



МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ
ФАКУЛТЕТ ПО ДЕНТАЛНА МЕДИЦИНА

КАТЕДРА ПАРОДОНТОЛОГИЯ

РЪКОВОДИТЕЛ: ПРОФ. Д-Р ХРИСТИНА ЛАЗАРОВА ПОПОВА, ДМ

Д-р Любомир Деянов Стефанов

**ВРЪЗКА МЕЖДУ ПАРОДОНТИТ
И РЕВМАТОИДЕН АРТРИТ.
КЛИНИЧНИ, ИМУНОЛОГИЧНИ,
МИКРОБИОЛОГИЧНИ И ГЕНЕТИЧНИ
ИЗСЛЕДВАНИЯ**

Дисертационен труд за присъждане на образователна
и научна степен "Доктор"

Научен ръководител:

Доц. д-р Теодора Николаева Болярова-Конова, дм

София, 2020 г.

СЪДЪРЖАНИЕ

I.	ВЪВЕДЕНИЕ.....	6
II.	ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР	8
	1. Пародонтит.....	8
	2. Ревматоиден артрит.....	14
	3. Общи патогенетични механизми в протичането на пародонталните и системните заболявания.....	16
	3.1. Инфекция	20
	3.2. Възпаление. Вроден имунен отговор. Маркери на възпалението .	21
	3.3. Придобит имунитет. Хуморален имунен отговор	26
	4. Ревматоидният артрит и микробната инфекция.....	29
	4.1. Ревматоиден фактор и пародонтит	30
	4.2. Цитрулинация, орални микроорганизми и ревматоиден артрит ...	33
	5. Генетични аспекти на връзката на пародонтита с ревматоидния артрит	39
	5.1. Полиморфизъм на FcgR гените	41
	5.2. Полиморфизъм на гени, свързани с експресия на общи за П и РА инфламаторни медиатори	43
	6. Тютюнопушене – общ рисков фактор на средата за пародонтит и ревматоиден артрит	46
	7. Слюнката – възможен диагностичен флуид	49
	ЗАКЛЮЧИТЕЛЕН АНАЛИЗ	54
	НАУЧНА ХИПОТЕЗА	56
III.	ЦЕЛ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД	58
IV.	ЗАДАЧИ.....	58
V.	ОБЕКТ НА ИЗСЛЕДВАНЕТО.....	59
VI.	МЕТОДИ.....	63
VII.	РЕЗУЛТАТИ.....	74
	Резултати по задача 1 – Съпоставяне на наличието и тежестта на РА с наличието и тежестта на П	74

Резултати по задача 2 – Определяне на присъствието и количеството на ревматоиден фактор (RF) и антитела срещу цитрулинирани протеини (АСРА) в гингивална кревикуларна течност при пациенти с П, с РА и с комбинация от двете заболявания и изследване на връзката им с наличието и изявата на двете заболявания.....	81
Резултати по задача 3 – Определяне на присъствието и количеството на антитела срещу цитрулинирани протеини (АСРА) в слюнка при пациенти с П, с РА и с двете заболявания и изследване на връзката им с наличието и изявата на РА и П.	87
Резултати по задача 4 – Идентифициране чрез PCR на пародонтопатогените: <i>P. gingivalis</i> , <i>P. intermedia</i> , <i>T. denticola</i> , в субгингивална плака във връзка със заболяванията ревматоиден артрит и пародонтит	97
Резултати по задача 5 – Изследване на генния полиморфизъм на FcgIIIa158V/F при пациенти с пародонтит, с ревматоиден артрит, с ревматоиден артрит и пародонтит и при здрави индивиди във връзка с изявата на двете заболявания. Изследване на комбинираното влияние на FcgIIIa158V/F и тютюнопушене върху изявата на пародонтита и ревматоидния артрит	107
Резултати по задача 6 – Изследване на влиянието на факторите на средата – тютюнопушене, пол, образование, възраст върху изявата на пародонтита и ревматоидния артрит и евентуалното им определяне като общи рискови фактори за двете заболявания	117
VIII. ОБСЪЖДАНЕ	130
IX. ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	156
X. ИЗВОДИ.....	157
XI. ПРИНОСИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД И ПРЕПОРЪКИ.....	159
XII. ПУБЛИКАЦИИ, ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД.....	161
XIII. ПРИЛОЖЕНИЯ.....	162
XIV. БИБЛИОГРАФИЯ	183

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ:

П	Пародонтит
РА	Ревматоиден артрит
СУЕ	Скорост на утаяване на еритроцитите
АСРА	Антитела срещу цитрулинирани протеини
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>
Anti-CCP	Антитела срещу цикличен цитрулиниран пептид
CAL	Clinical attachment loss (загуба на аташман)
CRP	С-реактивен протеин
<i>C. rectus</i>	<i>Campilobacter rectus</i>
DAS 28 CRP	Disease activity score 28 CRP
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
F	Furcation lesion (фуркационно увреждане)
<i>F. nucleatum</i>	<i>Fusobacterium nucleatum</i>
HLA	Human leukocyte antigene човешки левкоцитни антигени
IFN-γ	Интерферон гама
IgA, IgG, IgM, IgE, IgD	Имуноглобулини А, G, М, Е, D
IL	Интерлевкин
LPS	Липополизахариди
MHC	Major histocomptatibility complex – главен комплекс за тъканна съвместимост
MMP	Матриксни металопроотеинази
NETs	Neutrophil extracellular traps
NK	Natural killer cell
OPG	Остеопротегерин
<i>P. gingivalis</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
<i>P. intermedia</i>	<i>Prevotella intermedia</i>
PAD (PADs), ПАД	Пептидил-аргинин деиминази

PBI	Papillary bleeding index (индекс на повърхностното гингивално кървене)
PD	Pocket depth (дълбочина на джоба, дълбочина на сондиране)
PGE2	Простагландин Е 2
PISA	Periodontal inflamed surface area
PPAD (PPADs), ППАД	Пептидил-аргинин деиминази, продуцирани от <i>P. gingivalis</i>
R	Recession (рецесия)
RANKL	Рецептор активатор на нуклеарен фактор-капа-β-ли- ганд
RF	Ревматоиден фактор
<i>T. denticola</i>	<i>Treponema denticola</i>
<i>T. forsythia</i>	<i>Tannerella forsythia</i>
T regs	Т-регулаторни клетки
TNF-α	Tumor necrosis factor alfa

I. ВЪВЕДЕНИЕ

Пародонтитът е хронично, мултифакторно, инфламаторно заболяване, асоциирано с дисбиотичен биофилм и характеризиращо се с прогресивна деструкция на поддържащите зъба структури (288). Основните му характеристики са загуба на аташман, загуба на алвеоларна кост, формиране на пародонтални джобове и кървене при сондиране (76). Пародонтитът е заболяване със значимо въздействие върху общественото здраве поради широкото си разпространение. Между 5 и 15% от всяка популация са засегнати от тежък генерализиран пародонтит (277). Пародонталните заболявания могат да доведат до загуба на зъби и са една от причините за пълното обеззъбяване, засягат негативно дъвкателната функция и естетиката. Това може да е причина за влошено качество на живот и неравносечно социално положение. Пародонталните заболявания имат негативно въздействие върху системното здраве (288).

Ревматоидният артрит е хронично, инфламаторно ставно заболяване с неизяснена етиология, автоимунна патогенеза, разнообразна клинична картина и непредсказуемо протичане (4). РА е разпространен приблизително при 1% от световната популация. Разпространението се увеличава с възрастта и е 3 пъти по-често при жените, като са засегнати 5% от жените на възраст над 55 г. (257, 318). Главната клинична проява е прогресиращият ерозивен артрит, водещ до фиброзна пролиферация и анкилоза на периферните стави в крайните етапи на болестта (4). Това е причина за тежко и необратимо инвалидизиране на болните, като налага скъпо и продължително лечение и специални грижи (4).

Пародонтитът и ревматоидният артрит са две широко разпространени хронични инфламаторни заболявания. И двете състояния се характеризират с локална възпалителна реакция, инициирана от антигенен стимул и поддържана от клетките на имунната система чрез продължителна продукция на проинфламаторни медиатори, придружена от значителна деструкция на меки и твърди тъкани. И двете заболявания проявяват някои сходни, генетично обусловени патогенетични механизми – клетъчна инфилтрация, ензимна и цитокинова активност. Налице са промени в основни инфламаторни механизми. Природата на тези промени е все

още неясна. Въпреки това има много доказателства в подкрепа на идеята, че и двете заболявания се проявяват в резултат на дисбаланс между проинфламаторни и антиинфламаторни цитокини.

През последните години пародонтитът и ревматоидният артрит са разглеждани като комплексни или екогенетични заболявания. Като такива те имат генетична компонента, включваща множество гени във взаимодействие с факторите на средата. Комплексните заболявания са хронични заболявания обикновено с късно начало и фамилна агрегация, но не са изключени и ранни прояви с по-тежка клинична манифестация. Така в отговор на инициращ агент, факторите на средата взаимодействат с генетичните фактори и детерминират предразположението на индивида към заболяване. Това взаимодействие иницира и регулира имуноинфламаторния отговор. Клиничната проява на хроничните заболявания, в това число и на пародонтита и ревматоидния артрит, е повлияна от фактори на средата или модифициращи фактори – демографски, социално-икономически, начин на живот, хранителен режим, хормонални и физиологични промени.

II. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР

1. Пародонтит

В съвременната литература пародонтитите се разглеждат като инфекциозни заболявания, предизвикани от бактериалния биофилм, адхериран по зъбната коренова повърхност (83).

Съвременната концепция за патогенезата на пародонтита (286) е, че субгингивалният биофилм пропагира апикално в гингивалния сулкус, нарушавайки връзката между коронарната част на свързващия епител и зъба. Свързващият епител се превръща в епител на джоба – образува се пародонтален джоб, при който единствената бариера между бактериалния биофилм и съединителната тъкан е тънкият, на места улцерирал джобен епител, през който бактериалните продукти (като липополизахариди – LPS) и бактериите намират достъп до съединителната тъкан и кръвоносните съдове. Отделените липополизахариди и други вирулентни фактори, предимно от Грам-отрицателните микроорганизми от субгингивалния биофилм активират клетките на свързващия и на сулкуларния епител, деленето и секретирането на провъзпалителни медиатори, включително IL-8, IL-1 α , които привличат и активират неутрофили. Кръвоносните съдове на микроциркулацията са възпалени и високопропускливи. Ендотелните клетки също се активират. В резултат на това първо неутрофили, а след това и моноцити и лимфоцити мигрират през съдовата стена в извънсъдовото пространство, където образуват възпалително-клетъчния инфилтрат. Инфилтрираните моноцити се активират от липополизахаридите и интерферон- γ (IFN- γ) за секреция на IL-1 β , TNF- α , PGE2 и матриксни металопротеинази (ММР – голяма група ензими, които разграждат коллагена и всички компоненти на съединително-тъканния екстрацелуларен матрикс).

В патогенезата на пародонтитите се включват клетъчният и хуморалният имуноен отговор. Инфилтрираните Т- и В-лимфоцити се активират от различните бактериални антигени и цитокини и започват да секретират интерлевкини (IL-2, -3, -4, -5, -6, -10) и IFN- γ . Разширяват се Т-клетъчните клонове и се диференцират В-клетки в антитяло-произвеждащи плазматични клетки. IFN- γ индуцира и увеличава продукцията на простагландин E2 (PGE2) и матрикс-металопротеинази

(MMP), а тези молекули медираат деструкцията на екстрацелуларния матрикс на гингивата и пародонталния лигамент и резорбцията на алвеоларната кост.

В разширяващата се пародонтална лезия се включват и фибробласти, ендотелни и епителни клетки. Това води до увеличаване на разграждането на колагена, екстрацелуларния матрикс на съединителната тъкан и до алвеоларна костна загуба.

Общите механизми в патобиологията на пародонтитите се влияят от рискови фактори, които модифицират болестта – това са генетичните фактори и факторите на средата, които се различават в отделните етапи и форми на заболяването (285). Клиничната картина е резултат от комплексното взаимодействие между микробния фактор, общите механизми на възпалителната и имунната реакция и рисковите фактори. Такива рискови фактори могат да бъдат някои наследствени фактори, диабет, лекарства или заболявания, които компрометират защитата на организма, възраст, лоша орална хигиена, стрес, тютюнопушене, които могат да присъстват или липсват в различни етапи от живота и да варират по степен. Някои от тези фактори са рискови и за други системни заболявания, между които и ревматоидния артрит (285).

Пародонталните заболявания често се съпътстват от транзиторна бактериемия, която се изразява в навлизането на много микроорганизми и техни продукти [вкл. липополизахариди (LPS)] в кръвната циркулация (150, 228, 416), където те могат да активират директно левкоцити, тромбоцити или ендотелни клетки. Пародонталната лезия се смята за продължително обновяващ се източник за системно разпространение на бактериални антигени, Грам-отрицателни бактерии, които водят до активиране на локалната и системната имунна защита на макроорганизма, свързано с увеличаване на продукцията на множество провъзпалителни фактори (цитокини, химиокини) и медиатори на тъканна деструкция (114, 167, 196, 299).

Диагнозата пародонтит се основава главно на резултати от клинични изследвания, включващи параметри като: дълбочина на джоба, загуба на клиничен аташман, кървене при сондиране, засягане на фуркациите, зъбна подвижност, рентге-

нографски доказателства за загуба на кост и загуба на зъби. Пародонтитите се определят като семейство заболявания, които се различават по тяхната етиология, техния ход на протичане, скоростта на прогресия и отговора към лечението (293). Значение в патогенезата имат етиологичните, генетичните и факторите на средата. Критичен за развитието на хроничния пародонтит е субгингивалният бактериален биофилм, но отговорът на организма е важен за изявата и прогресията на пародонтита.

Предизвиканият от инфекция локален възпалителен процес на пародонта се счита за възможен механизъм, активиращ системния възпалителен отговор и разпространението на инфекцията (243, 321). Възпалително-деструктивният процес в пародонта обуславя увеличаването на серумните маркери на възпаление. Пародонтитът не е изолирано заболяване в устната кухина, а има значително системно отражение.

В последните 30 години класификацията на пародонталните заболявания е била многократно променяна в стремеж за съответствие с актуалните научни доказателства и клиничната практика. Международно приетата и широко използвана класификация от 1999 г. (Според нея пародонталните заболявания се класифицират като: хронични; агресивни; пародонтити като манифестация на системни заболявания; пародонтити, свързани с ендодонтски лезии, които съществуват в стабилна или активна форма) (17) има някои сериозни недостатъци, сред които – съществено припокриване и липса на ясно патобиологично разграничаване между някои от установените категории и отсъствие на ясни диагностични критерии. Необходимо бе нова класификационна система, която да ревизира и коригира настоящата, като вземе под внимание натрупаните нови знания относно епидемиологията, етиологията и патогенезата на пародонталните заболявания и състояния.

През последните години сериозно предизвикателство представлява поставянето на диагноза агресивен пародонтит и диференцирането му от хроничната форма на пародонтита. Конфликтните резултати в световната литература относно агресивната форма на пародонтита се дължат главно на това, че съществуващата класификация е твърде обширна, заболяването е трудно да бъде проучено от са-

мото начало и има прекалено малко дългосрочни проучвания, включващи различни популация и множество времеви точки. Parapanou et al. (288) твърдят, че е необходима по строга дефиниция на тази форма на пародонтит, която да се базира на съвременни методологии за по-добро познаване на патогенезата, диагностиката и лечението на това заболяване. Според Fine et al. (108) идентификацията на генетични, микробиологични и имунологични маркери е от голямо значение за дефинирането на агресивния пародонтит. В класификацията от 1999 г. възрастта на пациента и скоростта на прогресия на загубата на аташман и алвеоларна кост са от голямо значение за поставяне на диагноза агресивен пародонтит. Billings et al. (39) разглеждат влиянието на възрастта върху загубата на аташман и върху относителния принос на дълбочината на джоба и рецесията за загубата на аташман. Те поставят въпроса за възможността за дефиниране на възраст-зависим праг на загубата на аташман за тежък пародонтит. Авторите установяват, че възрастта е значима детерминанта за клиничната изява на пародонтита, свързана със загубата на аташман, а относителният принос на дълбочината на джоба и рецесията за нивото на клиничен аташман се променя с възрастта. Според тях съществените фенотипни различия в различните възрастови групи подсказват, че други фактори извън възрастта са от основно значение за предразположеността към пародонтални заболявания. Needleman et al. (259) правят преглед на множество публикации, включващи над 8600 участници, относно скоростта на прогресия на загубата на аташман и установяват, че средната годишна загуба на аташман варира значително във и между различните популации без значение на пола и възрастта. Тяхното заключение е, че доказателствата нито подкрепят, нито отричат диференцирането на различните форми на пародонтит на базата на скоростта на прогресия на загубата на аташман при индивиди над 18 години.

Според Tonetti et al. (371) няма достатъчно доказателства за специфични патофизиологични механизми за диференциация на хроничните от агресивните пародонтити, липсват достатъчно доказателства да се твърди, че хроничният и агресивният пародонтит са различни заболявания, но има доказателства за редица фактори и взаимодействия между тях, които влияят на клиничната изява и на двете форми на пародонтит. Затрудненията по отношение на точното диференциране на

агресивния и хроничния пародонтит са в основата на обосновката за новата класификация на пародонталните заболявания, където тези две форми са обединени в една група – *Пародонтит* (64). Определянето на конкретната форма на пародонтита и на тежестта и разпространението на пародонталната деструкция трябва да бъдат допълнени от влиянието на продължителността на пародонтита, нуждата от специфични лечебни процедури и от потенциалния системен ефект на пародонталното заболяване. Новата класификационна схема, касаеща категорията *Пародонтит*, е базирана на многостранна рамка за определяне на стадия и рисковия клас от прогресията на заболяването (371). Стадият на пародонтита се определя от тежестта и разпространението на пародонталната деструкция и се допълва от комплексността в индивидуалния лечебен подход. Критериите за тежест са: загуба на клиничен аташман, загуба на алвеоларна кост и загуба на зъби, дължаща се на пародонтит. Факторите, които определят комплексността в лечението и контрола на заболяването, са: дълбочина на сондиране, тип на костната загуба, фуркационни лезии, дефекти на алвеоларния гребен, нарушена мастикаторна функция, вторична оклузална травма и подвижност, понижаване на захапката и миграция на зъби. Тези фактори могат да утежнят диагнозата и наличието дори само на един от тях е достатъчно за преминаване в по-горен стадий. За по-точно дефиниране на диагнозата се въвеждат рискови класове за прогресия на пародонтита. Те се базират на скоростта на прогресия на пародонталната деструкция, изразена в загуба на аташман или кост за период от 5 години или на индиректни критерии, като наличие и количество на зъбна плака и съотношение между загуба на алвеоларна кост спрямо възраст. Рисковите класове за прогресия на пародонтита се определят и въз основа на оценка на риска от бъдеща прогресия на заболяването според наличието на рискови фактори, като: тютюнопушене и наличие на диабет и неговия гликемичен контрол, както и въз основа на риска от възможно системно влияние на пародонталното заболяване. Оценката на риска за системно влияние се базира на определянето на инфламаторната тежест на пародонтита чрез качествено и количествено идентифициране на някои биомаркери и индикатори на загубата на кост и аташман в слюнка, гингивална течност и серум. За дефинирането

на подобни биомаркери и техните количествени концентрационни прагове са необходими още конкретни научни доказателства.

Във връзка с инфламаторната тежест на пародонтита и възможното му влияние върху системното състояние на индивида, интерес представлява една публикация на Nesse et al. (261) от 2008 г. В нея авторите предлагат класификация на пародонтита според количествено представяне на обема възпалени пародонтални тъкани, която да може да бъде лесно и широко приложима в клиничната практика и в научните проучвания. Пародонтитът е възможен рисков фактор за някои системни заболявания чрез увеличаване на системната инфламаторна тежест. Биологичната обосновка за това е предизвикване на бактериемия, системен инфламаторен отговор и/или кросреактивност, водеща до автоимунна реакция. Според авторите е логично да се предположи, че колкото е по-голямо количеството възпалени тъкани, толкова е по-голяма е възможността за влияние на пародонтита върху системния имуен отговор. Някоя от съществуващите класификации на пародонталните заболявания не предлага количествена характеристика на възпалените пародонтални тъкани. Предложеният показател за количеството възпалени пародонтални тъкани (PISA) обединява няколко общоприети показателя за тежест и активност на пародонтита – загуба на клиничен аташман (CAL), дълбочина на пародонталния джоб (PD), рецесия (R) и кървене при сондиране (BoP). По този начин се вземат под внимание само възпалените тъкани на пародонта (там където има кървене при сондиране), отчита се наличието на рецесия и експонирана коренова повърхност, както и дълбочината на пародонталния джоб. Налична е свободно достъпна формула във формат Excel, която калкулира PISA в mm^2 . Авторите отчитат и някои недостатъци на предложената класификация на инфламаторната тежест на пародонтита – възможно е неточно измерване на показателите CAL, PD, R и BoP, формулата не отчита третото измерение на възпалената тъкан, а именно преминаването на възпалителния отговор в дълбочина на съединителната тъкан, затрудненията при наличие на псевдоджобове и гингивално разрастване, не отчита видовете микроорганизми в пародонталните джобове.

2. Ревматоиден артрит

РА е хронично аутоимунно заболяване, характеризиращо се с ерозивно-деструктивен артрит, има прогресиращ ход и в своята еволюция води до деформации, сублуксации и анкилози. Диагностицира се като хроничен възпалителен полиартрит, когато са засегнати 5 или повече стави (345). РА се характеризира с класически симптоми на възпаление – оток, болка, повишаване на температурата, загуба на функция, които при това заболяване се изразяват в оток на ставите, болка при палпация, сутрешна скованост, затруднени движения и прогресивна ставна деструкция, наблюдават се и рентгенографски промени в ставите. Има три форми – самоограничаваща се форма (индивиди с РА, но без изяви и симптоми за следващите 3-5 години), лесно контролирана форма (относително лесно контролирана само с нестероидни противовъзпалителни средства) и прогресивна – при нея пациентите се нуждаят от втора медикаментозна линия и въпреки това заболяването не е напълно контролирано (147). Като системно заболяване РА може да има и извънставни манифестации в органи и системи като бял дроб, очи, съдове и др. Диагнозата РА клинично се поставя въз основа на допълнителни критерии (2010 Rheumatoid Arthritis Classification Criteria – An American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism Collaborative Initiative), разпределени в 4 групи със съответна точкова система: ставно засягане, серологични показатели, острофазови протеини и продължителност на симптомите. Тези групи критерии се прилагат само когато е налице поне една става с клинични симптоми на синовит (оток) и този синовит не може да бъде обяснен с друго заболяване. Тогава се вземат под внимание допълнителните критерии, чиито общ брой точки трябва да е поне 6.

Диагнозата ревматоиден артрит се базира на клинична история на заболяването и клинични изследвания. Показатели от клиничното изследване определят болестната активност – Disease Activity Score – 28 (DAS-28). Този критерий включва клинични и лабораторни данни. 1. Брой болезнени и оточни стави (от общо 28 стави). 2. Визуална аналогова скала – субективна оценка на пациента за активността на болестта. 3. Стойността на СУЕ или CRP. Скорът се изчислява от ревматолога чрез DAS28 калкулатор. На базата на стойността му, активността на

заболяването се определя като: ремисия ($DAS \leq 2,6$), ниска ($2,6 < DAS \leq 3,2$), умерена ($2,6 < DAS \leq 5,1$), или висока $DAS > 5,1$ активност. Много лабораторни тестове допълват диагнозата ревматоиден артрит. Те включват: скорост на утаяване на еритроцитите, нива на острофазови протеини (нива на С-реактивен протеин), плазмен вискозитет, имуноглобулинов ревматоиден фактор и нива на антитела срещу цитролинирани протеини. Скоростта на утаяване на еритроцитите и нивата на С-реактивния протеин са информативни за острофазовия възпалителен отговор. Тези показатели корелират с клиничните прояви и с радиографските промени. В серума на болните от ревматоиден артрит се установяват 3 изоформи на имуноглобулинови класове – IgM, IgG и IgA. Повишеният титър на ревматоидния фактор много често предшества клиничната изява на заболяването. Смята се, че: IgA – ревматоиден фактор е по-силен рисков фактор за развитието на ревматоиден артрит и е с по-голяма специфичност като диагностичен показател, както и носителството на този фактор се асоциира с по-голяма честота на ревматоидния артрит (4). В съвременната диагностика тестът, установяващ антителата срещу цитрулинирани пептиди се счита за високо сензитивен и специфичен за диагнозата ревматоиден артрит (20). Тяхното присъствие може да предшества клиничната изява на ревматоидния артрит и може да се използва за предикция на прогресията. Образните методи за диагностика, които се използват за оценка на различни стави, включват рентгенографии, магнитен резонанс, компютърна томография, мускулно-скелетна сонография.

Клиничният ход на болестта флукутира, нейната прогноза е непредвидима, а социалната ѝ значимост се определя от високата степен на инвалидизиране. В повечето случаи РА се обсъжда като мултифакторно заболяване, резултат от комбинацията на генетична предразположеност на макроорганизма и фактори на средата (4).

Ревматоидният артрит е инфламаторно заболяване, инициирано от антигенна стимулация и последваща каскада от остри и хронични възпалителни процеси, водещи до порочен цикъл на продължителна продукция на проинфламаторни медиатори. Точните молекулярни и клетъчни механизми за експресия и контрол на тези медиатори не са достатъчно изяснени (24). Тяхното действие води до тъканна

деструкция. Неутрофилите и макрофагите са отговорни за продукцията на матриксни металопротеинази, ензими, способни да разграждат протеините в екстрацелуларния матрикс. Налице е дисбаланс между тези ензими и тъканните им инхибитори. Прогресията на заболяването е резултат на високи нива на IL-1 β , IL-6 и TNF- α , които индуцират продукцията на колагенази и други протеази и ниски нива на интерлевкин-10, отговорни за супресията на инфламаторния отговор. При ревматоидния артрит има нарушено равновесие между процесите на костно формиране и костна резорбция, обусловено от повишени количества на IL-1, IL-6, PGE2 и TNF- α – основни медиатори на костната резорбция. Имунният отговор при това заболяване е регулиран от гени, контролиращи T-клетъчно зависимите механизми за продукция на протективни антитела (277). Голямото разнообразие в клиничните характеристики на ревматоидния артрит би могло да се обясни до голяма степен с генетични фактори (277). Има данни за съществуването на "свръхреактивен моноцитен фенотип" (29), асоцииран с възприемчивост към инфламаторни заболявания. Типична проява на такъв фенотип е свръхпродукцията на PGE2, IL-1 β и TNF- α . Много от гените, регулиращи продукцията на проинфламаторни цитокини и активността на моноцитите са локализирани HLA-DR в хромозома 5 (29). През последните години ревматоидният артрит, както и пародонтитът са смятани за комплексно или екогенетично заболявания (180, 244). За такива заболявания е характерно взаимодействие на множество гени с факторите на средата (с най-голямо значение е тютюнопушенето), фамилна агрегация и в редки случаи ранно начало и тежка клинична манифестация.

3. Общи патогенетични механизми в протичането на пародонталните и системните заболявания

Изследвания, публикувани през последните десетилетия, подкрепят съществуването на връзка между пародонталните и множество системни заболявания като сърдечносъдови, белодробни, диабет, усложнения на бременността, ревмато-

иден артрит и др. (1, 117). Връзката между пародонтални заболявания и ревматоиден артрит вероятно се медира от общи механизми в патогенезата, от които с най-голямо значение са:

- Включване на възпалителните медиатори на макроорганизма в патогенетичните процеси на пародонталното и на общото заболяване (389).
- Възможно директно включване на пародонтални патогени в патогенезата на ревматоидния артрит (57, 224).
- Активиране на хуморалния и клетъчния имуен отговор (155).
- Наличието на общи независими рискови фактори за двете заболявания – възраст, тютюнопушене, нисък социално-икономически статус и др. (117).

Хроничният пародонтит е асоцииран с много системни заболявания и състояния като коронарна болест на сърцето, инсулт, миокарден инфаркт, остеопороза и преждевременно раждане (242, 292), но тези връзки се основават почти изцяло на епидемиологични данни. Въпреки че при тези заболявания са установени някои общи патогенетични асоциации, като повишени нива на С-реактивен протеин, няма очевиден общ патогенетичен механизъм (91). От друга страна, пародонтитът и ревматоидният артрит демонстрират много сходства по отношение на някои клинични, патофизиологични, епидемиологични и терапевтични характеристики.

За първи път през 1982 г. Snyderman и McCarty коментират общи инфламаторни механизми за ревматоидния артрит и пародонтита. И двете заболявания се характеризират с хронична възпалителна реакция в съединителна тъкан и прилежаща кост. В тази среда инфламаторни клетки и медиатори на възпалението водят до сходни клинични симптоми, като болка, оток, зачервяване и евентуална костна деструкция (348).

Пациенти с активен ревматоиден артрит демонстрират значително по-голяма честота и тежест на хроничен пародонтит, по-голямо разпространение и тежест на гингивалното кървене, повече загубени зъби и повече загуба на алвеоларна кост в сравнение с здравите контроли (120, 163, 239). Има данни и за повишена честота на ревматоидни заболявания при пациенти с хроничен пародонтит (240). Mercado et al. (241) публикуват подробно сравнение на ревматоиден артрит и пародонтит,

в което заключават, че е "много вероятна обща и основна дисрегулация на инфламаторния отговор на организма". Предположено е, че антиинфламаторната терапия на ревматоидния артрит влияе положително върху някои от показателите за тежест и активност на пародонтита, като кървене и костна загуба (163). Клиничната изява на пародонтални заболявания при пациенти с ревматоиден артрит е свързана и с нарушенията със слюнчената продукция при пациенти със синдром на Съогрен (66) вероятно по пътя на промени в бактериалната колонизация, с тютюнопушенето като рисков фактор за тежест и с прогресия и на двете заболявания (278), като е предположена и индиректна връзка между ревматоидното засягане на темпоро-мандибуларната става и хроничния пародонтит (417).

При ревматоидния артрит и пародонтита локалният възпалителен отговор на организма е свързан с миграцията и натрупването на инфламаторни клетки от системната циркулация в таргетните тъкани – пародонт и синовиална мембрана. В патогенезата на двете заболявания участие вземат и клетъчният и хуморалният имунен отговор. Активация на моноцитите от стимулирани Т-лимфоцити е основната причина за продукция на големи количества TNF- α и IL-1 β . Тези цитокини индуцират експресията на адхезионни молекули и други инфламаторни медиатори. Това води до амплифициране на локалната възпалителна реакция и до натрупване на различни проинфламаторни субстанции – цитокини, простагландини, ейкозаноиди, включително и COX-2, протеолитични ензими (матриксни металопроотеинази), кислородни радикали и азотни съединения (124, 138, 284, 298, 398, 414). Образуването на имунни комплекси и активирането на системата на компонента са финалните общи характеристики на възпалението при двете заболявания, което води до резорбция на прилежаща кост (157, 270, 365).

Има данни за съществуването на популации и етнически групи с повишена честота на заболяване от ревматоиден артрит. Например Пима индианци демонстрират високо разпространение на ревматоиден фактор (84) и при тях е установено и по-голямо разпространение на пародонтит (103). Имуногенетични проучвания на болни от ревматоиден артрит показват асоциация със специфични HLA антигени, в частност HLA-DR4 локус. Най-силната асоциация е със запазена ами-

нокиселинна последователност, отговаряща на позиции 70-74 от третия хиперпоменлив регион на HLA-DRB1 ген, наречен "споделен епитоп". Основните подтипове са 0401, 0404 и 0408 при бялата раса и 0405 при азиатската раса (260, 401). Същият генен локус (HLA-DR4) е асоцииран и с развитието на тежък и бързо прогресиращ пародонтит – основно подтипове 0401, 0405 и 0408 (47).

Много терапевтични методи при ревматоидния артрит са ефективни и за пародонталните заболявания – нестероидните прототовъзпалителни средства, инхибиторите на матриксните металопротеинази, цитокините инхибитори (125, 315). Тетрациклиновите антибиотици, използвани като допълнителни средства в лечението на пародонтита за инхибиране на матриксните металопротеинази, показват антиинфламаторна и имуномодулаторна активност и при болни от ревматоиден артрит. Доксициклин е един от препаратите, използвани при лечението на пародонталните заболявания, докато миноциклинът изглежда по-ефективен при ревматичните заболявания (355). Инхибитори на IL-1 като Kineret и на TNF- α се използват успешно в лечението на ревматоиден артрит от години, а има данни и за проучвания на техния ефект върху експериментални модели на пародонтит (125).

Три основни патогенетични механизма на влияние на пародонтита върху системните заболявания са приети на обща работна среща на Европейската федерация по пародонтология и Американската асоциация по пародонтология през 2012 г. в Сеговия, Испания – метастаза на инфекцията, възпаление и инфламаторна деструкция и адаптивен имунитет. Две различни заболявания могат да настъпят едновременно или да се развият последователно, като прогресията или екзацербацията на едното може да повлияе хода на другото. На тази среща са взети под внимание както постулатите на Кох за идентификация на етиологичния агент на едно инфекциозно заболяване, така и критериите за каузална асоциация между две заболявания. Тези критерии са познати като критерии на Брадфорд Хил и включват: епидемиологична връзка, биологична правдоподобност и влияние на намесата на едното заболяване върху другото (382). Метастаза, или метастатично заболяване, е разпространението на заболяването от един орган или част на тялото в други, несъседни органи или части на тялото. Тази дефиниция не е ограничена само до обичайната ѝ употреба във връзка с раковите заболявания – инфекцията и

възпалението също имат способността да метастазират (70). Оралните бактерии могат да навлязат в кръвообращението и да причинят инфекция в други органи и части, локалното пародонтално възпаление и локалните инфламаторните медиатори могат да повлияят системното възпаление, опосредствано от вродените имунни клетки и техните медиатори, да окажат въздействие върху адаптивния имуноен отговор и евентуално да доведат до системни последици. Това може да е комбинация от всеки един или от всички тези механизми. Въз основа на известните до момента данни асоциацията между пародонталните и системните заболявания е по-скоро резултат от общи рискови фактори и някои сходства в патогенетични механизми, а не каузална (382).

3.1. Инфекция

Пародонталните заболявания са инфламаторно-деструктивни заболявания на поддържащите зъба структури, причинени от бактериален биофилм (204). Бактериите, асоциирани с пародонтита, притежават различни вирулентни фактори, способни да индуцират продукция на инфламаторни медиатори в пародонталните тъкани. Различни цитотоксини, протеази, хемаглутиници и структурни молекули като липополизахариди и протеогликани взаимодействат с имунната система. Много от тези молекули имат елементи, познати като Pathogen-associated molecular patterns (PAMPs), които се разпознават от рецептори на имунните клетки, наречени Pattern recognition receptors (PRRs). Подобни рецептори са Toll-like рецепторите и G-protein coupled receptors (GPCRs) (213). Микроорганизмите, техните продукти и медиаторите на възпалението могат да навлязат в системното кръвообращение и да проявят въздействие на системното възпаление. Епидемиологични доказателства, свързващи пародонтита с прогресията на различни системни заболявания, като: кардио-васкуларни заболявания, диабет, ревматоиден артрит, са асоциирани с повишени нива на някои маркери на системното възпаление (174, 387). Kinane et al. (174) описват бактериемия след различни пародонтални процедури като scaling and root planing, сондиране и дори обикновено

измиване на зъбите с четка и паста. Обикновено тези микроорганизми биват елиминирани от кръвта от ретикуло-ендотелната система в рамките на минути (200). Възможно е някои от тези бактерии да преживеят и да останат в дистални органи и части, и да предизвикат имунен отговор чрез вирулентните си фактори.

3.2. Възпаление. Вроден имунен отговор. Маркери на възпалението

При пародонтита, както и при ревматоидния артрит, възпалението се провокира от антигенна стимулация (пептиди, липополизахариди) и последваща каскада на възпалението, водеща до освобождаване на проинфламаторни медиатори, взаимодействащи с клетките на организма. И при двете заболявания резидентните клетки (синовиални клетки при РА, кератиноцити, фибробласти и остеобласти при пародонтита) и мигриралите клетки на възпалението са отговорни за настъпващата деструкция. В патогенезата на двете заболявания съществена роля имат цитокините и другите провъзпалителни медиатори. Тяхното прекомерно увеличаване води до деструкция на тъканите. Цитокините, освободени от лимфоцити, макрофаги, фибробласти, са различни и са отговорни за специфични аспекти на възпалителната реакция. Тези провъзпалителни медиатори имат широк спектър на действие върху много клетки и водят до увеличаване на клетъчната пролиферация и тъканна деструкция.

За РА, както и за пародонтита, прогресията на заболяването се свързва с високи нива в тъканите на интерлевкин 1 (IL-1) и тумор-некротичен фактор алфа (TNF- α). IL-1 и TNF- α са в основата на предизвиканата продукция на колагенази и други неутрални протеази от много клетки. Основните ензими, отговорни за тъканната деструкция, са матрикс-металопротеинази (ММР). Те включват голямо семейство от ензими, действащи върху различни субстрати. Клетките, които освобождават ММР при пародонтита и РА, са полиморфнонуклеарни левкоцити, макрофаги, фибробласти. Костната деструкция е обща характеристика на ревматоидния артрит и на пародонтита. Тя е резултат от дисбаланс на процесите на костна резорбция и костно формиране. Основни медиатори за костната резорбция са простагландин Е₂, IL-1, TNF- α и IL-6. Според повечето автори възпалителният отговор има централна роля във връзката между пародонтита и РА (26). Увеличените нива

на възпалителните медиатори при пациентите с ревматоиден артрит внушават способността за суперпродукция на тези макромолекули (128, 183), но има и противоположни становища (67).

Бактериите и бактериалните антигени в системното кръвообращение предизвикват значителен възпалителен отговор. Левкоцитите и ендотелните клетки секретират проинфламаторни медиатори (цитокини, химиокини, С-реактивен протеин). IL1 β , IL6, TNF- α и PGE2, синтезирани локално във възпалената гингива могат да попаднат в кръвообращението и да проявят системно въздействие като индуцирана ендотелна дисфункция (102). Проинфламаторните цитокини в системната циркулация предизвикват левкоцитоза и повишение на някои острофазови показатели като С-реактивен протеин, фибриноген, разтворими CD14 и др. Всички те са свързани със системното състояние, асоциирано с пародонтита.

Голямо разнообразие от ефекторни клетки на вродения имунен отговор са свързани с патогенетичните механизми на пародонтита и ревматоидния артрит. Неутрофили, макрофаги, мастоцити, natural killer клетки (NK клетки) са разположени в синовиалните и пародонталните тъкани. Неутрофилите са първата защитна линия на организма (380) и тяхната функционалност е от голямо значение за пародонталното здраве. Силната асоциация на пародонтита с някои генетични заболявания с качествени или количествени дефекти на неутрофилите (недостатъчност на левкоцитната адхезия, циклична неутропения и други) са доказателство за значимата им роля. От друга страна, неутрофилите са в основата на тъканната деструкция при пародонтит и редица системни възпалителни заболявания, като ревматоидния артрит (397). Ензимите, секретирани от тези левкоцити (колагенази, еластази, лактоферин), както и биологичноактивните продукти, отделени след фагоцитозата, са причина за деструкцията. Повишени нива на неутрофили, както и увеличени нива на протеолитичните им ензими в гингивален ексудат и слюнка са асоциирани с активна пародонтална лезия и е открита корелация между тези нива с активността и тежестта на заболяването (12, 89, 110, 330, 412). Значението на колагеназната активност на неутрофилите е клинично проучена с въвеждането на ниски дози доксациклин (65, 111). Неутрофилите допринасят за синовиалното

възпаление със синтеза на простагландини, протеази и реактивни кислородни радикали (63).

Макрофагите са мононуклеарни клетки с участие в регулацията на имунния отговор, в ранната вродена защита срещу бактериалните антигени и в специфичния имунитет като антиген-представящи клетки. Те модулират имунния отговор чрез продукцията на цитокини – TNF- α и IL-1, IL-6, IL-12, IL-15, IL-18 и IL-23, простагландини, матрикс-разграждащи ензими и др. (77, 133). Макрофагите са основните ефекторни клетки на синовиата – клинично ефективните биологични препарати за лечение на ревматоидния артрит, значително редуцират макрофагната инфилтрация в синовиума (133). Тези левкоцити се активират от Toll-like рецептори – 2, 6, 3, 4, 8, разпознаващи различни бактериални, вирусни или ендеогенни патогенни структури (333). Активацията на макрофагите се индуцира и от: цитокини, взаимодействие с Т-клетки, имунни комплекси, липополизахариди (41, 188, 202).

НК клетките (клетки естествени убийци) имат свойството да индуцират спонтанна цитолiza на голям брой вирусно или бактериално инфектирани клетки, туморни клетки и др. Те са третата главна популация на лимфоцитите освен Т- и В-лимфоцитите. Не фагоцитират, а осъществяват действието си чрез отделяне на лизиращи ензими. Тяхното действие се усилва от някои цитокини като TNF- α , IL-1 и 2, а от друга страна, макрофагите експресират интерферон- γ и TNF- α , чрез което участват в регулацията на други имунокомпетентни клетки (211). Увредена функционалност на НК клетките е описана при редица системни заболявания, асоциирани с пародонтита (Papillon-Lefevre syndrome, Chediak-Higashi syndrome) (281), подчертавайки протективната им роля.

Цитокините са протеини с ниско молекулярно тегло, които инициират и поддържат възпалението и регулират амплитудата и продължителността на отговора на организма. Генетичната регулация на секрецията на цитокини от различни клетки е зависима от активацията на NF κ B – нуклеарен транскрипционен протеин, който се активира след свързване на Toll-like рецепторите с бактериален антиген (131). Цитокините се продуцират от резидентни епителни клетки, фибробласти, неутрофили и макрофаги, синовиални клетки, както и от лимфоцити по време на адаптивния имунен отговор. Функциите им са свързани с клетъчна миграция, тъканна

деструкция, активация на ММР и имат важна роля в патогенезата на пародонтита и ревматоидния артрит. Системната им циркулация оказва значително влияние върху системното възпаление и се асоциира със системни състояния и заболявания като диабет, ревматоиден артрит и др. (50, 107, 139, 231, 306). Интерлевкини-4, IL-13 и IL-15 са асоциирани с ранния ревматоиден артрит (306), TNF- α е от фундаментално значение за: активацията и експресията на цитокини и химиокини, експресията на ендотелни адхезионни молекули, промотиране на ангиогенезата, протекцията на синовиалните фибробласти, супресията на регулаторните Т-клетки, стимулацията на костната резорбция и супресията на костната формация (107, 139). Подобно действие има интерлевкин-6, който също така участва в активацията на левкоцитите, продукцията на антитела и медиера системния острофазов отговор (231). Интерлевкините IL-1 (IL-1 α , IL-1 β , IL-17, IL-18, IL-33) са в повишени количества при ревматоиден артрит и пародонтит. Те стимулират активацията на левкоцити, ендотелни клетки, остеокласти, фибробласти и хондроцити и са отговорни за костната и тъканната деструкция (231). Лимфоцит-сигнализиращите цитокини са група цитокини, които осигуряват прецизен механизъм за регулация на имунния отговор, медиран от Т-клетките. Към тази група принадлежат IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, свързани с промотиране на хуморалния отговор и детерминиране на класа имуноглобулини, а IL-2 и интерферон- γ регулират клетъчно-медирания отговор (50). Химиокините са хемотаксисни цитокини от голямо значение за миграцията на фагоцитите към мястото на инфекцията, а IL-8 е най-добре изучения сред тях. След преминаването през съдовата стена, левкоцитите са привлечени към мястото на инфекцията от концентрационния градиент на хемотаксисните фактори (418). Химиокини се синтезират от епителни, ендотелни клетки, както и самите левкоцити. Функционално, могат да се разделят на две групи – хомеостатични и инфламаторни. Те участват и в други биологични процеси като ангиогенеза, клетъчна пролиферация, апоптоза, туморни метастази (255). Бактериалните пептиди също имат хемотаксисни свойства по отношение на инфламаторните клетки.

Простагландините са продукти на хидролизата на мембранните фосфолипиди. Фосфолипаза А2 освобождава арахидонова киселина, прекурсор на група липиди,

познати като ейкозаноиди. Тази киселина метаболизира под действието на липоксигеназата до формиране на левкотриени, а под действие на циклооксигеназите (COX-1 и COX-2) – до простагландини, простациклини и тромбоксани. Простагландините са 10 субкласа, като от най-голямо значение за възпалението са D, E, F, G, H и I (115). Простагландин E2 е мощен стимулатор на костната резорбция (115). Пародонталното възпаление започва като протективен отговор към бактериалния биофилм. При възприемчивите индивиди невъзможността за отстраняване на инфламаторните клетки (особено неутрофили) след острия възпалителен отговор води до неутрофилно-медирана деструкция на екстрацелуларен матрикс и кост (381, 383, 384). В последните години усилията за контрол на възпалението при болни от ревматоиден артрит са насочени към употребата на агенти за инхибиране на проинфламаторните медиатори като нестероидните противовъзпалителни средства. Таргетни за тези средства са COX-1, COX-2 и липоксигеназа-зависимата продукция на простагландини, както и продукцията на TNF- α . Скорошни изследвания се фокусират върху ейкозаноидния механизъм на регулация на възпалението (381, 383). Това са молекули (липоксини), рецепторни агонисти, деривати на ендогенните мастни киселини, които стимулират разрешаване на острата фаза на възпалението и възстановяването на тъканната хомеостаза. Те ограничават неутрофилната миграция, модулират макрофагния фенотип, стимулират фагоцитозата на мъртвите неутрофили без освобождаване на проинфламаторни медиатори и улесняват изчистването на продуктите на възпалението с цел промоция на тъканната регенерация.

Матриксните металопротеинази (ММР) са ензими, отговорни за разграждането и ремоделирането на матриксни компоненти. Те се секретират в проензимна форма и се активират екстрацелуларно. Такава протеиназа е неутрофил-колагеназата, чиито нива са повишени във възпалена гингива, при болни от пародонтит, а концентрацията ѝ намалява след пародонтално лечение (175). Активността на ММР и техните инхибитори се асоциира с пародонталната деструкция. Sabeh et al. през 2010 (317) демонстрират значението на ММР-1, 3, 8, 13, 14, 16 за хрущялната деструкция при пациенти с ревматоиден артрит и подчертават значимостта

на MMP-14 в патогенезата на това заболяване. Проучването им показва и неуспешното действие на техните инхибитори да предотвратят каскадната деструкция. Авторите твърдят, че за повърхностната хрущялна деструкция и за рентгенографски увеличеното ставно пространство има значение активността на интерлевкин-1 и IL-17A и индуцираната от тях апоптоза на хондроцити.

RANKL (рецептор-активатор на нуклеарен фактор-капа- β лиганд) и OPG (остеопротегрин) са цитокини от семейството на TNF и заедно с RANK оформят важна система за регулация на остеокластите. Синтезират се от остеобласти. RANKL има активиращо остеокластите действие, докато OPG се свързва с RANKL и инхибира активацията на остеокласти. Проучванията показват повишени нива на RANKL и ниски на OPG при пародонтит в сравнение със здрави индивиди и асоциация с цитокини като IL-1 β , IL-6, IL-11, IL-17, TNF- α и PGE2 (198). Подобно синергично действие на IL-1, IL-6 и IL-17, TNF- α и RANKL при болни от ревматоиден артрит също е установено и се асоциира с продължителен инфламаторен отговор и ерозивни костни лезии (327, 328). Авторите установяват, че клиничната инхибиция на TNF- α , IL-6 и RANKL значително забавят ерозивните промени.

3.3. Придобит имунитет. Хуморален имунен отговор

При персистиране на остро пародонтално възпаление бактериалните антигени се представят от макрофаги и дендритни клетки на адаптивната имунна система. Два подвида лимфоцити разпознават интрацелуларни и екстрацелуларни патогени – Т- и В-лимфоцити. В-лимфоцитите носят на повърхността си имуноглобулинови молекули, които функционират като антигенни рецептори. Хуморалният имунитет се осъществява от антитела (разтворими имуноглобулини), секретирани след активация на В-лимфоцитите и насочени към антигени и чужди тела в извънклетъчното пространство. Т-лимфоцитите са ефекторни клетки от клетъчно-медиран имунитет (отложена свръхчувствителност). Техните антигенни рецептори са мембранни молекули, подобни на имуноглобулините и разпознаващи пептидни фрагменти от патогена. Активацията на Т-клетките изисква участието

на големия комплекс за хистосъвместимост (МНС), част от имуноглобулиновото суперсемејство. Два класа МНС молекули са ангажирани в активацията на различните подгрупи Т-лимфоцити. Т-клетките са класифицирани в подгрупи въз основа на повърхностната им експресия на CD4 и CD8 молекули. CD4 Т-клетките се определят като Т-хелпери (Th) и се разделят на Th1 и Th2 според цитокиновата им продукция. Th1 секретират интерлевкин-2 и интерферон- γ , докато Th2 продуцират IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 и IL-13. И двата подкласа Т-клетки отделят интерлевкин-3, TNF- α и гранулоцит-макрофаг колония стимулиращ фактор (411). Основната роля на интерлевкин-2 и интерферон- γ , секретирани от Th1, е инициране и поддържане на клетъчно-медиацията отговор, докато интерлевкин-4 от Th2 клетките е негов инхибитор. Т-лимфоцитите са отговорни и за В-клетъчното поведение. Th1 са отговорни за продукцията на имуноглобулин G2, докато Th2 регулират продукцията на G1. CD8 Т-клетките (цитотоксични Т-клетки) са ефекторни клетки на имунния отговор, но са свързани и със секрецията на цитокини, характерни за Th-лимфоцитите (411). Независимо, че синовиалната среда е богата на Т-клетки, ролята в патогенезата на ревматоидния артрит не е напълно изяснена. Използването на циклоспорин като препарат, насочен директно срещу Т-клетките, показва ограничена или никаква ефективност (287). Възможно е този препарат да въздейства както на ефекторните, така и на регулаторните Т-лимфоцити. Синовиумът при ревматично заболяване съдържа голямо количество миелоидни и плазмацитоидни дендритни клетки, които експресират цитокини (IL-12, 15, 18, 23), МНС клас II молекули и други костимулатори на Т-клетъчната активация и антигенната презентация (194, 329). Някои проучвания показват съществуване на автореактивен тип Т-клетки срещу собствени цитрулинирани протеини (55).

По-голямо внимание заслужават две други подгрупи CD4-Th-клетки – Th17 и Т-регулаторни Th-лимфоцити (Tregs). Те имат антагонистична роля като ефекторни и супресорни клетки (16, 320). Th17 са уникални в продукцията на интерлевкин-17A и IL-17F, както и на интерлевкин-21, IL-22 и TNF- α и оказват важна роля в остеокласт-генезата. Силно асоциирани са с пародонталната лезия и продуцираните от тях цитокини са в повишени количества при болни от пародонтит

(274, 405). Подобен фокус на внимание върху тези лимфоцити има и от ревматологична гледна точка. Интерлевкин-17А има синергично действие с TNF- α за активирането на фибробласти и хондроцити (118, 248). Трансформираният растежен фактор- β , както и интерлевкини 1 β , 6, 21 и 23 осигуряват подходяща среда за поддържане на Th17-диференциацията и потискане на Tregs-диференциацията в посока поддържане на възпалението. Изследванията показват намалена функционална способност на регулаторните Т-клетки при пациенти с ревматоиден артрит (28). Такъв дисбаланс между Th17 и Tregs може да отразяват и повишените нива на TNF- α , който е естествен супресор на регулаторните Т-клетки (258). Т-регулаторните лимфоцити имат протективна роля в пародонталните заболявания. Това са CD4 и CD25 експресиращи клетки, които специфично регулират активацията, пролиферацията и ефекторната функция на конвенционалните Т-лимфоцити (16, 320). Продуцират Т-лимфоцит-асоциирана молекула-4, която заедно с интерлевкин-10 е свързана с намалена инфламаторна активност (60, 274, 405).

Макрофаги и фагоцитни клетки ефективно поемат антигенни частици и експресират МНС клас II молекули. Тези молекули са способни да се свържат с антигенната частица и така тя да стане разпознаваема за Т-клетките. Рецептори на повърхността на Т-клетките (TCR) са отговорни за свързването с антигена. Генната им експресия е асоциирана с автоимунни заболявания като ревматоиден артрит, както и с пародонтит (337). Макрофагите са широко разпространени клетки с важна роля в хомеостазата и възпалителния отговор. Дендритните клетки също имат способността да експресират МНС клас II молекули и имат ко-стимулираща активност. Очевидно е, че вроденият и адаптивният имунен отговор координирано участват във възпалителния процес и тъканната деструкция. Въпреки това все още липсва пълно разбиране на механизмите на редица инфламаторни заболявания, в това число – и пародонтита и ревматоидния артрит.

В-клетките са в основата на хуморалния имунен отговор, активацията и диференциацията им се медира от цитокини (IL-4, IL-5, IL-6). Антителата се продуцират от плазматични клетки – това е последният етап на В-клетъчната пролиферация. Според редица проучвания (308, 337) броят на В-клетките се увеличава от здраве през гингивит към пародонтит. Присъствието на значително по-високи

нива на В-клетки в активна пародонтална лезия е в подкрепа на тезата за принос им към прогресията на заболяването. Хуморалният имунен отговор е неразделна част от патогенезата на ревматоидния артрит. Синовиални В-клетки са локализиранни основно в Т-В-клетъчни агрегати, поддържани от експресията на различни фактори – индуциращ пролиферацията лиганд (APRIL), В-лимфоцит стимулатор, СС и СХС химиокини. Плазматичните клетки са разположени основно в синовиума, но също и в костния мозък в съседство на ставата (336). Доказателство за патогенетичната роля на CD20 В-клетките е получено при проучване на ефикасността на rituximab в лечението на ревматоидния артрит (98). Тъй като анти-CD20 антителата не са насочени срещу плазматичните клетки, а нивата на автоантитела са променени в различна степен след терапията, клиничните наблюдения подсказват, че ролята на В-лимфоцитите в патогенезата на ревматоидния артрит не е ограничена до продукция на автоантитела, а включва автоантигенна презентация и продукция на цитокини (интерлевкин-6, TNF- α , лимфотоксин- β).

4. Ревматоидният артрит и микробната инфекция

Много пародонтопатогени могат да бъдат източник на липополизахариди, да предизвикват прекомерен синтез на провъзпалителни цитокини в генетически чувствителни индивиди и да допринесат за развитие на ревматоиден артрит. Това е биологично приемливо обяснение на един механизъм, по който съществуващ пародонтит може да активира ревматоиден артрит (272).

Антитела срещу Грам-отрицателни, анаеробни пародонтални патогени като *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella melaninogenica*, и *Tannerella forsythia* се откриват в серум и синовиална течност на пациенти с ревматоиден артрит (246, 250, 273). Увеличени нива на антитела и нива на ДНК за *Tannerella forsythia*, *P. intermedia*, *P. gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Treponema denticola*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, също са били открити в синовиална течност при пациенти с ревматоиден артрит в сравнение с контролни лица (224, 247, 275, 309, 366).

Тези открития показват възможността пародонтални патогени (цели или ДНК) да се транслоцират от пародонталните тъкани до синовията, където могат да утежнят възпалителния процес, съществуващ в ставите с ревматоиден артрит.

Пародонтални патогени имат директен достъп до кръвната циркулация (224, 251). Има съобщения за идентификация на *P. gingivalis* от далечни за пародонта органи, включително в атероматозни плаки. В наше изследване (45), за първи път в България беше амплифициран генен фрагмент, кодиращ 16S rRNA чрез описана преди това в литературата двойка праймери, определени за 16S rRNA и специфични за *Porphyromonas gingivalis*. *P. gingivalis* се идентифицира в 11 от 54 изследвани материала от бактериална плака, които принадлежат съответно на 3-ма кардиологично здрави, 3-ма пациенти със стабилна стенокардия и 5-ма пациенти с остър коронарен синдром. *P. gingivalis* се идентифицира и в 2 от 10 атероматозни плаки от коронарни кръвоносни съдове. Тези резултати са в подкрепа на хипотезата за директно включване на *P. gingivalis* в патогенетичните механизми на атеросклерозата.

P. gingivalis може да инвазира човешки хондроцити, изолирани от коленни стави и да индуцира клетъчни ефекти – забавя клетъчния цикъл и увеличава клетъчната апоптоза в хондроцитите (294).

Изследвания с животни, проведени от Bartold et al., показват, че инжектирането на умъртвени микроорганизми от *P. gingivalis* в гърба на плъхове допринася за развитие на артрит, оценен чрез подуване на лапата (23). Това изследване ясно демонстрира, че предварително съществуваща извънсиновиална хронична възпалителна лезия, предизвикана от *P. Gingivalis*, съдейства за развитието на артрит в животински модел.

4.1. Ревматоиден фактор и пародонтит

Анти- γ -глобулините или ревматоидните фактори (RF) са описани за първи път през 1940 г. и са идентифицирани в серум при 70-80% от случаите на болни от ревматоиден артрит (61, 144, 296). Допълнителни проучвания показват, че това са

имуноглобулини, формиращи антиген-антитяло комплекси с IgG. Въпреки че ревматоидният фактор е смятан за важен маркер на ревматоидния артрит и е един от диагностичните критерии според Американската колегия по ревматология, той не е достатъчно специфичен за това заболяване, тъй като е открит и при други аутоимунни заболявания (296). Ревматоидният фактор е установен и при системно здрави индивиди в 1-3% при бялата раса и до 30% при някои индиански племена (61). Тези имунни комплекси са директно въввлечени в патогенезата на ревматичните заболявания според проучванията на Hollander et al. (144) и Pope et al. (296), но има и мнения, че те са просто маркер за продължаваща имунологична активност (264). Ревматоидният фактор може да бъде идентифициран в две основни разновидности – с нисък афинитет и с висок афинитет. Ревматоидни фактори с нисък афинитет са естествено срещащи се IgM със специфичност за Fc фрагмента на IgG и кръстосана реактивност с други автоантигени. Те се произвеждат от CD5+ В-клетки при здрави индивиди и тяхното производство е независимо от Т-клетките (62). Тези ревматоидни фактори са кодирани от V-алелите на съответните гени и се експресират от В-клетки при нискостепенни хронични лимфопролиферативни състояния. Те имат същите характеристики като ревматоидните фактори, продуцирани в отговор на поликлонална В-клетъчна активация от Епщайн-Бар вирус или бактериални липополизахариди (297). Мултивалентността на IgM-RF позволява отлична аглутинация с комплекси от микроорганизми, вече свързани с антоген-специфичните IgG. Образуват се големи и слабо разтворими имунни комплекси, които се отстраняват бързо от макрофаг-фагоцитната система (106, 143, 297). В повечето случаи RF отговорът към инфекцията е преходен. Устойчиви микроорганизми, като херпес вирус и вируса на хепатит С, или оралната микрофлора могат да бъдат източник на персистиращо високи титри на ревматоиден фактор. Скорошни изследвания показват, че продукцията на ревматоиден фактор може да се увеличи с едновременното ангажиране на В-клетъчните рецептори за имуноглобулини и Toll-like рецепторите за патоген-асоциирани молекулярни модели, включващи липополизахариди, бактериални липопротеини, хипометилирана бактериална ДНК, ендогенни лиганди от увредени клетки и др. (193). Синергичното действие на имунните комплекси и бактериалната стимулация на Toll-like рецепторите биха могли да обяснят връзката между инфекция и отключване на ревматично заболяване.

Въпреки че повечето ревматоидни фактори са имуноглобулини от клас М, ревматоидните фактори с висок афинитет могат да бъдат имуноглобулини от всеки клас. Те се продуцират от антигенно сенсibiliзирани В-клетки (391). Разтворимите ревматоидни фактори с висок афинитет могат да взаимодействат и с много малки по размер имунни комплекси в синовиума или в ставната течност и да доведат до образуването на големи патогенни имунни комплекси. Малките димерни IgG-RF комплексите могат да предизвикат активация на комплемента, но могат да попаднат и в ставната капсула през кръвоносните съдове. Там те могат да агрегират в големи имунни комплекси под влияние на хидрофобни сили и да останат в синовиалните тъкани, предизвиквайки активация на системата на комплемента и освобождаването на цитокини от мононуклеарните клетки в синовиума (61, 264). Именно такива ревматоидни фактори с висок афинитет, основно IgA и самоагрегиращи IgG са силни предиктори на тежестта и прогресията на ревматоидния артрит (264). Въпреки че ревматоидният фактор може да не е основен фактор за появата на ревматичното заболяване, той има важна роля в прогресията на ревматоидния артрит (398).

Ревматоидният фактор е идентифициран в гингива, субгингивална плака, слюнка и серум при пациенти с пародонтални заболявания (90, 112, 113, 141, 368). Характеристиките и точната му функция при тези заболявания са все още неясни. В-клетките и плазматичните клетки присъстват изобилно в клетъчния инфилтрат във възпалена гингива. Сред В-клетките има и CD5+В-клетки, за които е известно, че експресират естествени антитела като IgM-RF (356). Присъствието на локално продуцирани имунни комплекси е доказано с имунофлуоресцентно оцветяване на базалната мембрана, както и на периваскуларна тъкан (270, 373). Hara et al. (132) предполагат, че свързването на ревматоидния фактор с имуноглобулини от клас G с нисък афинитет води до активиране на системата на комплемента и по този начин се модулира имунният отговор към бактериалната инфекция при пародонтит. За да установят дали оралните патогени могат да индуцират производство на ревматоиден фактор, авторите определят серумните нива на IgM-RF и IgG-RF по метода ELISA в експеримент с мишки, на които са инжектирани интраперитонеално пречистени бактериални липополизахариди от различни орални бактерии – *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum*, *Capnocytophaga ochracea*. Нивата на IgM и IgG се повишават значително от липополизахаридите

на *F. nucleatum* и *C. ochracea*. Различната способност за индукция на ревматоиден фактор се дължи на различния химичен състав на липополизахаридите, а наличието на повече мастни киселини и по-малко въглехидрати е причината тези микроорганизми да индуцират подобен отговор. Тези данни кореспондират с други проучвания, установяващи корелация между нивата на ревматоидния фактор и серумния титър на антитела срещу същите микроорганизми (368) при пациенти с пародонтит. Едно изследване на болни от пародонтит и на пациенти с ревматоиден артрит показва, че IgM-RF реагира с различни видове микроорганизми от оралната флора. При ревматоидно болните в 80% от случаите ревматоидният фактор се свързва с *Campylobacter gingivalis* и *F. nucleatum*, при пародонтално болните това се случва при около 60% от случаите. След свързването на IgG с орални микроорганизми *in vitro* значително се увеличава способността на ревматоидния фактор да се свърже с него (369). Това се дължи на факта, че IgG детерминантата е по-достъпна за ревматоидния фактор след свързване с бактериален агент. Данните показват, че повишените нива на ревматоиден фактор при пациенти с пародонтит отразяват хроничната антигенна стимулация от специфични орални патогени с кръстосано реактивни епитопи и по този начин улесняват елиминирането на IgG-свързаните бактериални патогени. Ревматоидният артрит и пародонтитът проявяват много сходни механизми по отношение на имунните комплекси и активацията на системата на комплемента.

4.2. Цитрулинация, орални микроорганизми и ревматоиден артрит

През последните години станаха известни други антигени, предизвикващи формиране на имунни комплекси с по-голяма специфичност за ревматичните заболявания. Антитела срещу структури, продуцирани от клетки на кератинизиращ епител, са идентифицирани в серума на болни от ревматоиден артрит. Това е семейство антитела, наречени *антитела срещу циклични цитрулинирани пептиди* (АСРА). Тези антитела включват: антинуклеарен фактор, антикератин, антивиментин (познат като Sa антиген), антифилагрин. За първи път са описани през 1964 г. (268) като IgG, свързващ се към перинуклеарни кератохиалинни гранули в цитоплазмата на клетки от букалната лигавица, и през 1979 г. (410) като IgG, свър-

звещ се към подобен антиген от клетки на езофагиалния епител на плъх. Този антиген е бил установен и във вроговяващия слой на човешки епидермис и се предполага, че представлява или филагрин, формиран по време на късната диференциация на епителни клетки и въввлечен в регулацията на цитокератиновата агрегация, или негов прекурсор – профилагрин. Тези протеини придобиват антигенни свойства при конверсията на аргинин в цитрулин, който изглежда е основният епитоп, разпознаваем от съответните автоантитела (325). Цитрулинът е неесенциална аминокиселина, която не е включена в пептидната верига, тъй като не съществува цитрулинова РНК. Присъствието на цитрулин в протеините е последица от посттранслационна модификация. Цитрулиновите остатъци се получават при деиминацията на гуанидино групата на аргининовите краища, при която се отделя амоняк. Процесът се осъществява от ензим, познат като *пептидил-аргинин деиминаза* (ПАД). Предполага се, че съществуват поне 5 силно свързани изоформи на ПАД с различно тъканно разпространение. От тях само ПАД-2 и ПАД-4 са асоциирани с ревматоидния артрит, а най-често свързаните с РА цитрулинирани антигени са цитрулиниран фибриноген, виментин, колаген тип 2 и алфа-енолаза (SER-1) (392).

Антифилагрин-антителата са с най-голяма специфичност по отношение на ревматоидния артрит. Присъствието им и титърът им корелират с тежестта и активността на заболяването (226). Тъй като филагринът е идентифициран изключително от епидермални клетки и антителата срещу него са открити в ревматоиден синовиум с вероятен локален произход от плазматични клетки в ревматоидния панус, специфичността на тези антитела се дължи на кръстосана реактивност с други антигени (226, 392). Присъствието на АСРА-продуциращи клетки в ревматоидната става предполага локална антиген-медирана матурация на антиген-специфични В-клетки. Моноцитите, привлечени във възпалената синовиална тъкан, могат да продуцират ПАД след диференциация в тъканни макрофаги и да поддържат локалната продукция на цитрулинирани протеини (393). Цитрулинизацията е процес, наблюдаван в протеините от цитоскелета и вероятно е регулаторен механизъм по време на апоптозата. Липсата на деиминиран интрацелуларен протеин в синовиума при други ставни заболявания подчертава специфичността на цитрулинираните протеини за ревматоидния артрит (226, 392). Деиминацията

превръща позитивно заредения аргининов край в полярен, но незареден цитрулин. Така тези цитрулинови остатъци стават прицелни за IgG. Нови изследвания показват, че таргетни епитопи в синовиума могат да бъдат цитрулинирани виментин и части от α - и β -веригата на фибрина (215, 226, 268, 332). Фибринови остатъци са били откривани във възпалена синовиална тъкан (13). Продължителната и сложна деградация на фибрина, включваща и цитрулинация, допринася за появата на нови епитопи за имунокомпетентните клетки в синовиума (95, 323).

Независимо, че антиперинуклеарният фактор и антикератин антителата са признати за достатъчно специфични за ревматоидния артрит, някои несъответствия в тестови резултати са причина за недостатъчното им използване в диагностиката на ревматичните заболявания (187). Съвременните тестове за идентифициране на АСРА използват като таргетен антиген синтетични цитрулинирани пептиди. По този начин сензитивността на тестовете е повишена значително. АСРА-антителата са основно IgG и имат специфичност от 98% за ревматоиден артрит. Наличието на такива антитела е с висока предиктивност за ревматоиден артрит, години преди клиничната изява (187), и се асоциира с по-тежка клинична картина, както и по-голяма вероятност за костна деструкция. Наличието на комбинация от ревматоиден фактор и АСРА е основание за по-тежко и по-бързо прогресиращо ревматично заболяване (304). Асоциацията между АСРА и ревматоидния артрит изглежда още по-силна на фона на едно генетично проучване на Suzuki et al. (358), според което в генен локус на хромозома 1, асоцииран с предразположеност към ревматоиден артрит, се намират четири ПАД-гена. Генът, кодиращ една от формите на ПАД-4, е свързан с висока стабилност на транскрипция, както и с повишени нива на АСРА.

Porphyromonas gingivalis е микроорганизъм, силно асоцииран с хроничния пародонтит. При маймуни имплантирането му в устната кухина води до развитие на пародонтално заболяване (149). Този микроорганизъм притежава редица вирулентни фактори като липополизахарид (ендотоксин), цистеин-протеази, хемаглютинин и фимбрии, с които е способен да колонизира и инвазира в пародонталния джоб. Растежът му се осигурява от деструкцията на пародонтални структури под

действието на човешки и бактериални протеази. От съществено значение са бактериалната аргинин-специфична (gingipain R) и лизин-специфична (gingipain K) цистеин ендопептидаза. Те са способни да инактивират цитокините TNF- α , IL-1 и IL-6 (97, 98, 99, 100). Аргининовата деиминация е от важно значение за *P. gingivalis* с оглед нуждата му от амонячни съединения за неутрализиране на киселата среда, за инактивиране на човешките протеази и други биологично активни пептиди (267). Отделянето също и на азотен оксид е асоциирано както с патогенезата на пародонтита, така и с някои ставни заболявания по пътя на нарушен химиотаксис (341). *P. gingivalis* е единственият прокариот, способен да продуцира пептидил-аргинин деиминаза (ППАД) (230). Бактериалната ППАД може да конвертира както пептидил-аргинин, така и свободен L-аргинин. Така ППАД-активността на *P. gingivalis* осигурява растежа му в пародонталния джоб и му помага да избягва хуморалните защитни механизми. Разграждането на фибрина е частично медирано от бактериалните ППАД и осигурява хранителна среда от пептиди за растеж и на други бактериални видове (374). Способността на *P. gingivalis* да разгражда фибрин чрез своите ППАД е от важно значение за оцеляването на този микроорганизъм. Фиброзната тъкан около пародонталната лезия е много богата на фибринови екстрацелуларни остатъци (337) и има докладвана негативна корелация между количеството на интактен фибрин в гингивален ексудат и клиничните маркери на пародонтално възпаление (363). Концентрацията на разградните продукти на фибрина в гингивален ексудат при пародонтално заболяване е съизмерима с тази в синовиална течност при ревматоиден артрит (363). Проучване на Lundberg et al. (210) за първи път установява, че: *P. gingivalis* съдържа различни ендогенни цитрулинирани пептиди, които не се откриват при другите орални патогени; *P. gingivalis* цитрулинира човешки фибриноген и алфа-енолаза и тази цитрулинация е зависима не само от ППАД, но и от аргинин-гингипаин – протеолитични ензими, които отделят аргининови остатъци, генерирайки пептиди за последваща цитрулинация от пептидил-аргинин деиминазите на *P. gingivalis*. Авторите констатират, че при цитрулинираната алфа-енолаза два аргининови края се заместват от цитрулин, като вторият (цитрулин 15) е от значение за разпознава-

нето на пептида от антителата. Тези данни са в основата на редица други проучвания и публикации на повече от 3000 серумни проби, които демонстрират честота на анти-СЕР1 антителата при около 40% от пациентите с ревматоиден артрит и специфичност на антителата от 97%. Интерес представлява и твърдението на Lundberg et al. (210), че човешката алфа-енолаза (СЕР-1) и *P. gingivalis*-енолазата са идентични в 51% от цялата дължина на пептида, като в региона, съответстващ на СЕР-1, те показват 82% идентична последователност, а деветте аминокиселини на позиции от 13 до 21 във втория цитрулиниран остатък (цитрулин 15) са 100% идентични. Това проучване установява и че антитяло-отговорът към *P. gingivalis*-цитрулиниран енолаза пептид 1 силно корелира с антитяло-отговора срещу човешки СЕР-1. Авторите формулират хипотезата за етиологична връзка между пародонтита и ревматоидния артрит на базата на молекулярна мимикрия. Според тях спад в имунната толерантност към цитрулинираните протеини, включително алфа-енолаза, може да настъпи в резултат на инфламаторен процес извън ставата, а именно – от пародонтално възпаление. Анти-СЕР1 антитела могат да са продуцирани след *P. gingivalis*-индуцирана цитрулинация на енолаза в гингивата на генетично предразположени индивиди.

P. gingivalis може директно да се свърже с ревматоидния артрит чрез процеса цитрулинация и предизвикване на антипептидил цитрулин-антитела, реагиращи с цитрулинирани човешки собствени протеини (269). Това е едно от доказателствата, че конкретен пародонтопатоген играе роля в развитието и прогресията на РА.

В свое проучване за връзката между пародонтита, *P. gingivalis* и ревматоидния артрит Mikuls et al. (245) откриват значително по-високи нива на серумни антитела срещу *Fusobacterium nucleatum* при болните от ревматоиден артрит и пародонтит в сравнение с контролите. В сравнение с *P. gingivalis* този микроорганизъм е по-слабо вирулентен и не е така силно асоцииран с пародонтита. За *Fusobacterium nucleatum* се знае, че експресира повърхностни адхезини и играе ролята на свързващ организъм в комплексния биофилм, характеризиращ пародонтита, може да коагрегира с *P. gingivalis* и да прояви синергично действие по отношение на предизвиканата пародонтална деструкция (295).

Reichert et al. (309) откриват ДНК от 5 пародонтопатогена в синовиална течност на болни от ревматоиден артрит и пародонти – *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans*, *P. intermedia*, *T. forsythia* и *T. denticola*, като ДНК от *P. gingivalis* се установява значително по-често от останалите микроорганизми, като корелира с тежестта на пародонтита и наличието му в субгингивалната плака.

Изследване на Schwenger et al. (331) разглежда асоциацията на имунния отговор на организма срещу *P. intermedia* при пациенти с ревматоиден артрит и пародонтит с антителата срещу цитрулинирани протеини. Авторите установяват, че антителата срещу цитрулинирани цитокератин-13 и тенасцин-5 проявяват реактивност и срещу *P. intermedia*. Изказват хипотезата, че този микроорганизъм би могъл да предизвика имунен отговор с производство на АСРА по механизъм, различен от този на *P. gingivalis*. Те предполагат, че *P. intermedia* е способна да стимулира активността на човешките пептидил-аргинин деиминази посредством индукция на локален възпалителен отговор. Активираните неутрофили са предполагаем източник на цитрулинирани антигени, а нуклеазите на *P. intermedia* притежават способността да разграждат структури по повърхността на неутрофилите (neutrophil extracellular traps – NETs), съдържащи антибактериални субстанции, включително и пептидил-аргинин деиминази и по този начин да увеличават патогенността си. Разрушените, в резултат на активността на *P. intermedia*, NETs освобождават ПАД и по този начин стават източник на цитрулинирани пептиди (94, 169, 352).

Scher et al. (326) установяват значително повишени нива на *Tanarella forsythia* и *Treponema denticola* при пациенти с пародонтит и с диагностициран, но нелекуван ревматоиден артрит. Те откриват тенденция за намаляване на нивата на тези микроорганизми след започване на лечението и постигане на контрол над ревматичното заболяване. Авторите изказват предположение за въздействие на препарати, модулиращи имунния отговор с възможни антибактериални свойства (хидроксихлороквин и метотрексат) върху адаптацията на тези два микроорганизма в субгингивалната екологична ниша.

Loyola-Rodrigues et al. (207) изказват предположение за три възможни механизма на транспорт на бактериална ДНК от пародонтални тъкани до синовиума:

попадане живи микроорганизми от системната циркулация в ставата; попадане на фрагменти от ДНК на микроорганизми в синовиалното пространство по кръвен път и пренос на бактериална ДНК от имунни клетки (синовиалната течност съдържа фагоцитиран материал, имуноглобулини, ревматоиден фактор, фибрин, антинуклеарни фактори, имунни комплекси и части от ДНК). В своето проучване, авторите установяват повишени нива на IgG и IgA в серум и синовиална течност срещу *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *Tanarella forsythia*, както и антитела срещу 40-kD heat shock protein от *A. actinomycetemcomitans* при пациенти с ревматоиден артрит и пародонтит.

5. Генетични аспекти на връзката на пародонтита с ревматоидния артрит

Пародонтитът и ревматоидният артрит са мултифакторни, комплексни заболявания. Те се асоциират с вариации на множество гени, всеки с относителен принос и роля в патологичния процес. Такива гени се наричат *модифициращи заболяването* (135). По отношение на пародонтита се предполагат повече от 20 модифициращи гена, които варират по значение за различните форми на пародонтит, за различните етнически популации и могат да се влияят в различна степен от факторите на средата. Генетичните фактори, асоциирани с пародонтита и ревматоидния артрит, съдействат за възприемчивостта на индивида към заболяванията и имат отношение към появата, тежестта и прогресията им (190). Ефективността на индивидуалната имунна система определя тежестта и разпространението на пародонталната деструкция и може да се разглежда като възприемчивост на индивида към заболяване. Ролята на генетичните фактори в развитието на пародонталните заболявания се потвърждава с въвеждането на концепцията за високорисковите групи. Редица изследвания показват, че относително малки пропорции от популациите развиват по-тежки форми на пародонтит, свързан с загуба на по-голям брой зъби (53). Тези факти показват, че не всички индивиди са еднакво възприемчиви към пародонтални заболявания. Съществуването на високорискови групи не може да бъде обяснено единствено с ролята на микроорганизмите, съществуват и

други фактори, влияещи на възпалителния и имунния отговор локално и системно – това са системни заболявания, фактори на средата (като пушене) и генетични фактори.

Категорично доказателство за влиянието на генетичните фактори при пародонтита е откриването на гена, кодиращ продукцията на лизозомната протеаза катепсин С от неутрофили, лимфоцити и епителни клетки и асоциацията му с препуберталния пародонтит като част от синдрома на Papillon-Lefèvre (372). Открити са повече от 40 мутации на гена с почти пълна загуба на функция на катепсин С, но точният механизъм, по който тази загуба на функция играе роля в патогенезата на препуберталния пародонтит, е неясен.

Само 10-15% от индивидите от световната човешка популация развиват тежки форми на деструктивно пародонтално заболяване (206). Появата и развитието на пародонтита е повлияно от микроорганизмите от субгингивалния биофилм, от редица системни заболявания, от фактори на средата и от гени, модифициращи заболяването. Вниманието е насочено към идентифицирането на генетични полиморфизми, свързани с имунния отговор, след като се знае, че отговорът на организма играе ключова роля в патогенезата на пародонтита.

Много от вариациите в клиничните характеристики на пародонталните заболявания и ревматоидния артрит могат да се обяснят с генетични фактори. Тежестта на пародонталната деструкция е до голяма степен резултат от продукцията на различни по количество и вид проинфламаторни медиатори. Подобна е и зависимостта при ревматичните заболявания, при които хуморалният имуен отговор има важна роля. Генетичният код е определящ за поведението и разпространението на клетките на имунната система, а те са отговорни за тежестта и прогресията на възпалителните заболявания.

Човешките левкоцитни антигени (HLA) са група генетично детерминирани антигени, разположени по повърхността на повечето ядрени човешки клетки. Първоначално са открити по повърхността на човешки левкоцити и затова носят това име. Тази група антигени участват в регулацията и контрола на имунните механизми и определят възприемчивостта и резистентността към различни заболявания (59, 229). HLA са част от главния комплекс за тъканна съвместимост

(MHC), комплекс с основна роля в осъществяването на имунния отговор срещу чужди антигени (229). От седемте основни типа HLA-антигени (A, B, C, D, DR, DQ и DP) е установена връзка между ревматоидния артрит и D, DR, DQ и DP антигените. Те съставляват 30% от генетичния риск за развитие на заболяването (126, 260). Най-добре проучени са детерминантите на локус D. Установени са HLA-DRB1 алели, съдържащи определена последователност от 5 аминокиселини (QKRAA) в остатъци 70-74 на HLA-DR β веригата. Тази последователност кодира така наречения *споделен епитоп*, силно асоцииран с появата, активността, тежестта и прогресията на ревматоидния артрит (126). Най-добре проучените алели от споделения епитоп принадлежат на HLA-DRB1 група 04 (0401, 0404, 0408, 0405), HLA-DRB1 група 01 (0101 и 0102), HLA-DRB1 група 14 (1402) и HLA-DRB1 група 10 (1001), но механизмът на асоциация все още е неясен. Възможна е връзка с представянето на артритогенни антигени или промени в Т-клетъчната регулация (126, 148). Някои изследвания установяват връзка между наличието и количеството антитела срещу цитрулинирани протеини при болни от ревматоиден артрит, положителни по отношение на носителството на алели от споделения епитоп в сравнение със споделен епитоп-негативни болни от ревматоиден артрит. Други проучвания показват връзка между генното взаимодействие на различни алели от споделения епитоп и наличието на АСРА и повишения риск за развитие на РА (134, 151). Проучване на Mahdi et al. (214) установява връзка между наличието на цитрулинирани: алфа-енолаза, виментин и фибриноген, в серума на АСРА-положителни пациенти с ревматоиден артрит и носителство на HLA-DRB1*04 алели.

5.1. Полиморфизъм на Fc γ R гените

Левкоцитите от миелоидния и лимфоидния ред имат рецептори Fc γ R за константния Fc регион на молекулата на IgG. Такива рецептори са открити по повърхността на голям брой имунни клетки в пародонталните тъкани. Изглежда те играят ролята на мост между клетъчния и хуморалния имунен отговор в патогенезата на пародонтита. Микроорганизмите и бактериалните антигени, опсонизирани

с антитела, могат да бъдат фагоцитирани посредством FcγR на неутрофилите. Т-клетките и НК клетките могат да се активират, когато техните FcγR се свържат с опсонизираните бактериални антигени. Тези процеси водят до освобождаване на различни цитокини и химиокини. Когато една или няколко FcγR-медиирани функции на левкоцитите са компрометирани или прекомерни поради полиморфизъм на FcγR гените, е възможно възприемчивостта и/или тежестта на пародонтита да е променена (205). FcγR са три класа с няколко подкласа – FcγRI a и b, FcγRII a, b и c, и FcγRIII a и b. FcγRIIa най-често се установяват в гранулоцити и ендотелни клетки, FcγRIIIa – в моноцити, макрофаги и НК клетки, а FcγRIIIb – в неутрофили (386). Полиморфизмът на тези гени е свързан с различна ефективност на молекулите, които кодират. При FcγRIIa има заместване на хистидин (H) от аргинин (R) на позиция 131; FcγRIIaH131 се свързва с IgG2-комплекс ефективно, докато FcγRIIaR131 не може да медира тази реакция. FcγRIIIb проявява биалелен полиморфизъм – NA2-тип се свързва с по-малка ефективност с комплексите IgG1 и IgG3 отколкото NA1-тип. При FcγRIIIa е налице заместване на фенилаланин (F) от валин (V) на позиция 158. Рецепторът, кодиран от FcγRIIIaV158 алел, има по-голям афинитет към комплексите IgG1 и IgG3 и само този рецептор е способен да се свърже с IgG4. Рецепторът, кодиран от FcγRIIIaV158 алел, увеличава активността на макрофагите в отговор на IgG-съдържащите комплекси и поддържа възпалението. Данните от проучванията на този ген и асоциацията му с пародонталните заболявания са недостатъчни. Изследване на Meisel et al., 2001 (233), свързва FcγRIIIaV158 алела с тежестта и разпространението на костната загуба при пациенти с пародонтит. FcγRIIIa158V е асоцииран с по-голямо разпространение и с по-тежка загуба на кост в сравнение с FcγRIII158F алела. Sugita et al., 1999 (357), свързват FcγRIIIa158V алела с рецидив на хроничния пародонтит, а Kobayashi et al., 2001 (182), установяват, че FcγRIIIa158V алела е с по-голяма честота при пациенти с тежък пародонтит отколкото при лица с умерен. Гените, кодиращи FcγR, са асоциирани с патогенезата и на ревматоидния артрит и други автоимунни заболявания. Тези рецептори са експресирани по повърхността на множество възпалителни клетки, участват в свързването на антитела и имунни комплекси, фагоцитозата и антигенно представяне. Тяхната експресия е генетично обусловена и регулирана, и се асоциира с развитието на експериментален артрит (40, 385). Kastbom et al., 2005 (164), в свое изследване установяват, че честотата на FcγRIIIa158V/V

и FcgR158V/F е значително по-висока при болни с ревматоиден артрит в сравнение с контролната група здрави индивиди. Това проучване свързва V-алела и с активността на ревматоидния артрит – установена е тенденция стойностите на DAS28 да са по-високи при FcgRIIIa158V/V. Авторите проучват възможното взаимодействие между FcgRIIIa158V/F полиморфизма и HLA-DRB1 полиморфизма. Единственият установен ген за възприемчивост към ревматоиден артрит е HLA-class II. HLA-асоциацията на някои алели DRB1, кодиращи *споделен епитоп*, е често свързвана с РА. И двете изследвания констатираха увеличен риск за развитие на ревматоиден артрит само при пациенти, които са хомозиготни по FcgRIIIa158V/V и положителни за HLA-DRB1 *споделен епитоп*. Други изследвания разглеждат от друг ъгъл това взаимодействие и установяват значимо по-голям брой носители на алел FcgRIIIa158V при болни от ревматоиден артрит с HLA-DRB1 отколкото при ревматоиден артрит без *споделен епитоп* (189).

5.2. Полиморфизъм на гени, свързани с експресия на общи за II и РА инфламаторни медиатори

Много проучвания разглеждат генетичните полиморфизми на IL-1 и TNF- α гени (235, 236). IL-1 и TNF- α са проинфламаторни цитокини и имат важна роля в патогенезата на пародонталните заболявания. Способни са да стимулират костната резорбция, да регулират пролиферацията на фибробластите в гингивата и периодонталния лигамент. Техните нива в гингивалната течност при пародонтит са повишени. Полиморфизмът на гените, които ги кодират, е свързан с повишаване на нивата на цитокините IL-1 и TNF- α и с дисрегулация на протеинната продукция (234). Полиморфизмът на гени, кодиращи провъзпалителни цитокини, е рисков фактор в патогенезата на пародонталните заболявания. Полиморфизмът на IL-1 и TNF- α е свързан и с някои системни възпалителни и инфекциозни заболявания, като ревматоиден артрит, системен лупус, синдром на Съогрен, псориазис и др. Тези цитокини са от фундаментално значение за ревматоидния артрит – свързани са по-тежки ставни увреждания, с по-висока скорост на прогресия на ерозивните промени, както и с по-голяма активност на заболяването (170). IL-1 е смятан за основен медиатор на ставната деструкция и генетичният полиморфизъм на гена на IL-1 може да е полезен по отношение на предиктивността на тежестта и на ревматоидния артрит (57).

Интерлевкин-4 е плейотропен цитокин, инхибиращ Th1 клетките и стимулиращ Th2 имунния отговор. Той е и мощен регулатор на функцията на макрофагите. Потиска секрецията на IL-1 и е способен да индуцира апоптоза в остеобласти и моноцити. По този начин допринася за прогресията на костната резорбция. Три полиморфизма са известни с асоциацията си с повишен риск от пародонтални заболявания – IL-4 590 C/T, IL-4 33 C/T и IL-4 70 bp (404).

Полиморфизмът на гена, кодиращ IL-6, е свързан с вариации в продукцията на интерлевкин-6 и е асоцииран с наличието на *P. gingivalis* и *A. Actinomycetemcomitans* в субгингивална плака (265). Този цитокин е мощен медиатор на костната резорбция чрез стимулиране на макрофаги и остеокласти. Основната му функция е индуцирането на матурацията на В-клетките и превръщането им в имуноглобулин-секретиращи клетки. Също така той стимулира растежа на Т-клетките, инхибира фибробластите и инициира експресията на клас I МНС антиген. Този цитокин играе ключова роля в отговора на организма към бактериални антигени. Промените в серумните му нива повлияват имунния отговор в посока фаворизиране на растежа на пародонтопатогенните микроорганизми. IL-6 174 GG генотип е свързан с повишена продукция и активация на макрофаги. Това води до увеличаване на нивата на инфламаторни продукти и желязо и до създаването на благоприятна за развитието на микроорганизмите среда. Носителството на G-алела е възможно да бъде силен предиктор за наличие на *P. gingivalis* и *A. actinomycetemcomitans* и се свързва с по-голяма тежест на пародонтита (266).

Интерлевкин-8 е химиокин от важно значение в патогенезата на пародонтита по отношение активацията и миграцията на неутрофили. При пародонтит нивата му в гингивалния ексудат са повишени. Някои изследвания показват възможност пародонтопатогени като *P. gingivalis* и *T. forsythia* да индуцират експресията му от гингивалните епителни клетки (280). Генът, кодиращ производството на този интерлевкин, има два полиморфизма – IL-8 251 A/T и IL-8 845 T/C. 251-A алелът е асоцииран с повишено производство и активност на IL-8, а T-алелът има протективно действие. По отношение на 845 T/C полиморфизма C-алела се асоциира с повишен риск от пародонтално заболяване (403).

Полиморфизмът на гена, кодиращ IL-10, е свързан с нарушена продукция на интерлевкин-10. Този цитокин се продуцира от моноцити/макрофаги и Т-клетки и ре-

гулира проинфламаторните IL-1 и TNF- α . Той се смята за антиинфламаторен фактор, който потиска имунния отговор на моноцитите/макрофагите и стимулира продукцията на протективни антитела (88). IL-10 е асоцииран със системен лупус и ревматоиден артрит във връзка с възможността му да стимулира продукцията на аутоантитела (72). Данните са противоречиви за евентуална връзка на полиморфизма на гена, кодиращ IL-10, с пародонталните заболявания и са необходими повече изследвания за изясняване на ролята му в патогенезата на пародонтита.

Семейството на интерлекин-17 отскоро е по-подробно изучено. Това е подклас цитокини, включващи 5 лиганда (интерлекини 17A, 17B, 17C, 17D, 17E и 17F) и 5 рецептора (интерлекини 17RA, 17RB/25R, 17RC, 17RD/SEF и 17RE). От тях интерлекин 17A е най-добре изучен. Първоначално се е смятало, че е продуциран само от Т-клетки, но днес е известно, че макрофаги, дендритни клетки и НК клетки също го продуцират. Интерлекин-17 са свързани с патогенезата на различни възпалителни и аутоимунни заболявания чрез стимулиране на епителни клетки и фибробласти за секреция на IL-6 и IL-8, TNF- α и PGE2, както и остеоласти за секреция на RANKL (279). Проучване на Correa et al. (78) показва, че генният полиморфизъм на IL-17A 197 е свързан с хроничния пародонтит и носителството на алел A е асоциирано с по-голяма тежест и активност на заболяването. Авторите изказват хипотезата, че полиморфизмът на този ген е свързан с регулацията на производството на интерлекин-17 и последващата експресия на проинфламаторни медиатори и медиатори на костната деструкция. Paradowska-Gorycka et al. (289) демонстрират асоциация на генетичния полиморфизъм на IL-17 F 161 с по-висока активност на ревматоидния артрит, докато полиморфизмът на гена, кодиращ IL-17A, е свързан по-скоро с радиографската прогресия на заболяването.

Интерлекин-18 е цитокин, принадлежащ към групата на IL-1, и е свързан с редица възпалителни заболявания, като пародонтит, ревматоиден артрит, атеросклероза, псориазис и др. Полиморфизмите на гена, кодиращ IL-18, са свързани с промени в експресията и функцията на този интерлекин и по този начин с възможна предразположеност към пародонтит. Известни са два полиморфизма – място 607 A/C и място 137 G/C. Изследване на Li et al. показва значима асоциация между носителството на C-алелите и повишения риск от пародонтит (201).

Алвеоларната костна загуба е резултат от действието на медиаторите на костния метаболизъм и е част от характеристиките на пародонтита. Генът, кодиращ

витамин D рецептора, е идентифициран като ген, отговорен за експресията на медиатори за костна хомеостаза. Генният полиморфизъм на витамин D рецептора е свързан с промени в експресията на тези медиатори, нарушаване на костния метаболизъм и промяна в костната плътност при някои заболявания като остеопороза и остеоартрит (351). Освен това този рецептор има значение за фагоцитозата на моноцитите и тяхната диференциация (334). Генът, кодиращ витамин D рецептора, е възможно да бъде свързан с пародонталните заболявания, защото той влияе както на костния метаболизъм, така и на имунния отговор. Проведените проучвания показват противоречиви резултати и затова са необходими още данни за изясняване на ролята на този ген в патогенезата на пародонтита.

6. Тютюнопушене – общ рисков фактор на средата за пародонтит и ревматоиден артрит

Тютюнопушенето е свързано с някои системни състояния и заболявания като рак, преждевременно раждане, белодробни и сърдечно-съдови заболявания (395). В последните 25 години стана ясна значимостта на пушенето като основен рисков фактор в развитието и прогресията на пародонталните заболявания (33). Проучванията показват наличие на повече и по-дълбоки пародонтални джобове при пушачи в сравнение с непушачи, както и по-голяма загуба на аташман (33, 35). Броят на засегнатите фуркации е значително по-голям при настоящи пушачи и при тях се наблюдават рентгенографски фуркационни лезии два пъти по-често (32, 256). Пушачите имат по-голяма загуба на кост и повече зъбен камък (14, 32). Тези данни са потвърдени и от множество дългосрочни проучвания (34, 44, 212, 223).

Редица изследвания разглеждат влиянието на тютюнопушенето върху количеството и състава на зъбната плака, но получените данни са противоречиви. Интерес представлява проучването на Zambon et al., което показва, че броят на индивидите, положителни за *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* и *T. forsythia*, е значително по-голям сред пушачи отколкото при непушачи (413). *A. Actinomycetemcomitans* се открива 3 пъти по-често при пушачи, а *T. forsythia* – 2 пъти по-често, като при *T. forsythia* има дозозависима значимост. От пушещите под 10 цигари положителни за *T. forsythia* са 43%, докато от пушещите над 20 цигари 64% са *T. forsythia*-положителни.

Въпреки че бактериалната плака е етиологичният фактор при пародонталните заболявания, имунният отговор е определящ за възприемчивостта на организма. Пушенето може да повлияе пародонталната деструкция по пътя на нарушен отговор за неутрализация на микроорганизмите или увреждания в имунните механизми, водещи до по-голяма тъканна деструкция (191, 339). При пушачи е вероятно да е намален броят на Т-хелперните лимфоцити, които са от голямо значение за регулацията на В-клетките и производството на антитела. При тях се наблюдават намалени нива на IgG в серума и на IgA в слюнката, както и нарушен IgG2-отговор (23, 31, 79, 119). Серумните нива на IgG срещу *P. intermedia* и *F. nucleatum* са редуцирани при пушачи (129). Изследвания демонстрират влиянието на пушенето върху неутрофилите и тяхната функция – нарушени са химиотаксисът и фагоцитозата, както и освобождаването на реактивни кислородни радикали (74, 99, 161, 168). In vitro проучвания показват, че никотинът инхибира неутрофилната продукция на супероксид и водороден пероксид – реагенти с важно значение за антимикробната функция на тези клетки (282). Никотинът и цигареният дим оказват негативен ефект върху гингивалния кръвен ток, реваascularизацията на меките и твърдите тъкани, както и при оздравяването на пародонталната рана (73, 254, 312). Никотинът има инхибиращо действие върху фибробластите по отношение на продукцията на колаген и фибронектин, потиска пролиферацията на остеобласти и стимулира синтеза на алкалната фосфатаза (105, 370). Тютюневите компоненти могат да модифицират продукцията на цитокини и проинфламаторни медиатори, с което да допринесат за пародонтална деструкция. Никотинът увеличава продукцията на IL-6 от остеобласти (100). При пушачи нивата на TNF- α , IL-1 и PGE2 в кривуларната течност са повишени – такива промени могат да засегнат репаративния и регенеративния потенциал на пародонта (158, 290, 335).

От рисковите факторите на средата, асоциирани с ревматичните заболявания, пушенето е свързано с най-голям риск за инициация и прогресия на ревматоидния артрит. Публикации показват 40% по-висок риск от ревматоиден артрит при пушачи в сравнение с непушачи. Дори леките пушачи са с повишен риск за ревматоидно аутоимунно заболяване (10, 80, 162, 354, 375, 390). Биологичният ефект от тютюнопушенето за развитието на ревматоидния артрит е все още неясен. Някои

компоненти в тютюна, като никотина, хидрокарбони и въглероден моноксид, могат да предизвикат имунна реакция, а в някои проучвания се установява, че тези съставки могат да предизвикат артрит при гризачи (146, 353).

Ревматоидният артрит е комплексно инфламаторно заболяване, при което факторите на средата, генетичните фактори и имунният отговор взаимодействат помежду си и влияят по различен начин при отделните индивиди и по време на различните фази на болестта (177). В последните години бе изяснено, че пушенето е главен рисков фактор основно при RF-положителни пациенти с ревматоиден артрит и риска от развитие на заболяването е зависимо от носителството на някои алелни форми от споделения епитоп (HLA-DRB1). Това взаимодействие между пушенето и генния полиморфизъм показва, че тютюнопушенето може да отключи специфични имунни реакции в присъствието на определени гени (80, 162, 354, 375). Някои автори изказват хипотезата, че пушенето може да отключи имунна реакция срещу цитрулинирани протеини при носителство на алели от споделения епитоп въз основа на проучвания, показващи значима зависимост между пушене и HLA-DRB1 само при АСРА-положителни пациенти с ревматоиден артрит (177, 203). Това взаимодействие може да се случи години преди началото на клиничните симптоми на ревматичното заболяване. Те предполагат, че пушенето предизвиква увеличаване на броя апоптични клетки в организма и активация на вродения отговор, а в резултат на това се увеличава цитрулинацията на ендогенни протеини и количеството освободени интрацелуларни молекули, способни да предизвикат имунна реакция с образуване на антитела. Когато това се случи при индивиди, положителни за носителство на алели от споделения епитоп, рискът от развитие на ревматично заболяване е по-голям.

7. Слюнката – възможен диагностичен флуид

Има няколко източника на тъканни и телесни течности, които могат да се използват за откриване на биомаркери за РА. Най-често използваните биологични среди са кръвен серум и синовиална течност. Тяхното вземане обаче винаги е свързано с инвазивен подход. Съвременни изследвания използват слюнката като

субстрат с потенциални диагностични възможности. Анализът на слюнка има своите преимущества. Събирането на слюнка е лесно, неинвазивно и бързо. Слюнката се използва за диагностика не само на пародонтални заболявания и зъбен кариес, но и на системни заболявания (185).

Ако трябва да се направи скринингово изследване за заболяемост от РА, диагностичните биомаркери, като се има предвид разпространението на заболяването (около 1%), ще трябва да използват биологичен материал, който е лесно достъпен, и метод, който е по-малко инвазивен. Поради това слюнката изглежда по-подходяща в сравнение с кръвта, синовиалната тъкан или течност, за скрининг и за диагностика особено в ранния стадий на заболяването. В по-късни етапи на заболяването използването на показателя от слюнка би дало възможност за мониториране на заболяването и персонализиране на медицинския подход (52).

Концепцията за биомаркерния алгоритъм или многовариантните биомаркери е разработена въз основа на наблюдението, че един отделен биомаркер често е недостатъчен, за да даде категоричен резултат, а комбинацията от биомаркери е по-добра (51).

Цитокините като диагностични маркери. Цитокините са малки молекули протеини, които играят важна роля в клетъчната сигнализация. Те се секретират от различни клетъчни източници, действащи върху клетката, която ги произвежда (автокринна сигнализация) или върху околните клетки (паракринна сигнализация). Неудобствата и ограниченията при изследванията на цитокини са свързани с индивидуални вариации на индивида; вариации, свързани с възраст и пол, като изследванията показват увеличаване на количествата им, свързано с възрастта; денонощен ритъм на количествата им; зависимост от приема на храна; движение; стрес. Във връзка с изследванията е важно да се има предвид в каква биологична течност се правят, времето за работа, тъй като те имат относително кратък полуживот и е важно да се отчете риска от деградация на молекулата, да се спазва специална температура за съхранение. В идеалния случай пробите, предназначени за търсене на цитокини, трябва да се събират в стерилни контейнери (без ендоток-

син) и да се обработват максимално бързо. Обработената проба (плазма или серум) трябва да се замразят при -80°C възможно най-скоро в малки аликвотни части, за да се избегнат повтарящи се цикли на замразяване и размразяване (38).

Друго ограничение при изследвания на цитокини са припокриванията. В рамките на имуноанализите припокриванията са многобройни, сложни и обикновено трудни за разрешаване. Протеините могат да покажат променен модел на експресия при повече от едно заболяване. Присъствието на липиди, фактори на комплемента и други сложни молекули в кръвта също се отразяват на анализите. Съществуването на автоантитела срещу цитокини е документирано. Автоантителата срещу IL-1 са най-добре проучени (360). Тяхното разпространение е голямо и с висок афинитет.

Цитокините за диагностика на РА. През годините различни видове цитокини са открити като участващи в патологията на РА. Една насока от терапията се основава на блокиране на най-високо присъстващия цитокин. Голям брой от цитокините се откриват в мястото на заболяването – в синовиални тъкани и течности, където те играят роля във възпалителния процес, разрушаването на хрущяла и ремоделирането на костите, свързани с РА. Идентифицират се TNF-алфа и IL-1 като важни фактори в мрежата от цитокини, особено директно експресирани в мястото на заболяването в ставна тъкан или течност. IL-6 и IFN-гама също присъстват.

Данните за нивата на цитокините при хора във връзка с активността на заболяването все още са ограничени. Повишени нива на цитокини като IL1, IL-6 и TNF са интерпретирани като индикатор за възпалителното състояние. Малко вероятно е тези цитокини да служат като "биомаркери" при РА, тъй като те са свързани с биологичния процес, а не специално с определена болест. Въпреки тези ограничения има някои цитокини, които изглеждат релевантни при РА. За IL-6 е доказано, че са по-чувствителни от CRP за прогнозиране на терапевтичния отговор на пациентите с РА към ритуксимаб (104). Независимо от това IL-6 не е специфичен за заболяването (178). IL-6 не може да бъде открит в серум от здрави лица, докато серумните IL-6 нива са значително повишени при РА със значителни циркадни вариации, съответстващи на циркадния ритъм на симптомите в РА (19).

Антицитрулинирани протеинови антитела (АСРА или АССР) в диагностиката на РА

За РА се знае, че началото му се свързва с наличието на антитела, насочени срещу цикличен цитрулиниран пептид (anti-ССР) (313). Цитрулинацията, или деаминацията, е термин, използван за определяне на генетична модификация в протеин на аминокиселината аргинин в аминокиселината цитрулин и е осъществена от ензимната активност на пептидиларгинин деаминази (PADs).

По време на предклиничната имунологична фаза на ревматоиден артрит се появяват серумни автоантитела, които съществуват дълги години преди появата на клиничните признаци и симптоми на ревматоиден артрит. Двете най-добре проучени автоантитела са ревматоиден фактор и антицитрулинирани протеинови антитела (АСРА). От тях продуцирането на АСРА се счита за много важно поради високата им прогностична стойност за бъдеща проява на ревматоиден артрит. Анти-ССР антителата се откриват в различни тъкани на тялото. Американската колегия по ревматология определя присъствието на АСРА като един от класификационните критерии за диагностициране на РА. Екстраартикуларната цитрулинация и продуцирането на АСРА като основен имунологичен отговор са добре документирани в редица тъкани, включително във възпалени тъкани на гингива, свързани с пародонтално заболяване (51).

Клиничното диагностициране на РА остава трудно. На ранен етап възпалителният артрит често е с нетипично представяне. Автоантителата (RF и АСРА) са полезни при диагностицирането на РА, като те се включват като критерии в новата диагностична система, призната от EULAR (Annual European Congress of Rheumatology) от 2010 г. Недостатъкът им е, че и двата маркера нямат чувствителност в началото на заболяването (< 50%) (156), докато специфичността на АСРА е висока (над 95%) (121).

Идеалният диагностичен биомаркер за РА трябва да се характеризира с висока специфичност и чувствителност – близки до 100%. Идеалният биомаркер също трябва да открива наличие на РА в ранни стадии. Малко са биомаркерите с постигнати такива нива на чувствителност и специфичност.

Като значими диагностични методи за РА се прилагат определяне на ревматоиден фактор в серум и промените, които се откриват в ставите на рентгенография. През последните години се прилагат ултрасонография и магнитно-резонансно изследване на стави. Ходът на заболяването РА е флукуиращ и труднопредвидим. В клиничната практика активността на заболяването най-често се определя с показателите DAS28-CRP или СУЕ. Последните години изследванията са насочени към откриване и количествено характеризиране на антицитрулинирани антитела в серум. Тестът се характеризира с висока чувствителност и специфичност (20), което го прави един от тестовете, поставящи диагнозата РА. Средната чувствителност е определена като 53 и 68% съответно за анти-CCP1 и анти-CCP2, а средната специфичност е 96% и 95% съответно за анти-CCP1 и анти-CCP2. Чувствителността на определяне на анти-CCP е близка до тази на ревматоидния фактор, но специфичността е значително по-висока, така че разграничава РА от други ревматични заболявания. Освен това анти-CCP антителата изглеждат са силно предсказващи за бъдещо развитие на РА при здрави доброволци и пациенти с недиференциран артрит (20).

АССР титрите се определят, като се използва комерсиализиран антицикличен цитрулинов пептиден ензимно-свързан имуносорбентен анализ. Пациентите се считат за АСРА позитивни, ако титрите са 5 RU/ml или по-големи (225).

Проучванията показват, че пептидиларгинин деаминаза на *P. gingivalis* (PPAD) и човешка PAD-4 от възпалени тъкани на гингивата играят важна роля в производството на антициклични цитрулини пептидни антитела, които са част от етиологията на РА (136, 302).

Антиенолазата (анти-ЕНО1) от бактериален произход и от макроорганизма, както и фибриноген, може да бъде цитрулинирана от *P. gingivalis* PAD (PPAD). PPAD може да цитрулинира както пептидил аргинин, така и свободен L-аргинин (230). Установено е, че антицикличният цитрулинов пептид (анти-CCP) IgG и анти-PPAD IgG в серума са значително по-високи при РА отколкото при контролни пациенти без това заболяване (342). Следователно PPAD се свързва с производството на цитрулинирани протеини (109). Още едно доказателство за ролята на PPAD в производството на цитрулинирани протеини е обратната корелация на серумното ниво на PPAD IgG

с клиничния отговор при РА след биологично лечение (bDMARD). Пациентите с РА с ниски титри на анти-PPAD IgG имат значително по-нисък DAS28-CRP в сравнение с РА групата с високи титри IgG анти-PPAD (179).

Връзката на РА с пародонтита се демонстрира и въз основа на определянето на АСРА. Наличието на пародонтит е по-често при пациенти с АСРА положителен РА. При пациенти с присъствие на *P. gingivalis* в субгингивална плака и при тези с по-високи нива на анти-*P. gingivalis* антитела експресионните нива на избрани АСРА (включително антитела към цитрулинизирания филагрин) са по-високи, независимо от фактора тютюнопушене (245, 246).

От друга страна, пациенти с РА със серопозитивни цитрулинизирани автоантигени демонстрират по-висока честота на пародонтит. АСРА може да съществува от месеци до години в серума на пациенти преди изява на РА (215).

P. gingivalis може да цитрулинира протеини на макроорганизма или на бактерии, с което допринася за появата на РА. Съществува положителна корелация между антитяло-отговора към *P. gingivalis* и нивата на АСРА в подгрупата на пациентите с ранен РА (191). При диагностика на пародонтита се установява, че анти-СЕР-1 положителните пациенти имат значително по-високи пародонтални показатели в сравнение с анти-СЕР-1 негативните пациенти, а слюнченото ниво на анти-ССР корелира с максималната клинична дълбочина на сондиране (361).

Резултатите от проучване внушават, че оценката на слюнчените анти-ССР могат да бъдат обсъждани като маркер при диагностицирането на пациенти с ревматоиден артрит. При сравняване на нивата на слюнчените анти-ССР със серумните стойности при пациенти с РА са открити значими зависимости. В групата с РА 86.6% от пациентите имат увеличение на слюнчените нива на анти-ССР пропорционално на серумните стойности на анти-ССР (301).

Друго изследване показва, че антитела при пародонтит са насочени предимно към нецитрулинирани пептиди. Авторите считат, че тази загуба на толерантност води след това до автоимунен отговор при пародонтита, развиващ се в предсимптоматичен РА (85).

Интересното е, че PAD-2 и PAD-4, цитрулинирани протеини и АСРА са идентифицирани във възпалени човешки пародонтални тъкани (136, 263). Те биха

могли да се друг източник на извънартикуларна цитрулинация и да са в подкрепа на връзката между пародонтита и РА. Ролята на пародонталната цитрулинация и РА е все още в етап на изясняване и е важна за установяване.

ЗАКЛЮЧИТЕЛЕН АНАЛИЗ

От години се разглежда възможността за връзка между ревматоидния артрит и пародонтита на базата на редица общи патогенетични характеристики. Съществуващите епидемиологични данни показват зависимост между тежестта и разпространението на двете заболявания при един и същ индивид, както и по-голяма честота на случаи с пародонтално заболяване при страдащи от ревматоиден артрит. Каузалната връзка между двете заболявания е малко вероятна, но взаимодействието и взаимното влияние на тези заболявания изглеждат все по-очевидни. Така при наличието на пародонтит и ревматоиден артрит у един и същ пациент, вероятността за съществуването на общи патогенетични механизми заслужава допълнително разглеждане.

Известно е, че при П и РА възпалително-деструктивният отговор на организма се провокира от антигенна стимулация (липополизахариди, пептиди) и последваща каскада на възпалението, водеща до освобождаване на проинфламаторни медиатори, взаимодействащи с клетките на организма. Точният механизъм на взаимно потенциране на двете заболявания на базата на медиатори на възпалението обаче е **недостатъчно добре проучен**.

Антителата срещу цитрулинирани протеини в серум са диагностичен критерий за ревматоидния артрит, а количеството им е показател за тежестта на заболяването. Антителата срещу цитрулинираните протеини са биомаркери с голяма диагностична сензитивност и специфичност за ревматоидния артрит. Те притежават висока предиктивна стойност за началото на ревматоидния артрит и могат да бъдат открити години преди изявата на клиничните симптоми. Нивата им в серум са асоциирани с по-голяма тежест на заболяването (20). Въпреки че цитрулинирани протеини и антитела срещу тях са открити в пародонтални тъкани, като количеството им се увеличава с напредване на възпалителния процес (136, 263), не-

достатъчно проучени са механизмите на цитрулинация във възпалените пародонтални тъкани и евентуалната локална продукция на антитела срещу цитрулинирани протеини. Това е проблем, заслужаващ повишено внимание с оглед обсъждането на ролята пародонтита, като извънставен източник на цитрулинирани протеини, за намаляване на имунната толерантност при генетично предразположени индивиди и за изявата на ревматичното заболяване.

Ревматоидният фактор е един от диагностичните критерии за ревматоиден артрит, а концентрацията му в серума е показател за тежестта на заболяването (26). **Има недостатъчно данни** в литературата за наличието на RF в пародонтални тъкани и гингивална кревикуларна течност (71) и не изяснен възможният механизъм на локална продукция при пациенти с пародонтит.

През последните години вниманието се насочва към възможна връзка между някои пародонтопатогени и ревматоидния артрит. Обсъжда се влиянието им върху патогенетичните механизми при РА на базата на индиректното въздействие на пародонталната инфекция върху възпалителния процес посредством индуциране на продукцията на проинфламаторни медиатори, както и влиянието им върху имунния толеранс и активирането на антитяло-реакциите при РА чрез процесите на цитрулинация. Това е проблем, който е **недостатъчно проучен** и нови изследвания биха допринесли за изясняването му.

Недостатъчно проучена е и ролята на генетичните фактори и факторите на средата за изявата и прогресията на РА и П, както и възможността за съществуването на общи за двете заболявания рискови фактори. В последните години значителен интерес представлява идентифицирането на единични нуклеотидни полиморфизми (SNPs). Това би позволило определянето на индивидуалните различия във възприемчивостта към пародонтални и ревматоидни заболявания. Разпознаването на генетичните мутации на отделните гени, асоциирани с комплексните заболявания, както и взаимодействията между тях и факторите на средата, ще позволи по-добро разбиране на влиянието им върху тези заболявания. Това взаимодействие иницира и регулира имуноинфламаторния отговор. Установяването на общи генетични фактори, както и установяването на взаимодействие на генетични

фактори с фактори на средата би допринесло за разкриване на друг аспект от общите механизми в патогенезата на двете заболявания.

НАУЧНА ХИПОТЕЗА

Намирането на зависимост между наличието на ревматоиден артрит (РА) и клиничните показатели за тежест и активност на пародонтита (П), както и на връзка между наличието на П и лабораторните показатели за тежест и активност на РА би потвърдило тезата за взаимното потенциране на двете заболявания на базата на медиатори на възпалението при инфламаторно-деструктивния отговор на организма. Определянето на присъствието и количеството на ревматоиден фактор (RF) и антитела срещу цитрулинирани протеини (АСРА) в серум е част от диагностиката и класифицирането на РА. Откриването на увеличени количества на RF и АСРА в гингивална кревикуларна течност и слюнка при пациенти с пародонтит ще подкрепи хипотезата за тяхната локална продукция, като резултат от локалната цитрулинация при пародонтално заболяване. Тези локално произведени фактори могат да са отключващи за изява на РА или да допринесат за активирането му. При количественото определяне на серумните и слюнчените показатели на АСРА при пациенти без РА е възможно стойностите на АСРА в слюнка да бъдат определени като част от предклиничната фаза на РА. Така чрез този слюнчен показател ще могат да се установят индивидите в риск от РА. От друга страна, при сравняване на нивата на слюнчените АСРА със серумните им стойности и данните от прегледа на пациенти с РА могат да се открият зависимости, които биха дали основание нивото на АСРА в слюнка да се обсъжда като маркер при диагностицирането и мониторирането на РА. Идентифицирането на пародонтопатогени от субгингивална микробна флора при пациенти с П и/или РА, както и установяването на връзката им с наличието и количествата на RF в гингивална кревикуларна течност и АСРА в гингивална кревикуларна течност и в слюнка биха потвърдили ролята им в продукцията на RF и АСРА. Евентуалното идентифициране на определен генотип при изследването на генния полиморфизъм на FcgIIIa-158V/F при пациенти, страдащи от РА, и при индивиди, стра-

дащи от пародонтит, в сравнение със здрави лица (без тези заболявания) би го определило като рисков фактор за двете заболявания. Съпоставянето на тютюнопушене и генен полиморфизъм на FcgIIIa-158V/F, от една страна, с изявата и тежестта на РА и от друга, с изявата и тежестта на П, ще определи значимостта на взаимодействието на генотипа с факторите на средата за проявата на двете заболявания. Изследването на влиянието на факторите на средата – тютюнопушене, пол – би допринесло за определяне на тяхната значимост като общи рискови фактори за двете заболявания и за обосновка на връзката между тях.

III. ЦЕЛ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

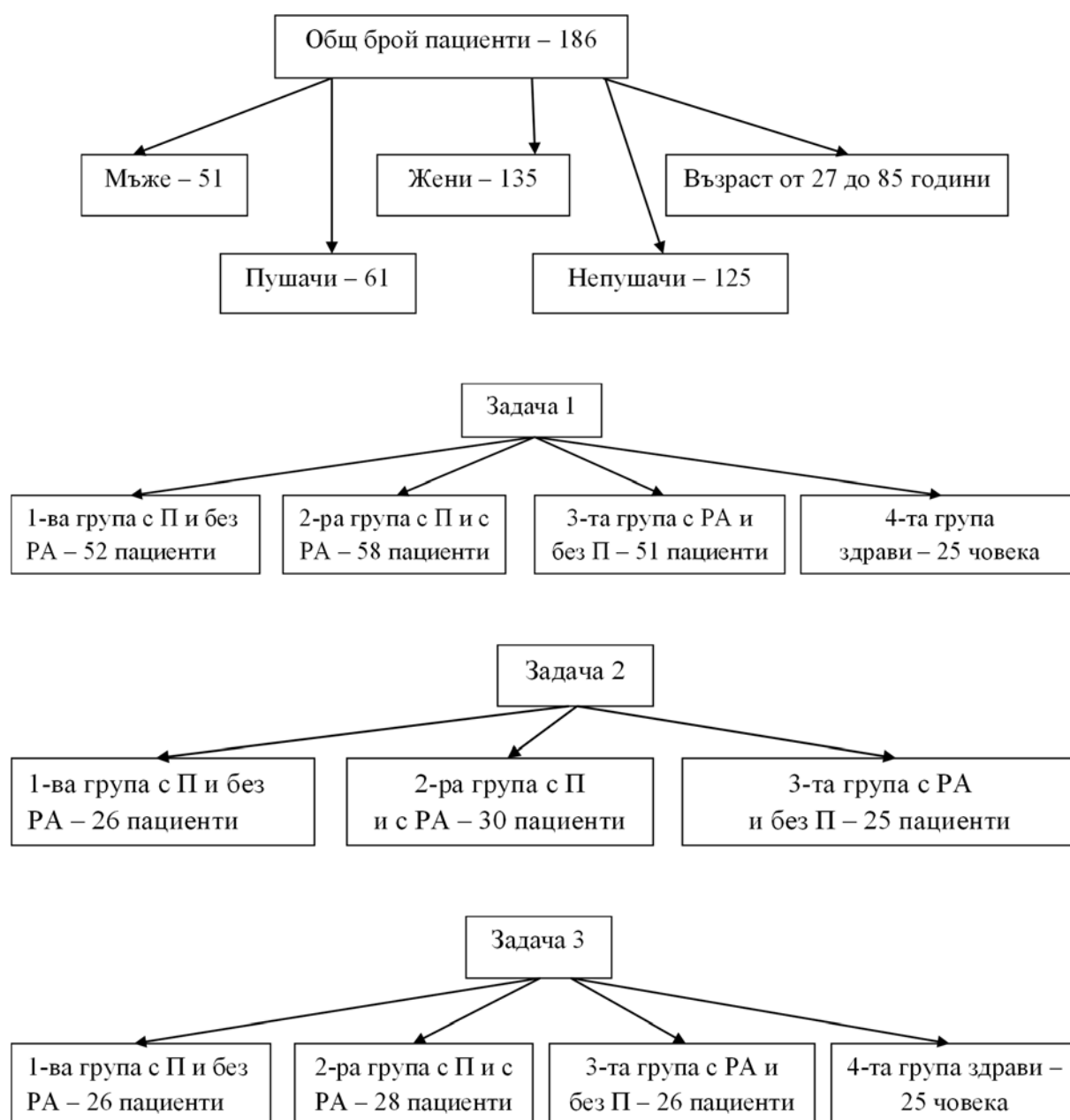
Да се изследва връзката между пародонтита и ревматоидния артрит на базата на клинични характеристики на двата типа заболявания, имунологични показатели в серум, гингивална кревикуларна течност и слюнка и генетични фактори и да се определят общи рискови фактори.

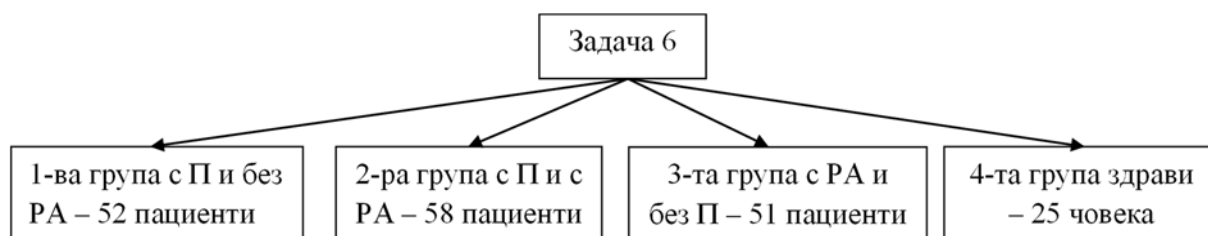
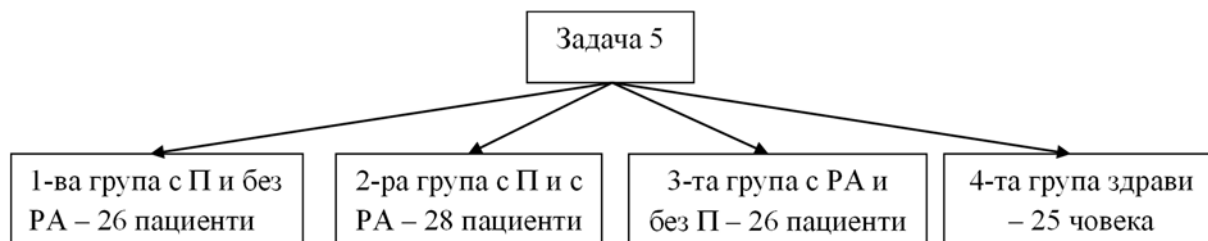
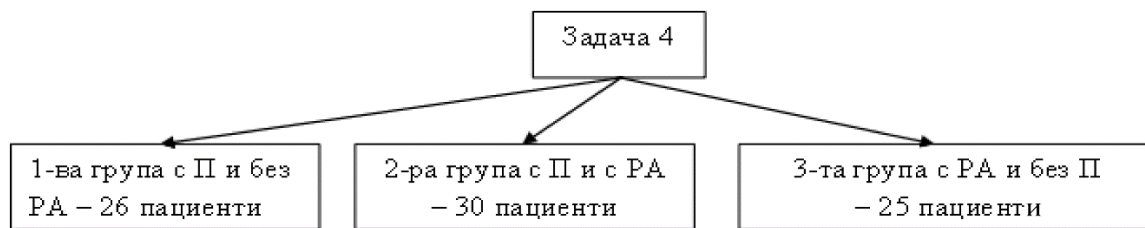
IV. ЗАДАЧИ

1. Съпоставяне на наличието и тежестта на РА с наличието и тежестта на П.
2. Определяне на присъствието и количеството на ревматоиден фактор (RF) и антитела срещу цитрулинирани протеини (АСРА) в гингивална кревикуларна течност при пациенти с П, с РА и с комбинация от двете заболявания и изследване на връзката им с наличието и изявата на РА и П.
3. Определяне на присъствието и количеството на антитела срещу цитрулинирани протеини (АСРА) в слюнка при пациенти с П, с РА и с двете заболявания и проучване на връзката им с наличието, активността и тежестта на двете заболявания.
4. Идентифициране чрез PCR на пародонтопатогените: *P. gingivalis*, *P. Intermedia*, *T. denticola* в субгингивална плака във връзка със заболяванията ревматоиден артрит и пародонтит.
5. Изследване на генния полиморфизъм на FcgIIIa158V/F при пациенти с пародонтит, с ревматоиден артрит, със съчетание на ревматоиден артрит и пародонтит и здрави индивиди във връзка с изявата на двете заболявания. Проучване на комбинираното влияние на FcgIIIa158V/F и тютюнопушенето върху изявата на пародонтита и ревматоидния артрит.
6. Изследване на влиянието на факторите на средата – тютюнопушене, пол, образование, възраст върху изявата на пародонтита и ревматоидния артрит и евентуалното им определяне като общи рискови фактори за двете заболявания.

V. ОБЕКТ НА ИЗСЛЕДВАНЕТО

В изследването участваха 186 пациенти (135 жени и 51 мъже), на възраст от 27 до 85 години. Пациентите бяха разделени на четири групи: 1-ва група – 52-ма пациенти с диагностициран пародонтит, без ревматоиден артрит и с остеоартроза; 2-ра група 58 пациенти – с диагностицирани пародонтит и ревматоиден артрит; 3-та група – 51 пациенти с диагностициран ревматоиден артрит и без пародонтит; 4-та група – 25 здрави индивиди без пародонтит и без ревматоиден артрит.





От изследването бяха изключени пациенти под 18 години, лица с по-малко от девет зъба в устата, пациенти, на които им е провеждано антибиотично лечение през последните три месеца или са се подлагали на пародонтално лечение през последните шест месеца, пациенти, нуждаещи се от антибиотична профилактика по време на процедури в устата, включително пародонтално сондиране. Изключени са и бременни и кърмещи жени.

Пациентите с хроничен пародонтит (от първа и втора група) трябва да имат шест места в два квадранта с най-малко два засегнати зъба във всеки квадрант и всяко засегнато място да е с дълбочина на джоба при сондиране $PPD \geq 5$ mm, клинична загуба на аташман $CAL \geq 3$ mm, кървене при сондиране $BoP \geq 20\%$ от всички изследвани места (изследвани са шест места на зъб). Предвижда се в изследването да участват пациенти с умерен пародонтит (със загуба на аташман по-голяма или равна на 3 и по-малка или равна на 4 mm) и тежък пародонтит (загуба на аташман по-голяма или равна на 5 mm и/или фуркационен дефект F2 или F3).

Диагнозата ревматоиден артрит е поставена в Клиниката по ревматология на УМБАЛ "Свети Иван Рилски" въз основа на класификационните критерии на

ACR/EULAR от 2010 г. Критериите са разпределени в 4 групи: ставно засягане, серологични показатели, острофазови протеини и продължителност на симптомите. Използва се точкова система и диагнозата РА се приема при наличие на синовит, който не може да бъде обяснен с друго заболяване и общ резултат от допълнителните критерии ≥ 6 точки

Синовит, който не може да се обясни с друго заболяване + резултат $\geq 6/10$		
Ставно засягане	1 голяма става	0
	2-10 големи стави	1
	1-3 малки стави	2
	4-10 малки стави	3
	> 10 стави (поне 1 малка)	5
Серология	RF–; АСРА–	0
	Нисък RF+ или нисък АСРА+	2
	Висок RF+ или висок АСРА+	3
Острофазови протеини	Нормален CRP и нормална СУЕ	0
	Абнормен CRP или абнормна СУЕ	1
Продължителност На симптомите	< 6 седмици	0
	≥ 6 седмици	1

Диагнозата остеоартроза е поставена в Клиниката по ревматология на УМБАЛ "Свети Иван Рилски", като пациентите трябва да имат:

1. Анамнестични данни за механичен тип болка (болка, засилваща се при физическо натоварване и липсваща в покой), краткотрайна сутрешна скованост (по-малко от 15 мин);

2. Клинични данни – специфични за засегнатите стави – обикновено засегнати са дисталните интерфалангеални стави (възли на Хеберден) или проксималните интерфалангеални стави (възли на Бушар); рицартроза; носещи стави.

3. Лабораторни данни – нормални острофазови показатели; отрицателни RF-IgM и анти-ССР.

4. Рентгенови промени – стесняването на ставната междина; субхондрална остеохондроза; образуване на остеофити; кисти и колапс на костта;

Тези пациенти не изпълняват критериите за поставяне на диагноза възпалително ставно заболяване.

Пародонтално здравите лица трябва да имат BoP $\leq 10\%$ от всички изследвани места (изследвани са шест места на зъб), дълбочина на джоба при сондиране PPD ≤ 4 mm на всички места, липса на места със загуба на аташман (липса на места с CAL ≥ 2 mm).

VI. МЕТОДИ

1. Анкетни (по анкетно-клинична карта) – изследвани 186 пациенти.

2. Клинични

2.1. Методи за изследване на ревматоиден артрит и остеоартроза – изследвани 186 пациенти.

2.1.1. Анамнеза, оглед, палпация.

2.1.2. Активността на артритите се оценява чрез международно утвърден, комбиниран скор (критерий) за оценка DAS-28 (CRP). Скорът включва клинични и лабораторни данни.

1. Брой болезнени и оточни стави (от общо 28 стави).

2. Визуална аналогова скала – субективна оценка на пациента за активността на болестта.

3. Стойността на СУЕ или на CRP. За целите на настоящото проучване е използвана стойността на CRP.

Скорът се изчислява от ревматолога чрез DAS28 калкулатор. На базата на стойността му, активността на заболяването се определя като: ремисия $DAS < 2,6$; ниска $2,6 < DAS < 3,2$; умерена $3,2 < DAS \leq 5,1$; или висока $DAS > 5,1$.

2.2. Методи за изследване на орално-хигиенен, гингивален и пародонтален статус – изследвани 186 пациенти

2.2.1. Определяне на Hygiene index (HI – хигиенен индекс). Зъбната плака се визуализира с помощта на оцветяващ агент. Отчита се присъствието (+) или отсъствието (-) на плака по четири зъбни повърхности (вестибуларна, орална, мезиална, дистална). Индексът се изчислява в проценти зъбни повърхности без плака.

2.2.2. Определяне на Papilla bleeding index (PBI – индекс, отчитащ кървенето на папилата, като показател за възпаление на гингивата). С помощта на пародонтална сонда се предизвиква кървене чрез въвеждане на сондата в сулкус/джоба на дълбочина 1 мм и придвижване покрай мезиалните и дисталните зъбни повърхности, от основата на папилите до върха им. След 20-30 секунди се отчита интензивността на кървенето. Стойностите му са: при липса на кървене се

дава оценка „0“; при наличие на една кървяща точка – „1“; при наличие на тънка линия кръв на гингивалния ръб или на няколко кървящи точки – „2“; при изпълване на интерденталния триъгълник с кръв – „3“; при профузно кървене – „4“.

Сондирането се извършва по квадранти: I квадрант – палатинално, II – вестибуларно, III – лингвално, IV – вестибуларно. Стойността на индекса за пациент е средно аритметично от всички измерени стойности и определя тежестта на гингивалното възпаление. Процентът на кървящите папили спрямо всички папили определя разпространението на възпалението.

2.2.3. Определяне дълбочината на пародонталния джоб при сондиране (PPD). Изследването се извършва със специализирана градуирана пародонтална сонда. Измерването се прави на всяка пародонтална единица в устата в шест точки – централно вестибуларно, централно орално, а медиално и дистално – в две точки (вестибуларна и орална). Регистрират се шест стойности – вестибуларно и орално, и по две стойности, измерени медиално и дистално.

2.2.4. Определяне на показателя BOP (bleeding on probing – кървене при сондиране). Този индекс регистрира наличието на кървене от дъното на джоба в рамките на 30 секунди след сондиране (отбелязва се със стойност 1) и липса на кървене в рамките на 30 секунди след сондиране от дъното на джоба (стойност 0). Измерването се извършва на всяка пародонтална единица в устата в шест точки – централно вестибуларно, централно орално, а медиално и дистално – в две точки (вестибуларна и орална). Вестибуларно и орално се регистрират по шест стойности, а медиално и дистално по две стойности. Резултатът се изчислява в проценти, като се раздели броят на местата с кървене от джоба на общия брой изследвани места и се умножава по 100.

2.2.5. Определяне на загубата на клиничен аташман за всяка пародонтална единица (CAL). Това измерване отново се извършва със специализирана градуирана пародонтална сонда. Отчита се разстоянието от емайлоциментовата граница до дъното на джоба в шест точки – централно вестибуларно, централно орално, а медиално и дистално – в две точки (вестибуларна и орална), на всяка пародонтална единица. Регистрират се шест стойности – вестибуларно, орално, както и по две стойности, измерени медиално и дистално.

2.2.6. Определяне на рецесията в шест точки около всеки зъб (R). Това измерване се извършва отново със специализирана градуирана пародонтална сонда. Големината на рецесията се измерва от емайло-циментовата граница (ЕЦГ) до нивото на гингивалния ръб в шест точки – централно вестибуларно, централно орално, а медиално и дистално – в две точки (вестибуларна и орална) на всяка пародонтална единица. Регистрират се по шест стойности – вестибуларно и орално, и по две стойности, измерени медиално и дистално, за всяка пародонтална единица.

2.2.7. Отчитане на наличие на фуркационен дефект при зъби, които имат два или три корена, чрез фуркационен индекс (F). Това се прави със специална изследователска сонда Nabers и хоризонтално сондиране в областта на фуркацията.

Фуркационният индекс включва четири стойности:

F0 – сондата не прониква във фуркацията;

F1 – до 3 мм дълбочина на проникване на сондата при хоризонтално сондиране;

F2 – от 3 мм до 6 мм проникване на сондата при хоризонтално сондиране, но не преминава в срещуположната страна;

F3 – сондата преминава през фуркационния дефект (от вестибуларно до орално за долни молари).

2.2.8. Определяне на показателя PISA (Periodontal inflamed surface area) Nesse et al. 2008 (261) определят площта на възпалени пародонтални тъкани, чрез въвеждане на пародонталните показатели: загуба на клиничен аташман, дълбочина на джоба при сондиране, кръвене при сондиране и рецесии на всяка пародонтална единица. Според авторите големината на тази площ може да се свърже с влиянието на пародонтита върху други системни заболявания.

Този индекс, приложен при пациентите с пародонтит, включва няколко нови показателя на пародонтита:

Обща повърхност със загуба на аташман – attachment loss surface area (ALSA). ALSA определя кореновата повърхност, която е изложена, вследствие на загуба на аташман.

Друга характеристика е *пародонталната епителна повърхност – periodontal epithelial surface area (PESA).*

За да се изчисли PESA, повърхността на рецесията – recession surface area (RSA) трябва да се извади от ALSA. RSA се определя от измерените стойности на рецесията в шест точки на всяка пародонтална единица, които се нанасят в таблица във файла.

За да се измери PESA, има три аритметически възможности:

А) Гингивалният ръб е под ЕЦГ. В този случай $PPD < CAL$ и $PESA < ALSA$. Това означава, че $PESA = ALSA - RSA$

Б) Гингивалният ръб е на нивото на ЕЦГ. В този случай $PPD = CAL$, $RSA = 0$ и $PESA = ALSA$.

В) Гингивалният ръб е над ЕЦГ. В този случай $PPD > CAL$, $PESA > ALSA$. Ако се използва CAL, това ще доведе до подценяване на PESA. Изчисляването на PESA е възможно единствено чрез използването на PPD вместо CAL, т.е. въвеждайки PPD като CAL. Това обаче също ще доведе до неточно оценяване на PESA. PESA все още не определя количеството на възпален епител на джоба, тъй като включва и количеството на епитела на здрави джобове/сулкуси. Възпалената част от PESA, от друга страна, теоретично представя възпалението. За да се изчисли възпалената част от PESA, се предлага да се изчисли частта, която е засегната от кървене при сондиране BoP. BoP отразява понижена плътност на колагена, повишена пропускливост на кръвоносните съдове, редукция на дебелината на епитела и нарушаване на епителния интегритет. Предложена е нова класификация, на базата на нов пародонтален показател, който изчислява количеството възпалена пародонтална повърхност, наречена PISA (Periodontal inflamed surface area). PISA се изчислява в площ (mm^2). Използването на класификацията става чрез въвеждане на пародонтални измервания (CAL, PPD, BoP, ниво на гингивалния ръб) върху специално създаден за целта файл на програмата Microsoft Excel.

PISA определя количеството на възпалени тъкани за всеки пациент по-обективно от друга класификация.

PISA се свързва и с тежестта и активността на пародонталното заболяване, поради факта, че се изчислява на базата на загуба на аташман и кървене при сондиране.

3. Методи за вземане на биологични материали

3.1. Гингивална кревикуларна течност – взет е материал от 81 пациенти. Събирането на гингивалната кревикуларна течност се извършва при друга среща с пациента, различна от момента на пародонталния преглед. От всяко изследвано лице с показатели за хроничен пародонтит се взема материал от зъби 16, 11, 26 и 36, 31, 46, при които трябва да е установена дълбочина на джоба от 5 mm до 7 mm. Ако не е установена такава дълбочина при тези репрезентативни зъби, се взема материал от друг зъб от същия секстант, за който е установена дълбочина на джоба от 5 mm до 7 mm. От всяко изследвано лице с показатели за здрав пародонт вземането на материал е от мезиобукалната повърхност на зъби 16, 11, 26 и 36, 31, 46. Гингивалната кревикуларна течност се събира в микрокапилярна пипета, като общото събирано количество е 2 μ L. Микрокапилярните пипети с гингивалната кревикуларна течност се пренасят незабавно до Национална референтна лаборатория по имунология при НЦЗПБ. Събирането на гингивалната кревикуларна течност се извършва след изолиране с лигнинова ролка на съответния участък и повърхностно подсушаване. Без да се докосва гингивалния ръб се отстранява супрагингивалната плака с пародонтална кюрета, за да се избегне контаминация или запушване на микрокапилярната пипета (съд). Събирането на гингивалната кревикуларна течност се извършва с микрокапилярен съд (Microcapillary tube calibrated) с обем до 5 μ L, която се поставя извънкревикуларно, в контакт със зъба, за 5 минути, без да се докосва маргиналната гингива. Необходимо е да се събере количество от 2 μ L. Микропипетите, които са контаминирани с кръв или слюнка се изключват от изследването и в тези случаи материалът се взема от друго място, отговарящо на характеристиките. Събраната в микрокапилярния съд гингивална кревикуларна течност се транспортира незабавно до Национална референтна лаборатория по имунология при НЦЗПБ, София. В лабораторни условия събраната в микрокапилярните съдове гингивална кревикуларна течност се изтласква от микропипетата в криоепруветка, добавя се 1 ml буферен разтвор (Phosphat Buffer solution – PBS) и се замразява в хладилна камера на -80°C до момента на изследване.

3.2. Субгингивална плака – събран е материал от 81 пациенти. Събирането на субгингивална плака се извършва в посещение, различно от това, на което се прави пародонталния клиничен преглед, за да не се замърсяват образците с кръв. Пробата се взема 2 часа след последното хранене и миене на зъби. От всяко изследвано лице с показатели за хроничен пародонтит се взема материал от зъби 16, 11, 26 и 36, 31, 46, при които трябва да е установена дълбочина на джоба от 5 mm до 7 mm. Ако не е установена такава дълбочина при тези репрезентативни зъби, материал се взема от друг зъб от същия секстант, за който е установена дълбочина на джоба от 5 до 7 mm. От всяко изследвано лице с показатели за здрав пародонт материал се взема от мезиобукалната повърхност на зъби 16, 11, 26 и 36, 31, 46. Начинът за вземане на материал от субгингивална плака е следният: след изолиране на зъбите се премахва супрагингивалната плака, а субгингивални образци се вземат, като се използват 6 стерилни хартиени щифта № 30, които се въвеждат за 20 секунди в джоба. Образците се поставят в сухи стерилни контейнери и се транспортират до Националната референтна лаборатория по особено опасни бактериални инфекции (НРЛ ООБИ), НЦЗПБ – София.

3.3. Периферна кръв – взет е материал от 81 пациенти. При всички пациенти се взема периферна кръв от кубитална вена, която се използва за рутинните изследвания в клинична лаборатория (острофазови показатели – СУЕ, CRP) и клинична имунология (включително изследване на IgM-RF, anti-citrullinated protein antibody (АСРА). Допълнително за целите на настоящия проект се вземат 2 ml кръв във вакутейнер за серум – serum tubes, за микробиологично изследване.

3.4. Слюнка – събран е материал от 105 пациенти. При посещението, в което се събира слюнка от изследваните лица, не се прави никаква интервенция в устата, преди да се вземе слюнчения материал. Нестимулирана цялостна слюнка се събира в съответствие с метода, описан от Navazesh (Navazesh M. Methods for Collecting Saliva Annals of the New York Academy of Sciences. Volume 694, Saliva as a Diagnostic Fluid pages 72-77, 1993.) и модифициран съгласно IARC –International Agency for Research on Cancer. (Collecting and Processing Saliva. The Molecular Methods database. Wed, 12/19/2012). Събирането на слюнката се прави сутрин

(между 9 и 11 ч.). Пациентите са помолени да не извършват орално-хигиенни процедури (т.е. миене на зъбите, изплакване на устата), хранене, пиене или дъвчене на дъвка 1 час преди събирането на слюнка. Всички лица изплакват устата си с обикновена чешмяна вода от (10 мл) за 30 секунди и изплюват преди събирането на слюнка. Пет минути след устното изплакване всяко лице отделя слюнка в 15-милилитров стерилен контейнер. По време на събирането на слюнката лицата са помолени да се въздържат от говорене. По-добре е главата да се наведе и да се остави слюнката да тече естествено към предната част на устата, да се задържи известно време и да се осигури плюене в контейнера. Лицата плюят в контейнера поне веднъж в минута в продължение на 10 минути. Целта на събирането на цялостна слюнка е да се събере количество около 2 мл. Лицата са предварително информирани да не плюят слюз и храчки докато се събира слюнка. Контейнерите със слюнка се поставят в съд с лед по време на събирането на слюнката и по време на пренасянето на материала до лабораторията.

3.5. Генетичен материал – събран е материал от 105 пациенти. Вземат се епителни клетки от орална лигавица от всички лица, преди да се извърши пародонталния преглед. Със специална четка за вземане на ДНК материал се остъргват последователно дясна букална мукоза, лява букална мукоза, горна лабиална мукоза и долна лабиална мукоза, като след всяко остъргване четката се потапя в контейнер с дестилирана вода. След последното вземане на материал четката се поставя в същия контейнер и така се транспортира до Националната генетична лаборатория, където се центрофугира при 10 000 оборота за 5 минути. Супернатантът се отделя, а генетичният материал се замразява на -20°C и се съхранява до екстракцията на ДНК.

4. Лабораторни

4.1. Микробиологични – ДНК се изолира от проби от изследваните биологични материали (субгингивална плака) от пациенти. ДНК се пречиства с използването на кит на Qiagen с модифициран протокол за изолиране на ДНК от тъкани от съответната течност. Амплифицира се чрез конвенционален PCR с използването на универсални прокариотни праймери за установяване на наличието на бак-

терии в пробите. Използва се Taq-полимераза на Invitrogen, моонуклеотиди, фабрични буфери. Условиата на амплификация са според описани до момента в литературата. Тестват се на агарозен гел, оцветен с етидиев бромид, при наличие на фрагменти, същата ДНК се амплифицира с видово специфични праймери за *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. denticola*. Получените фрагменти от размножаването с универсални прокариотни праймери се секвестират, като получените последователности се сравнят с наличните online бази данни за определяне на патогена до вид.

4.2. Имунологични – количествено определяне на IgM – RF и АСРА, чрез метода ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) в материал от гингивална кревикуларна течност, предварително обработен. Биологичната течност се съхранява на -80°C до извършване на изследванията.

4.2.1. Определяне на АСРА в гингивална кревикуларна течност

За определянето на АСРА се използва ELISA метод. Определянето се основава на непряко свързана ензимно-имунна реакция със следните стъпки, описани според методиката, приложена в кита: Специфичните антитела в пробите се свързват към антигена, с който е покрита повърхността на реакционните ямки. След инкубиране, следва измиване на плаката за премахване на несвързаните и неспецифично свързаните серумни или плазмени компоненти. След това се добавя ензим-конюгат, който се свързва с комплекса антитяло-антиген. След инкубиране, следва повторно измиване за премахване на несвързания ензим-конюгат. След което се прибавя разтвор на субстрат и след инкубация се получава синьо оцветяване в резултат от хидролизирането.

За спиране на реакцията се добавя киселина и пробата се оцветява в жълто. Интензитетът на жълтия цвят корелира с концентрацията на антитяло-антигенния комплекс и се измерва фотометрично при 450 nm.

4.2.2. Определяне на IgM – RF в гингивална кревикуларна течност

За полуколичественото определяне на IgM – RF се използва ELISA съгласно приложената от фирмата-производител процедура. В първия етап на реакцията разредените проби се инкубират в ямките, покрити с антигени за IgM. В случай на положителни проби, специфичните IgM антитела се свързват с антигените. За

откриване на свързаните антитела се извършва втора инкубация с добавяне на ензимно-белязано анти-човешко IgM (ензим-конюгат), при което се получава цветна реакция. Следва добавяне на киселина за спиране на реакцията, след което пробите се отчитат фотометрично при 450 nm.

4.2.3. Определяне на АСРА в слюнка – В Имунологичната лаборатория материалите се центрифугират при 2600 x g за 15 минути при 4°C. Супернатантът се поставя в нова криоепруветка, съдържаща разтвор на лиофилизиран протеазен инхибитор (SigmaFast Protease inhibitor, Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, USA) – 1 µL от протеазния инхибитор на всеки mL от слюнка. Всички образци са съхраняват в хладилна камера, на температура –80°C до момента на анализа – количествено определяне на АСРА антитела чрез ELISA (Euroimmun AG, Германия). Определянето се основава на непряко свързана ензимно-имунна реакция със стъпки, описани според методиката, приложена в кита: специфичните антитела в пробите се свързват към антигена, с който е покрита повърхността на реакционните ямки. След инкубиране, плаките се измиват за премахване на несвързаните и неспецифично свързаните серумни или плазмени компоненти. След това се добавя ензим-конюгат, който се свързва с комплекса антитяло-антиген. След инкубиране, следва повторно измиване за премахване на несвързания ензим-конюгат. След това се прибавя разтвор на субстрат и след инкубация се получава синьо оцветяване в резултат от хидролизирането. За спиране на реакцията се добавя киселина и пробата се оцветява в жълто. Интензитетът корелира с концентрацията на антитяло-антигена комплекс и се измерва фотометрично при 450 nm.

4.3. Генетични – FcgRIIIa генотипизиране чрез гнездова полимеразна верижна реакция (nested PCR), анализ на полиморфизма на дължината на рестриционния фрагмент (RFLP) и определяне на алелната честота на FcgRIIIa-158V.

Определянето на FcgRIIIa полиморфизма се извършва като част от екзон 4 на FcgRIIIa се амплифицира, което съответства на втория екстрацелуларен участък и съдържа позицията на нуклеотид 559.

Последователност на праймерите за амплификация:

A (сенс) – 5' ATATTTACAGAATGGCACAGG 3'

B (антисенс) – 5'GAC TTG GTA CCC AGG TGG AA 3'

C (сенс) – 5` ATC AGA TTC GAT CCT ACT TCT GGA GGG GGC AT 3`

D (антисенс) – 5` ATC ACC AGG AGG GAA CCA CAT A 3`

Два FcgRIIIa ген-специфични праймера (A и B) се използват за амплифициране на 1.2 Kb фрагмент, съдържащ полиморфния участък. Праймер C от nested-PCR съдържа несъответствие, което създава NlaIII рестрикционен участък само в ДНК, кодираща FcgRIIIa-158V. Праймер D води до 207 bp амплифициран фрагмент, включващ вътрешен контролен рестрикционен участък за разграждане на NlaIII. След гел-електрофореза върху 1.5% агарозен гел пробите се визуализират с UV трансилюминатор, за да се открие наличието или отсъствието на 207 bp фрагмент. Рестрикционният ензим NlaIII хидролизира амплифицираната ДНК, като създава ДНК фрагменти, както следва:

1 – два фрагмента (123 и 61 bp), представляващи хомозиготния FcgRIIIa-158V/V фенотип.

2 – два фрагмента (123 и 84 bp), представляващи хомозиготния FcgRIIIa-158F/F фенотип.

3 – три фрагмента (123, 84 и 61 bp), представляващи хетерозиготния FcgRIIIa-158V/F фенотип.

FcgRIIIa генотипове и съответните фенотипове FcgRI-IIa-158V/F се определят за всички участници (пациенти и контроли), след което се определят FcgRIIIa-158V алелните честоти за всички изследвани групи.

4.4. Рентгенографско изследване – при всички пациенти с ревматоиден артрит се извършва рентгенографско изследване във връзка с диагностика на ревматично заболяване.

На рентгенографско изследване се търсят следните промени: периставна остеопороза, субхондрална костна деструкция, ставни деформации, фиброзни и костни анкилози и ерозии.

На основа на рентгенографското и клиничното изследване се прави стадиране на структурните промени в четири стадия при пациентите с ревматоиден артрит:

I стадий – рентгенови данни за периставна остеопороза; липсват деструктивни ставни промени.

II стадий – рентгенови данни за леко стеснение на ставната междина и единични костни ерозии; липсват ставни деформации, въпреки че може да има леко ограничение на ставните движения; придружаваща мускулна атрофия; възможно е да има извънставни мекотъканни промени (възли и теносиновити).

III стадий – рентгенови данни за изразено стесняване на ставната междина и множество ерозии; ставни деформации (сублуксации, улнарна девиация или хиперекстензия без фиброза или костна анкилоза); изразена мускулна атрофия. Възможно е да има извънставни мекотъканни промени (възли и теносиновити).

IV стадий – включва критериите от стадий III плюс рентгенови данни за фиброзни или костни анкилози.

5. Статистически – за статистическа обработка на данните се използват съвременни методи за научна медицинска статистика

5.1. Честотен анализ

5.2. Вариационен анализ

5.3. Кростабулация (взаимни честотни разпределения на две качествени променливи)

5.4. Проверка за нормалност на разпределение на количествени променливи – Tests of normality – Kolmogorov-Smirnov

5.4. Дисперсионен анализ

5.4.1. T-test или ANOVA в зависимост от броя на категориите на групиращата променлива, когато променливите са нормално разпределени.

5.4.2. Непараметрични подходи (Mann-Whitney test, когато групиращата променлива има две категории и Kruskal-Wallis test при повече от две категории на групиращата променлива), ако разпределението не е нормално. Тества се хипотезата, че две или повече средни стойности са равни. Нулевата хипотеза (всички средни стойности равни) се отхвърля, ако $p < 0,05$.

5.5. Корелационен анализ

5.5.1. Параметричен (Pearson Correlation)

5.5.2. Непараметричен (Spearman`s rho)

VII. РЕЗУЛТАТИ

Резултати по задача 1 – Съпоставяне на наличието и тежестта на РА с наличието и тежестта на П

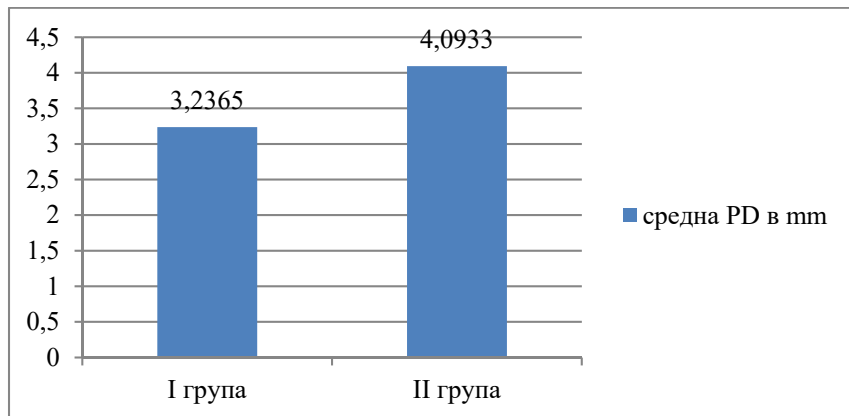
Съпоставихме всеки от параметрите на пародонтита между пациентите от първа и втора група (таблица 1). Средните стойности на HI и PVI не показват значими разлики, което означава, че по начина на разпространение на бактериалната плака по наличните зъбни повърхности и по отношение на гингивалното възпаление, индуцирано от бактериалната плака и отчетено чрез индекса PVI, практически няма разлика между пациентите от двете групи.

Установихме статистически значимо по-високи стойности на показателите средна дълбочина на джобовете (PD) (Mann-Witney test, $p = 0,004$, таблица 1, фигура 1), разпространение на кървене при сондиране (BoP%) (Mann-Witney test, $p = 0,007$, таблица 1, фигура 2) и тенденция за по-високи средни стойности на загуба на аташман (CAL) (Mann-Witney test, $p = 0,063$, таблица 1, фигура 3) при пациентите от 2-ра група с П и РА в сравнение с пациентите от 1-ва група само с П.

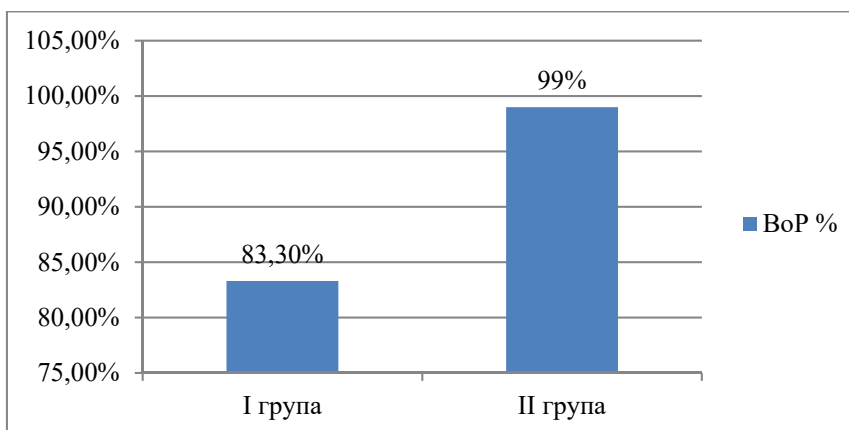
Таблица 1. Средни стойности на някои от клиничните показатели на пародонтита в зависимост от наличието на ревматоиден артрит

	2-ра група П и РА		1-ва група П без РА		P-стойност/ Метод
	Средна стойност	Стандартно отклонение	Средна стойност	Стандартно отклонение	
PVI тежест	2,37	±0,529	2,16	±0,623	0,089 Mann-Witney test
PD < 3 мм	4,80	±7,308	6,17	±8,764	0,581 Mann-Witney test
PD 3-5 мм	11,69	±7,486	10,69	±8,255	0,532 Mann-Witney test
PD 5-7 мм	1,35	±4,505	2,93	±4,336	0,556 Mann-Witney test
PD > 7 мм	0,71	±2,349	0,65	±1,888	0,432 Mann-Witney test
PD средно мм	4,09	±0,99	3,24	±1,29	0,004 Mann-Witney test
CAL средно мм	4,74	±1,45	4,00	±1,68	0,063 Mann-Witney test
F честота на засягане	53,30%	±26,75	23,00%	±16,86	0,086 Fisher's exact test
Брой загубени зъби	4,3	±2,290	2,5	±3,996	0,019 Mann-Witney test
BoP%	99,00%	±29,15	83,30%	±5,48	0,007 Mann-Witney test
PISA	1676,313	±839,411	1273,776	±729,102	0,005 Mann-Witney test

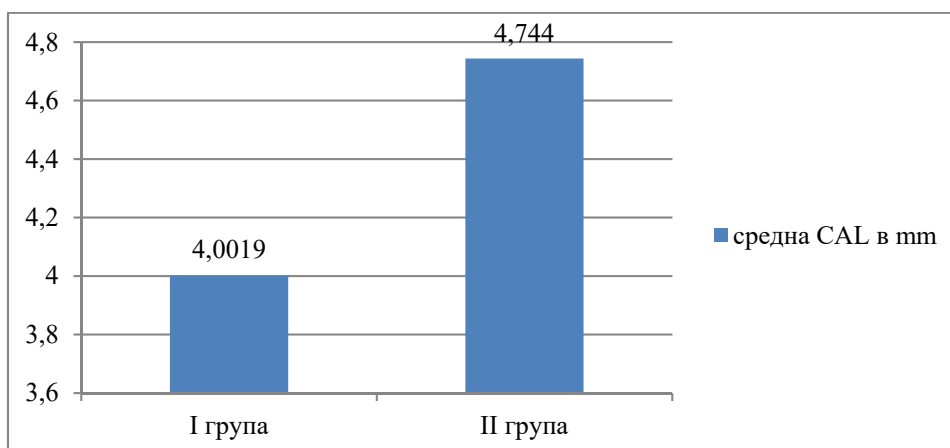
Фигура 1. Средни стойности на дълбочината на джобовете (PD) при пациентите от двете групи с пародонтит и с различни ставни заболявания



Фигура 2. Средни стойности на кървенето при сондиране (BoP) при пациентите от двете групи с пародонтит и с различни ставни заболявания

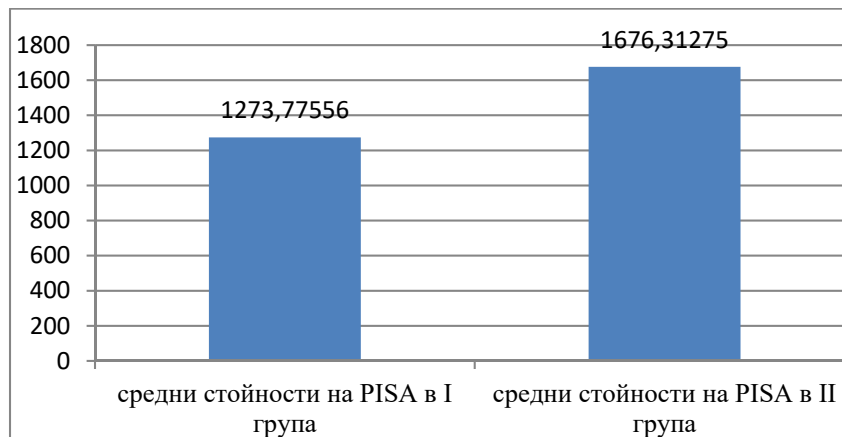


Фигура 3. Средни стойности на загуба на аташман (CAL) при пациентите от двете групи с пародонтит и с различни ставни заболявания



В нашето изследване установихме статистически значимо по-високи средни стойности на показателя PISA при пациентите от втора група в сравнение с тези от първа група (Mann-Witney test, $p = 0,004$, таблица 1, фигура 4).

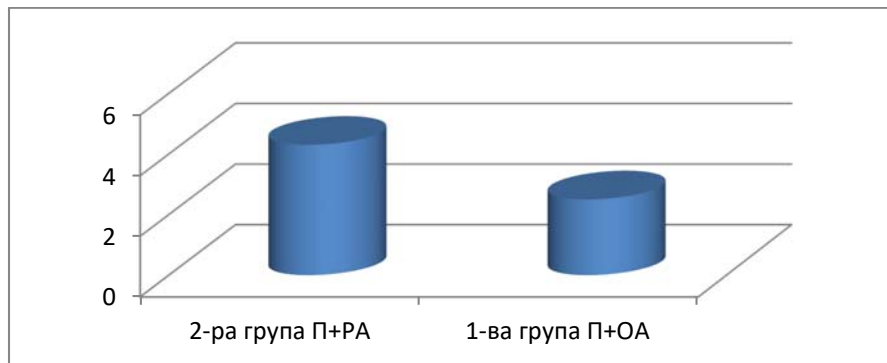
Фигура 4. Средни стойности на PISA в mm^2 при пациентите от първа и втора група



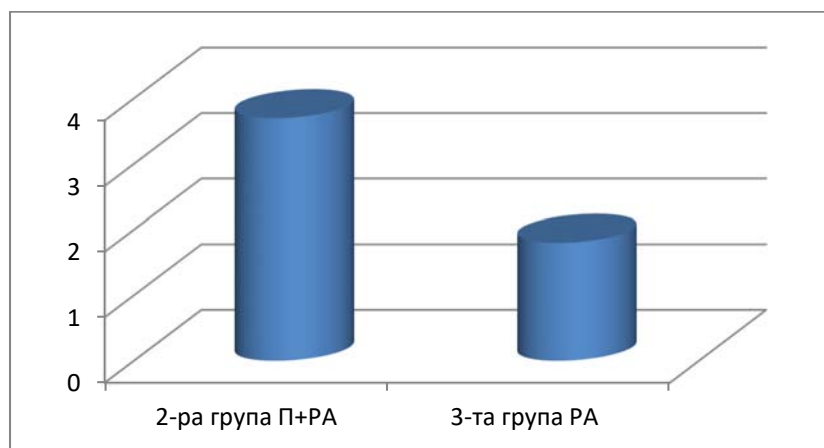
Според нас много интересен е показателят PISA. Той е стойност за количествено представяне на обема възпалени пародонтални тъкани, която да може да бъде лесно и широко приложена в клиничната практика и в научните проучвания. Счита се, че по този начин може да се отрази влиянието на активността на пародонтита върху далечни органи и системи. Според авторите показателят PISA дава възможност за оценяване на пародонтита като рисков фактор за други общи заболявания (261). Пародонтитът е възможен рисков фактор за някои системни заболявания чрез увеличаване на системната инфламаторна тежест. Биологичната обосновка за това е предизвикване на бактериемия, системен инфламаторен отговор и/или крос-реактивност, водеща до автоимунна реакция. Според авторите е логично да се предположи, че колкото е по-голямо количеството възпалени тъкани, толкова по-голяма е възможността за влияние на пародонтита върху системния имунен отговор. Установените от нас значимо по-високи средни стойности на показателя PISA при пациентите с пародонтит и РА в сравнение с тези на пациентите с пародонтит и ОА са в подкрепа на хипотезата за влиянието на пародонтита върху РА, на основата на медиатори на възпалението.

Установихме значима корелация между броя загубени зъби при различните групи пациенти. Пациентите с пародонтит и ревматоиден артрит имат значително повече загубени зъби спрямо тези с пародонтит и без ревматоиден артрит (Mann-Witney test, $p = 0,019$, таблица 1, фигура 5) и спрямо тези с ревматоиден артрит и без пародонтит (Mann-Witney test, $p = 0,025$, фигура 6).

Фигура 5. Средни стойности на броя загубени зъби при пациенти от 2-ра група (П + РА) спрямо пациенти от 1-ва група (П + ОА)



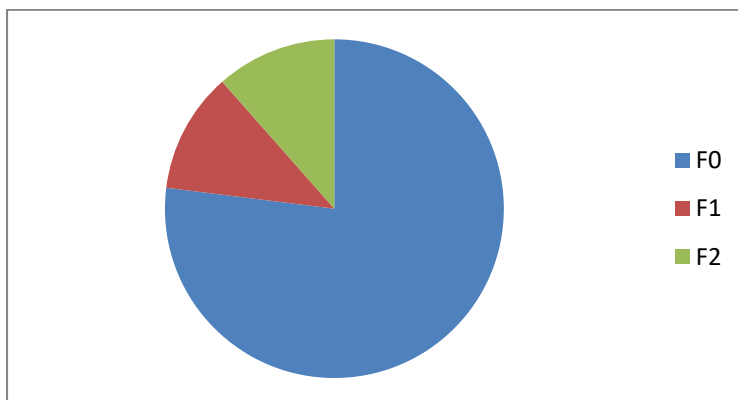
Фигура 6. Средни стойности на броя загубени зъби при пациенти от 2-ра група (П + РА) спрямо пациенти от 3-та група (РА)



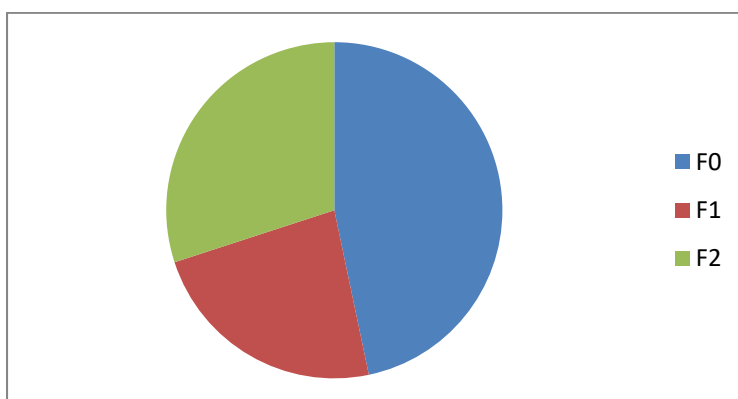
Установихме и тенденция при пациентите от втора група по-често да се среща по-често по-висока степен на засягане на фуркациите при многокоренови зъби, което е признак, отразяващ тежестта на пародонтита (Mann-Witney test, $p = 0,086$, таблица 1, фигура 7, фигура 8).

Въпреки че няма статистическа зависимост, при пациентите с ревматоиден артрит и пародонтит се наблюдава два пъти по-голям брой на джобовете с дълбочина от 5 до 7 мм отколкото при лицата с пародонтит и без ревматоиден артрит (Mann-Witney test, $p = 0,556$, таблица 1, фигура 9).

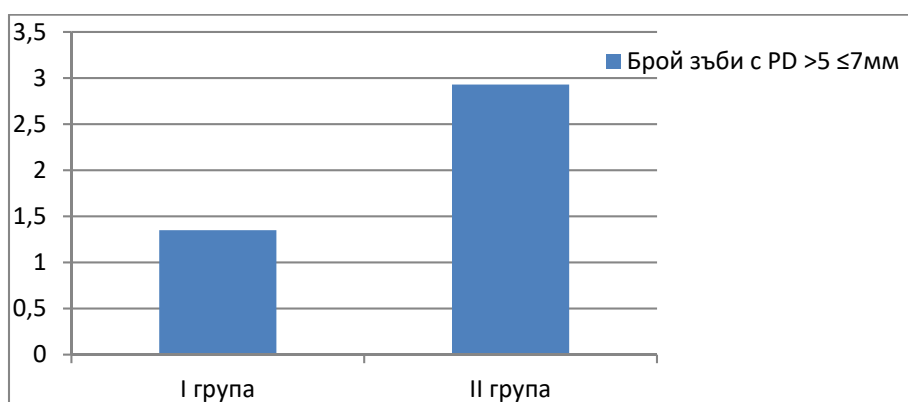
Фигура 7. Брой засегнати фуркации (F) по отношение на тежестта на фуркационното увреждане при пациенти от 1-ва група с П и без РА



Фиг. 8. Брой засегнати фуркации (F) по отношение на тежестта на фуркационното увреждане при пациенти от 2-ра група с П и РА



Фигура 9. Средни стойности на броя зъби с PD от 5 до 7 мм при пациентите от двете групи с пародонтит и с различни ставни заболявания

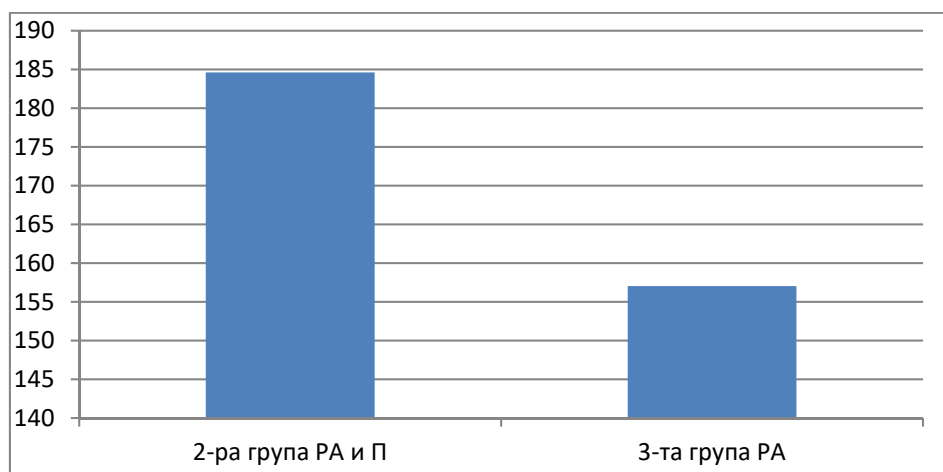


Съпоставихме показателите на ревматоидния артрит между пациентите от 2-ра (П и РА) и 3-та (РА без П) група, за да търсим влиянието на пародонтита върху РА (таблица 2). Изследването ни установи статистически значима зависимост между количеството ревматоиден фактор в серума и броя загубени зъби при пациенти с ревматоиден артрит и пародонтит (Mann-Witney test, $p = 0,042$, $r = 0,374$), като с увеличаване на концентрацията на RF расте и броят на загубените зъби. Определихме количеството на АССР в серума на пациенти с ревматоиден артрит и пародонтит и установихме статистически значима положителна зависимост между АССР в серума и броя загубени зъби (Mann-Witney test, $p = 0,011$, $r = 0,458$). Пациентите с по-високи нива на АССР в серум имат по-голям брой липсващи зъби. Не установихме статистически значими зависимости, но пациентите с РА и П имат по-високи нива на АСРА в серум (Mann-Witney test, $p = 0,321$, таблица 2, фигура 10) в сравнение с тези само с РА. Открихме и по-голяма честота на разпространение на четвърти рентгенов стадий на ревматоидения артрит (Mann-Witney test, $p = 0,306$, фигура 11) сред пациентите от 2-ра група с РА и П спрямо пациентите от 3-та група само с РА, но без статистическа значимост.

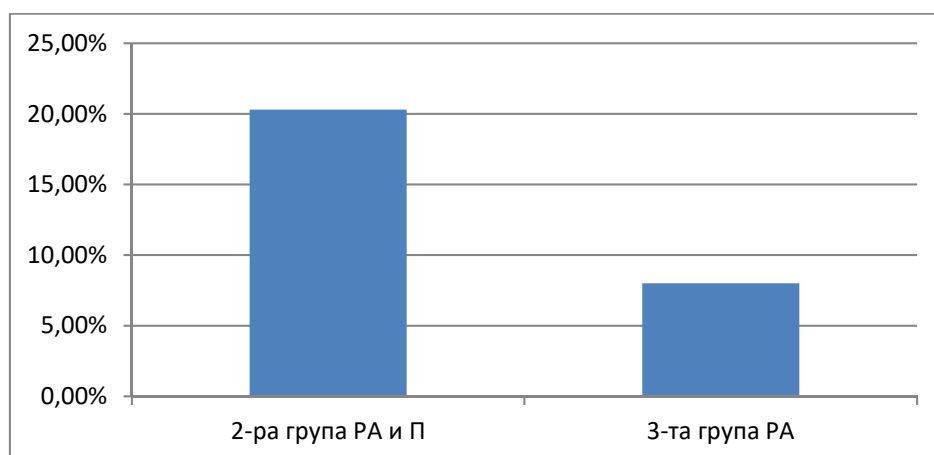
Таблица 2. Средни стойности на някои от показателите на РА в зависимост от наличието на П

	2-ра група П и РА		3-та група РА		Р-стойност
	Средна стойност	Стандартно отклонение	Средна стойност	Стандартно отклонение	
АСРА серум	184,61	±179,445	157,03	±188,173	0,321 Mann-Witney test
RF серум	84,07	±117,154	137,89	±125,588	0,190 Mann-Witney test
Активност DAS 28	4,295	±1,6872	4,653	±1,5427	0,245 Mann-Witney test
Честота на разпространение на 4-ти рентгенов стадий	20,3%	±15,2%	8%	±6,3%	0,224 Mann-Witney test

**Фигура 10. Средни стойности на АСРА в серума при пациентите с РА
в зависимост от наличието на пародонтит**



**Фигура 11. Честота на разпространение на 4-ти рентгенов стадий при пациентите с РА
в зависимост от наличието на пародонтит**



Изводи

1. Установихме влиянието на РА като рисков фактор за по-тежката клинична изява на пародонталното заболяване.

- Установихме статистически значимо по-голяма средна дълбочина на джоба и по-висок процент на кървене при сондиране, при пациенти с пародонтит и ревматоиден артрит в сравнение с пациентите с пародонтит и без ревматоиден артрит.

- Установихме статистически значимо по-високи стойности на показателя PISA при пациенти с пародонтит и ревматоиден артрит в сравнение с пациентите с пародонтит и без ревматоиден артрит.

- Установихме тенденция за по-високи стойности на средната загуба на аташман и по-често срещане на втора и трета степен фуркационно увреждане (показатели за тежест на пародонталното заболяване) при пациенти с пародонтит и ревматоиден артрит в сравнение с тези с пародонтит и без ревматоиден артрит.

2. Установихме влиянието на П като рисков фактор, свързан с тежестта на показателите на ревматоидния артрит.

- Установихме значима зависимост между броя загубени зъби – показател, отразяващ тежестта на П, и нивата на АСРА в серума – показател за тежест на РА, при пациенти с РА и П.

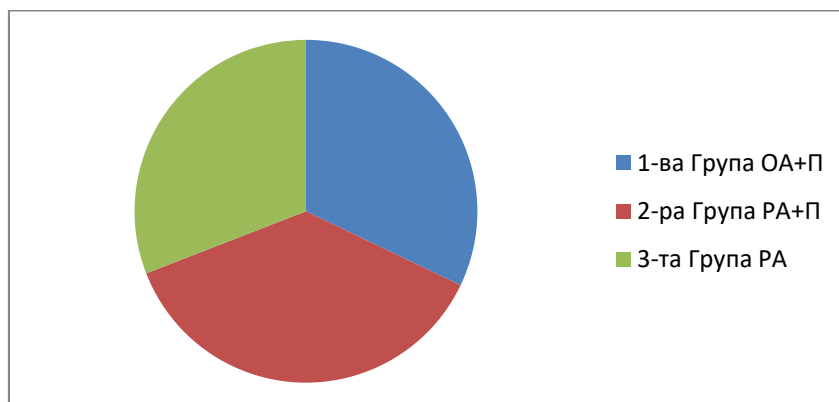
- Установихме значима зависимост между броя загубени зъби – показател, отразяващ тежестта на П, и нивата на RF – показател за тежест на РА, в серума при пациенти с РА и П.

- Установихме по-висока концентрацията на АСРА в серум, показател за тежест на РА, при пациенти с пародонтит и ревматоиден артрит в сравнение с пациентите с ревматоиден артрит и без пародонтит.

- Установихме по-висока честота на разпространение на 4-ти рентгенов стадий, показател за тежест на РА, при пациенти с пародонтит и ревматоиден артрит в сравнение с пациентите с ревматоиден артрит и без пародонтит.

Резултати по задача 2 – Определяне на присъствието и количеството на ревматоиден фактор (RF) и антитела срещу цитрулинирани протеини (АСРА) в гингивална кревикуларна течност при пациенти с П, с РА и с комбинация от двете заболявания и изследване на връзката им с наличието и изявата на двете заболявания

Фигура 12. Разпределение на пациентите по групи



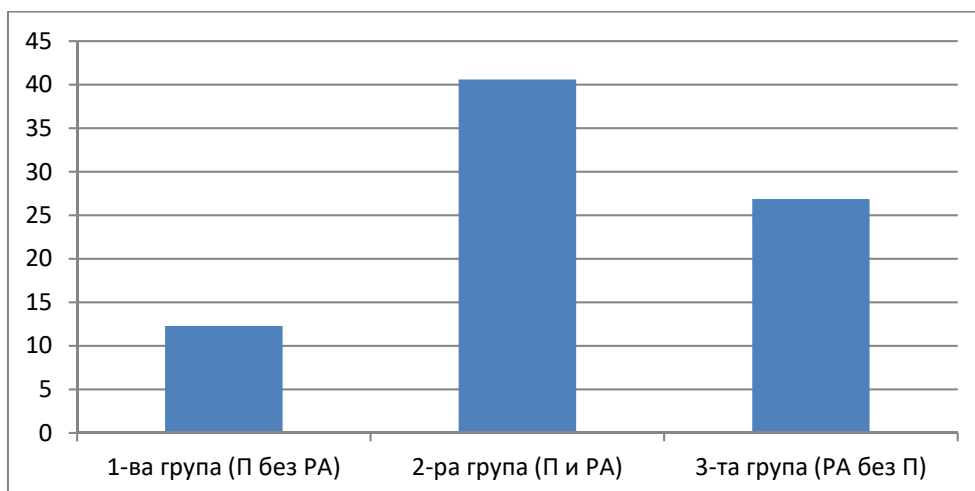
Определянето на нивата на АСРА и RF в гингивална кревикуларна течност при пациенти с пародонтит и ревматоиден артрит ще ни даде възможност да тестваме хипотезата си за възможна локална продукция на АСРА и RF при пародонталното заболяване и евентуалната им зависимост от тежестта на пародонтита.

Изследването ни установи наличие на ревматоиден фактор (RF) в гингивална кревикуларна течност при всички пациенти от трите групи (таблица 3, фигура 13). Определихме процентното съотношение на RF-положителните ($RF \geq 20$ RU/ml) и RF-отрицателните ($RF < 20$ RU/ml) при трите групи пациенти (1-ва (П без РА), 2-ра (П и РА) и 3-та (РА без П)). Установихме, че честотата на пациентите, положителни за RF в гингивална кревикуларна течност, е най-висока във 2-ра група (53,3%), където са пациентите с ревматоиден артрит и пародонтит. Честотата на положителните за RF в гингивална кревикуларна течност пациенти от 2-ра група (РА+П) са значително повече в сравнение с тези от 1-ва група (П + ОА) (15,4%) (Fisher`s exact test, $p = 0,005$, фигура 14) и в сравнение с тези от 3-та група (РА без П) (24%) (Fisher`s exact test, $p = 0,032$, фигура 15).

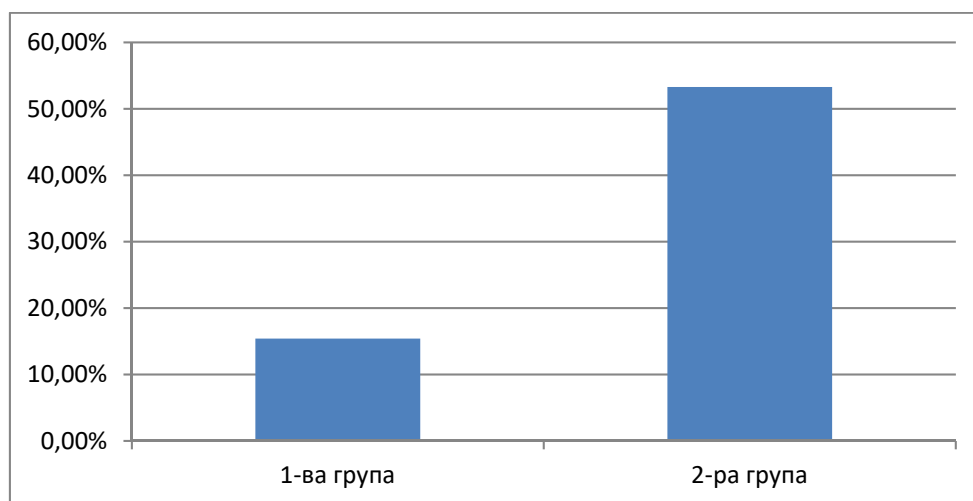
Таблица 3. Средни стойности на RF и АСРА в гингивална кревикуларна течност по групи пациенти

Групи пациенти	RF гинг. крeв. течност		АСРА гинг. крeв. течност	
	Средна стойност	Стандартно откл.	Средна стойност	Стандартно откл.
1-ва група	12,29	± 20,68	2,84	± 3,71
2-ра група	40,60	± 69,36	6,06	± 13,96
3-та група	26,86	± 42,61	12,93	± 26,13

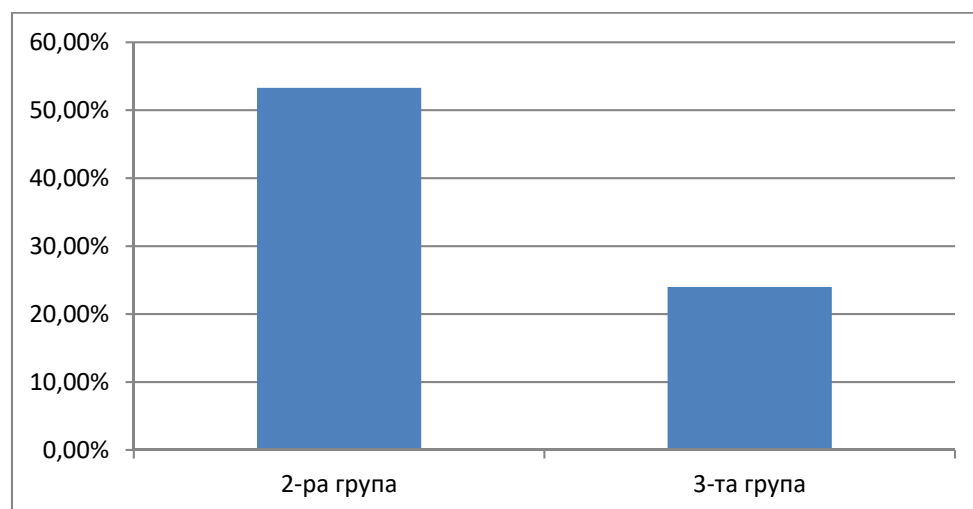
Фигура 13. Средни стойности на RF в гингивална кревикуларна течност по групи пациенти



Фигура 14. Честота на RF-положителни пациенти във 2-ра група (П и РА) спрямо 1-ва група (П без РА)



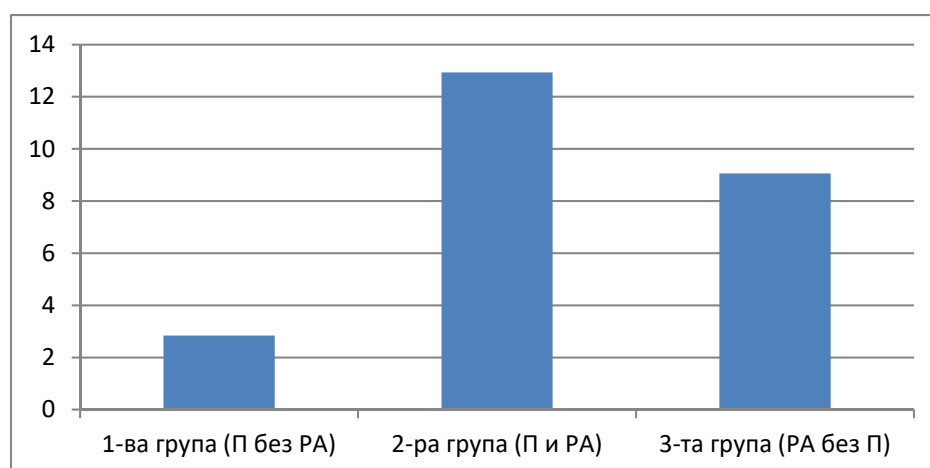
Фигура 15. Честота на RF-положителни пациенти във 2-ра група (П и РА) спрямо 3-та група (П без РА)



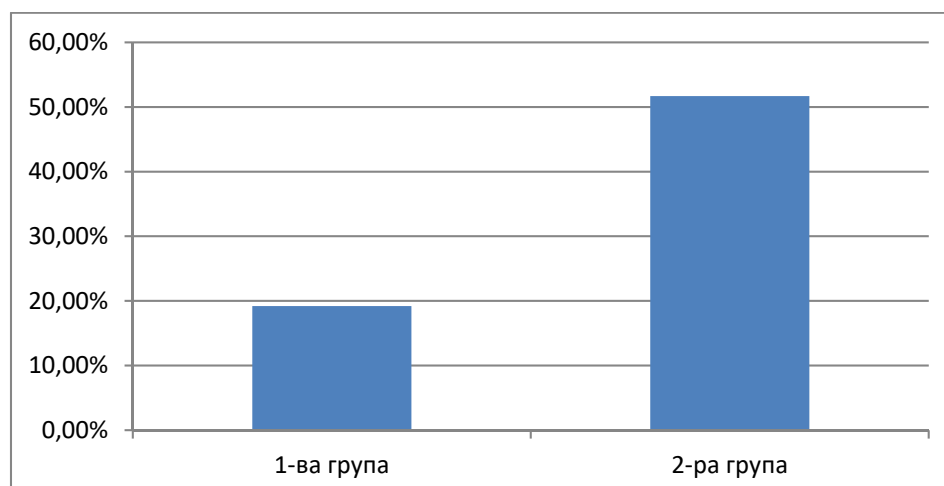
Изследването ни установи наличие на АСРА в гингивална кревикуларна течност при всички пациенти от трите групи (таблица 3, фигура 16). Установихме значимо по-високи средни стойности на показателя АСРА в гингивална кревикуларна течност на пациентите от 2-ра група (с П и РА), съпоставени с пациентите от 1-ва група (с П и без РА) (Fisher`s exact test, $p < 0,0001$, фигура 16). Не установихме значима разлика между средните стойности на АСРА в гингивална кревикуларна течност при пациентите от 2-ра група (с П и РА) и пациентите от 3-та група (РА без П) (Fisher`s exact test, $p = 0,307$).

Определихме процентното съотношение на АСРА-положителни ($АСРА \geq 6$ RU/ml) и АСРА-отрицателни ($АСРА < 6$ RU/ml) при пациентите от трите групи (1-ва (П без РА), 2-ра (П и РА) и 3-та (РА без П)). Установихме значимо по-голяма честота на индивиди, положителни по отношение на АСРА в гингивална кревикулярна течност при пациенти от 2-ра група (с П и РА) (51,7) в сравнение с пациенти от 1-ва група (с П и без РА) (19,2%) (Fisher's exact test, $p = 0,024$, фигура 17), както и по-голяма честота на АСРА – положителни пациенти в гингивална кревикулярна течност от 2-ра група (с П и РА) в сравнение с тези от 3-та група (без П, с РА) (32%), без значима разлика (Fisher's exact test, $p = 0,175$, фигура 18).

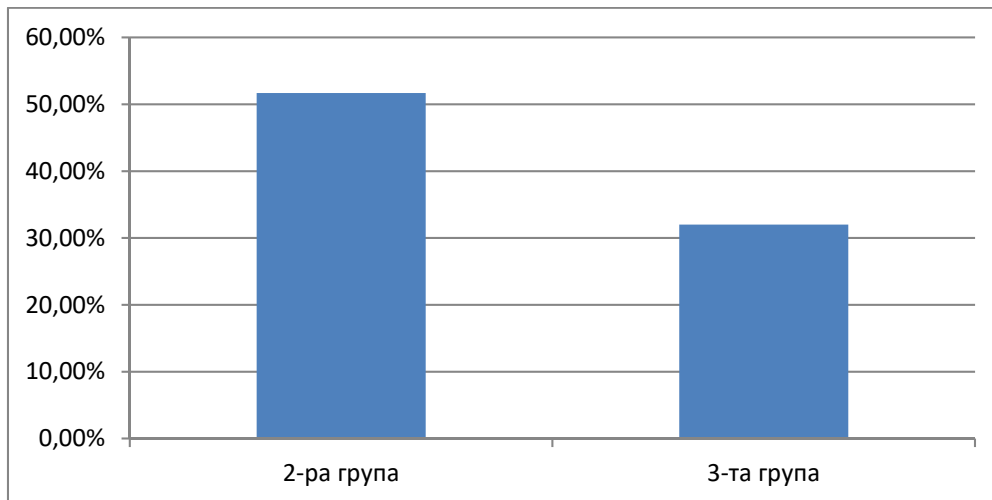
Фигура 16. Средни стойности на АСРА в гингивална кревикулярна течност по групи пациенти



Фигура 17. Честота на АСРА-положителни пациенти във 2-ра група (П и РА) спрямо 1-ва група (П без РА)



Фигура 18. Честота на АСРА-положителни пациенти във 2-ра група (П и РА) спрямо 3-та група (П без РА)



Изследването ни не установи значима зависимост между количеството на АСРА и RF в гингивална кревикуларна течност и показателите на пародонтита при пациентите от 1-ва и 2-ра група (таблица 4).

Таблица 4. Корелационни отношения между нивата на АСРА и RF в гингивална кревикуларна течност и показателите на П при пациентите от 1-ва и 2-ра група (Spearman's rho)

Показатели на П	RF гинг. крeв. течност		АСРА гинг. крeв. течност	
	1-ва група	2-ра група	1-ва група	2-ра група
Брой загубени зъби	p = 0,107	p = 0,255	p = 0,225	p = 0,159
Брой PD > 3 < 7	p = 0,789	p = 0,650	p = 0,704	p = 0,630
Брой PD > 7 мм	p = 0,299	p = 0,175	p = 0,441	p = 0,356
PD средно мм	p = 0,979	p = 0,855	p = 0,245	p = 0,145
CAL средно мм	p = 0,866	p = 0,790	p = 0,334	p = 0,225
PISA	p = 0,881	p = 0,833	p = 0,140	p = 0,166
Брой рецесии R	p = 0,449	p = 0,390	p = 0,547	p = 0,455

Изследвахме концентрациите на АСРА и RF в гингивална кревикуларна течност в зависимост от лабораторните показатели на РА при пациентите с РА от 2-ра и 3-та група (таблица 5). При пациентите от 3-та група (РА без П) открихме значима зависимост между концентрацията на RF в серум и концентрацията на RF в гингивална кревикуларна течност (Fisher`s exact test, $p = 0,014$, таблица 5), а при пациентите от 2-ра група (с П и РА) открихме тенденция за зависимост между тези показатели (Fisher`s exact test, $p = 0,067$, таблица 5) – с увеличаването на концентрацията на RF в серума, нараства и концентрацията на RF в гингивалната кревикуларна течност. Не установихме зависимости между концентрацията на АСРА в гингивална кревикуларна течност и концентрациите на серумните АСРА и RF. Не установихме зависимост между концентрациите на АСРА и RF в гингивална кревикуларна течност и активността на РА, оценена чрез DAS 28.

Таблица 5. Статистическа зависимост между нивата на АСРА и RF в гингивална кревикуларна течност и показателите на РА при пациентите от 2-ра и 3-та група (Spearman`s rho)

Показатели на РА	RF гинг. крeв. течност		АСРА гинг. крeв. течност	
АСРА серум	2-ра група	3-та група	2-ра група	3-та група
	$p = 0,430$	$p = 0,860$	$p = 0,107$	$p = 0,325$
RF серум	2-ра група	3-та група	2-ра група	3-та група
	$p = 0,067$	$p = 0,014$	$p = 0,275$	$p = 0,570$
DAS 28	2-ра група	3-та група	2-ра група	3-та група
	$p = 0,469$	$p = 0,603$	$p = 0,190$	$p = 0,403$

Изводи

1. Установихме наличие на RF в гингивалната кревикуларна течност при всички изследвани пациенти и потвърдихме възможността за локалната им продукция при възпалително-деструктивно заболяване на пародонта.

- Установихме значимо по-висока честотата на пациентите, положителни за RF в гингивална кревикуларна течност във 2-ра група (РА+П) в сравнение с тези от 3-та група (РА без П).

- Установихме повишени нива на RF в гингивалната кревикуларна течност при пациенти с ревматоиден артрит и пародонтит спрямо тези само с ревматоиден артрит и без пародонтит, без статистически значима разлика.

2. Установихме значимо по-висока честотата на пациентите, положителни за RF в гингивална кревикуларна течност във 2-ра група (РА+П) в сравнение с тези от 1-ва група (П без РА) в подкрепа на тезата за възможно преминаване на серумен RF от кръвната циркулация в гингивалната кревикуларна течност.

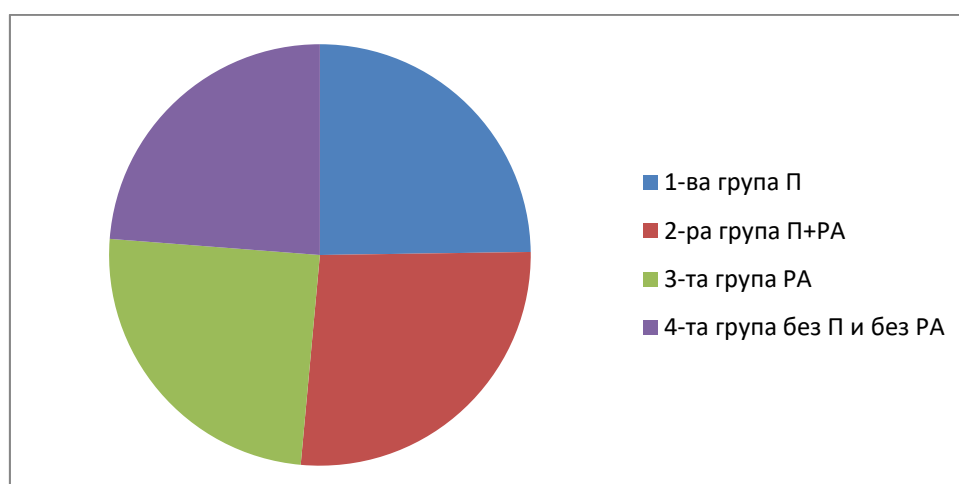
3. Установихме наличие на АССР в гингивалната кревикуларна течност на всички пациенти с пародонтит в подкрепа на тезата за локална продукция на АСРА при възпалително-деструктивно заболяване на пародонта.

- Установихме тенденция за по-голяма честота на АСРА – положителни пациенти в гингивална кревикуларна течност от 2-ра група (с П и РА) в сравнение с тези от 3-та група (РА и без П).

4. Констатирахме значимо по-голяма честота на индивиди, положителни по отношение на АСРА в гингивална кревикуларна течност при пациенти от 2-ра група (с П и РА) в сравнение с пациенти от 1-ва група (с П и без РА) в подкрепа на тезата за възможно дифундиране на серумни АСРА от кръвната циркулация в гингивалната кревикуларна течност.

Резултати по задача 3 – Определяне на присъствието и количеството на антитела срещу цитрулинирани протеини (АСРА) в слюнка при пациенти с П, с РА и с двете заболявания и изследване на връзката им с наличието и изявата на РА и П.

Фигура 19. Разпределение на пациентите по групи



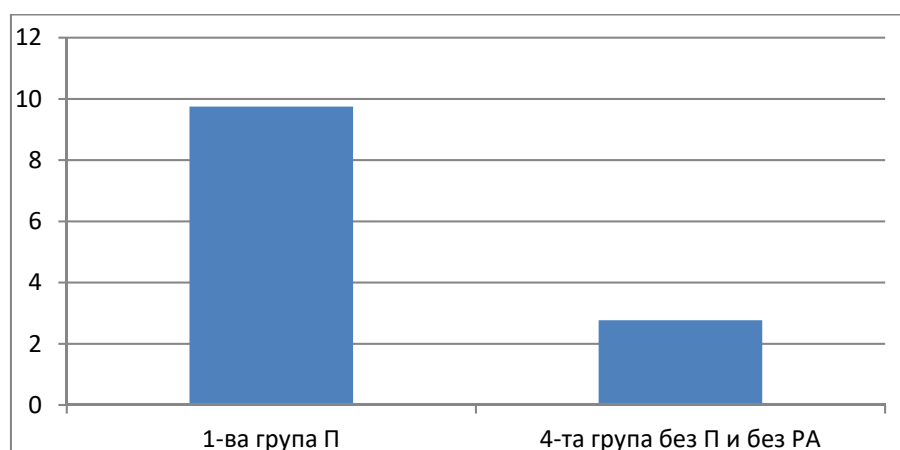
Установихме наличие на АСРА в слюнка при всички пациенти и от четирите групи и определихме количествено този показател по групи.

Таблица 6. Средни стойности на АСРА в слюнка по групи пациенти

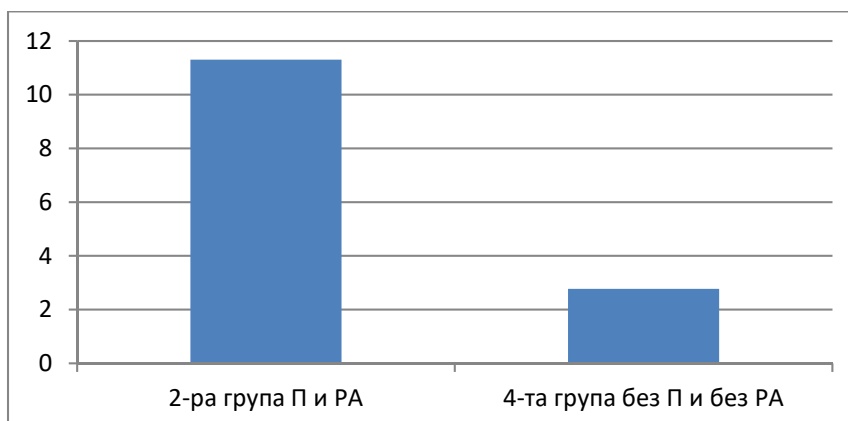
Групи пациенти	Брой	Средна стойност RU/ml	Стандартно отклонение
1-ва група П	26	9,7500 RU/ml	± 8,65820
2-ра група П + РА	28	11,3014 RU/ml	± 14,45057
3-та група РА	26	35,7992 RU/ml	± 55,48167
4-та група без П и без РА	25	2,7708 RU/ml	± 1,61123

Целта на задачата бе да установим нивата на АСРА в слюнка при пациенти с пародонтит спрямо здравите индивиди и да тестваме хипотезата си за възможна локална продукция на АСРА в резултат на пародонталното заболяване. Изследвахме и евентуална зависимост на концентрацията на АСРА в слюнката от показателите на пародонтита. Установихме статистически значимо по-висока концентрация на АСРА при пациентите от 1-ва група само с П в сравнение с пациентите от 4-та група без П и без РА (Mann-Witney test, $p < 0,001$, таблица 6, фигура 20). Установихме, че пациентите от 4-та група без П и без РА са със значително по-ниски нива на АСРА в слюнка спрямо пациентите от 2-ра група с П и РА (Mann-Witney test, $p < 0,001$, таблица 6, фигура 21), както и спрямо пациентите с пародонтит (от 1-ва и 2-ра група заедно) (Mann-Witney test, $p < 0,001$, фигура 22).

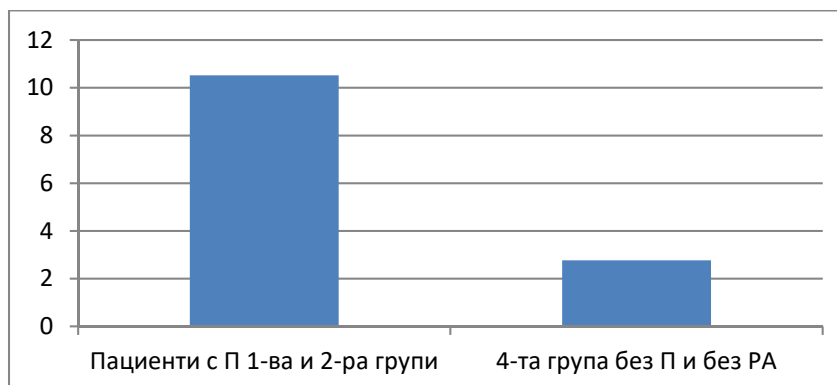
Фигура 20. Нива на АСРА в слюнка при пациентите от 1-ва група с П и 4-та група без П и без РА



Фигура 21. Нива на АСРА в слюнка при пациентите от 2-ра група с П и РА и 4-та група без П и без РА



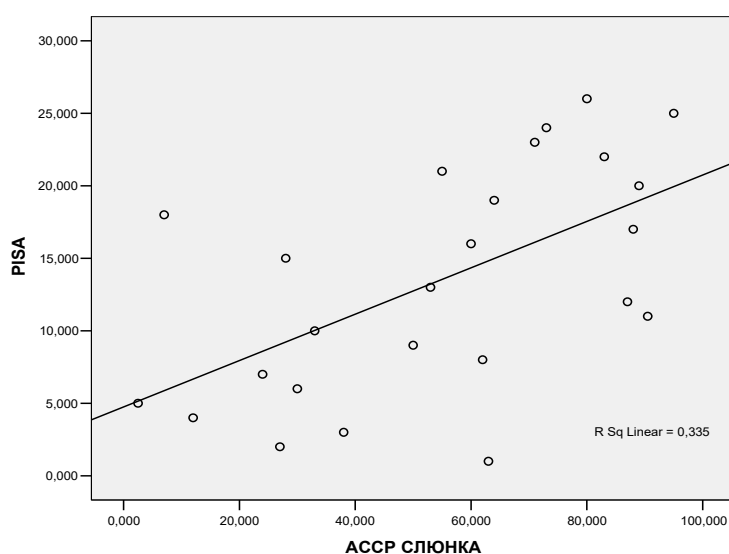
Фигура 22. Нива на АСРА в слюнка при пациентите с пародонтит (от 1-ва и 2-ра групи заедно) и 4-та група без П и без РА



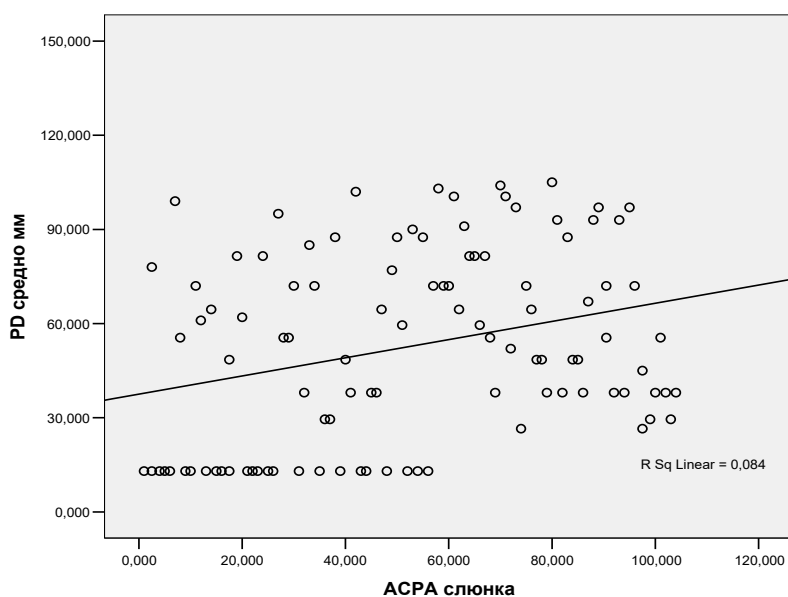
Проверихме влиянието на клиничните параметри на пародонтита върху концентрацията на АСРА в слюнка при пациентите с пародонтит (1-ва и 2-ра група). Установихме статистически значима положителна корелация между концентрацията АСРА в слюнка и показателя PISA (Spearman`s rho, $p < 0,001$, $r = 0,525$, графика 1). Установихме значима положителна зависимост между концентрацията на АСРА в слюнка и средната дълбочина на пародонралните джобове (PD средно) (Spearman`s rho, $p = 0,003$, $r = 0,290$, графика 2). Установихме значима положителна корелация между концентрацията на АСРА в слюнка и разпространението на кървене при сондиране (BoP) (Spearman`s rho, $p = 0,007$, $r = 0,263$, графика 3), както и между концентрацията АСРА в слюнка и тежестта (Spearman`s rho, $p = 0,009$, $r = 0,255$,) и разпространението (Spearman`s rho, $p < 0,001$, $r = 0,521$) на повърхностното гингивално възпаление (PBI), при пациентите с пародонтит от 1-ва и 2-ра група заедно. Установихме тенденция за положителна корелация между броя на дълбоките пародонтални джобове над 7 мм (PD > 7 мм) и концентрацията

на АСРА в слюнката (Spearman`s rho, $p = 0,083$, $r = 0,24$, графика 4), както и тенденция по-голямото разпространение на фуркационни лезии (F) да е свързано с по-високи нива на АСРА в слюнката на пациентите с пародонтит (1-ва и 2-ра група заедно) (Spearman`s rho, $p = 0,097$). Установихме тенденция по-големият брой плитки пародонтални джобове до 3 мм да е свързан с по-ниски стойности на АСРА в слюнка при пациентите с пародонтит (от 1-ва и 2-ра група заедно) (Spearman`s rho, $p = 0,088$, $r = 0,168$).

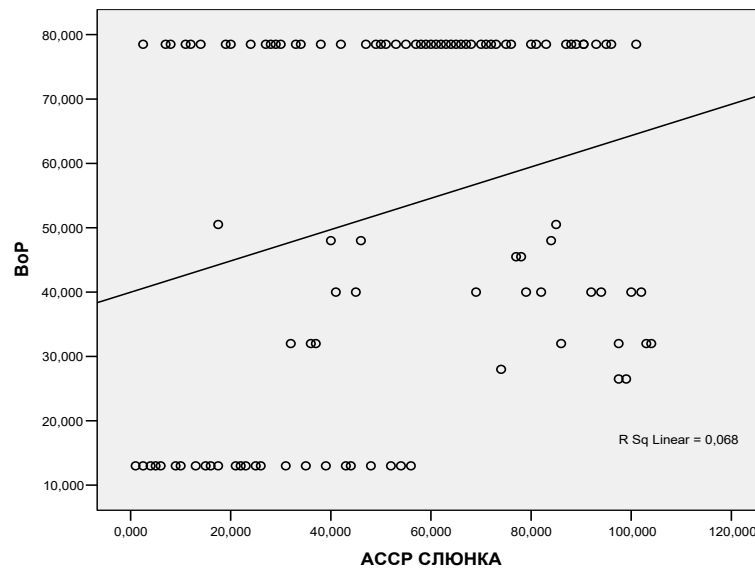
Графика 1. Зависимост между концентрацията на АСРА в слюнка и показателя PISA при пациентите с пародонтит 1-ва и 2-ра група



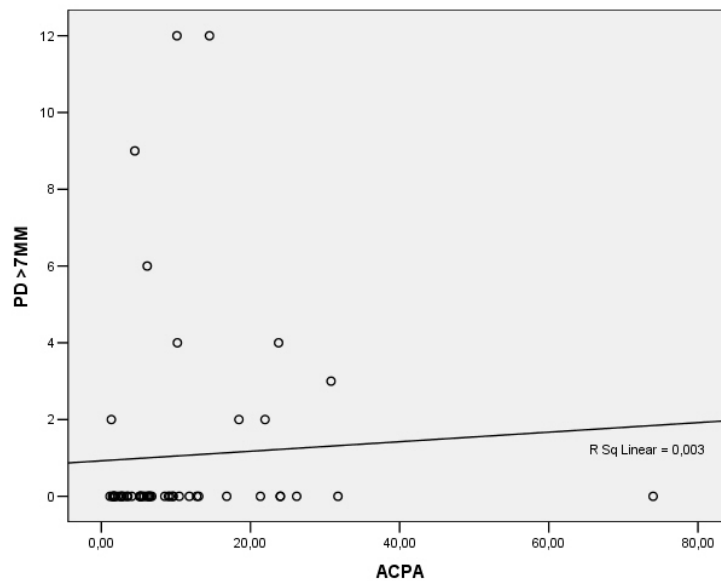
Графика 2. Зависимост между концентрацията на АСРА в слюнка и средната дълбочина на пародонталните джобове (PD средно мм) при пациентите с пародонтит 1-ва и 2-ра група



Графика 3. Зависимост между концентрацията на АСРА в слюнка и разпространението на кървене при сондиране (VoP%) при пациентите с пародонтит 1-ва и 2-ра група



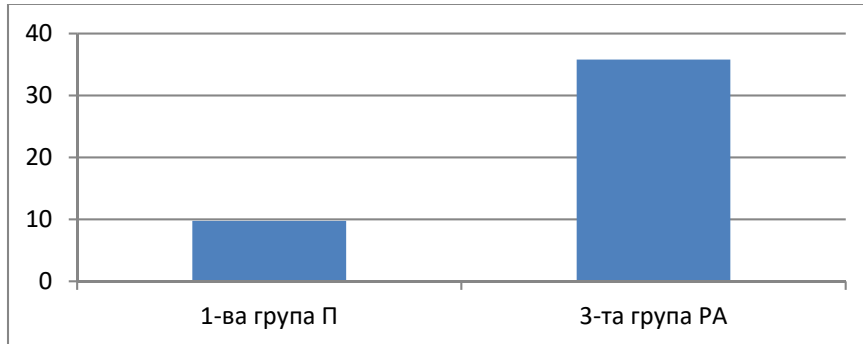
Графика 4. Зависимост между концентрацията на АСРА в слюнка и броя на пародонталните джобове над 7 мм (PD > 7 мм) при пациентите с пародонтит 1-ва и 2-ра група



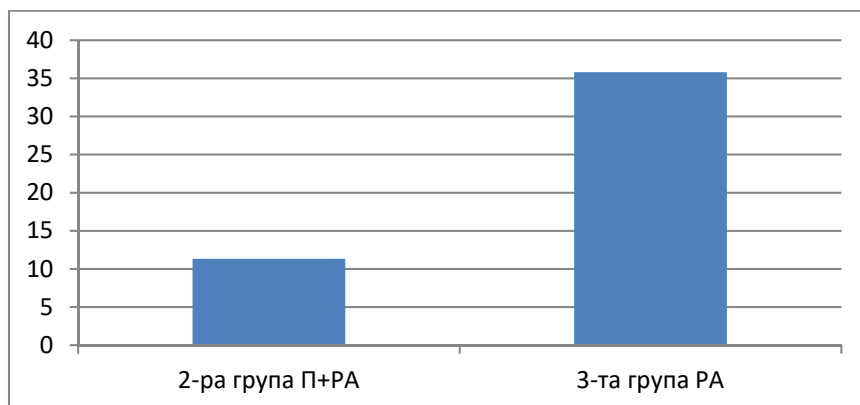
След като съпоставихме концентрацията на АСРА в слюнка при пациентите от различните групи, установихме, че при пациентите от 3-та група (само с РА) се открива значимо по-висока концентрацията на АСРА в слюнката спрямо пациентите от 1-ва група (само с П) (Mann-Witney test, $p = 0,016$, таблица 6, фигура 23), спрямо пациентите от 2-ра група с П и РА (Mann-Witney test, $p = 0,017$, таблица 6, фигура 24) и спрямо пациентите от 4-та група без П и РА (Mann-Witney test, $p < 0,001$, таблица 6,

фигура 25). Установихме, че при пациентите с ревматоиден артрит (от 2-ра и 3-та група заедно) има значително по-високи нива на АСРА в слюнка спрямо пациентите 4-та група без П и без РА (Mann-Witney test, $p < 0,001$, фигура 26).

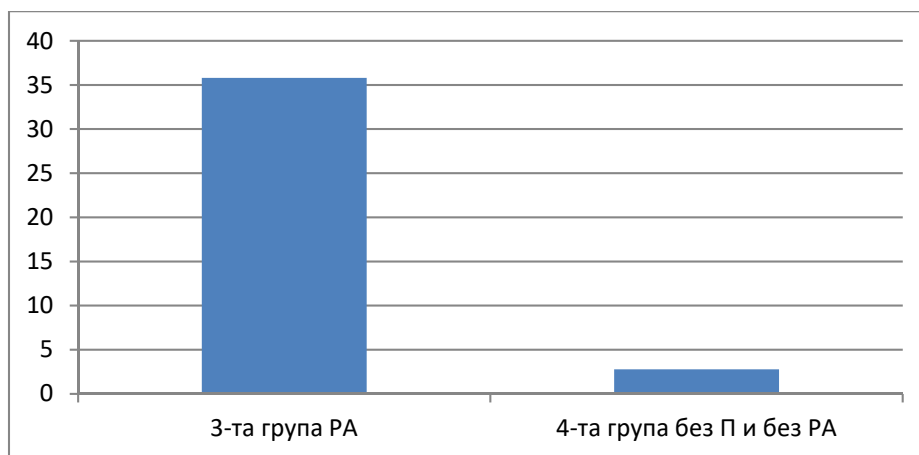
Фигура 23. Нива на АСРА в слюнка при пациентите от 3-та група с РА и 1-ва група с П



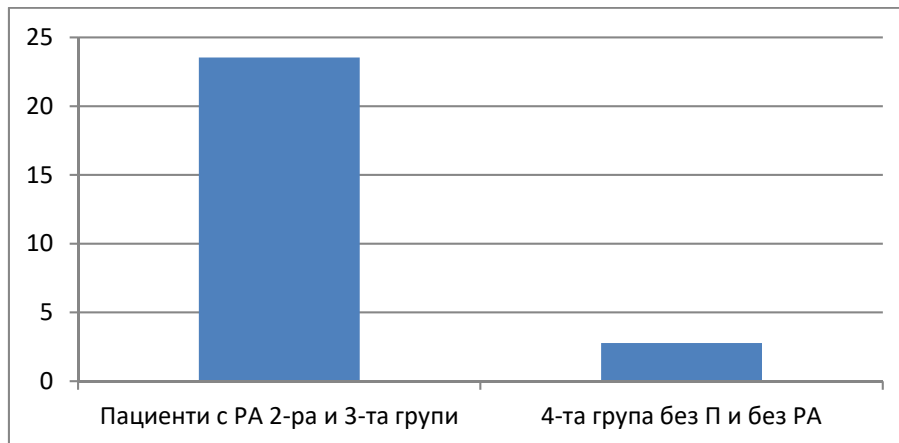
Фигура 24. Нива на АСРА в слюнка при пациентите от 3-та група с РА и 2-ра група с П + РА



Фигура 25. Нива на АСРА в слюнка при пациентите от 3-та група с РА и 4-та група без П и без РА



Фигура 26. Нива на АСРА в слюнка при пациентите с ревматоиден артрит (от 2-ра и 3-та групи заедно) и 4-та група без П и без РА



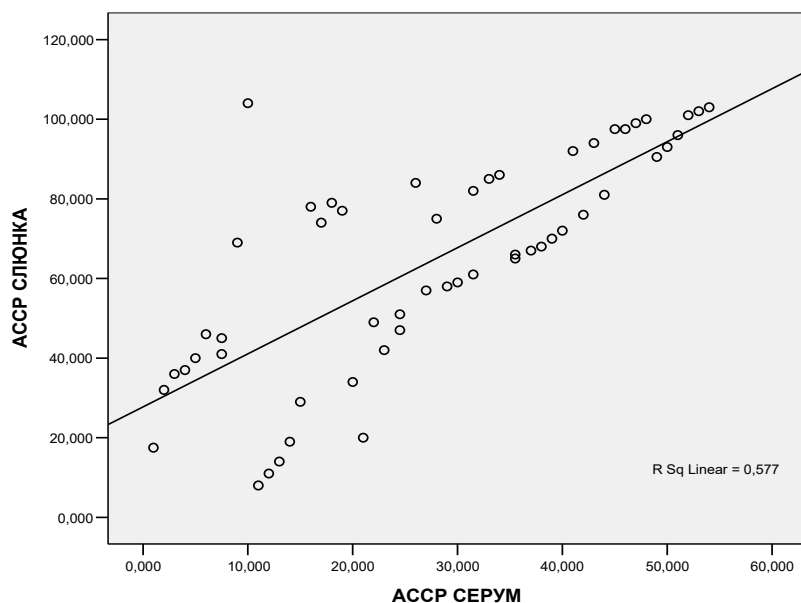
Установените от нас високи нива на АСРА в слюнка при пациентите от 3-та група само с ревматоиден артрит спрямо здравите лица, както и спрямо пациентите само с П, бяха основание да потърсим зависимост между концентрацията им и показателите на РА при пациентите с ревматоиден артрит от 3-та и 2-ра група. Специален интерес за нас представляваше намирането на връзка между нивата на АСРА в серум и АСРА в слюнка с оглед обсъждането на евентуалната роля на слюнката като диагностичен флуид, а слюнчените АСРА като предиктивен или диагностичен маркер за ревматоидния артрит.

Резултатите ни показват статистически значима положителна корелация между концентрацията на АСРА в слюнка и концентрацията на АСРА в серума при всички пациенти с ревматоиден артрит (Spearman`s rho, $p < 0,001$, $r = 0,761$). Значима зависимост между концентрациите на АСРА в слюнка и на АСРА в серум установихме и когато разгледахме пациентите с РА в двете групи поотделно – при пациентите от 2-ра група с П + РА (Spearman`s rho, $p < 0,001$, $r = 0,972$) и при пациентите от 3-та група само с РА (Spearman`s rho, $p < 0,001$, $r = 0,9$). Установихме статистически значима положителна корелация между концентрацията на АСРА в слюнка и концентрацията на RF в серума на всички пациенти с ревматоиден артрит (Spearman`s rho, $p < 0,001$, $r = 0,894$). Значима зависимост между концентрацията на АСРА в слюнка и концентрацията на RF в серум установихме и когато разгледахме пациентите с РА в двете групи поотделно – при пациентите от

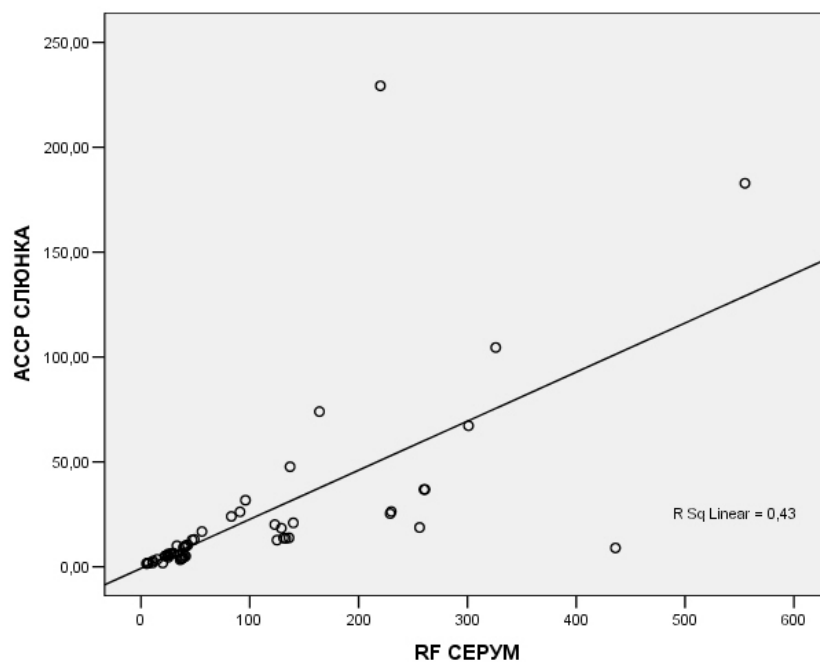
2-ра група с П + РА (Spearman`s rho, $p < 0,001$, $r = 0,953$) и при пациентите от 3-та група само с РА (Spearman`s rho, $p < 0,001$, $r = 0,911$). Открихме и значима положителна зависимост между нивата на АСРА в слюнка и активността DAS 28 на ревматичното заболяване при всички пациенти с РА (Spearman`s rho, $p = 0,009$, $r = 0,353$).

Резултатите, представени на графика 5 показват зависимостта между концентрациите на АСРА в слюнка и на АСРА в серум, а на графика 6 е показана зависимостта между концентрацията на АСРА в слюнка и нивата на RF в серума при пациентите с ревматоиден артрит. Подобна зависимост установяваме и по отношение на активността DAS 28 на ревматичното заболяване – по-висока е концентрацията на АСРА в слюнка при пациенти с по-голяма активност, отчетена чрез DAS 28 на заболяването (графика 7). С увеличаване на концентрациите на RF и на АСРА в серума нараства и концентрацията на АСРА в слюнката. Показателите RF и АСРА в серум и DAS 28 са маркери за тежест и активност на ревматоидния артрит, следователно с увеличаване на тежестта и активността на РА се увеличава и концентрацията на АСРА в слюнка.

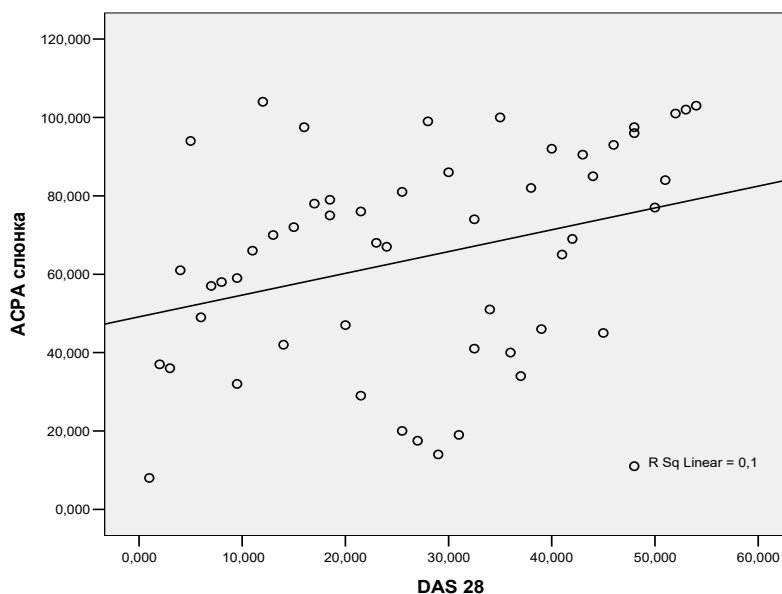
Графика 5. Зависимост между концентрацията на АСРА в слюнка и количеството АСРА в серума при пациенти с ревматоиден артрит



Графика 6. Зависимост между концентрацията на АСРА в слюнка и количеството RF в серума при пациенти с ревматоиден артрит



Графика 7. Зависимост между концентрацията на АСРА в слюнка и показателя активност DAS 28 при пациенти с ревматоиден артрит



Въпреки че не установихме статистически значими разлики между концентрациите на АСРА в слюнка при пациентите само с пародонтит (1-ва група) и тези с пародонтит и ревматоиден артрит (2-ра група), резултатите ни показват, че при по-тежкия пародонтит с по-голяма активност на пародонталните джобове и по-

тежко гингивално възпаление се открива по-висока концентрация на АСРА в слюнка. От друга страна, наличието на ревматично заболяване може да допринесе за присъствието на тези антитела в слюнката най-вероятно чрез дифузия от системната циркулация, като тежестта и активността на РА корелират с нивата на слюнчените АСРА.

Изводи

1. Установихме наличие на АСРА в слюнката на всички пациенти с пародонтит и ревматоиден артрит.

- Установихме значимо по-високи нива на АСРА в слюнка при пациентите от 1-ва и 2-ра група с пародонтит спрямо здравите индивиди, в подкрепа на тезата за локална продукция на АСРА.

- Установихме значима положителна зависимост между количеството АСРА в слюнка и показателите на пародонтита – PISA, дълбочината на джобовете (PD), броя на засегнатите фуркации (F) и кървенето при сондиране (BoP), в подкрепа на тезата за локална продукция на АСРА, зависима от тежестта на възпалително-деструктивния процес при П.

2. Установихме значително по-високи нива на АСРА в слюнка при пациентите от 3-та група с РА спрямо пациентите от 1-ва и 2-ра група с пародонтит и спрямо здравите индивиди, в подкрепа на тезата за пасивен, зависим от концентрацията транспорт от серума.

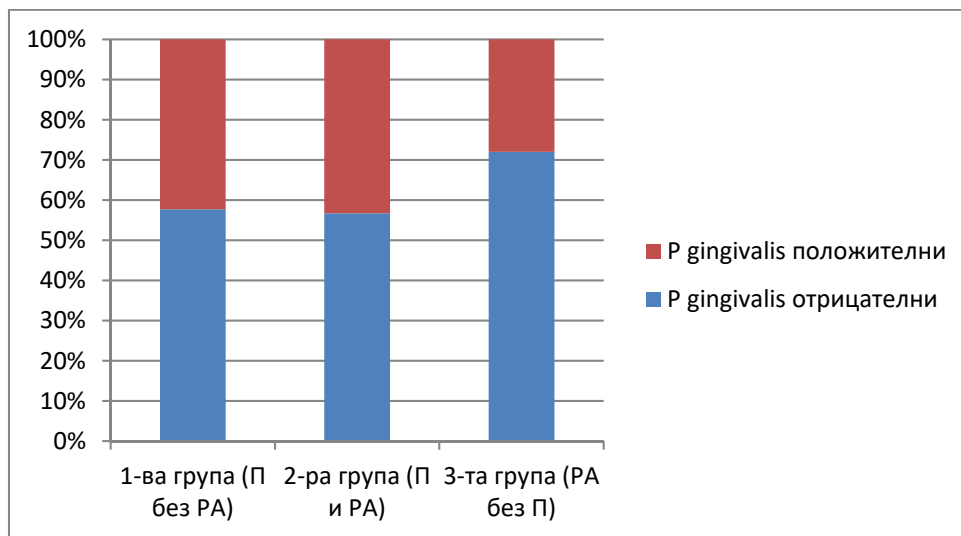
3. Установихме по-високи нива на АСРА в слюнката на пациенти с по-висока концентрация на АСРА в серум, показател за тежестта на РА в подкрепа на тезата за зависима от концентрацията на АСРА в серум дифузия на АСРА в слюнката.

4. Значимо по-високата концентрация на АСРА в слюнка при пациенти с ревматоиден артрит в съпоставка със здравите индивиди и пациентите без РА и установената от нас положителна корелация между концентрациите на серумните и слюнчените АСРА са в подкрепа на диагностичната значимост на слюнчените АСРА за ревматичните заболявания.

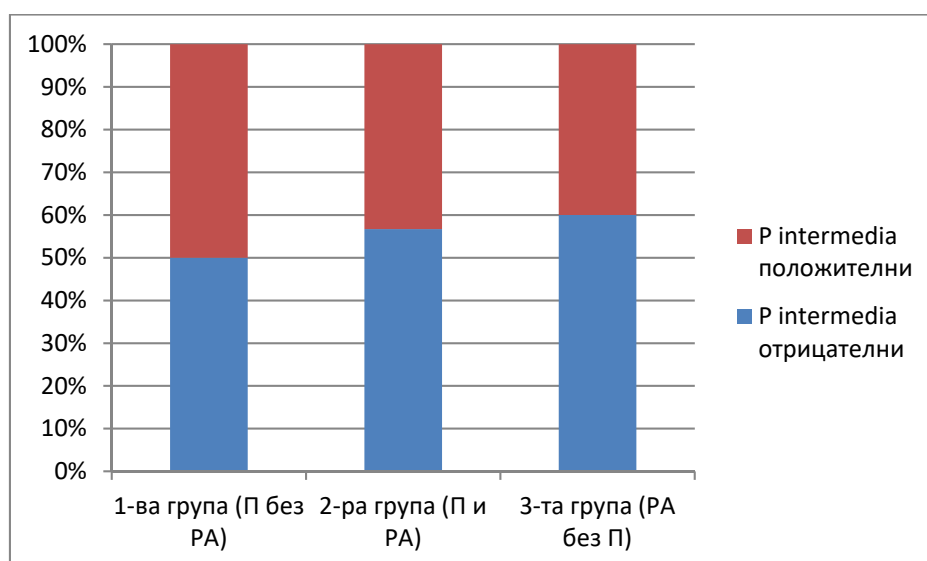
Резултати по задача 4 – Идентифициране чрез PCR на пародонтопатогените: *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. denticola*, в субгингивална плака във връзка със заболяванията ревматоиден артрит и пародонтит

Установихме наличие и на трите микроорганизма сред изследваните пациенти (фигури 27, 28 и 29).

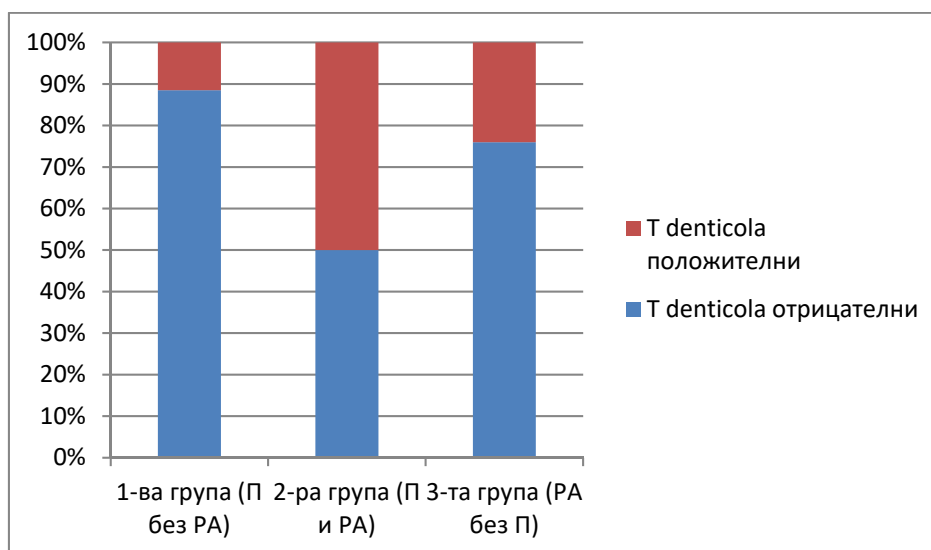
Фигура 27. Разпределение на *P. gingivalis*-положителни и *P. gingivalis*-отрицателни пациенти в трите изследвани групи



Фигура 28. Разпределение на *P. intermedia*-положителни и *P. intermedia*-отрицателни пациенти в трите изследвани групи

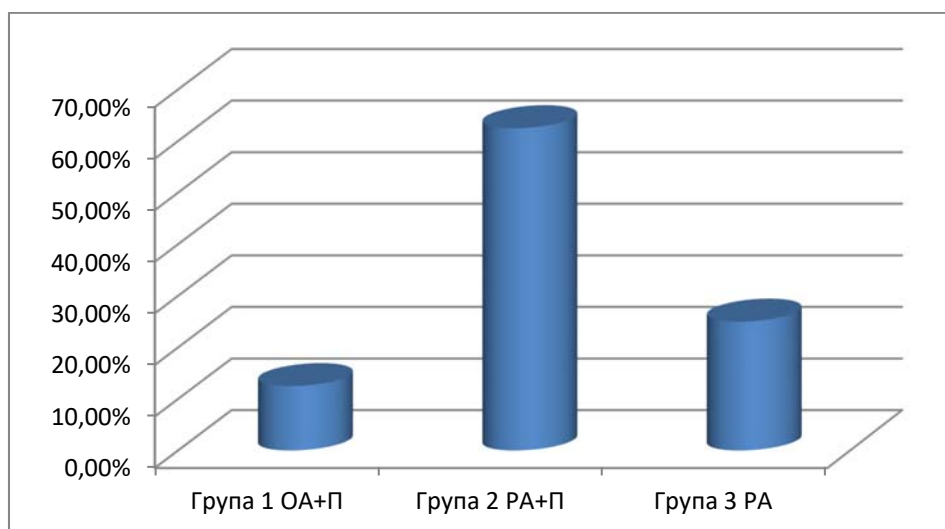


Фигура 29. Разпределение на *T. denticola*-положителни и *T. denticola*-отрицателни пациенти в трите изследвани групи



Установихме статистически значима по-голяма честота на положителни за *T. denticola* пациенти от 2-ра група (с пародонтит и ревматоиден артрит) в сравнение с тези от 1-ва група – с пародонтит и без ревматоиден артрит (Mann-Witney test, $p = 0,005$, фигура 30). Установихме и по-голяма честота на положителни за *T. denticola* пациенти в 3-та група (само с РА), но без значима зависимост спрямо пациентите с П и без РА от 1-ва група.

Фигура 30. Разпределение на положителните за *T. denticola* пациенти по групи



Нашите резултати показват зависимости между присъствието на *P. gingivalis* в субгингивална плака и много от клиничните пародонтални параметри. Установихме значително по-голям брой зъби с пародонтални джобове от 5 до 7 мм при пациенти с пародонтит [(от 1-ва група (с П + ОА) и от 2-ра група (П + РА)], които са положителни за *P. gingivalis*, спрямо пациенти с пародонтит от същите групи, отрицателни за *P. gingivalis* (Mann-Witney test, $p = 0,022$). Пациентите от 1-ва и 2-ра група с пародонтит, положителни за *P. gingivalis*, показаха по-голяма средна дълбочина на PD (Mann-Witney test, $p = 0,008$) в сравнение с пациентите от 1-ва и 2-ра група с пародонтит и отрицателни за *P. gingivalis*. Установихме значимо по-голяма средна загуба на аташман CAL (Mann-Witney test, $p = 0,033$) при *P. gingivalis*-положителните пациенти с пародонтит от 1-ва и 2-ра група. Присъствието на *P. gingivalis* при пациентите с от 1-ва и 2-ра група с пародонтит е в положителна корелация с показателя PISA (Mann-Witney test, $p = 0,003$). Пациентите от 1-ва и 2-ра група с пародонтит, положителни за *P. Gingivalis*, показват по-често засягане на фуркационната област (Mann-Witney test, $p = 0,039$) спрямо пациентите от тези две групи, които са отрицателни за *P. gingivalis*. Установихме и тенденция положителните за *P. gingivalis* пациенти от 1-ва и 2-ра група с пародонтит да имат по-голям процент на разпространение на повърхностното гингивално възпаление (PBI) (Mann-Witney test, $p = 0,061$). При *P. gingivalis*-положителните пациенти с пародонтит от 1-ва и 2-ра група има и тенденция за по-голямо разпространение на кървене при сондиране (BoP) (Mann-Witney test, $p = 0,084$) и тенденция за наличие на по-голям брой рецесии (R) (Mann-Witney test, $p = 0,091$) спрямо пациентите с пародонтит от 1-ва и 2-ра група, но отрицателни за *P. gingivalis*.

На таблица 7 (както и фигури 16-23 от Приложение 1) са представени тези зависимости.

При пациентите с пародонтит, положителни за *T. denticola*, установихме значително по-тежест нарастване на пародонталните показатели. Наблюдава се значително по-голяма честота на разпределение на пародонтални джобове над 7 мм при пациенти от 1-ва и 2-ра група с пародонтит, положителни за *T. denticola*, спрямо тези, които са отрицателни за *T. denticola* (Mann-Witney test, $p = 0,033$). Присъствието на *T. denticola* при пациентите с пародонтит от 1-ва и 2-ра група води до по-

голяма честота на засягане на фуркационната област (Chi-square test, $p = 0,019$) спрямо отрицателните за *T. denticola*. Пациентите от 1-ва и 2-ра група с пародонтит и положителни за *T. denticola* имат по-голяма средна дълбочина на PD в мм (Student's T-test, $p < 0,0001$) и по-голям брой джобове с $5 \text{ мм} < \text{PD} < 7 \text{ мм}$ (Chi-square test, $p = 0,001$) спрямо отрицателните за *T. denticola*. Установихме по-голяма средна загуба на аташман CAL в мм (Mann-Witney test, $p < 0,0001$) и по-високи стойности на показателя PISA (Mann-Witney test, $p < 0,0001$) при пациентите от 1-ва и 2-ра група с пародонтит и положителни за *T. denticola* спрямо отрицателните за *T. denticola*. Пациентите от 1-ва и 2-ра група с пародонтит и наличие на *T. denticola* имат по-голяма средна стойност на тежест на гингивалното възпаление (PBI) (Mann-Witney test, $p = 0,012$) спрямо отрицателните за *T. denticola*.

Таблица 7. Средни стойности на някои от показателите за тежест и активност на пародонтита в зависимост от наличието на *P. gingivalis*

	<i>P. gingivalis</i> положителни		<i>P. gingivalis</i> отрицателни		P-стойност/ Метод
	Средна стойност	Стандартно отклонение	Средна стойност	Стандартно отклонение	
PBI%	99,74%	± 1,43684	93%	± 18,65366	0,061 Mann-Witney test
PD 5-7 мм	3.00	± 2,96355	1.5938	± 3,22149	0,022 Mann-Witney test
PD средно мм	4.1371	± 1,07621	3.3644	± 1,22140	0,008 Mann-Witney test
CAL средно мм	4.8933	± 1,47690	4.0291	± 1,59268	0,033 Mann-Witney test
F честота на засягане	54,2%	± 26,75	28,2%	± 16,86	0,039 Fisher's exact test
R брой	6,2581	± 7,75013	3,52	± 5,55213	0,091 Mann-Witney test
BoP%	84,95%	± 29,1106	72,70%	± 33,21392	0,084 Mann-Witney test
PISA	1931.41	± 720,980341	1370.90	± 861,29353	0,003 Mann-Witney test

На таблица 8 (фигури 24-30 от Приложение 1) са представени тези зависимости.

Таблица 8. Средни стойности на някои от показателите на пародонтита в зависимост от наличието на *T. denticola*

	<i>T. denticola</i> положителни		<i>T. denticola</i> отрицателни		Р-стойност/ Метод
	Средна стойност	Стандартно отклонение	Средна стойност	Стандартно отклонение	
РВІ тежест	2.1279	± 0,63708	1.714	± 0,77268	0,012 Mann-Witney test
PD 5-7 мм	3,9444	± 3,26248	1,3684	± 2,49402	< 0,001 Mann-Witney test
PD > 7 мм честота на разпространение	33,4%	± 16,38	10,5%	± 9,56	0,033 Chi-square tests
PD средно мм	4,4878	± 1,08595	3,3203	± 1,09516	< 0,001 Student's T-test
CAL средно мм	5,5989	± 1,43593	3,8313	± 1,33391	< 0,001 Mann-Witney test
F честота на засягане	61,1%	± 19,66	28,9%	± 14,32	0,019 Chi-square tests
BoP%	95%	± 15,43487	90,1%	± 23,95059	0,473 Mann-Witney test
PISA	2209,621	± 848,00393	1327,621	± 688,40474	< 0,001 Mann-Witney test

Установихме значително по-голяма средна загуба на аташман (CAL) при пациенти от 1-ва и 2-ра група с пародонтит и положителни за *P. intermedia* спрямо тези с пародонтит, но отрицателни за *P. intermedia* (Mann-Witney test, $p = 0,045$, таблица 9 /фигура 31 от Приложение 1/). Не установихме статистически значими зависимости при изследването на другите показатели на пародонтита (таблица 9).

Таблица 9. Средни стойности на някои от показателите за тежест и активност на пародонтита в зависимост от наличието на *P. intermedia*

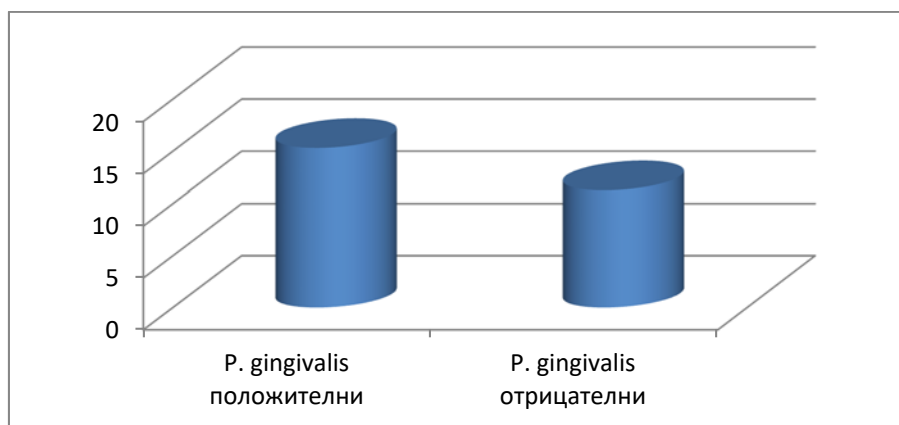
	<i>P. intermedia</i> положителни		<i>P. intermedia</i> отрицателни		Р-стойност/ Метод
	Средна стойност	Стандартно отклонение	Средна стойност	Стандартно отклонение	
РВІ тежест	1,9547	± 0,65117	1,7422	± 0,73252	0,177 Student`s T-test
PD 5-7 мм	2,3846	± 2,9268	2,0333	± 3,39861	0,291 Mann-Witney test
PD средно мм	3,9673	± 1,25714	3,4600	± 1,14440	0,120 Student`s T-test
CAL средно мм	4,8842	± 1,72083	3,9793	± 1,35966	0,045 Mann-Witney test
BoP%	94,23%	± 17,01131	89,5%	± 24,92575	0,502 Mann-Witney test
PISA	1736,961	± 819,303248	1502,061	± 865,24901	0,188 Mann-Witney test

Изследвахме концентрациите на биохимичните показатели АСРА и RF в гингивална кревикуларна течност и серум при пациентите с РА и П от 2-ра група в зависимост от наличието на *P. gingivalis*. Установихме повишаване на нивата на АССР в гингивална кревикуларна течност при пациентите от 2-ра група с пародонтит и ревматоиден артрит и положителни за *P. gingivalis* спрямо пациентите, отрицателни за *P. gingivalis*, но без да има значима зависимост (Mann-Witney test, $p = 0,644$). При пациентите от 2-ра група, положителни за *P. gingivalis*, установихме по-високи нива на RF в гингивална кревикуларна течност спрямо пациентите, които са отрицателни за *P. gingivalis*, но без статистически значима зависимост (Mann-Witney test, $p = 0,412$). Установихме повишено количество на RF в серума при пациентите от 2-ра група с ревматоиден артрит и пародонтит, при които доказахме присъствие на *P. gingivalis* в субгингивалната плака спрямо тези, които са отрицателни за *P. gingivalis*, но без значима зависимост (Mann-Witney test, $p = 0,609$). Резултатите са представени на таблица 10 и фигури 31, 32, 33.

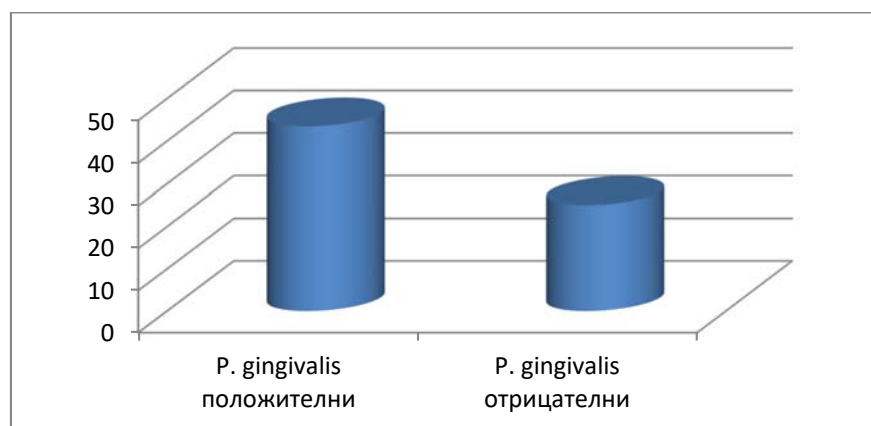
Таблица 10. Средни стойности на АСРА и RF в серум и гингивална кревикуларна течност при пациентите от 2-ра група с П и РА в зависимост от наличието на *P. gingivalis*

	<i>P. gingivalis</i> положителни		<i>P. gingivalis</i> отрицателни		Р-стойност
	Средна стойност	Стандартно отклонение	Средна стойност	Стандартно отклонение	
АСРА серум	200,37	± 224,92647	183,99	± 204,27168	0,495 Mann-Witney test
АСРА гинг. крив. течност	15,31	± 37,8671	11,26	± 14,215132	0,688 Mann-Witney test
RF серум	137,96	± 136,59982	108,72	± 136,66626	0,190 Mann-Witney test
RF гинг. крив. течност	43,47319	± 92,614108	25,02848	± 43,537938	0,781 Mann-Witney test

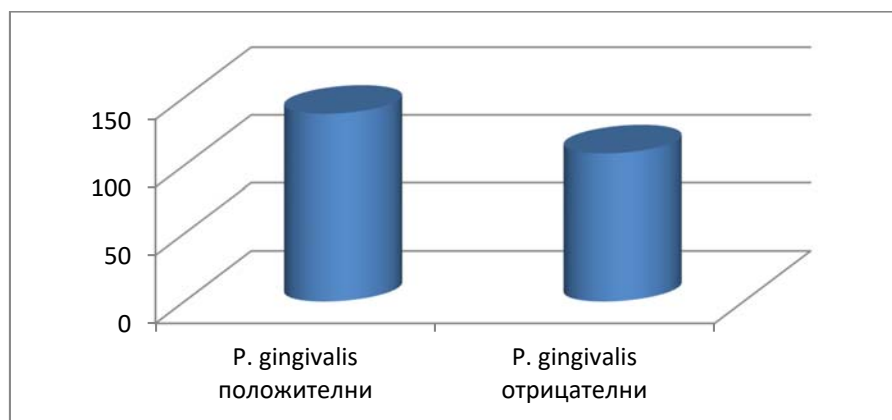
Фигура 31. Средни стойности на АСРА в гингивална кревикуларна течност при пациентите от 2-ра група с пародонтит и ревматоиден артрит, положителни за *P. gingivalis* спрямо пациенти с пародонтит и ревматоиден артрит и отрицателни за *P. gingivalis*



Фигура 32. Средни стойности на RF в гингивална кревикуларна течност при пациентите от 2-ра група с пародонтит и ревматоиден артрит, положителни за *P. gingivalis* спрямо пациенти с пародонтит и ревматоиден артрит и отрицателни за *P. gingivalis*



Фигура 33. Средни стойности на RF в серум при пациентите от 2-ра група с ревматоиден артрит и пародонтит, положителни за *P. gingivalis* спрямо пациенти с ревматоиден артрит и отрицателни за *P. gingivalis*



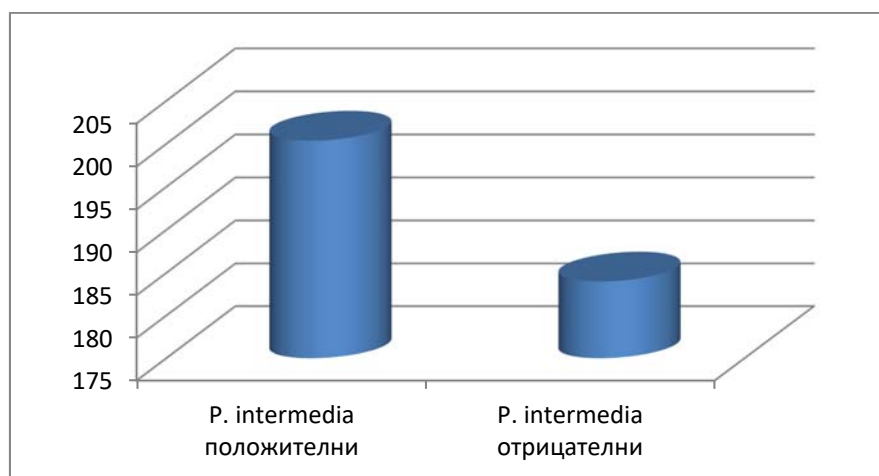
Установихме и по-високи нива на АСРА в серум при пациенти от 2-ра група с ревматоиден артрит и пародонтит, които са положителни за *P. intermedia* в субгингивалната плака, спрямо отрицателните за *P. intermedia* (Mann-Witney test, $p = 0,510$). Установихме и по-високи нива на RF в серум при пациенти от 2-ра група с ревматоиден артрит и пародонтит, положителни за *P. intermedia* в субгингивалната плака спрямо отрицателните за *P. intermedia* (Mann-Witney test, $p = 0,465$). Установихме и по-високи нива на RF в гингивална кревикуларна течност при пациенти от 2-ра група с ревматоиден артрит и пародонтит, положителни за *P. intermedia* в субгингивалната плака, спрямо отрицателните за *P. intermedia* (Mann-Witney test, $p = 0,909$).

Резултатите са представени на таблица 11 и фигури 34, 35, 36.

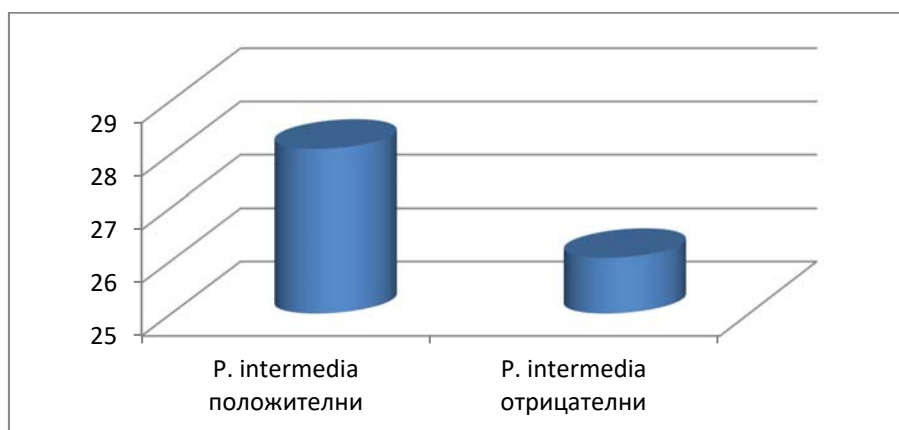
Таблица 11. Средни стойности на АСРА и RF в серум и гингивална кревикуларна течност при пациентите от 2-ра група с П и РА в зависимост от наличието на *P. intermedia*

	<i>P. intermedia</i> положителни		<i>P. intermedia</i> отрицателни		Р-стойност
	Средна стойност	Стандартно отклонение	Средна стойност	Стандартно отклонение	
АСРА серум	200,3746	± 227,5053	183,9965	± 209,8023	0,840 Mann-Witney test
АСРА гинг. крив. течност	11,84751	± 23,269145	4,07043	± 3,304238	0,322 Mann-Witney test
RF серум	125,91	± 142,20017	108,79	± 140,01929	0,941 Mann-Witney test
RF гинг. крив. течност	28,09	± 71,495911	26,05	± 63,566834	0,588 Mann-Witney test

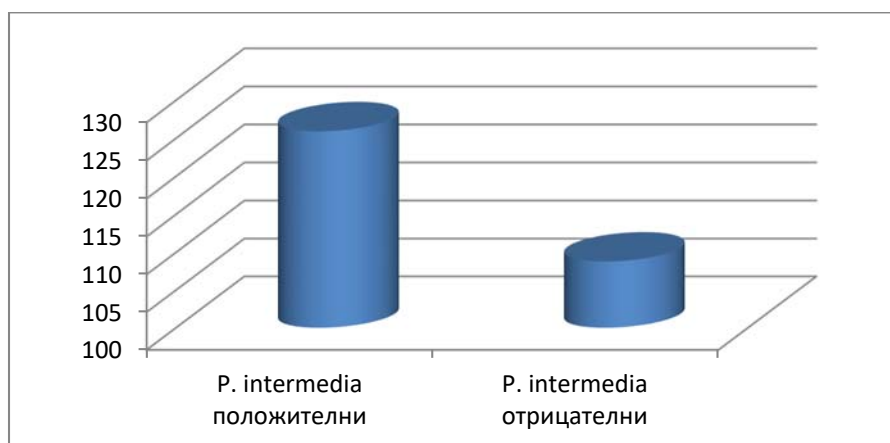
Фигура 34. Средни стойности на АСРА в серум при положителни и отрицателни за *P. intermedia* пациенти от 2-ра група с пародонтит и ревматоиден артрит



Фигура 35. Средни стойности на RF в гингивална кревикуларна течност при положителни и отрицателни за *P. intermedia* пациенти от 2-ра група с пародонтит и ревматоиден артрит



Фигура 36. Средни стойности на RF в серум при положителни и отрицателни за *P. intermedia* пациенти от 2-ра група с пародонтит и ревматоиден артрит



На таблица 12 са представени средните стойности на АСРА и RF в серум и гингивална кревикуларна течност при пациентите от 2-ра група с П и РА в зависимост от наличието на *T. denticola*. Не установихме значима корелация между наличието на този микроорганизъм и концентрациите на биохимичните показатели АСРА и RF в серума. Не бе намерена и корелация между концентрациите на АСРА и RF в гингивална кревикуларна течност и присъствието на *T. denticola*.

Таблица 12. Средни стойности на АСРА и RF в серум и гингивална кревикуларна течност при пациентите от 2-ра група с П и РА в зависимост от наличието на *T. denticola*

	<i>T. denticola</i> положителни		<i>T. denticola</i> отрицателни		Р-стойност
	Средна стойност	Стандартно отклонение	Средна стойност	Стандартно отклонение	
АСРА серум	172,946	± 191,3523	209,2413	± 239,7695	0,650 Mann-Witney test
RF серум	110,428	± 134,05112	118,0480	± 147,46365	0,883 Mann-Witney test
RF гинг. крив. течност	21,99442	± 18,497273	36,33732	± 78,532249	0,300 Mann-Witney test
АСРА гинг. крив. течност	5,67965	± 4,151454	9,56089	± 21,027144	0,309 Mann-Witney test

Изводи

1. Установихме статистически значимо по-голяма честота на положителни за *T. denticola* в субгингивална плака пациенти с П и РА в сравнение с такива само с П, без РА.

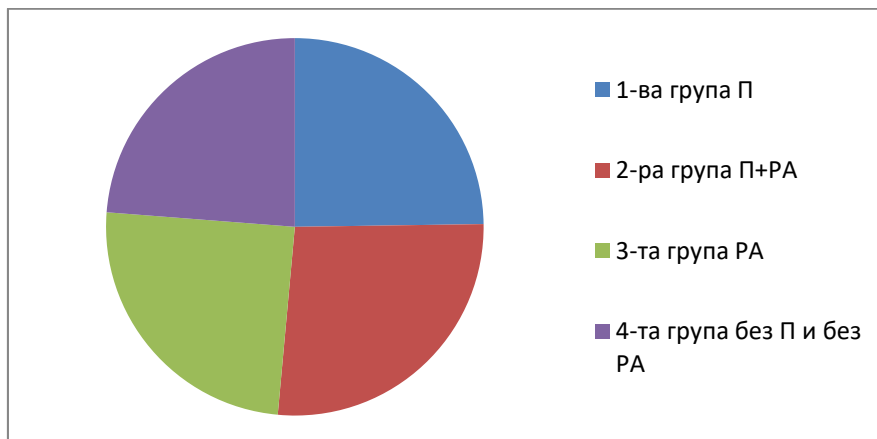
2. Установихме положителна корелация на присъствие на *P. gingivalis* в субгингивална плака с показателите на пародонтита – средна PD, средна CAL, брой засегнати F и PISA, което потвърждава връзката на този микроорганизъм с П.

3. Установихме положителна корелация на присъствие на *T. denticola* в субгингивална плака с показателите на пародонтита – средна PD, средна CAL, брой засегнати F и PISA, което потвърждава връзката на този микроорганизъм с П.

4. Установихме положителна корелация на присъствие на *P. intermedia* в субгингивална плака с показателя на пародонтита – средна CAL, което потвърждава връзката на този микроорганизъм с П.

Резултати по задача 5 – Изследване на генния полиморфизъм на FcgIIIa158V/F при пациенти с пародонтит, с ревматоиден артрит, с ревматоиден артрит и пародонтит и при здрави индивиди във връзка с изявата на двете заболявания. Изследване на комбинираното влияние на FcgIIIa158V/F и тютюнопушене върху изявата на пародонтита и ревматоидния артрит

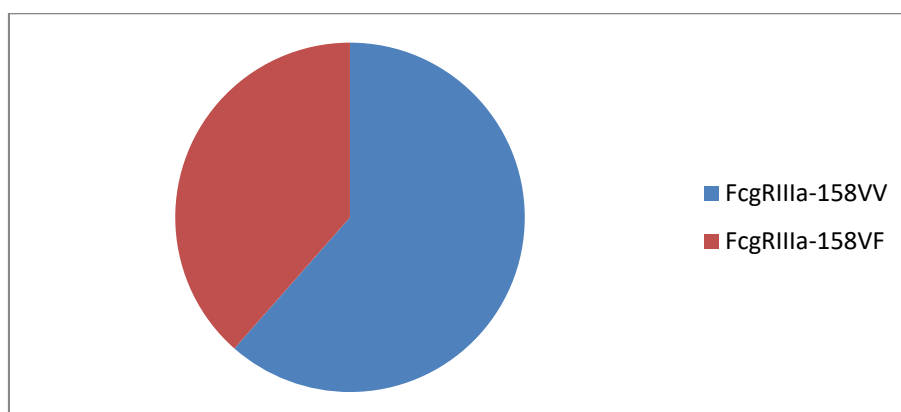
Фигура 37. Разпределение на пациентите по групи



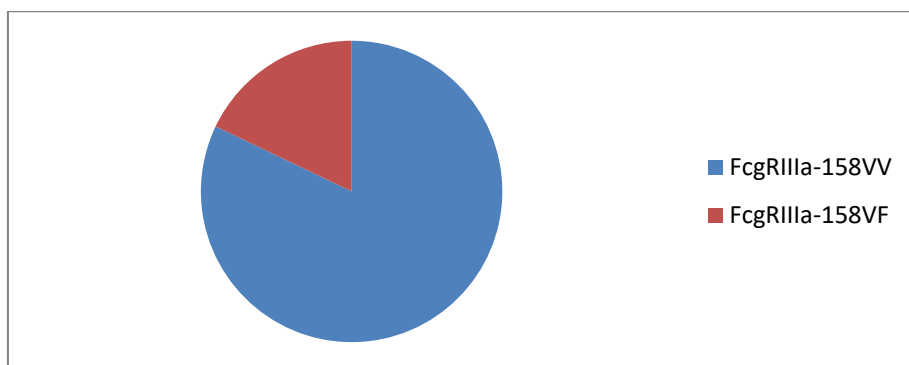
При FcgRIIIa генотипизирането установихме 100% разпространение на FcgRIIIa-158V алела при всички изследвани пациенти. Хомозиготни по този алел (FcgRIIIa-158VV) са 78,1% от всички изследвани пациенти, докато хетерозиготните (FcgRIIIa-158VF) са 21,9%. При селектирането на пациентите по пол установихме, че 85,3% от мъжете са носители на FcgRIIIa-158VV, а 14,7% са хетерозиготни (FcgRIIIa-158VF). При жените хомозиготни (FcgRIIIa-158VV) са 79,6% и хетерозиготни (FcgRIIIa-158VF) са 20,4%.

На фигури 38, 39, 40 и 41 е представено генотипизирането на пациентите по групи.

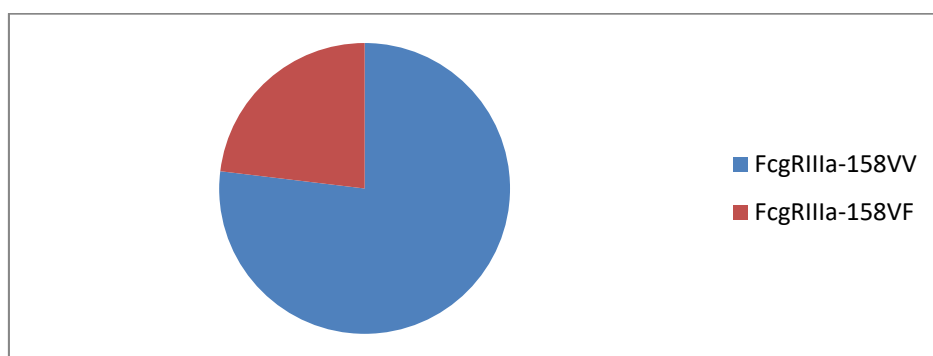
Фигура 38. Генотипизиране на пациентите от 1-ва група с П и без РА



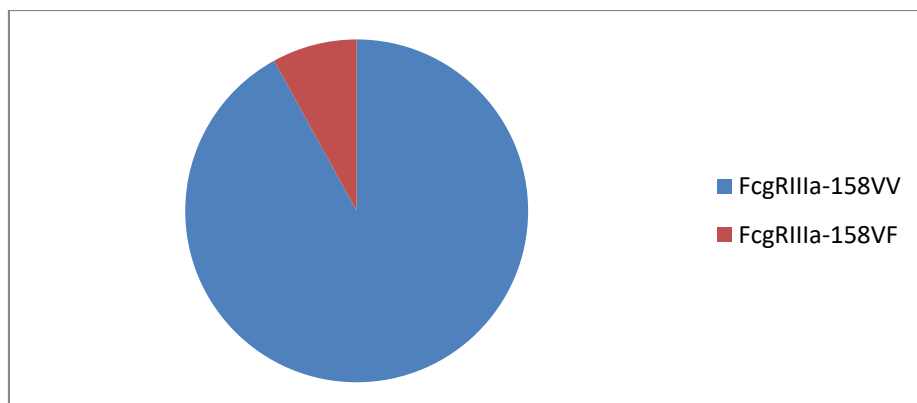
Фигура 39. Генотипизиране на пациентите от 2-ра група с П и РА



Фигура 40. Генотипизиране на пациентите от 3-та група с РА и без П



Фигура 41. Генотипизиране на 4-та група здрави индивиди без П и без РА



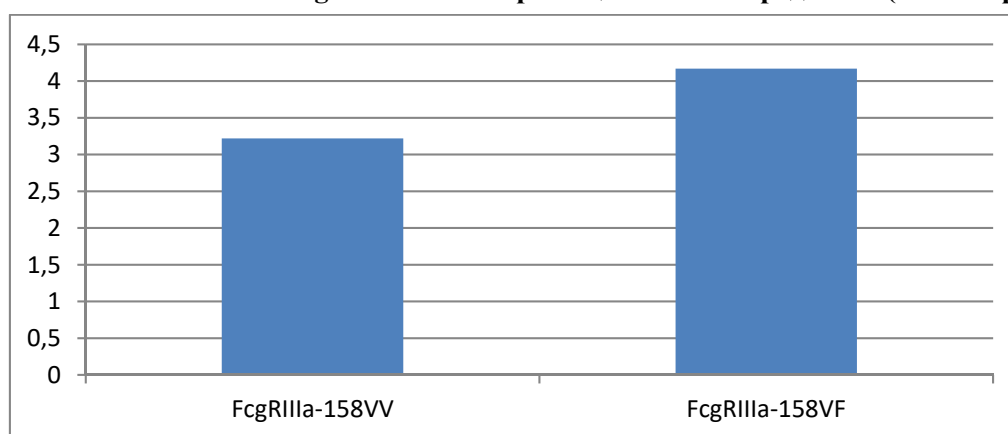
Съпоставихме пародонталните показатели с генотипа FcgRIIIa-158VF при пациентите с пародонтит от 1-ва и 2-ра група. Установихме значима зависимост между FcgRIIIa-158VF генотипа и средната дълбочина на пародонталните джобове (PD) (Mann-Witney Test, $p = 0,019$, фигура 42, таблица 13) в сравнение с FcgRIIIa-158VV генотипа, както и тенденция за по-голям брой пародонтални джобове с дълбочина между 5-7 мм (Mann-Witney Test, $p = 0,092$, фигура 43, таблица 13) при генотип FcgRIIIa-158VF в сравнение с генотип FcgRIIIa-158VV при пациентите с пародонтит от 1-ва и 2-ра група. Установихме, че при пациентите от 1-ва

и 2-ра група с пародонтит има тенденция генотипа FcgRIIIa-158VF да е свързан с по-голямо разпространение на кървенето при сондиране (BoP) (Mann-Witney test, $p = 0,061$, фигура 44, таблица 13) в сравнение с FcgRIIIa-158VV генотипа. Установихме, че при пациентите с пародонтит от 1-ва и 2-ра група има тенденция при генотип FcgRIIIa-158VF да се открива по-голямо разпространение на повърхностното гингивално кървене (PBI) в сравнение с FcgRIIIa-158VV генотипа (Fisher's Exact Test, $p = 0,093$, фигура 45, таблица 13).

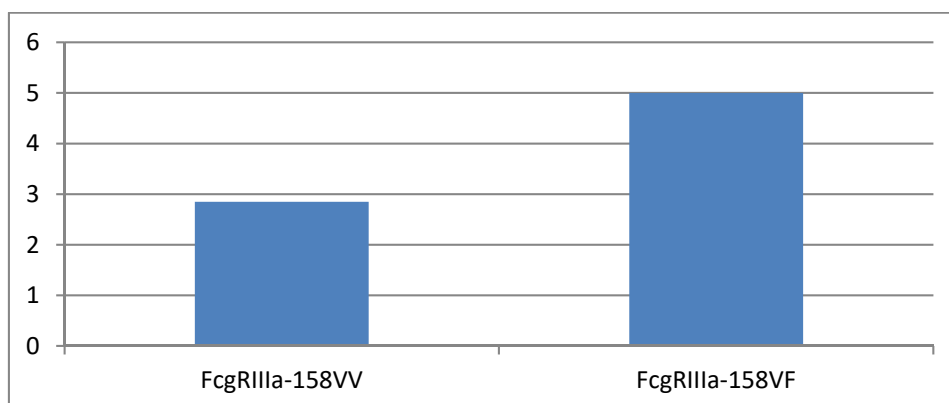
Таблица 13. Средни стойности на някои пародонтални показатели при различните генотипове по отношение на FcgRIIIa-158V/F при пациентите с пародонтит (1-ва и 2-ра група)

Пародонтални показатели	FcgRIIIa-158VF		FcgRIIIa-158VV		P-стойност
	Средна стойност	Стандартно отклонение	Средна стойност	Стандартно отклонение	
PD средно мм	4,17	± 1,845	3,22	± 1,823	p = 0,019 Mann-Witney test
PD от 5 мм до 7 мм	5,00	± 6,459	2,85	± 4,749	p = 0,092 Mann-Witney test
BoP% разпространение	81,52	± 29,520	64,05	± 38,715	p = 0,061 Mann-Witney test
PBI% разпространение	93,04	± 23,048	77,56	± 36,160	p = 0,093 Fisher's Exact test
Разпространение F	66,7%	± 45,66	41%	± 33,50	$p = 0,131$ Chi-square test
PISA	2073,062	± 1242,617	1560,140	± 808,273	$p = 0,178$ Mann-Witney test

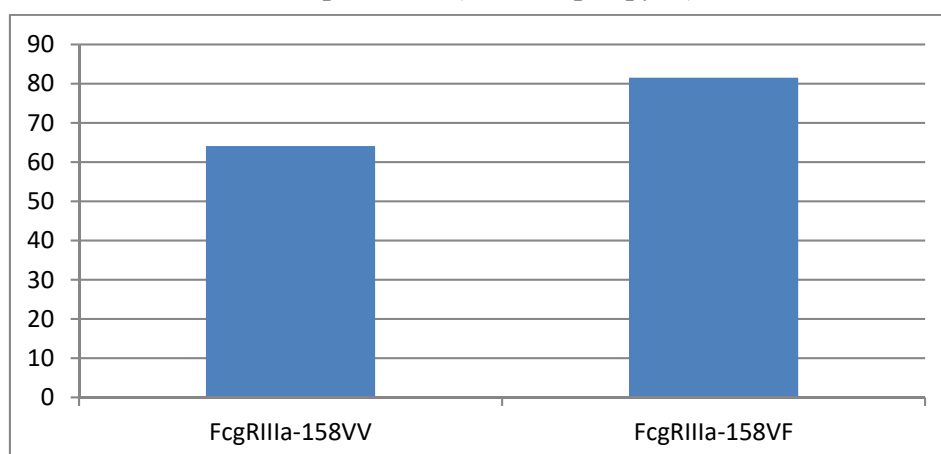
Фигура 42. Средни стойности на дълбочина на пародонталния джоб (PD) при различните генотипове по отношение на FcgRIIIa-158V/F при пациентите с пародонтит (1-ва и 2-ра група)



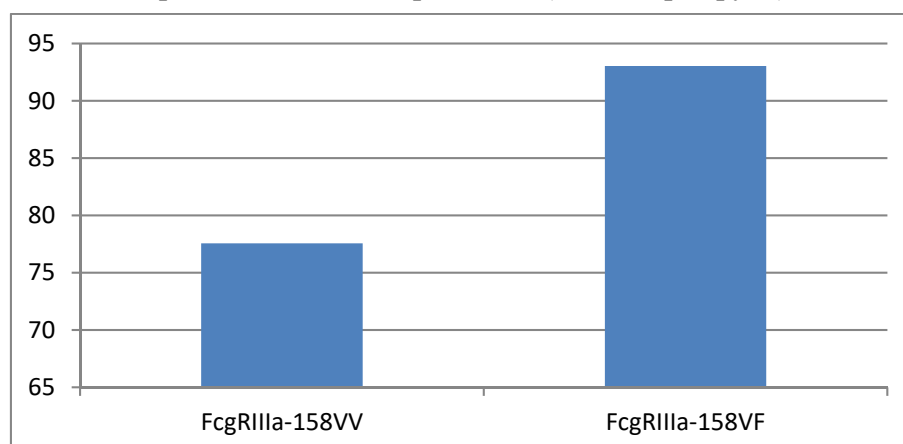
Фигура 43. Среден брой на дълбоки пародонтални джобове между 5-7 мм (PD 5-7 мм) при различните генотипове по отношение на FcγRIIIa-158V/F при пациентите с пародонтит (1-ва и 2-ра група)



Фигура 44. Средни стойности на разпространението на кървенето при сондиране (BoP) при различните генотипове по отношение на FcγRIIIa-158V/F при пациентите с пародонтит (1-ва и 2-ра група)

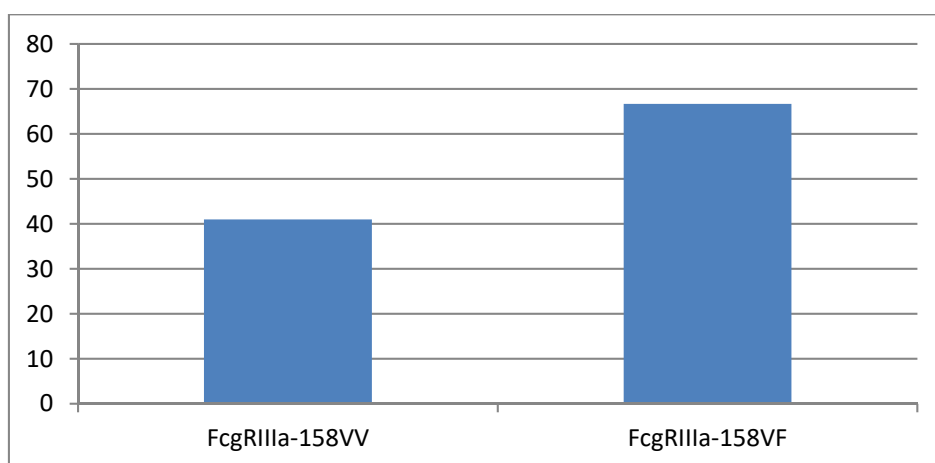


Фигура 45. Средни стойности на разпространението на повърхностното гингивално кървене (PBI) при различните генотипове по отношение на FcγRIIIa-158V/F при пациентите с пародонтит (1-ва и 2-ра група)

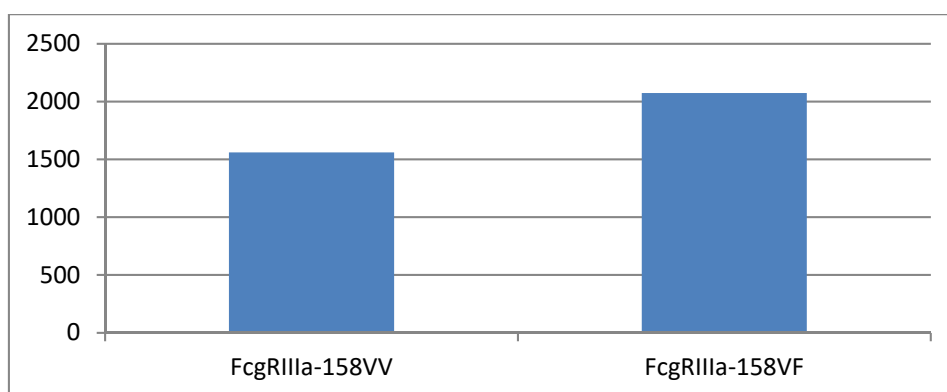


Въпреки че не установихме статистически значима зависимост, при пациентите с пародонтит от 1-ва и 2-ра група, имащи генотип FcgRIIIa-158VF, откриваме тенденция за по-често на фуркационно засягане от втора и трета степен (Chi-Square Test, $p = 0,131$, таблица 13, фигура 46) и по-високи средни стойности на показателя PISA (Mann-Witney Test, $p = 0,178$, таблица 13, фигура 47) в сравнение с пациентите с генотип FcgRIIIa-158VV.

Фигура 46. Разпространение в % на засегнатите фуркации (F) от втора и трета степен при различните генетипове по отношение на FcgRIIIa-158V/F при пациентите с пародонтит (1-ва и 2-ра група)



Фигура 47. Средни стойности на показателя PISA при различните генетипове по отношение на FcgRIIIa-158V/F при пациентите с пародонтит (1-ва и 2-ра група)



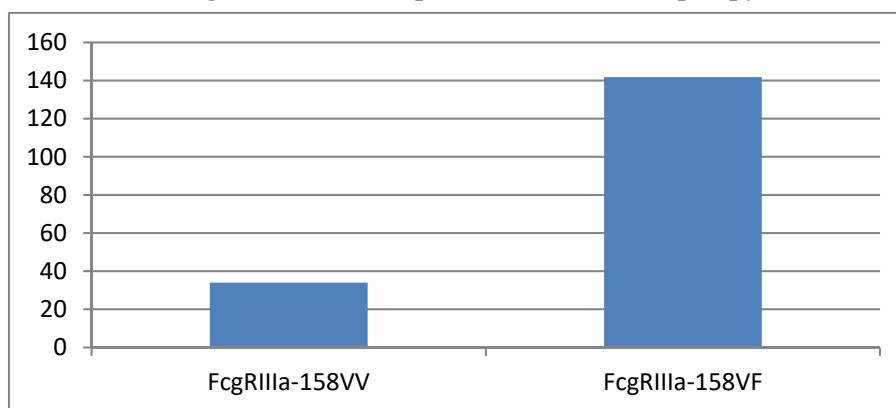
При съпоставяне на вида генотип с концентрациите на АСРА и RF в серум при пациентите от 2-ра група с П и РА установихме тенденция за по-високи средни нива на RF в серума при генотип FcgRIIIa-158VF (Mann-Witney Test, $p = 0,079$, фигура 48, таблица 14) в сравнение с пациентите от същата група с генотип

FcgRIIIa-158VV. Въпреки че няма значима зависимост нивата на АСРА в серума на пациентите от 2-ра група с генотип FcgRIIIa-158VF са по-високи от нивата на АСРА в серума на пациентите с генотип FcgRIIIa-158VV (Mann-Witney Test, $p = 0,220$, таблица 14, фигура 49).

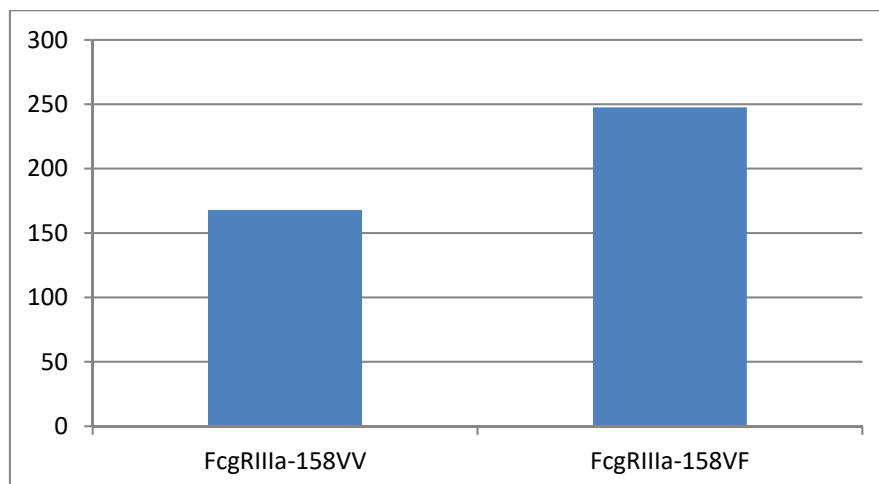
Таблица 14. Средни стойности на АСРА и RF в серум при различните генотипове във 2-ра група (II и РА) пациенти

	FcgRIIIa-158VF		FcgRIIIa-158VV		P-стойност
	Средна стойност	Стандартно отклонение	Средна стойност	Стандартно отклонение	
АСРА серум	247,60	± 207,204	167,87	± 121,632	$p = 0,220$ Mann-Witney test
RF серум	141,80	± 173,94	34,03	± 26,26	$p = 0,079$ Mann-Witney test

Фигура 48. Средни стойности на RF в серума в зависимост от генотипа FcgRIIIa-158V/F при пациентите от 2-ра група с II и РА



Фигура 49. Средни стойности на АСРА в серума в зависимост от генотипа FcgRIIIa-158V/F при пациентите от 2-ра група с II и РА

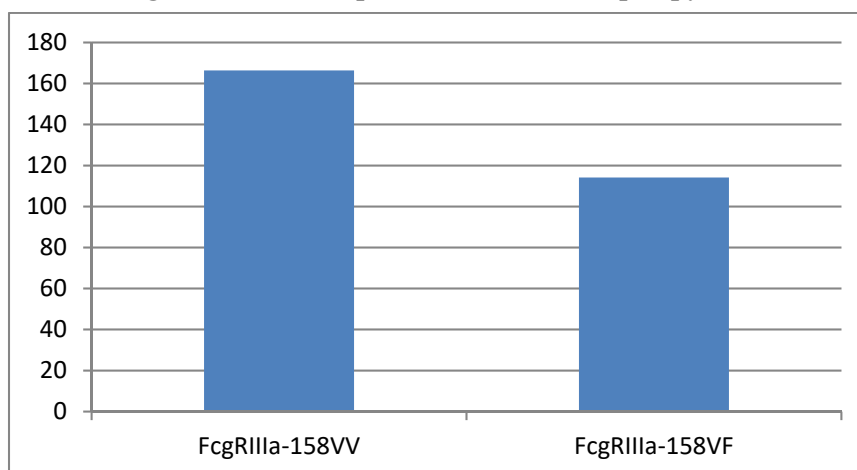


При пациентите от 3-та група (РА и без П), хомозиготни с генотип FcgRIIIa-158VV установихме тенденция нивата на RF и АСРА в серума да са по-високи в сравнение с пациентите от същата група, хетерозиготни с генотип FcgRIIIa-158VF, но без статистически значима зависимост (Mann-Witney Test, съответно $p = 0,361$ и $p = 0,238$, таблица 15, фиг. 50 и фиг. 51).

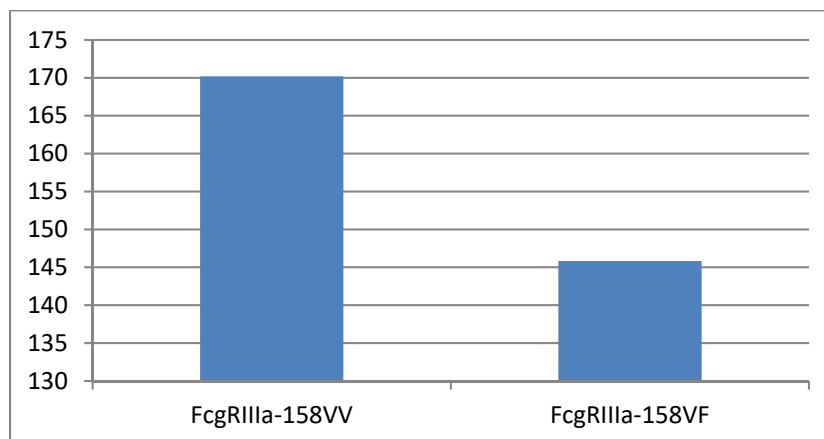
Таблица 15. Средни стойности на АСРА и RF в серум при различните генотипове в 3-та група (П и РА) пациенти

	FcgRIIIa-158VF		FcgRIIIa-158VV		P-стойност
	Средна стойност	Стандартно отклонение	Средна стойност	Стандартно отклонение	
АСРА серум	145,83	± 240,081	170,20	± 202,724	$p = 0,238$ Mann-Witney test
RF серум	114,17	± 114,580	166,40	± 128,381	$p = 0,361$ Mann-Witney test

Фигура 50. Средни стойности на RF в серума в зависимост от генотипа FcgRIIIa-158V/F при пациентите от 3-ра група със РА и без П



Фигура 51. Средни стойности на АСРА в серума в зависимост от генотипа FcgRIIIa-158V/F при пациентите от 3-ра група с РА и без П

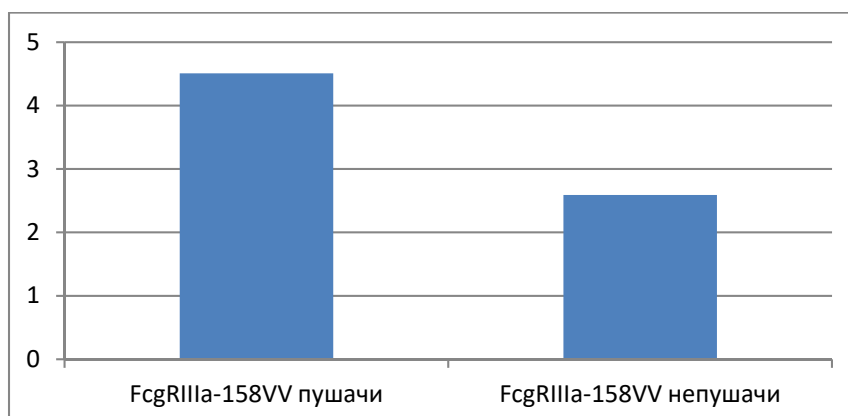


Пациентите с П (от 1-ва и 2-ра група) разделихме на хомозиготни и хетерозиготни по генотип и изследвахме влиянието на фактора тютюнопушене. Установихме, че при хомозиготните FcgRIIIa-158VV пушачи има значително по-голяма средна дълбочина на пародонталните джобове в сравнение с хетерозиготните FcgRIIIa-158VF при непушачи (Mann-Witney test, $p < 0,001$, фигура 52, таблица 16). Установихме значително по-голямо разпространение на кървенето при сондиране (BoP) при генотип FcgRIIIa-158VV и пушачи спрямо същия генотип и непушачи в 1-ва и 2-ра група пациенти с П (Mann-Witney test, $p < 0,001$, фигура 53, таблица 16). Установихме, че при непушачите с генотип FcgRIIIa-158VV има значително по-голям брой на плитки пародонтални джобове с дълбочина < 3 мм в сравнение със същия генотип при пушачи в 1-ва и 2-ра група пациенти с П (Mann-Witney test, $p < 0,001$, фигура 54, таблица 16).

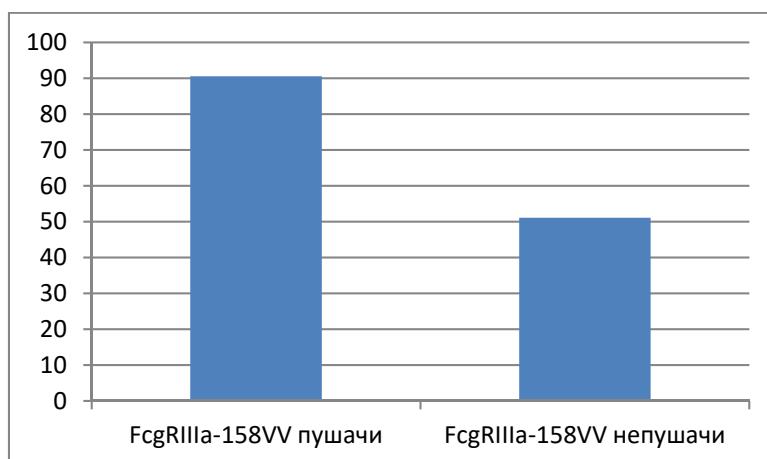
Таблица 16. Средни стойности на някои пародонтални показатели при пациенти с пародонтит (от 1-ва и 2-ра група), генотип FcgRIIIa-158VV, пушачи и непушачи

Пародонтални показатели	FcgRIIIa-158VV пушачи		FcgRIIIa-158VV непушачи		Р-стойност
	Средна стойност	Стандартно отклонение	Средна стойност	Стандартно отклонение	
PD средно мм	4,51	± 1,422	2,59	± 1,666	$p < 0,001$ Mann-Witney test
PD < 3 мм	5,96	± 10,749	17,98	± 12,541	$p < 0,001$ Mann-Witney test
BoP(%) разпространение	90,56	± 19,520	51,09	± 39,715	$p < 0,001$ Mann-Witney test

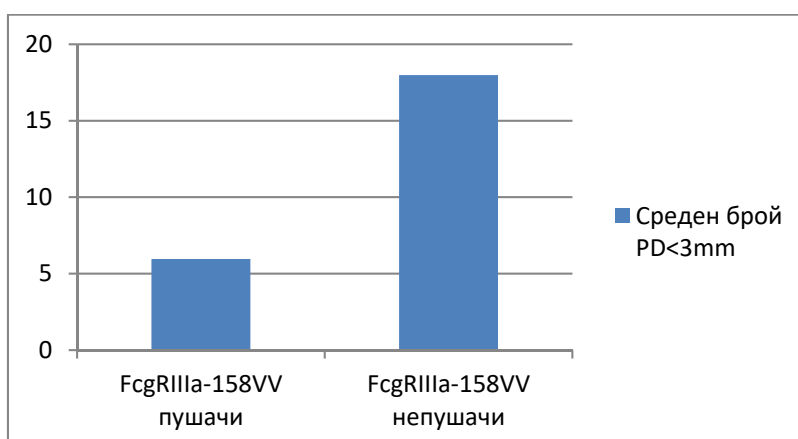
Фигура 52. Средни стойности на дълбочина на пародонталния джоб (PD) при пациенти с пародонтит (от 1-ва и 2-ра група), генотип FcgRIIIa-158VV, пушачи и непушачи



Фигура 53. Разпространение на кървенето при сондиране (Вор) при пациенти с пародонтит (от 1-ва и 2-ра група), генотип FcgRIIIa-158VV, пушачи и непушачи



Фигура 54. Среден брой на плитките пародонталните джобове < 3 мм (PD < 3 мм) при пациенти с пародонтит (от 1-ва и 2-ра група), генотип FcgRIIIa-158VV, пушачи и непушачи



Пациентите с РА (от 2-ра и 3-та група) разделихме на хомозиготни и хетерозиготни по генотип и изследвахме влиянието на фактора тютюнопушене. Не установихме значими зависимости между показателите на РА и комбинираното действие на факторите тютюнопушене и генотип FcgRIIIa-158VF.

Направихме многофакторен логистичен регресионен анализ, за да тестваме хипотезата си за значението на генния полиморфизъм FcgRIIIa-158V/F като рисков фактор за изявата на П и РА. Съпоставихме всяка от групите пациенти с П и без РА (1-ва група); с П и РА (2-ра група) и с РА и без П (3-та група) с групата на здравите индивиди (4-та група) по отношение на генотипа FcgRIIIa-158V/F. Взехме под вни-

мание и допълнителни фактори като пол, възраст, тютюнопушене и образование. Установихме, че носителството на генотип FcgRIIIa-158VF статистически значимо увеличава вероятността за изява на П в сравнение с носителството на генотип FcgRIIIa-158VV при пациентите от 1-ва група (OR = 7,2 (1,4-37,3), p = 0,019). Установихме също, че мъжкият пол може да промени статистически значимо отношението на шансовете за изява на П при носителство на генотип FcgRIIIa-158VF в сравнение с генотип FcgRIIIa-158VV при пациентите от 1-ва група (OR = 3,5 (1,1-11,3), p = 0,035), а нарастването на възрастта с една година увеличава два пъти шанса за изява на П при същите пациенти от 1-ва група (OR = 1,9 (1,3-2,7), p = 0,001). Логистичният регресионен анализ не установи статистически значима зависимост между генния полиморфизъм FcgRIIIa-158VF и наличието на РА при пациентите от 2-ра група с П и РА (OR = 2,5 (0,44-14,23), p = 0,302), но установихме тенденция при пациентите от 3-та група с РА да има увеличен шанс за изява на РА (OR = 3,45 (0,625-19,05), p = 0,155). Липсата на статистически значима зависимост между носителството на генотип FcgRIIIa-158VF и наличието на РА най-вероятно се дължи на ограничения брой изследвани пациенти.

Изводи

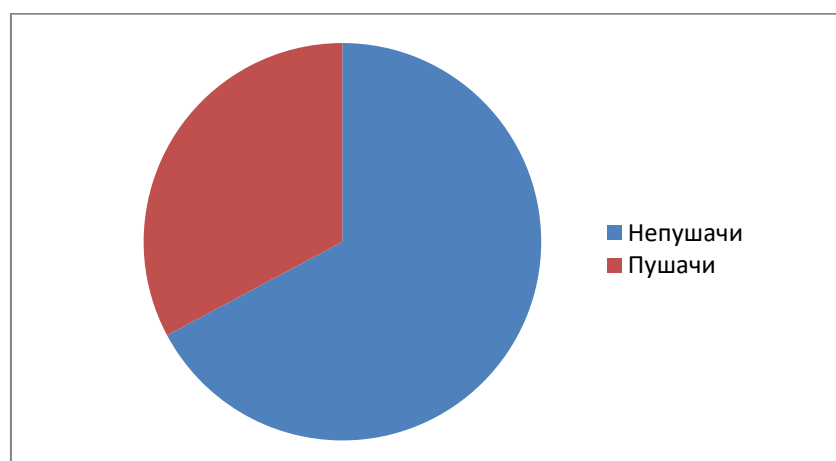
1. Установихме 100% честота на разпространение на FcgRIIIa-158V алела при изследваните пациенти.
2. Установихме значима зависимост между FcgRIIIa-158VF генотипа и показателите на пародонтита – дълбочина на пародонталните джобове, кървене при сондиране и повърхностно гингивално кървене.
3. Установихме тенденция FcgRIIIa-158VF генотипа да е свързан с по-висока концентрацията на RF в серум, показател за тежест на РА, при пациентите с РА и П.
4. Установихме, че при пациентите с комбинация от факторите генотип FcgRIIIa-158VV и тютюнопушене се откриват: по-голяма дълбочина на пародонталните джобове, по-голямо разпространение на кървене при сондиране и РВІ.

Резултати по задача 6 – Изследване на влиянието на факторите на средата – тютюнопушене, пол, образование, възраст върху изявата на пародонтита и ревматоидния артрит и евентуалното им определяне като общи рискови фактори за двете заболявания

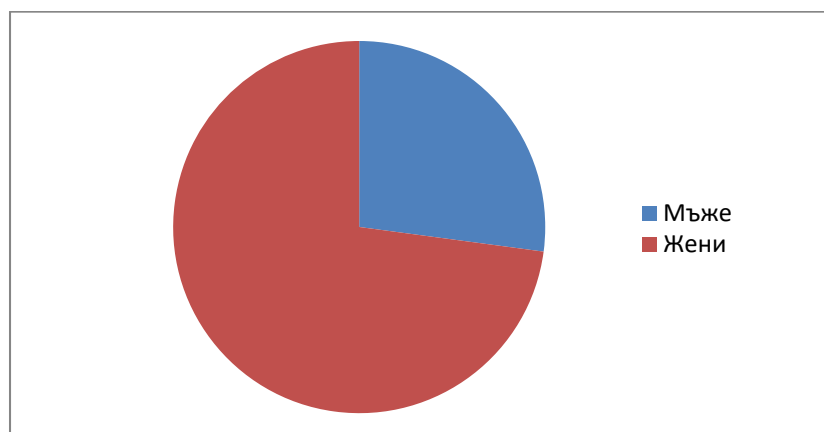
Таблица 17. Разпределение на пациентите по групи според факторите тютюнопушене и пол

	Тютюнопушене				Пол			
	пушачи		непушачи		мъже		жени	
	Брой	%	Брой	%	Брой	%	Брой	%
1-ва група П без РА	17	32,7%	35	67,3%	19	36,5%	33	63,5%
2-ра група П и РА	27	45%	33	55%	16	26,6%	27	73,4%
3-та група РА без П	17	34,7%	32	65,3%	9	18,37%	40	81,63%
4-та група здрави индивиди	0	0%	25	100%	7	28%	18	72%

Фигура 55. Разпределение на всички изследвани пациентите според фактора тютюнопушене



Фигура 56. Разпределение на пациентите според фактора пол



Изследвахме влиянието на фактора тютюнопушене върху изязвата на пародонтита при пациентите от 1-ва (П + ОА) и 2-ра (П + РА) група, оценени чрез клиничните показатели – дълбочина на сондиране, загуба на аташман, наличие на рецесии, засегнати фуркации, загубени зъби, кървене при сондиране и показателя PISA.

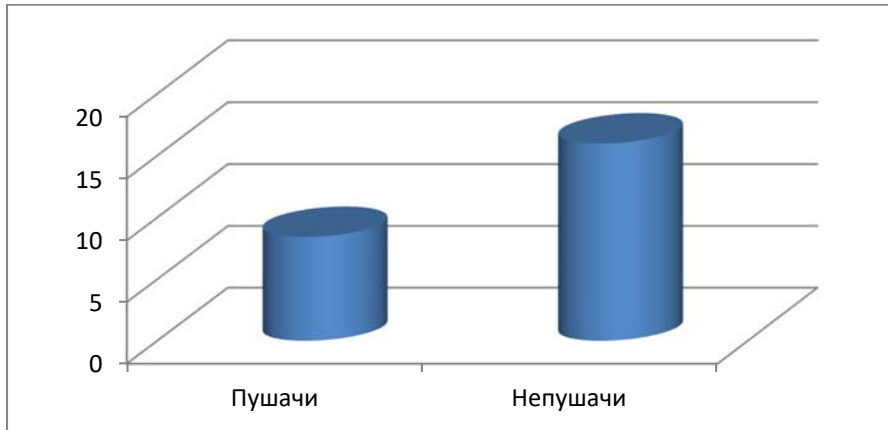
Установихме значително по-голям брой на плитките пародонтални джобове до 3 мм ($PD < 3$ мм) при непушачите с пародонтит в сравнение с пушачите сред пациентите от тези две групи (Mann-Witney test, $p < 0,001$, таблица 18, фигура 57). Установихме тенденция сред пациентите с пародонтит от 1-ва и 2-ра група, пушачите да имат по-голям брой джобове с дълбочина между 3-5 мм ($3 \text{ мм} < PD < 5$ мм) в сравнение с непушачите (Mann-Witney test, $p = 0,096$, таблица 18, фигура 58). Установихме, че пушачите с пародонтит имат значително по-голям брой пародонтални джобове между 5 мм и 7 мм ($5 \text{ мм} < PD < 7$ мм) в сравнение с непушачите с пародонтит (Mann-Witney test, $p = 0,005$, таблица 18, фигура 59). При пушачите с пародонтит от 1-ва и 2-ра група има корелация между броя на пародонталните джобове с дълбочина ($5 \text{ мм} < PD < 7$ мм) и броя изпушени цигари дневно – пациентите, пушещи над 20 цигари имат значително по-голям брой такива джобове в сравнение с пушещите до 20 цигари (Mann-Witney test, $p = 0,003$, фигура 60) и в сравнение с непушачи (Mann-Witney test, $p = 0,002$, фигура 61). Установихме статистически значимо по-голямо разпространение на броя пародонтални джобове над 7 мм ($PD > 7$ мм) при пушачи в сравнение с непушачи сред пациентите с пародонтит от 1-ва и 2-ра група (Mann-Witney test, $p = 0,003$, таблица 18, фигура 62). Установихме, че средната дълбочина на сондиране (PD средно) при пушачи е значително по-голяма в сравнение с непушачи сред пациентите с пародонтит от 1-ва и 2-ра група (Mann-Witney test, $p < 0,001$, таблица 18, фигура 63). Установихме, че средната загуба на аташман (CAL) при пушачи е значително по-голяма в сравнение с непушачи сред пациентите с пародонтит от 1-ва и 2-ра група (Mann-Witney test, $p = 0,009$, таблица 18, фигура 64). Установихме и статистически значимо по-голямо разпространение на кървенето при сондиране (BoP) (Mann-Witney test, $p < 0,001$, таблица 18, фигура 65), както и значимо по-голяма честота на засягане на фуркациите (F) от втора и трета степен (Mann-Witney test,

$p = 0,008$, таблица 18, фигура 66) при пушачи в сравнение с непушачи сред пациентите с пародонтит от 1-ва и 2-ра група. Установихме и статистически значима зависимост между фактора тютюнопушене и броя загубени зъби – пушачите имат значително по-голям брой загубени зъби в сравнение с непушачите сред пациентите с пародонтит от 1-ва и 2-ра група (Mann-Witney test, $p = 0,045$, таблица 18, фигура 67).

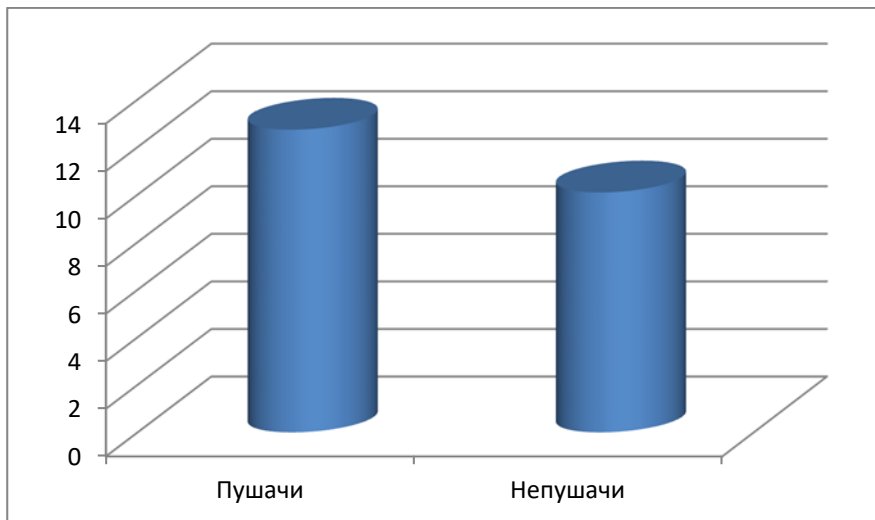
Таблица 18. Клинични показатели на пародонтита според фактора тютюнопушене при пациентите с пародонтит от 1-ва и 2-ра група

Клинични показатели на P	Непушачи		Пушачи		P-стойност/ метод
	Средна стойност	Стандартно отклонение	Средна стойност	Стандартно отклонение	
Брой зъби с PD < 3мм	15,98	±11,448	8,43	±11,175	P < 0,001 Mann-Witney test
Брой зъби с PD > 3 < 5 мм	10,09	±7,917	12,73	±7,614	P = 0,096 Mann-Witney test
Брой зъби с PD > 5 < 7 мм	2,21	±3,631	3,84	±5,260	P = 0,005 Mann-Witney test
Брой зъби с PD > 7 мм	0,26	±0,765	1,32	±3,175	P = 0,086 Mann-Witney test
PD средна стойност	2,96	±1,469	4,22	±1,589	P < 0,001 Mann-Witney test
САL средна стойност	4,84	±1,7618	5,703	±1,3961	P = 0,009 Mann-Witney test
BoP%	65,31%	±37,855	85,82%	±26,016	P < 0,001 Mann-Witney test
F брой засегнати фуркации	0,62	±0,847	1,14	±1,047	P = 0,008 Mann-Witney test
Брой загубени зъби	5,21	±5,354	6,56	±5,207	P = 0,045 Mann-Witney test
PISA	1520,237	±1059,507	1878,358	±758,888	P = 0,113 Mann-Witney test

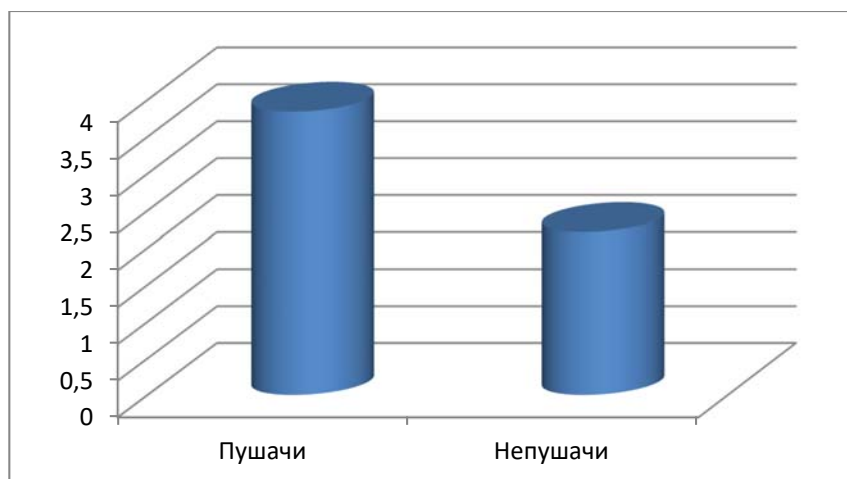
Фигура 57. Среден брой пародонтални единици с $PD < 3$ мм при пациентите от 1-ва и 2-ра група с пародонтит – пушачи и непушачи



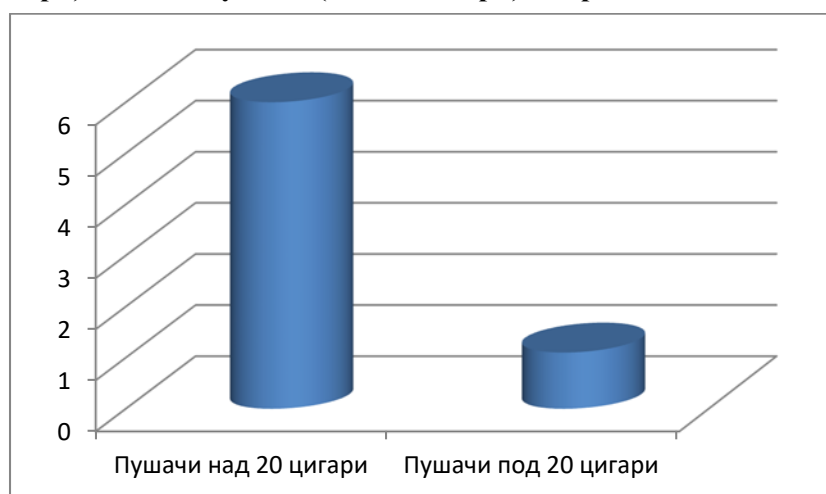
Фигура 58. Среден брой пародонтални единици с $3 \text{ мм} < PD < 5$ мм при пациентите от 1-ва и 2-ра група с пародонтит – пушачи и непушачи



Фигура 59. Среден брой пародонтални единици с $5 \text{ мм} < PD < 7$ мм при пациентите от 1-ва и 2-ра група с пародонтит – пушачи и непушачи



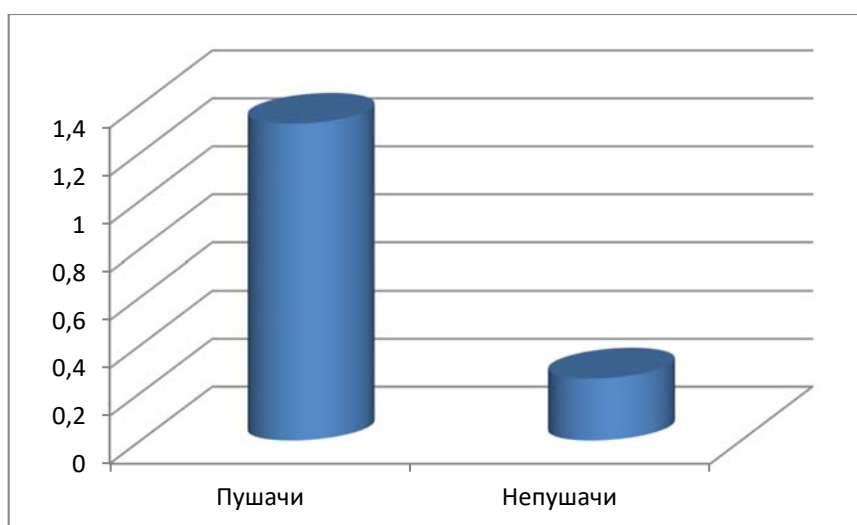
Фигура 60. Среден брой пародонтални единици с $5 \text{ mm} < \text{PD} < 7 \text{ mm}$ при умерени пушачи (над 20 цигари) и тежки пушачи (под 20 цигари) с пародонтит от 1-ва и 2-ра група



Фигура 61. Среден брой пародонтални единици с $5 \text{ mm} < \text{PD} < 7 \text{ mm}$ при тежки пушачи (над 20 цигари) и непушачи с пародонтит от 1-ва и 2-ра група



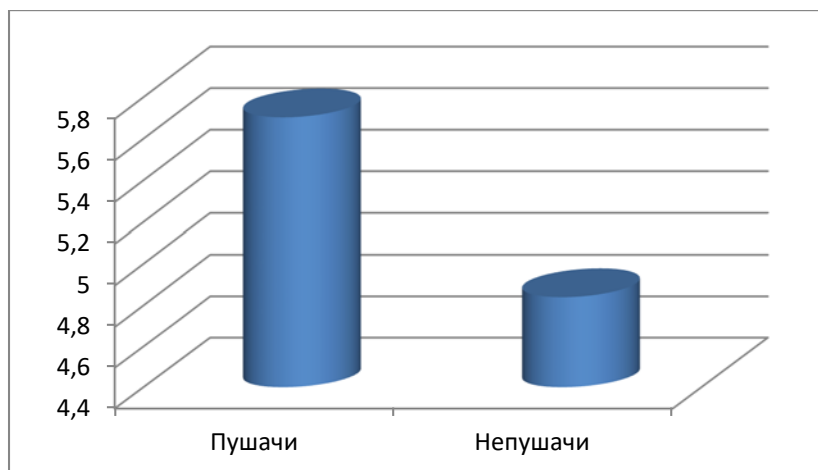
Фигура 62. Среден брой пародонтални единици с $\text{PD} > 7 \text{ mm}$ при пациентите от 1-ва и 2-ра група с пародонтит – пушачи и непушачи



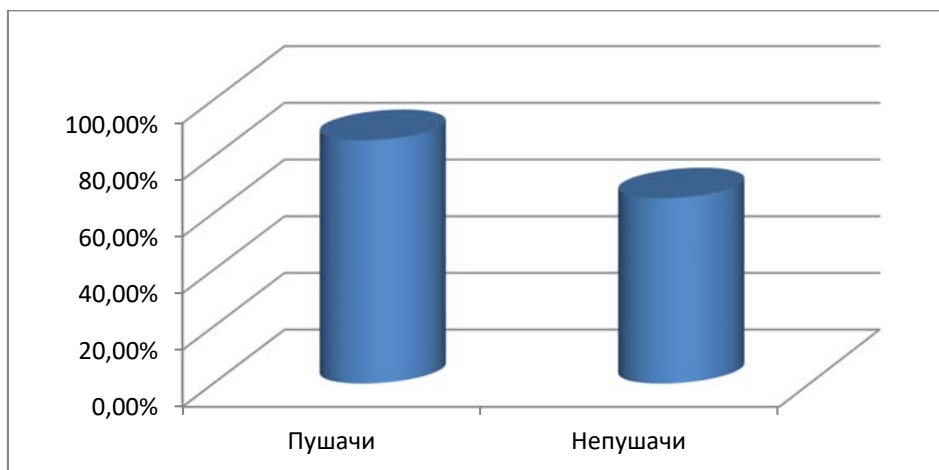
Фигура 63. Средна стойност на PD в мм при пациентите от 1-ва и 2-ра група с пародонтит – пушачи и непушачи



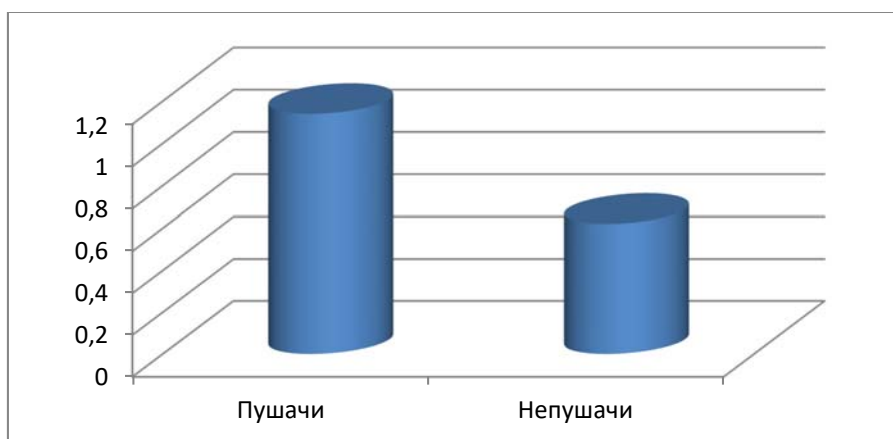
Фигура 64. Средна стойност на CAL в мм при пациентите от 1-ва и 2-ра група с пародонтит – пушачи и непушачи



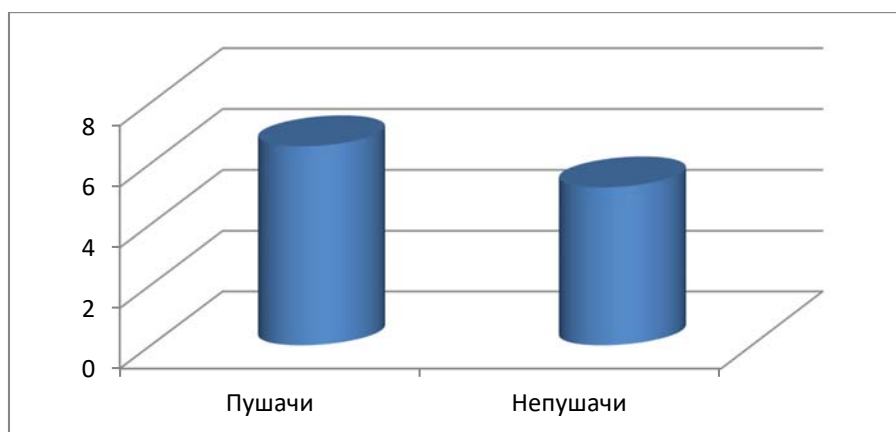
Фигура 65. Средна стойност на разпространението на BoP при пациентите от 1-ва и 2-ра група с пародонтит – пушачи и непушачи



Фигура 66. Брой засегнати фуркации (втора и трета степен) при пациентите от 1-ва и 2-ра група с пародонтит – пушачи и непушачи



Фигура 67. Брой загубени зъби в мм при пациентите от 1-ва и 2-ра група с пародонтит – пушачи и непушачи



Изследвахме влиянието на фактора тютюнопушене върху показателите на ревматоидния артрит – концентрациите на RF и АСРА в серум и показателя DAS 28 при пациентите от 2-ра (П + РА) и 3-та (РА) група (таблица 19). Изследването ни не установи статистически значими зависимости между стойностите на тези показатели при пациентите – пушачи и непушачи, от тези две групи.

Изследвахме влиянието на фактора пол върху клиничните показатели на пародонтита – тежест и разпространение на гингивалното възпаление, дълбочина на пародонталния джоб, загуба на аташман, наличие на рецесии, засегнати фуркации, брой загубени зъби, кървене при сондиране и показателя PISA при пациентите от 1-ва (П + ОА) и 2-ра (П + РА) група.

Таблица 19. Лабораторни показатели на РА при пушачи и непушачи с РА от 2-ра и 3-та група

Показатели на РА	Пушачи		Непушачи		Р-стойност/ метод
	Средна стойност	Стандартно отклонение	Средна стойност	Стандартно отклонение	
Концентрация RF серум IU/ml	81,64	± 94,367	127,12	± 137,507	P = 0,197 Mann-Witney test
Концентрация АСРА серум IU/ml	145,28	± 139,79	190,02	± 206,552	P = 0,566 Mann-Witney test
DAS 28	4,508	± 1,4523	4,426	± 1,7417	P = 0,717 Mann-Witney test

Установихме статистически значими разлики при някои от параметрите на пародонтита по отношение на пола. В сравнение с жените, мъжете имат значително по-голяма средна дълбочина на джоба (Mann-Witney test, $p = 0,003$, фигура 68), по-малко на брой плитки пародонтални джобове ($PD < 3$ мм) (Mann-Witney test, $p = 0,046$, фигура 69), по-голям брой джобове $PD > 7$ мм (Mann-Witney test, $p = 0,046$, фигура 70), по-голям брой джобове с $PD > 5$ мм < 7 мм (Mann-Witney test, $p = 0,030$, фигура 71), по-голяма средна стойност на загубата на аташман (Mann-Witney test, $p = 0,028$, фигура 72), по-често засягане на фуркациите (Mann-Witney test, $p = 0,006$, фигура 73) и тенденция за по-високи стойности на показателя PISA (Mann-Witney test, $p = 0,059$, фигура 74). На таблица 20 са представени обобщаващи характеристики на пародонталните показатели в зависимост от пола на пациентите с пародонтит.

Фигура 68. Средна стойност на PD в мм при мъже и жени с пародонтит от 1-ва и 2-ра група с пародонтит

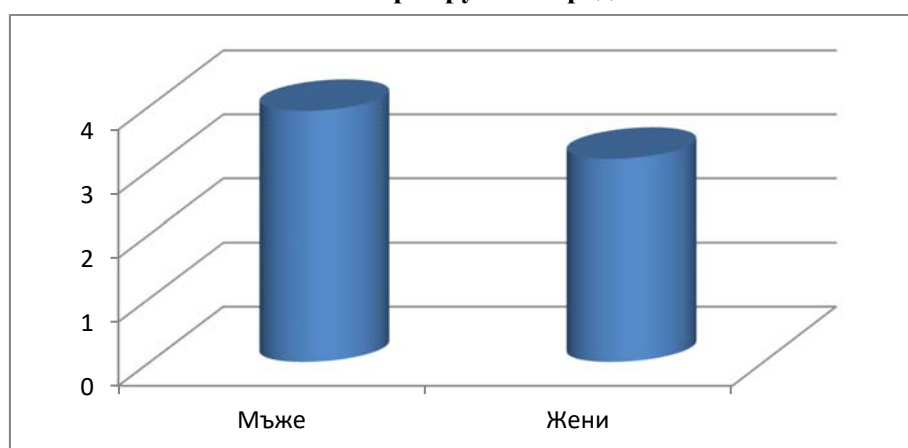
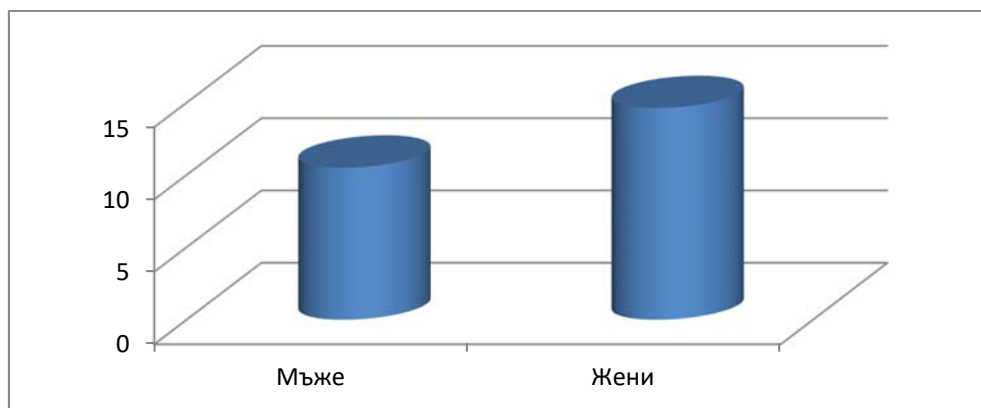


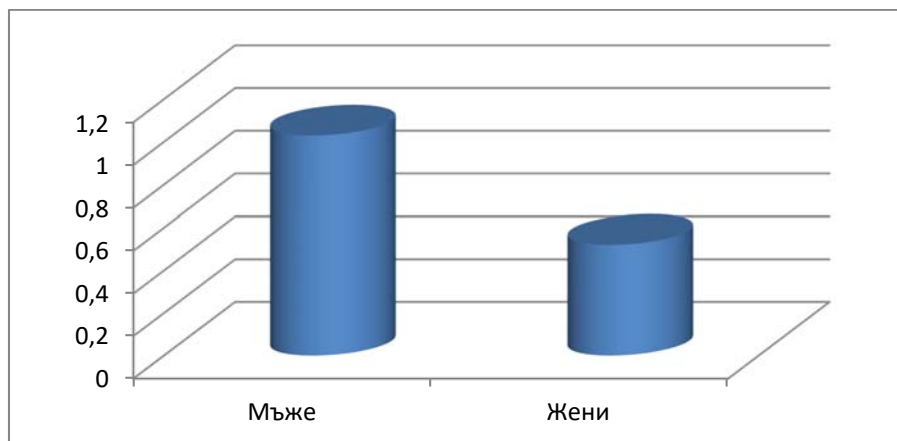
Таблица 20. Клинични показатели на пародонтита според фактора пол при пациентите с пародонтит от 1-ва и 2-ра група

Клинични показатели на Р	Мъже		Жени		Р-стойност/ метод
	Средна стойност	Стандартно отклонение	Средна стойност	Стандартно отклонение	
РВІ средна стойност	1,96	± 0,822	1,79	± 0,814	P = 0,123 Mann-Witney test
РВІ%	88,24%	± 28,50	86,98%	± 28,687	P = 0,741 Mann-Witney test
Среден брой зъби с PD < 3 мм	10,51	± 12,529	14,63	± 11,462	P = 0,046 Mann-Witney test
Среден брой зъби с 3 мм < PD < 5 мм	12,83	± 7,56	10,35	± 7,937	P = 0,124 Mann-Witney test
Среден брой зъби с 5мм < PD < 7 мм	4,11	± 4,837	2,27	± 4,083	P = 0,030 Mann-Witney test
Среден брой зъби с PD > 7 мм	1,03	± 2,332	0,52	± 2,024	P = 0,046 Mann-Witney test
PD средна стойност	3,92	± 1,755	3,17	± 1,517	P = 0,003 Mann-Witney test
CAL средна стойност	5,674	± 1,5416	4,954	± 1,6954	P = 0,028 Mann-Witney test
ВоР%	76,86%	± 34,971	70,21%	± 35,907	P = 0,229 Mann-Witney test
F брой засегнати фуркации	1,20	± 1,023	0,65	± 0,885	P = 0,006 Mann-Witney test
Брой загубени зъби	5,08	± 4,516	5,87	± 5,608	P = 0,595 Mann-Witney test
PISA	1877,584	± 890,699	1562,897	± 895,416	P = 0,059 Mann-Witney test

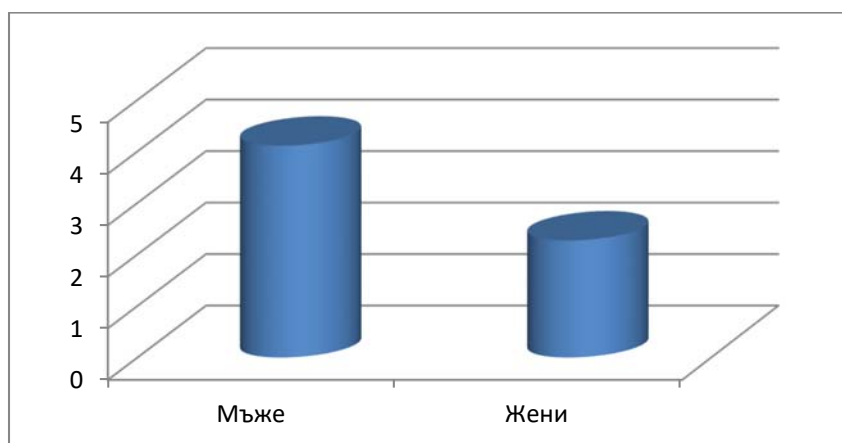
Фигура 69. Среден брой пародонтални единици с джобове PD < 3 мм при мъже и жени с пародонтит от 1-ва и 2-ра група с пародонтит



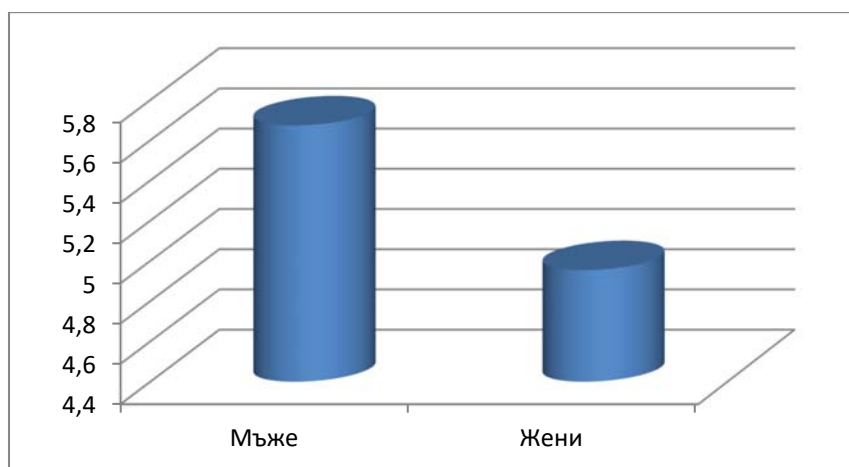
Фигура 70. Средна стойност на броя пародонтални единици с джобове PD > 7 мм при мъже и жени с пародонтит от 1-ва и 2-ра група с пародонтит



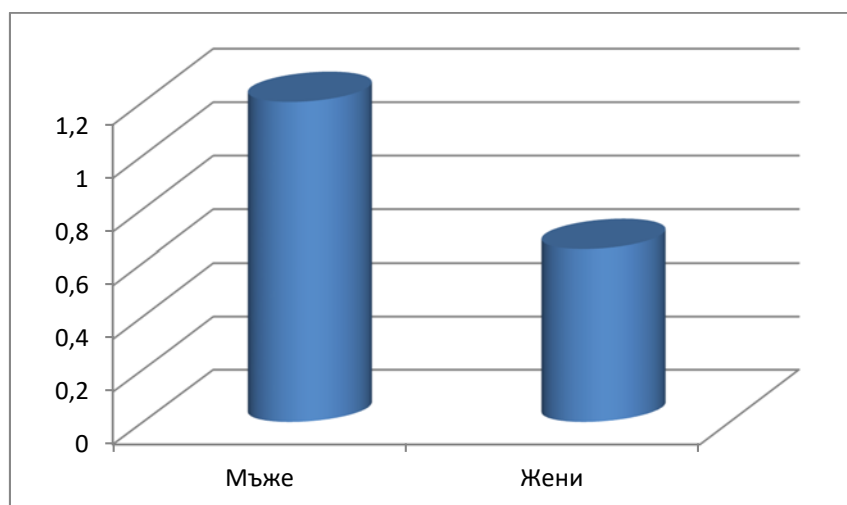
Фигура 71. Средна стойност на броя пародонтални единици с 5 мм < PD < 7 мм при мъже и жени с пародонтит от 1-ва и 2-ра група с пародонтит



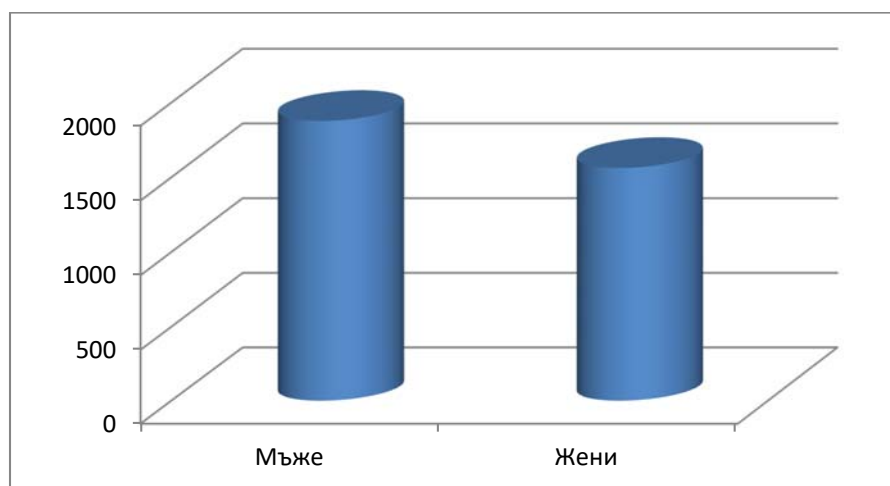
Фигура 72. Средна стойност на CAL в мм при мъже и жени с пародонтит от 1-ва и 2-ра група с пародонтит



Фигура 73. Среден брой засегнати фуркации от втора и трета степен мм при мъже и жени с пародонтит от 1-ва и 2-ра група с пародонтит



Фигура 74. Средна стойност на показателя PISA при мъже и жени с пародонтит от 1-ва и 2-ра група с пародонтит



При пациентите от 2-ра (П + РА) и 3-та (РА) група изследвахме влиянието на фактора пол върху концентрациите на RF и АСРА в серум и показателя DAS 28 (таблица 21).

Не установихме статистически значими разлики в стойностите на изследваните показатели при пациентите (жени и мъже), от 2-ра и 3-та група, но пациентите от 2-ра и 3-та група с РА от женски пол демонстрират по-високи нива на RF и АСРА в серума.

Изследвахме влиянието на фактора *образование* върху показателите на пародонтита при пациентите от 1-ва и 2-ра група. Установихме, че индивидите със средно и под средно образование са с по-големи средна стойност и разпространение на гингивално кървене в сравнение с тези с висше образование, съответно ($p < 0,001$, $r = 0,8$ и $p < 0,001$) (Mann-Witney test). Установихме, че пациентите с висше образование имат статистически значимо по-голям брой плитки пародонтални джобове ($PD < 3$ мм) (Mann-Witney test, $p < 0,001$), по-малка средна дълбочина на сондиране (Mann-Witney test, $p < 0,001$), по-малък процент на разпространение на кървене при сондиране (Mann-Witney test, $p < 0,001$) и по-малък брой загубени зъби (Mann-Witney test, $p < 0,001$) в сравнение с лицата със средно и под средно образование от тези две групи.

Таблица 21. Показатели на РА при мъже и жени с РА от 2-ра и 3-та група

Показатели на РА	Мъже		Жени		Р-стойност/метод
	Средна стойност	Стандартно отклонение	Средна стойност	Стандартно отклонение	
RF серум IU/ml	82,26	± 86,726	116,64	± 131,901	P = 0,174 Mann-Witney test
АСРА серум IU/ml	156,42	± 182,845	176,58	± 184,098	P = 0,411 Mann-Witney test
DAS 28	4,376	± 1,7731	4,438	± 1,5979	P = 0,812 Mann-Witney test

Изследвахме влиянието на фактора *възраст* върху показателите на пародонтита при пациентите от 1-ва и 2-ра група. Установихме, че с увеличаване на възрастта нарастват: средната стойност (Mann-Witney test, $p < 0,001$) и разпространението (Mann-Witney test, $p < 0,001$, $r = 0,336$) на индекса РВІ, както и разпространението на кървенето при сондиране (Mann-Witney test, $p < 0,001$). Установихме права корелация между възрастта на пациентите и средната дълбочина на пародонталните джобове (Mann-Witney test, $p < 0,001$, $r = 0,338$), както и обратна

корелация между възрастта на пациентите и броя на плитките пародонтални джобове ($PD < 3$ мм) (Mann-Witney test, $p < 0,001$). По-възрастните пациенти имат и по-голям брой загубени зъби (Mann-Witney test, $p < 0,001$).

Изследването ни не установи статистически значими зависимости между факторите *възраст* и *образование* и показателите на ревматоидния артрит.

Изводи

1. Установихме корелация между тютюнопушенето и показателите на пародонтита – дълбочина на сондиране, загуба на аташман, засегнати фуркации, загубени зъби, кървене при сондиране и PISA.
2. Определихме тютюнопушенето като рисков фактор за П.
3. Установихме корелация между мъжкия пол и показателите на пародонтита – дълбочина на сондиране, загуба на аташман, засегнати фуркации, загубени зъби и PISA.
4. Определихме мъжкия пол като рисков фактор за П.
5. Установихме корелация между възрастта и показателите на пародонтита – дълбочина на сондиране, загубени зъби, кървене при сондиране и РВІ.
6. Определихме възрастта като рисков фактор за П.
7. Установихме корелация между по-ниската степен на образование и показателите на пародонтита – дълбочина на сондиране, загубени зъби, кървене при сондиране и РВІ.
8. Определихме по-ниската степен на образование като рисков фактор за П.
9. Установихме тенденция за корелация между тютюнопушенето и показателите на РА – АСРА и RF в серум.
10. Установихме тенденция за корелация между женския пол и показателите на РА – АСРА и RF в серум.
11. Нашите резултати не са категорични относно определянето на тези фактори като рискови в патогенезата на РА, вероятно поради малкия брой изследвани пациенти.

VIII. ОБСЪЖДАНЕ

Обсъждане на резултатите по задача 1 – Съпоставяне на наличието и тежестта на РА с наличието и тежестта на П

Установените от нас значително по-голяма средна дълбочина на сондиране, по-голямо разпространение на кървенето при сондиране, повече загубени зъби и по-високи стойности на показателя PISA, както и тенденцията за по-често и по-тежко засягане на фуркациите и по-голяма средна загуба на аташман при пациентите от 2-ра група с П и РА в сравнение с пациентите от 1-ва група с П и без РА, подкрепят тезата за влияние на РА върху изявата на пародонталното заболяване. Показателите PISA и кървене при сондиране свързваме в най-голяма степен с активността на пародонтита, а дълбочината на джобовете, загубата на аташман, фуркационните увреждания и загубените зъби отразяват тежестта на пародонталното заболяване. Резултатите ни съответстват на епидемиологичните данни за по-голяма тежест и активност на пародонталното заболяване при пациенти с РА в сравнение с такива само с П (26, 183, 316). Според Mercado et al., 2001 (239), пациенти с активен РА демонстрират значително по-голяма честота на разпространение на П, както и по-голяма тежест на П, оценена с по-дълбоки пародонтални джобове и по-голяма загуба на кост, в сравнение с тези само с П. Kaber et al., 1997 (163), установяват, че пациентите с РА и П са с по-голяма загуба на аташман и по-голямо разпространение на кървенето при сондиране и гингивалното кървене в сравнение с тези без РА. Gleissner et al., 1998 (120), установяват подобни резултати, свързани с по-голяма тежест и активност на пародонтита и с повече загубени зъби при наличие на РА. Нашите резултати подкрепят цитираните данни.

Повишената честота на разпространение на пародонталните заболявания и по-голямата им тежест сред болните от РА е свързана със сходни и за двете заболявания характеристики на инфламаторния отговор на организма. Вероятният механизъм на това влияние е взаимното потенциране на възпалително-деструктивния отговор при двете заболявания, факт, широко обсъждан в литературата (26). При пародонтита, както и при ревматоидния артрит, възпалението се провокира от ан-

тигенна стимулация (пептиди за РА и микроорганизми, бактериална ДНК и липополизахариди за П) и последваща каскада на възпалението, освобождаваща проинфламаторни медиатори, взаимодействащи си с клетките на организма. Това стимулира синтез на колагенази и локална деструкция от резидентни клетки (синовиални клетки при РА и кератиноцити, фибробласти и остеобласти при пародонтита) и клетки на възпалението. Joseph et al., 2013 (159), установяват, че при пациентите с П и при пациентите с РА се наблюдават персистиращо високи нива на проинфламаторни цитокини като IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-1 α и TNF- α , ниски нива на IL-10 и TGF- β , високи нива на MMP и ниски нива на тъканните инхибитори на MMP, свързани с по-голяма тъканна деструкция. Kobayashi et al. (183), установяват, че активността на РА корелира със серумните нива на IL-6, TNF- α и CRP, а високите нива на цитокини могат да влияят на ВoP при пациенти с пародонтит и умерена до висока активност на РА. За РА, както и за П, прогресията на заболяването е свързана с високи нива в тъканите на IL-1 и TNF- α (316). IL-1 и TNF- α са в основата на предизвикване на продукцията на колагенази и други неутрални протеази от много клетки, като MMP, синтезирани от полиморфнонуклеарни левкоцити, макрофаги, фибробласти (316), както и в медирането на костната резорбция (24). RANKL (рецептор активатор на нуклеарен фактор-капа- β лиганд) и OPG (остеопротегрин) са цитокини от семейството на TNF и заедно с RANK оформят важна система за регулация на остеокластите – RANKL има активиращо остеокластите действие, докато OPG се свързва с RANKL и инхибира активацията на остеокласти (198, 328). Установени са повишени нива на RANKL и по-ниски нива на OPG при лица с пародонтит в сравнение със здрави индивиди и асоциация с IL-1 β , IL-6, TNF- α и PGE2 (198). Подобно синергично действие на IL-1, IL-6, TNF- α и RANKL при болни от ревматоиден артрит също е установено и е асоциирано с продължителен инфламаторен отговор и ерозивни костни лезии (328). Повишените количества на проинфламаторни цитокини и матриксни металопротеинази, ниските нива на тъканните инхибитори на MMP и по-големите количества на IL-1 β , IL-6, TNF- α и PGE2 в системната циркулация при болни от ревматоиден артрит могат да допринесат за по-голяма пародонтална деструкция при налично пародонтално заболяване или да допринесат за изявата му при генетична предиспозиция.

В нашето изследване установихме статистически значима зависимост между количеството ревматоиден фактор в серум и броя загубени зъби в групата пациенти с ревматоиден артрит и пародонтит. Загубата на зъби е критерий за тежест, както и рисков фактор за прогресия на пародонтита. Имуновъзпалителният отговор на организма към бактериалната микрофлора с продукция на проинфламаторни медиатори и ензими е механизъм, по който се предизвиква деструкция на пародонталните структури, която може да доведе до загуба на зъби. В този смисъл броят загубени зъби отразява тежестта на пародонталното заболяване. По-високите нива на ревматоиден фактор в серума на пациенти с по-тежък пародонтит може да свържем с евентуално действие на някои пародонтопатогени от субгингивална плака или техни антигени, които, попадайки в системната циркулация, могат да се свържат с молекулата на IgG, да променят структурата на Fc фрагмента и да индуцират продукция на ревматоиден фактор (112). В литературата са докладвани редица проучвания за връзка между титъра на ревматоидния фактор в серум и пародонталното лечение (97, 311, 362). Редуцирането на бактериалния товар след лечение на пародонтита води до редуциране и на количеството на ревматоиден фактор в серума. Някои изследвания показват и обратна връзка – контролирането на ревматоидния артрит с намалени стойности на ревматоидния фактор подобрява клиничните резултати от пародонталното лечение (311). Kaur et al. (166) съобщават за по-голяма честота на случаи с пародонтит при пациенти с ревматоиден артрит, както и за положителна връзка между тежестта на двете заболявания, но установяват повишени количества само на С-реактивен протеин и ускорено утаяване на еритроцитите без значима зависимост по отношение на ревматоидния фактор.

В нашето изследване установихме статистически значима положителна корелация между АСРА в серум и един от показателите за тежест на пародонтита – брой загубени зъби, при пациентите с П и РА. Въпреки че няма статистическа значимост, пациентите с РА и П демонстрират по-високи средни стойности на АСРА в серума в сравнение с пациентите само с РА.

Ние считаме, че повишената концентрация на АСРА в серума на пациенти с РА и П в сравнение с пациентите само с РА е свързана с увеличената локална продукция на цитрулинирани протеини в резултат на пародонтално възпаление, което би

довело до потенциране на автоантитяло отговора при предразположени индивиди, каквито са пациентите с РА. Антителата срещу цитрулинирани протеини са високоспецифични за ревматоидния артрит и са с прогностична значимост за хода на заболяването. При АСРА-позитивните пациенти ревматоидният артрит протича по-тежко, с по-голяма активност и има по-лоша прогноза (165). Продължителната и сложна деградация (включително цитрулинация) (215, 226, 268, 332) на фибрин и виментин, предизвикана от пептидил-аргинин деиминаза (ПАД), стимулирани от действието и на пародонтопатогени, допринася за появата на нови епитопи за имунокомпетентните клетки в синовиума (95, 323). Фибриновите екстрацелуларни остатъци са в голямо количество във фиброзната тъкан в пародонталната лезия (337) и има докладвана негативна корелация между количеството интактен фибрин в гингивалната тъкан и клиничните маркери на пародонтално възпаление (363). Концентрацията на разградните продукти на фибрина в гингивалната тъкан при пародонтално заболяване е съизмерима с тази в синовиална течност при ревматоиден артрит (363). Друг протеин, който се подлага на цитрулинация, е виментинът. Той е основен протеин на интермедиерните филаменти в съединителната тъкан на гингива и периодонтален лигамент. Установено е, че пародонталното възпаление е свързано с наличие на цитрулиниран виментин (93, 323), а Nesse et al., 2012 (263), установяват наличие на цитрулинирани протеини в над 80% от пациентите с П и при под 33% от пациентите без пародонтит, като подчертават, че при някои от пациентите без пародонтит се установява гингивално възпаление без загуба на аташман. От друга страна, Harvey et al., 2012 (136), установяват повишена концентрация на ПАД-2 и ПАД-4 при пациенти с пародонтално възпаление в сравнение с такива без пародонтит, като тежестта на пародонтита е свързана с по-високи нива на тези ензими. Основният източник на пептидил-аргинин деиминази са активираните неутрофили и моноцити/макрофаги при инфламаторния отговор. Вероятно активираните клетки на възпалението са в основата на цитрулинирането на протеини в тъканите на пародонта и активирането на локалното и общото антитяло-образуване, което свързваме с по-високите средни стойности на АСРА в серум.

Обсъждане на резултатите по задача 2 – Определяне на присъствието и количеството на ревматоиден фактор и антитела срещу цитрулинирани протеини в гингивална кревикуларна течност при пациенти с П, с РА и с двете заболявания заедно и изследване на връзката им с наличието и изявата на РА и П

В литературата има малко данни за нивата на ревматоидния фактор (RF) в гингивална кревикуларна течност при пациенти с ревматоиден артрит и пародонтит. Ние установихме наличие на RF в гингивална кревикуларна течност при всички групи изследвани пациенти. Установихме статистически значимо по-голяма честота на RF-положителни пациенти в гингивална кревикуларна течност при пациенти с РА и П спрямо пациентите с П и без РА, както и тенденция за по-голяма честота на RF-положителни пациенти в гингивална кревикуларна течност при пациенти с РА и П спрямо пациентите само с РА и без П. Смятаме, че установеното от нас наличие на RF в гингивална кревикуларна течност при пациентите с П и по-голямата честота на RF-положителни пациенти в гингивална кревикуларна течност при пациенти с РА и П спрямо пациентите само с РА и без П е свързано с възможен синтез на RF в тъканите на пародонта и е в подкрепа на съществуващите данни в литературата за локална продукция на ревматоиден фактор при индивиди с пародонтални заболявания (49, 71, 96, 101, 186, 238). Ревматоидният фактор е един от диагностичните критерии за ревматоиден артрит, а количеството му в серума е показател за тежестта на заболяването (26). Наличие на ревматоиден фактор е било установено във възпалени гингивални тъкани, гингивална кревикуларна течност, слюнка и серум на пациенти с пародонтит и без ревматично заболяване (186). Възможен механизъм за продукция на RF във възпалени гингивални тъкани е хроничната антигенна стимулация на пародонтопатогени и техните липополизахариди от субгингивалната плака. В-клетките и плазмените клетки обилно присъстват в клетъчния инфилтрат във възпалената гингива. Сред В-клетките има и CD5+В-клетки, за които е известно, че експресират естествени антитела като IgM-RF (356). Izui et al. (154) съобщават за продукция на IgM-RF в отговор на ендотоксини на грам-негативните пръчковидни бактерии, а Tanner и Slots (346, 364) демонстрираха преобладаване именно на грам-негативни

анаеробни пръчковидни бактерии при по-тежки пародонтити. Бактериалните липополизахариди могат да индуцират поликлонална В-клетъчна активация с последваща продукция на антитела. Тези антитела се свързват с бактериалните липополизахариди и формират антиген-антитяло комплекси. Формирането на такива комплекси води до промяна в терциерната структура на антитяло-молекулата (промяна в Fc фрагмента на IgG) и откриване на нови антигенни детерминанти. Тези антигенни детерминанти са причина за производство на автоантитела – ревматоиден фактор. Възможно е и продукцията на ревматоиден фактор да бъде директно индуцирана от специфичен структурен регион на липополизахаридната молекула, наречен Липид А (71). При пародонталните заболявания свързването на имунните комплекси с ревматоидния фактор се случва в средата на гингивалната кревикуларна течност или в гингивалната съединителна тъкан. Това може да доведе до активиране на системата на комплемента, привличайки на място неутрофили и макрофаги. Заради процеса на продължителна антигенна стимулация от бактериалната плака се наблюдава и продължителна пролиферация на лимфоцити и плазмени клетки. Това е причината за поддържане във времето на повишени количества ревматоиден фактор в гингивална кревикуларна течност.

Установеното от нас наличие на RF в гингивална кревикуларна течност при пациенти само с РА, както и значимо по-голямата честота на RF-положителни пациенти с РА и П в сравнение с тези само с П и без РА предполагат друг, различен от локалната продукция във възпалени гингивални тъкани механизъм на присъствие на RF в гингивалната кревикуларна течност. Смятаме, че е възможно дифундиране на молекулата на RF от кръвната циркулация, през ендотела на периферните кръвоносни съдове на гингивата към гингивалната кревикуларна течност при пациенти, които са с изявени РА и П. В подкрепа на тази хипотеза е и фактът, че установихме силна положителна корелация между концентрациите на RF в серума и гингивалната кревикуларна течност при пациентите от 3-та група само с РА, както и тенденция по-високите нива на RF в серума на пациентите от 2-ра група с П и РА да корелират с по-високи нива на RF в гингивалната кревикуларна течност. Тези резултати са подобни на резултатите на други автори (96, 101), ко-

ито установяват повишени нива на IgA-RF и IgM-RF в слюнка и гингивална кревикуларна течност при изследване на болни от ревматоиден артрит в сравнение със здрави лица и предполагат пасивен трансфер на ревматоиден фактор от серум към слюнка и гингивална кревикуларна течност.

Установихме присъствие на АСРА в гингивална кревикуларна течност на всички участващи пациенти. Установихме значимо по-голяма честота на индивиди, положителни по отношение на АСРА в гингивална кревикуларна течност, при пациенти от 2-ра група (с П и РА) в сравнение с пациенти от 1-ва група (с П и без РА), което вероятно е във връзка с транспорт на АСРА от серум в GCF при пациентите с РА.

Нашите резултати показват тенденция за по-голяма честота на АСРА – положителни пациенти в гингивална кревикуларна течност от 2-ра група група (с П и РА) в сравнение с тези от 3-та група (РА и без П). Тези резултати свързваме с възможността за продукция на цитрулинирани протеини и антитела срещу тях (АСРА) в пародонталните тъкани под действие на бактериалната инфекция при пародонтит.

Установеното от нас наличие на АСРА в гингивална кревикуларна течност при пациенти с П свързваме с възможната роля на пародонтопатогени от субгингивална плака в продукцията на АСРА. Нашите резултати са в съответствие с други проучвания показващи както наличие на антитела срещу цитрулинирани протеини в гингивална кревикуларна течност (26, 230, 302, 349, 396), така и присъствие на цитрулинирани протеини в гингивалните тъкани и гингивална кревикуларна течност при пациенти с пародонтит (127, 221). Чрез маспектрометричен анализ Schwenzer et al. (331) идентифицират такива протеини, както и антителата срещу тях в гингивална кревикуларна течност. Цитрулиниране на протеини и образуване на антитела срещу тях се случва в пародонталните тъкани при пациенти с пародонтални заболявания и под действие на евентуално присъстващи пародонтопатогени. Установена е и корелация между антителата срещу цитрулинирани цитокератин-13 и тенаascin-С и антитела срещу *P. intermedia*, както и между антителата срещу цитрулинирани α -енолаза и тенаascin-С и антитела срещу *P.*

gingivalis при пациенти с ревматоиден артрит и пародонтит и такива само с ревматоиден артрит. Тези антитела срещу цитрулинирани протеини биха могли да дадат начало или да утежнят РА. За *P. gingivalis* има доказателства, че е способен да цитрулинира протеини. Той отделя собствени пептидил-аргинин деиминази (ППАД), които могат да конвертират както пептидил-аргинин, така и свободен L-аргинин и да цитрулинират протеини (221). Изследванията на *P. intermedia* предполагат друг механизъм на връзка с процесите на цитрулинация и продукция на антитела срещу цитрулинирани протеини, който се свързва със стимулация на човешките пептидил-аргинин деиминази. За ендогенните ПАД се знае, че се произвеждат основно от неутрофили, активирани от възпалителен процес. *P. intermedia* притежава способността да разгражда структури по повърхността на неутрофилите (Neutrophil extracellular traps, NETs), съдържащи антибактериални субстанции, включително и пептидил-аргинин. NETs освобождават ПАД и по този начин стават източник на цитрулинирани пептиди (94, 169, 352). Konig et al. (184) идентифицират *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* като патоген, способен да индуцира вътреклетъчна цитрулинация при неутрофилите посредством своя левкотоксин А. Авторите откриват, че 44 цитрулинирани пептида, отделени при левкотоксин-индуцираната апоптоза на неутрофилите, са идентични с предварително идентифицираните 86 цитрулинирани протеина в синовиална течност при болни от ревматоиден артрит.

В нашето проучване ние установихме присъствие на АСРА в гингивална кревикуларна течност на всички участващи пациенти, като получихме статистически значима зависимост по отношение на концентрацията им при пациенти с ревматоиден артрит и пародонтит спрямо тези без ревматоиден артрит, но с пародонтит. Не установихме статистически значима разлика в концентрациите на АСРА в гингивална кревикуларна течност между пациентите с РА и П и тези само с РА. Тези резултати свързваме с възможността за дифундиране на серумни АСРА от кръвната циркулация, през ендотела на периферните кръвоносни съдове на гингивата към гингивалната кревикуларна течност при пациенти, които са с изявено ревматично заболяване (331).

Обсъждане на резултатите по задача 3 – Определяне на присъствието и количеството на антитела срещу цитрулинирани протеини (АСРА) в слюнка при пациенти с П, с РА и с двете заболявания заедно и изследване на връзката им с наличието и изявата на РА и П

В нашето изследване ние установихме статистически значимо по-високи нива на АСРА в слюнката на пациентите с пародонтит и без ревматоиден артрит спрямо здравите индивиди, както и значително по-висока концентрация на АСРА в слюнка при пациентите с П и РА в сравнение със здравите контроли. Установихме и че групата пациенти само с пародонтит не се различава статистически значимо от групата пациенти с пародонтит и ревматоиден артрит по отношение на концентрацията на АСРА в слюнка. Резултатите ни показват, че пародонталното заболяване би могло да е източник на цитрулинирани протеини и при пациенти с пародонтит се откриват антитела срещу цитрулинирани протеини в значително по-високи нива в сравнение със здравите индивиди, без пародонтит. Ние установихме статистически значими положителни зависимости между концентрацията на АСРА в слюнка и средната дълбочина на пародонталния джоб (PD средно), кървенето при сондиране (BoP), повърхностното гингивално възпаление (РВІ), както и тенденция повишеното количество на АСРА в слюнка да е свързано с по-голям брой пародонтални джобове над 7 мм и по-често и по-тежко засягане на фуркациите. Дълбочината на пародонталните джобове и фуркационните лезии са показатели за тежест на пародонтита, а кървенето при сондиране се свързва с неговата активност. Резултатите ни показват, че по-голямата тежест и активност на П корелират с по-висока концентрация на АСРА в слюнката. Това е в съответствие с публикуваните досега данни за ролята на пародонталното възпаление като източник на цитрулинирани протеини и антитела срещу тях, което може да се свърже с отчетените увеличени концентрации на АСРА в слюнка при по-високи показатели на П. Увеличената концентрация на АСРА в слюнка е в подкрепа на хипотезата за евентуалната роля на пародонтита като извънставен източник на цитрулинирани протеини и антитела срещу тях. Локалната продукция на АСРА във възпалените пародонтални тъкани би могла да доведе до нарушаване на имунната толерантност към цитрулинирани пептиди и при предразположени индивиди да допринесе за изява на РА при съществуващо ревматично заболяване да утежни хода му.

Антителата срещу цитрулинирани протеини са високоспецифични за ревматоидния артрит и са с прогностична значимост за хода на заболяването. При АСРА-позитивните пациенти ревматоидният артрит протича по-тежко, с по-голяма активност и има по-лоша прогноза (165). От друга страна, са установени наличие на АСРА в слюнка при пациенти с пародонтит и положителна зависимост между концентрацията им и тежестта на пародонталното заболяване (136). През 2012 г. Harvey et al. (136) установява наличие цитрулинирани протеини и антитела срещу тях в пародонталните тъкани и зависимост между тежестта на гингивалното възпаление и процеса на цитрулинация, като с увеличаване на тежестта на възпалението се повишава концентрацията им. Установяват подобна зависимост и по отношение на наличието и количеството на антитела срещу цитрулинирани протеини в слюнка и предполагат, че тези АСРА не индуцират задължително аутоимунно заболяване, а са част от имунния отговор в резултат на пародонталното заболяване. Продуцирани са от CD5+В-клетките, които се намират във възпалените пародонтални тъкани и имат полиреактивност и нисък афинитет. Възпалените пародонтални тъкани са възможен източник на цитрулинирани протеини и индуктор на производство на антитела срещу тях, като механизмът на действие е свързан най-вероятно с активността на някои пародонтотпатогени (*P. gingivalis*, *P. intermedia*) в процесите на цитрулинация и последващо активиране на АСРА-продуциращите клетки (CD5+В-клетки) (51, 136, 263, 316). Nesse et al., 2012 г. (263), също установяват цитрулинирани протеини в пародонтални тъкани и откриват зависимост между количеството им и тежестта на пародонталното възпаление. Въпреки че в своето проучване авторите не търсят наличие и количество на АСРА в пародонталните тъкани, те установяват зависимост между наличието на цитрулинирани протеини и количеството на CD5+В-клетките. *P. gingivalis* е пародонтотпатоген, способен да цитрулинира протеини чрез собствен ензим – пептидил-аргинин деиминаза (ППАД). *P. gingivalis* е асоцииран с тежестта и активността на пародонталното заболяване. Цитрулинираните от *P. gingivalis* протеини могат да предизвикат производство на антитела срещу тях, а цитрулинираната α -енолаза, смятана за основен аутоантиген за РА, демонстрира структурна хомоложност с цитрулинираната от *P. gingivalis* α -енолаза (210, 396). *P. intermedia*

е способен да стимулира активността на човешките пептидил-аргинин деиминази чрез индукция на локален възпалителен отговор. Активираните неутрофили са предполагаем източник на цитрулинирани антигени, а нуклеазите на *P. intermedia* притежават способността да разгражда структури по повърхността на неутрофилите, съдържащи антибактериални субстанции, включително и пептидил-аргинин деиминази. Разрушените, в резултат на активността на *P. intermedia* NETs освобождават ПАД и по този начин стават източник на цитрулинирани пептиди (331). Установено е наличие на пептидил-аргинин деиминаза 2 (ПАД-2) и пептидил-аргинин деиминаза 4 (ПАД-4) в гингивална тъкан и повишените им количества при увеличаване на тежестта на гингивалното възпаление. Тези ензими са асоциирани с ревматоидния артрит и са единствените два от семейството на човешките пептидил-аргинин деиминази, участващи в патогенезата на това заболяване (109).

Ние установихме присъствие на АСРА в слюнката на всички участници в изследването, като количеството им беше значително по-голямо при пациентите с РА от 3-та група в сравнение с пациентите с пародонтит от 1-ва група, пациентите с РА и П от 2-ра група и здравите индивиди от 4-та група. Възможно обяснение за тези резултати е локалната продукция на АСРА в слюнчените жлези. Според Svard et al. (359) доминиращите имуноглобулини в слюнката са IgA, секретирани локално от слюнчените жлези и IgG, транспортирани от серума. Авторите установяват АСРА в слюнка при 50% от пациентите АСРА-позитивни в серума, срещу 28% от АСРА-негативните и при 92% от пациентите, RF-позитивни в серума, срещу 73% от RF-негативните, като отхвърлят възможността за транспорт на АСРА в слюнка от системната циркулация, тъй като нивата на слюнчените антитела срещу цитрулинираните протеини не се различават статистически значимо при АСРА-позитивните и АСРА-негативните пациенти и допускат, че наличието на тези антитела се дължи на локалната им продукция.

Установихме, че пациентите с пародонтит имат значително по-високи концентрации на АСРА в слюнка в сравнение със здравите индивиди и концентрацията на АСРА в слюнка корелира с тежестта и активността на пародонталното заболяване. Установихме и значително по-високи концентрации на АСРА в слюнка при пациентите с ревматоиден артрит и тези концентрации силно корелират със серумните

нива на АСРА. Като потвърждение на тези резултати интерес представлява един експеримент на Sakaguchi et al., 2019 (319), в който на мишки се индуцира ревматоиден артрит чрез инжектиране на говежди колаген тип II, но част от тях допълнително са инжектирани с *P. gingivalis*. Известно е, че цитрулинацията е процес, осъществяващ се чрез пептидил-аргинин деиминази (ПАД). Резултатите на Sakaguchi et al., 2019 (319), показват, че *P. gingivalis* инфекцията екзацерира клиничните симптоми при РА и допринася за възпалението. Авторите определят количеството АСРА в слюнка и серум и изолират и анализират цитрулинирани протеини 55 kDa. Резултатите им показват значително по-високи нива на АСРА в серума на мишките с РА и *P. gingivalis* в сравнение с мишките само с РА, както и тенденция за по-високи нива на АСРА в слюнка при *P. gingivalis*-позитивните мишки с РА спрямо *P. gingivalis*-негативните с РА. Установяват и значима корелация между количествата АСРА в серум и слюнка при мишките с РА и *P. gingivalis*. Идентифицирани са цитрулинирани протеини в серума и слюнката на мишките с РА и *P. gingivalis*, както и при тези само с РА.

Наличието на АСРА в слюнката може да се обясни и чрез преминаването му от серума. Ние смятаме, че това е по-вероятното обяснение на наличието на АСРА в слюнка при пациенти с ревматоиден артрит, защото установихме силна положителна корелация между концентрациите на АСРА в слюнка и серум не само при всички пациенти с РА, но и във всяка от групите (2-ра група с РА и П; 3-та група само РА) поотделно. И според Sakaguchi et al., 2019 (319), наличието на АСРА в слюнка се дължи на транспорт от серума, тъй като в проведеното от тях проучване установяват концентрация на АСРА в слюнка 1/1000 спрямо концентрацията на тези антитела в серума на групите РА и РА/*P. gingivalis*. Авторите твърдят, че откритите от тях цитрулинирани пептиди в групите на мишки с РА и с РА/*P. gingivalis* отсъстват в контролните групи без РА. Цитрулинираните протеини са образувани в серума, преди да има антитела срещу тях, и са транспортирани в слюнката. Подобни резултати са представени в една публикация на Sathasivasubramanian et al., 2015 (301), за изследване на нивата на слюнчените АСРА и корелацията им със серумните антитела срещу цитрулинирани протеини при пациенти с РА и здрави индивиди. Авторите установяват силна зависимост

между нивата на серумните и слюнчените АСРА при болните от ревматоиден артрит, както и статистически значимо по-високи нива на АСРА в слюнка при пациенти с РА в сравнение със здравите контроли. Ние установихме положителна зависимост и между концентрацията на АСРА в слюнка и активността на РА, оценена чрез показателя DAS 28 CRP. Резултатите ни кореспондират с публикации, изследващи антитела срещу цитрулинирани протеини в слюнка на пациенти с поставена диагноза РА и свързващи слюнчените АСРА с активността на заболяването (75, 165). Установено е, че по-високите нива на слюнчени АСРА съответстват на по-високи стойности на скорост на утаяване на еритроцитите (СУЕ) и на С-реактивен протеин (CRP). Ние установихме силна положителна корелация между концентрациите на АСРА в слюнка и RF в серум не само при всички пациенти с РА, но и във всяка от групите пациенти с РА (2-ра група с РА и П; 3-та група само РА) поотделно. Нашите резултати са в унисон с установената от други автори корелация на серумните нива на АСРА и RF с тежестта на РА (75). Наличието и на двата типа антитела се свързва с по-тежка ставна деструкция и костна ерозия; има положителна зависимост между концентрациите им при по-тежките изяви на ревматичното заболяване и заедно и поотделно концентрациите им корелират с острофазовите показатели (СУЕ и CRP) (75).

Получените резултати за по-висока концентрация на АСРА в слюнка при пациенти с РА и корелацията между серумните и слюнчените нива на АСРА дават основание да се обсъди слюнката като възможен флуид за диагностика и мониториране на ревматоидния артрит. АСРА е с висока специфичност за РА, такива антитела срещу цитрулинирани протеини могат да бъдат открити във високи концентрации преди клиничната изява на ревматичното заболяване и тогава установяването им в слюнката би имало предиктивно значение и би определило такива индивиди във висок риск от развитие на РА. Наличието им във високи концентрации в слюнка при наличен РА може да бъде определено като маркер за РА с диагностично значение за тежестта на заболяването и мониториране на лечението.

В резултатите по задача 2 обсъдихме установеното от нас наличие на АСРА в гингивалната кревикуларна течност и тенденция за по-голяма честота на АСРА – положителни индивиди сред пациентите с П и РА в сравнение с пациентите само

с РА. Тези наши резултати обясняваме с евентуалната локална продукция на АСРА при възпалително-деструктивно заболяване на пародонта. Като част от състава на слюнката, гингивалната кревикуларна течност може да допринесе за присъствието на АСРА, тъй като локално произведените АСРА в пародонталните тъкани най-вероятно първо попадат в гингивалната кревикуларна течност и от там – в слюнката.

Обсъждане на резултатите по задача 4 – Идентифициране чрез PCR на пародонтопатогените: *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. denticola*, в субгингивална плака във връзка със заболяванията ревматоиден артрит и пародонтит

Ние изследвахме пародонтопатогените *P. gingivalis*, *P. intermedia* и *T. denticola*, тъй като през последните години, на фона на все по-големия обем епидемиологични доказателства за връзка между пародонтита и ревматоидния артрит, вниманието е фокусирано върху възможната им роля в патогенезата на РА. Установихме значимо по-голяма честота на положителни за *T. denticola* в субгингивална плака на пациенти от 2-ра група с П и РА спрямо тези от 1-ва група само с П. Налице е тенденция за по-голяма честота на положителни за *T. denticola* пациенти от 3-та група само с РА, спрямо пациентите само с П от 1-ва група. Вероятно малкият брой изследвани пациенти е причина за липсата на статистически значими резултати. Други автори свързват присъствието на *T. denticola*, *P. gingivalis* и *P. intermedia* с по-голяма честота на разпространение на РА сред пациентите с пародонтит, както и с по-високи концентрации на биохимичните показатели АСРА и RF в серума на пациенти с П и РА (224, 250, 273, 294, 316, 396).

Обсъжда се евентуалната роля на *T. denticola* в развитието на РА, след като са идентифицирани лизин и аргинин секвенции в Fc-региона на IgG молекулата (46). Способността на *T. denticola* да разгражда лизин и аргинин чрез аргинин- и лизин-специфичните си протеази е възможно обяснение за ролята на този микроорганизъм в "осигуряването" на таргетни за имунната система автоантигенни IgG молекули. Аргинин-специфичните протеази на *T. denticola* могат да допринесат и за

процесите на цитрулинация, генерирайки свободни аргининови епитопи за действието на цитрулиниращите ензими (273).

Ние установихме значими зависимости между някои показатели на пародонтита (дълбочина на пародонталните джобове, загуба на аташман, кървене при сондиране, засягане на фуркации, PISA) и наличието на *P. gingivalis* и *T. denticola*. Тези резултати потвърждават значението на изследваните пародонтопатогени в развитието и утежняването на пародонтита. Но клиничният показател, който в голяма степен отразява активността на пародонтита и евентуано неговото далечно действие, включително и върху РА, е показателят PISA (261). Локалното възпаление при пародонтит, предизвикано от субгингивалната бактериална плака, включително изследваните пародонтопатогени, е свързано с увеличена продукция на проинфламаторни медиатори, които чрез системната циркулация биха могли да достигнат далечни органи и системи и да допринесат за тежестта на системно заболяване като РА.

Възможен механизъм на влияние на пародонтопатогени върху хода на РА е и евентуалното им участие в индуциране на производство на RF. Ревматоидният фактор RF е идентифициран като автоантитяло срещу Fc-региона на IgG молекулата. Такива автоантитела са открити при болни от РА и други хронични инфламаторни заболявания, включително и пародонтит (316). Под действието на микроорганизмите или техните липополизахариди се променя структурата на Fc фрагмента на имуноглобулиновата молекула (IgG) и се увеличава способността на ревматоидния фактор да се свърже с него. Това се дължи на факта, че IgG детерминантата е по-достъпна за ревматоидния фактор след свързване с бактериален агент (132). Въпреки че няма значима зависимост ние установихме по-високи нива на RF в серума и гингивалната кревикуларна течност при пациентите от 2-ра група с П и РА, при които идентифицирахме *P. gingivalis* и *P. Intermedia*, в сравнение с отрицателните за тези микроорганизми пациенти. Резултатите са в потвърждение на хипотезата за възможността пародонтопатогените да стимулират производството на RF. Наличие на ревматоиден фактор е установено във възпалени гингивални тъкани, гингивален ексудат, слюнка и серум на пациенти с пародонтит и без ревматично заболяване (57), а антитела срещу грам-отрицателни анаеробни

пародонтални патогени като *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythia*, *Fusobacterium nucleatum*, *Treponema denticola*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* са открити в серум и синовиална течност на пациенти с ревматоиден артрит (132). Под действието на микроорганизмите или техните липополизахариди се променя структурата на Fc фрагмента на имуноглобулиновата молекула (IgG) и се увеличава способността на ревматоидния фактор да се свърже с него. Това се дължи на факта, че IgG детерминантата е по-достъпна за ревматоидния фактор след свързване с бактериален агент (132). Установено е повишаване на нивата на RF след инжектиране на бактериални липополизахариди от *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* при мишки (132), а The et al. (369) установяват корелация между нивата на RF и антителата срещу същите микроорганизми. RF при RF-позитивните индивиди показва кръстосана реактивност с бактериални епитопи на някои пародонтопатогени като *P. intermedia* и *P. Gingivalis* (316).

Друг възможен механизъм на влияние на оралните пародонтопатогени върху изявата и хода на РА е участието им в цитрулинацията на протеини и евентуалното индуциране на производство на антитела срещу цитрулинирани протеини. Въпреки че няма значима зависимост ние установихме по-високи нива на АСРА в серума при пациентите от 2-ра група с П и РА, при които идентифицирахме *P. Intermedia*, и по-високи нива на АСРА в гингивалната кревикуларна течност при пациентите от същата група, при които идентифицирахме *P. gingivalis*, в сравнение с отрицателните за тези микроорганизми пациенти. Пародонталното заболяване като възможен извънставен източник на цитрулинирани пептиди и антитела срещу тях може да допринесе за намаляване на имунната толерантност при предразположени индивиди и да благоприятства развитието на РА. При вече изявено ревматично заболяване цитрулинираните протеини или антителата срещу тях, попадайки в системната циркулация, могат да стимулират обща антитяло-реакция и да повлияят тежестта на РА.

P. gingivalis е микроорганизъм, способен да продуцира пептидил-аргинин деиминаза (ППАД). Бактериалната ППАД може да конвертира както пептидил-аргинин, така и свободен L-аргинин, превръщайки се в източник на цитрулинирани

протеини. *P. gingivalis* цитрулинира човешки фибриноген и алфа-енолаза и тази цитрулинация е зависима не само от ППАД, но и от бактериалните аргинин-специфични цистеин протеази – гингипаин-R. Човешката алфа-енолаза и *P. Gingivalis* енолазата са идентични в 51% от цялата дължина на пептида. В региона, съответстващ на СЕР-1, те показват 82% идентична последователност, а деветте аминокиселини на позиции от 13 до 21 във втория цитрулиниран остатък (цитрулин 15) са 100% идентични. Антитяло-отговорът към *P. gingivalis*-цитрулиниран енолаза пептид 1 (СЕР-1) силно корелира с антитяло-отговора срещу човешки СЕР-1 (210). Тази възможна кръстосана реактивност вероятно допринася за засилената продукция на антитела срещу човешки СЕР-1, което може да агравира развитието на РА.

Влиянието на *P. intermedia* се свързва със стимулиране на активността на човешките пептидил-аргинин деиминази чрез индукция на локален възпалителен отговор. Активираните неутрофили са предполагаем източник на цитрулинирани антигени, а нуклеазите на *P. intermedia* притежават способността да разгражда структури по повърхността на неутрофилите, съдържащи антибактериални субстанции, включително и пептидил-аргинин деиминази. Разрушените, в резултат на активността на *P. intermedia*, NETs освобождават ПАД и по този начин стават източник на цитрулинирани пептиди (331). Установена е корелация между антителата срещу цитрулинирани цитокератин-13 и тенасцин-С и антитела срещу *P. intermedia*, както и между антителата срещу цитрулинирани α -енолаза и тенасцин-С и антитела срещу *P. gingivalis* при пациенти с ревматоиден артрит и пародонтит и такива само с ревматоиден артрит. Schwenzer et al. (331) подкрепят хипотезата за евентуалното влияние на тези микроорганизми в производството на цитрулинирани антигени и антитела срещу тях.

Обсъждане на резултатите по задача 5 – Изследване на генния полиморфизъм на FcgRIIIa158V/F при пациенти с пародонтит, с ревматоиден артрит, с ревматоиден артрит и пародонтит и здрави индивиди във връзка с изявата на двете заболявания. Изследване на комбинираното влияние на FcgRIIIa158V/F и тютюнопушенето върху изявата на пародонтита и ревматоидния артрит

За първи път в България проведохме изследване на генетичния полиморфизъм на FcgRIIIa-158V/F и определихме алелната честота на FcgRIIIa-158V в извадка от българска популация при пациенти с РА; с П; с РА и П; здрави индивиди. Това е и първото изследване на полиморфизма на този ген при пациенти с пародонтит и ревматоиден артрит. Установихме много високо разпространение (78,1%) на FcgRIIIa-158VV генотипа при всички изследвани пациенти и при здравите контроли, без да има статистически значими разлики между отделните изследвани групи. При 21,9% от всички пациенти установихме генотип FcgRIIIa-158VF. Нито един от пациентите не беше хомозиготен по FcgRIIIa-158F алела. Установихме 100% разпространение на FcgRIIIa-158V алела. Резултатите ни силно контрастират с публикувани данни за разпределение на FcgRIIIa-158V/F генотипа в азиатски популации, където FcgRIIIa-158F алелът е с по-голяма честота на разпространение – около 70% (181, 182, 357). Установеното от нас високо разпространение на FcgRIIIa-158V алела в българска популация вероятно се дължи на различни от азиатските популации расови и етнически особености и е във връзка с географския регион. Според Yoshie et al., 2005 (408), расовият и етническият произход е от голямо значение при изследването на полиморфизма на единичните гени, тъй като може да съществуват значителни различия в генетичния фон при различните популации. Пример за това е установената връзка между вариации на IL-1 гена (IL-1A+4845, IL-1A-889, IL-B+3954) и тежестта на пародонтита при европейската раса и много ниската честота на разпространение на тези полиморфизми в азиатската раса (408).

В нашето изследване ние търсихме зависимост на показателите на пародонтита от вида генотип. Установихме, че при пациентите с пародонтит и генотип FcgRIIIa-158VF има значително по-голяма средна дълбочина на пародонталните джобове в

сравнение с пациенти с пародонтит и генотип FcgRIIIa-158VV. Установихме тенденция за по-голям брой на дълбоки пародонтални джобове между 5-7 мм при генотип FcgRIIIa-158VF. Установихме и тенденция пациентите с генотип FcgRIIIa-158VF да имат по-голямо разпространение на гингивално кървене и кървене при сондиране в сравнение с генотип FcgRIIIa-158VV. Резултатите ни са в противоречие с редица изследвания, свързващи носителството на FcgRIIIa-158V алела и хомозиготния FcgRIIIa-158VV генотип с по-голяма честота на разпространение и по-голяма тежест на пародонтита (10, 14, 17, 20). Meisel et al., 2001 г., установяват, че носителството на FcgRIIIa-158V е свързано с по-голяма загуба на кост при пациенти с пародонтит (233). Пациентите, хомозиготни по този алел, демонстрират по-голяма тежест и активност на пародонталното заболяване (182, 233). Подобни резултати са публикувани след едно изследване на Kobayashi et al., 2001 г., в което е установена по-висока честота на FcgRIIIa-158V алела при пациентите с тежък пародонтит в сравнение с тези с лек и умерен пародонтит (182). Вероятният механизъм на влияние на FcgRIIIa-158V алела е свързан с промени в активността на макрофаги и НК клетки в имунния отговор на организма чрез FcgR рецепторите. Микроорганизми и бактериални антигени, опсонизирани с антитела, се свързват чрез FcgR с неутрофилите и впоследствие се фагоцитират. FcgRIIIa рецепторът медира антитяло-зависимата цитотоксичност на Т-клетките и НК клетките, фагоцитозата на макрофаги, цитокинната продукция на НК клетките и лимфоцитите, както и регулира Ig продукцията. FcgRIIIa-158V алотипът проявява по-голям афинитет към IgG1 и IgG3 от алотип FcgRIIIa-158F и само той е способен да се свърже с IgG4 (197, 305). Във възпалена гингивална тъкан при пародонтални заболявания нивата на активираните НК клетки и макрофаги са значително повишени, а преобладаващият подклас имуноглобулини е IgG1 (173). Повишената активност на макрофаги и НК клетки е причина за повишена продукция на проинфламаторни цитокини TNF- α и IL1, които имат важна роля в активацията и действието на остеокластите и последващата костна резорбция (173, 190). FcgRIIIa-158V алелът е свързан с повишена активност на макрофаги и НК клетки и повишена експресия на проинфламаторни цитокини.

Подобни на нашите резултати са публикувани от Sugita et al., 1999 г., при които носителството на FcgRIIIa-158F алела е по-често свързано с пародонтит в сравнение с FcgRIIIa-158V алела (357). Авторите установяват генотип FcgRIIIa-158VF в 35 от 42 пациенти от европейска популация с пародонтит, а генотип FcgRIIIa-158VV – само при 7 пациенти. Kobayashi et al., 2000 г., също докладват по-голяма честота на алела FcgRIIIa-158F сред пациенти от европейска популация с пародонтит, както и по-голяма честота на разпространение на генотипа FcgRIIIa-158VF при пациентите с пародонтит в сравнение с генотипа FcgRIIIa-158VV (181).

Ролята на FcgRIIIa-158V/F полиморфизма в патогенезата на пародонтита може да бъде обяснена с факта, че пародонталните заболявания са комплексни, мултифакторни заболявания. Множество единични генни полиморфизми и взаимодействието между тях може да повлияе на изявата и прогресията на пародонтита (172, 409). Хаплотипният анализ е обещаващ подход за идентифицирането на генетичните фактори като рискови за пародонталните заболявания. При този подход се анализират два или повече полиморфизма на гени, намиращи се в структурна близост един до друг (409). Kobayashi et al. (181) установяват, че комбинираният генотип FcgRIIIa-158VV и FcgRIIIb-NA2NA2 е свързан с тежестта на пародонтита, а Meisel et al. (233) свързват комбинирания генотип FcgRIIIa-158VV и FcgRIIIa-H/H 131 с по-голяма тежест и активност на пародонтита. Гените, кодиращи FcgR, са групирани в рамките на разстояние от 0,5МВ на хромозома 1, правейки възможно комбинираното влияние на полиморфизма на тези гени върху развитието на пародонтита (172, 409). FcgRIIIa-H 131 алелът е свързан с повишена активност на неутрофилите, повишен афинитет на свързване с IgG2, както и повишена продукция на TNF- α и IL1 (406). FcgRIIIb-NA2 алелът е свързан с пониска фагоцитозна ефективност на неутрофилите (400). Според тези изследвания комбинираната изява на съседни гени, кодиращи FcgR, е важна за изявата на пародонтита. Заедно с това ние отчитаме и разликите в характерните генетични полиморфизми сред популациите в различни географски райони, които биха могли да определят различно протичане на заболяването пародонтит. Получените от нас различни резултати в съпоставка с резултатите на други автори (10, 14, 17, 20) по

отношение на FcgRIIIa-158V/F алелите с изявата и тежестта на пародонтита отдаваме на изследването на българска популация, която има различно географско положение и различна расова принадлежност.

При изследване на генотипа по отношение на FcgRIIIa-158V/F и фактора тютюнопушене установихме статистически значима зависимост между комбинираното действие на генотип FcgRIIIa-158VV и тютюнопушене и показателите на пародонтита. Значимо по-голяма е средната дълбочина на пародонталните джобове, по-голям е процентът на разпространението на кървене при сондиране при пациенти с генотип FcgRIIIa-158VV, които са пушачи в сравнение с непушачи. При пациенти, които са с генотип FcgRIIIa-158VV и непушачи, установихме по-често разпространение на плитки пародонтални джобове до 3 мм в сравнение с тези с генотип FcgRIIIa-158VV и пушачи.

Пушенето може да модифицира индивидуалния геном по механизмите на епигенетиката и да повлияе генната активация и фенотипната изява (190). Разкриването на връзката между генетичните фактори, факторите на средата и патогенезата на заболяването е обект на епигенетиката, която изучава възможностите на влияние на фактори на средата върху генома. Нашите резултати за комбинираното действие на тютюнопушенето и носителството на FcgRIIIa-158VV алела са в съответствие с редица публикации за по-голяма честота и тежест на пародонтита при пушачи с генотип FcgRIIIa-158VV (182, 233, 406). Повишената ефективност на свързване с IgG1, IgG3 и IgG4 и по-голямата активност на макрофаги и NK клетки при генотип FcgRIIIa-158VV водят до по-голяма секреция на проинфламаторни цитокини като IL-1 и TNF- α (190). Пушенето е свързано с влияние върху неутрофилите и тяхната функция – нарушени са химиотаксиса и фагоцитозата. Никотинът увеличава продукцията на IL-6. При пушачи нивата на TNF- α , IL-1 и PGE2 в кревикуларната течност са повишени (23). Това вероятно са механизмите на евентуален синергичен ефект на генетичния полиморфизъм на FcgRIIIa-158V/F и тютюнопушенето върху пародонталната деструкция.

При изследване на генетичния полиморфизъм на FcgRIIIa-158V/F и изявата на РА ние установихме, че при пациентите от 3-та група с РА и без П с генотип FcgRIIIa-158VV нивата на RF и АСРА в серума (маркери за РА) са по-високи в

сравнение с пациентите от същата група с генотип FcgRIIIa-158VF, но без статистически значима зависимост. Morgan et al., 2000 (253), публикуват резултати от проучване, според което FcgRIIIA158V алелът е по-често срещан при болни от РА и е свързан с по-голяма тежест на заболяването. Този алел е асоцииран с повишаване на активността на макрофаги в отговор на IgG-съдържащи имунни комплекси, каквито са IgG-RF и развитието на РА при предразположени индивиди. Активираният макрофаги са преобладаващият тип клетки във възпалителния инфилтрат, открити в ревматоидния синовиум, панус и възли, а FcgRIIIa-158V изоформата по повърхността на макрофагите е с повишен афинитет за свързване с IgG-RF комплексите (253). По този начин се поддържа инфламаторният отговор и съответно се увеличава тежестта на РА. Свързването на макрофагите с FcgR води до активацията им и отделянето на проинфламаторни цитокини, протеолитични ензими, реактивни кислородни радикали и др. При свързването на FcgRIIIA с IgG-RF имунни комплекси моноцитите отделят TNF- α и IL-1 β . Тези медиатори доминират от моноцитния профил на РА и са с основна роля в синовиалното възпаление (8). Носителството на FcgRIIIA158V алела е свързано с повишаване на активацията на моноцити и макрофаги в ставната капсула чрез увеличено свързване на FcgR с IgG-съдържащи имунни комплекси. Продължителната активация на тези клетки и продукцията на проинфламаторни медиатори води до персистиране на възпалението и повишаване на тежестта на заболяването (8, 253). Вероятно това са част от механизмите на влияние на FcgRIIIA158V алела върху проинфламаторните клетки и върху изявата на РА, отразена чрез нивата на RF и АСРА в серум.

При пациентите от 2-ра група с П и РА установихме тенденция генотипът FcgRIIIa-158VF да е свързан с тенденция за по-високи средни нива на RF в серума в сравнение с пациентите от същата група с генотип FcgRIIIa-158VV. Въпреки че няма значима зависимост, нивата на АСРА в серума на пациентите от 2-ра група с генотип FcgRIIIa-158VF са по-високи от нивата на АСРА в серума на пациентите с генотип FcgRIIIa-158VV. Възможно обяснение на тези резултати е вероятността определен хаплотип да е свързан с изявата и развитието на РА, а не единичен генетичен полиморфизъм. Едно проучване на Morgan et al., 2006 (252), установява, че комбинираният генотип FcgRIIIa-158VF и FcgRIIIb-NA2NA2 е по-силно асоцииран с наличието на РА в сравнение с генотипа FcgRIIIa-158VV.

Обсъждане на резултатите по задача 6 – Изследване на влиянието на факторите на средата – тютюнопушене, пол, образование, възраст, върху изявата на пародонтита и ревматоидния артрит и евентуалното им определяне като общи рискови фактори за двете заболявания

Изследвахме влиянието на пушенето върху изявата на пародонтита при пациентите с пародонтит от 1-ва и 2-ра група, оценена чрез клиничните показатели дълбочина на сондиране, загуба на аташман, брой фуркационни увреждания, кръвене при сондиране и брой загубени зъби. Установихме, че пушачите имат значително по-голяма средна дълбочина на сондиране спрямо непушачите, както и тенденция за по-голям брой дълбоки пародонтални джобове над 7 мм. Пушачите имат значимо по-малък брой пародонтални джобове – под 3 мм в сравнение с непушачите. Установихме, че при пушачите се откриват по-голяма средна загуба на аташман от непушачите, както и по-често и по-тежко засягане на фуркационната област. Резултатите ни потвърждават първостепенното значение на тютюнопушенето като рисков фактор за пародонтита, което се свързва с по-голяма дълбочина на пародонталните джобове и по-голям брой дълбоки джобове (36), по-голяма загуба на аташман (27), повече загуба на алвеоларна кост (37), повече загубени зъби (145), по-голям брой по-тежко засегнати фуркации (116, 130) при пушачи. Вероятният механизъм на влияние на тютюнопушенето е свързан с някои нарушения на отговора на организма към бактериалната инфекция. Никотинът има инхибиращо действие върху неутрофилната миграция и забавено преминаване през ендотела на кръвоносните съдове, както и намалена фагоцитираща способност. Повишеното количество на разтворими ICAM-1 при пушачи ангажира свободните рецептор-лиганди по повърхността на неутрофилите и намалява капацитета на защитната роля на тези клетки. При пушачи е установено и повишено количество на неутрофилна еластаза в гингивалната съединителна тъкан (23). При пушачи са нарушени Т- и В-клетъчната функция. Никотинът намалява функционалната активност на Т-клетките и намалява броя на Т-хелперните лимфоцити, които са от голямо значение за регулацията на В-клетките и производството на антитела. При пушачи се установяват и намалени нива на IgG в серума и на IgA в слюнката, както и нарушен IgG2 отговор (413). От друга страна, компонентите на тютюневия

дим могат да влияят върху продукцията на цитокини и проинфламаторни медиатори, с което да допринесат за пародонтална деструкция. За никотина се знае, че увеличава продукцията на IL-6 от остеобласти, както и нивата на TNF- α , IL-1 и PGE2 в кривуларната течност (290). Това са част от механизмите, по които тютюнопушенето влияе върху изявата на П и нашите резултати потвърждават това влияние чрез откритите значително по-високи стойности на параметрите на пародонтита при пациенти с пародонтит и пушачи в сравнение с тези с пародонтит и непушачи.

Не установихме статистически значима зависимост между тютюнопушенето и изявата на РА, оценени чрез концентрациите на RF и АСРА в серум, DAS 28 CRP и рентгенов стадий. Други епидемиологични изследвания превеждат данни, че тютюнопушенето е рисков фактор за РА (177, 283, 354). Пушенето е риск за прогресия на ревматоиден артрит основно при RF-позитивни (283) и АСРА-позитивни (177) индивиди. Един от механизмите на действие е чрез увеличаване на броя на лимфоцитите в периферната кръв; стимулиране продукцията на RF-IgM и RF-IgA и повишаване на нивата им в серума (219). Друг възможен механизъм на влияние е стимулиране на производството на ендогенни цитрулинирани пептиди в отдалечени от ставата органи и системи, като белите дробове или пародонта (177). Пушенето предизвиква увеличаване на количеството клетки в апоптоза, при което се освобождават ендогенни пептидил-аргинин деиминази, ензими, отговорни за процеса цитрулинация. Никотинът е свързан с повишаване на активността на макрофаги и други антиген-представящи клетки (177). Това може да допринесе за нарушаване на имунната толерантност към цитрулинираните протеини и при предразположени индивиди да доведе до имунна реакция с образуване на автоантитела. Възможно е връзката между тютюнопушенето и РА да е мултифакторна и да включва носителство на генетични полиморфизми. В потвърждение на това се установява значима зависимост между пушенето и наличието и тежестта на РА, оценени чрез нивата на АСРА и RF в серум при пациенти, които са носители на генотип HLA-DRB1 (споделен епитоп), който се свързва с предразположение към РА (177). Ние изследвахме влиянието на пушенето без отчитане на рисковия фактор за РА – HLA-DRB1, което вероятно има значение за неоткриването на значими зависимости между тютюнопушенето и параметрите на РА.

Установихме значимо влияние на фактора пол върху тежестта и активността на пародонтита. В сравнение с жените при мъжете се откриват по-голям брой дълбоки (над 7 мм пародонтални джобове) и по-малък брой плитки (до 3 мм) пародонтални джобове. При мъжете се демонстрират по-голяма средна дълбочина на сондиране и средна загуба на аташман, както и по-често засягане на фуркациите. При мъжете има тенденция за по-високи средни стойности на показателя PISA. Резултатите ни са в съответствие със съществуващите епидемиологични данни за по-голяма честота на разпространение и по-голяма тежест и активност на пародонтита при мъже, отчетени по клиничните пародонтални параметри, определящи мъжкия пол като рисков фактор за развитие на пародонтит (53, 340). Някои автори свързват тези различия в параметрите на пародонтита между двата пола с по-ниско ниво на лична орална хигиена, с по-голямо количество бактериална плака и по-рядко и по-късно търсене на специализирано дентално лечение, а не със структурни или функционални различия между двата пола (53, 340). Ние не установихме статистически значими различия в разпространението на бактериалната плака при мъже и жени. Възможно обяснение на тези резултати е биологично правдоподобната идея за полов диморфизъм и половоспецифичните различия в имунната функция при двата пола (222). Половите хормони могат да модифицират инициацията и хода на имунния отговор при някои автоимунни заболявания, включително системен лупус и РА (15, 222). По-силният инфламаторен отговор при жени вероятно има протективен ефект по отношение на пародонталната инфекция (15). Половообусловените различия в имуно-инфламаторния отговор на организма са все още недобре изяснени, но вероятно са свързани с половоспецифична генетична архитектура и са модулирани от полови хормони (15).

Не установихме значимо влияние на фактора пол върху изявата на РА. При изследването на пациентите с РА установихме по-високи концентрации на АСРА и RF в серума на жените в сравнение с мъжете, без значима разлика. Вероятно комбинираното действие с генетични фактори и взаимно влияние на други фактори на средата (тютюнопушене) обуславя пола като рисков фактор за РА. Известно е от епидемиологичните проучвания, че ревматоидният артрит засяга по-често жени, при жените синовиалното ревматоидно възпаление има по-висок деструктивен потенциал, женският пол е по-слабо резистентен към тъканна деструкция и по-слабо възпаление може да предизвика деструкция на ставната архитектура

(399). От друга страна, мъжкият пол е свързан с по-голяма тежест на РА и по-голяма честота на извънставна форма на заболяването (399). Механизмът на влияние на пола е все още неясен, но би могъл да е свързан с полово асоциирани генетични фактори и/или полови хормони (399). Фенотипни различия могат да отразяват различни комбинации от гени, предразполагащи към РА. Например хомозиготност на HLA-DRB1*04 алел се свързва с увеличена честота на разпространение на екстраартикуларната форма на РА при мъже (399).

Изследването ни установи влияние на възрастта върху изявата на пародонтита, отчетена по клиничните параметри. С увеличаване на възрастта се увеличават средната дълбочина на сондиране, разпространението на кървенето при сондиране, както и броят загубени зъби. Възрастта не е самостоятелен рисков фактор за начало и прогресия на пародонтита. Вероятно с годините се увеличава кумулативният ефект на заболяването, свързан с продължително действие на плаката и протрахирано възпаление, което води до по-голяма пародонтална деструкция.

Установихме значимо влияние на фактора образование върху някои от параметрите на пародонтита. В сравнение с пациентите с висше образование, при пациентите със средно и под средно образование се отчитат по-голямо разпространение на кървене при сондиране, по-голяма средна дълбочина на сондиране, по-малко плитки пародонтални джобове до 3 мм и повече загубени зъби. Свързваме по-ниското ниво на образование с по-лошо ниво на орална хигиена и повече бактериална плака, с по-ниско ниво на здравна култура, с тютюнопушене, както и по-рядко и по-късно търсене на медицинска помощ (43). Не на последно място, по-ниското ниво на образование може да е свързано и с по-ниско ниво на социално-икономически статус на индивида и съответно невъзможност за дентално лечение.

Изследването ни не установи статистически значимо влияние на фактора образование върху тежестта и активността на ревматоидния артрит. Нашите резултати кореспондират с публикуваните досега данни за липса на връзка между образованието и социално-икономическия статус и изявата и тежестта на РА (30). Няма доказателства за ролята на образователния ценз в изявата на ревматичното заболяване.

IX. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Пародонтитът и ревматоидният артрит са социалнозначими заболявания, водещи до функционални нарушения на засегнатите органи и влошаващи качеството на живот на засегнатите индивиди. От десетилетия се изследва връзката между тези две заболявания. Изясняването на механизмите на взаимното влияние би било от голямо значение за лечението и контрола на П и РА заедно или самостоятелно. Резултатите от нашите изследвания дават нови данни за механизмите на връзка между двете заболявания. Установихме взаимно потенциране на РА и П на базата на по-голяма тежест на клиничните показатели на двете заболявания и по-високи стойности на лабораторните показатели за РА. Направените изводи ни дават основание да считаме, че лечението на пародонталното заболяване би допринесло за контрола и на РА. Установихме по-често присъствие на *T. denticola* в субгингивална плака, пародонтопатоген, асоцииран с наличието и тежестта на пародонтита, при пациенти РА. В оралните биологични флуиди – гингивална кревикуларна течност и слюнка, установихме наличие на АСРА и RF, специфични диагностични маркери за ревматоидния артрит, и свързахме пародонталната инфекция с локална продукция на АСРА и RF. Установената от нас корелация между тежестта на пародонталното заболяване и концентрацията на АСРА в слюнката е основание П да се приеме за фактор в локалната продукция на АСРА и евентуален стимул в изявата на РА. Значително увеличените концентрации на АСРА и RF в слюнка и гингивална кревикуларна течност могат да бъдат използвани като диагностични показатели, добивани от сравнително леснодостъпни диагностични среди. Пародонтитът и ревматоидният артрит са комплексни, мултифакторни заболявания, които имат генетичен компонент, включващ много гени вероятно взаимодействащи помежду си и с факторите на средата. Изследваният от нас генен полиморфизъм на FcgIIIa158V/F установи генотипа FcgIIIa158VF като рисков фактор за П и вероятно с по-високорискова стойност за РА. Установихме, че тютюнопушенето в присъствие на генотип FcgIIIa158VV е с по-висока рискова стойност за изява на пародонтит.

Х. ИЗВОДИ

1. Установените значимо по-високи стойности на изследваните показатели на П при пациентите от 2-ра група (с П и РА) в сравнение с пациентите от 1-ва група (П) внушават влиянието на РА върху П.
2. По-високата концентрация на АСРА в серум при пациентите с П и РА в сравнение с пациентите с РА без П е в подкрепа на влиянието на П върху РА.
3. По-високата концентрация на АСРА в GCF при пациентите от 2-ра група (с П и РА) в съпоставка с тези от 1-ва група (П) свързваме с преминаване на АСРА от серум в GCF при пациентите с РА.
4. По-високият брой пациенти с RF в GCF при пациентите с П и РА в съпоставка с пациентите само с РА или само с П свързваме с възможността за транспорт на RF от серум към GCF при пациентите с РА и евентуалното производство на RF в тъканите на пародонта при П.
5. Голямата, статистически значима разлика в концентрациите на АСРА в слюнка между пациентите с РА; с П и РА; с П, от една страна, и здравите индивиди – от друга, е в подкрепа на мнението, че АСРА в слюнка зависи от наличието на РА и на П.
6. Наличието на корелация между АСРА в слюнка и показателите на П е в подкрепа на мнението, че АСРА зависи от активността на П и вероятно пародонталните структури са източник на АСРА.
7. Откритата зависимост между АСРА в слюнка и АСРА в серум се свързва с транспорт на този маркер от серум към слюнка при пациентите с РА.
8. Корелацията на АСРА в слюнка с показатели на РА като АСРА в серум, RF в серум, DAS-28 се свързва със зависимост на АСРА в слюнка от тежестта на РА.
9. Зависимостта на АСРА в слюнка от тежестта на РА е основание да се предложи слюнката като удобен диагностичен флуид за РА.

10. По-често положителни за *T. denticola* индивиди са установени в групата с П и РА в съпоставка с тези от групата с П и без РА, което е основание да се предположи нейното евентуално участие в патогенезата на РА.
11. Изследваният от нас генен полиморфизъм на FcgRIIIa-158V/F показва, че генотипът FcgRIIIa-158VF е рисков фактор за изява на П и вероятно е с висока рискова стойност за РА.
12. Потвърдихме значението на тютюнопушенето и мъжкия пол като рискови фактори за П. Потвърдихме значението на женския пол като рисков фактор за РА.

XI. ПРИНОСИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД И ПРЕПОРЪКИ

1. Приноси с оригинален характер

1.1. За първи път са изследвани RF и АСРА (маркери за РА) в биологичните течности слюнка и гингивална кревикуларна течност и са установени:

1.1.1. Зависимост между концентрацията на RF в гингивална кревикуларна течност и показателите на пародонтита.

1.1.2. Зависимост между концентрацията на АСРА в гингивална кревикуларна течност и показателите на пародонтита.

1.1.3. Зависимост между концентрацията на АСРА в слюнка и показателите на пародонтита.

1.1.4. Зависимост между концентрацията на АСРА в слюнка и показателите на ревматоидния артрит.

1.1.5. Установените зависимости дават основание да се използват тези биологични течности за определяне на параметри на РА (АСРА) с диагностично значение.

1.2. При изследване на субгингивална микрофлора при пародонтит и съпоставянето ѝ с РА установихме по-често присъствие на *T. denticola* в субгингивална плака при пациенти с РА.

1.3. За първи път в българска популация е изследван генният полиморфизъм на FcgRIIIa-158V/F във връзка с пародонтит и ревматоиден артрит и е установено:

1.3.1. Генотипът FcgRIIIa-158VF е рисков фактор за пародонтит.

1.3.2. Генотипът FcgRIIIa-158VF вероятно е с по-висока рискова стойност за РА.

1.3.3. Тютюнопушенето в присъствие на генотип FcgRIIIa-158VV е свързано с по-висока рискова стойност за пародонтита.

2. Приноси с потвърдителен характер

2.1. Потвърдихме влиянието на РА като рисков фактор за по-тежка клинична изява на пародонталното заболяване.

2.2. Потвърдихме влиянието на П като рисков фактор за по-тежката изява на ревматоидния артрит.

- 2.3. Потвърдихме тютюнопушенето като рисков фактор за пародонтита.
- 2.4. Потвърдихме мъжкия пол като рисков фактор за пародонтита.
- 2.5. Потвърдихме възрастта като рисков фактор на пародонтита.
- 2.6. Потвърдихме по-ниската степен на образование като рисков фактор за пародонтита.

Препоръки

I. Установената от нас връзка между наличието и тежестта на П и РА ни дава основание да направим препоръка за по-тясна колаборация между специалистите по ревматология и пародонтология, защото:

1. Установената от нас по-голяма тежест на П при наличие на изявен РА е основание за контрол на РА с цел по-ефективно лечение на П.

2. Установената от нас по-голяма тежест на РА при наличие на пародонтално заболяване е основание за контрол на П с цел по-ефективно лечение на РА.

II. Зависимостта между концентрациите на АСРА в слюнка и серум, която установихме при пациентите с РА, ни дава основание да препоръчаме определяне на слюнчените нива на АСРА като маркер за ранна диагностика и мониториране на РА.

ХІІ. ПУБЛИКАЦИИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. Научни публикации

- 1.1. Болярова Т., Л. Стефанов. Връзка между пародонтални заболявания и ревматоиден артрит (обзор), *Обща медицина*, 2017, XIX, 2, 31- 40.
- 1.2. Болярова-Конова Т., Л. Стефанов, Зл. Коларов, Р. Емилова, В. Толчков, Д. Танев, М. Николова, Г. Христова. Клинични данни за връзка между пародонтит и ревматоиден артрит (предварителни резултати). *Ревматология*, 2018,4,9-17.
- 1.3. V. Tolchkov, L. Stefanov, G. Hristova, T. Bolyarova. Detection of microbial flora using polymerase chain reaction. *Problems of Infectious and Parasitic Diseases*. 2018, 46, 2, 40-42.

2. Постери

- 2.1. Толчков Б., Л. Стефанов, Г. Христова, Т. Болярова. Доказване на видове от оралната анаеробна микрофлора чрез PCR. 16 Национален конгрес по клинична микробиология и инфекции. 10-12 май 2018, София, Постер 33.

3. Проекти

- 3.1. Изследователски проект “ГРАНТ – 2017”, финансиран от МУ – София, с водещ изследовател доц. д-р Теодора Болярова-Конова, дм, на тема "Връзка между пародонтални заболявания и ревматоиден артрит. Клинични, имунологични и микробиологични изследвания". Проектът е оценен от СМН на МУ – София, с оценка „много добър“.
- 3.2. Изследователски проект “ГРАНТ – 2019”, финансиран от МУ – София, с водещ изследовател доц. д-р Теодора Болярова-Конова, дм, на тема "Връзка между пародонтални заболявания и ревматоиден артрит. Изследване на генетичен полиморфизъм на FcgRIIIA и изследване на антицитрулинирани протеинови антитела в слюнка".

ХІІІ. ПРИЛОЖЕНИЯ

ПРИЛОЖЕНИЕ 1

По задача 1

Табл. 1. Средни стойности на PISA в мм² при пациентите от първа и втора група

Групи	Средна стойност на PISA в мм ²	Стандартно отклонение
I група	1273,77556	729,10214
II група	1676,31275	839,41147

Табл. 2. Средна стойност на броя зъби с PD > 5 ≤ 7 мм при I и II група

Групи	Средна стойност на брой зъби с PD > 5 ≤ 7 мм	Стандартно отклонение
I група	1,35	2,35
II група	2,93	3,61

Табл. 3. Средни стойности на дълбочината на джобовете (PD) при пациентите от двете групи с пародонтит и с различни ставни заболявания

Групи	Средна стойност на PD в мм	Стандартно отклонение
I група	3,24	1,29
II група	4,09	0,99

Табл. 4. Средни стойности на кървенето при сондиране (BoP) при пациентите от двете групи с пародонтит и с различни ставни заболявания

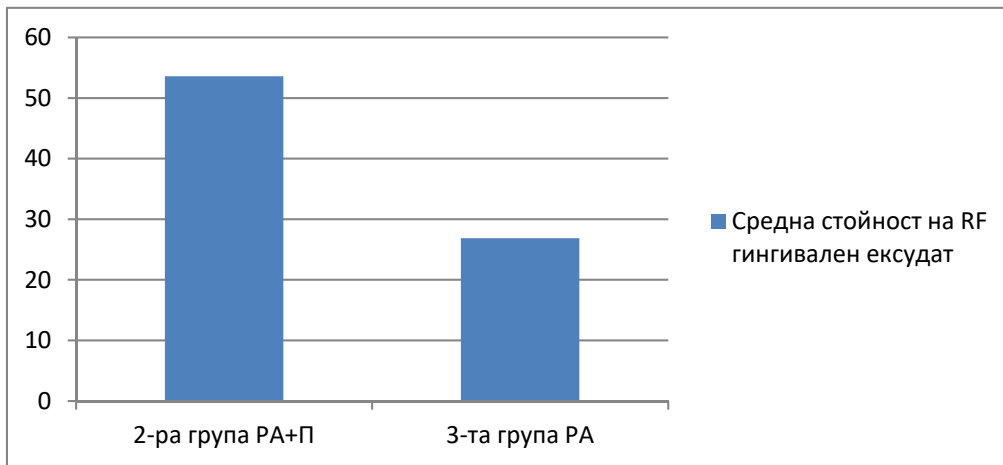
Групи	Средна стойност BoP%	Стандартно отклонение
I група	83.30	29.15
II група	99.00	5.48

Табл. 5 Средни стойности на загуба на аташман (CAL) при пациентите от двете групи с пародонтит и с различни ставни заболявания

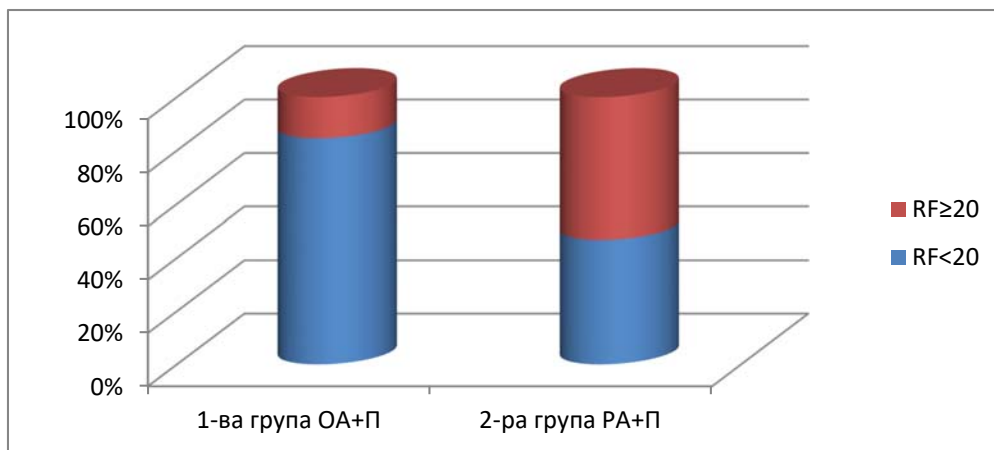
Групи	Средна стойност на CAL в мм	Стандартно отклонение
I група	4,00	1,68
II група	4,74	1,45

По задача 2

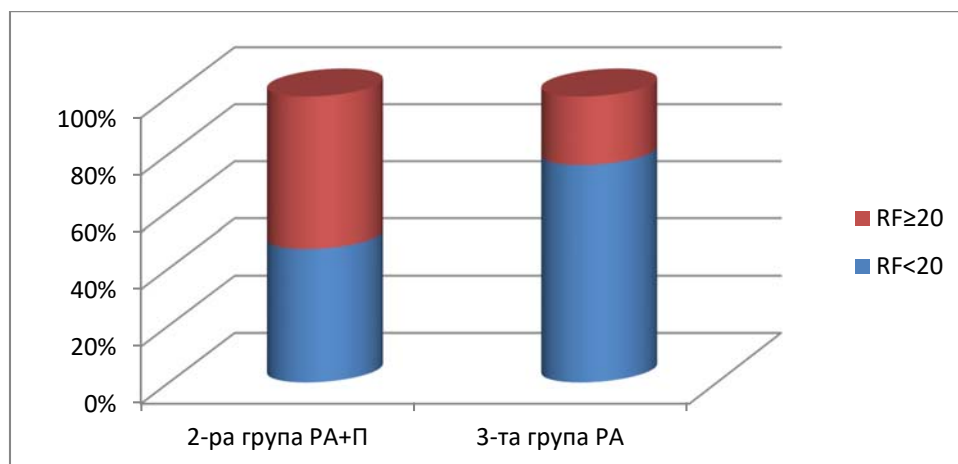
Фигура 1. Нива на RF в гингивален ексудат при пациенти с пародонтит и ревматоиден артрит и при пациенти без пародонтит, но с ревматоиден артрит



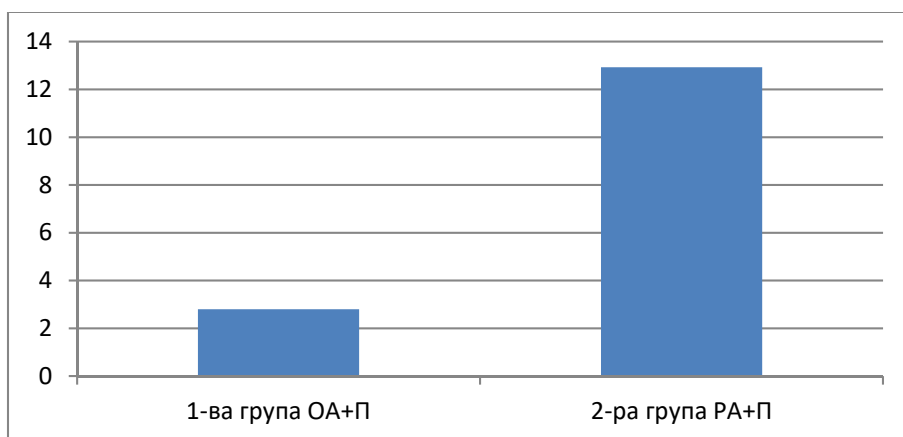
Фигура 2. Честота на положителни стойности на ревматоиден фактор в гингивален ексудат при пациенти с ОА и П (1-ва група) в сравнение с пациенти с РА и П (2-ра група)



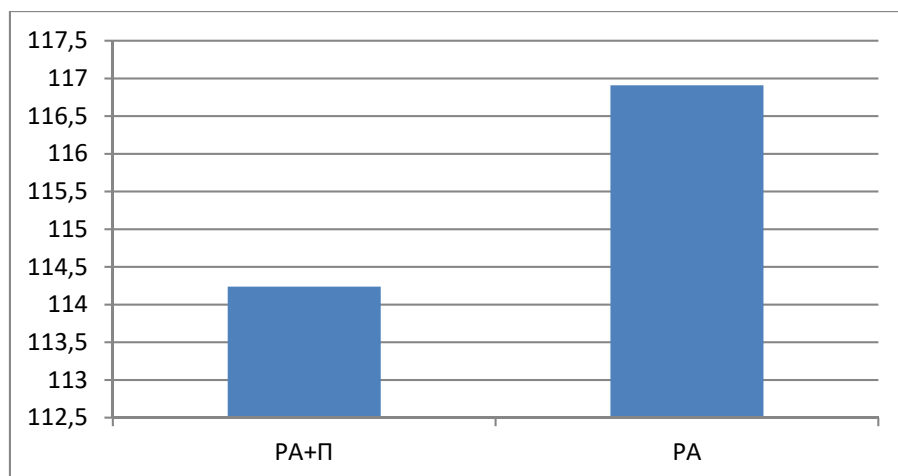
Фигура 3. Честота на положителни стойности на ревматоиден фактор в гингивален ексудат при пациенти с РА и П (2-ра група) в сравнение с пациенти само с РА (3-та група)



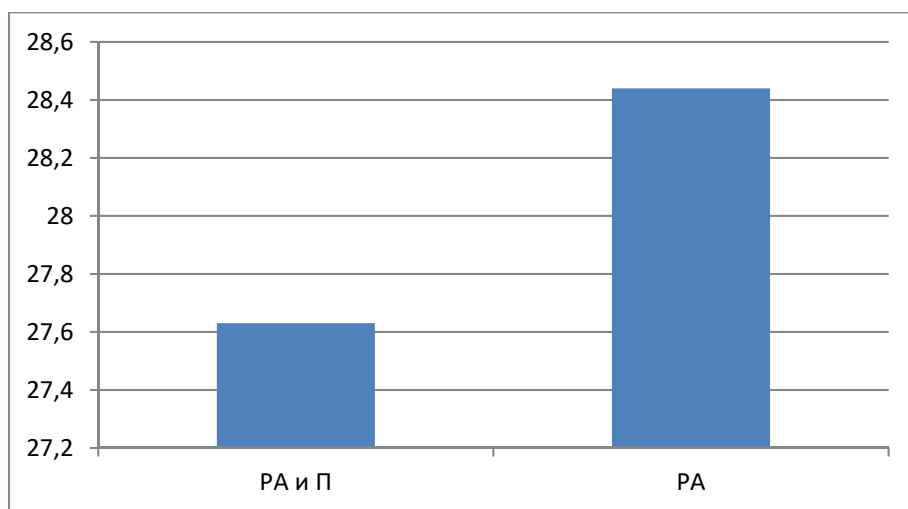
Фигура 4. Средни стойности на АССР в гингивален ексудат в 1-ва и 2-ра група пациенти



Фигура 5. Нива на RF в серум при пациенти с РА+П и РА

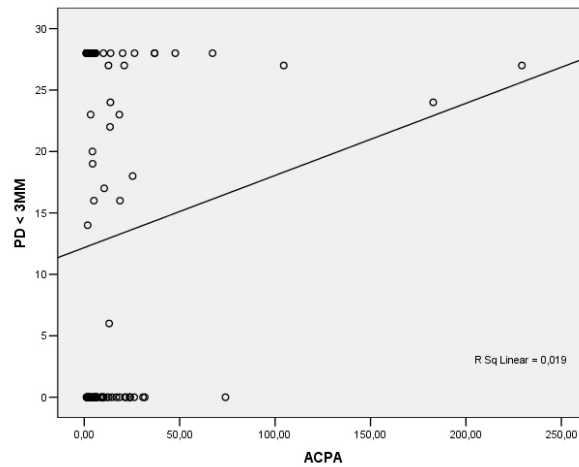


Фигура 6. Средни стойности на АССР в серум при пациенти с РА и П и при пациенти само с РА

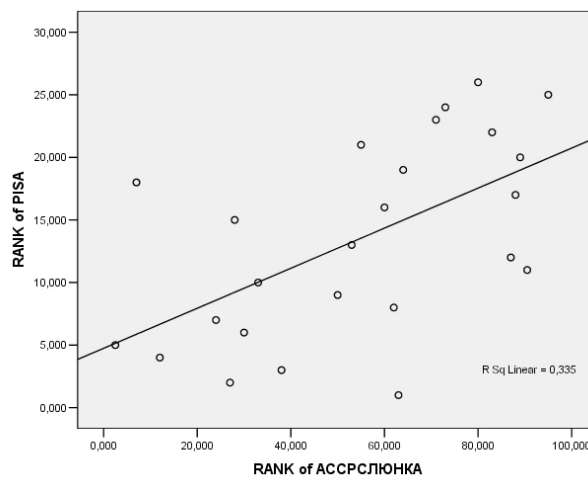


По задача 3

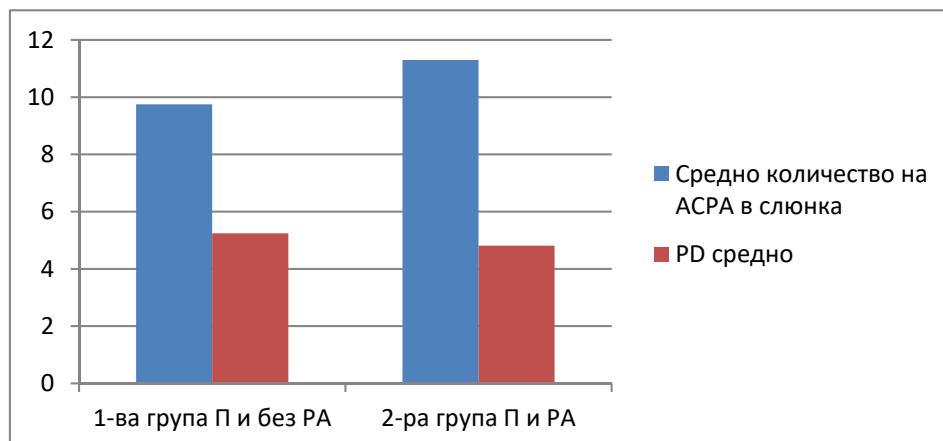
Графика 1. Зависимост между концентрацията на АСРА в слюнка и броя на пародонталните джобове до 3 мм (PD < 3 мм) при пациентите с пародонтит от 1-ва и 2-ра група



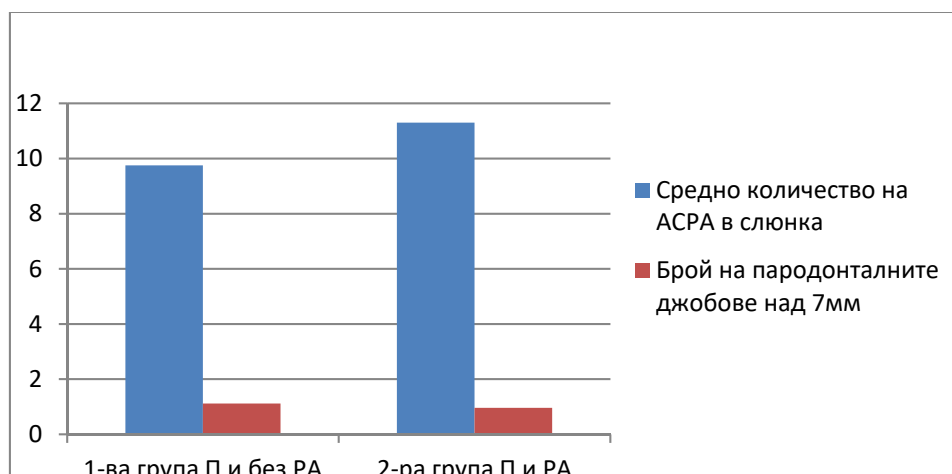
Графика 2. Зависимост между количеството АСРА в слюнка и показателя PISA при пациентите от 1-ва група с П и без РА



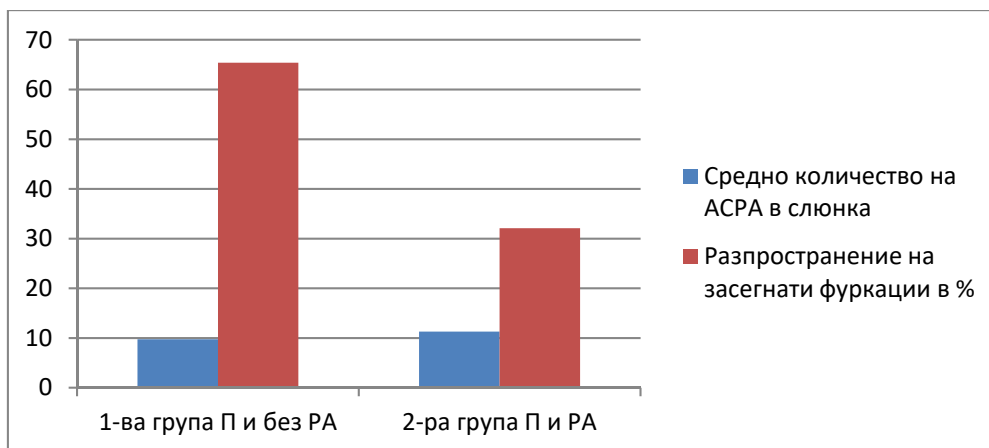
Фигура 7. Средни нива на АСРА в слюнка и средна дълбочина на пародонталните джобове (PD средно) в 1-ва група пациенти с П и без РА и 2-ра група пациенти с РА и П



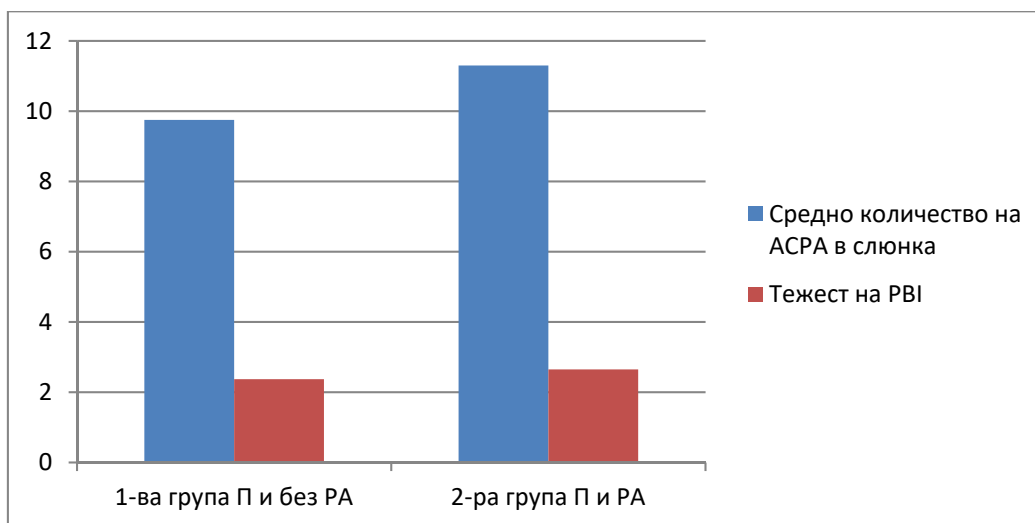
Фигура 8. Средни нива на АСРА в слюнка и брой на пародонталните джобове над 7 мм (PD > 7 мм) в 1-ва група пациенти с П и без РА и 2-ра група пациенти с РА и П



Фигура 9. Средни нива на АСРА в слюнка и процентно разпространение на засегнати фуркации (F) в 1-ва група пациенти с П и без РА и 2-ра група пациенти с РА и П

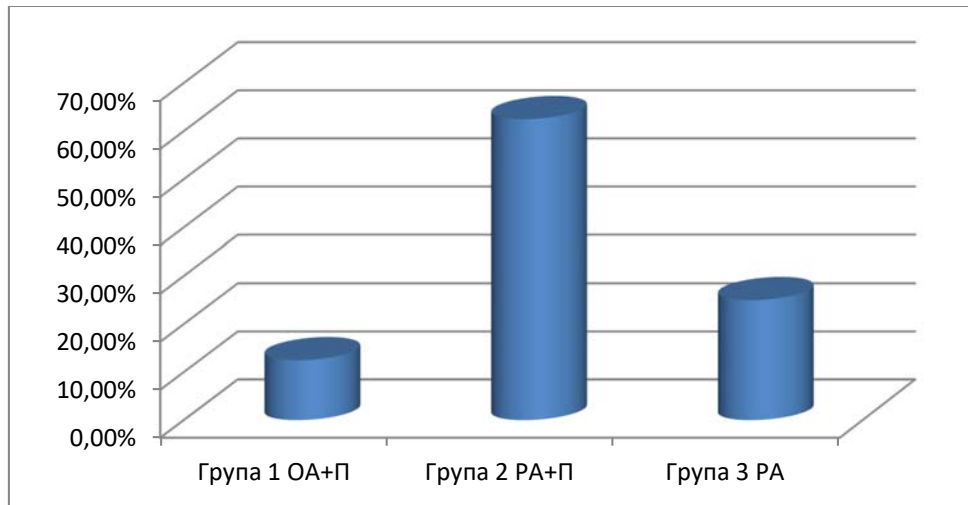


Фигура 10. Средни нива на АСРА в слюнка и тежест на РВІ в 1-ва група пациенти с П и без РА и 2-ра група пациенти с РА и П

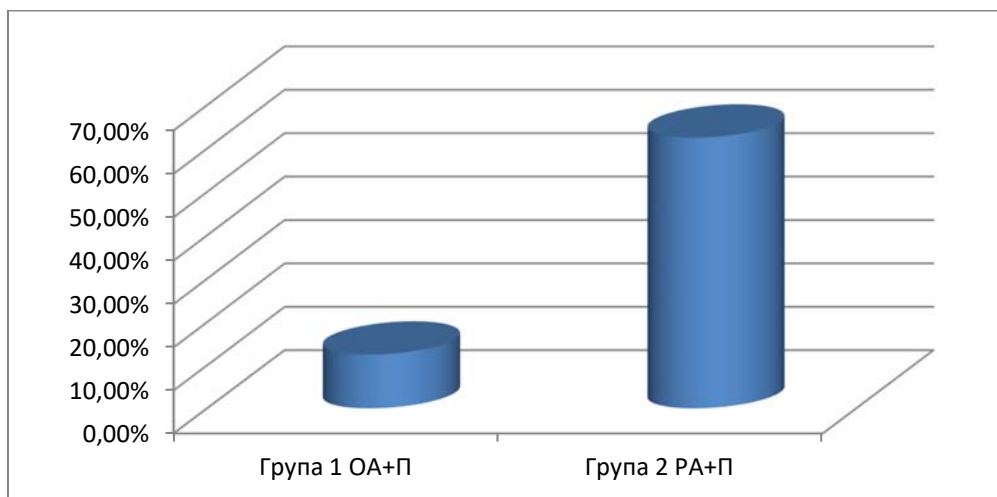


По задача 4

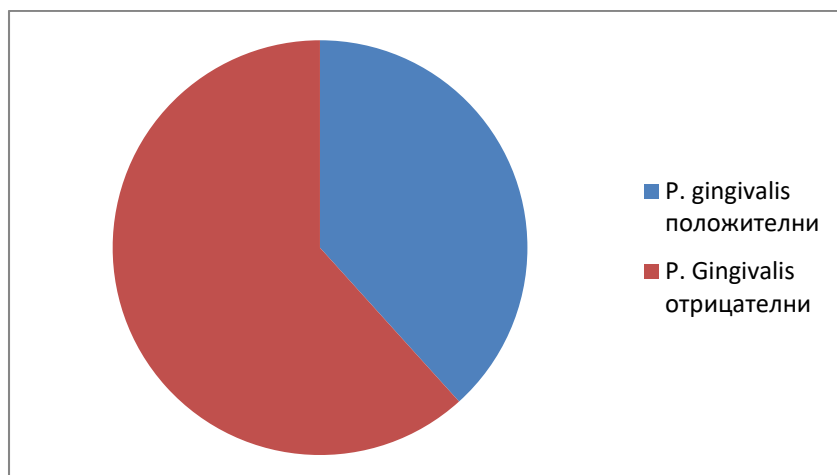
Фигура 11. Разпределение на положителните за *T. denticola* пациенти по групи диагнози



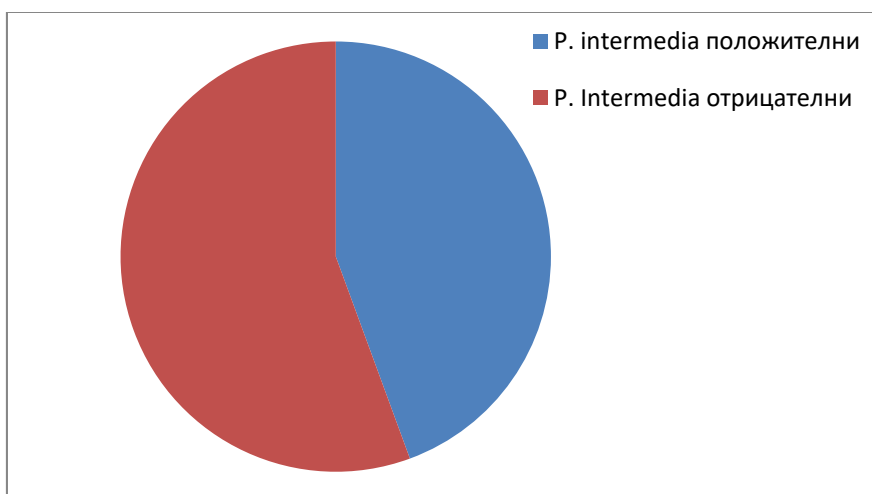
Фигура 12. Разпределение на положителните за *T. denticola* пациенти с пародонтит в зависимост от наличието на РА



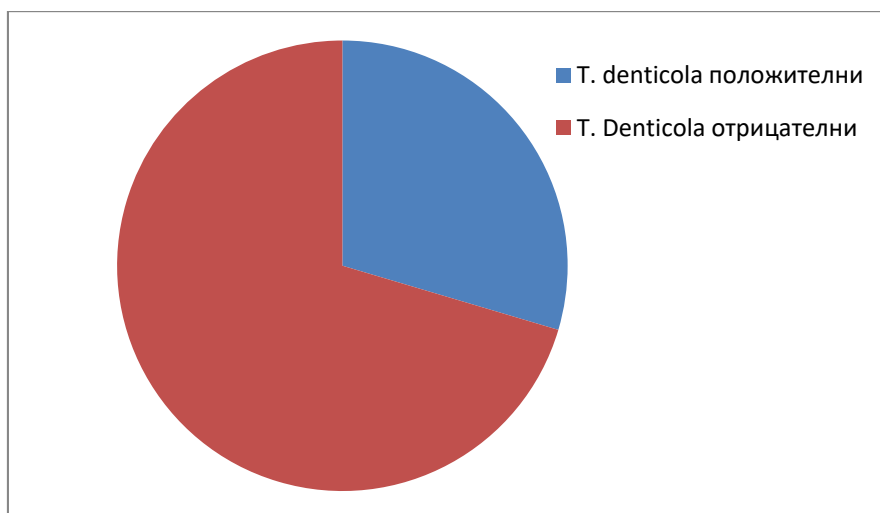
Фигура 13. Наличие на *P. gingivalis* в субгингивална плака при всички изследвани пациенти



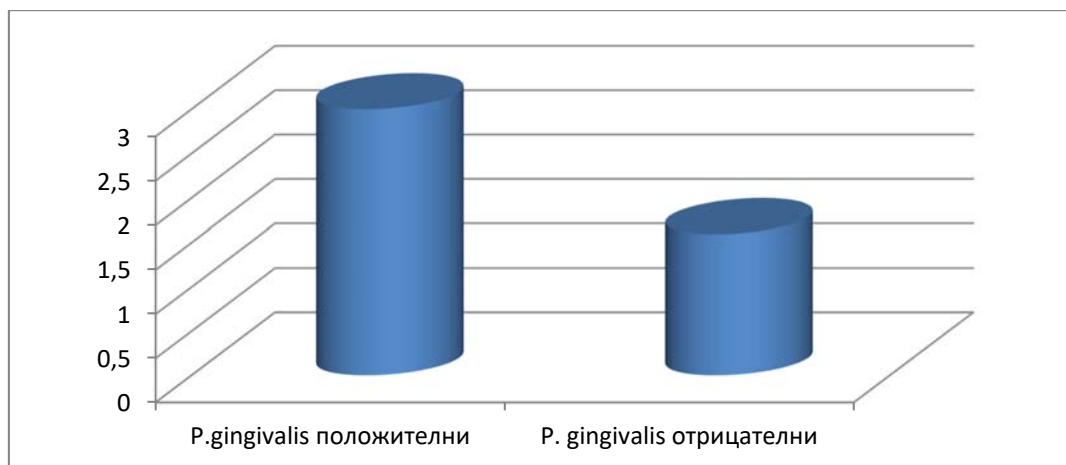
Фигура 14. Наличие на *P. intermedia* в субгингивална плака при всички изследвани пациенти



Фигура 15. Наличие на *T. denticola* в субгингивална плака при всички изследвани пациенти



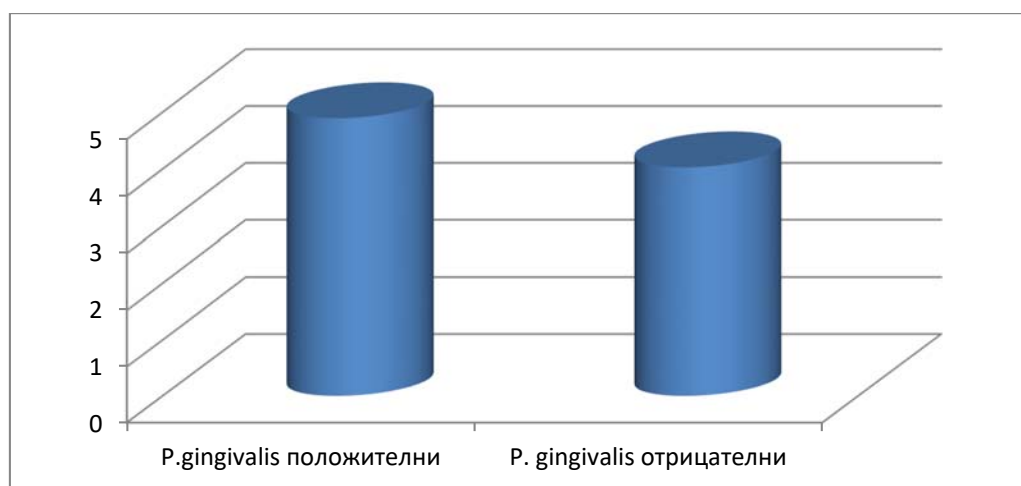
Фигура 16. Средна стойност на броя зъби с $5 \text{ mm} < \text{PD} < 7 \text{ mm}$ при положителни и отрицателни за *P. gingivalis* в субгингивална плака пациенти с пародонтит



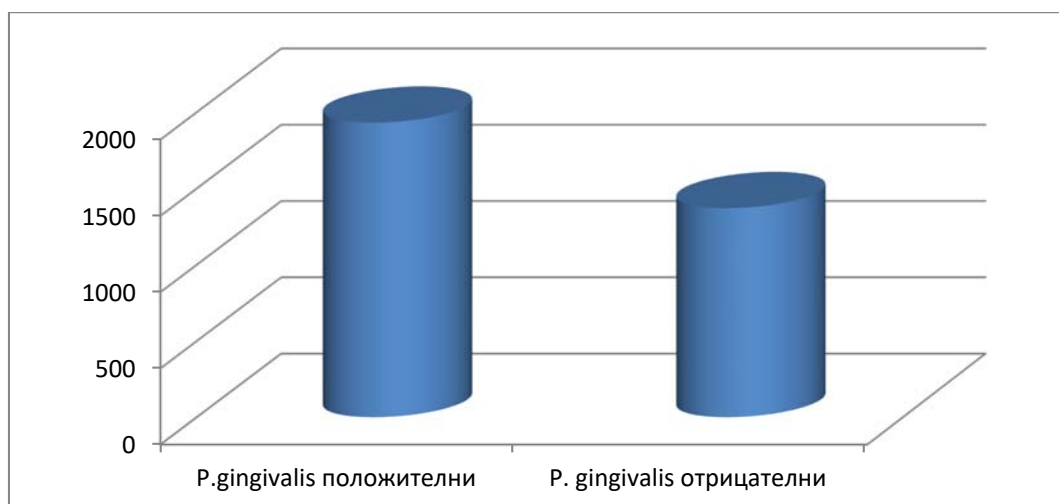
Фигура 17. Средна стойност на PD в мм при положителни и отрицателни за *P. gingivalis* в субгингивална плака пациенти с пародонтит



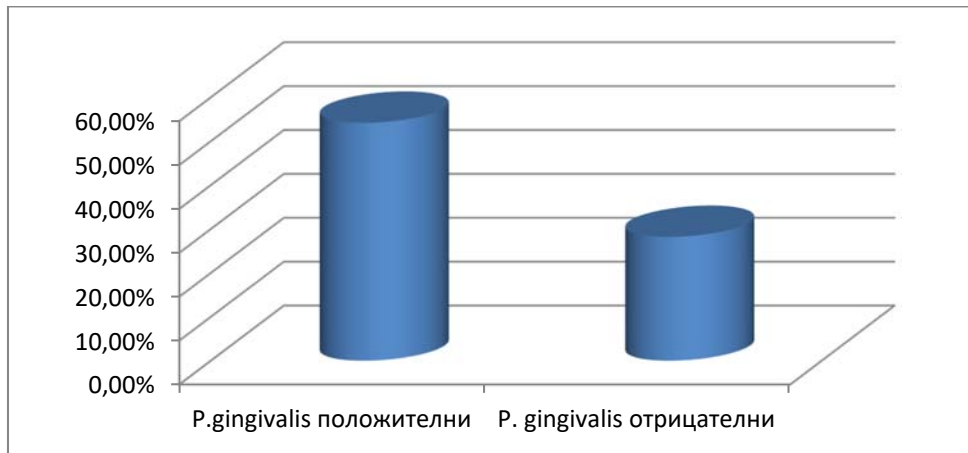
Фигура 18. Средна стойност на CAL в мм при положителни и отрицателни за *P. gingivalis* в субгингивална плака пациенти с пародонтит



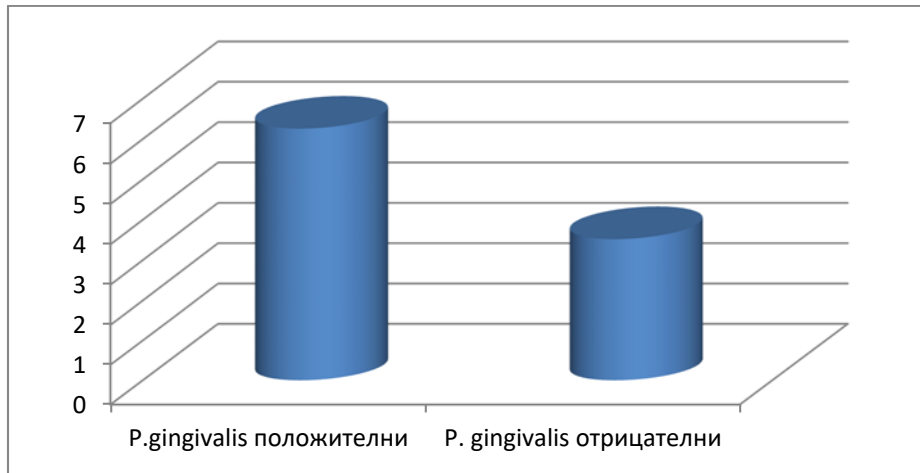
Фигура 19. Средни стойности на PISA при положителни и отрицателни за *P. gingivalis* в субгингивална плака пациенти с пародонтит



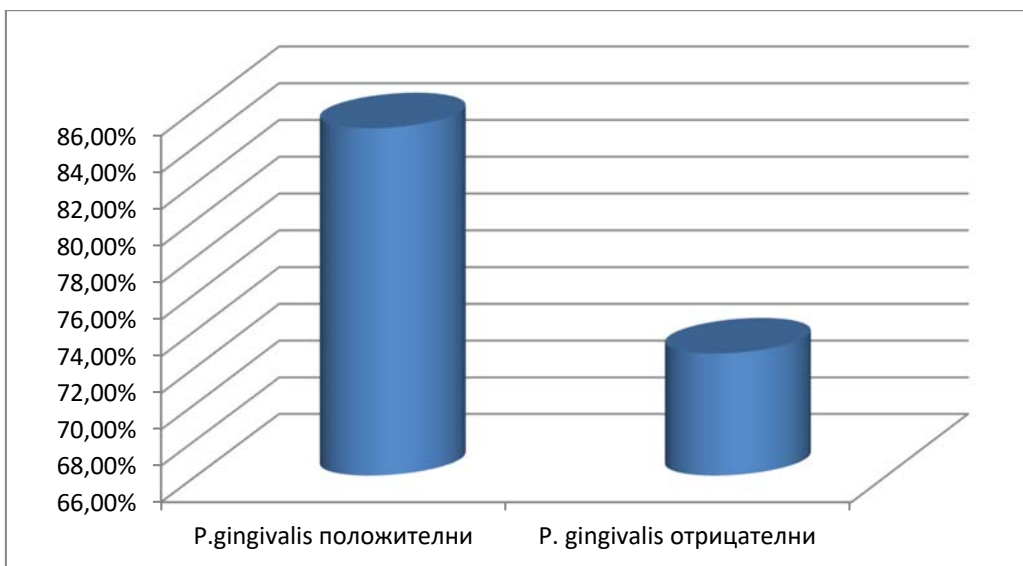
Фигура 20. Честота на засягане на фуркации (F) при положителни и отрицателни за *P. gingivalis* в субгингивална плака пациенти с пародонтит



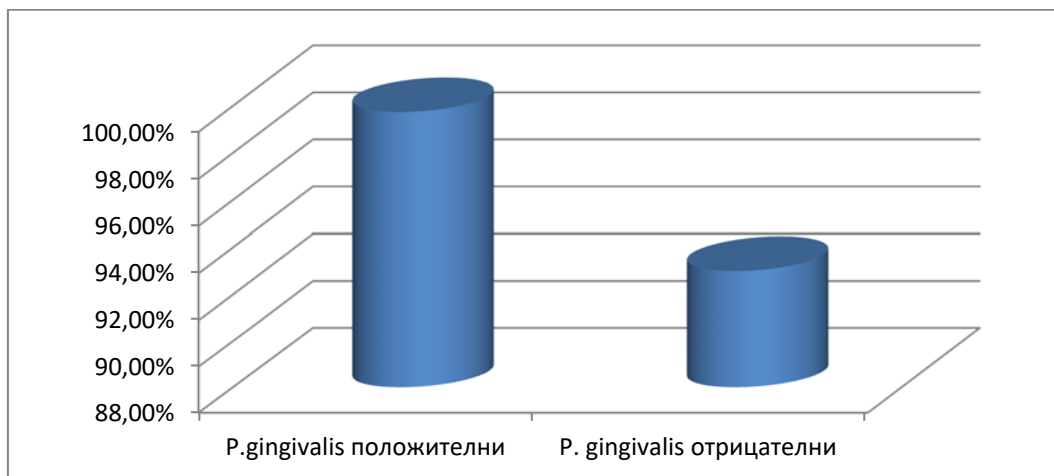
Фигура 21. Средна стойност на броя зъби с рецесии (R) при положителни и отрицателни за *P. gingivalis* в субгингивална плака пациенти с пародонтит



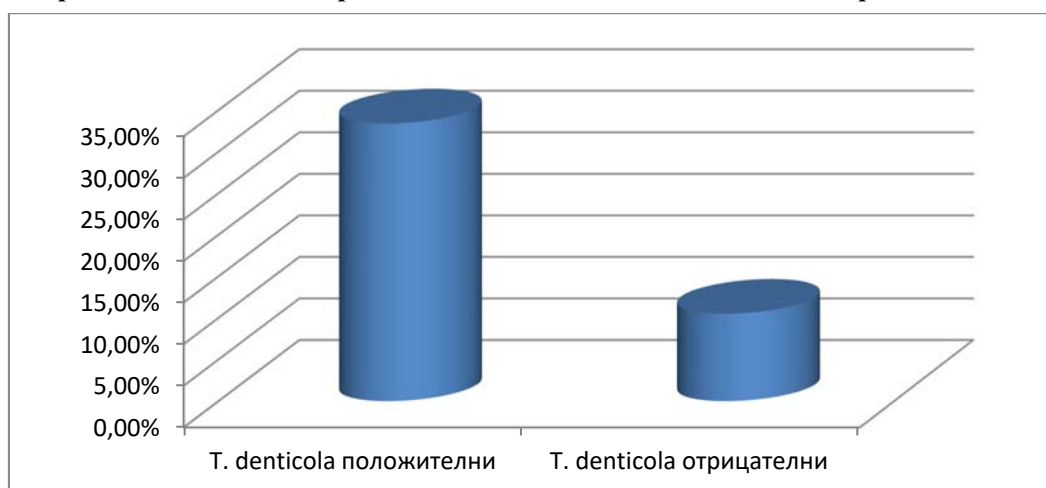
Фигура 22. Средна стойност на разпространението на кървене при сондиране ВоР при положителни и отрицателни за *P. gingivalis* в субгингивална плака пациенти с пародонтит



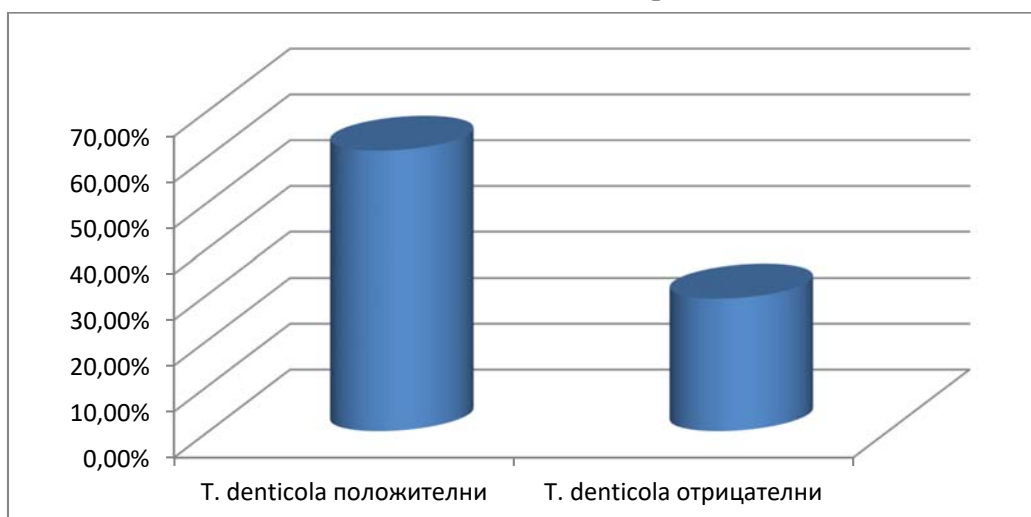
Фигура 23. Средна стойност на разпространението на повърхностното гингивално кървене (PBI) при положителни и отрицателни за *P. gingivalis* в субгингивална плака пациенти с пародонтит



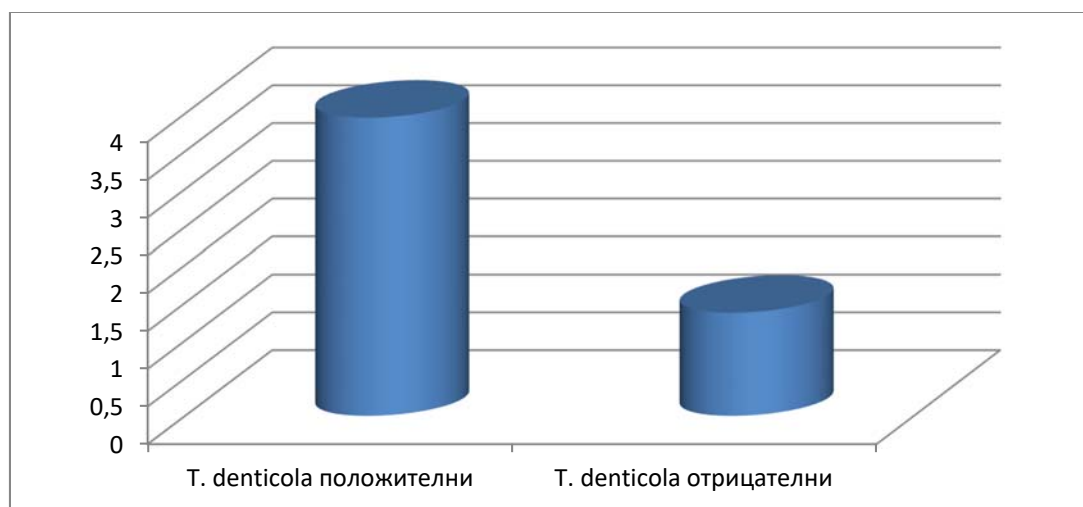
Фигура 24. Честота на разпространение на броя пародонтални джобове над 7 мм при положителни и отрицателни за *T. denticola* пациенти с пародонтит



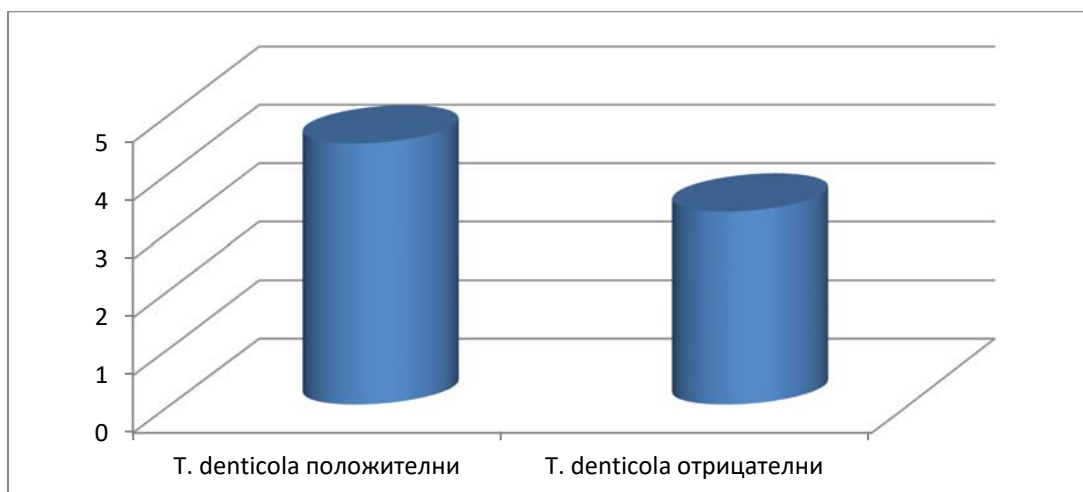
Фигура 25. Честота на засягане на фуркации (F) при положителни и отрицателни за *T. denticola* пациенти с пародонтит



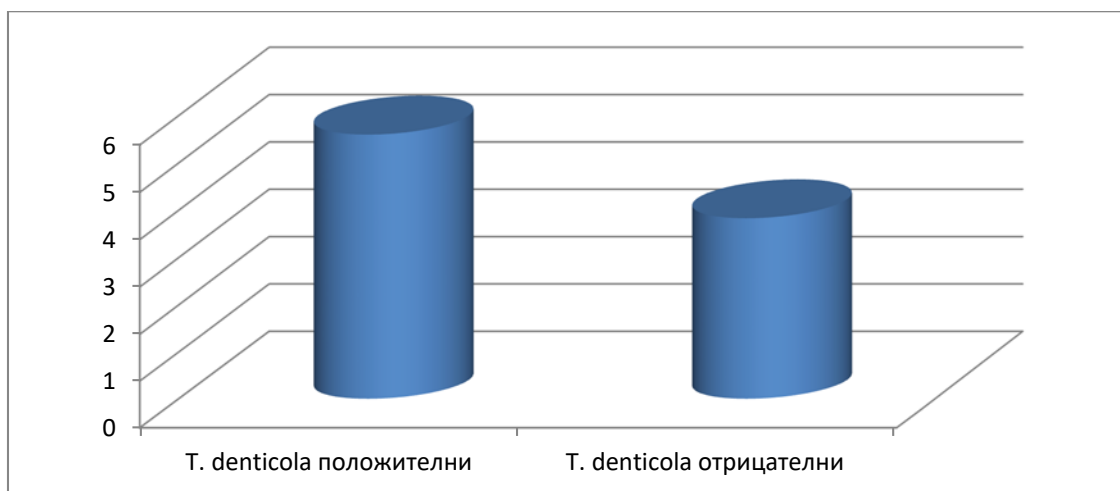
Фигура 26. Среден брой зъби с $5\text{ mm} < \text{PD} < 7\text{ mm}$ при положителни и отрицателни за *T. denticola* пациенти с пародонтит



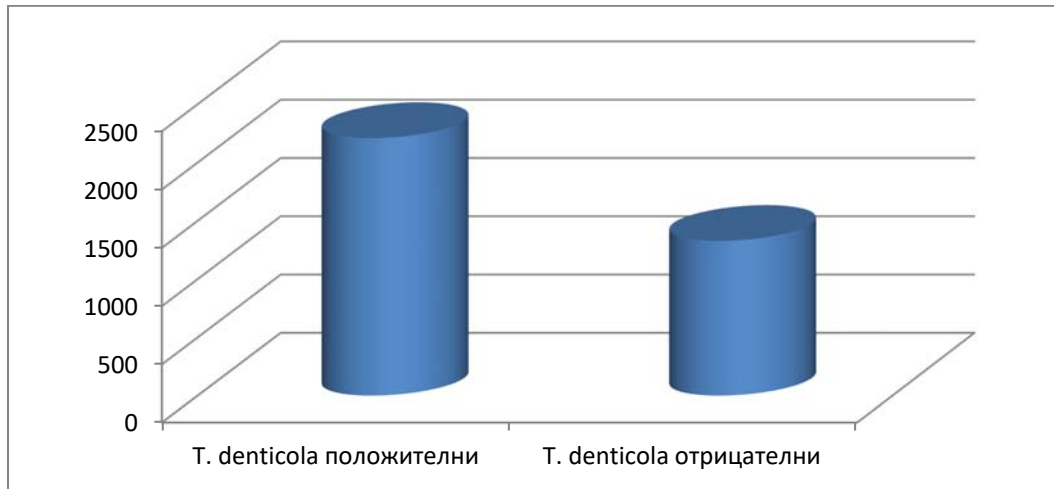
Фигура 27. Средна стойност на PD в мм при положителни и отрицателни за *T. denticola* пациенти с пародонтит



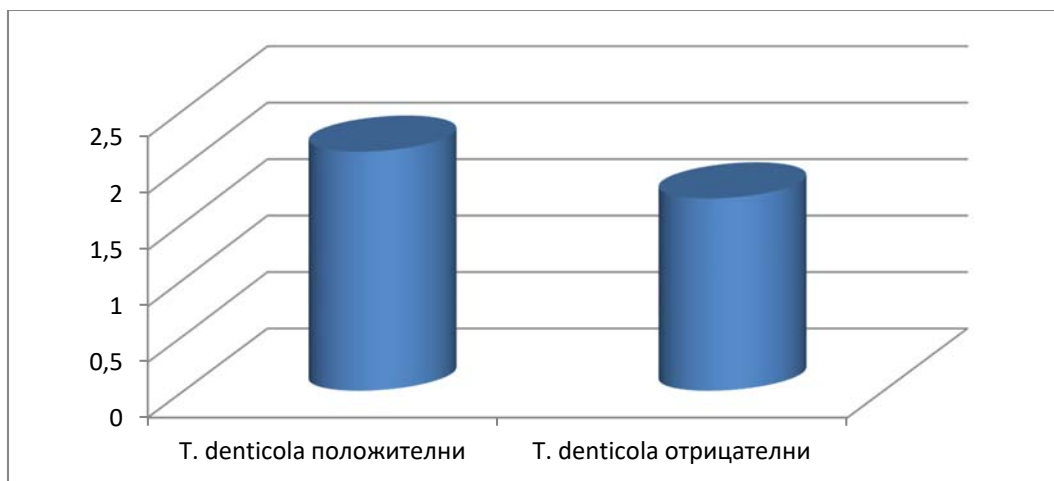
Фигура 28. Средна стойност на CAL в мм при положителни и отрицателни за *T. denticola* пациенти с пародонтит



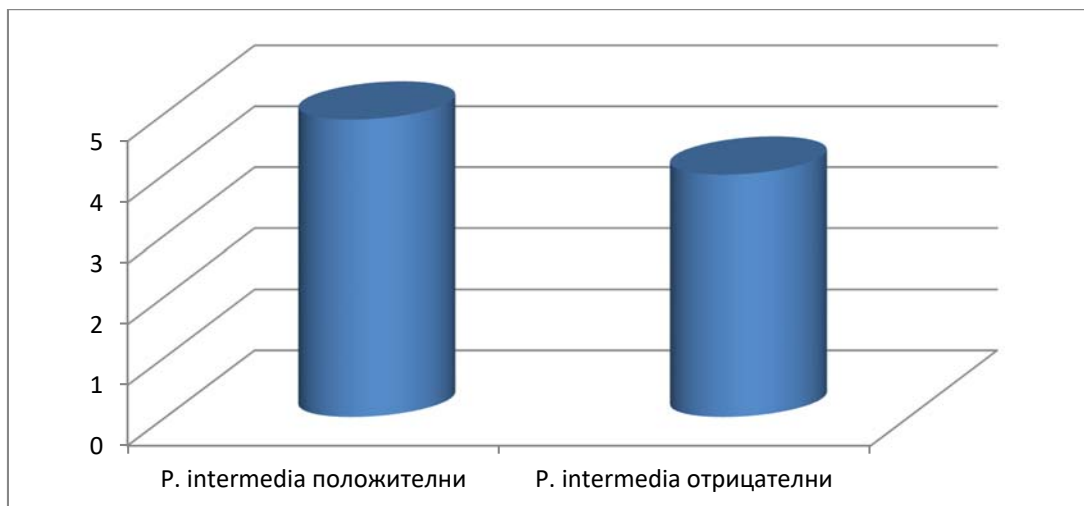
Фигура 29. Средни стойности на PISA при положителни и отрицателни за *T. denticola* пациенти с пародонтит



Фигура 30. Средна стойност на тежестта на повърхностното гингивално кървене (PBI) при положителни и отрицателни за *T. denticola* пациенти с пародонтит.



Фигура 31. Средна стойност на CAL в мм при положителни и отрицателни за *P. intermedia* пациенти с пародонтит



По задача 5

Таблица 6. Средни стойности на дълбочина на пародонталния джоб (PD) в зависимост от генотипа FcgRIIIa-158V/F при пациентите с пародонтит от 1-ва и 2-ра група

Генотип	Средна стойност на PD	Стандартно отклонение	P-стойност
FcgRIIIa-158V/F			
FcgRIIIa-158VV	3,22	± 1,823	0,019
FcgRIIIa-158VF	4,17	± 1,845	

Таблица 7. Среден брой на пародонталните джобове между 5-7 мм (PD 5-7 мм) в зависимост от генотипа FcgRIIIa-158V/F при пациентите с пародонтит от 1-ва и 2-ра група

Генотип	Среден брой на PD 5-7 мм	Стандартно отклонение	P-стойност
FcgRIIIa-158V/F			
FcgRIIIa-158VV	2,85	± 4,749	0,092
FcgRIIIa-158VF	5,00	± 6,459	

Таблица 8. Средни стойности на разпространението на кървенето при сондиране (BoP) в зависимост от генотипа FcgRIIIa-158V/F при пациентите с пародонтит от 1-ва и 2-ра група

Генотип	Средни стойности на разпространение на BoP (%)	Стандартно отклонение	P-стойност
FcgRIIIa-158V/F			
FcgRIIIa-158VV	64,09	± 38,715	0,061
FcgRIIIa-158VF	81,52	± 29,520	

Таблица 9. Средни стойности на разпространението на повърхностното гингивално кървене (PBI) в зависимост от генотипа FcgRIIIa-158V/F при пациентите с пародонтит от 1-ва и 2-ра група

Генотип	Средни стойности на разпространение на PBI (%)	Стандартно отклонение	P-стойност
FcgRIIIa-158V/F			
FcgRIIIa-158VV	77,56	± 36,160	0,093
FcgRIIIa-158VF	93,04	± 23,048	

Таблица 10. Средни стойности на RF в серума в зависимост от генотипа FcgRIIIa-158V/F при пациентите от 2-ра група с П и РА

Генотип	Средни стойности на разпространение на RF	Стандартно отклонение	P-стойност
FcgRIIIa-158V/F			
FcgRIIIa-158VV	34.03	± 26.260	0,079
FcgRIIIa-158VF	141.80	±173.940	

Таблица 11. Средни стойности на дълбочина на пародонталния джоб (PD) в зависимост от генотипа FcgRIIIa-158VV и фактора тютюнопушене при пациентите с пародонтит от 1-ва и 2-ра група

Генотип	Средна стойност на PD	Стандартно отклонение	P-стойност
FcgRIIIa-158V/F			
FcgRIIIa-158VV пушачи	4,51	± 1,422	< 0,001
FcgRIIIa-158VV непушачи	2,59	± 1,666	

Таблица 12. Разпространение на кървенето при сондиране (BoP) в зависимост от генотипа FcgRIIIa-158VV и фактора тютюнопушене при пациентите с пародонтит от 1-ва и 2-ра група

Генотип	Средна стойност на разпространение на BoP (%)	Стандартно отклонение	P-стойност
FcgRIIIa-158V/F			
FcgRIIIa-158VV пушачи	90,56	± 19,332	< 0,001
FcgRIIIa-158VV непушачи	51,09	± 39,319	

Таблица 13. Разпространение на повърхностното гингивално кървене (PBI) в зависимост от генотипа FcgRIIIa-158VV и фактора тютюнопушене при пациентите с пародонтит от 1-ва и 2-ра група

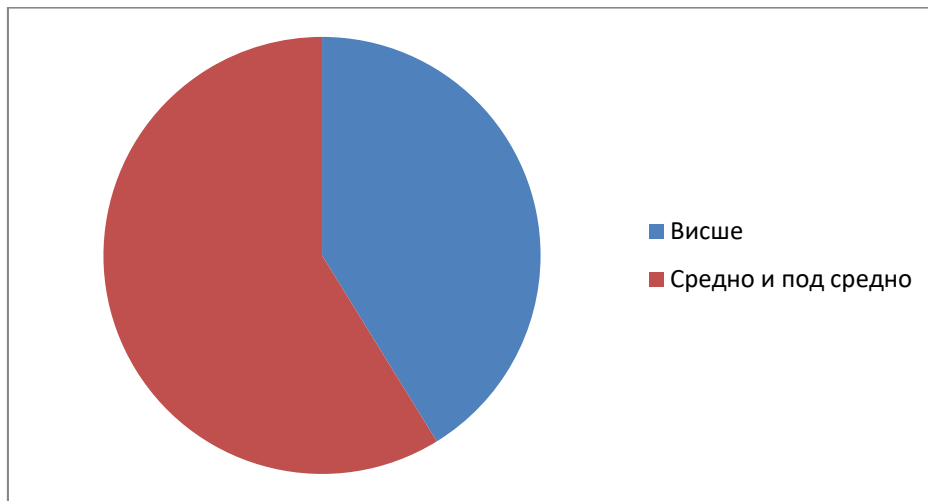
Генотип	Средна стойност на PBI%	Стандартно отклонение	P-стойност
FcgRIIIa-158V/F			
FcgRIIIa-158VV пушачи	100	±0.000	< 0,001
FcgRIIIa-158VV непушачи	66.55	±39.825	

Таблица 14. Среден брой на плитките пародонталните джобове < 3 мм (PD < 3 мм) в зависимост от генотипа FcgRIIIa-158VV и фактора тютюнопушене при пациентите с пародонтит от 1-ва и 2-ра група

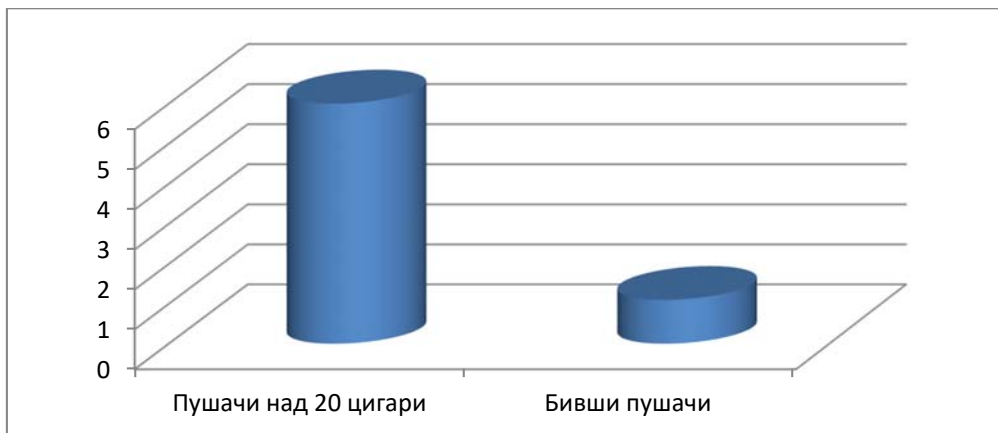
Генотип	Среден брой на PD < 3 мм	Стандартно отклонение	P-стойност
FcgRIIIa-158V/F			
FcgRIIIa-158VV пушачи	5,96	± 10,991	< 0,001
FcgRIIIa-158VV непушачи	17,98	± 12,541	

По задача 6

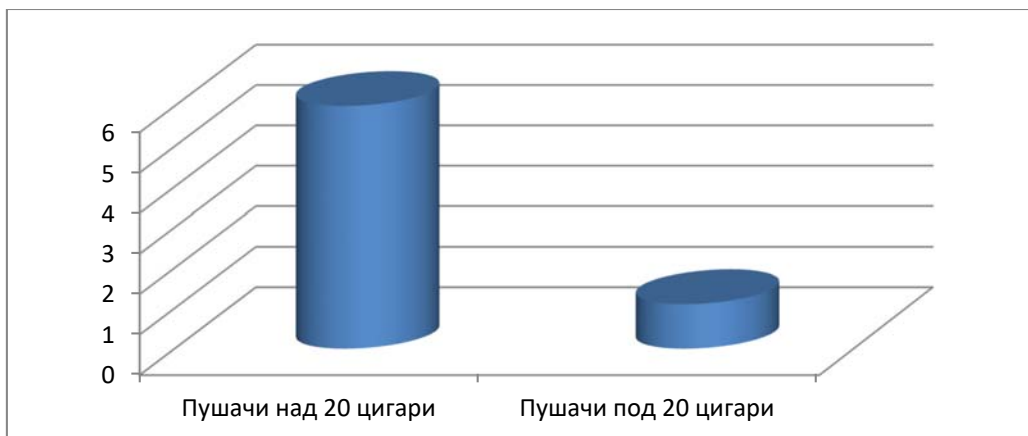
Фигура 32. Разпределение на всички изследвани пациентите според фактора образование



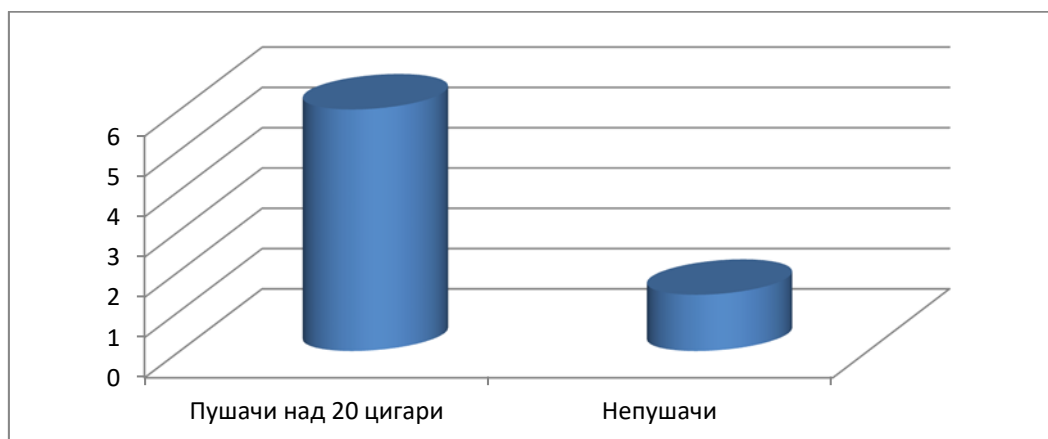
Фигура 33. Средна стойност на броя пародонтални единици с PD > 5 мм и < 7 мм при пушачи (над 20 цигари) и бивши пушачи с пародонтит



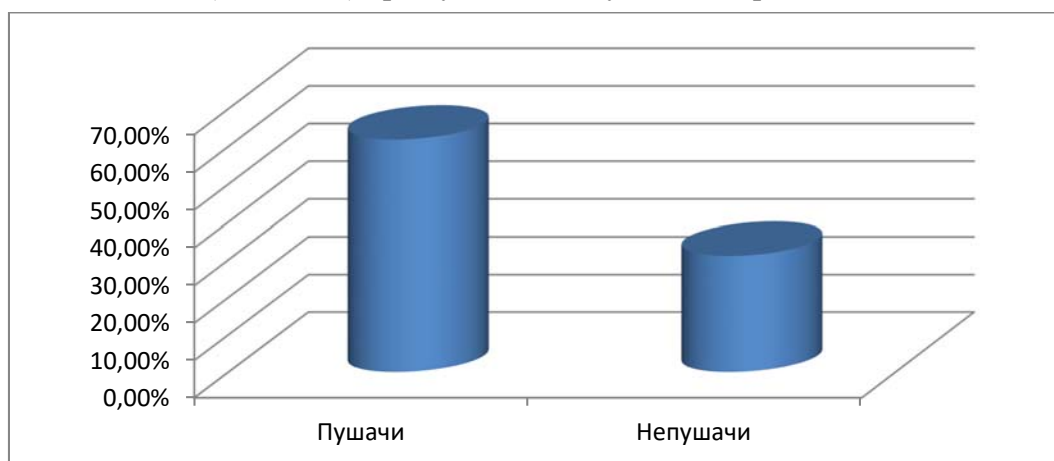
Фигура 34. Средна стойност на броя пародонтални единици с PD > 5 мм и < 7 мм при пушачи (над 20 цигари) и пушачи (под 20 цигари) с пародонтит



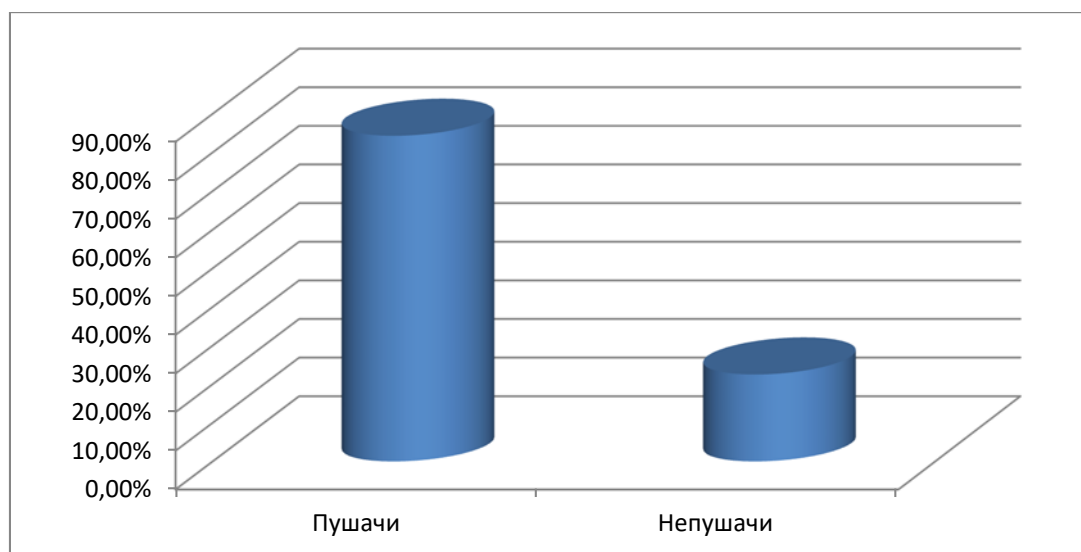
Фигура 35. Средна стойност на броя пародонтални единици с PD > 5 мм и < 7 мм при пушачи (над 20 цигари) и непушачи с пародонтит



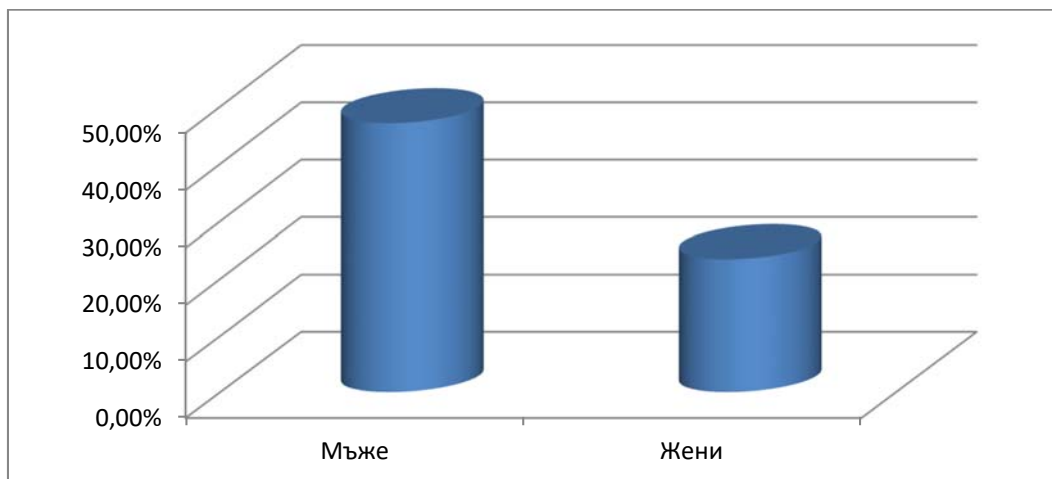
Фигура 36. Честота на разпределение на дълбоките пародонтални джобове над 7 мм (PD > 7 мм) при пушачи и непушачи с пародонтит



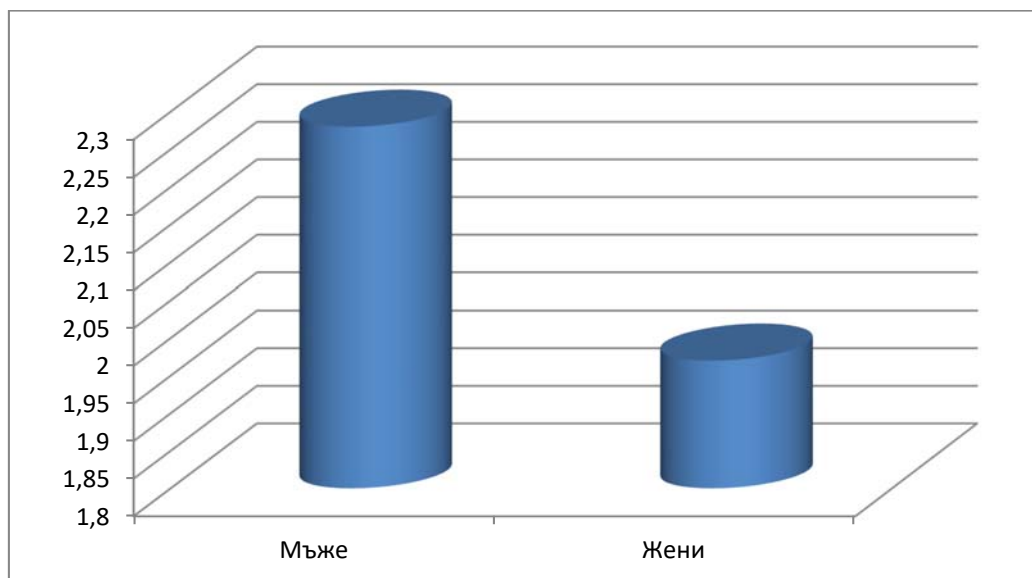
Фигура 37. Честота на засягане на фуркации (F2) при пушачи и непушачи с пародонтит



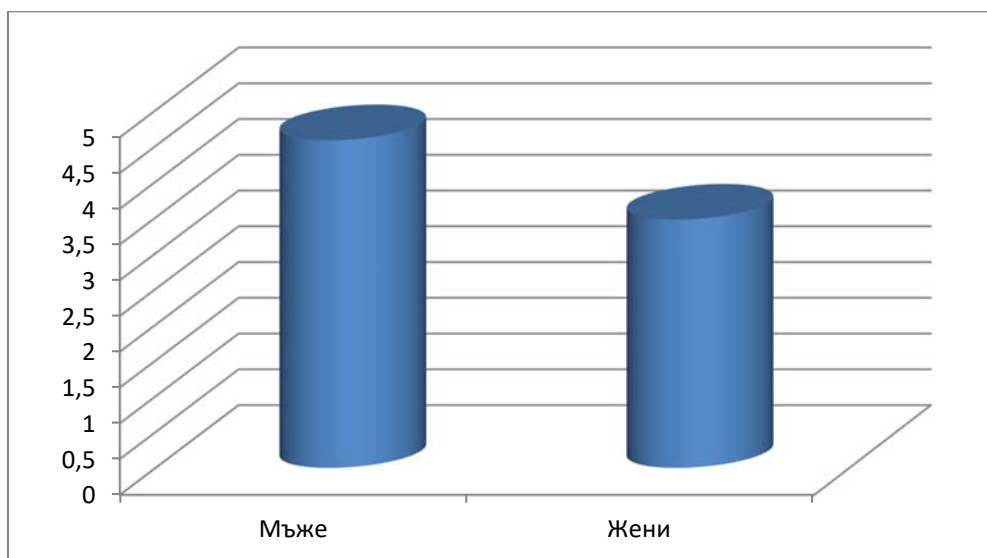
Фигура 38. Честота на засягане на фуркации при изследваните пациенти от двата пола



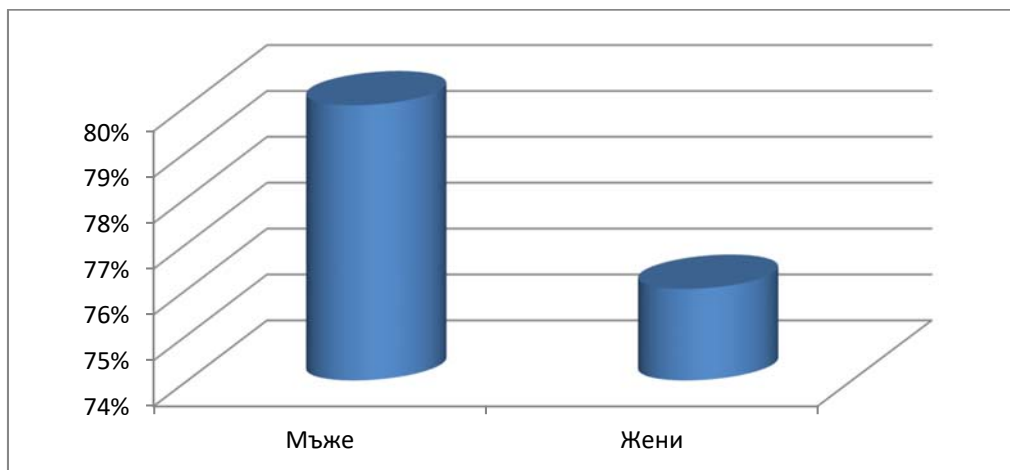
Фигура 39. Средна стойност на РВІ при изследваните пациенти от двата пола



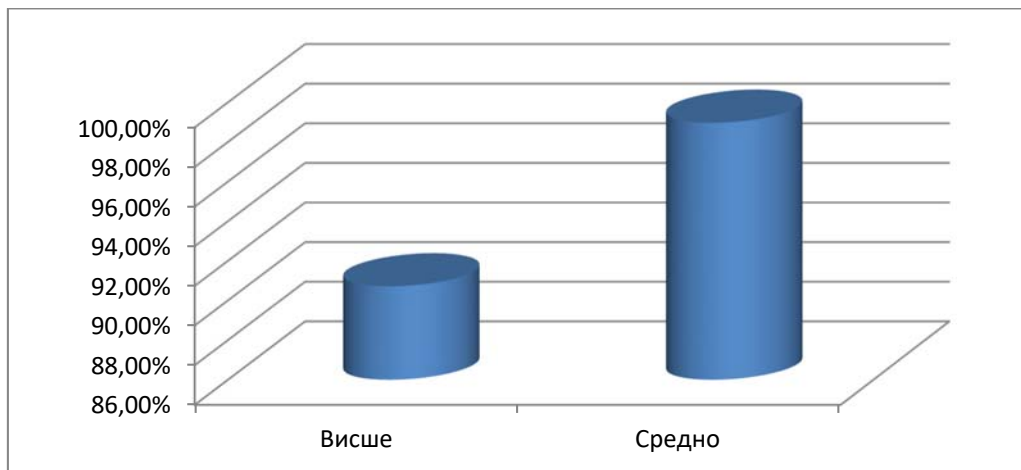
Фигура 40. Брой рецесии при изследваните пациенти от двата пола



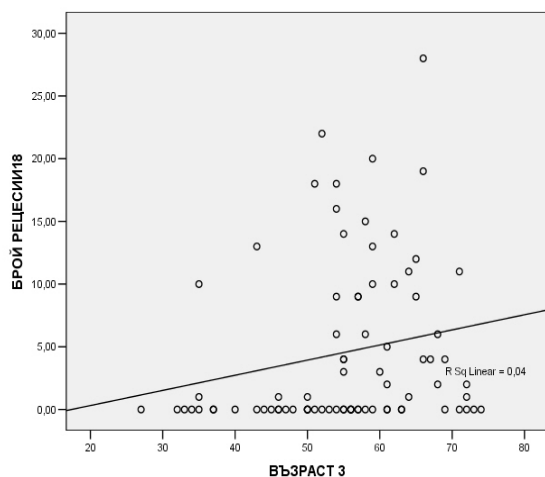
Фигура 41. Разпространение на VoP при изследваните пациенти от двата пола



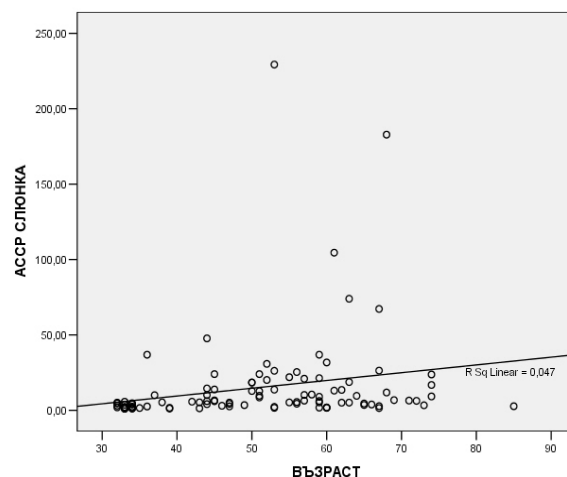
Фигура 42. Средна стойност в проценти на разпространение на РВІ при пациенти с висше образование и пародонтит спрямо тези с пародонтит и средно образование



Графика 3. Разпределението на броя на рецесията по отношение на възрастта при пациенти с пародонтит



Графика 4. Зависимост между възрастта и количеството АСРА в слюнка



ПРИЛОЖЕНИЕ 2

Анкетно-клинична карта №.....

1. Име.....
2. Пол М Ж
3. Възраст.....
4. Адрес.....
Тел.....
5. Образование.....
6. Вредни навици:
- 6.1. Тютюнопушене:
- никога
- бивш пушач
- настоящ пушач
- под 20 цигари на ден
- над 20 цигари на ден
- 6.2. Употреба на алкохол
- не или в малки количества
- прекомерно
- 6.3. Употреба на наркотици
- Да
- Не
7. Психоемоционален стрес
- | Да | Не |
|----|-----------------------------|
| | Смърт на близък човек |
| | Развод |
| | Напрежение при изпити |
| | Неудовлетвореност от работа |
| | Други |

8. Придружаващи заболявания и състояния:

- Белодробни заболявания
- Обменни и ендокринни заболявания
 - Диабет
 - Заболявания на щитовидната и паращитовидната жлеза
 - Хипоадренкортицизъм
- Кръвни заболявания
- Бъбречни заболявания и хемодиализа
- Чернодробни заболявания
- Ревматоидни заболявания
 - Ревматоиден артрит
 - кога е диагностициран.....
 - Остеоартроза
- Органна трансплантация или подготвяне за органна трансплантация
- Рак
- Антиракова терапия
- Бременност или кърмене
- Заболявания на слюнчените жлези
- Възпалителни заболявания на червата
- Инфекциозни заболявания
 - Вирусни хепатити
 - Инфекции, предавани по полов път
 - Туберкулоза
- Пародонтален абсцес
- Имуносупресивна терапия
- Антибиотична профилактика на инфекциозен ендокардит
- Заболявания на оралната лигавица – афтози, лихен планус, левкоплакия, рак на устата
- Остро заболяване в момента – температура, възпалено гърло, болки в мускулите, диария.

9. Системна медикация.

Лекарствено средство	Доза

XIV. БИБЛИОГРАФИЯ

1. Болярова Т. Връзка на пародонталните заболявания с общи заболявания и състояния (обзор). С., Обща медицина, 2016, 1.
2. Болярова Т, Петкова С. Определяне на концентрациите на някои маркери на възпаление и деструкция в слюнка и гингивален ексудат за диагноза на пародонталните заболявания (обзор). Обща медицина, 2016, 4.
3. Георгиев Цв, Иванова М, Кабакчиева Пл, Коларов Зл, Стоилов Р. Остеоартроза: Класификация, патогенеза, етиология, клинична картина и лечение. TopMedica, 2016, 7(4), 18-23.
4. Коларов Зл. Съвременни аспекти в патогенезата на ревматоидния артрит. Университетско издателство "Св. Климент Охридски", 1997.
5. Коларов Зл. Клиноко-генетични и имунологични проучвания при ревматоиден артрит, Док. дис., София, 2000.
6. Коларов Зл, Шумналиева Р. Ревматоиден артрит – нови диагностични и терапевтични методи. – Health.bg, 2014, 12(1), 39-43.
7. Шумналиева Р, Монов С, Коларов Зл. Епигенетични модификации в патогенезата на ревматоиден артрит. MEDINFO, май 2016, 42-47.
8. Abrahams VM, Cambridge G et al. Induction of tumor necrosis factor a production by adhered human monocytes: a key role for Fcg receptor type IIIA in rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum, 2000, 43, 608-16.
9. Agrawal S, Misra R, Aggarwal A. Autoantibodies in rheumatoid arthritis: association with severity of disease in established RA. Clin Rheumatol, 2007, 26(2), 201-4.
10. Aho K, Heliövaara M. Risk factors for rheumatoid arthritis. Ann Med, 2004, 36, 242-251.
11. Aletaha D, et al. Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. Arthritis Rheum., 2010, 62(9), 2569-81.
12. Altman LC, Baker C et al. Neutrophil-mediated damage to human gingival epithelial cells. J Periodontal Res, 1992, 27, 70-79.
13. Andersen RB, Elling P. Immunofluorescent demonstration of intracellular fibrin in synovial tissue. Ann. Rheum. Dis. 1972, 31, 59-64.

14. Anerud A, Løe H, Boysen H. The natural history and clinical course of calculus formation in man. *J Clin Periodontol*, 1991, 18, 160-170.
15. Ansar Ahmed S, Penhale W, Talal N. Sex hormones, immune responses, and autoimmune diseases. Mechanisms of sex hormone action. *Am J Pathol*, 1985, 121, 531-551.
16. Appay V, van Lier RA et al. Phenotype and function of human T lymphocyte subsets: consensus and issues. *Cytometry A*, 2008, 73, 975-983.
17. Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol*. 1999,4,1-6.
18. Arnett F, et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*, 1988, 31, 3, 315-24.
19. Arvidson NG, Gudbjornsson B, Elfman L, et al. Circadian rhythm of serum interleukin-6 in Rheumatoid Arthritis. *Ann Rheum Dis*, 1994, 53(8), 521-524.
20. Avouac J, Gossec L, Dougados M. Diagnostic and predictive value of anti-cyclic citrullinated protein antibodies in rheumatoid arthritis: a systematic literature review. *Ann Rheum Dis*, 2006, 65, 845-851
21. Axelsson P, Paulander J, Lindhe J. Relationship between smoking and dental status in 35-, 50-, 65-, and 75-year-old individuals. *J Clin Periodontol*, 1998, 25, 297-305.
22. Ballini A, Tete S et al. The role of anti-cyclic citrullinated peptide antibody in periodontal disease. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2010,3,677-681.
23. Barbour SE, Nakashim K, et al. Tobacco and smoking: Environmental factors that modify the host response (immune system) and have an impact on periodontal health. *Crit Rev Oral Biol Med*, 1997, 8, 437-460.
24. Bartold M, Mariotti A. association between periodontitis and rheumatoid arthritis. *Periodontal disease and overall health: A clinician guide*. 2010, www.academia.edu.
25. Bartold PM, Marino V, et al. Effect of *Porphyromonas gingivalis*-induced inflammation on the development of rheumatoid arthritis. *J Clin Periodontol* 2010, 37, 405-411.
26. Bartold PM, Marshal RI, Haynes DR. Periodontitis and rheumatoid arthritis: a review. *J Periodontol*, 76, 2005, Suppl. 11S, 2066-74.
27. Beck J, Koch G et al. Prevalence and risk indicators for periodontal attachment loss in a population of older community-dwelling blacks and whites. *J Periodontol* 1990, 61, 521-528.
28. Behrens F, Himsel A, et al. Imbalance in distribution of functional autologous regulatory T cells in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*, 2007, 66, 1151-1156.

29. Bendtzen K, Morling N, et al. Association between HLA-DR2 and production of tumournecrosis factor alpha and interleukin 1 by mononuclear cells activated by lipopolysaccharide. *Scand J Immunol*, 1988, 28, 599-606.
30. Bengtsson C, Nordmark B, et al. Socioeconomic status and the risk of developing rheumatoid arthritis: results from the Swedish EIRA study. *Ann Rheum Dis*, 2005, 64, 1588-94.
31. Bennet KR, Read PC. Salivary immunoglobulin A levels in normal subjects, tobacco smokers, and patients with minor aphthous ulceration. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 1982, 53, 461-465.
32. Bergström J, Eliasson S. Cigarette smoking and alveolar bone height in subjects with high standard of oral hygiene. *J Clin Periodontol*, 1987, 14, 466-469.
33. Bergström J, Eliasson S. Noxious effect of cigarette smoking on periodontal health. *J Periodont Res*, 1987, 22, 513-517.
34. Bergstrom J, Preber H. Tobacco use as a risk factor. *J Periodontol* 1994,65,545-550.
35. Bergström J. Cigarette smoking as risk factor in chronic periodontal disease. *Community Dent Oral Epidemiol*, 1989, 17, 245-247.
36. Bergström J. Cigarette smoking as a risk factor in chronic periodontal disease. *Community Dent Oral Epidemiol*, 1989, 17, 245-247.
37. Bergström J, Eliasson S. Cigarette smoking and alveolar bone height in subjects with a high standard of oral hygiene. *J Clin Periodontol*, 1987, 14, 466-469.
38. Bienvenu JAD, Monneret G, Gutowski MC, Fabien N. Cytokine assays in human sera and tissues. *Toxicology*, 1998, 129(1), 55-61.
39. Billings M, Holtfreter B, et al. Age-dependent distribution of periodontitis in two countries: findings from NHANES 2009-2014 and SHIP-Trend 2008-2012. *J Periodontol*, 2018, 89(1), 140-158.
40. Blom AB, van Lent PL, van Vuuren H, et al. Fc gamma R expression on macrophages is related to severity and chronicity of synovial inflammation and cartilage destruction during experimental immune-complex-mediated arthritis (ICA). *Arthritis Res*, 2000, 2, 489-50.
41. Bluml S, Bonelli M, et al. Essential role of microRNA-155 in the pathogenesis of autoimmune arthritis in mice. *Arthritis Rheum*, 2011, 63, 1281-8.
42. Bogliolo L, Alpini C, et al. Antibodies to cyclic citrullinated peptides in psoriatic arthritis. *J Rheumatol*, 2005, 32, 511-515.

43. Boillot A, El Halabi B, et al. Education as a Predictor of Chronic Periodontitis: A Systematic Review with Meta-Analysis Population-Based Studies. *PlosOne*, 2011.
44. Bolin A, Lavstedt S, et al. Proximal alveolar bone loss in a longitudinal radiographic investigation. IV. Smoking and some other factors influencing the progress in individuals with at least 20 remaining teeth. *Acta Odontol Scand* 1986,44,263-269.
45. Bolyarova T, Marina M, Tolchkov V, Baev B. *P. gingivalis* Isolation from Subgingival Dental Plaque and Atheromatous Plaque among Patients with Chronic Periodontitis, with or without Coronary Heart Disease. *Comptes rendus de l'Academie Bulgare des Sciences*, 2014, 67(9), 1295-1301.
46. Bonagura VR, Artandi SE, et al. Mapping studies reveal unique epitopes on IgG recognized by rheumatoid arthritis-derived monoclonal rheumatoid factors. *J Immunol*, 1993, 151, 3840-3852.
47. Bonfil JJ, Dillier FL, et al. A "case control" study on the role of HLA DR4 in severe periodontitis and rapidly progressive periodontitis. *J Clin Periodontol*, 1999, 26,77-84.
48. Bostanci N, Heywood W, Mills K, et al. Application of label-free absolute quantitative proteomics in human gingival crevicular fluid by LC/MS E (gingival exudatome). *J Proteome Res*, 2010, 9(5), 2191-9.
49. Brandtzaeg P. Immunochemical comparison of proteins in human gingival pocket, serum and saliva. *Arch Oral Biol*, 1965, 10, 795.
50. Brennan FM, McInnes IB. Evidence that cytokines play a role in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest*, 2008, 118, 3537-45.
51. Bright R, Proudman SM, Rosenstein ED, Bartold PM. Is there a link between carbamylation and citrullination in periodontal disease and rheumatoid arthritis? *Med Hypotheses*, 2015, 84(6), 570-6.
52. Burska A, Boissinot M, Ponchel F. Cytokines as Biomarkers in Rheumatoid Arthritis. *Mediators of Inflammation*. 2014, Article ID 545493, <http://dx.doi.org/10.1155/2014/545493>.
53. Burt B. Research, Science and Therapy Committee of the American Academy of Periodontology. Position paper: Epidemiology of periodontal diseases. *J Periodontol*, 2005, 76, 1406-1419.
54. Burt BA, Ismail AI, Morrison EC, Beltran ED. Risk factors for tooth loss over a 28-year period. *J Dent Res*, 1990, 69, 1126-1130.

55. Calkins CC, Platt K et al. Inactivation of tumor necrosis factor-alpha by proteinases (gingipains) from the periodontal pathogen, *Porphyromonas gingivalis*. Implications of immune evasion. *J Biol Chem*, 1998, 273, 6611-6614.
56. Cantaert T, Brouard S et al. Alterations of the synovial T cell repertoire in anti-citrullinated protein antibody-positive rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 2009, 60, 1944-56.
57. Cantagrel A, Navaux F, Loubet-Lescoulié P, et al. Interleukin-1beta, interleukin-1 receptor antagonist, interleukin-4, and interleukin-10 gene polymorphisms: relationship to occurrence and severity of rheumatoid arthritis. *Arthr Rheum*, 1999, 42, 1093-100.
58. Cantley MD, Haynes DR, et al. Pre-existing periodontitis exacerbates experimental arthritis in amouse model. *J Clin Periodontol*, 2011, 38, 532-541.
59. Cappellini R, et al. Genetic of leucocyte antigens a family study of segregation and linkage. In: *Histocompatibility testing*, Copenhagen, Munksgaard, 1967, 149-187.
60. Cardoso CR, Garlet GP, et al. Characterization of CD4+CD25+ natural regulatory T cells in the inflammatory infiltrate of human chronic periodontitis. *J Leuk Biol*, 2008, 84, 311-318.
61. Carson DA, Chen PP, Kipps TJ. New roles for rheumatoid factor. *J Clin Invest*, 1991, 87, 379-383.
62. Casali P, Burastero SE, et al. Human lymphocytes making rheumatoid factor and antibody to ssDNA belong to Leu-1+ B-cell subset. *Science*, 1987, 236, 77-81.
63. Cascao R, Rosario HS, et al. Neutrophils in rheumatoid arthritis: more than simple final effectors. *Autoimmun Rev*, 2010, 9, 531-535.
64. Caton JG, Armitage G, et al. A new classification scheme for periodontal and peri-implantdiseases and conditions – Introduction and key changesfrom the 1999 classification. *Periodontol*. 2018,89,1,1-8
65. Caton JG, Ciancio SG et al. Treatment with subantimicrobial dose doxycycline improves the efficacy of scaling and root planing in patients with adult periodontitis. *J Periodontol*, 2000, 71, 521-32.
66. Celenligil H, Eratalay K, et al. Periodontal status and serum antibody responses to oral microorganisms in Sjogren's syndrome. *J Periodontol*, 1998, 69, 571-577.
67. Cetinkaya B, Guzeldemir E, Ogus E, Bulut S. Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines in gingival crevicular fluid and serum of patients with rheumatoid arthritis and patients with chronic periodontitis. *J Periodontol*, 2013, 84, 84-93.

68. Chabaud M, Fossiez F, et al. Enhancing effect of IL-17 on IL-1-induced IL-6 and leukemia inhibitory factor production by rheumatoid arthritis synoviocytes and its regulation by Th2 cytokines. *J Immunol*, 1998, 161, 409-14.
69. Chavanas S, Takahara H. Comparative analysis of the mouse and human peptidylarginine deiminase gene clusters reveals highly conserved non-coding segments and a new human gene, PADI6. *Gene*, 2004, 330, 19-27.
70. Chiang AC, Massague J. Molecular basis of metastasis. *N Engl J Med*, 2008, 359, 2814-2823.
71. Chiller JM, Skidmore BJ, et al. Relationship of the Structure of Bacterial Lipopolysaccharides to Its Function in Mitogenesis and Adjuvanticity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1973, 70, 21-29.
72. Chong WP, Ip WK, Wong WH, et al. Association of interleukin-10 promoter polymorphisms with systemic lupus erythematosus. *Gen Immunol* 2004, 5, 484-492.
73. Clarke NG, Shephard BC, Hirsch RS. The effects of intra-arterial epinephrine and nicotine on gingival circulation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 1981, 52, 577-582.
74. Codd EE, Swim AT, Bridges RB. Tobacco smokers neutrophils are desensitized to chemotactic peptide-stimulated oxygen uptake. *J Lab Clin Med*, 1987, 110, 648-652.
75. Conrad K, Roggenbuck D, et al. Profiling of rheumatoid arthritis associated autoantibodies. *Autoimm Rev*, 2010, 9(6), 431-435.
76. Consensus Report: Chronic Periodontitis. 1999 International Workshop for a classification of Periodontal Diseases and Conditions. *Ann Periodontol*, 1999, 4, 38.
77. Cornish AL, Campbell IK, et al. G-CSF and GM-CSF as therapeutic targets in rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol*, 2009, 5, 554-9.
78. Correa JD, Madeira MFM, et al. Association between polymorphisms in interleukin-17A and -17F genes and chronic periodontal disease. *Mediators Inflamm*, 2012, 846052,9.
79. Costabel U, Bross KJ, et al. Alterations in immunoregulatory T-cell subsets in cigarette smokers. A phenotypic analysis of bronchoalveolar and blood lymphocytes. *Chest*, 1986, 90, 39-44.
80. Costenbader KH, Feskanich D, et al. Smoking intensity, duration and cessation and the risk of rheumatoid arthritis in women. *Am J Med*, 2006, 119, 503-511.
81. Cuesta IA, Sud S, et al. T-cell receptor (V beta) bias in the response of rheumatoid arthritis synovial fluid T cells to connective tissue antigens. *Scand J Rheumatol*, 1997, 26, 166-173.

82. Cutler CW, Kalmar JR, Genco CA. Pathogenic strategies of the oral anaerobe *Porphyromonas gingivalis*. *Trends Microbiol*, 1995, 3, 45-51.
83. Darveau R. Periodontitis: a polymicrobial disruption of host homeostasis. *Nat Rev Microbiol*, 2010, 8, 7, 481, 90.
84. Davidson A, Keiser HD, et al. Expression of rheumatoid factor idiotypes 17.109, 6B6.6, and 4C9 in the sera of Pima Indians. *Autoimmunity*, 1994, 18, 251-258.
85. De Pablo P et al. The autoantibody repertoire in periodontitis: a role in the induction of autoimmunity to citrullinated proteins in rheumatoid arthritis? *Ann Rheum Dis*, 2014, 73, 580-586.
86. De Pablo P, Dietrich T, McAlindon T. Association of periodontal disease and tooth loss with rheumatoid arthritis in the US population. *J Rheumatol*, 2008, 35, 70-76.
87. De Rycke L, Nicholas AP, et al. Synovial intracellular citrullinated proteins colocalizing with peptidyl arginine deiminase as pathophysiologically relevant antigenic determinants of rheumatoid arthritis-specific humoral autoimmunity. *Arthritis Rheum*, 2005, 52, 2323-2330.
88. De Waal Malefyt R, Yssel H, de Vries JE. Direct effects of IL-10 on subsets of human CD41 T cell clones and resting T cells. Specific inhibition of IL-2 production and proliferation. *J Immunol*, 1993, 150, 4754-4765.
89. Deguchi S, Hori T et al. Neutrophil-mediated damage to human periodontal ligament-derived fibroblasts: role of lipopolysaccharide. *J Periodontol Res*, 1990, 25, 293-299.
90. DeNardin A M, Sojar H T et al. Humoral immunity of older adults with periodontal disease to *Porphyromonas gingivalis*. *Infect. Immun*, 1991, 59, 4363-4370.
91. DeNardin E. The role of inflammatory and immunologic mediators in periodontitis and cardiovascular disease. *Ann. Periodontol*, 2001, 6, 30-40.
92. Detert J, Pischon N, et al. The association between rheumatoid arthritis and periodontal disease. *Arthr Res Ther*, 2010, 12, 218, 2-7.
93. Dissick A, Redman RS et al. Association of Periodontitis With Rheumatoid Arthritis: A Pilot Study. *J Periodontol*, 2010, 81(2), 223-230.
94. Doke M, Fukamachi H et al. Nucleases from *Prevotella intermedia* can degrade neutrophil extracellular traps. *Mol Oral Microbiol*, 2016, 2016, 288-300.
95. Dumonde DC, Glynn LE. The production of arthritis in rabbits by an immunological reaction to fibrin. *Br J Exp Pathol*, 1962, 43, 373-383.
96. Dunne J, Carson D, et al. IgA rheumatoid factor in the sera and saliva of patient with rheumatoid arthritis and Sjogren's syndrome. *Ann Rheum Dis*, 1979, 38, 161-165.

97. Ebersole JL, Machen RL et al. Systemic acute phase reactants, C-reactive protein and haptoglobin in adult periodontitis. *Clin Exp Immunol*, 1997, 107, 347-352.
98. Edwards JC, Szczepanski L, et al. Efficacy of B-cell-targeted therapy with rituximab in patients with rheumatoid arthritis. *N Engl J Med*, 2004, 350, 2572-81.
99. Eichel B, Shahrik HA. Tobacco smoke toxicity: Loss of human oral leukocyte function and fluid cell metabolism. *Science*, 1969, 166, 1424-1428.
100. El-Ghorab N, Marzec N, Genco R, Dziak R. Effect of nicotine and estrogen on IL-6 release from osteoblasts. *J Dent Res*, 1997, 76, 341-349.
101. Elkon KB, Gharavi AE, et al. IgA and IgM rheumatoid factors in serum, saliva and other secretions: relationship to immunoglobulin ratios in systemic sicca syndrome and rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol*, 1983, 52, 75-84.
102. Elter JR, Hinderliter AL, et al. The effects of periodontal therapy on vascular endothelial function: a pilot trial. *Am Heart J* 2006, 151, 47.
103. Emrich LJ, Schlossman M, Genco RJ. Periodontal disease in non-insulin dependent diabetes mellitus. *J Periodontol*, 1991, 62, 123-131.
104. Fabre S, Guisset C, Tatem L, et al. Protein biochip array technology to monitor rituximab in Rheumatoid Arthritis. *Clin Exp Immunol*, 2009, 155(3), 395-402.
105. Fang MA, Frost PJ, et al. Effects of nicotine on cellular function in UMR 106-01 osteoblast-like cells. *Bone*, 1991, 12, 283-286.
106. Fehr T, Bachmann MF et al. Role of repetitive antigen patterns for induction of antibodies against antibodies. *J Exp Med*, 1997, 185, 1785-1792.
107. Feldmann M, Brennan FM, Maini R N. Rheumatoid arthritis. *Cell*, 1996, 85, 307-10.
108. Fine DH, Patil AG, Loos BG. Classification and diagnosis of aggressive periodontitis. *J Periodontol*, 2018, 89(1), 103-119.
109. Foulquier C, Sebbag M, et al. Peptidyl arginine deiminase type 2 (PAD-2) and PAD-4 but not PAD-1, PAD-3, and PAD-6 are expressed in rheumatoid arthritis synovium in close association with tissue inflammation. *Arthritis Rheum*, 2007, 56, 3541-53.
110. Gangbar S, Overall CM, et al. Identification of polymorphonuclear leukocyte collagenase and gelatinase activities in mouthrinse samples: correlation with periodontal disease activity in adult and juvenile periodontitis. *J Periodontal Res*, 1990, 25, 257-67.
111. Gapski R, Barr JL, et al. Effect of systemic matrix metalloproteinase inhibition on periodontal wound repair: a proof of concept trial. *J Periodontol*, 2004, 75, 441-52.
112. Gargiulo A, Robinson J, et al. Identification of rheumatoid factor in periodontal disease. *J Periodontol*, 1982, 53(9), 568-577

113. Gargiulo A, Jr V, et al. Latex slide agglutination vs. ELISA system: Rheumatoid factor detection in inflamed human gingiva. *J. Periodont. Res.* 1985,20,31-34.
114. Garlet GP. Destructive and protective roles of cytokines in periodontitis: a re-appraisal from host defense and tissue destruction viewpoints (published online ahead of print Aug. 25, 2010). *J Dent Res*, 2010, 89(12), 1349-1363.
115. Gemmell E, Marshall RI, Seymour GJ. Cytokines and prostaglandins in immune homeostasis and tissue destruction in periodontal disease. *Periodontology*, 2000, 1997, 14, 112-143.
116. Genco R. Current view of risk factors for periodontal diseases. *J Periodontol*, 1996, 67, 1041-1049.
117. Genco, R. J., R. C. Williams, editors. *Periodontal disease and overall health: A clinician's guide*. 2nd edition. Copyright (C) by the Colgate-Palmolive Company, 2014.
118. Genovese MC, Van den Bosch F, et al. LY2439821, a humanized anti-interleukin-17 monoclonal antibody, in the treatment of patients with rheumatoid arthritis: a phase I randomized double-blind, placebo-controlled, proof-of-concept study. *Arthritis Rheum*, 2010, 62, 929-939.
119. Ginns LC, Goldenheim PD, Miller LG. T-lymphocyte subsets in smoking and lung cancer. Analyses of monoclonal antibodies and flow cytometry. *Am Rev Respir Dis* 1982,126,265-269.
120. Gleissner, C, Willershausen B, K"aaßer U, Bolten W W. The role of risk factors for periodontal disease in patients with rheumatoid arthritis. *Eur J Med Res*, 1998, 3, 387-392.
121. Göeb V, Jouen F, Gilbert D, et al. Diagnostic and prognostic usefulness of antibodies to citrullinated peptides. *Joint Bone Spine*, 2009, 76(4), 343-349.
122. Golub LM, Payne JB, et al. Can systemic diseases co-induce (not just exacerbate) periodontitis? A hypothetical "two-hit" model. *J Dent Res*, 2006, 85, 102-105.
123. Gottenberg JE, Mignot S, et al. Prevalence of anti-cyclic citrullinated peptide and anti-keratin antibodies in patients with primary Sjogren's syndrome. *Ann Rheum Dis*, 2005, 64, 114-117.
124. Graves DT, Cochran D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction. *J Periodontol*, 2003, 74, 391-401.
125. Greenwald RA, Kirkwood K. Adult periodontitis as a model for rheumatoid arthritis (with emphasis on treatment strategies) *J Rheumatol*, 1999, 26, 1650-1653.

126. Gregersten PK, Silver J, Winchester R. The shared epitope hypothesis. An approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 1987, 30, 1205-1213.
127. Gully N, Bright R, Porphyromonas gingivalis peptidylarginine deiminase, a key contributor in the pathogenesis of experimental periodontal disease and experimental arthritis. *PLoS ONE*, 2014, 9, e100838.
128. Gümüş P, et al. Gingival crevicular fluid, serum levels of receptor activator of nuclear factor- κ B ligand, osteoprotegerin, and interleukin-17 in patients with rheumatoid arthritis and osteoporosis and with periodontal disease. *J Periodontol*, 2013, 84(11), 1627-37.
129. Haber J. Cigarette smoking: A major risk factor for periodontitis. *Compend Continuing Educ Dent*, 1994, 15, 1002-1014.
130. Haber J, Wattles J, et al. Evidence for cigarette smoking as a major risk factor for Periodontitis. *J Periodontol*, 1993, 64, 16-23.
131. Hanada T, Yoshimura A. Regulation of cytokine signaling and inflammation. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2002, 13, 413-421.
132. Hara Y, Kaneko T, et al. Serum rheumatoid factor induced by intraperitoneal administration of periodontopathic bacterial lipopolysaccharide in mice. *J Periodont Res*, 1996, 31, 502-507.
133. Haringman JJ, Gerlag DM, et al. Synovial tissue macrophages: a sensitive biomarker for response to treatment in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*, 2005, 64, 834-8.
134. Harris ML, et al. Association of autoimmunity to peptidyl arginine deiminase type 4 with genotype and disease severity in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 2008, 58, 1958-1967.
135. Hart TC, Kornman KS. Genetic factors in the pathogenesis of periodontitis. *Periodontology 2000*, 1997, 14, 202-215.
136. Harvey GP, Fitzsimmons TR, et al. Expression of peptidylarginine deiminase-2 and -4, citrullinated proteins and anti-citrullinated protein antibodies in human gingiva. *J Periodontal Res*, 2013, 48, 252-261.
137. Hendler A, Mulli TK, et al. Involvement of autoimmunity in the pathogenesis of aggressive periodontitis. *J Dent Res*, 2010, 89, 1389-1394.
138. Henrotin YE, Bruckner P, Pujol JP. The role of reactive oxygen species in homeostasis and degradation of cartilage. *Osteoarthritis Cartilage*, 2003, 11, 747-755.

139. Hess A, Axmann R, et al. Blockade of TNF- α rapidly inhibits pain responses in the central nervous system. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108, 3731-6.
140. Hill J A, Southwood S, et al. The conversion of arginine to citrulline allows for a high-affinity peptide interaction with the rheumatoid arthritis-associated HLA-DRB1*0401 MHC class II molecule. *J Immunol*, 2003, 171, 538-541.
141. Hirsch HZ, Tarkowski A, et al. Local production of IgA- and IgM-rheumatoid factors in adult periodontal disease. *J Clin Immunol*, 1989, 9, 273-278.
142. Hoffman IE, Peene I, et al. Presence of rheumatoid factor and antibodies to citrullinated peptides in systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis*, 2005, 64, 330-332.
143. Hogben DN, Devey ME. Studies on rheumatoid factor: I. The effect of rheumatoid factor on the clearance of preformed immune complexes in mice. *Clin Exp Immunol*, 1986, 66, 648-653.
144. Hollander JL, McCarty DJ, et al. Studies on the pathogenesis of rheumatoid joint inflammation. I. The "R.A. cell" and a working hypothesis. *Ann Intern Med*, 1965, 62, 271-280.
145. Holm G. Smoking as an additional risk for tooth loss. *J Periodontol*, 1994, 65, 996-1001.
146. Holmdahl R, Lorentzen JC, et al. Arthritis induced in rats with nonimmunogenic adjuvants as models for rheumatoid arthritis. *Immunol Rev*, 2001, 184, 184-202
147. Holmdahl R, Malmstrom V, Burkhardt H. Autoimmune priming, tissue attack and chronic inflammation – The three stages of rheumatoid arthritis. *Eur J Immunol*, 2014, 44, 1593-1599.
148. Holoshitz J. The rheumatoid arthritis HLA-DRB1 shared epitope. *Curr Opin Rheumatol*, 2010, 22(3), 293-298.
149. Holt SC, Ebersole J, et al. Implantation of *Bacteroides gingivalis* in nonhuman primates initiates progression of periodontitis. *Science* 1988, 239, 55-57.
150. Horliana A, et al. Dissemination of periodontal pathogens in the bloodstream after periodontal procedures: a systematic review. *PLoS One*, 2014, 9(5), e98271.
151. Huizinga TW, et al. Refining the complex rheumatoid arthritis phenotype based on specificity of the HLA-DRB1 shared epitope for antibodies to citrullinated proteins. *Arthritis Rheum*, 2005, 52, 3433-3438.
152. Humby F, Bombardieri M, et al. Ectopic lymphoid structures support ongoing production of class-switched autoantibodies in rheumatoid synovium. *PLoS Med* 2009, 6, 1, e1.

153. Imamura T, Potempa J, et al. Activation of blood coagulation factor X by arginine-specific cysteine proteinases (gingipain-Rs) from *Porphyromonas gingivalis*. *J Biol Chem*, 1997, 272, 16062-16067.
154. Izui S, Eisenberg R, Dixon F. IgM rheumatoid factors in mice injected with bacterial lipopolysaccharides. *J Immunol*, 1979, 122, 2096.
155. Janssen, K. et al. Lessons to be learned from periodontitis. *Curr Opin Rheumatol*, 2013, 25(2), 241-247.
156. Jansen AL, Van der Horst-Bruinsma I, et al. Rheumatoid factor and antibodies to cyclic citrullinated peptide differentiate Rheumatoid Arthritis from undifferentiated polyarthritis in patients with early arthritis. *J Rheumatol*, 2002, 29(10), 2074-2076.
157. Joe BH, Borke JL, et al. Interleukin-1 β regulation of adhesion molecules on human gingival and periodontal ligament fibroblasts. *J Periodontol*, 2001, 72, 865-870.
158. Johnson GK, Organ CC. Prostaglandin E2 and interleukin-1 levels in nicotine-exposed oral keratinocyte cultures. *J Periodont Res*, 1997, 32, 447-454.
159. Josepf R, Rajappan S, et al. Association between chronic periodontitis and rheumatoid arthritis: a hospital-based case-control study. *Rheumatol Int*, 2013, 33, 103-109.
160. Jung E, Choi Y, Lee K Relationship between rheumatoid arthritis and periodontal disease in Korean adults: Data from the Sixth Korea National Health and Nutrition Examination Survey, 2013 to 2015. *J Periodontol*, 2019, 90(4), 350-357.
161. Kalra J, Chandhary AK, Prasad K. Increased production of oxygen free radicals in cigarette smokers. *Int J Exp Pathol*, 1991, 72, 1-7.
162. Karlsson EW, Lee IM, et al. A retrospective cohort study of cigarette smoking and risk of rheumatoid arthritis in female health professionals. *Arthritis Reum*, 1999, 42, 910-917.
163. Kaßer, U, Gleissner C, et al. Risk for periodontal disease in patients with longstanding rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 1997, 40, 2248-2251.
164. Kastbom A, Ahmadi A, et al. The 158V polymorphism of Fc gamma receptor type IIIA in early rheumatoid arthritis: increased susceptibility and severity in male patients (the Swedish TIRA* project). *Rheumatology*, 2005, 44, 1294-1298.
165. Kastbom A., Strandberg G, et al. Anti-CCP antibody test predicts the disease course during 3 years in early rheumatoid arthritis (the Swedish TIRA project). *Ann Rheum Dis*, 2004, 63, 1085.
166. Kaur S, White S, Bartold PM. Periodontal Disease and Rheumatoid Arthritis: A Systematic Review. *J Dent Res*, 2013, 92, 5, 399-408.

167. Kebschull M., Demmer R T, Papapanou P N. Gum bug, leave my heart alone!: epidemiologic and mechanistic evidence linking periodontal infections and atherosclerosis (published online ahead of print July 16, 2010). *J Dent Res*, 2010, 89(9), 879-902.
168. Kenney EB, Kraal JH, et al. The effect of cigarette smoke on human oral polymorphonuclear leukocytes. *J Periodont Res*, 1977, 12, 227-234.
169. Khandpur R, Carmona-Rivera C, et al. NETs are a source of citrullinated autoantigens and stimulate inflammatory responses in rheumatoid arthritis. *Sci Transl Med*, 2013, 5(178), ra40.
170. Khanna D, Wu H, Park G, et al. Association of tumor necrosis factor alpha polymorphism, but not the shared epitope, with increased radiographic progression in a seropositive rheumatoid arthritis inception cohort. *Arthritis Rheum*, 2006, 54, 1105-16.
171. Kimberly RP, Salmon JE, Edberg JC. Receptors for immunoglobulin G: molecular diversity and implications for disease. *Arthritis Rheum*, 1995, 38, 306-14.
172. Kinane DF, Hart TC. Genes and gene polymorphisms associated with periodontal disease. *Crit Rev Oral Biol Med*, 2003, 14, 430-449.
173. Kinane DF, Lappin DF, et al. Humoral immune responses in periodontal disease may have mucosal and systemic immune features. *Clin Exp Immunol*, 1999, 115, 534-41.
174. Kinane DF, Riggio MP, et al. Bacteraemia following periodontal procedures. *J Clin Periodontol*, 2005, 32, 708-713.
175. Kinane DF. Regulators of tissue destruction and homeostasis as diagnostic aids in periodontology. *Periodontology 2000*, 2001, 24, 215-225.
176. Klarekskog L, Padyukov L, Alfredsson L. Smoking as a trigger for inflammatory rheumatic diseases. *Curr Opin Rheumatol*, 2007, 19, 49-54.
177. Klarekskog L, Stolt P, et al. A new model for an etiology of rheumatoid arthritis: smoking may trigger HLA-DR (shared epitope)-restricted immune reactions to autoantigens modified by citrullination. *Arthritis Rheum*, 2006, 54, 38-4633.
178. Knudsen LS, Christensen IJ, Lottenburger T, et al. Preanalytical and biological variability in circulating interleukin 6 in healthy subjects and patients with Rheumatoid Arthritis. *Biomarkers*, 2008, 13(1), 59-78.
179. Kobayashi T, Ito S, Kobayashi D, et al. Serum immunoglobulin G levels to porphyromonas gingivalis peptidyl-arginine deiminase affect clinical response to biological disease-modifying anti-rheumatic drug in rheumatoid arthritis. *PLoS ONE*, 2016, 11(4), e0154182.

180. Kobayashi S, Momohara S, et al. Molecular aspects of rheumatoid arthritis:role of environmental factors. *FEBS J*, 2008, 275, 4456-4462.
181. Kobayashi T, Sugita N, et al. Fc gamma receptor genotype as a risk factor for generalized early-onset periodontitis in Japanese patients. *J Periodontol*, 2000, 71(1), 1425-1432.
182. Kobayashi T, Yamamoto K et al. The Fc gamma receptor genotype as a severity factor for chronic periodontitis in Japanese patients. *J Periodontol*, 2001, 72, 1324-1331.
183. Kobayashi T et al. Serum cytokine and periodontal profiles in relation to disease activity of rheumatoid arthritis in Japanese adults. *J Periodontol*, 81, 2010(5), 650-7.
184. Konig MF, Abusleme L, et al. Aggregatibacter actinomycetemcomitans-induced hypercitrullination links periodontal infection to autoimmunity in rheumatoid arthritis. *Sci Transl Med*, 2016, 8, 369, 369ra176.
185. Korte D, Kinney J. Personalized medicine: an update of salivary biomarkers for periodontal diseases *Periodontology*, 2000, 70, 2016, 26-37.
186. Kristoffersen T, Tonder O. Anti-immunoglobulin activity in inflamed human gingiva. *J Dent Res*, 1973, 52, 991.
187. Kroot EJ, de Jong BA, et al. The prognostic value of anti-cyclic citrullinated peptide antibody in patients with recent-onset rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 2000, 43, 1831-1835.
188. Kurowska-Stolarska M, Alivernini S et al. MicroRNA-155 as a proinflammatory regulator in clinical and experimental arthritis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011,108,11193-8.
189. Kyogoku C, Tsuchiya N, Matsuta K, Tokunaga K. Studies on the association of Fcg receptor IIA, IIB, IIIA and IIIB polymorphisms with rheumatoid arthritis in the Japanese: evidence for a genetic interaction between HLA-DRB1 and FCGR3A. *Genes Immun*, 2002, 3, 488-493.
190. Laine ML, Crielaard W, Loos BG. Genetic susceptibility to periodontitis. *Periodontol* 2000, 2012, 58, 37-68.
191. Lamster IB. The host response in gingival crevicular fluid: Potential applications in periodontitis clinical trials. *J Periodontol*, 1992, 63, 1117-1123.
192. Lamster IB, Kaluszner-Shapira I, et al. Serum IgG antibody response to Actinobacillus actinomycetemcomitans and Porphyromonas gingivalis: implications for periodontal diagnosis. *J Clin Periodontol*, 1998, 25(6), 510-6.
193. Leadbetter EA, Rifkin IR, et al. Chromatin-IgG complexes activate B cells by dual engagement of IgM and Toll-like receptors. *Nature*, 2002, 416, 603-607.

194. Lebre MC, Jongbloed SL, et al. Rheumatoid arthritis synovium contains two subsets of CD83-DC-LAMP- dendritic cells with distinct cytokine profiles. *Am J Pathol*, 2008, 172, 940-50.
195. Lee N, Beck CE, Hall M. Rheumatoid factor and anti-CCP autoantibodies in rheumatoid arthritis: a review. *Clin Lab Sci*, 2008, Winter, 21(1), 15-8.
196. Leivadaros, et al. A pilot study into measurements of markers of atherosclerosis in periodontitis. *J Periodontol*, 2005, 76, 121-128.
197. Lenz P, Gessner JE, et al. Fc gamma-receptor III (CD16) is involved in NK-B cell interaction. *Immunobiol*, 1996, 196, 387-98.
198. Lerner UH. Inflammation-induced bone remodeling in periodontal disease and the influence of post-menopausal osteoporosis. *J Dent Res*, 2006, 85, 596-907.
199. Leung KP, Torres BA. Prevotella intermedia stimulates expansion of Vbeta-specific CD4(+) T cells. *Infect Immun*, 2000, 68, 5420-5424.
200. Li X, Kolltveit KM, et al. Systemic diseases caused by oral infection. *Clin Microbiol Rev*, 2000, 13, 547-558.
201. Li Z-G, Li J-J, Sun C-A, et al. Interleukin-18 promoter polymorphisms and plasma levels are associated with increased risk of periodontitis: a meta-analysis. *Inflamm Res*, 2013, 1, 45-52.
202. Liew FY, McInnes IB. The role of innate mediators in inflammatory response. *Mol Immunol*, 2002, 38, 887-90.
203. Linn-Rasker SP, van der Helm-van Mil AH, et al. Smoking is a risk factor for anti-CCP antibodies only in rheumatoid arthritis patients who carry HLA-DRB1 shared epitope alleles. *Ann Rheum Dis*, 2006, 65, 366-7134.
204. Loe H, Theilade E, Jensen SB. Experimental Gingivitis in Man. *J Periodontol*, 1965, 36, 177-187.
205. Loos BG, Leppers F, et al. Fcγ receptor polymorphism in relation to periodontitis. *J Clin Periodontol*, 2003, 30(7), 595-602.
206. Loos BG, John RP, Laine ML Identification of genetic risk factors for periodontitis and possible mechanisms of action. *J Clin Periodontol*, 2005, 32(6), 159-179.
207. Loyola-Rodriges J P, Martinez-Martinez R E et al. Rheumatoid arthritis and the role of oral bacteria. *J Oral Microbiol*, 2010, 2, 5784.
208. Lundberg K, Kinloch A, Fisher BA, et al. Antibodies to citrullinated alpha-enolase peptide 1 are specific for rheumatoid arthritis and cross-react with bacterial enolase. *Arthritis Rheum*, 2008, 58, 3009-19.

209. Lundberg K, Nijenhuis, S et al. Citrullinated proteins have increased immunogenicity and arthritogenicity and their presence in arthritic joints correlates with disease severity. *Arthritis Res Ther*, 2005, 7, R458-R467.
210. Lundberg K, Wegner N, et al. Periodontitis in RA – the citrullinated enolase connection. *Nat Rev Rheumatol*, 2010, 6, 727-730.
211. Lundgren T, Parhar RS, et al. Impaired cytotoxicity in Papillon-Lefevre syndrome. *J Dent Res*, 2005, 84, 414-7.
212. Machtei EE, Dunford R, et al. Longitudinal study of prognostic factors in established periodontitis patients. *J Clin Periodontol*, 1997, 24, 102-109.
213. Madianos PN, Bobetsis YA, Kinane DF. Generation of inflammatory stimuli: how bacteria set up inflammatory responses in the gingiva. *J Clin Periodontol*, 2005, 32(6), 57-71.
214. Mahdi H, Fisher BA, et al. Specific interaction between genotype, smoking and autoimmunity to citrullinated alpha-enolase in the etiology of rheumatoid arthritis. *Nat Gen*, 2009, 41, 1319-1324.
215. Majka DS, Deane KD, Parrish LA, et al. Duration of preclinical rheumatoid arthritis-related autoantibody positivity increases in subjects with older age at time of disease diagnosis. *Ann Rheum Dis*, 2008, 67(6), 801-7.
216. Majka DS, Holers VM. Can we accurately predict the development of rheumatoid arthritis in the preclinical phase? *Arthritis Rheum*, 2003, 48, 2701-2705.
217. Makrygiannakis D, af Klint E, et al. Citrullination is an inflammation-dependent process. *Ann Rheum Dis*, 2006, 65, 1219-22.
218. Malawista SE. Resolution of Lyme arthritis, acute or prolonged: A new look. *Inflammation*, 2000, 24, 493-504.
219. Manfredsdottir VF, Vikingsdottir T, et al. A. The effects of tobacco smoking and rheumatoid factor seropositivity on disease activity and joint damage in early rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*, 2006, 45, 734-740.
220. Mangat P, Wegner N. Bacterial and human peptidylarginine deiminases: targets for inhibiting the autoimmune response in rheumatoid arthritis? *Arthritis Res Ther*, 2010, 12, 209-217.
221. Maresz KJ, Hellvard A. *Porphyromonas gingivalis* facilitates the development and progression of destructive arthritis through its unique bacterial peptidylarginine deiminase (PAD). *PLoS Pathog*, 2013, 9, e1003627.

222. Marriott I, Huet-Hudson YM. Sexual dimorphism in innate immune responses to infectious organisms. *Immunol Res*, 2006, 34, 177-192.
223. Martinez-Canut P, Lorca A, Magan R. Smoking and periodontal disease severity. *J Clin Periodontol*, 1995, 22, 743-749.
224. Martinez-Martinez RE, Abud-Mendoza C, Patiño-Marin N, et al. Detection of periodontal bacterial DNA in serum and synovial fluid in refractory rheumatoid arthritis patients. *J Clin Periodontol*, 2009, 36, 12, 1004-10.
225. Martínez-Rivera JI, et al. Salivary ammonia levels and Tannerella forsythia are associated with rheumatoid arthritis: A cross sectional study. *Clin Exp Dent Res*, 2017, 3, 107-114.
226. Masson-Bessière C, Sebbag M, et al. The major synovial targets of the rheumatoid arthritis-specific antifilaggrin autoantibodies are deiminated forms of the α - and β -chains of fibrin. *J. Immunol*, 2001, 166, 4177-4182.
227. Mathur A, Michalowicz B, et al. Influence of periodontal bacteria and disease status on V beta expression in T cells. *J Periodontal Res*, 1995, 30, 369-373.
228. Matthews D. Impact of everyday oral activities on the risk of bacteraemia is unclear. *Evid Based Dent*, 2012, 13(3), 80.
229. McDevitte HO, Bodmer WF. Histocompatibility antigens. Immune responsiveness and susceptibility to disease. *Am J Med*, 1972, 52, 1-8.
230. McGraw WT, Potempa J. Purification, Characterization, and sequence analysis of a potential virulence factor from Porphyromonas gingivalis peptidylarginine deiminase. *Infect Immun*, 1999, 67, 3248-3256.
231. McInnes IB, Schett G. Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Nat Rev Immunol*, 2007, 7, 429-42.
232. McInnes IB, Leung BP, Liew FY. Cell-cell interactions in synovitis: interactions between T lymphocytes and synovial cells. *Arthritis Res*, 2000, 2, 374-378.
233. Meisel P, Carlsson L, et al. Polymorphisms of Fc gamma-receptors RIIa, RIIIa, and RIIIb in patients with adult periodontal diseases. *Genes Immun*, 2001, 2, 258-262.
234. Meisel P, Schwahn C, et al. T. Dose-effect relation of smoking and the interleukin-1 gene polymorphism in periodontal disease. *J Periodontol*, 2004, 75, 236-242.
235. Meisel P, Siegemund A, et al. Smoking and polymorphisms of the interleukin-1 gene cluster (IL-1alpha, IL-1beta, and IL-1RN) in patients with periodontal disease. *J Periodontol*, 2002b, 73, 27-32.

236. Meisel P, Siegemund A, et al. The interleukin-1 polymorphism, smoking, and the risk of periodontal disease in the population-based SHIP study. *J Dent Res*, 2003, 82, 189-193.
237. Mellors, R. et al. Cellular origin of rheumatoid factor. *J Exp Med.*, 1959, 110, 6, 875-86.
238. Mellors RC, Nowoslawski A, Korngold L. Rheumatoid arthritis and the cellular origine of rheumatoid factors. *Am J Pathol*, 1961, 39, 533.
239. Mercado FB, Marshall RI et al. Relationship between rheumatoid arthritis and periodontal disease. *J Periodontol*, 2001, 72, 779-787.
240. Mercado FB, Marshall RI et al. Is there a relationship between rheumatoid arthritis and periodontal disease? *J Clin Periodontol*, 2000, 27, 267-272.
241. Mercado FB, Marshall RI, BartoldP M. Interrelationships between rheumatoid arthritis and periodontal disease. *J Clin Periodontol*, 2003, 30, 761-772.
242. Meurman JH, Sanz M, Janket SJ. Oral health, atherosclerosis, and cardiovascular disease. *Crit Rev Oral Biol Med*, 2004, 15, 403-413.
243. Michalowicz, B. S. Genetic and heritable risk factors in periodontal disease. *J Periodontol*, 1994, 65(5), 479-88.
244. Michalowicz BS, Diehl SR et al. Evidence of a substantial genetic basis for risk of adult periodontitis. *J Periodontol*, 2000, 71, 1699-1707.
245. Mikuls T R, Payne J B et al. Periodontitis and *Porphyromonas gingivalis* in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 2014, 66(5), 1090-1100.
246. Mikuls TR, Payne JB, et al. Antibody responses to *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) in subjects with rheumatoid arthritis and periodontitis. *Int Immunopharmacol*, 2009, 9(1), 38-42.
247. Mikuls TR, Thiele GM, et al. *Porphyromonas gingivalis* and disease-related autoantibodies in individuals at increased risk of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 2011, 64, 3522-30.
248. Miossec P, Korn T, Kuchroo VK. Interleukin-17 and type 17 helper T cells. *N Engl J Med*, 2009, 361, 888-898.
249. Mitnick H, Hoffstein S, Weissmann G. Fate of antigen after intravenous and intraarticular injection into rabbits. *Arthritis Rheum*, 1978, 21, 918-929.
250. Moen K, Brun JG, Madland TM, et al. Immunoglobulin G and A antibody responses to *Bacteroides forsythus* and *Prevotella intermedia* in sera and synovial fluids of arthritis patients. *Clin Diagn Lab Immunol*, 2003, 10, 1043-1050.

251. Moen, K, Brun JG, Valen M, et al. Synovial inflammation in active rheumatoid arthritis and psoriatic arthritis facilitates trapping of a variety of oral bacterial DNAs. *Clin Exp Rheumatol*, 2006, 24, 6, 656-663.
252. Morgan A, Barrett J et al. Analysis of Fcγ receptor haplotypes in rheumatoid arthritis: FCGR3A remains a major susceptibility gene at this locus, with an additional contribution from RCGR3B. *Arthritis Res Ther*, 2006, 8(1), 1-9.
253. Morgan AW, Griffiths B, et al. Fcγ receptor type IIIA is associated with rheumatoid arthritis in two distinct ethnic groups. *Arthritis Rheum*, 2000, 43(10), 2328-2334.
254. Mosely LH, Finseth F, Goody M. Nicotine and its effects on wound healing. *Plast Reconst Surg* 1978,61,570-575.
255. Moser B, Wolf M, et al. Chemokines: multiple levels of leukocyte migration control. *Trends Immunol*, 2004,25,75-84.
256. Mullally BH, Linden GJ. Molar furcation involvement associated with cigarette smoking in periodontal referrals. *J Clin Periodontol*, 1996, 23, 658-661.
257. Myasoedova E, Crowson CS, et al. Is the incidence of rheumatoid arthritis rising? Results from Olmsted County, Minnesota, 1955-2007. *Arthritis Rheum.*, 2010, 62, 1576-1582.
258. Nadkarni S, Mauri C, Ehrenstein MR. Anti-TNF-alpha therapy induces a distinct regulatory T cell population in patients with rheumatoid arthritis via TGF-beta. *J Exp Med*, 2007, 204, 33-39.
259. Needleman I, Garcia R, et al. Mean annual attachment, bone level and tooth loss: a systematic review. *J Periodontol*, 2018, 89(1), 120-139.
260. Nepom GT, Nepom BS. Prediction of susceptibility to rheumatoid arthritis by human leukocyte antigen genotyping. *Rheum Dis Clin Am*, 1992, 18, 785-792.
261. Nesse W, Abbas F, et al. Periodontal inflamed surface area: quantifying inflammatory burden. *J Clin Periodontol*, 2008, 35, 668-673.
262. Nesse W, Dijkstra PU, et al. Increased prevalence of cardiovascular and autoimmune diseases in periodontitis patients: a cross-sectional study. *J Periodontol*, 2010, 81, 1622-8.
263. Nesse W, Westra J, et al. The periodontium of periodontitis patients contains citrullinated proteins which may play a role in ACPA (anti-citrullinated protein antibody) formation. *J Clin Periodontol*, 2012, 39, 599-607.
264. Newkirk M M. Rheumatoid factors: Host resistance or autoimmunity? *Clin Immunol*, 2002, 104, 1-13.

265. Nibali L, Ready DR, Parkar M, et al. Gene polymorphisms and the prevalence of key periodontal pathogens. *J Dent Res*, 2007, 86, 416-420.
266. Nibali L, Tonetti MS, Ready D, et al. Interleukin-6 polymorphisms are associated with pathogenic bacteria in subjects with periodontitis. *J Periodontol*, 2008, 79, 677-683.
267. Niederman R, Brunkhorst B, et al. Ammonia as a potential mediator of adult human periodontal infection: Inhibition of neutrophil function. *Arch Oral Biol*, 1990, 35, 205S-209S.
268. Nienhuis RL, Mandema E. A new serum factor in patients with rheumatoid arthritis: The antiperinuclear factor. *Ann Rheum. Dis*, 1964, 23, 302-305.
269. Nigrovic PA, Lee DM. Synovial mast cells: role in acute and chronic arthritis. *Immunol Rev*, 2007, 217, 19-37.
270. Nikolopoulou-Papaconstantinou AA, Johannessen AC, Kristoffersen T. Deposits of immunoglobulins, complement and immune complexes in inflamed human gingiva. *ACTA Odontol Scand*, 1987, 45, 187-193.
271. Offenbacher S. Periodontal diseases: pathogenesis. *Ann Periodontol*, 1996, 1, 821-878.
272. Ogrendik M. Does periodontopathic bacterial infection contribute to the etiopathogenesis of the autoimmune disease rheumatoid arthritis? *Discov Med*, 2012, 13, 72, 349-355.
273. Ogrendik M, Kokino S, Ozdemir F, et al. Serum antibodies to oral anaerobic bacteria in patients with rheumatoid arthritis. *Med Gen Med*, 2005, 7(2), 2-10.
274. Ohyama H, Kato-Kogoe N et al. The involvement of IL-23 and the Th17 pathway in periodontitis. *J Dent Res*, 2009, 88, 633-638.
275. Okada M, Kobayashi T, Ito S, et al. Antibody responses to periodontopathic bacteria in relation to rheumatoid arthritis in Japanese adults. *J Periodontol.*, 2011, 82, 1433-41
276. Oliver RC, Brown LJ, Loe H. Periodontal diseases in the United States population. *J Periodontol*, 1998, 69, 269-278.
277. Ollier W, Thomson W. Population genetics of rheumatoid arthritis. *Rheum Dis Clin North Am* 1992, 18, 741-759.
278. Olsson AR, Skogh T, Wingren G. Aetiological factors of importance for the development of rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol*, 2004, 33, 300-306.
279. Onishi RM, Gaffen SL. Interleukin-17 and its target genes: mechanisms of interleukin-17 function in disease. *Immunology*, 2010, 129, 311-321.
280. Onishi S, Honma K, Liang S, et al. Toll-like receptor 2-mediated interleukin-8 expression in gingival epithelial cells by the *Tannerella forsythia* leucine-rich repeat protein BspA. *Infect Immun*, 2008, 76, 198-205

281. Orange JS. Human natural killer cell deficiencies and susceptibility to infection. *Microbes Infect*, 2002, 4, 1545-58.
282. Pabst MJ, Pabst KM, Collier JA, et al. Inhibition of neutrophil and monocyte defensive functions by nicotine. *J Periodontol*, 1995, 66, 1047-1055.
283. Padyukov L, Silva C, et al. A gene-environment interaction between smoking and shared epitope genes in HLA-DR provides a high risk of seropositive rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 2004, 50, 3085-3092.
284. Page RC, Offenbacher S, et al. Advances in the pathogenesis of periodontitis: Summary of developments, clinical implications, and future directions. *Periodontol*, 2000, 1997, 14, 216-248.
285. Page R, Beck J. Risk assessment for periodontal diseases. *Int Dent J*, 1997, 47, 61-67.
286. Page R. The pathobiology of periodontal diseases may affect systemic diseases: inversion of paradigm. *Ann Periodontol*, 1998, 3(1), 108-120.
287. Panayi GS. Even though T-cell-directed trials have been of limited success, is there reason for optimism? *Nat Clin Pract Rheumatol*, 2006, 2, 58-9.
288. Papapanou PN, Sanz M, et al. Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *J Periodontol*, 2018, 89(1),173-182.
289. Paradowska-Gorycka A, Wojtecka-Lukasik E(et al. Association between IL-17 F genes polymorphisms and susceptibility to and severity of rheumatoid arthritis. *J Immunol*, 2010, 72, 134-141.
290. Payne JB, Johnson GK, et al. Nicotine effects on PGE2 and IL-1_β release by LPS-treated human monocytes. *Periodont Res*, 1996, 31, 99-104.
291. Pedersen M, Jacobsen S, et al. Environmental risk factors differ between rheumatoid arthritis with and without auto-antibodies against cyclic citrullinated peptide. *Arthritis Res Ther*, 2006, 8, R133.
292. Persson RE, Hollender LG, et al. Assessment of periodontal conditions and systemic disease in older subjects. Focus on osteoporosis. *J Clin Periodontol*, 2002, 29, 796-802.
293. Pihlstrom BL, Michalowicz BS, Johnson NW. Periodontal diseases. *Lancet*, 2005, 366, 1809-1820.
294. Pischon N, et al. Effects of *Porphyromonas gingivalis* on cell cycle progression and apoptosis of primary human chondrocytes. *Ann Rheum Dis*, 2009, 68(12), 1902-7.

295. Polak D, Shapira L, et al. The role of coaggregation between *Porphyromonas gingivalis* and *Fusobacterium nucleatum* on the host response to mixed infection. *J Clin Periodontol*, 2012, 39, 617-625.
296. Pope RM, Teller DC, Mannik M. The molecular basis of self-association of antibodies to IgG (rheumatoid factors) in rheumatoid arthritis. *Proc Natl Acad. Sci USA*, 1974, 71, 517-521.
297. Posnett DN, Edinger J. When do microbes stimulate rheumatoid factor? *J Exp Med*, 1997, 185, 1721-1723.
298. Pouliot M, Clish CB, et al. Lipoxin A4 analogues inhibit leukocyte recruitment to *Porphyromonas gingivalis*: A role for cyclooxygenase-2 and lipoxins in periodontal disease. *Biochemistry*, 2000, 39, 4761-4768.
299. Prabhu et al. Detection of local and systemic cytokines in adult periodontitis. *J Periodontol*, 1996, 67, 515-522.
300. Prasad S, Amit A, Aggrawal B. Detection of inflammatory biomarkers in saliva and urine: potential in diagnosis, prevention and treatment for chronic diseases. *Exp Biol Med*, 2016, 0, 1-17.
301. Priyadarshini S, Sathasivasubramanian S. Evaluation of Salivary Anti-Ccp in Rheumatoid Arthritis Patients. *J Dent Med Sci (IOSR-JDMS)*, 2015, 14(12), 27-30.
302. Quirke A-M, Lugli EB. Heightened immune response to autocitrullinated *Porphyromonas gingivalis* peptidylarginine deiminase: a potential mechanism for breaching immunologic tolerance in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*, 2014, 73, 263-269.
303. Ramamurthy NS, Greenwald RA et al. Experimental arthritis in rats induces biomarkers of periodontitis which are ameliorated by gene therapy with tissue inhibitor of matrix metalloproteinases. *J Periodontol*, 2005, 76, 229-233.
304. Rantapaa-Dahlqvist S, de Jong BA, et al. Antibodies against cyclic citrullinated peptide and IgA rheumatoid factor predict the development of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 2003, 48, 2741-2748.
305. Ravetch JV, Perussia B. Alternative membrane forms of FcγRIII (CD16) on human natural killer cells and neutrophils. Cell type-specific expression of two genes that differ in single nucleotide substitutions. *J Exp Med*, 1989, 170, 481-97.
306. Raza K, Falciani F et al. Early rheumatoid arthritis is characterized by a distinct and transient synovial fluid cytokine profile of T cell and stromal cell origin. *Arthritis Res Ther*, 2005, 7, 784-795.

307. Reddy MS, Geurs NC, Gunsolley JC. Periodontal host modulation with antiproteinase, anti-inflammatory, and bone-sparing agents. A systematic review. *Ann Periodontol*, 2003, 8, 12-37.
308. Reinhardt RA, Bolton RW, McDonald TL, et al. In situ lymphocyte subpopulations from active versus stable periodontal sites. *J Periodontol*, 1988, 59, 656-70.
309. Reichert S, Haffner M et al. Detection of oral bacteria DNA in synovial fluid. *J Clin Periodontol* 2013,40,591-598
310. Renaudineau Y, Jamin C, Saraux A, Youinou P. Rheumatoid factor on a daily basis. *Autoimmunity*, 2005, 38, 11-16.
311. Ribeiro J, Leao A, Novaes AB. Periodontal infection as a possible severity factor for rheumatoid arthritis. *J Clin Periodontol*, 2005, 32, 412-416.
312. Riebel GD, Boden SD, et al. The effect of nicotine on incorporation of cancellous bone graft in an animal model. *Spine*, 1995, 20, 2198-2202.
313. Rodriguez-Rodriguez L, Lamas JR, et al. Combined influence of genetic and environmental factors in age of rheumatoid arthritis onset. *Rheumatol Int*, 2011, doi: 10.1007/s00296-011-2090-9.
314. Rojas-Villarraga A, Diaz FJ, et al. Familial disease, the HLA-DRB1 shared epitope and anti-CCP antibodies influence time at appearance of substantial joint damage in rheumatoid arthritis. *J Autoimmun*, 2009, 32, 64-69.
315. Rosenstein ED, Kushner LJ, et al. Pilot study of dietary fatty acid supplementation in the treatment of adult periodontitis. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*, 2003, 68, 213-218.
316. Rosenstein ED, et al. Hypothesis: the humoral immune response to oral bacteria provides a stimulus for the development of rheumatoid arthritis. *Inflammation*, 2004, 28(6), 311-8.
317. Sabeh F, Fox D, Weiss SJ. Membrane type I matrix metalloproteinase-dependent regulation of rheumatoid arthritis synoviocyte function. *J Immunol*, 2010, 184, 6396-406.
318. Sacks JJ, Luo YH, Helmick CG. Prevalence of specific types of arthritis and other rheumatic conditions in the ambulatory health care system in the United States, 2001-2005. *Arthritis Care Res*, 2010, 62, 460-464.
319. Sakaguchi W, To M, et al. Detection of anti-citrullinated protein antibody (ACPA) in saliva for rheumatoid arthritis using DBA mice infected with *Porphyromonas gingivalis*. *Arch Oral Biol*, 2019, 108, 104510.

320. Sallusto F, Lanzavecchia A. Heterogeneity of CD4⁺ memory T cells: functional modules for tailored immunity. *Eur J Immunol*, 2009, 39, 2076-2082.
321. Salvi G, Yalda EB, Collins J G et al. Inflammatory mediator response as a potential risk marker for periodontal diseases in insulin-dependent diabetes mellitus patients. *J Periodontol*, 1997, 68, 127-35.
322. Samanci N, et al. Diagnostic value and clinical significance of anti-CCP in patients with advanced rheumatoid arthritis. *J Natl Med Assoc*, 2005, 97, 8, 1120-6.
323. Sanchez-Pernaute O, Largo R et al. A fibrin based model for rheumatoid synovitis. *Ann. Rheum. Dis.* 2003,62,1135-1138.
324. Schattner, A. Review: anti-cyclic citrullinated peptide antibody is a more specific test for rheumatoid arthritis than rheumatoid factor. *Evid Based Med.*, 2007, 12, 6, 183.
325. Schellenkens GA, de Jong BAW, et al. Citrulline is an essential constituent of antigenic determinants recognized by rheumatoid arthritis-specific autoantibodies. *J Clin Invest.* 1998, 101, 273-281.
326. Scher J, Ubeda C, et al. Periodontal disease and the oral microbiota in new-onset rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 2012, 64(10), 3083-3094.
327. Schett G, Stach C et al. How antirheumatic drugs protect joints from damage in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 2008, 58, 2936-48.
328. Schett G, Teitelbaum SL. Osteoclasts and arthritis. *J Bone Miner Res*, 2009, 24, 1142-6.
329. Schroder AE, Greiner A, et al. Differentiation of B cells in the nonlymphoid tissue of the synovial membrane of patients with rheumatoid arthritis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93, 221-5.
330. Schroeder HE, Lindhe J. Conversion of stable established gingivitis in the dog into destructive periodontitis. *Arch Oral Biol*, 1975, 20, 775-782.
331. Schwenzer A, Quirke AM, et al. Association of Distinct Fine Specificities of Anti Citrullinated Peptide Antibodies With Elevated Immune Responses to *Prevotella intermedia* in a Subgroup of Patients With Rheumatoid Arthritis and Periodontitis. *Arthritis Rheum*, 2017, 69(12), 2303-2313.
332. Sebbag M, Simon M, et al. The antiperinuclear factor and the so-called “antikeratin antibodies” are the same rheumatoid arthritis specific autoantibodies. *J Clin Invest*, 1995, 952672-2679.
333. Seibl R, Birchler T, et al. Expression and regulation of Toll-like receptor 2 in rheumatoid arthritis synovium. *Am J Pathol*, 2003, 162, 1221-7.

334. Selvaraj P, et al. Regulatory role of vitamin D receptor gene variants of Bsm I, Apa I, Taq I, and Fok I polymorphisms on macrophage phagocytosis and lymphoproliferative response to mycobacterium tuberculosis antigen in pulmonary tuberculosis. *Journal of Clin Immunol*, 2004, 24, 523-532.
335. Seow WK, Thong YH, et al. Nicotine-induced release of elastase and eicosanoids by human neutrophils. *Inflammation*, 1994,18,119-127.
336. Seyler TM, Park YW, et al. BLYS and APRIL in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest*, 2005, 115, 3083-3092.
337. Seymour GJ, Powell RN, Davies WIR. The immunopathogenesis of progressive chronic inflammatory periodontal disease. *J Oral Pathol*, 1979, 8, 249-265.
338. Seymour GJ, Powell RN, Davies WI. Conversion of a stable T-cell lesion to a progressive Bcell lesion in the pathogenesis of chronic inflammatory periodontal disease: an hypothesis. *J Clin Periodontol*, 1979, 6, 267-77.
339. Seymour GJ. Importance of the host response in the periodontium. *J Clin Periodontol*, 1991, 18, 421-426.
340. Shiau H, Reynolds M. Sex differences in destructive periodontal disease: A systematic review. *J Periodontol*, 2010, 81, 1379-1389.
341. Shibata K, Warbington ML, et al. Nitric oxide synthase activity in neutrophils from patients with localized aggressive periodontitis. *J Periodontol*, 2001, 72, 1052-1058.
342. Shimada A, Kobayashi T, Ito S, et al. Expression of anti-*Porphyromonas gingivalis* peptidyl-arginine deiminase immunoglobulin G and peptidyl-arginine deiminase-4 in patients with rheumatoid arthritis and periodontitis. *J Periodontal Res*, 2016, 51(1), 103-11.
343. Shirai H, Blundell TL, Mizuguchi K. A novel superfamily of enzymes that catalyze the modification of guanido groups. *Trends Biochem Sci*, 2001, 26, 465-468.
344. Shoenfeld Y, Sherer Y, Kalden J R. The expanding world of autoimmunity. *Trends Immunol*, 2002, 23, 278-279.
345. Silman AJ, Hochberg MC. *Epidemiology of the rheumatic diseases*, second ed. New York, Oxford University Press, 2001.
346. Slots J, Subgingival microflora and periodontal disease. *J Clin Periodontol*, 1979,6,351
347. Smolik I, Robinson D, El-Gabalawy HS. Periodontitis and rheumatoid arthritis: epidemiologic, clinical and immunologic associations. *Compendium of continuing education in dentistry*, 2009, 30(4), 188-190

- 348.** Snyderman R, McCarty GA. Analogous mechanisms of tissue destruction in rheumatoid arthritis and periodontal disease. Host-Parasite interaction in periodontal diseases. American Society of Microbiology, Washington, DC, 1982, 354-362.
- 349.** Socransky SS, Haffajee AD. Periodontal microbial ecology. *Periodontol* 2000, 2005, 38, 135-187.
- 350.** Socransky SS, Haffajee AD. Evidence of bacterial etiology: a historical perspective. Microbiology and immunology of periodontal diseases. *Periodontology* 2000, 1994, 5, 7-25.
- 351.** Spector TD, MacGregor AJ. Risk factors for osteoarthritis: genetics. *Osteoarthritis and Cartilage* 2004, 12 (suppl. A), S39-44.
- 352.** Spengler J, Lugonja B, et al. Release of active peptidyl arginine deiminases by neutrophils can explain production of extracellular citrullinated autoantigens in rheumatoid arthritis synovial fluid. *Arthritis Rheumatol*, 2015, 67, 3135-45.
- 353.** Stämpfli MR, Anderson GP. How cigarette smoke skews immune responses to promote infection, lung disease and cancer. *Nat Rev Immunol*, 2009, 9, 377-384.
- 354.** Stolt P, Bengtsson C, et al. Quantification of the influence of cigarette smoking on rheumatoid arthritis: results from a population based case-control study, using incident cases. *Ann Rheum Dis*, 2003, 62, 835-841.
- 355.** Stone M, Fortin PR, et al. Should tetracycline treatment be used more extensively for rheumatoid arthritis? Meta-analysis demonstrates clinical benefit with reduction in disease activity. *J Rheumatol*, 2003, 30, 2112-2122.
- 356.** Sugawara M, Yamashita K, et al. Detection of, and anti-collagen antibody produced by, CD5-positive B cells in inflamed gingival tissues. *J Periodont Res*, 1992, 27, 489-498.
- 357.** Sugita N, Yamamoto K, et al. Relevance of Fc gamma RIIIa-158V-F polymorphism to recurrence of adult periodontitis in Japanese patients. *Clin Exp Immunol*, 1999, 117, 350-354.
- 358.** Suzuki A, Yamada R, et al. Functional haplotypes of PADI4, encoding citrullinating enzyme peptidylarginine deiminase 4, are associated with rheumatoid arthritis. *Nat Genet*, 2003, 34, 395-402.
- 359.** Svard A, Kastbom A, et al. Salivary IgA antibodies to cyclic citrullinated peptides (CCP) in rheumatoid arthritis. *Immunobiology*, 2012, 2013, 232-237.
- 360.** Svenson M, Hansen MB, Kayser L, et al. Effects of human anti-IL-1 α autoantibodies on receptor binding and biological activities of IL-1. *Cytokine*, 1992, 4(2), 125-133.

- 361.** Szekanecz Z, et al. Rheumatoid Arthritis and Periodontal Disease: Salivary ACPA Levels and Clinical Presentation. *Arthritis Rheumatol*, 2016, 68 (suppl. 10), <https://acrabstracts.org/abstract/rheumatoid-arthritis-and-periodontal-disease-salivary-acpa-levels-and-clinical-presentation/>.
- 362.** Takahashi K, Takigawa M, et al. Clinical and Laboratory studies on a patient with early onset periodontitis and her family members A case report. *J Periodontol*, 1995, 66, 403-412.
- 363.** Talonpoika JT, Soderling E, Paunio K. Characterization of fibronectin and fibrin(ogen) fragments in gingival crevicular fluid. *Scand J Dent Res*, 1993, 101, 26-32.
- 364.** Tanner A, Haffer C, et al. A study of bacteria associated with advancing periodontitis in man. *J Clin Periodontol*, 1981, 6, 278.
- 365.** Taubman MA, Kawai T. Involvement of T-lymphocytes in periodontal disease and in direct and indirect induction of bone resorption. *Crit Rev Oral Biol Med*, 2001, 12, 125-135.
- 366.** Témoïn S, Chakaki A, Askari A, et al. Identification of oral bacterial DNA in synovial fluid of patients with arthritis with native and failed prosthetic joints. *J Clin Rheumatol*, 2012, 18, 117-21.
- 367.** Tesmer L, Lundy A, et al. Th17 cells in human disease. *Immunol Rev*, 2008, 223(1), 87-113.
- 368.** The J, Ebersole JL. Rheumatoid factor (RF) distribution in periodontal disease. *J Clin Immunol*, 1991, 11, 132-142.
- 369.** The J, Ebersole JL. Rheumatoid factor from periodontitis patients cross-reacts with epitopes on oral bacteria. *Oral Dis*, 1996, 2, 253-262.
- 370.** Tipton DA, Dabbous MK. Effects of nicotine on proliferation and extracellular matrix production of human gingival fibroblasts in vitro. *J Periodontol*, 1995, 66, 1056-1064.
- 371.** Tonetti MS, Greenwell H, Kornman KS. Staging and grading of periodontitis: framework and proposal of a new classification and case definition. *J Periodontol*, 2018, 89(1), 159-172.
- 372.** Tooms C, et al. Loss-of-function mutations in the cathepsin C gene results in periodontal disease and palmoplantar keratosis. *Nature Genetics*, 1999, 23, 421-424.
- 373.** Toto PD, Lin LM, Gargiulo AW. Immunoglobulins and complement in human periodontitis. *J Periodontol*, 1978, 49, 631-634.
- 374.** Travis J, Pike T, et al. *Porphyromonas gingivalis* proteinases as virulence factors in the development of periodontitis. *J Periodont Res*, 1997, 32, 120-125.

- 375.** Uhlig T, Hagen B, Kvien TK. Current tobacco smoking, formal education, and the risk of rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*, 1999, 26, 47-54.
- 376.** Utz P J, Genovese MC, Robinson WH. Unlocking the “PAD” lock on rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*, 2004, 63, 330-332.
- 377.** Van Boekel M, et al. Autoantibody systems in rheumatoid arthritis: specificity, sensitivity and diagnostic value. *Arthritis Res*, 2002, 4(2), 87-93.
- 378.** Van de Stadt LA, De Koning MHMT. Development of the anti-citrullinated protein antibody repertoire prior to the onset of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 2011, 63, 3226-3233.
- 379.** Van der Helm-van Mil AH, Verpoort KN, et al. Antibodies to citrullinated proteins and differences in clinical progression of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*, 2005, 7, R949-R958.
- 380.** Van Dyke TE, Levine MJ, Genco RJ. Neutrophil function and oral disease. *J Oral Pathol*, 1985, 14, 95-120.
- 381.** Van Dyke TE, Serhan CN. Resolution of inflammation: a new paradigm for the pathogenesis of periodontal diseases. *J Dent Res*, 2003, 82, 82-90.
- 382.** Van Dyke TE, van Winkelhoff AJ. Infection and inflammatory mechanisms. *J Clin Periodontol*, 2013, 40(14), 1-7.
- 383.** Van Dyke TE. Control of inflammation and periodontitis. *Periodontology 2000*, 2007, 45, 158-166.
- 384.** Van Dyke TE. The management of inflammation in periodontal disease. *J Periodontol*, 2008, 79, 1601-1608.
- 385.** Van Lent PL, van Vuuren AJ, Blom AB, et al. Role of Fc receptor gamma chain in inflammation and cartilage damage during experimental antigen-induced arthritis. *Arthritis Rheum*, 2000, 43, 740-52.
- 386.** Van Sorge NM, van der Pol WL, van de Winkel JG. Fc gamma R polymorphisms: implications for function, disease susceptibility and immunotherapy. *Tissue Antigens*, 2003, 61, 189-202
- 387.** Van Winkelhoff AJ, Slots J. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in nonoral infections. *Periodontology 2000*, 1999, 20, 122-135.
- 388.** Vaughan J, et al. Rheumatoid factor-producing cells detected by direct hemolytic plaque assay. *J Clin Invest*, 1976, 58, 4, 933-41.
- 389.** Venkataraman A, Almas K. Rheumatoid Arthritis and Periodontal Disease. An Update. *NY State Dent J*, 2015, 81, 5, 30-6.

390. Vessey MP, Villard-Mackintosh L, Yeates D. Oral contraceptives, cigarette smoking and other factors in relation to arthritis. *Contraception*, 1987, 35, 457-464.
391. Victor KD, Randen I, et al. Rheumatoid factors isolated from patients with autoimmune disorders are derived from germline genes distinct from those encoding the Wa, Po, and Bla cross-reactive idiotypes. *J Clin Invest*, 1991, 87, 1603-1613.
392. Vossenaar ER, Zendman AJW, et al. PAD, a growing family of citrullinating enzymes: Genes, features, and involvement in disease. *Bioessays*, 2003, 25, 1106-1118.
393. Vossenaar ER, Radstake TRD, et al. Expression and activity of citrullinating peptidylarginine deiminase enzymes in monocytes and macrophages. *Ann Rheum Dis*, 2004, 63, 373-381.
394. Waddington RJ, Moseley R, Embery G. Reactive oxygen species: a potential role in the pathogenesis of periodontal diseases. *Oral Dis*, 2000, 6, 138-51.
395. Wald NJ, Hackshaw AK. Cigarette smoking: An epidemiological overview. *Br Med Bull*, 1996, 52, 3-11.
396. Wegner N, Wait R. Peptidylarginine deiminase from *Porphyromonas gingivalis* citrullinates human fibrinogen and α -Enolase. implications for autoimmunity in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 2010, 62, 2662-2672.
397. Weiss SJ. Tissue destruction by neutrophils. *N Engl J Med*, 1989, 320, 365-76.
398. Weissmann G. Pathogenesis of rheumatoid arthritis. *J Clin Rheumatol*, 2004, 10, S26-S31.
399. Weyand C, Schmidt D, et al. Influence of sex on the phenotype of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 1998, 41(5), 817-822.
400. Wolf DL, Neiderud AM, et al. Fc γ receptor polymorphism and periodontal status: a prospective follow-up study. *J Clin Periodontol*, 2006, 33, 691-698.
401. Wordsworth P, Pile KD, et al. HLA heterozygosity contributes to susceptibility to rheumatoid arthritis. *Am J Hum Genet*, 1992, 51, 585-591.
402. Wouters FR, Salonen LWE, et al. Significance of some variables on interproximal alveolar bone height based on cross-sectional epidemiologic data. *J Clin Periodontol*, 1993, 20, 199-206.
403. Chen X, Huang J, Zhong L, Ding C. Quantitative assessment of the associations between interleukin-8 polymorphisms and periodontitis susceptibility. *J Periodontol*, 2015, 86(2), 292-300.

404. Yan Y, Weng H, Shen Z-H, et al. Association between interleukin-4 gene -590C/T, -33 C/T, and 70-basepair polymorphisms and periodontitis susceptibility: a metaanalysis. *J Periodontol*, 2015, 85(11), 354-362.
405. Yago T, Nanke Y, et al. IL-17 induces osteoclastogenesis from human monocytes alone in the absence of osteoblasts, which is potently inhibited by anti-TNF-alpha antibody: a novel mechanism of osteoclastogenesis by IL-17. *J Cell Biochem*, 2009, 108, 947-955.
406. Yamamoto K, Kobayashi T, et al. Association of Fcγ receptor IIa genotype with chronic periodontitis in caucasians. *J Periodontol*, 2004, 75(4), 517-522.
407. Yoshida A, Nakano Y, et al. Immunodominant Region of Actinobacillus actinomycetemcomitans 40-kilodalton Heat Shock Protein in Patients with Rheumatoid Arthritis. *J Dent Res*, 2001, 80(1), 346-350.
408. Yoshie H, Galicia J C et al. Genetic polymorphisms and periodontitis. *International Congress Series 2005*, 1284, 131-139, www.ics-elsevier.com
409. Yoshie H, Kobayashi T, et al. The role of genetic polymorphisms in periodontitis. *Periodontology 2000*, 2007, 43(1), 102-132.
410. Young BJJ, Mallya RK, et al. Anti-keratin antibodies in rheumatoid arthritis. *Br Med J*, 1979, 2, 97-99.
411. Zadeh HH, Nichols FC, Miyasaki KT. The role of the cell-mediated immune response to Actinobacillus actinomycetemcomitans and Porphyromonas gingivalis in periodontitis. *Periodontology 2000*, 1999, 20, 239-288.
412. Zafiroopoulos GG, Flores-de-Jacoby L, et al. Gingival crevicular fluid elastaseinhibitor complex: correlation with clinical indices and subgingival flora. *J Periodontal Res*, 1991, 26, 24-32.
413. Zambon JJ, Grossi SG, et al. Cigarette smoking increases the risk for subgingival infection with periodontal pathogens. *J Periodontol*, 1996, 67, 1050-1054.
414. Zhang F, Engebretson SP, et al. The overexpression of cyclo-oxygenase-2 in chronic periodontitis. *J Am Dent Assoc*, 2003, 134, 861-867.
415. Zhang Y, Sun J, et al. The emerging landscape of salivary diagnostics. *Periodontology 2000*, 2016, 70, 38-52
416. Zhang W. et al. Incidence and magnitude of bacteraemia caused by flossing and by scaling and root planing. *J Clin Periodontol*, 2013, 40(1), 41-52.
417. Zide MF, Carlton DM, Kent JN. Rheumatoid disease and related arthropathies: I. Systemic findings, medical therapy, and peripheral joint surgery. *Oral Surg Oral Med. Oral Pathol*, 1986, 61, 119-125.

- 418.** Zlotnik A, Yoshie O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity*, 2000, 12, 121-127.