

تأثير العمر، الجنس وبعض العوامل الجينية على شدة التهاب النسيج حول السنينة المزمن عند مرضى سوريين

د. شادن حدّاد*

د. علي أبو سليمان*

فاتن كفي*

(تاريخ الإبداع 19 / 4 / 2018. قُبِلَ للنشر في 20 / 6 / 2018)

□ ملخص □

إنّ التهاب النسيج حول السنينة المزمن مرضٌ إنتانيّ، يتّصف بالتهابٍ لثويّ يمتدّ إلى النسيج حول السنينة المجاورة، مؤدياً لتشكّل جيوب حول سنينة، وخسارة في الارتباط السريري، والعظم السنخي المجاور، يحدث غالباً عند البالغين، ولكن يمكن مشاهدته في أيّ عمر، ويتأثر معدل تطوّر المرض بالعوامل الموضعية و/أو الجهازية، والبيئية، التي تعدّل استجابة الثوي المناعية تجاه اللويحة البكتيرية، ما يزيد الحساسية تجاه المرض، ويُعتقد أن الاستعداد للمرض حول السنينة يرتبط جزئياً بالاستعداد الجيني، وقد تمّ تحديد العديد من الجينات التي تعتبر مواضع كامنة للاستعداد للالتهاب، وأحد أهمها مستقبل الفيتامين د VDR الذي يتواسط فعالية الفيتامين د الحيوية في استقلاب العظم، وتعديل الاستجابة المناعية.

هدفت دراستنا للتحري عن علاقة العمر، الجنس، والتعدّد الشكلي FokI في جين مستقبل الفيتامين د بالحالة السريرية لمرضى سوريين بالتهاب النسيج حول السنينة المزمن، حيث شملت العينة على 50 مريضاً بمتوسط عمر (0.722±64) عاماً، و30 حالة شاهدة (0.63±50) عاماً، وتمّ عزل الدنا DNA من الدم المحيطي، وإجراء تفاعل البوليميراز التسلسلي PCR، وهضم شدف الدنا المضخمة بأنزيم قطع FokI.

أظهرت دراستنا بتطبيق اختبار كاي مربع Chi-square عدم وجود فروقٍ يعتدّ بها إحصائياً بين مجموعتي الدراسة من حيث العمر، الجنس، وتوزع الأنماط الجينية والأليلات في الموقع FokI من جين VDR، وضمن حدود هذا البحث يمكن القول أنّ هذه العوامل لا تؤهّب لحدوث المرض، أو تؤثر على درجة تطوره.

الكلمات المفتاحية: مستقبل الفيتامين د، التهاب النسيج حول السنينة المزمن، FokI.

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

* أستاذ مساعد - قسم النسيج حول السنينة - كلية طب الأسنان - جامعة دمشق - سورية.

* طالبة ماجستير - قسم الكيمياء الحيوية والأحياء الدقيقة - كلية الصيدلة - جامعة دمشق - سورية.

Effects of age, sex and genetic factors on chronic periodontitis severity in Syrian Patients

Dr. Shaden Haddad*
Dr. Ali Abou-sulaiman**
Faten Kafa***

(Received 19 / 4 / 2018. Accepted 20 / 6 / 2018)

□ ABSTRACT □

Chronic periodontitis (CP) is an inflammatory disease, characterized by gingivitis, and affecting tooth supporting tissues, forming periodontal pockets with associated attachment loss, alveolar bone resorption. It is common in adults, but can also occur at any age. The rate of disease progression may be influenced by local, systemic conditions, and/or environmental factors that alter the normal host response to bacterial plaque, and affect the susceptibility to disease. It is suggested that periodontitis is partially associated by genetic factors, that many genes are involved in inflammation susceptibility, mainly include the vitamin D receptor (VDR) gene that is implicated in bone metabolism and the host immune response.

80 Syrian subjects were recruited for vitamin D receptor gene polymorphism study, and allocated in two groups: 50 diagnosed with CP and mean age was (64 ± 0.722) years, 30 matched controls. DNA was isolated from peripheral blood cells, and genotyping was performed by polymerase chain reaction (PCR) method and restriction fragment length polymorphism analysis (RFLP) by using FokI enzyme.

By using Chi square test, no significant differences were found between the study groups in the frequencies of alleles and genotypes at FokI position of VDR gene, age and sex. These findings suggest that the investigated factors are not associated with periodontal disease in this studied sample of Syrian population.

Keywords: Chronic Periodontitis, VDR, Polymorphism, PCR, RFLP

* Associate Professor- Department of Biochemistry and microbiology, Faculty of Pharmacy, Damascus University, Syria

** Associate Professor- Department of Periodontology, Faculty of Dentistry, Damascus University, Syria

* Master student- Department of Biochemistry and microbiology, Faculty of Pharmacy, Damascus University, Syria

مقدمة:

تؤمّن النسيج حول السنّية السليمة الدعم الضروري للحفاظ على وظيفة السن، وهي تتكوّن من أربعة مكوناتٍ أساسية: اللثة، الرباط حول السنّي، الملاط والعظم السنخي، يختلف كل منها في التوضع، والبنية البيوكيميائية، ولكنها تعمل كوحدةٍ وظيفية واحدة [1]. إنّ التهاب النسيج حول السنّية الذي يبدأ بتراكم لويحة جراثيمية على سطح السن واللثة، هو مرض التهابي مزمن يتأثر بالعوامل البيئية والجينية [2]، ويعتبر التهاب النسيج المزمن chronic periodontitis (CP) هو النمط الأكثر شيوعاً لالتهابات النسيج حول السنّية، ويصيب حتى 30% من البالغين [3]، ويوصّف بالتهاب لثوي، تراكم اللويحة والقلح، تشكّل جيب حول سنّي، تطوّر بطيء لارتشاف العظم السنخي، وفقد الارتباط السريري، وتترافق الحالات المتقدمة برائحة فم كريهة، وحركة في الأسنان [4]، [5].

يرتبط فقد العظم والارتباط بزيادة في تعداد الجراثيم سلبية الغرام في اللويحة تحت اللثة، ويعتقد إنّ لهذه الجراثيم تأثيراً على الخلايا المناعية، والنسجية، ما يؤدي لمرض موضعي، تتداخل فيه العديد من العوامل المسببة لاختلال التوازن بين اللويحة الجرثومية و استجابة اللثوي [1]، وتؤثر على معدل تطور المرض، منها عوامل موضعية كالحشوات والتيجان تحرض التهاباً لثوياً، وفقد ارتباط سريري، وعوامل جهازية كالسكري قد تنقص دفاعات اللثوي تجاه الانتان البكتيري، وعوامل بيئية كالتدخين والتوتر تنقص الوظيفة المناعية فتزيد الحساسية للمرض.

قد تؤثر العوامل الجينية على استجابة اللثوي للانتان، وتؤدي لتغيرات ملحوظة في شدة المرض، ومن الجينات التي تؤثر في الحساسية تجاه المرض تلك التي تتدخل في الاستجابة المناعية، وجين مستقبل الفيتامين د [6].

يتوسط مستقبل الفيتامين د العمليات الحيوية للفيتامين د، ويتكوّن من ميدان رابط للجين ligand binding domain، وميدان رابط للدنا DNA-binding domain، يعمل كمنظم للانتساخ الجيني، يشكّل المستقبل متغايراً مثنوياً heterodimer مع مستقبلات الريتينويد (RXR)، ويرتبط مع الدنا ليبدأ تعديل الهيستونات، إعادة بناء الكروماتين، وارتباط RNA polymerase II الضروري لبدء الانتساخ، تتوضع جين مستقبل الفيتامين د على الصبغي 12، وقد تحوي أكثر من 470 تعدداً شكلياً SNP، تؤثر على قبط الفيتامين، وتعتبر عوامل خطورة للعديد من الأمراض [7]، [8]، [9]، من أكثر التعدّات الشكلية المدروسة FokI في الاكسون 2، BsmI في الاكسون 8، TaqI في الاكسون 9، و ApaI في الاكسون 9 [10].

أظهرت الدراسات أنّ التعدّد الشكلي FokI يرتبط مع التهاب النسيج حول السنّية المزمن الشديد في المجتمع الياباني [3]، بينما لم توجد أيّ فروقٍ إحصائية بين FokI ومجموعتي الدراسة (مرضى وأصحاء) في المجتمع اللبني [1]، وبسبب اختلاف النتائج حسب مجتمع الدراسة والدور الحيوي لمستقبل الفيتامين د في الاستجابة المناعية، واستقلاب العظم اللذين يتدخلان في إمرضية التهاب النسيج حول السنّية المزمن تهدف دراستنا للتحرّي عن تأثير FokI في الحساسية للمرض في المجتمع السوري.

أهمية البحث وأهدافه:

على الرغم من وجود أدلة على دور المحدّات الجينية، وبسبب اختلاف النتائج حسب مجتمع الدراسة، فإن نتائج الدراسات المتوفرة لاتزال موضع جدلٍ، ولعدم وجود دراسةٍ مماثلة في سورية فقد دفعنا ذلك لإجراء دراسة على مجموعةٍ من مرضى التهاب النسيج حول السنّية المزمن لتحرّي علاقة المرض بالتعدّات الشكلية في جين مستقبل الفيتامين د، العمر، والجنس في المجتمع السوري، وذلك من خلال:

- I. دراسة نسب انتشار الأليلات (alleles) في الموقع الجيني FokI عند المرضى السوريين المصابين بالتهاب النسيج حول السنّة المزمن مقارنةً مع الأفراد الأصحاء من الناحية حول السنّة;
- II. تقييم ارتباط المشعرات السريرية حول السنّة والأنماط الجينية المدروسة والعمر، والجنس مع المرض حول السنّي.

طرائق البحث ومواده:

تمّ إجراء دراسة مقطعية Cross Sectional Study على 80 مراجعاً لقسم علم النسيج حول السنّة / كلية طب الأسنان / جامعة دمشق، ومركز أديب اللحام التخصصي لطب الأسنان خلال الفترة الواقعة ما بين 19/12/2016 وحتى 10/8/2017، حيث تمّ جمع عينات الدم من المشتركين الذين تتوفر لديهم شروط قبول محددة، توزعت العينات إلى مجموعتين:

1. مجموعة مرضى التهاب النسيج حول السنّة المزمن (Chronic Periodontitis (ChP): تضم 50 مريضاً لديهم التهاب نسيج حول سنّة مزمن بحيث حدّد التهاب النسيج حول السنّة وفقاً للمعايير الموضوعية من قبل الجمعية الأمريكية لعلم النسيج حول السنّة [11]1999، وتضمّنت هذه المجموعة 17 سيّدة (34%) ، و 33 رجلاً (66%)، بمتوسط عمر 64 ± 0.722 عاماً.
2. المجموعة الشاهدة المقاومة للمرض حول السنّي (Resistant Control (RC): تضم 30 مريضاً أعمارهم أكبر من 40 سنةً بمتوسط 50 ± 0.63 عاماً، متطابقين من حيث العمر والجنس مع مجموعة المرضى ($p.value > 0.05$)، مع غياب فقد الارتباط السريري، وعدم وجود أعماق جيوب أكبر من 3 ملم في جميع المواقع.

(a) معايير الإدخال Inclusion Criteria

- ✓ عدد الأسنان الموجودة في الفم أكثر من 20 سنّاً;
- ✓ العمر 40-70 عاماً

(b) معايير الاستبعاد Exclusion Criteria

- ✓ أقل من 20 سن طبيعى باستثناء الأرحاء الثالثة.
- ✓ المصابين بأمراض جهازية كالسكريّ أو موضعية فموية (غير التهاب اللثة).
- ✓ استخدام المضادات الحيوية أو معالجات حول سنّة خلال الأشهر الثلاثة الأخيرة.
- ✓ الحمل والإرضاع.
- ✓ التدخين.

تضمّن العمل ثلاث مراحل أجريت في مخابر كلية الصيدلة _ جامعة دمشق:

1. عزل الدنا DNA من عينات الدم
2. إجراء تفاعل البوليميراز التسلسلي Polymerase Chain Reaction PCR
3. الهضم بواسطة أنزيم القطع FokI

عزل الدنا:

تم عزل الدنا باتباع بروتوكول يدوي باستخدام sodium dodecyl sulfate، TE buffer، و proteinase K، و NaCl، urea، (SDS). وتم قياس تركيز ونقاوة الدنا المعزول باستخدام جهاز Nano drop 2000 (من شركة Thermo scientific، USA) في مركز الدراسات الويائية والبيولوجية لطفيليات اللشمانية.

إجراء تفاعل البوليميراز التسلسلي (PCR) Polymerase Chain Reaction

أجري تفاعل PCR باستخدام زوجين من المشارع primers من شركة (Eurofins Genomics، Germany) مجفدة ومنقاة بالكروماتوغرافيا HPLC، وتم حلها حسب تعليمات الشركة المصنعة:

SNP name	DbSNP	SNP type	SNP site	primers' sequences
FokI	2228570	C/T	Exon 2	For 5'-AGCTGGCCCTGGCACTGACTCTGGCTCT-3' Rev 5'-ATGGAAACACCTTGCTTCTTCTCCCTC-3'

وباستخدام عتيدة 1.1 * PCR SuperMix من شركة (GeneDirex، USA)، تم تطبيق البرنامج الحراري الموضح في الجدول (1) [12]:

الجدول (1): البرنامج الحراري المستخدم لإجراء تفاعل PCR

Step	Temperature	Time	Cycle number
Initial denaturation	94.5°C	5 min	1
Denaturation	94°C	30 sec	30
Annealing	60°C	30 sec	
Elongation	72°C	30 sec	
Final elongation	72°C	10 min	1

تم إظهار نتائج التضخيم بالترحيل على هلامة الأغاروز 2%، باستخدام دائرة TBE 1X. تم استخدام أنزيم قطع FokI لشركة (Thermo scientific، USA)، ودرجة الحرارة المثلى لعمل الأنزيم 37°C، والعمل حسب تعليمات الشركة المصنعة.

الدراسة الإحصائية :

تم إنجاز التحليل الإحصائي باستخدام برنامج (SPSS، version 22) استخدم اختبار كاي مربع Chi-square لتحليل المعطيات بين المجموعات لمعرفة ما إذا كانت الفروقات الملاحظة بين المجموعات يعنّد بها إحصائياً (في حال كانت p.value أصغر من 0.05) أو أن هذه الفروقات ناتجة عن المصادفة (في حال كانت p.value أكبر من 0.05)، وحساب odds ratios (ORs) بمجال ثقة confidence (intervals) 95%.

تمت مقارنة النمط الجيني وتواتر الأليلات (TT، TC، CC) بين مجموعتي الدراسة.

النتائج:

تراوحت أعمار المرضى بين 40-70 عاماً، وتمّ توزيعها لثلاث مجموعات: (49 - 40)، (59 - 50)، (69 - 60)، وكذلك قسّمت شدة المرض حسب عمق الجيب حول السنّي إلى: خفيف (PD=4 - 5mm)، متوسط (PD= 6-7mm)، شديد (PD>7mm).

يظهر الجدول (2) توزّع عينات المرضى والشواهد حسب الجنس، العمر، شدة المرض، ولم يظهر فروقاً إحصائية بين هذه المجموعات ($p.value > 0.05$).

الجدول (2): توزّع عينات الدراسة

ChP(N=50)				RC (N= 30)	المجموعات	
خفيف	متوسط	شديد	الكلّي			
8	10	15	33 (66%)	18 (60%)	ذكور	الجنس
3	5	9	17 (34%)	12 (40%)	إناث	
			64 ± 0.722	50 ± 0.63		العمر (mean±SD)
2	12	10	24 (48%)	17(56.67%)	40-49	المجموعات العمرية
7	3	11	21 (42%)	11(36.67%)	50-59	
2	0	3	5 (10%)	2(6.66%)	60-69	

تمّ حساب تواتر الأنماط الجينية والأليات بين مجموعتي الدراسة، ولكن لم يوجد أي فارق يعتدّ به إحصائياً بين التواترات والمجموعات ($p.value > 0.05$).

الجدول (3): توزّع الأنماط الجينية والأليات بين مجموعتي الدراسة

CI (95%)	OR	P*	ChP(N=50)	RC (N= 30)	الأنماط الجينية
0.284 - 1.929	0.740	0.538	15 (30%)	11 (36.7%)	TT
0.553 - 3.465	1.385	0.486	24 (48%)	12 (40%)	CT
0.315 - 2.725	0.890	0.890	11 (22%)	7 (23.3%)	CC
					الأليات
0.367 - 3.173	0.890	0.890	54 (54%)	34 (56.7%)	T
0.567 - 3.910	0.418	0.418	46 (46%)	26 (43.3%)	C

تمّ حساب تواتر الأنماط الجينية بين مجموعتي الدراسة حسب الجنس، وكذلك لم يوجد أي فارق يعتدّ به إحصائياً بين التواترات والمجموعات ($p.value > 0.05$).

الجدول (4): توزع الأنماط الجينية بين مجموعتي الدراسة حسب الجنس

الأنماط الجينية				
TT	CT	CC		
10	17	6	ذكور	ChP(N=50)
5	7	5	إناث	
7	7	4	ذكور	RC (N= 30)
4	5	3	إناث	

المنافشة:

إنّ التهاب النسيج حول السنّية المزمن أحد أكثر الأمراض الالتهابية شيوعاً، يؤثر على النسيج الداعمة للأسنان، يحدث بسبب تشكّل فيلم جرثومي على سطح السنّ، ويحرّض بدء الالتهاب والاستجابة المناعية، التي تؤدي إلى تخرب النسيج الضامة والعظم السنخي، وفي مراحل متقدمة فقد الأسنان، وقد يؤدي لأمراض جهازية خطيرة كاحتشاء عضلة القلب، وتشير الدراسات إلى سبببات المرض التي تتضمن الجراثيم، الاستجابة المناعية، العوامل البيئية كالتدخين، والجينية مثل التعدّات الشكلية لمستقبل الفيتامين د [13].

إنّ التعدّد الشكلي SNPFokI الذي يتوضع في موقع بدء الترجمة للإكسون 2 في منطقة الترميز 5` في جين مستقبل الفيتامين د VDR، هو استبدال T/C transition يؤدي لخلق ببتيّد أقصر بثلاثة حموض أمينية من البروتين كامل الطول، يظهر بروتين VDR الأصغر فعالية انتساخ عالية [14]، ويرسل إشارات مرتبطة بارتشاف العظم والالتهاب أكثر فعالية مقارنة مع البروتين الطبيعي، وبالتالي قد يؤهّب للإصابة بالتهاب النسيج حول السنّية المزمن [3].

شملت دراستنا على 80 عينة، توزعت بين 50 مريضاً بالتهاب النسيج حول السنّية المزمن، و30 عينة شاهدة، وقسمت إلى ثلاث مجموعات عمرية، وأجريت الاختبارات الإحصائية باستخدام اختبار كاي مربع واعتماد قيمة $p=0.05$ لمعرفة توزع التكرارات، وإيجاد علاقة بين الجنس، العمر، والتعدّد الشكلي FokI مع المرض، ولكن لم تظهر النتائج أي فارق يعتدّ به إحصائياً بين مجموعات الدراسة وتواتر الأنماط الجينية والأليلات، وكذلك العمر والجنس.

تمّ تحديد التدخين كعامل خطورة أساسي، يرتبط بزيادة في حدوث وشدة التهاب النسيج حول السنّية، بعض الأحيان يعتبر الارتباط الجيني بالتهاب النسيج حول السنّية مؤشراً فقط عند استبعاد التدخين، تأكيداً على أهمية عامل الخطورة، واقتراح أن تأثيره قوي بشكل كافٍ ليظهر في الحالات غير المستعدة جينياً لالتهاب النسيج حول السنّية، لذا تمّ استبعاد المدخنين من الدراسة.

لم تجد العديد من الدراسات أي علاقة بين التعدّد الشكلي FokI والتهاب النسيج حول السنّية المزمن كما في دراسة [15] Chen et al عند الآسيويين، ودراسة [1] El Jilani et al في المجتمع الليبي، وقد وجدنا لأخيرة نسبة عالية من الإصابة عند الذكور مقارنةً بالإناث، رغم أنها ليست ذات فارق إحصائي يعتدّ به، ويمكن تفسير ذلك بقلة العناية الفموية، والاهتمام بزيارة الطبيب، وهذا يتوافق مع نتيجتنا، كذلك وجد إن FokI لا يرتبط مع SNPs أخرى في VDR كمؤهّب للمرض في مجتمعات مثل Gambia (غرب إفريقيا)، بريطانيا، النرويج، فنلندا، ورومانيا [3].

بينما اختلفت دراستنا مع دراسة على المجتمع الياباني قائلانّ التعدّد الشكلي FokI أقل احتمالية لحدوث التهاب نسيج شديد مقارنةً مع النمط متغاير الزيجوت TC، ودراسة النمط الفردي haplotype للتعدّات الشكلية (ApalI،

BsmI and *FokI*) مجتمعة وبشكل متماثل الزيجات، تبين أنها ذات خطورة عالية للإصابة بالتهاب النسيج حول السنّة الشديداً [16].

تفسر العديد من العوامل التناقضات الملاحظة في هذه الدراسات، حيث تعتبر الاختلافات البيئية والعرقية *racial* في المجتمعات عاملاً عالي الأهمية، فالتعددات الشكلية قد تتفاعل مع العوامل البيئية لتؤثر على الحساسية تجاه المرض. بعض العوامل البيئية أساسية في حدوث المرض، فمثلاً الوارد الغذائي المنخفض من الكالسيوم يؤدي لزيادة شدة أمراض النسيج حول السنّة، كذلك تؤثر معايير اختيار المجتمع المدروس على النتائج.

ينكوّن بروتين VDR من ثلاثة ميادين *domains* مميزة، النهاية الأمينية *N-terminal dual zinc finger DNA-binding domain*، النهاية الكربوكسيلية منطقة الفعالية للربط للجين، ومنطقة غير بنوية تربط منطقتي البروتينين الوظيفيتين معاً، ويشكل معقدًا متوياً متغيراً *heterodimer* مع *retinoid-X- receptor (RXR)*، لذلك ورغم أن البروتين الطافر ذو فعالية انتساح عالية، نعتقد أنّ هذه الفعالية قد تتأثر بوجود *SNPs* أخرى في أحد الميادين الرابطتين للدنا أو اللجين، أو في الجين المرمّز لـ *RXR*، ما يعدّل من ارتباط اللجين أو تشكل المعقد، وبالتالي وظيفة المستقبل، كذلك فإن توضع هذه التعدّات الشكلية على نفس الصبغي (*haplotypes*) قد يكون عاملاً مؤثراً في فعالية كل منهما، واختلاف تأثيره على الحساسية تجاه المرض من مجتمع لآخر.

إن التهاب النسيج حول السنّة من الأمراض المعقّدة التي ترتبط بشكل عام بتغيّرات *variations* في عدة جينات، كل منها تظهر تأثيرات أصغرية على الاستعداد أو تطوّر المرض، بالإضافة إلى أنّ عدد ونمط الجينات الوظيفية قد يختلف في المجموعات العرقية المختلفة، وقد أظهرت العديد من الدراسات أنه لا يوجد جين مفردة كافية لحدوث *CP* [17]، لذا فإن *CP* يتأثر بأكثر من جين واحدة، وقد يسهّل تحديد الجينات المرتبطة بالمرض تقدير الخطورة والوقاية.

الاستنتاجات والتوصيات

الاستنتاجات:

لم تظهر دراستنا أي علاقة بين العمر، الجنس، والتعدّد الشكلي *FokI* في جين مستقبل الفيتامين د والتهاب النسيج حول السنّة المزمن في المجتمع السوري.

التوصيات:

- دراسة التعدد الشكلي *FokI* مع تعدّات شكلية في مواقع أخرى من *VDR* أو في جينات مجاورة.
- استخدام عدد أكبر من العينات للحصول على مؤشر أفضل عن إمراضية *CP*.

المراجع:

1. El JILANI, M.M., et al., *Association between vitamin D receptor gene polymorphisms and chronic periodontitis among Libyans*. *Libyan J Med*, 2015. 10: p. 26771.
2. STABHOLZ, A., W.A. SOSKOLNE, and L. SHAPIRA, *Genetic and environmental risk factors for chronic periodontitis and aggressive periodontitis*. *Periodontol* 2000, 2010. 53: p. 138-53.

3. WANG, X., T.L. ZHANG, and D. CHEN, *Lack of association between the vitamin D receptor polymorphism rs2228570 and chronic periodontitis in a Han Chinese population*. Genet Mol Res, 2015. 14(4): p. 12299-305.
4. WIEBE, C.B. and E.E. PUTNINS, *The periodontal disease classification system of the American Academy of Periodontology--an update*. J Can Dent Assoc, 2000. 66(11): p. 594-7.
5. ARMITAGE, G.C., *Development of a classification system for periodontal diseases and conditions*. Ann Periodontol, 1999. 4(1): p. 1-6.
6. KINANE, D.F., H. SHIBA, and T.C. HART, *The genetic basis of periodontitis*. Periodontol 2000, 2005. 39: p. 91-117.
7. HADDAD, S., *Vitamin-D receptor (VDR) (gene polymorphisms (Taq-I & Apa-I) in Syrian healthy population*. Meta gene, 2014. 2: p. 646-650.
8. Mostowska, A., et al., *Vitamin D receptor gene BsmI, FokI, ApaI and TaqI polymorphisms and the risk of systemic lupus erythematosus*. Mol Biol Rep, 2013. 40 : (2) p. 803-10.
9. KILIC, S., et al., *Vitamin D Receptor Gene BSMI, FOKI, APAI, and TAQI Polymorphisms and the Risk of Atopic Dermatitis*. J Investig Allergol Clin Immunol, 2016. 26(2): p. 106-10.
10. LEE, S.W., et al., *VDR and VDBP genes polymorphisms associated with susceptibility to tuberculosis in a Han Taiwanese population*. J Microbiol Immunol Infect, 2016. 49(5): p. 783-787.
11. EKE, P.I., et al., *Update of the case definitions for population-based surveillance of periodontitis*. J Periodontol, 2012 : (12)83 .p. 1449-54.
12. GROSS, C., et al., *The presence of a polymorphism at the translation initiation site of the vitamin D receptor gene is associated with low bone mineral density in postmenopausal mexican-American women*. Journal of Bone and Mineral Research, 1996. 11(12): p. 1850-1855.
13. HEIDARI, Z., et al., *The association between interleukin-28B gene polymorphisms as a potential biomarker and the risk of chronic Periodontitis in an Iranian population*. Head & face medicine, 2017. 13(1): p. 16.
14. ALIMIRAH, F., et al., *Functional significance of vitamin D receptor FokI polymorphism in human breast cancer cells*. PLoS One, 2011. 6(1): p. e16024.
15. Chen, L.l., et al., *Association between vitamin D receptor polymorphisms and periodontitis: A meta-analysis*. Journal of periodontology, 2012. 83(9): p. 1095-1103.
16. NAITO, M., et al., *Association between vitamin D receptor gene haplotypes and chronic periodontitis among Japanese men*. International journal of medical sciences, 2007. 4(4): p. 216.
17. ASHOK, N., et al., *Toll-like receptor 9 gene polymorphism in chronic and aggressive periodontitis patients*. Journal of Indian Society of Periodontology, 2014. 18(6): p. 723.