European Heart Network og British Heart Foundation, 2005. European Cardiovascular Disease Statistics: 2005-utgaven. European Heart Network and British Heart Foundation, 2005. (Side 7)
17. European Heart Network og British Heart Foundation, 2005. European Cardiovascular Disease Statistics: 2005-utgaven. European Heart Network and British Heart Foundation, 2005. (Side 11)
18. Moore, K.J., and Tabas, I. (2011). Macrophages in the pathogenesis of atherosclerosis. *Cell* 145, 341-355
19. Tedgui, A., and Mallat, Z. (2006). Cytokines in atherosclerosis: pathogenic and regulatory pathways. *Physiol Rev* 86, 515-581.
20. Little, P.J., Chait, A., and Bobik, A. (2011). Cellular and cytokine-based inflammatory processes as novel therapeutic targets for the prevention and treatment of atherosclerosis. *Pharmacol Ther* 131, 255-268.
21. Nishihira, K., Imamura, T., Yamashita, A., Hatakeyama, K., Shibata, Y., Nagatomo, Y., Date, H., Kita, T., Eto, T., and Asada, Y. (2006). Increased expression of interleukin-10 in unstable plaque obtained by directional coronary atherectomy. *Eur Heart J* 27, 1685-1689.
22. Ait-Oufella, H., Taleb, S., Mallat, Z., and Tedgui, A. (2011). Recent advances on the role of cytokines in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 31, 969-979.
23. Types of Cardiovascular Diseases. Available at: [www.wrongdiagnosis.com/c/cardiovascular\\_diseases/subtypes.htm](http://www.wrongdiagnosis.com/c/cardiovascular_diseases/subtypes.htm). Accessed in 2004
24. Khader YS, Albashaireh ZSM, Alomari MA. Periodontal diseases and the risk of coronary heart and cerebrovascular diseases: a meta-analysis. *J Periodontol*. 2004;75:1046-1053.
25. Elter JR, Champagne CME, Offenbacher S, Beck JD. Relationship of periodontal disease and tooth loss to prevalence of coronary heart disease. *J Periodontol*. 2004;75:782-790
26. Pussinen PJ, Alfthan G, Rissanen H, et al. Antibodies to periodontal pathogens and stroke risk. *Stroke*. 2004;35:2020-2023
27. D'Aiuto F, Ready D, Tonetti MS. Periodontal disease and C-reactive protein-associated cardiovascular risk. *J Periodontol Res*. 2004;39:236-241.
28. Molloy J, Wolff LF, Lopez-Guzman A, Hodges JS. The association of periodontal disease parameters with systemic medical conditions and tobacco use. *J Clin Periodontol*. 2004;31:625-632
29. Ciancio SG. Taking oral health to heart. *J Am Dent Assoc*. 2002;133 Suppl:4S-6S
30. Renvert S, Ohlsson O, Persson S, et al. Analysis of periodontal risk profiles in adults with or without a history of myocardial infarction. *J Clin Periodontol*. 2004;31:19-24
31. Montebugnoli L, Servidio D, Miaton RA, et al. Poor oral health is associated with coronary heart disease and elevated systemic inflammatory and haemostatic factors. *J Clin Periodontol*. 2004;31:25-29.
32. Hung H-C, Willett W, Merchant A, et al. Oral health and peripheral arterial disease. *Circulation*. 2003;107:1152-1157.



33. abEskdale J, Kube D, Tesch H, Gallagher G (1997). "Mapping of the human IL10 gene and further characterization of the 5' flanking sequence". *Immunogenetics* 46 (2): 120–8. doi:10.1007/s002510050250. PMID 9162098.
34. "Entrez Gene: IL10 interleukin 10".  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=gene&Cmd=ShowDetailView&TermToSearch=3586>.
35. Braat H, Rottiers P, Hommes DW, Huyghebaert N, Remaut E, Remon JP, van Deventer SJ, Neiryneck S, Peppelenbosch MP, Steidler L (June 2006). "A phase I trial with transgenic bacteria expressing interleukin-10 in Crohn's disease". *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 4 (6): 754–9. doi:10.1016/j.cgh.2006.03.028. PMID 16716759.
36. Overexpression of interleukin-10 by activated T lymphocytes inhibits atherosclerosis in LDL receptor-deficient Mice by altering lymphocyte and macrophage phenotypes, Laura J. Pinderski, Michael P. Fischbein
37. Protective Role of Interleukin-10 in Atherosclerosis, Ziad Mallat, Sandrine Besnard, Micheline Duriez, Virginie Deleuze, Florence Emmanuel, Michel F. Bureau, Fabienne Soubrier, Bruno Esposito, Hélène Duez 1999.
38. Circulating Interleukin-10 and Risk of Cardiovascular Events, A Prospective Study in the Elderly at Risk, Paul Welsh, Heather M. Murray, Ian Ford, Stella Trompet, 2011
39. Kaliński P, Hilkens CM, Snijders A, Snijdewint FG, Kapsenberg ML (1997). "IL-12-deficient dendritic cells, generated in the presence of prostaglandin E2, promote type 2 cytokine production in maturing human naive T helper cells". *J. Immunol.* 159 (1): 28–35. PMID 9200435.
40. Temblay JN, Bertelli E, Arques JL, Regoli M, Nicoletti C. Production of IL-12 by Peyer patch-dendritic cells is critical for the resistance to food allergy, *J Allergy Clin Immunol.* 2007 Sep;120(3):659-65. Epub 2007 Jun 28.
41. Tsai IS, Tsai CC, Ho YP, Ho KY, Wu YM, Hung CC. Interleukin-12 and interleukin-16 in periodontal disease. *Cytokine.* 2005 Jul 7;31(1):34-40
42. Kuby, Janis; Kindt, Thomas J.; Goldsby, Richard A.; Osborne, Barbara A. (2007). *Kuby immunology*. San Francisco: W.H. Freeman. pp. 396
43. Miossec P, Korn T, Kuchroo VK (August 2009). "Interleukin-17 and type 17 helper T cells". *N. Engl. J. Med.* 361 (9): 888–98
44. Kolls JK, Lindén A (2004). "Interleukin-17 family members and inflammation". *Immunity* 21 (4): 467–76
45. Aggarwal S, Gurney AL (2002). "IL-17: prototype member of an emerging cytokine family". *J. Leukoc. Biol.* 71 (1): 1–8
46. Aggarwal S, Ghilardi N, Xie MH, de Sauvage FJ, Gurney AL (2003). "Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17". *J. Biol. Chem.* 278 (3): 1910–4. doi:10.1074/jbc.M207577200.
47. Cho ML, Kang JW, Moon YM, Nam HJ, Jhun JY, Heo SB, Jin HT, Min SY, Ju JH, Park KS, Cho YG, Yoon CH, Park SH, Sung YC, Kim HY (2006). "STAT3 and NF-kappaB signal pathway is required for IL-23-mediated IL-17 production in spontaneous arthritis animal model IL-1 receptor antagonist-deficient mice". *J. Immunol.* 176 (9): 5652–61



48. Chen Z, Laurence A, Kanno Y, Pacher-Zavisin M, Zhu BM, Tato C, Yoshimura A, Hennighausen L, O'Shea JJ (2006). "Selective regulatory function of Socs3 in the formation of IL-17-secreting T cells".
49. Veldhoen M, Hocking RJ, Atkins CJ, Locksley RM, Stockinger B (2006). "TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells". *Immunity* 24 (2): 179–89
50. Mangan PR, Harrington LE, O'Quinn DB, Helms WS, Bullard DC, Elson CO, Hatton RD, Wahl SM, Schoeb TR, Weaver CT (2006). "Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage". *Nature* 441 (7090): 231–4
51. Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, Weiner HL, Kuchroo VK (2006). "Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells". *Nature* 441 (7090): 235–8.
52. Ivanov II, McKenzie B.S., Zhou L., Tadokoro C.E., Lepelley A., Lafaille J.J., Cua D.J., Littman D.R. (2006). "The orphan nuclear receptor ROR- $\gamma$  directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells". *Cell* 126 (6): 1121–1133
53. Kawaguchi M, Adachi M, Oda N, Kokubu F, Huang SK (2004). "IL-17 cytokine family". *J. Allergy Clin. Immunol.* 114 (6): 1265–73; quiz 1274.
54. Moseley TA, Haudenschild DR, Rose L, Reddi AH (2003). "Interleukin-17 family and IL-17 receptors". *Cytokine Growth Factor Rev.* 14 (2): 155–74.
55. Ohshima H, Kato-Kogoe N, Kuhara A et al. The involvement of IL-23 and the Th17 pathway in periodontitis. *J Dent Res.* 2009 Jul;88:633-8.
56. Schenkein HA, Koertge TE, Brooks CN, Sabatini R, Purkall DE, Tew JG. IL-17 in sera from patients with aggressive periodontitis. *J Dent Res.* 2010 Sep;89:943-7.
57. Jiang Z, Yang P, Hou S et al. IL-23R gene confers susceptibility to Behcet's disease in a Chinese Han population. *Ann Rheum Dis.* 2010 Jul;69:1325-8
58. Nordang GB, Viken MK, Hollis-Moffatt JE et al. Association analysis of the interleukin 17A gene in Caucasian rheumatoid arthritis patients from Norway and New Zealand. *Rheumatology (Oxford).* 2009 Apr;48:367-70
59. S. Dhanasekaran, T. Mark Doherty, John Kenneth and TB Trials Study Group. (2010 Mar). "Comparison of different standards for real-time PCR-based absolute quantification". *Immunol Methods.* 354 (1–2): 34–9.
60. FDA Authorizes Emergency Use of Influenza Medicines, Diagnostic Test in Response to Swine Flu Outbreak in Humans. *FDA News*, April 27, 2009.
61. Fillion, M (editor) (2012). *Quantitative Real-time PCR in Applied Microbiology*. Caister Academic Press. ISBN 978-1-908230-01-0.
62. Holland, P. M.; Abramson, R. D.; Watson, R.; Gelfand, D. H. (1991). "Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88 (16): 7276–7280. Bibcode1991PNAS...88.7276H. doi:10.1073/pnas.88.16.7276. PMC52277. PMID1871133. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?tool=pmcentrez&artid=52277>. edit



63. Kutuyavin IV, Afonina IA, Mills A, Gorn VV, Lukhtanov EA, Belousov ES, Singer MJ, Walburger DK, Lokhov SG, Gall AA, Dempcy R, Reed MW, Meyer RB, Hedgpeth J (2000). "3'-Minor groove binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures". *Nucleic Acids Res* 28 (2): 655–661.  
doi:10.1093/nar/28.2.655. PMC102528. PMID10606668.  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?tool=pmcentrez&artid=102528>.
64. Okada H, Murakami S. Cytokine expression in periodontal health and disease. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1998;9:248-66.
65. Tokoro Y, Matsuki Y, Yamamoto T, Suzuki T, Hara K. Relevance of local Th2-type cytokine mRNA expression in immunocompetent infiltrates in inflamed gingival tissue to periodontal diseases. *Clin Exp Immunol*. 1997;107:166-74.
66. Page RC, Offenbacher S, Schroeder HE, Seymour GJ, Kornman KS. Advances in the pathogenesis of periodontitis: summary of developments, clinical implications and future directions. *Periodontol*. 2000;14:216-48.
67. Meisel P, Siegemund A, Grimm R et al. The interleukin-1 polymorphism, smoking, and the risk of periodontal disease in the population-based SHIP study. *J Dent Res*. 2003;82:189-93.
68. Berglundh T, Donati M, Hahn-Zoric M, Hanson LA, Padyukov L. Association of the-1087 IL 10 gene polymorphism with severe chronic periodontitis in Swedish Caucasians. *J Clin Periodontol*. 2003;30:249-54.
69. Association of interleukin-10 gene promoter polymorphisms with chronic and aggressive periodontitis, Jaradat SM, Ababneh KT, Jaradat SA, Abbadi MS, Taha AH, Karasneh JA, Haddad HI, April 2012.

**Bilder:**

Forsiden:

<http://www.implantdentist.co.nz/procedures/11/>

<http://www.topnews.in/health/diseases/heart?page=2>