



МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ-СОФИЯ
ФАКУЛТЕТ ПО ДЕНТАЛНА МЕДИЦИНА
КАТЕДРА ПАРОДОНТОЛОГИЯ



Ръководител: доц. д-р Антоанета Митева Млъчкова, доктор

Д-р Здравка Илиева Пашова-Тасева

ЗНАЧИМОСТ НА ГЕННИТЕ ПОЛИМОРФИЗМИ ПРИ ТЕЖЪК ПАРОДОНТИТ

Автореферат

На дисертационен труд за присъждане на образователна и научна степен „доктор”

Докторска програма „Терапевтична дентална медицина“,
професионално направление 7.2. Дентална медицина,
област на висше образование 7. Здравеопазване и спорт

Научен ръководител: доц. д-р Антоанета Митева Млъчкова, доктор

София, октомври 2022 г.

СЪДЪРЖАНИЕ

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ.....	4
1. ВЪВЕДЕНИЕ.....	5
2. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ.....	7
3. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ.....	8
4. РЕЗУЛТАТИ.....	14
5. ОБСЪЖДАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ.....	48
6. ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	60
7. ИЗВОДИ.....	62
8. ПРИНОСИ	64
9. ПУБЛИКАЦИИ И УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ФОРУМИ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД	65

Дисертационният труд се състои от 259 страници и е онагледен с 92 таблици, 110 фигури и 1 приложение. Библиографията включва 236 литературни източника, от които 2 на кирилица и 234 на латиница. Публичната защита на дисертационния труд ще се проведе на 24.10.2022 г., 13:30 часа в Първа аудитория на ФДМ, София, ул. „Св. Георги Софийски“ №1, съгласно чл. 4, ал. 2 от ЗРАСРБ, чл. 2, ал. 2 от Правилника за прилагането на Закона, на чл. 5, ал. 2 във връзка с чл. 73 от Правилника за условията и реда за придобиване на научни степени и заемане на академични длъжности в МУ – София, и въз основа на Заповед № РК36-1513/21.09.2022 г. на Ректора на МУ – София,

Пред научно жури в състав:

1. Проф. д-р Христина Лазарова Попова, доктор – рецензент и вътрешен член за МУ-София, Катедра „Пародонтология“ на ФДМ при МУ-София
2. Проф. д-р Алексей Славчев Савов, доктор – вътрешен член за МУ – София, ръководител на национална генетична лаборатория при МУ-София
3. Проф. д-р Елена Иванова Фиркова, доктор – външен член за МУ-София, Катедра „Пародонтология и заболявания на оралната лигавица“ Факултет дентална Медицина, медицински университет – Пловдив
4. Доц. д-р Илияна Любомирова Стоева, доктор – външен член за МУ-София, Катедра по образна диагностика, дентална алергология и физиотерапия, Факултет по дентална медицина, Медицински университет - Пловдив
5. Доц. Д-р Миглена Илиева Балчева-Енева, д.м., доктор, външен член за МУ-София, катедра Консервативно зъболечение и орална патология Факултет по Дентална медицина, медицински университет – Варна

Резервни членове:

1. Проф. д-р Лаура Стефанова Андреева – Гургуриева, доктор, ДН - вътрешен резервен член, катедра „Ортодонтия“ на ФДМ при МУ-София
2. Проф. д-р Георги Томчев Томов, доктор – външен резервен член за МУ-София, Катедра „Пародонтология и заболявания на оралната лигавица“, Факултет по Дентална медицина, Медицински Университет – Пловдив

Материалите по защитата са на разположение в Катедра „Пародонтология“ на Факултете по дентална медицина към МУ-София и са публикувани на неговата интернет страница.

Забележка: номерата на таблиците и фигурите не съответстват на номерата в дисертационния труд.

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

GCF – гингивална кревикуларна течност
TNF- α – тумор некрозис фактор – алфа
IFN γ - интерферон гама
LPS – липополизахарид
CRP – С-реактивен протеин
SNP – single nucleotide polymorphism (единичен нуклеотиден полиморфизъм)
PMNs – полиморфонуклеарни левкоцити
T. denticola – Treponema denticola
P. gingivalis – Porphyromonas gingivalis
F. nucleatum – Fusobacterium nucleatum
T. Forsythia – Tannerella forsythia
F. alocis - Filifactor alocis
SerB - серин фосфатаза
IL- 1 β - интерлевкин- 1 бета
IL- 6 - интерлевкин-6
IL-17 – интерлевкин 17
IL-10 – интерлевкин -10
IL-13 – интерлевкин 13
IL-23 – интерлевкин 23
NF-kB – ядрен фактор-каппа В
RANKL – рецептор активатор на NF-kB лиганд
CRC – колоректален рак
МНС II - major histocompatibility complex class II (главен комплекс за хистосъвместимост II)
PGE2 - простагландин E2
G-CSF - гранулоцит колонен фактор
FMPS – Full Mouth Plaque Score
FMBS – Full Mouth Bleeding Score
PPD/ PD – дълбочина на сондиране/дълбочина на джоба
CAL – загуба на клиничен аташман
BoP – кървене при сондиране
F – фуркация лезия
R - рецесия
M - подвижност
VI/Age – костна загуба спрямо възраст

1. ВЪВЕДЕНИЕ

Пародонтитът е възпалително заболяване, индуцирано от микроорганизми в денталната плака. В последните десетилетия се налага разбиране за взаимодействие между полимикробната инфекция и дисрегулацията на имунен отговор, което подчертава комплексния характер на заболяването. Остаряването на имунната система се обсъжда като съществен компонент, влияещ върху системното здраве на индивида и в частност върху пародонталното.

Пародонтитът е мултифакторно заболяване със значително влияние в цял свят като по последни данни се подрежда в първите шест превалиращи хронични заболявания в световен мащаб, засягащо повече от 750 млн. души. От по-мащабна медицинска гледна точка пародонтитът споделя сходни патогенетични механизми с други системни заболявания като метаболитен синдром, затлъстяване, ревматоиден артрит, диабет, бронхиална астма и др. Експериментален модел, използващ затлъстели плъхове доказва, че повишеното ниво на про-инфламаторни медиатори е свързано както с метаболитния синдром, така и с пародонтита. Разглеждан като мултифакторен инфекциозен процес нелекуваният пародонтит може да доведе до възникване на някои системни заболявания. В тези случаи балансът между про-и анти-инфламаторния имунен процес играе ключова роля и се контролира от бактериите. Повишеното ниво на агресивни бактериални видове генерира дисбиоза – феномен, който често остава подценяван. Самата дисбиоза поддържа възпалителна среда и в момента, в който възпалителния модел е установен, части на цялата имунна/нервна/ендокринна система генерират каскада от разрушителни събития. Хроничното възпалително състояние постепенно води до висока пропускливост на мукозната стена – състояние, което е известно със свободно преминаване на чревни/орални патогени в системата. Това събитие само по себе си повишава амплитудата на възпалителната реакция до по-нататъшен неконтролиран системен авто-имунен отговор. Съществува предположението, че дисбиозата евентуално може да повлияе функционално на целия организъм, в частност на пародонталните структури. Рискови фактори от средата като храненето и начинът на живот може да повлияе негативно микробиома като повиши активността на бактерии, гъбички и вируси и да насочи имунната система към активиране на една про-инфламаторна активност чрез присъствието на тумор некролизаторен фактор – α (TNF- α), интерферон γ (IFN γ), интерлевкини [46, 100].

Етиологията на пародонталните заболявания се свързва с патогенните микроорганизми, но патогенезата се разгръща на основата на възпалителните процеси, инфлуирани от имунната система на индивида. Съществуват данни, че възпалителният отговор на организма диктува промяната в бактериалната композиция. Същевременно се разглежда хипотеза за подтискането на инфламаторния отговор при податливи индивиди, което вероятно би предотвратило развитието на пародонтит [220].

Прогресията на пародонтита се свързва с разрушаване на алвеоларната кост и поддържащи зъба структури, както и с възникването на патологичен пародонтален джоб. Пародонталните заболявания са една от двете основни причини за загуба на зъби заедно със зъбния кариес. Пародонталните заболявания се асоциират с множество системни болести като кардиоваскуларните заболявания, диабет, преждевременно раждане на деца с поднормено телесно тегло и мн. други, включително рак. Тази

теоритична постановка не е нова – още Хипократ е предполагал, че ваденето на зъб може да лекува артрит [143].

Податливостта към много заболявания се търси в присъствието на определени генни полиморфизми, в частност полиморфизмите на единичен нуклеотид (SNP). Както беше споменато, пародонтитът е орално инфламаторно заболяване с деструктивен характер. Той представлява комплексно заболяване, асоциирано с различни генетични фактори и фактори от околната среда, което възниква при взаимодействие на поведенчески, микробни, генетични фактори. Множество генетични изследвания разкриват полигенната природа на пародонтита [89]. SNPs представляват вариации в ДНК последователностите, които са резултат от замяна на единичен нуклеотид като някои SNPs са специфични за дадена популация. SNPs не водят до заместване на аминокиселини, но могат да променят функцията на определен ген и/или да увредят генната експресия. До 2014 г. в човешкият геном са идентифицирани повече от 10 млн SNPs! Вариациите в единичен нуклеотид може да има незначителна или умерена роля при някои известни заболявания, но може да проявят сериозни взаимодействия с други генетични вариации или фактори на средата [89, 112, 114].

По отношение на оралните заболявания интересът към генетичните фактори е насочен към търсене на генни полиморфизми, които играят роля в имунния отговор, процесите на тъканна деструкция или метаболитни процеси. В някои ситуации генните полиморфизми могат да предизвикат промяна в даден протеин или в неговата експресия, което да доведе до нарушения във вродения или придобития имуен отговор като по този начин да се прояви като детерминант в прогресията на заболяването. Генните полиморфизми проявяват протективен или деструктивен ефект по отношение на едно заболяване. Смята се, че анализът на SNPs ще улесни откриването на множество гени, асоциирани с пародонтит, в качеството им на генетични маркери. Установено е, че между десет и двадесет гена могат да бъдат включени в мултифакторни заболявания. Много данни свидетелстват за това, че алелни вариации в гени, кодиращи цитокини, както и фактори, регулиращи тяхната експресия, могат да повлияят податливост към пародонтално заболяване, клиничния му ход, неговата прогресия и тежест. Дисрегулираната генна експресия на цитокините може да бъде отговорна за повтарящи се цикли на тъканно възпаление.

2. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Цел - целта на настоящия дисертационен труд е да се проучат определени генни полиморфизми и тяхната връзка с тежестта на пародонтита.

Във връзка с поставената цел са формулирани следните **задачи**:

1. Да се установи присъствието на генни полиморфизми при пациенти с пародонтит във връзка с определени параметри на пародонтита;
2. Да се проучи връзката между присъствие на генен полиморфизъм на IL-17F и тежест на пародонтита;
3. Да се проучи съществува ли връзка между IL-17F и IL-23 и по-голяма тежест на пародонтита. В посочената задача са обособени две подзадачи:
 - 3.1. Генотипизиране на участниците;
 - 3.2. Установяване на връзки между двата интерлевкина и тежестта на пародонтита.
4. Да се проучи присъствието на генен полиморфизъм за IL-13 и податливост към тежък пародонтит с бърза прогресия. В посочената задача са обособени две подзадачи:
 - 4.1. Генотипизиране на участниците;
 - 4.2. Установяване на връзка между генен полиморфизъм на IL-13 и податливост към тежък пародонтит с бърза прогресия.
5. Установяване за полиморфизъм на IL-10 и обвързването му с определени параметри на тежкия пародонтит.

3. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

Материали

Изследвани лица – в изследването взеха участие 157 лица – пациенти с тежък пародонтит и здрави доброволци. Клинични и рентгенологични изисквания (включващи критерии) към участниците:

За здравите лица – пълнолетни лица, без близкородствени връзки; системно здрави.

За пациентите с пародонтит– системно здрави, без близкородствени връзки. В изследването се включват пациенти с тежък пародонтит – III и IV стадий, рисков клас B и C, отговарящи на критериите, поставящи съответната диагноза.

За всички включени лица – липса на ортодонтско лечение към момента на проучването, липса на прием на антибиотици или нестероидни противовъзпалителни средства поне година преди участие в проекта, липса на пародонтално лечение в последната една година.

Критерии за изключване – бременни жени, лица на системна медикация, лица със злокачествени заболявания или системни заболявания, асоциирани с връзка с пародонтит.

Методи

I.Клинични методи:

1. Анамнеза – на всички изследвани лица е снета щателна общомедицинска анамнеза с цел установяване или отхвърляне на заболявания и състояния, които не биха позволили участие в научното изследване. Всички изследвани лица са подписали информирано съгласие. Медицинската етика е спазена и официализирана чрез декларация от Комисия по етика на научните изследвания в медицински университет – София (КЕНИМУС), предоставена за всеки проект, по който са взели участие изследваните лица.

2. Клинични методи, регистриращи хигиенен, гингивален и пародонтален статус:

2.1. FMPS/FMBS (Full mouth plaque score/Full mouth bleeding score) – двата показателя са снети едновременно с помощта на градуирана пародонтална сонда. Пародонталната сонда се въвежда не повече от 1 mm апикално от гингивалния ръб в пародонталния джоб или гингивалния сулкус. Пародонталната сонда се придвижва циркумферентно по цялата повърхност на всеки обследван зъб, като отчитането на наличие или отсъствие на зъбна плака и гингивално кървене се осъществява в шест места – медиовестибуларно, централновестибуларно, дистовестибуларно, медиолингвално / медиопалатинално, централнолингвално / централнопалатинално, дистолингвално / дистопалатинално. Наличието или отсъствието на плака и кървене се отбелядва в

четири точки със знак „+“ или „-“, „“. За отчитане на наличието на кървене се изчаква 30 секунди от въвеждане на пародонталната сонда в сулкуса/джоба.

2.2. PPD – извършва се в циркуферентно за всеки зъб, като най - дълбоките стойности се регистрират в шест места около всеки зъб. Измерването на дълбочината на сондиране се извършва с градуирана пародонтална сонда. Измерва се разстоянието от гингивалния ръб до дъното на сулкуса/пародонталния джоб в милиметри. Пародонталното сондиране за регистриране и измерване на джобове е надежден метод за локализиране на пародонтални джобове и за измерване на тяхната клинична дълбочина. Изследваните места се разделят на следните групи: 1-3 mm, 3-5 mm, 5-7 mm, над 7 mm.

2.3. CAL – Загуба на клинично прикрепване. Параметърът дава информация за количеството загубен съединително-тъканен аташман около всеки зъб. С градуирана пародонтална сонда се измерва разстоянието от цемента-емайловата граница до дъното на сулкуса/джоба. Измерването се извършва циркуферентно около всеки зъб като стойностите се записват в шест места за всеки зъб в милиметри като под внимание се вземат най-високите измерени стойности.

2.4. BoP – измерването на този пародонтален параметър се извършва с градуирана пародонтална сонда и се регистрира в шест места. Кървенето от дъното на пародонталния джоб е метод за оценяване на активността на пародонталното заболяване както на ниво пародонтално място, така и в цялото съзъбие. Положителните за кървене места се вписват със знак „+“, а местата, при които липсва кървене се отбелязват със знак „-“.

2.5. F – фуркационно увреждане/фуркационна лезия. Фуркационното увреждане представлява загуба на пародонтален аташман между корените на двукоренови и трикоренови/многокоренови зъби (премолари и молари). Хоризонталната компонента на фуркационното увреждане се осъществява със специализирана пародонтална сонда на Nabers и се класифицира по следния начин, съгласно класификацията на Hamr: F0 – вертикално сондиране на пародонтален джоб без хоризонтално пенетриране на пародонталната сонда, F1 – пародонталната сонда навлиза до 3 mm във фуркационния вход, F2 – хоризонтално фуркационно засягане от 3 до 6 mm, F3 – фуркационно засягане над 6 mm или т.нар. проходно засягане.

2.6. R – рецесия. Рецесията е състояние, което се характеризира с апикална миграция на маргиналният гингивален ръб и експозиция на кореновата повърхност. Използвана е класификацията на Cairo за гингивални рецесии, както следва: RT1 – гингивална рецесия без загуба на интерпроксимален аташман; RT2 – гингивална рецесия с наличие на интерпроксимална загуба на аташман, която е по-малка или равна на вестибуларната; RT3 – гингивална рецесия, при която интерпроксималната загуба на аташман надвишава големината на вестибуларната рецесия.

2.7. M – подвижност на зъбите, регистрирана по индекса на Милер: клас 1 – подвижност в хоризонтална посока до 1 mm; клас 2 – подвижност в хоризонтална посока над 1 mm; клас 3 – подвижност както в хоризонтална, така и вертикална посока.

3. Метод за вземане на генетичен материал – от букална мукоза.

- За IL-17F и IL-23 – вземане на проба от букална лигавица със стерилен тампон, предоставен от сертифицирана лаборатория¹ и транспортиране на пробата директно до лабораторията или съхранение на пробата в хладилник до транспортиране в лабораторията. Пробата е взета чрез обтриване последователно на дясна, лява буза, последвано от обтриване на вътрешната повърхност на горна и долна устна.

- За IL-10 и IL-13 – вземане на проба от букална лигавица със стерилна полиуретанова четка, поставяне на четката в контейнер с дестилирана вода и транспортиране на пробата до Национална Генетична Лаборатория или съхранение на пробата за не повече от 5 дни в хладилник до транспортиране на пробата до НГЛ.

II. Параклиничен метод – рентренографски метод. Ортопантомография и секторна рентгенография в най-тежко поразения участък в дентицията. На отропанотомография е установено наличието на костна загуба, както и типа на костната деструкция. На периапикална рентгенография е измерен параметъра дълбочина на вертикален костен дефект. При анализа на тази стойност са взети под внимание само вертикални дефекти с дълбочина ≥ 3 mm. На периапикална рентгенография е измерен показателя костна загуба/възраст на пациента (BI/Age).

III. Лабораторен метод – PCR

- За IL-17F и IL-23:

Real-time PCR (полимеразно-верижна реакция в реално време)

Протоколи:

- ✓ Изолиране на геномна ДНК от букална лигавица и пречистване с колонка /търговски кит/

Всеки тампон се инкубира в 2мл лизис буфер с Протеиназа К на 55С за 30 мин. при постоянно размесване. След отстраняване на тампона към всяка проба се добавят по 400мкл буфер, оптимизиран за свързване на ДНК, пробата се центрофугира през колонка, която се промива двукратно след това. ДНК се елуира в 50мкл буфер и се съхранява на -20С до провеждане на анализа.

- ✓ Провеждане на Real-time PCR

Анализът се провежда с 5 мкл геномна ДНК и оптимизирани комплекти от праймери и две сонди за определяне на генотип:

Условията на real-time PCR реакцията са: общ обем - 20мкл, 1x95С/10мин; 40x95С/15сек. и 60С/1мин.

- За IL-10 и IL-13:

Real-time PCR SNP анализ за определяне на IL-13 -1112.

¹ Лаборатория „Проген“ ООД

Използван е кит за изолиране Nucleo Spin MACHEREY-NAGEL с колонки.

Протокол за изолиране на геномна ДНК от букална лигавица:

- Отстранява се четката и пробата се завърта на 12000 оборота за 10 мин. Маха се супернатанта и с част от водата се ресуспендират клетките;
- Пре-лизиране - добавя се 180 µl T1 буфер и 25 µl протеиназа К;
- Вортексира се и се инкубира на 56°C за 1-3 часа;
- Лизиране – Добават се 200 µl В3 буфер и се инкубира на 70°C за 10 мин;
- Добавя се 210 µl 96-100% етанол и се вортексира;
- Пробата се прехвърля в колонката и се върти на 11 000 g за 1 мин;
- Добавя се 500 µl ВW wash буфер и се върти на 11 000 g за 1 мин;
- Добавя се 600 µl W5 wash буфер и се върти на 11 000 g за 1 мин;
- Сухо въртене на 11 000 g за 1 мин;
- Елууване на пробата – Колонката се поставя в предварително надписаната 1,5 mL епендорвка. Добавя се 80 µl ВЕ буфер. Инкубира се на стайна температура за 1 мин и се върти на 11 000 g за 1 мин;
- Преданалитична обработка – PCR (полимеразна верижна реакция) и оценка на пробата на 2% агарозен гел;
- Анализ – RFLP (Restriction fragment length polymorphism) – метод за детекция на варианти (полиморфизми/генетични маркери) в ДНК молекулата чрез рестрикция на ДНК фрагмента с помощта на рестриктазни ензими, които разпознават определения регион. Така се получават различни по дължина фрагменти от PCR продукта и така могат да бъдат анализирани. Анализът се прави след разтичането на пробите на 3% агарозен гел.

Праймери за П-13-1112

Праймери: Прав: 5'- GGAATCCAGCATGCCTTGTGAGG-3'

Обратен: 5'-GTCGCCTTTTCCTGCTCTTCCCGC-3'

Праймери за П-10 -819

Прав: 5'-TCATTCTATGTGCTGGAGATGG-3'

Обратен: 5'-TGGGGGAAGTGGGTAAGAGT-3'

IV.Статистически методи:

Данните бяха въведени и обработени със статистическия пакет PCA – IBM SPSS Statistics Version 22. За ниво на значимост, при което се отхвърля нулевата хипотеза беше избрано $p < 0,05$.

Статистически методи за потвърждаване или отхвърляне на нулевата хипотеза бяха приложени при решаване на задачи 2, 3 (подзадача 2), 4 (подзадача 2) и 5.

Формулират се следните хипотези:

По задача 2:

- H_0 – Различните генотипове не оказват обективно (статистически значимо влияние) върху тежестта на пародонтита, измерена чрез различни параметри;
- H_0 – полът не оказва обективно (статистически значимо влияние) върху тежестта на пародонтита, измерена чрез различни параметри;
- H_0 – тютюнопушенето не оказва обективно (статистически значимо влияние) върху тежестта на пародонтита, измерена чрез различни параметри.

По задача 3 (подзадача 2):

- H_0 – Различните комбинации на генотипове между IL-17F и IL-23 не оказват обективно (статистически значимо влияние) върху тежестта на пародонтита, измерена чрез различни параметри.

По задача 4 (подзадача 2):

- H_0 – Различните генотипове не влияят върху податливост към тежък пародонтит с бърза прогресия.

По задача 5:

- H_0 – различните генотипове не оказват обективно (статистически значимо влияние) върху тежестта на пародонтита, измерена чрез различни параметри;
- H_0 – полът не оказва обективно (статистически значимо влияние) върху тежестта на пародонтита, измерена чрез различни параметри;
- H_0 – тютюнопушенето не оказва обективно (статистически значимо влияние) върху тежестта на пародонтита, измерена чрез различни параметри.

За анализ на данните са използвани методите на описателния анализ (едномерни и двумерни групировки) общо за цялата съвкупност и за подсъвкупности, формирани по здравен статус, по генотип, по пол, по модифициращ фактор – тютюнопушене, както и по комбинации между различните значения на гореизброените признаци. Оценени са средна аритметична, медиана (показатели за централна тенденция) и стандартно отклонение и размах (показатели за оценка на разсейването).

1. Дескриптивен (описателен) анализ – честотното разпределение на изследваните лица по интересувашите ни параметри е представено в таблици – общо за всички изследвани лица и по подсъвкупности. Оценени са характеристики на едномерните разпределения – измерители на централната тенденция (средна аритметична, медиана и мода) и измерители на разсейването (размах и стандартно отклонение).

2. Student T-test – за проверка на хипотези за разлика между две средни аритметични от две независими извадки. Нивото на значимост е 0,05.

3. Корелационни коефициенти – за измерване силата/теснотата на връзката между различни параметри

4. χ^2 – метод за проверка на хипотези за наличие на статистически значима връзка между две променливи, разположени на слаби скали.

5. **Fisher exact test** – за определяне на статистически значими връзки между дихотомни променливи.

Бяха установени корелационни коефициенти при следните параметри: възраст, FMPS (%), FMBS (%), PD 1-3 mm, PD 3-5 mm, PD 5-7 mm, PD > 7 mm, CAL 1-2 mm, CAL-3-4 mm, CAL \geq 5 mm, BoP (%), BI/Age.

4. РЕЗУЛТАТИ

Резултати по задача 1- Да се установи присъствието на генни полиморфизми при пациенти с пародонтит във връзка с определени параметри на пародонтита

В задача 1 са обобщени клинични, параклинични и лабораторни данни на всички изследвани лица. В нашето проучване взеха участие 157 лица, от които 117 са с пародонтит, а 40 са здрави контролни индивиди. на всички участници в изследването беше направена пародонтална диагностика. Биологичен материал беше взет с помощта на стерилен тампон/стерилна четка като последователно бяха обтрети вътрешната страна на дясната и лявата буза, вътрешната страна на горна и долна устна. Извършено беше генотипизиране на всички изследвани лица с цел установяване на присъствие на генни полиморфизми на IL-17F, IL-23, IL-13, IL-10. Резултатите показаха, че в нашето проучване са взели участие 66 мъже (42%) и 91 жени или 58% от всички участници. По модифициращия фактор тютюнопушене се установи, че 92 от участниците са непущачи (58,6%), докато пушачите са 41,4% от цялата извадка.

Разпределение на пациентите по изследвани интерлевкини:

- 83 участника са изследвани за SNP на IL-17F (52,9%)
 - 83 участника са изследвани за SNP на IL-23 (52,9%)
 - 101 участника са изследвани за SNP на IL-13 (64,3%)
 - 96 участника са изследвани за SNP на IL-10 (61,1%)
- Данните на всички изследвани лица представихме в таблица.

Таблица 1. Обща характеристика на всички участници.

Характеристика	Значение	Брой	Относителен дял
База (брой лица) <i>N=157</i>			
Интерлевкин	IL_17	83	52,9%
	IL_23	83	52,9%
	IL_13	101	64,3%
	IL_10	96	61,1%
Пол	Мъж	66	42,0%
	Жена	91	58,0%
Пушач	Не	92	58,6%
	Да	65	41,4%

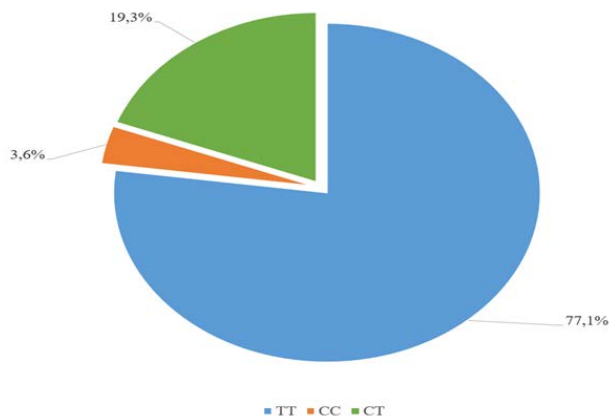
Статус на пациента	Пародонтит	117	74,5%
	Здрав	40	25,5%

Таблица 2. Двумерно разпределение на всички изследвани лица.

Интерлевкин	Пол				Пушач				Здравен статус				Общо
	Мъж		Жена		Не		Да		Не		Да		
	Брой (N)	Относителен дял	Брой (N)	Относителен дял	Брой (N)	Относителен дял	Брой (N)	Относителен дял	Пародонтит	Относителен дял	Здрав	Относителен дял	
IL_17	32	38,6%	51	61,4%	47	56,6%	36	43,4%	21	25,3%	62	74,7%	83
IL_23	32	38,6%	51	61,4%	47	56,6%	36	43,4%	21	25,3%	62	74,7%	83
IL_13	47	46,5%	54	53,5%	55	54,5%	46	45,5%	30	29,7%	71	70,3%	101
IL_10	46	47,9%	50	52,1%	52	54,2%	44	45,8%	27	28,1%	69	71,9%	96
ОБЩО	66	42,0%	91	58,0%	92	58,6%	65	41,4%	40	25,5%	117	74,5%	157

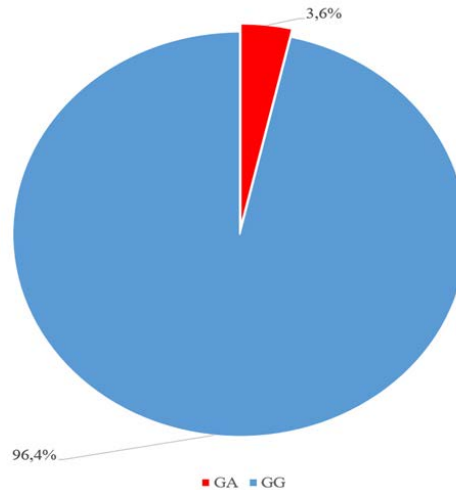
Резултатите от генотипизирането на участниците по всеки един единичен нуклеотиден полиморфизъм на търсените цитокини са представени графично.

В търсене на SNP IL-17F и IL-23 изследвахме 32 мъже (38,6%) и 51 жени (61,4%). От изследваните лица пушачите са общо 36 (43,4%), а непушачите – 47 (56,6%). Пациентите с пародонтит са 62 (74,7%), а здравите контролни индивиди са 21 (25,3%).



Фигура 1. Генотипизиране на участниците с SNP на IL-17F.

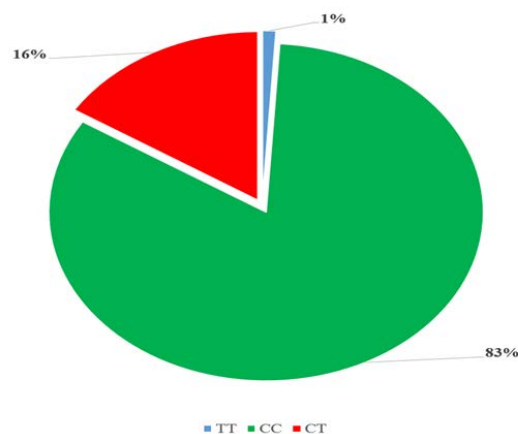
Най-голямо разпространение се установи при генотип TT – 77,1%, както при пациентите с пародонтит, така и при здравите пробанти. На второ място по разпространение е генотип CT с 19,3%. Най-дискретно е разпространението на генитип CC, установен само при трима участника – 3,6%.



Фигура 2. Генотипизиране на участниците с SNP на IL-23.

При изследване на SNP на IL-23 се установи присъствие на два генотипа. Масово разпространение е регистрирано по отношение на GG-генотип – 96,4%, докато GA-генотипът е изолиран едва при 3,6%. При нито едно от изследваните лица не се установи присъствие на AA-генотип.

В проучването за за SNP на IL-13 са включени общо 106 лица. При пет от тях ДНК не беше амплифицирана. От общо 101 изследвани лица 47 (46,5%) са мъже и 54 (53,5%) са жени. По фактор тютюнопушене се установи, че 46 (45,5%) от участниците са пушачи, а останалите 55 (54,5%) са непушачи.

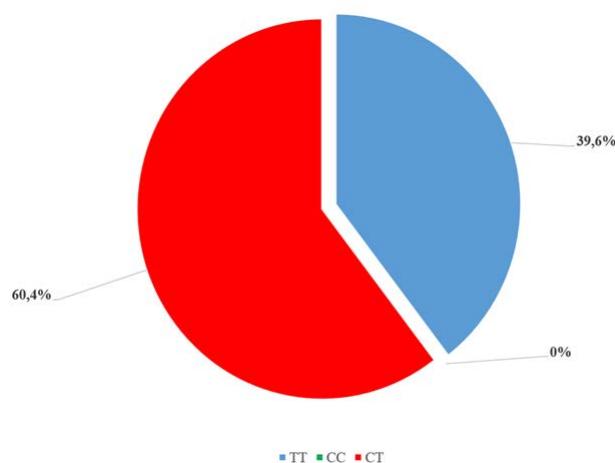


Фигура 3. Генотипизиране на участниците с SNP на IL-13.

При търсения полиморфизъм са изолирани три генотипа: с най-голямо разпространение е генотип CC – 83% от всички изследвани лица, последван от CT – 16%. С най-ниско разпространение е генотипът TT – 1%, установен само при един пациент с пародонтит.

При изследване на SNP на IL-10 в проучването се включиха общо 106 лица, но при 10 от тях ДНК не се амплифицира. На статистическа обработка са подложени данните на 96 лица, от които мъжете представляват 46 (47,9%), а жените са 50 (52,1%). От всички лица пушачите са 44 (45,8%), непушачите – 52 (54,2%). 69 от изследваните лица

(71,9%) са пациенти с пародонтит, здравите пробанти са 27, което представлява 28,15 от общия дял.



Фигура 4. Генотипизиране на участниците с SNP на IL-10.

Получени са данни за присъствие на два генотипа. По-широко разпространение има генотип CT – 60,4%, докато TT-генотип се установи при 39,6% от всички изследвани лица. Не се изолира генотип CC.

По отношение на пародонталния статус данните на изследваните лица са анализирани и представени таблично.

Таблица 3. Характеристика на участниците.

Характеристики на пациентите в извадката		Пародонтален статус			
		Да		Не	
		Пародонтит	Относителен дял	Здрав	Относителен дял
Пол	Мъж	53	45,3%	13	32,5%
	Жена	64	54,7%	27	67,5%
Пушач	Не	62	53,0%	30	75,0%
	Да	55	47,0%	10	25,0%
ОБЩО		117	100,0%	40	100,0%

Установи се, че при пациентите с пародонтит жените са повече в сравнение с мъжете – 64 (54,7%) срещу 53 (45,3%). Също така в тази група от изследвани лица непушачите са незначително повече от пушачите – 62 (53%) срещу 55 (47%). Здравите контролни индивиди се характеризират с почти двойно повече участници от женски пол – 27 жени (67,5%) спрямо 13 мъже (32,5%). От тях обаче само една четвърт са пушачи, т.е. 10 индивида пушат, а останалите са непушачи.

Резултати по задача 2 - Да се проучи връзката между присъствие на генен полиморфизъм на IL-17F и тежест на пародонтита

Изследвани са 83 лица, от които 32-ма мъже и 51 жени. Лицата с пародонтит представляват 74,7% от всички изследвани, здравите контроли – 25,3% от всички изследвани лица. Сред обследваната група незначително доминират пушачите пред непушачите с процент от 55,6% пред 43,4% или 47 от тях са пушачи, а останалите 36 са непушачи. Генното типизиране за IL-17F показва носителство на три генотипа: ТТ, СТ, СС. От всички изследвани лица 64 са носители на ТТ генотип, 16 – на СТ генотип и едва 3 лица са хомозиготни по С-алела (СС генотип). При пациентите с пародонтит и здрави контроли разпределението на двата генотипа ТТ/СТ по пародонтален статус е еднакво (от изследваните пациенти с генотип ТТ 48 са с пародонтит и 16 здрави, а от изследваните лица с генотип СТ пациентите с пародонтит са 16, а здравите – 4 лица). Това означава, че и в двете подсъвкупности $\frac{3}{4}$ от лицата са с пародонтит.

Таблица 4. Обща характеристика на всички лица.

Характеристика	Значение	Брой	Относителен дял
База (брой лица)	<i>N=83</i>		
Пол	Мъж	32	38,6%
	Жена	51	61,4%
Пушач	Не	47	55,6%
	Да	36	43,4%
SNP IL-17F rs_763780	ТТ	64	77,1%
	СС	3	3,6%
	СТ	16	19,3%
Статус на пациента	Пародонтит	62	74,7%
	Здрав	21	25,3%

При изследваните лица с диагноза пародонтит бяха установени следните данни, приложени в таблица:

Таблица 5. Пародонтални параметри на пациенти.

Изследван показател	N	Средна	Медиана	Стандартно отклонение	Размах	Минимална стойност	Максимална стойност
Възраст	62	48,61	47,00	11,30	56,00	29,00	85,00
FMPS (%)	62	86,48	92,50	15,81	54,00	46,00	100,00
FMBS (%)	62	72,95	74,00	24,97	92,20	7,80	100,00
PD 1-3 (%)	62	41,85	40,30	18,57	90,00	0,00	90,00
PD 3-5 (%)	62	34,06	34,95	14,69	61,70	5,50	67,20
PD 5-7 (%)	62	17,37	16,45	9,75	40,30	1,90	42,20
PD > 7 (%)	62	5,99	4,25	6,90	43,60	0,00	43,60
CAL 1-2 (%)	62	31,16	31,70	19,15	72,00	0,00	72,00
CAL 3-4 (%)	62	40,33	39,60	15,46	71,80	7,30	79,10
CAL ≥ 5 (%)	62	26,24	22,35	17,37	84,20	0,90	85,10
BoP (%)	62	79,43	85,50	20,73	83,00	17,00	100,00
BI/Age	62	1,07	1,04	0,43	2,52	0,34	2,86

Установихме, че средната възраст при изследваните от нас пациентите с пародонтит е 48,6 години, с най-ниска регистрирана възраст 29,00 години и най-висока – 85,00 години. Средното ниво на разпространение на зъбна плака, регистрирано с FMPS е 86,48%, а маргиналното кървене, регистрирано с FMBS е със средни стойности от 72,93%. По отношение дълбочината на сондиране са регистрирани следните средни стойности:

- PD 1-3 mm – 41,85% от изследваните места;
- PD 3-5 mm – 34,06% от изследваните места;
- PD 5-7 mm – 17,37% ;
- PD > 7 mm – 5,99 %;
- CAL 1-2 mm – 31,16%;
- CAL 3-4 mm – 40,33%;
- CAL ≥ 5 mm – 26,24%;
- BoP – 79,43%
- BI/Age – 1,07.

Подложихме на статистически анализ данните, получени от клиничния и рентгенологичен статус на пациентите. Резултатите представихме таблично.

Таблица 6. Пародонтален статус на пациенти с генотип ТТ.

Изследван показател	N	Средна	Медиана	Стандартно отклонение	Размах	Минимална стойност	Максимална стойност
Възраст	48	48,10	46,50	10,29	46,00	29,00	75,00
FMPS (%)	48	85,13	92,50	16,93	54,00	46,00	100,00
FMBS (%)	48	71,70	72,00	25,50	92,20	7,80	100,00
PD 1-3 (%)	48	41,63	40,50	17,59	90,00	0,00	90,00
PD 3-5 (%)	48	34,63	32,70	14,79	61,70	5,50	67,20
PD 5-7 (%)	48	16,71	16,15	8,83	40,30	1,90	42,20
PD > 7 (%)	48	6,53	4,45	7,52	43,60	0,00	43,60
CAL 1-2 (%)	48	32,80	35,50	20,02	72,00	0,00	72,00
CAL 3-4 (%)	48	41,72	41,20	15,78	67,10	12,00	79,10
CAL ≥ 5 (%)	48	24,06	18,75	16,88	84,20	0,90	85,10
BoP (%)	48	80,41	88,50	21,44	83,00	17,00	100,00
BI/Age	48	1,07	1,03	0,43	2,40	0,46	2,86

Средната възраст на пациентите с генотип ТТ е приблизително 48, 00 години с най-ниска регистрирана възраст от 29,00 години и най-висока от 75,00 години. Зъбната плака и гингивалното кървене са със средни стойности от 85,13% за FMPS и 71,70% за FMBS. В тази под-група отново се среща висок дял на местата с дълбочина на

сондиране PD 1-3 mm (41,63%). Делът на най-дълбоките пародонтални джобове е със средна стойност от 6,53% (PD >7mm), докато местата с дълбочина на сондиране 3-5 mm и 5-7 mm са разпределени съответно 34,63% за джобовете от 3 до 5 mm и 16,71% - респективно за джобовете от 5-7 mm. Установява се, че тези пародонтални места са с най-високи стойности в сравнение със същите при останалите генотипове за разглеждания полиморфизъм. При изследваната под-група най-голямо разпределение се наблюдава на местата с умерена загуба на клинично прикрепване CAL 3-4 mm 41,72%, а най-малко на CAL \geq 5 mm – 24,06%. Леката загуба на клиничен аташман представлява 32,80% от всички места със загуба на клинична аташман. Параметърът BoP, показващ активността на изследваните пародонтални джобове е представен със средна стойност от 80,41%, а съотношението BI/Age има стойност 1,07.

При пациентите, носители на СТ генотип се установяват следните резултати:

Таблица 7. Пародонтален статус при пациенти с генотип СТ.

Изследван показател	N	Средна	Медиана	Стандартно отклонение	Размах	Минимална стойност	Максимална стойност
Възраст	12	46,92	46,00	11,16	36,00	29,00	65,00
FMPS (%)	12	93,73	100,00	8,63	26,00	74,00	100,00
FMBS (%)	12	81,44	89,30	21,19	56,10	43,90	100,00
PD 1-3 (%)	12	40,50	38,00	22,91	88,60	0,00	88,60
PD 3-5 (%)	12	32,64	39,00	15,50	48,50	6,70	55,20
PD 5-7 (%)	12	21,51	20,70	12,51	39,00	2,00	41,00
PD > 7 (%)	12	3,50	2,30	3,67	10,10	0,00	10,10
CAL 1-2 (%)	12	24,55	21,50	16,13	43,00	7,00	50,00
CAL 3-4 (%)	12	35,08	34,80	14,55	46,70	7,30	54,00
CAL \geq 5 (%)	12	33,51	34,75	18,46	53,40	4,90	58,30
BoP (%)	12	78,83	83,10	18,37	66,00	34,00	100,00
BI/Age	12	1,15	1,23	0,42	1,34	0,40	1,74

По отношение на средната възраст, тя е съпоставима със средната възраст при пациентите с генотип ТТ. Незначително по-високи стойности са регистрирани в разпространението на зъбната плака и свързаното с нейното персистиране кървене от маргиналният гингивален ръб – FMPS има средна стойност от почти 94%, а FMBS – 81,44%. Най-широко разпространени са пародонталните места с дълбочина на сондиране 1-3 mm, последвани от PD 3-5 mm – 32,64%. PD 5-7 mm са представени със средна стойност от 21,51%, а PD > 7 mm се срещат в 3,50%. Леката загуба на клинично

прикрепване се среща в 24,55 % от обследваните места. Умерена стойност на CAL 3-4 mm се наблюдава в 35,08% от изследваните места, а тежка CAL \geq 5 mm – 33,51%. Последната стойност е по-високата в сравнение със същата при пациентите, хомозиготни по T-алел. Кървенето при сондиране BoP има средна стойност от 78,83%, BI/Age – 1,15. Съотношението костна загуба спрямо възраст на пациент при тази група е по-високо в сравнение със същата стойност при TT генотип пациенти.

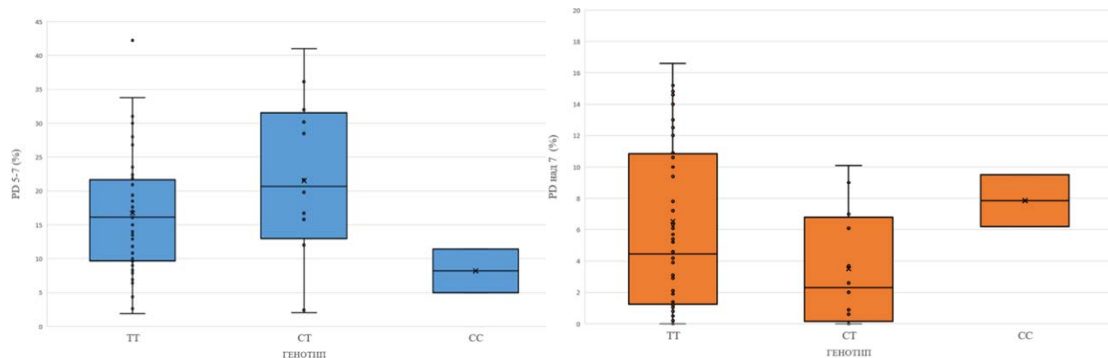
Таблица 8. Пародонтален статус при пациенти с генотип CC.

Изследван показател	N	Средна	Медиана	Стандартно отклонение	Размах	Минимална стойност	Максимална стойност
Възраст	2	71,00	71,00	19,80	28,00	57,00	85,00
FMPS (%)	2	75,50	75,50	3,54	5,00	73,00	78,00
FMBS (%)	2	52,00	52,00	26,87	38,00	33,00	71,00
PD 1-3 (%)	2	55,00	55,00	18,95	26,80	41,60	68,40
PD 3-5 (%)	2	28,95	28,95	12,09	17,10	20,40	37,50
PD 5-7 (%)	2	8,20	8,20	4,53	6,40	5,00	11,40
PD > 7 (%)	2	7,85	7,85	2,33	3,30	6,20	9,50
CAL 1-2 (%)	2	31,65	31,65	1,91	2,70	30,30	33,00
CAL 3-4 (%)	2	38,30	38,30	10,32	14,60	31,00	45,60
CAL \geq 5 (%)	2	35,05	35,05	15,49	21,90	24,10	46,00
BoP (%)	2	59,60	59,60	6,51	9,20	55,00	64,20
BI/Age	2	0,68	0,68	0,48	0,68	0,34	1,02

Прави впечатление, че средната възраст е значително по-висока в сравнение с останалите две под-групи, а именно 71,00 години. Разпространението на зъбната плака е 75,50%, но гингивалното възпаление не корелира с нейното разпространение, т.е. установени са сравнително по-ниски стойности на FMBS. Широко разпространени са PD 1-3 mm – 55,00%. PD с дълбочина 3-5 mm се установяват средно в 28,95% от изследваните места. PD 5-7 mm се установяват със средно разпределение от 8,20%, а местата с дълбочина на сондиране над 7 mm представляват средно 7,85%, с което се приближават по-скоро до стойностите на PD > 7 mm при пациенти с TT генотип. По отношение загуба на клиничен аташман резултатите се доближават повече до тези при пациентите с генотип CT. Установени са следните средни разпределения: CAL 1-2 mm – 31,65%, CAL 3-4 mm – 38,30%, CAL \geq 5 mm – 35,05%. Кървенето при сондиране е по-ниско в сравнение с останалите генотипове – почти 60%, а съотношението костна загуба спрямо възраст на пациента е 0,68 – отново с по-ниска стойност в сравнение с останалите два генотипа.

Поради ограниченото разпространение на генотип CC не могат да бъдат направени изводи относно неговата протективна/деструктивна роля в пародонталното заболяване.

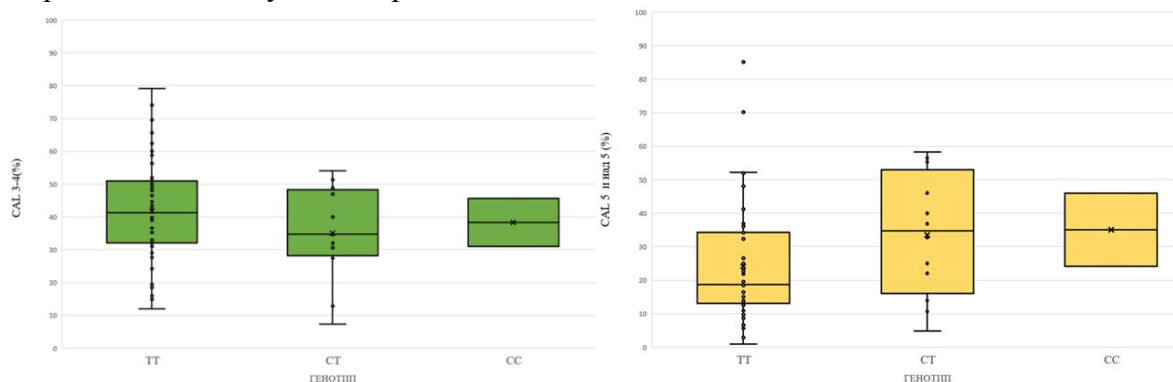
Някои основни параметри, придаващи тежест на пародонтита, ще бъдат представени и сравнени графично – пародонтални джобове с дълбочина 5-7 mm, пародонтални джобове с дълбочина над 7 mm, загуба на клиничен аташман, кървене при сондиране от дъното на джоба, костна загуба/възраст на пациента.



Фигура 5. Разпределение на пародонтални джобове с дълбочина на сондиране 5-7 mm и над 7 mm при пациенти, сравнени по генотип.

Установихме, че при пациентите с генотип СТ разпределението на пародонтални джобове с дълбочина на сондиране 5-7 mm е най-високо. При представителите на ТТ генотип се наблюдава високо разпространение на най-дълбоките пародонтални места над 7mm. От диаграмата се вижда, че при тези пациенти са регистрирани и няколко екстремално високи стойности на изследвания параметър.

По отношение на загубата на клиничен аташман – CAL, представени са данни за умерена и тежка загуба на пародонтални тъкани.



Фигура 6. Умерена и тежка загуба на клиничен аташман при пациенти, сравнени по генотип.

От диаграмата се вижда, че разпределението на местата с умерена загуба на клинично прикрепване при представителите на трите генотипа пациенти с пародонит е сравнима, въпреки че медианата при пациентите с ТТ генотип е разположена по-високо. При хетерозиготните индивиди най-високо е разпределението на тежка загуба на клиничен аташман. При пациентите с генотип ТТ тази загуба се среща при по-малко пациенти, но същевременно са регистрирани и няколко изключително високи, респ. стойности на посочения пародонтален параметър.

Оценена е силата на връзката между възрастта и няколко параметъра на пародонтита, съотнасящи диагнозата към тежък стадий: CAL \geq 5 mm, също и допълнителни критерии като BoP и BI/Age. Основно вниманието е насочено към 4 корелационни коефициента – измерващи силата на връзките: възраст и PD над 7 mm, CAL \geq 5 mm, BoP, BI/Age. Прави впечатление, че за последните три коефициента стойностите са най-високи при генотип СТ (ако при корелацията възраст/CAL, за всички изследвани лица стойността на коефициента е 0,377, то за лицата с генотип СТ стойността на коефициента е 0,588). BoP за всички изследвани лица е 0,561, а за носителите на генотипа СТ е 0,683. Относно корелацията между възраст и BI/Age при всички лица е 0,277, при генотип СТ е 0,414. Това показва, че възрастта има по-голямо значение при носителите на генотип СТ по отношение на горепосочените пародонтални параметри.

Таблица 10. Резултати от проверка на хипотези между най-разпространените генотипове на SNP на IL-17F.

Изследван показател	ТТ	СТ	P-value
	Средна	Средна	
Възраст	43,94	40,88	0,407
FMPS (%)	75,44	75,92	0,954
FMBS (%)	62,85	63,71	0,925
PD 1-3 (%)	55,93	55,38	0,947
PD 3-5 (%)	26,27	24,48	0,744
PD 5-7 (%)	12,53	16,13	0,262
PD \geq 7 (%)	4,90	2,63	0,219
CAL 1-2 (%)	24,60	18,41	0,247
CAL 3-4 (%)	31,29	26,31	0,425
CAL \geq 5 (%)	18,04	25,13	0,181
BoP (%)	60,31	59,12	0,914
BI/Age	0,80	0,86	0,717

* Разликата е значима при равнище на значимост 0.10

** Разликата е значима при равнище на значимост 0.05

Не се установяват статистически значими разлики при средните стойности на изследваните параметри по двата генотипа. Една от възможните причини е сравнително малкият обем на извадката при пациентите с генотип СТ (само 16 пациента). Независимо от липсата на статистическа значимост, клинично се установява, че при пациентите с генотип ТТ пародонталните джобове, регистрирани с най-високи стойности се срещат по-често в сравнение със същия параметър при пациенти с генотип СТ. При хетерозиготните пациенти пародонталните места с най-тежка деструкция, регистрирана с параметъра CAL \geq 5 mm, се срещат повече в сравнение с пациентите с генотип ТТ.

Относно влиянието на отделните генотипове по отношение на някои параметри на пародонтита установихме, че нямаме основание да отхвърлим нулевата хипотеза H_0 , въпреки че са налице известни различия по следните показатели:

- $PD > 7\text{mm}$ – в полза на TT генотип;
- $CAL \geq 5\text{ mm}$ – в полза на CT генотип.

Таблица 11. Проверка на хипотези за наличие на статистически значими разлики между средните величини на показателите на жените и мъжете.

Отхвърляме нулевата хипотеза, че полът не оказва обективно влияние (статистически значимо влияние) върху тежестта на пародонтита, измерена чрез различни параметри.

Приемаме алтернативна хипотеза H_1 – полът оказва влияние върху различни параметри на пародонтита, а именно $CAL \geq 5\text{ mm}$ и BI/Age .

Таблица 11. Резултати от проверка на хипотези за наличие на статистически значими разлики между средните величини на показателите на пушачите и непушачите.

Изследван показател	ПУШАЧИ	НЕПУШАЧИ	P-value
	Средна	Средна	
Възраст	41,03	45,83	0,121
FMPS (%)	76,14	73,64	0,707
FMBS (%)	49,21	71,79	0.001**
PD 1-3 (%)	50,93	60,47	0,149
PD 3-5 (%)	28,30	23,65	0,279
PD 5-7 (%)	14,55	11,77	0,270
PD > 7 (%)	5,25	3,87	0,342
CAL 1-2 (%)	18,12	27,23	0.054*
CAL 3-4 (%)	31,06	29,41	0,739
CAL ≥ 5 (%)	25,98	14,72	0.010**
BOP (%)	57,86	60,46	0,766
BI/Age	0,87	0,75	0,351

* Разликата е значима при равнище на значимост 0.10

** Разликата е значима при равнище на значимост 0.05

Във връзка с тютюнопушенето и влиянието му върху определени параметри на пародонтита, ние отхвърлихме нулевата хипотеза H_0 . Приехме алтернативната хипотеза – тютюнопушенето влияе върху определени параметри на пародонтита, а именно върху неговата тежест, измерена с параметъра $CAL \geq 5\text{ mm}$.

Таблица 12. Резултати от проверка на хипотези за наличие на статистически значими разлики между следните величини на показателите на мъже и жени.

Изследван показател	ЖЕНИ	МЪЖЕ	P-value
	Средна	Средна	
Възраст	43,76	43,72	0,988

FMPs (%)	67,71	85,91	0.006**
FMBS (%)	58,51	67,56	0,220
PD 1-3 (%)	59,47	51,33	0,228
PD 3-5 (%)	24,35	27,78	0,434
PD 5-7 (%)	11,64	15,09	0,178
PD ≥ 7 (%)	4,15	4,99	0,568
CAL 1-2 (%)	23,07	23,61	0,912
CAL 3-4 (%)	29,94	30,42	0,924
CAL ≥ 5 (%)	16,25	24,95	0.040**
BOP (%)	55,72	65,10	0,290
BI/Age	0,67	1,01	0.011**

* Разликата е значима при равнище на значимост 0.10

** Разликата е значима при равнище на значимост 0.05

Отхвърляме нулевата хипотеза, че полът не оказва обективно влияние (статистически значимо влияние) върху тежестта на пародонтита, измерена чрез различни параметри.

Приемаме алтернативна хипотеза H_1 – полът оказва влияние върху различни параметри на пародонтита, а именно $CAL \geq 5$ mm BI/Age.

При изследваните пациенти анализирахме допълнителни показатели, придаващи тежест на пародонталното заболяване.

Фуркационното засягане представлява сериозен проблем, застрашаващ прогнозата на моларите. Анализирахме данните по този параметър при пациенти (пушачи и непушачи) с генотип СТ и генотип ТТ.

Резултатите, получени при хетерозиготните пациенти, са сравними. За пациентите с генотип ТТ установихме, че непушачите (N=28), които притежават поне една фуркационна лезия клас 2 или 3 са 57,1%, докато в подгрупата на пушачите (N=20) този процент е значително по-висок – 85%. Между двата относителни дяла (относителен дял на наличие на фуркационна лезия при пушачи и непушачи) разликата е статистически значима ($p = 0,01$).

Таблица 13. Разпределение на пациентите с генотип ТТ по тютюнопушене и наличие на фуркационна лезия.

Подвижност на зъби (M 2/3)	Пушач	
	Не	Да

	Брой (N)	Относителен дял	Брой (N)	Относителен дял
Да	12	42,9%	14	70,0%
Не	16	57,1%	6	30,0%
Общо	28	100,0%	20	100,0%

Резултати по задача 3 - Да се проучи съществува ли връзка между IL-17F и IL-23 и по-голяма тежест на пародонтита.

Резултати по подзадача 3.1. - Генотипизиране на участниците

Изследвани са 83 лица. Техните данни, обобщени по пол, тютюнопушене, генен полиморфизъм и пародонтален статус, са представени в таблица.

Таблица 14. Общи характеристики на изследваните лица.

Характеристика	Значение	Брой	Относителен дял
База (брой лица)	<i>N=83</i>		
Пол	Мъж	32	38,6%
	Жена	51	61,4%
Пушач	Не	47	55,6%
	Да	36	43,4%
SNP IL23-R rs_11209026	GA	3	3,6%
	GG	80	96,4%
Статус на пациента	Пародонтит	62	74,7%
	Здрав	21	25,3%

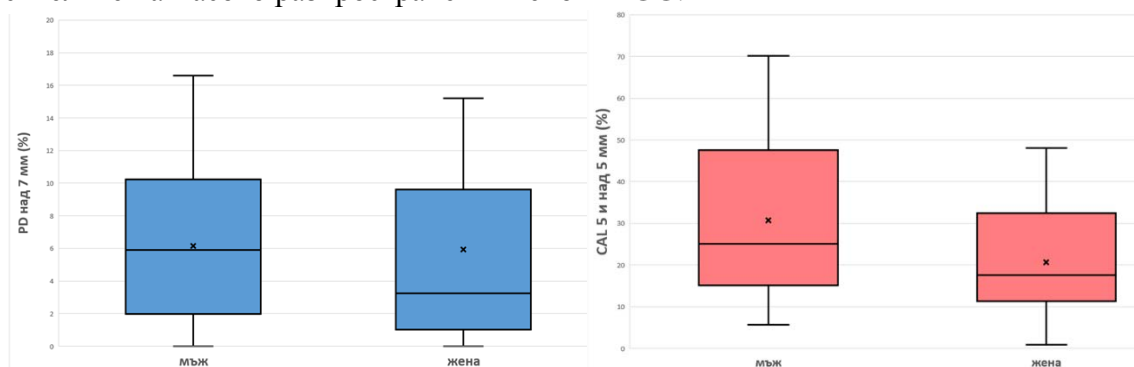
От всички изследвани лица се установява, че 62 са с пародонтит и 21- здрави. Лицата с пародонтит представляват 74,7% от всички изследвани, здравите лица – 25,3% от всички изследвани лица. В проучваната извадка незначително доминират пушачите пред непушачите с 55,6% непушачи пред 43,4% пушачи или 47 от тях са пушачи, а останалите 36 са непушачи. По отношение SNP (единичен нуклеотиден полиморфизъм) на IL23-R rs_11209026 генното типизиране показва, че носителите на алела GA са само трима, което потвърждава литературните данни, че хетерозиготните индивиди по съответния полиморфизъм се срещат значително по-рядко в сравнение с хомозиготните и то по алела G. Установен е доминиращ генотип - GG генотип.

Таблица 15. Пародонтални параметри при пациенти с генотип GG.

Изследван показател	N	Средна	Медиана	Стандартно отклонение	Размах	Минимална стойност	Максимална стойност
Възраст	60	48,77	47,00	11,42	56,00	29,00	85,00
FMPS (%)	60	86,03	92,00	15,88	54,00	46,00	100,00
FMBS (%)	60	72,66	74,00	25,11	92,20	7,80	100,00
PD 1-3 (%)	60	42,21	40,30	18,66	90,00	0,00	90,00
PD 3-5 (%)	60	34,02	34,95	14,93	61,70	5,50	67,20
PD 5-7 (%)	60	16,97	16,45	9,36	39,10	1,90	41,00
PD > 7 (%)	60	6,03	4,25	6,96	43,60	0,00	43,60
CAL 1-2 (%)	60	32,20	32,70	18,57	72,00	0,00	72,00
CAL 3-4 (%)	60	40,44	39,60	15,17	71,80	7,30	79,10
CAL ≥ 5 (%)	60	25,01	21,90	15,74	69,30	0,90	70,20
BoP (%)	60	79,48	85,50	20,68	83,00	17,00	100,00
BI/Age	60	1,07	1,03	0,44	2,52	0,34	2,86

Средната възраст на пациентите с пародонтит е 48,77 години като половината от изследваните лица са над 47 години, а останалата половина под 47 години. Най-младият пациент е на възраст 29 години, най-възрастният – на 85 години. Установяват се високи стойности на присъствието на зъбна плака, приблизително 86% заети от плака повърхности при всички пациенти с пародонтит като стойностите са регистрирани с Full Mouth Plaque Score (FMPS). Наличието на маргинално възпаление в отговор на персистиращата дентална плака в близост до гингивалния ръб е установено с Full Mouth Bleeding Score (FMBS) и показва разпространение от 72,66%, което корелира с разпространението на зъбната плака по изследваните зъбни повърхности. По отношение разпространението на пародонтални джобове с дълбочина 1-3 mm процентът е 42,21, джобовете с дълбочина 4 и 5 mm са 34,02 от общия процент на пародонталните джобове, а джобовете с дълбочина 6 и 7 mm са почти 17%. Пародонтални джобове с дълбочина над 7 mm са установени в малко над 6% от изследваните места. По параметъра загуба на клиничен аташман (CAL) разпределението е следното: CAL от 1 -2 mm се установява в 32,20%, CAL 3-4 mm се наблюдава на 40,44%, а местата с най-тежка загуба на прикрепване са 25,01%. Показателят, показващ активност на пародонталните джобове, е т.нар. кървене при сондиране или Bleeding on Probing (BoP). В таблицата се вижда, че местата, които показват активно възпаление, са 79,48%. По параметъра костна загуба спрямо възраст на пациента (BI/Age) средната стойност е 1,07, което говори за висока костна загуба предвид възрастта на изследваните лица.

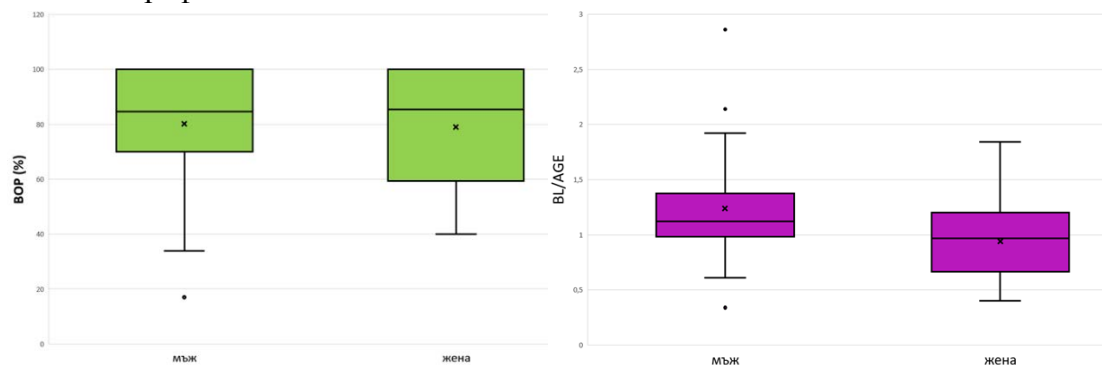
Направихме сравнение между някои параметри на пародонтита при мъже и жени, носителите на масово разпространения генотип GG.



Фигура 8. PD > 7 mm и CAL ≥ 5 mm – сравнение между мъже и жени, носители на генотип GG.

Най-дълбоките пародонтални места при мъже и жени са сравнително равномерно разпределени, като медианата при мъжете е с по-висока средна стойност, което означава, че все пак при мъжете се срещат по-често пародонтални джобове с дълбочина на сондиране над 7 mm. По отношение загубата на клиничен аташман при представителите с генотип GG се вижда, че при мъжете се среща по-често тежка загуба на прикрепване, в сравнение с жените.

По отношение на параметъра BoP и коефициента BI/AGE сравнените данни са представени графично.



Фигура 9. BoP и BI/AGE - сравнение между мъже и жени, носители на генотип GG.

При двата пола се установява сравнимо ниво на кървене при сондиране, регистрирано с индекса BoP. При мъжете е регистрирана една значително ниска стойност. Костната загуба спрямо възрастта на пациента при двата пола показва известна разлика - при мъжете с пародонтит съотношението е по-високо.

Корелационният анализ показва, че при пациентите с генотип GG с увеличаване на възрастта нараства броя на местата с дълбочина на сондиране > 7 mm, както и коефициента BI/AGE (при равнище на значимост $p < 0,05$).

При изследваните лица, разграничени по полов признак се установява статистически значима разлика при ниво на значимост $p < 0,05$ по отношение на FMPS. Тази разлика показва, че равнището на орална хигиена е по-добро при представители на женски пол. По отношение на $CAL \geq 5$ mm също се наблюдава статистически значима разлика – при жените тежката пародонтална деструкция се среща по-рядко. По-високи стойности при коефициента BI/AGE са регистрирани при мъже – 0,67 при жени, 1,01 при мъже.

Таблица 16. Резултати от проверка на хипотези за наличие на статистически значими разлики между средните величини на показателите при жени и мъже.

Изследван показател	ЖЕНИ	МЪЖЕ	P-value
	Средна	Средна	
Възраст	43,76	43,72	0,988
FMPS (%)	67,71	85,91	0.006*
FMBS (%)	58,51	67,56	0,220
PD 1-3 (%)	59,47	51,33	0,228
PD 3-5 (%)	24,35	27,78	0,434
PD 5-7 (%)	11,64	15,09	0,178
PD > 7 (%)	4,15	4,99	0,568
CAL 1-2 (%)	23,07	23,61	0,912
CAL 3-4 (%)	29,94	30,42	0,924
CAL ≥ 5 (%)	16,25	24,95	0.040*
ВОР (%)	55,72	65,10	0,290
BI/Age	0,67	1,01	0.011*

* Разликата е значима при равнище на значимост 0.05

Интерпретирахме средните стойности от пародонталните параметри на всички пациенти, диференцирани по признак тютюнопушене. Установихме статистически значими разлики при равнище на значимост $p < 0,05$ по отношение на следните параметри: FMBS и $CAL \geq 5mm$. Гингивалното кървене, регистрирано с FMBS е по-високо при непушачи. Местата с тежка загуба на клинично прикрепване са по-разпространени при пушачи.

Таблица 17. Резултати от проверка на хипотези за наличие на статистически значими разлики между средните величини на показателите на пушачи и непушачи.

Изследван показател	ПУШАЧИ	НЕПУШАЧИ	P-value
	Средна	Средна	
Възраст	41,03	45,83	0,121
FMPS (%)	76,14	73,64	0,707
FMBS (%)	49,21	71,79	0.001*
PD 1-3 (%)	50,93	60,47	0,149
PD 3-5 (%)	28,30	23,65	0,279
PD 5-7 (%)	14,55	11,77	0,270
PD > 7 (%)	5,25	3,87	0,342
CAL 1-2 (%)	18,12	27,23	0,054
CAL 3-4 (%)	31,06	29,41	0,739
CAL ≥ 5 (%)	25,98	14,72	0.010*
ВОР (%)	57,86	60,46	0,766
BI/Age	0,87	0,75	0,351

* Разликата е значима при равнище на значимост 0.05

Разгледахме допълнителни пародонтални параметри, придаващи тежест на пародонтита като ги интерпретирахме съвместно с модифициращия фактор

тютюнопушене. По отношение на някои от тях установихме статистически значими връзки.

Таблица 18. Разпределение на пациентите с генотип GG по тютюнопушене и подвижност на зъбите.

Подвижност на зъби (M 2/3)	Пушач			
	Не		Да	
	Брой (M)	Относителен дял	Брой (M)	Относителен дял
Да	12	36,4%	17	63,0%
Не	21	63,6%	10	37,0%
Общо	33	100,0%	27	100,0%

При непушачите (N=33) при 12 пациенти (36,3%) се наблюдава зъбна подвижност 2-ра и 3-та степен, а при 21 от тях (63,6%) не се установяват мобилни зъби. При 63,0% от пушачите се среща подвижност на зъбите в посочените параметри, докато при 37% от пушачите такава мобилност не е регистрирана. Разликата между относителните дялове на наличие на зъбна подвижност при пушачи и непушачи е статистически значима ($p=0,041$).

Таблица 19. Разпределение на пациентите с генотип GG по тютюнопушене и фуркационна лезия.

Фуркационна лезия (F 2/3)	Пушач			
	Не		Да	
	Брой (M)	Относителен дял	Брой (M)	Относителен дял
Да	18	54,5%	20	74,1%
Не	15	45,5%	7	25,9%
Общо	33	100,0%	27	100,0%

Сравнихме пушачите и непушачите по търсения параметър и установихме, че при непушачите 54,5% от пациентите притежават поне една фуркационна лезия клас 2 или 3, докато при пушачите този процент е по-висок – 74,1%. При повишаване на риска за грешка от първи род α от 5 на 10% може да се установи статистически значима разлика при F ($p=0,072$).

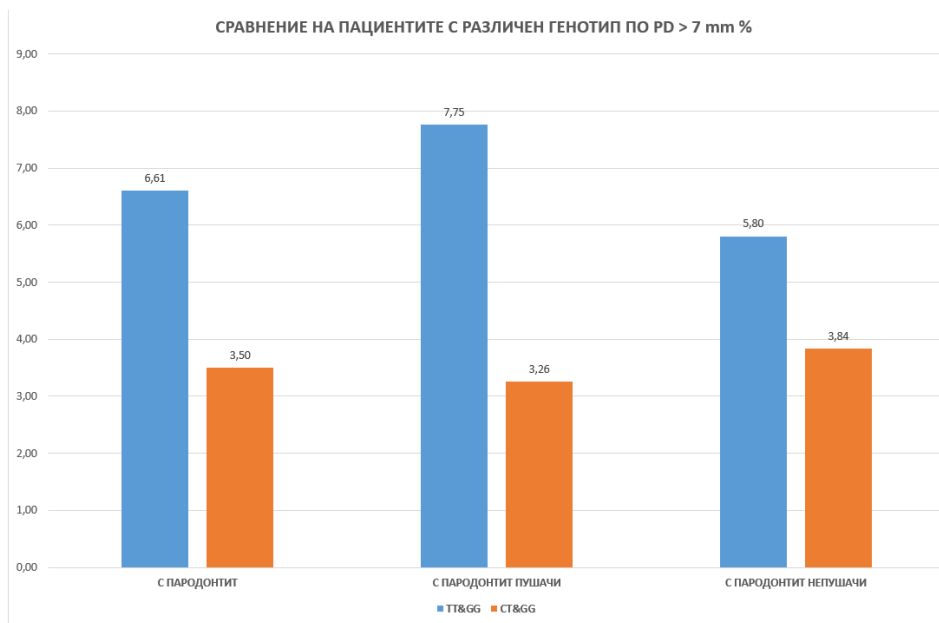
Данните по отношение на разпространението на специфичен генотип, както и на доминиращ алел еднозначно са в полза на G-алела, респективно GG – генотип. Това разпространение е валидно както в групата на пациентите с пародонтит, така и в групата на здравите лица. Само двама пациенти са носители на редкия GA- генотип, който е изолиран само при един здрав участник. Тенденцията за ниска честота на A-алела обяснява липсата на хомозиготност и липса на участници с AA-генотип.

Таблица 20. Разпределение по генотипове и алели.

	Здравен статус				p*		p**	OR	CI (95%)
	Пародонтит		Здрав						
Генотип									
GG	60	96,77%	20	95,24%	0,74	GA vs GG	1	0,67	(0,05; 7,75)
GA	2	3,23%	1	4,76%					
ОБЩО	62		21						
Allele									
G	122	98,39%	41	97,62%	0,75	A vs G	1	0,67	(0,06; 7,60)
A	2	1,61%	1	2,38%					
ОБЩО	124		42						
* χ^2 test									
** Fisher exact test									

Резултати по подзадача 3.2. - Установяване на връзки между двата интерлевкина и тежестта на пародонтита.

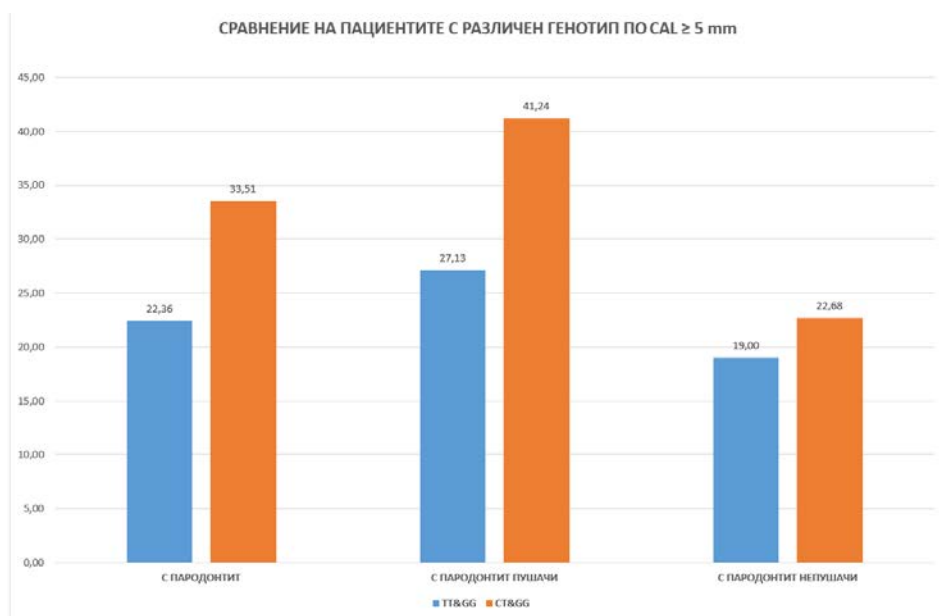
Предвид търсената връзка между двата полиморфизма и тежестта на пародонтита, направен е анализ на междугенни и междуалелни взаимодействия при пациентите с пародонтит по отношение на различни пародонтални параметри, придаващи тежест на заболяването. Относно дълбоките пародонтални джобове, регистрирани със стойности PD>7mm се установяват някои значими тенденции:



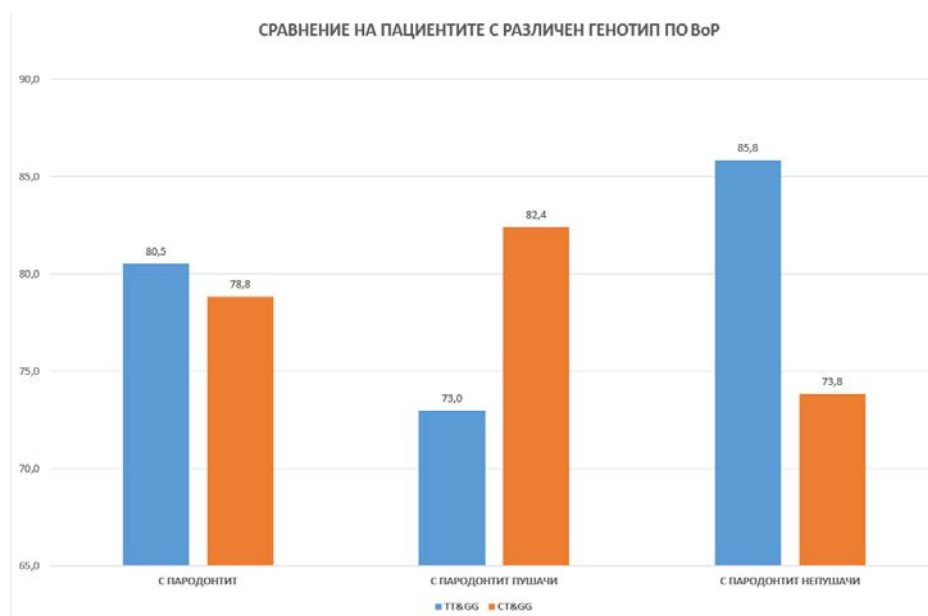
Фигура 10. Сравнение на PD > 7 mm при генотипна комбинация, изразено в проценти.

В под-групата на пациентите с пародонтит се очертава доминиране на комбинацията от TT IL-17F/GG IL-23 по отношение на най-дълбоките пародонтални места. Тази тенденция се забелязва както в общата подгрупа от пациенти, така и при разглеждането на този показател в присъствие на модифициращ фактор тютюнопушене. Въпреки това при пациентите-пушачи се регистрират по-високи стойности на изследвания пародонтален параметър при съотношението TT IL-17F/GG

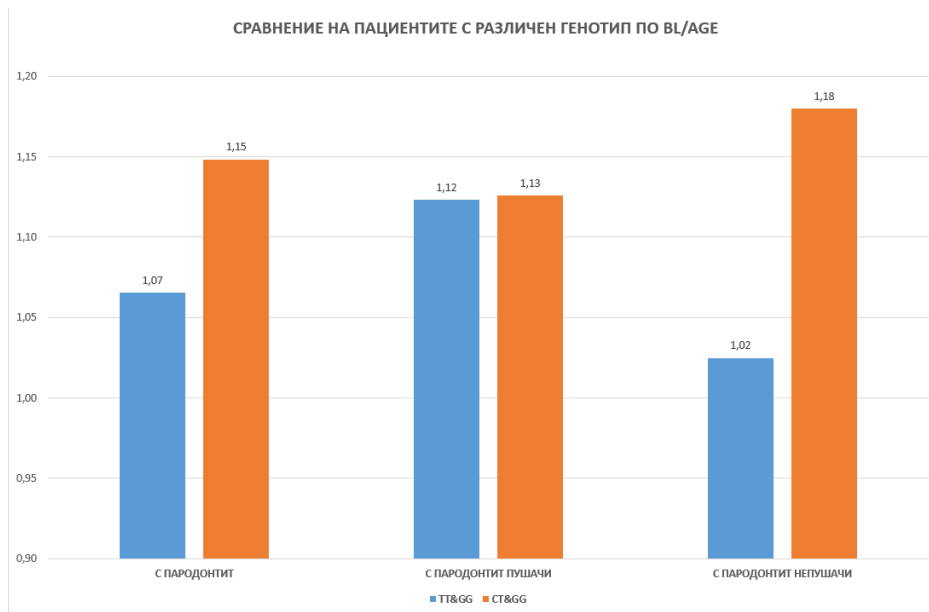
IL-23 в сравнение със същия параметър в групата от пациенти-пушачи, носители на междугенната характеристика CT IL-17F/GG IL-23. По-високи са стойностите на най-дълбоките пародонтални места и в групата на непушачите, като отново съотношението е в полза на генотипната комбинация TT IL-17F/GG IL-23. Статистически значима разлика има в $PD > 7\text{ mm}$ в подгрупата на пушачите – $p = 0,041$, и общо за всички пациенти – $0,049$.



Фигура 11. Сравнение на $CAL \geq 5\text{ mm}$ при генотипна комбинация.



Фигура 12. Сравнение на VoP при генотипна комбинация.



Фигура 13. Сравнение на VI/Age при генотипна комбинация.

Обобщените данни ясно показват, че тежката загуба на клиничен аташман се асоциира с генотипната комбинация CT IL-17F/GG IL-23. Данните внушават, че при пациентите, носители на тези генотипове тежката загуба на аташман се манифестира независимо от рисковия фактор тютюнопушене. Относно признака BoP се установяват разлики при носителите на двете основни генотипни комбинации в под-групата на непушачите. При пациентите пушачи стойностите на кървене са по-високи в групата на съвместна изява на CT & GG, докато при непушачите това съотношение е в полза на TT & GG. Съотношението VI/Age е по-високо при пациенти със съвместна изява на TT IL-17F и GG IL-23. При пациентите пушачи тези стойности са съвсем сравними, докато при непушачите се установява, че стойността на коефициента костна загуба/възраст е по – висок при съвместна изява на CT IL-17F и GG IL-23. Тези резултати дават основание да се смята, че съвместната изява на гените, характеризиращи се с CT IL-17F и GG IL-23 могат да се разглеждат като рисков фактор по отношение на бързата прогресия на пародонтита.

Комбинацията TT IL-17F/GG IL-23 оказва статистически значимо влияние. Отхвърлихме нулевата хипотеза H_0 в полза на алтернативната H_1 по отношение на PD > 7 mm в подгрупата на пушачите – $p = 0,041$, и общо за всички пациенти – $0,049$. По отношение на другите параметри на пародонтита не се установи статистически значима връзка, т.е. няма основание да се отхвърли нулевата хипотеза.

Резултати по задача 4 - Да се проучи присъствието на генен полиморфизъм за IL-13 и податливост към тежък пародонтит с бърза прогресия.

Подзадача 4.1. Генотипизиране на участниците.

4.2. Установяване на връзка между генен полиморфизъм на IL-13 и податливост към тежък пародонтит с бърза прогресия.

Изследваните по задача 4 лица са общо 101 лица, от които 30 здрави индивиди, а останалите 71 са пациенти са диагностицирани с тежък пародонтит – стадий III и IV и рисков клас B и C. Участниците от мъжки пол са 47,2% от всички изследвани лица, а от женски пол – 52,8%. Пушачите представляват 42,5% от всички участници, а непушачите – 57,5%. Техните обобщени данни представихме в таблица.

Таблица 21. Общи характеристики на всички изследвани лица.

Характеристика	Значение	Относителен дял
База (брой лица)	<i>N=101</i>	
Пол	Мъж	47,2%
	Жена	52,8%
Пушач	Не	57,5%
	Да	42,5%
SNP на IL13/1112 (rs1800925) C>T	TT	1,0%
	CC	82,2%
	CT	16,8%
Статус на пациента	Пародонтит	70,7%
	Здрав	28,3%

При изследване на SNP на IL-13 се установи наличие на три генотипа: TT генотип, установен при един пациент от женски пол, CC генотип, представляващ 68,7% от пациентите с пародонтит и 31,3% от здравите индивиди от общия дял изследвани лица, и CT генотип, установен при 75,0% от пациентите с пародонтит и 25,0% от здравите лица.

При всички изследвани лица бяха регистрирани следните параметри, свързани с хигиенен статус, гингивален статус и парододнтален статус: FMPS, FMBS, PD 1-3mm, PD 3-5 mm, PD 5-7mm, PD > 7 mm, CAL 1-2 mm, CAL 3-4 mm, CAL ≥ 5mm, BoP, BI/Age. Данните са систематизирани в таблици.

Таблица 22. Параметри на лицата с пародонтит и генотип СС.

Изследван показател	N	Средна	Медиана	Стандартно отклонение	Размах	Минимална стойност	Максимална стойност
Възраст	57	48,8	47,0	12,4	57,0	29,0	86,0
FMPS (%)	57	86,19	92,00	16,48	72,10	27,90	100,00
FMBS (%)	57	66,89	65,00	26,72	81,20	18,80	100,00
PD 1-3 (%)	57	46,85	44,50	19,54	75,70	13,00	88,70
PD 3-5 (%)	57	32,89	33,80	15,98	67,00	7,00	74,00
PD 5-7 (%)	57	14,09	12,60	9,05	35,50	0,60	36,10
PD > 7 (%)	57	6,17	4,10	8,29	51,90	0,00	51,90
CAL 1-2 (%)	57	22,07	22,00	17,98	58,80	0,00	58,80
CAL 3-4 (%)	57	33,74	32,60	18,27	86,00	0,00	86,00
CAL ≥ 5 (%)	57	35,74	34,40	21,32	98,20	1,80	100,00
BoP (%)	57	82,54	84,00	18,07	70,60	29,40	100,00
BI/Age	57	1,05	1,10	0,37	1,80	0,34	2,14

Хомозиготните по С-алелът пациенти с пародонтит предствляват 57 от общо 70 пациенти. Средните стойности на FMPS и FMBS са респ. 86,19% и 66,89%. Плитките пародонтални джобове с дълбочина от 1 до 3 mm представляват средно 46,85% от всички измерени пародонтални джобове. PD 3-5 mm са почти 33%. Пародонталните джобове с PD 5-7 mm са 14,09%. Джобовите с PD > 7mm са 6,17% от всички места. Разпространението на местата с CAL 1-2 mm е 22,07%, CAL 3-4 mm – 33,74%, CAL ≥ 5 mm – 35,74%. Разпространението на BoP има средна стойност 82,54%. Съотношението BI/Age има средна стойност 1,05 като най-високата стойност е 2,14.

Таблица 23. Параметри на лицата с пародонтит и генотип СТ.

Изследван показател	N	Средна	Медиана	Стандартно отклонение	Размах	Минимална стойност	Максимална стойност
Възраст	12	45,3	46,5	8,3	25,0	32,0	57,0
FMPS (%)	12	85,70	88,60	17,22	51,00	49,00	100,00
FMBS (%)	12	63,51	58,30	29,13	73,00	27,00	100,00
PD 1-3 (%)	12	43,87	41,75	17,23	72,30	9,00	81,30
PD 3-5 (%)	12	32,45	34,95	10,84	36,00	11,90	47,90
PD 5-7 (%)	12	15,61	12,05	10,48	36,40	4,60	41,00
PD > 7 (%)	12	8,08	9,05	4,98	17,10	0,00	17,10
CAL 1-2 (%)	12	29,83	23,50	19,37	69,10	0,00	69,10
CAL 3-4 (%)	12	31,50	31,85	12,47	38,80	15,20	54,00
CAL ≥ 5 (%)	12	33,38	28,95	16,23	55,00	12,30	67,30
BoP (%)	12	82,63	76,45	15,88	35,80	64,20	100,00
BI/Age	12	1,01	1,07	0,24	0,86	0,40	1,26

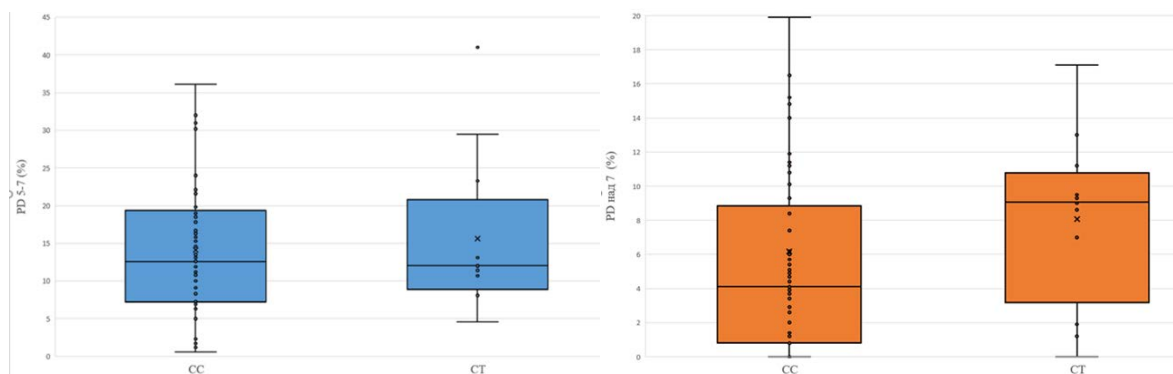
Хетерозиготните пациенти са 12 на брой. Средната възраст на изследваните пациенти е от 44 години до 62 години. Вижда се, че средната стойност на FMPS е 85,70%. По отношение на FMBS се установява средна стойност от 63,51%. Разпространението на пародонтални джобове с дълбочина 1-3 mm има средна стойност от 43,87%. PD 3-5 mm имат средна стойност от 32,45%. PD 5-7 mm се срещат в 15,61% от всички измерени места. Пародонталните джобове с дълбочина над 7 mm имат разпространение със средна стойност от 8,08%, което е незначително по-високо от същия параметър в сравнение с хомозиготните по С-алел пациенти. Сравними са стойностите на кървенето при сондиране като при хетерозиготните пациенти тя е 82,63%. BI/Age има средна стойност от 1,01 като при тази субгрупа най-високата установена стойност на това съотношение е 1,26.

Таблица 24. Анализ на участниците по генотипове и по алели.

	Здравен статус				p*	p**	OR	CI (95%)
	Пародонтит		Здрав					
Генотип								
CC	57	81,43%	26	86,67%	0,52	CT vs CC	1,48	(0,40;4,695)
CT	13	18,57%	4	13,33%				
Allele								
C	127	90,71%	56	93,33%	0,54	T vs C	1,43	(0,41;4,31)
T	13	9,29%	4	6,67%				
* χ^2 test								
** Fisher exact test								

От таблицата е видимо, че преобладава хомозиготност по С-алел както в подгрупата на пациентите, така и в подгрупата на здравите доброволци. Процентните разпределения при двете групи индивиди, разгледани по здравен пародонтален статус са сравними. Прави впечатление, че С-алела се среща с висока честота, за разлика от Т-алела. Подлежи на обсъждане тенденцията за подтискане на експресията на Т-алела.

Основни пародонтални параметри, характерни за тежкия пародонтит са дълбочина на сондиране между 5 и 7 mm (PD 5-7mm), дълбочина на сондиране над 7 mm (PD \geq 7mm), загуба на клиничен аташман равна или по-голяма от 5mm (CAL \geq 5), кървене от сондиране от дъното на пародонталния джоб (BoP) и костна загуба спрямо възраст на пациента (BI/Age). Съотношението между двата генотипа при различните пародонтални параметри общо за всички пациенти е представено в бокс-плот диаграми.

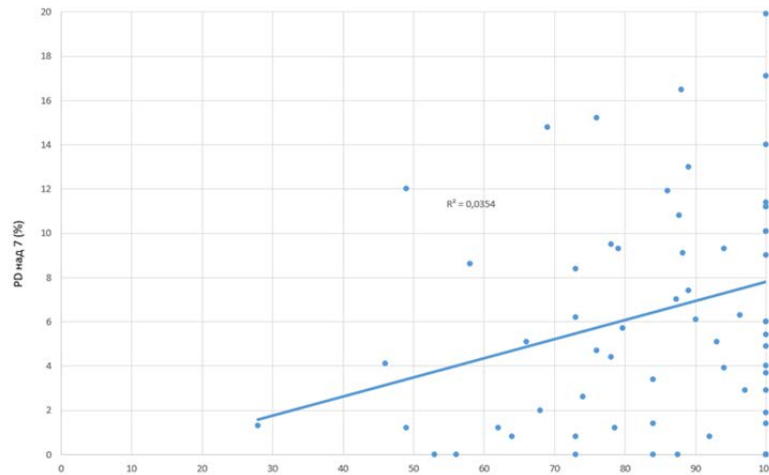


Фигура 12. Разпределение на PD 5-7 mm и PD > 7 mm при пациентите с генотип CC и генотип CT.

От бокс-плот диаграмата се вижда, че при пациентите с двата генотипа се установяват сравними стойности на дълбочина на сондиране между 5 - 7 mm. При хомозиготните по С-алел пациенти се установява вариабилност по отношение на екстремно високи и екстремно ниски стойности, т.е срещат се както пациенти, които са с много малко места с посочение стойности, така и пациенти с много високо разпространение на съответните места. Същевременно при хетерозиготните пациенти (СТ генотип) се установява една екстремно ниска и две екстремно високи стойности. Параметърът PD > 7mm показва, че при пациенти с СТ генотип се регистрират повече

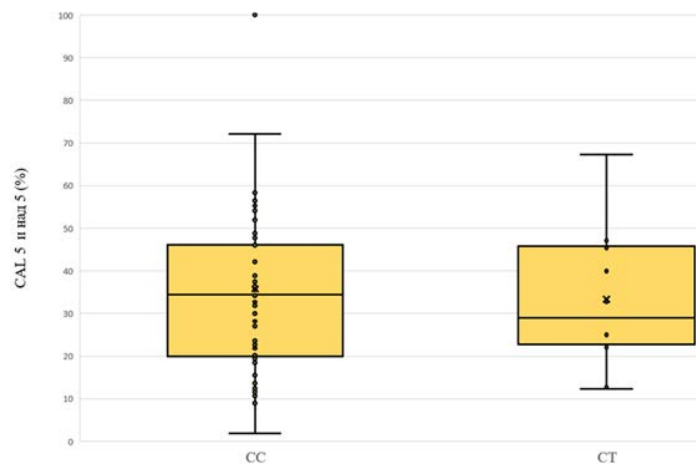
пациенти по посочения показател в сравнение с хомозиготните по С-алел пациенти. Медианата при СТ-генотип е по-висока в сравнение с СС-генотип.

При изследвания параметър, показващ разпространението на най-дълбоките пародонтални места, без разграничаване по пол, генотип, тютюнопушене и др. се установи зависимост от наличието на местата, покрити от зъбна плака. Тази зависимост е показана в корелограма.



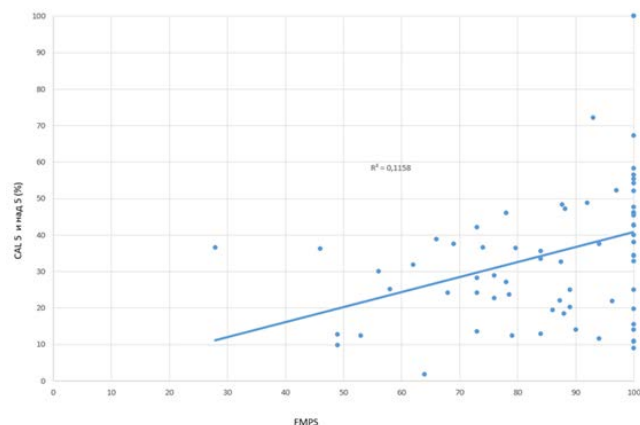
Фигура 13. Корелация между разпространението на зъбната плака и най-дълбоките пародонтални места.

Корелограмата показва, че при нарастване на броя места, заети от зъбна плака, регистрирани с FMPS, се увеличават местата с дълбочина на сондиране над 7 mm (PD > 7mm).



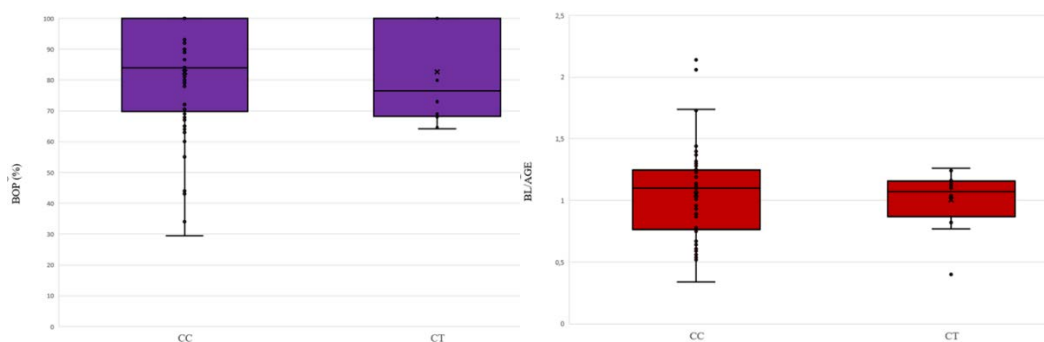
Фигура 14. Разпределение на CAL ≥ 5 mm при пациентите с генотип СС и генотип СТ.

По отношение на тежката загуба на клинично прикрепване се установяват сравними стойности – и при двата генотипа разпространението на по-голяма загуба на клиничен аташман равно на 5mm, или повече от 5 mm се среща със сходна честота. Въпреки това медианата е по-висока при представителите с СС генотип. Установява се зависимост между повишените стойности на FMPS и CAL ≥ 5 mm.



Фигура 15. Корелация между разпространението на зъбната плака и местата с тежка загуба на клиничен аташман.

Общо за всички пациенти с пародонтит се установява, че разпространението на зъбната плака корелира с местата с тежка пародонтална деструкция.



Фигура 16. Разпределение на BoP и Bl/Age при пациентите с генотип CC и генотип CT.

Кървенето при дълбоко сондиране е еднакво разпределено при пациентите с двата генотипа – CC и CT. Независимо от това, при CC генотип се установяват няколко изключително ниски стойности на този показател, но въпреки това медианата при този генотип е по-висока в сравнение с хетерозигонтите пациенти. Не се установяват статистически значими разлики. Съотношението костна загуба спрямо възраст при двата преобладаващи генотипа се различава без статистическа значимост. Пациентите с CC-генотип имат по-широк размах в стойностите, както и някои екстремално високи, респ. ниски стойности. Въпреки това медианата при двата генотипа е сравнима.

При сравнение на пародонтални параметри при пушачи и непушачи установихме, че при пушачите съотношението Bl/Age е по-високо в сравнение с непушачи със статистически значима разлика $p = 0,08$.

4.2. Установяване на връзка между генен полиморфизъм на IL-13 и податливост към тежък пародонтит с бърза прогресия.

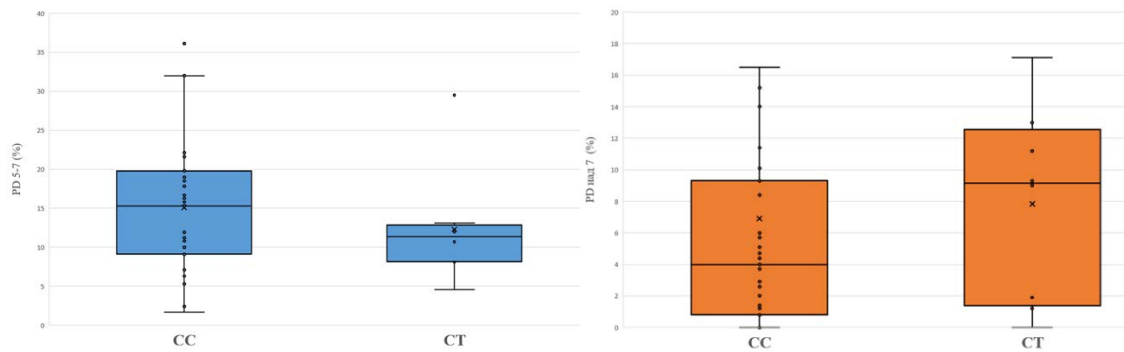
Пародонталният критерий, който обвързва пародонтита и бързата му прогресия, е показателят костна загуба спрямо възраст - BI/Age. Същият параметър е критерий за определяне на рисков клас по отношение на диагнозата на пародонтита и представлява обективен начин за преценка на скоростта, с която прогресира костната загуба. Същевременно характеристика на бърза прогресия придава и модифициращият фактор тютюнопушене.

Данните показват, че от всички 70 пациенти с тежък пародонтит, 20 се характеризират с рисков клас В – риск от умерена скорост на прогресия, и съотношение на индекса BI/Age до 1. Останалите 50 пациенти се характеризират с тежък пародонтит с висок риск от прогресия, или съотношението BI/Age – костна загуба спрямо възраст на пациента, е с изчислена стойност повече от 1.

Таблица 25. Параметри на изследвани лица с тежък пародонтит с бърз риск от прогресия – рисков клас С.

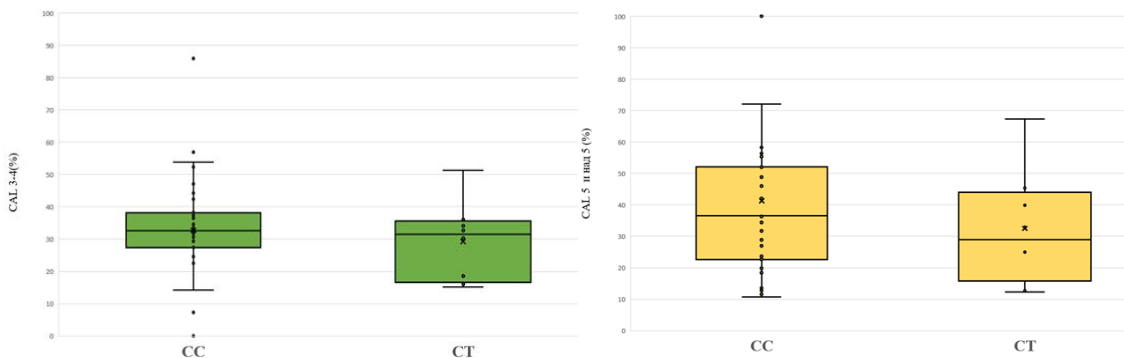
Изследван показател	N	Средна	Медиана	Стандартно отклонение	Размах	Минимална стойност	Максимална стойност
Възраст	50	45,1	44,5	8,6	39,0	29,0	68,0
FMPS (%)	50	87,99	93,50	14,57	54,00	46,00	100,00
FMBS (%)	50	63,96	59,05	26,53	81,00	19,00	100,00
PD 1-3 (%)	50	45,70	43,00	16,85	66,00	17,60	83,60
PD 3-5 (%)	50	31,94	35,40	14,52	53,20	7,00	60,20
PD 5-7 (%)	50	14,99	12,60	8,97	34,40	1,70	36,10
PD > 7 (%)	50	7,37	5,00	8,67	51,90	0,00	51,90
CAL 1-2 (%)	50	23,39	22,50	19,00	69,10	0,00	69,10
CAL 3-4 (%)	50	32,45	32,55	16,96	86,00	0,00	86,00
CAL ≥ 5 (%)	50	38,22	36,30	21,73	89,33	10,67	100,00
BoP (%)	50	82,23	83,30	16,33	66,00	34,00	100,00
BI/Age	50	1,17	1,14	0,30	1,60	0,54	2,14

Пациентите с посочената диагноза са общо 50. Средната им възраст е приблизително 45 години. Разпространението на зъбната плака е със средна стойност от 87,99%, а кървенето при стимулиране на маргиналната гингива не коренспондира с наличната зъбна плака. При тези пациенти доминира наличието на плитки пародонтални джобове – PD 1-3 mm 45,70%, местата с дълбочина 3-5 mm се срещат средно в почти 32 %. Пародонтални джобове със стойности 5-7 mm са разпространени средно в 15% от всички изследвани места, а най-дълбоките пародонтални джобове, характеризиращи се със стойности над 7 mm са разпространени средно в 7,37% от всички изследвани места. По отношение на загубата на клиничен аташман се установи, че леката загуба на клинично прикрепване (CAL 1-2 mm) се среща в 23,39% от всички места, позитивни за този признак. Умерена загуба на клиничен аташман се регистрира средно при 32,45% от всички изследвани места, а тежката загуба на клинично прикрепване се среща при 38,33% от изследваните места. Кървенето при сондиране има висока стойност – средно 82,23%, като най-ниската регистрирана стойност е едва 34%, а най-високата – 100%. Индексът костна загуба/възраст на пациента показва средна стойност от 1,17.



Фигура 17. Пародонтални джобове с PD 5-7 mm и PD > 7 mm при пациенти с тежък пародонтит и риск от бърза прогресия.

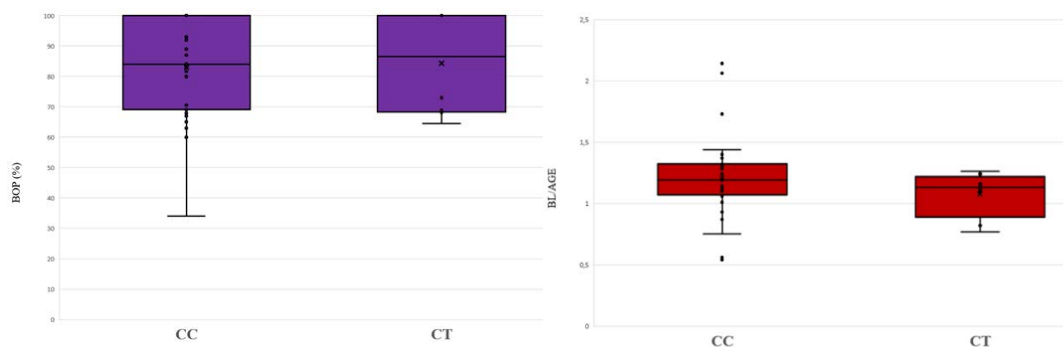
Пародонталните параметри, които определят пародонтита като тежък, за пациентите с рисков клас С, ще бъдат сравнени при пациентите разпределени по генотип. Пациентите с пародонтит, при които заболяването крие риск от бърза прогресия, показват разлики в показаните на фигурите параметри. При пациентите с генотип СС доминират значително пародонталните джобове с дълбочина 5-7 mm, а разпространението им при пациенти с генотип СТ е доста дискретно. Същевременно при хетерозиготните пациенти стойностите на най-дълбоките пародонтални места с PD > 7 mm са по-разпространени сравнено с пациентите с СС-генотип – медианата е значително по-висока при СТ-генотип.



Фигура 18. Умерена (CAL 3-4 mm) и тежка загуба на клиничен аташман (CAL ≥ 5 mm) при пациенти с тежък пародонтит и рисков клас С, сравнени по генотип.

По показател CAL 3-4 mm се установява, че при хомозиготни пациенти стойностите са разпространени в по-тесен диапазон в сравнение с остнаалите пациенти. Относно тежката загуба на клиничен аташман – CAL ≥ 5mm се установи, се среща повече при пациентите с СС-генотип, отколкото при пациенти с СТ-генотип.

В отделни бокс-плот диаграми са представени данни за BoP и BI/Age.



Фигура 19. ВоР и BI/Age при пациенти с тежък пародонтит, рисков клас С, сравнени по генотип.

По отношение на горната граница на ВоР се вижда, че и в двете подгрупи тя достига 100%. При пациентите с генотип СС се установява разпространение на значително по-ниски стойности в сравнение с пациентите с генотип СТ. По показателя костна загуба спрямо възраст на пациента, който има основна роля в определянето на пародонтита като такъв с риск от бърза прогресия, се установява, че при пациентите с СС-генотип горната граница на този индекс е по-висока, като в тази под-група се установяват изключително ниски, но и екстремно високи стойности по този параметър.

Таблица 26. Резултати от проверка на хипотези за наличие на статистически значими разлики между средните величини на показателите на лица с генотип СС и СТ (за пациенти с рисков клас С).

Изследван показател	СС	СТ	P-value
	Средна	Средна	
Възраст	45,26	44,55	0,811
FMPS (%)	88,67	85,56	0,537
FMBS (%)	65,03	60,19	0,599
PD 1-3 (%)	45,33	47,04	0,770
PD 3-5 (%)	32,07	31,49	0,909
PD 5-7 (%)	15,46	13,30	0,486
PD > 7 (%)	7,14	8,17	0,731
CAL 1-2 (%)	21,39	30,45	0,165
CAL 3-4 (%)	33,29	29,45	0,513
CAL ≥ 5 (%)	39,29	34,42	0,517
ВОР (%)	82,56	81,05	0,788
BI/Age	1,20	1,06	0,165

* Разликата е значима при равнище на значимост 0.10

** Разликата е значима при равнище на значимост 0.05

Данните от статистическия анализ показват, че нямаме основание да отхвърлим нулевата хипотеза H_0 – не се установява връзка между различните генотипове и податливост към тежък пародонтит с бърза прогресия. Въпреки липсата на статистически значими разлики в разглежданите пародонтални параметри при пациенти с двата генотипа, ние установихме, че костната загуба спрямо възраст на пациента и тежката загуба на клиничен аташман са по-високи при хомозиготните пациенти.

Резултати по задача 5 - Установяване за полиморфизъм на IL-10 и обвързването му с определени параметри на тежкия пародонтит.

По последната задача участие взеха 96 лица. Описателната статистика относно техния статус е представена таблично. Мъжете и жените са разпределени сравнително равномерно, непушачите доминират над пушачите.

Таблица 27. Общи характеристики на всички лица.

Характеристика	Значение	Относителен дял
База (брой лица)	<i>N=96</i>	
Пол	Мъж	49,0%
	Жена	51,0%
Пушач	Не	57,3%
	Да	42,7%
SNP IL-10 -819	ТТ	39,6%
	СС	0%
	СТ	60,4%
Статус на пациента	Пародонтит	71,9%
	Здрав	28,1%

При участниците се установи присъствие на два генотипа – СТ-генотип с процентно разпределение от 60,4%. ТТ-генотипът се установи при 39,6% от общия дял. Не се изолира наличие на СС-генотип сред нито едно от изследваните лица, участващи в проучването.

Пародонталните параметри на пациентите с двата изолирани генотипа представихме в таблици.

Таблица 28. Параметри на пациентите с пародонтит с генотип СТ.

Изследван показател	<i>N</i>	Средна	Медиана	Стандартно отклонение	Размах	Минимална стойност	Максимална стойност
Възраст	41	48,3	47,0	12,2	57,0	29,0	86,0
FMPS (%)	41	85,32	90,00	18,45	72,10	27,90	100,00
FMBS (%)	41	67,36	62,00	24,80	76,00	24,00	100,00
PD 1-3 (%)	41	45,29	43,40	18,80	74,60	9,00	83,60
PD 3-5 (%)	41	33,06	32,00	15,45	67,00	7,00	74,00
PD 5-7 (%)	41	15,73	12,10	10,24	39,80	1,20	41,00
PD > 7 (%)	41	5,91	4,90	5,76	24,70	0,00	24,70
CAL 1-2 (%)	41	24,93	23,80	18,70	58,80	0,00	58,80
CAL 3-4 (%)	41	31,88	32,70	16,52	80,60	0,00	80,60
CAL ≥ 5 (%)	41	35,15	36,20	21,56	98,20	1,80	100,00
BoP (%)	41	81,87	84,00	18,60	70,60	29,40	100,00
BI/Age	41	1,04	1,10	0,36	1,74	0,40	2,14

Средната възраст при изследваните лица е 48,3 години като най-младият участник е на 29 години, а най-възрастният е на 86 години. Данните за хигиенния статус на изследваните лица показва, че средната стойност на FMPS е 85,32%. Маргиналното възпаление, регистрирано с FMBS е със средна стойност 67,36%. Плитките пародонтални места PD 1-3mm се срещат в 45,29% от изследваните места, пародонталните места PD 3-5 mm се срещат в 33,06% от изследваните места. При пациентите с пародонтит ще бъдат интерпретирани данните, добавящи тежест към пародонталното заболяване. Такива са пародонталните места с дълбочина 5-7 mm, ≥ 7 mm, загуба на клиничен аташман, кървене при сондиране и костна загуба спрямо възраст на пациента. По отношение на местата, чиято дълбочина варира от 5 до 7 mm, средната стойност, регистрирана при пациентите е 15,73% с максимална стойност, достигаща 41% (над 1/3 от наличните пародонтални джобове). PD > 7 mm има разпространение със средна стойност от 5,91%. Интервалите, в които този параметър варира, показват стойности от 0% - липса на пародонтални джобове с посочената дълбочина при някои пациенти, до 24,70% или близо една четвърт от изследваните места с посочените стойности. Леката загуба на аташман се среща средно при 24,93% от изследваните пародонтални места. По-голямо е разпространението на загубата на прикрепване, свидетелстващо за умерен пародонтит, а именно CAL 3-4 mm, чиято средна стойност в проценти е 31,88%. Изследваните места с тежка загуба на пародонтални структури представляват средно 35,15% от всички изследвани места. От резултатите се вижда, че има пациенти, чиито стойности по този показател показват 100% разпространение или всички пародонтални места в дентицията на някои пациенти се характеризират със 100% тежка загуба на клиничен аташман. Параметърът BoP демонстрира средна стойност от почти 82%, което означава, че 81,87% от изследваните места показват белези на активност/възпаление. Параметърът, свидетелстващ за риск от бърза прогресия на пародонталното заболяване е BI/Age. Неговата средна стойност е 1,04, което показва, че при поне половината пациенти е наличие на тенденция за риск от бърза прогресия на пародонтита. Този индекс показва широка вариабилност с най-ниска стойност от 0,40, но и с най-висока стойност от 2,14.

Аналогични интерпретации са направени за участниците, които са хомозиготни по алел Т.

Таблица 29. Параметри на пациенти с пародонтит с генотип ТТ.

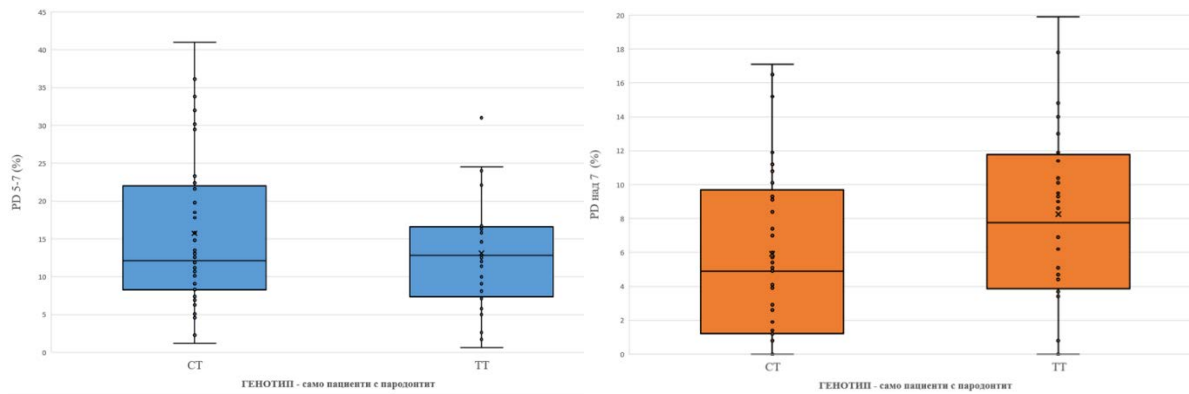
Изследван показател	N	Средна	Медиана	Стандартно отклонение	Размах	Минимална стойност	Максимална стойност
Възраст	28	50,4	48,5	11,4	52,0	33,0	85,0
FMPS (%)	28	87,39	88,25	12,52	42,00	58,00	100,00
FMBS (%)	28	64,51	67,50	30,05	81,20	18,80	100,00
PD 1-3 (%)	28	43,10	40,30	20,26	88,70	0,00	88,70
PD 3-5 (%)	28	35,44	37,15	13,71	57,00	10,70	67,70
PD 5-7 (%)	28	13,16	13,00	7,51	30,40	0,60	31,00
PD > 7 (%)	28	8,30	7,75	6,41	25,50	0,00	25,50
CAL 1-2 (%)	28	21,83	22,50	18,56	69,10	0,00	69,10
CAL 3-4 (%)	28	37,48	36,55	19,28	86,00	0,00	86,00
CAL ≥ 5 (%)	28	35,04	31,00	19,13	87,70	12,30	100,00
BoP (%)	28	84,02	86,80	16,43	57,00	43,00	100,00
BI/Age	28	0,98	0,99	0,33	1,72	0,34	2,06

Средната възраст на изследваните лица е 50,4 години, като най-ниската регистрирана възраст е 33 години, а най-високата е 85 години. Средната стойност на показателя за разпространение на зъбна плака FMPS е 87,39%, а разпространението на маргинално възпаление на тъканите в отговор на персистирането на денталната плака (FMBS) показва средна стойност от 64,51%. Разпространението на пародонтални джобове, характеризирани се с PD 1-3 mm има средна стойност от 43,10%, PD 3-5 mm има средна стойност 35,44%. При пациентите с генотип TT се установява, че дълбоките пародонтални джобове, измерени със стойност PD 5-7 mm, представляват 13,16% от всички измерени джобове. По отношение на PD > 7 mm се установява най-ниско разпространение сред пародонталните места – 8,30% средна стойност. При някои пациенти отново липсват такива джобове, но при други тяхното разпространение достига до 25,50%, което представлява близо една четвърт от всички измерени пародонтални места. Подобно на под-групата, представляваща хетерозиготните пациенти, и тук разпространението на места с лека загуба на клинично прикрепване е най-малко в сравнение с останалите суб-групи на същия параметър. Разпространението на места със стойности CAL 3-4 mm е средно 37,38%, като максималната регистрирана стойност достига до 86%, а минималната до 0%. Интересно е, че при тежката загуба на клиничен аташман отново се регистрират пациенти със 100% разпространение на тежка пародонтална деструкция, но с най-ниско разпространение от 12,30%, сравнено със същия признак при СТ генотип, който показва минимална стойност от 1,80%. Кървенето при сондиране е близо 84% като максималната стойност е 100%. Средната стойност на индекса BI/Age е 0,98, което говори по-скоро за умерен риск от прогресия при посочения генотип, въпреки че стойността на коефициента е съвсем близо до 1.

Сравнение на средните стойности при двата генотипа, разгледани при пациенти с пародонтит, показва, че по отношение на някои параметри, макар и да липсва статистически значима разлика има наличие на важни клинични характеристики:

- По отношение на индекса BI/Age средната стойност при пациентите, носители на по-разпространения генотип, а именно СТ се характеризират със средна стойност от 1,04 – висок риск от прогресия на пародонтита, докато пациентите с генотип TT имат средна стойност от 0,98, която макар и гранична, все пак предполага рисков клас В или умерен риск от прогресия на пародонтита;
- Относно CAL \geq 5 mm се установява, че макар средните стойности при двата генотипа да са сравними, съществуват разлики между минималната стойност, която е в полза на пациентите с TT-генотип.

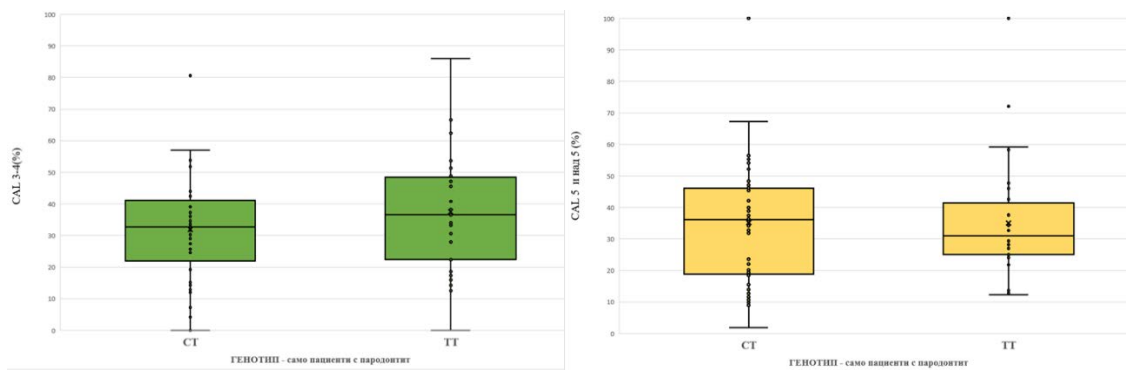
Основни клинични и параклинични параметри, описващи пародонтита по отношение на неговата тежест, са представени в диаграми. Сравнени са двата основни изолирани генотипа.



Фигура 20. PD 5-7 mm и PD > 7 mm при пациенти с СТ- и ТТ-генотип.

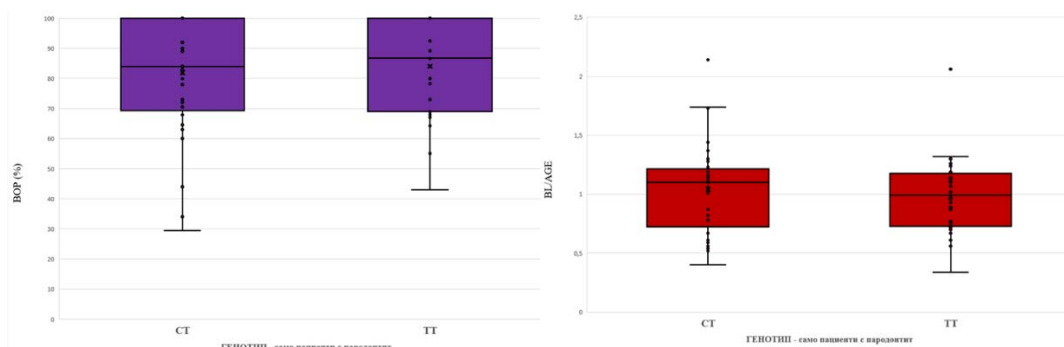
При анализ на дълбоките пародонтални места се установи, че пациентите с генотип СТ по-често експресират пародонтални джобове с дълбочина 5-7 mm, в сравнение с хомозиготните пациенти. От друга страна, при пациентите с генотип ТТ се срещат повече пародонтални джобове с дълбочина > 7 mm.

Загубата на клиничен аташман в умерена и тежка степен показва някои особености при пациентите с двата генотипа.



Фигура 21. CAL 3-4 mm и CAL ≥ 5 mm при пациенти с СТ- и ТТ-генотип.

Установихме, че при пациентите, хомозиготни по Т-алел, се срещат в по-голяма степен пародонтални места с умерена загуба на клиничен аташман, докато при пациентите с СТ-генотип доминират пародонтални места с тежка загуба на клиничен аташман.



Фигура 22. BoP и BI/AGE при пациенти с СТ- и ТТ-генотип.

При двете подгрупи пациенти не се установява разлика в максималното разпространение на кървящите пародонтални джобове. При пациентите с генотип СТ се установява по-широк диапазон на отчетените стойности в сравнение с пациентите с ТТ-генотип. Костната загуба спрямо възрастта на пациента е с по-високи стойности при пациентите с СТ-генотип. И при двете под-групи пациенти се регистрират единични екстремално високи стойности.

Данните за разпространение на различните генотипове и респективно алели, са обобщени в таблица.

Таблица 30. Разпространение на генотипове и алели.

	Здравен статус		p*	p**	OR	CI (95%)			
	Пародонтит	Здрав							
Генотип									
ТТ	28	40,58%	10	37,04%	0,74	CT vs TT	0,82	0,86	(0,34;2,16)
СТ	41	59,42%	17	62,96%					
Allele									
T	97	70,29%	37	68,52%	0,81	C vs T	0,86	0,92	(0,47;1,82)
C	41	29,71%	17	31,48%					
* χ^2 test									
** Fisher exact test									

Анализът показва, че при пациенти с пародонит генотип ТТ се среща по-често, в сравнение с генотип СТ с $p < 0,1$. От данните в таблицата се вижда, че в изследваната група доминира Т алела, в сравнение с С- алела, но при пациентите с генотип СТ преобладава по-тежката загуба на аташман и пародонтални джобове с дълбочина 5-7 mm.

При сравнение на пародонтални параметри при мъже и жени установихме статистически значими разлики по отношение на най-дълбоките пародонтални джобове. При жените се установи присъствие на пародонтални джобове с дълбочина 5-7 mm, което е по-високо от това при мъжете с равнище на значимост $p = 0,074$. Най-дълбоките пародонтални джобове с дълбочина на сондиране над 7 mm доминират над същите места при мъжете със статистическа значимост $p = 0,079$. Тези резултати могат да бъдат обяснени с по-голямото участие на жени.

Сравнявайки параметри на пародонтита при пушачи и непушачи установихме статистически значими разлики по отношение на ВI/Age с равнище на значимост $p < 0,10$. Установява се, че при пациенти с пародонтит, които пушат, ВI/Age има по-висока стойност в сравнение с пациентите с пародонтит, които са непушачи.

Проверката на хипотезите по различни параметри е представена в таблици. Изводите по тях да представени под всяка таблица.

Таблица 31. Резултати от проверка на хипотези за наличие на статистически значими разлики между средните величини на показателите на лица с генотип ТТ и генотип СТ.

Изследван показател	ТТ	СТ	P-value
	Средна	Средна	
Възраст	50,36	48,32	0,487
FMPS (%)	87,39	85,32	0,606
FMBS (%)	64,51	67,36	0,669
PD 1-3 (%)	43,10	45,29	0,646
PD 3-5 (%)	35,44	33,06	0,513
PD 5-7 (%)	13,16	15,73	0,260
PD > 7 (%)	8,30	5,91	0,111
CAL 1-2 (%)	21,83	24,93	0,500
CAL 3-4 (%)	37,48	31,88	0,201
CAL ≥ 5 (%)	35,04	35,15	0,983
BoP (%)	84,02	81,87	0,624
BI/Age	0,98	1,04	0,453

* Разликата е значима при равнище на значимост 0.10

** Разликата е значима при равнище на значимост 0.05

Базирайки се на получените данни за статистическа значимост, нямаме основание да отхвърлим нулевата хипотеза H_0 – различните генотипове не оказват обективно (статистически значимо влияние) върху тежестта на пародонтита, измерена чрез различни параметри.

Независимо от липсата на статистическа значимост установихме, че при пациентите с генотип ТТ се регистрира по-високо разпространение на пародонтални джобове с дълбочина на сондиране повече от 7 mm, т.е. налице е по-голяма тежест на заболяването по параметъра PD > 7 mm. В същата подгрупа се среща по-често разпространение на клиничен аташман 3-4 mm. Липсата на статистическа значимост може да бъде обяснена с малката извадка.

Таблица 32. Резултати от проверка на хипотези за наличие на статистически значими разлики между средните величини на показателите на жените и мъжете.

Изследван показател	ЖЕНИ	МЪЖЕ	P-value
	Средна	Средна	
Възраст	45,61	43,64	0,502
FMPS (%)	61,66	72,08	0,139
FMBS (%)	46,93	51,14	0,568
PD 1-3 (%)	59,12	60,99	0,762
PD 3-5 (%)	35,70	32,49	0,369
PD 5-7 (%)	16,76	12,79	0,074*
PD > 7 (%)	8,23	5,65	0,079*
CAL 1-2 (%)	20,46	26,61	0,172
CAL 3-4 (%)	34,66	33,69	0,823
CAL ≥ 5 (%)	37,15	33,23	0,431
BoP (%)	83,65	81,91	0,686
BI/Age	0,97	1,06	0,276

* Разликата е значима при равнище на значимост 0.10

** Разликата е значима при равнище на значимост 0.05

Отхвърлихме нулевата хипотеза H_0 – полът не оказва обективно (статистически значимо влияние) върху тежестта на пародонтита, измерена чрез различни параметри, в полза на алтернативната хипотеза H_1 – полът оказва обективно (статистически значимо влияние) върху тежестта на пародонтита, измерена чрез различни параметри.

При жените се установи присъствие на пародонтални джобове с дълбочина 5-7 mm, което е по-високо от това при мъжете с равнище на значимост $p=0,074$. Най-дълбоките пародонтални джобове с дълбочина на сондиране над 7 mm доминират над същите места при мъжете със статистическа значимост $p=0,079$.

Таблица 33. Резултати от проверка на хипотези за наличие на статистически значими разлики между средните величини на показателите на пушачите и непушачите.

Изследван показател	ПУШАЧИ	НЕПУШАЧИ	P-value
	Средна	Средна	
Възраст	42,88	45,96	0,299
FMPS (%)	79,79	57,05	0,001**

FMBS (%)	49,38	48,69	0,927
PD 1-3 (%)	48,61	68,55	0,001**
PD 3-5 (%)	34,35	33,66	0,848
PD 5-7 (%)	15,96	13,22	0,223
PD > 7 (%)	6,63	7,17	0,720
CAL 1-2 (%)	22,07	25,52	0,446
CAL 3-4 (%)	35,06	33,10	0,650
CAL ≥ 5 (%)	35,83	34,27	0,735
BoP (%)	79,55	86,43	0,107
BI/Age	1,09	0,93	0,058*

* Разликата е значима при равнище на значимост 0.10

** Разликата е значима при равнище на значимост 0.05

Относно модифицирания фактор тютюнопушене и връзката му с тежестта на пародонтита при параметъра костна загуба възраст отхвърлихме нулевата хипотеза H_0 – тютюнопушенето не оказва обективно (статистически значимо влияние) върху тежестта на пародонтита, измерена чрез различни параметри. Приехме алтернативната хипотеза H_1 – тютюнопушенето оказва обективно (статистически значимо влияние) върху тежестта на пародонтита, измерена чрез различни параметри. При пациентите пушачи съотношението костна загуба спрямо възраст е по-високо в сравнение със същия показател при пациенти непущачи със статистически значима разлика $p = 0,058$.

V. ОБСЪЖДАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

По задача 1.

В последните десетилетия много направления в медицината насочват внимание към изучаване на гените, отговорни за податливост към развитие на заболявания. Еволюцията в научното мислене доведе до разработване и прилагане на методи – инвазивни и неинвазивни, помагачи за дефинирането на пациенти в риск от развитие на симптоми, заболявания и животозастрашаващи състояния. Тази постановка дава възможност за прилагане на пациент-центриран, персонализиран подход на лечение, съобразен с индивидуалните особености, съпоставени с клинични симптоми.

Разбирането, че индивидуалните генетични особености са предпоставка за развитие на много болестни, но и оздравителни процеси, провокира интерес към специфични гени и междугенни взаимодействия. Дефинирането на цитокините като молекули, балансиращи ключови инфламаторни и автоимунни процеси в човешкия организъм и провокиращи определен локален и системен отговор, дава основание за тяхното разглеждане като биомаркери по отношение на различни заболявания. Ролята на цитокините, но и на техните полиморфизми, се обсъжда в различни изследвания като предиктори на отговора на организма към конкретно лечение, към риск от развитие на определени симптоми при заболявания и др. обсъжда се тяхната роля както като биомаркери в диагностиката, така и като насока в лечението.

Спецификата на отговора на организма се обсъжда не само по отношение на реакция спрямо инфекциозен процес, но и в контекста на избор на диета, медикаментозна реактивност, онкогенеза, дори преждевременно стареене.

Нашият интерес към интерлевкините и техните полиморфизми е породен от публикувани научни материали в различни сфери на хуманната и денталната медицина в нашата страна и извън нея. Изобилстващата чуждестранна литература дава противоречиви данни относно проучванията от нас единични нуклеотидни полиморфизми, подчертавайки етническа специфичност в генетичния профил на разглежданите популации.

Анализирахме изследвания, проведени в българска популация относно значимостта на търсените от нас цитокини и техните полиморфизми, свързани или не с пародонталното заболяване. Клинични проучвания относно влиянието на IL-17 в някои възпалителни и автоимунни заболявания са обект на интерес от страна на Христова и кол., които обсъждат връзката между полиморфизъм на IL-17A и системен лупус еритематозус и асоцииратия с него лупусен нефрит. Резултатите от тяхното изследване внушават, че определени генотипове и алели се асоциират със системен лупус

еритематозус и насочват вниманието си към серумните нива на интерлевкина като като параметър за мониториране по време на лечението. Серумната експресия на IL-17A е обект на интерес в проучване, проведено върху пациенти с умерен до тежък алергичен ринит, при което се установява, че нивата на цитокина са повишени в сравнение с асимптоматичните контролни индивиди. Освен с алергични, възпалителни и автоимунни заболявания, ролята на IL-17 се обсъжда в онкогенезата на различни видове рак. Неговото про-туморно действие се обсъжда на фона на способността му да води по фибробластна и ендотелна пролиферация, имащи отношение към прогресията на тумора. IL-17 в същото време се определя като плурипотентен цитокин, притежаващ и анти-туморна функция, дължаща се на цитотоксична спрямо туморните клетки активност. По отношение влиянието на IL-17 върху пародонталните тъкани данни да получени при изследване на негови полиморфизми, както и количествен анализ на интерлевкина в гингивални тъкани и серум. Ролята на IL-17A относно тежестта на пародонталното заболяване е проучвана и доказана в различни научни изследвания, но малко се знае IL-17F в патогенезата на пародонтита.

Фактът че, експресията на IL-17 се влияе от Th17 клетките и способността на IL-23 да стимулира тези клетки в продукцията на IL-17 е в основата на редица клинични изследвания. Изследвания на Геренова и кол. в областта на автоимунните заболявания подчертава значимостта на оста IL-23/IL-17 в развитието и тежестта на тироидит на Хашимото. Също така авторите обсъждат възможността серумните нива на IL-23 да се използват като биомаркер за прогресия на заболяването. В изясняване на ролята на генетични фактори като предразполагащи към развитие на някои заболявания, Иванова и кол. изследват проинфламаторни цитокини, вкл. IL-23 във връзка с анкилозиращ спондилит. Те установяват определени тенденции относно търсените цитокини и активността на заболяването, сравнявайки своите резултати със сходни изследвания по света.

Серумните и локалните нива на IL-13 са изследвани от Влайков и кол. във връзка с алергичен ринит не дават основателни данни за обвързване на заболяването по отношение на неговата патогенеза, но и тежест, с проинфламаторния цитокин. При клинично изследване, проведено сред пациенти с бронхиална астма авторите изследват ролята на няколко цитокина по отношение тежестта на заболяването. Димитрова и кол. отбелязват значимата роля на IL-13 и IL-17A в различната тежест на бронхиалната астма.

Изследването на генни полиморфизми на цитокини като маркери за откриване на пациенти в риск е обект на научно изследване. Михайлова и кол. насочват своя интерес към връзка между множествена склероза и единични нуклеотидни полиморфизми на няколко молекули, сред които и IL-10. Те провеждат своето изследване сред пациенти с депресия и здрави контроли и установяват някои тенденции относно присъствието на определни междугенни взаимодействия и алелни честоти. Значимостта на единичен нуклеотиден полиморфизъм на IL-10 на позиция -1082 е проучен във връзка с множествена склероза от Григоров и кол. изследователите установяват връзка между AA генотипът и клиничната изява на заболяването при лица над 30-годишна възраст. Ролята на IL-10 в генезата на някои заболявания също е проучена в българска популация. По отношение на SNP на IL-10 на позиция -1082 A/G във връзка с ревматоиден артрит е направено проучване в българска популация, показващо слаба асоциация между изследваните параметри.

Биомаркери за тежест на пародонтита са търсени и анализирани в български проучвания. Изследванията са проведени сред пациенти с пародонтит и здрави контролни лица. Данни за медиаторите на възпалението са получени от биопсични проби, серумни нива на търсените молекули, слюнка, гингивална кревикуларна течност и ДНК-проби. Получените резултати дават основа на нашето научното търсене в посока установяване значимостта на някои генни полиморфизми по отношение на пародонталното заболяване и в частност определени параметри, свързани с неговата тежест.

Единичните нуклеотидни полиморфизми са обект на особено интензивно проучване в нашата страна, както и по света в последните години. Въпреки това съществуването на противоречиви данни относно значимостта на някои цитокини и техни единични нуклеотидни полиморфизми относно развитието и прогресията на заболявания в човешкото тяло внушава необходимост клиничните проучвания да продължат.

Липсват изследвания в българска популация относно разпространението на търсените от нас интерлевкини (IL-17F, IL-23, IL-10, IL-13) и техните единични нуклеотидни полиморфизми особено във връзка с пародонталното заболяване. Поради тази причина научният ни интерес е насочен към изучаване на неизследвани досега полиморфизми на про-и антиинфламаторни цитокини в българска популация изключително във връзка с тежък пародонтит.

В търсене на ролята на проинфламаторните цитокини IL-17F и IL-23 проучихме български изследвания относно цитокини и пародонтално заболяване. В изследването на тези полиморфизми включихме общо 83 лица.

В подгрупата на пациентите най-младият пациент е на възраст 29 години, а най-високата установена възраст е 86 години.

При здравите контролни лица най-ниската възраст е 19, а най-високата е 67 години. Средната възраст на здравите пациенти е по-ниска от тази на пациентите с пародонтит, по обективни причини – затруднение да бъдат открити здрави лица, отговарящи на критериите за пародонтално здраве във възрастовата група над 35 години.

От всички лица, участващи в изследванията, се установява разпределение по здравен пародонтален статус както следва: 117 пациенти с тежък пародонтит, 40 здрави контроли.

Всички пациенти са диагностицирани с тежък пародонтит – стадии III и IV, с умерен и бърз риск от прогресия (рисков клас B и C). Разпространението на пародонталното заболяване е генерализирано – над 30% пародонтални места, характеризиращи се със загуба на клиничен аташман и алвеоларна кост. За поставяне на диагнозата са използвани класификационните критерии, съгласно Класификация на пародонталните заболявания и състояния около естествени зъби и импланти от 2018 г. В съобразяването на диагнозата са взети под внимание следните фактори по отношение на стадирането на пародонтита:

- За тежест на пародонтита – интерпроксимална загуба на клиничен аташман ≥ 5 mm на поне две несъседни места; рентгенографска костна загуба достигаща или надминаваща средната трета на корена; загуба на зъби поради пародонтит (≤ 4 зъба за стадий III, ≥ 5 зъба за стадий IV);
- За комплексност на пародонтита – наличие на пародонтални джобове с дълбочина ≥ 6 mm, наличие на вертикална костна загуба с дълбочина ≥ 3 mm, фуркационно засягане от клас 2 или 3, умерен дефект на алвеоларния гребен.

Поради факта, че в изследванията са включени пациенти с пародонтит с умерен и бърз риск от прогресия, за отиференциране на рисковия клас са съобразени следните критерии:

- Индиректни данни за прогресия, базирани на костна загуба спрямо възраст на пациента и фенотип на пациента
- Модификатори на рисковия клас – съобразено е тютюнопушенето (под 10 цигари и ≥ 10 цигари).

От общо 117 пациенти с пародонтит 75 се характеризират с тежък пародонтит (III и IV стадий) с риск от бърза прогресия – рисков клас C, т.е почти двойно повече от пациентите се характеризират с бърз риск от прогресия на пародонталната деструкция. 19 от тези пациенти са под 40-годишна възраст, а броят на пациентите с диагноза тежък пародонтит с риск от бърза прогресия на възраст ≤ 45 години е 37 (или почти $\frac{1}{2}$ от всички пациенти с бърз риск от прогресия). При 67 от пациентите с диагноза тежък пародонтит с риск от бърза прогресия рисковият клас е поставен на базата на съотношението костна загуба спрямо възраст на пациенти, а при останалите 8 – по модифициращ фактор тютюнопушене ≥ 10 цигари дневно. При 38 от пациентите се среща както висока стойност на $VI/Age > 1$, така и тютюнопушене ≥ 10 цигари дневно.

При интерпретиране на получените данни относно значимост на IL-13 при пародонтит с бърз риск от прогресия са включени пациенти с тежък пародонтит и рисков клас C, т.к. научните данни насочват към влияние на полиморфизма на IL-13 основно при пациенти с пародонтит и риск от бърза прогресия (срещан в литературата като агресивен пародонтит по Класификация на пародонталните заболявания от 1999г.).

Целта на задача 1 е да се установи присъствие на генни полиморфизми на IL-17F, IL-23, IL-13 и IL-10 и да се обвърже тяхното присъствие с тежестта на пародонтита. Установяването на съответните полиморфизми се реализирано чрез Real time PCR анализ. Относно единични нуклеотидни полиморфизми на IL-17F и IL-23 анализът е направен в частна лаборатория .

Анализирани са 83 лица, при които е установено следното присъствие на единични нуклеотидни полиморфизми на двата проинфламаторни цитокина както следва:

- IL-17F – три генотипа: TT, CT и CC;
- IL-23 – два генотипа: GG и GA.

SNPs на IL-13 и IL-10 са изследвани в Национална генетична лаборатория и са установени следните генотипни характеристики:

- IL-13 – 1112 – три генотипа: CT, CC и CT;
- IL-10 – 819 – два генотипа: CT и TT.

Относно връзката на всеки от генотиповете на посочените полиморфизми с тежестта на пародонтита подробен анализ е направен в дискусия по задачи 2-5.

По задача 2

Цел на нашето изследване беше да се установи присъствието на SNP за IL-17F при пациенти с пародонтит в българска популация и обвързването на конкретен генотип с тежест на пародонталното заболяване – изследване, което не е правено към настоящия момент. Интересът по тази задача е насочен също към дефинирането на преобладаващ

генотип по отношение на търсените единични нуклеотидни полиморфизми на проинфламаторните цитокини.

При изследване на единичен нуклеотиден полиморфизъм на IL-17F установихме значимо превалиране на ТТ генотип в изследваната популация. Носителите на този генотип представляват 75% от пациентите с пародонтит и 25% от здравите контролни доброволци. СТ генотипът е установен при 16 от изследваните лица - 75% представляват пациенти, а останалите 25% - здрави контроли. От данните се вижда, че $\frac{3}{4}$ от участниците с посочените генотипове са пациенти с пародонтит, а $\frac{1}{4}$ са здрави. Носителите на СС генотипът, установен в най-нисък процент на разпространение, са общо трима – двама пациенти и едно здраво лице. При сравняване на литературни данни с резултатите, получени от нашето изследване, открихме някои сходства по отношение на доминиращият генотип ТТ. В проучване, целящо да открие ролята на SNP на IL-17F в генезата на пародонтита в Бразилия научен екип, ръководен от Zacharias изследва 140 пациенти с пародонтит и 173 контролни индивиди. Учените не успяват да идентифицира СС генотип при контролната група (общо 140 участника в изследването), за разлика от нашето проучване, при което се установи един здрав участник с посочения, очевидно рядък генотип. В групата на пациентите СС генотипът се среща само при един индивид (двама – в нашето проучване). Zacharias и колективът му установяват значително превалиране на ТТ генотипът пред СТ генотипът (91.3% ТТ / 8.7% СТ). В заключение авторите обобщават, че генният полиморфизъм на IL-17F не може да бъде свързан с риск от развитие на пародонтит и липсва основание да се заключи, че търсеният полиморфизъм се свързва с повишен риск от пародонтит.

Сходно проучване, отново в бразилска популация, е проведено от Saraiva и кол. В него участие вземат общо 202 изследвани лица. Подобно на нашето изследване, са включени пациенти-пушачи, т.к. пушенето оказва влияние върху пародонталното заболяване. ДНК е изолирана с помощта на стерилна пластмасова шпатула, а пробите са взети от устната кухина. Анализът на установените генотипове е направен както за непушачи, така и за пушачи. При непушачите в групата на здравите лица хомозиготност по Т-алел се установява в 93,64%. При пациентите с пародонтит с риск от бърза прогресия (агресивен пародонтит по Класификация на пародонталните заболявания от 1999г.) генотип ТТ се среща в 92%, а в групата на пациентите с пародонтит – в 93,62%. На второ място по разпространение е установена хетерозиготност, разпределена процентно както следва: при здравите индивиди – 6,38%, при пациенти с пародонти с риск от бърза прогресия – 8%, при пациенти с пародонтит – 6,38%. При анализ общо на всички пациенти (пушачи и непушачи) в групата на здравите ТТ генотип се среща в 93,22%, а СТ- 6,78%; при пациентите с пародонтит с бърза прогресия хомозиготност по Т-алела се установява в 92,11%, а хетерозиготност – в 7,89%; при пациентите с пародонтит ТТ генотип е установен в 89,74%, а СТ генотип – в 10,26%. При нито едно от изследваните лица, независимо от здравния пародонтален статус, не е установено присъствие на СС-генотип. Същевременно анализът на алелите показва недвусмислено доминиране на Т-алела пред С-алела като при пациентите, така и при здравите контролни лица. Тези резултати, получени от изследвания в бразилска популация се доближават до нашите по това, че е установено значително разпространение на ТТ генотип, но същевременно няма данни за присъствие на един, вероятно рядък генотип, а именно СС генотипът. Нашите резултати, както и проведените в изключително хетерогенната бразилска популация, внушават тенденция към ниско разпространение на хомозиготност по С-алел.

В контраст на цитираните изследвания, Erdemir и кол. провеждат проучване, целящо да установи връзка между SNP на IL-17F и пародонтит в турска популация. Установено е преваляване на генотип TT както в под-групата на пациентите, така и при здравите контроли. При пациентите с хроничен пародонтит разпространението на хомозиготност по T-алел е 90,4%, последвано от хетерозиготност – СТ генотип, характеризиращ се с процентно разпределение от 8,4%. В тази подгрупа е идентифициран един пациент, носител на редкия СС генотип – 1,2% от всички пациенти с пародонтит, дефиниран от изследователите като хроничен (по Класификация от 1999г.). При пациентите с генерализиран агресивен пародонтит не е установено присъствие на хомозиготност по С-алел. Генотипизирането в тази група е в полза на TT генотип, който е разпространен в 93,0% от всички изследвани пациенти с посочената под-група. В 7,0% от тези пациенти е установено присъствие на генотип СТ. При здравите контроли се открива един случай с генотип СС, но при останалите разпространението на генотиповете е сравнимо с под-групите на пациентите с пародонтит – 93,3% генотип TT и 5,6% разпространение на генотип СТ. Сходствата на изследването в турската популация се доближават до получените от нас по отношение на процентното разпределение на генотиповете и на алелите, изолирани при търсене на единичен нуклеотиден полиморфизъм на IL-17F. заключението на авторите е , че присъствието на различните генотипове не се асоциира с различна фенотипна изява на заболяването.

Хипотезата за потенциална значимост на единичен нуклеотиден полиморфизъм на IL-17 в податливостта към пародонтит е изследвана от Abdelkawy и кол. сред египетска популация, включваща пациенти с пародонтит и здрави доброволци. Пациентите са разделени на две под-групи според поставената диагноза: пациенти в стадий II и рисков клас В, и пациенти в стадий III и рисков клас С. В изследването са включени 60 лица, разделени в три групи, включващи по 20 участника: 20 здрави контроли, 20 пациенти с пародонтит стадий II, рисков клас В, и 20 пациенти с пародонтит стадий III, рисков клас С. От всеки участник е взета проба от 3 mm венозна кръв, от която е изолирана ДНК. Авторите изследват връзка между IL-17A и IL-17F и тежест на пародонтита. С най-голямо разпространение се среща генотип TT, последван от генотип СТ, а генотип СС се среща най-рядко сред представителите на трите подгрупи. Авторите отбелязват, че разпространението както на генотиповете, така и на алелите е сходно както в групата на пациентите, така и при здравите лица. Изследователският екип не установява статистически значими връзки между присъствието на определен генотип и тежестта на пародонтита. Тези данни са в съгласие с получените от нас резултати, както и с изводите, направени от бразилските учени Corrêa и кол., Saraiva и кол. и Zacharias и кол., което дава основание да се допусне, че IL-17F притежава слаба проинфламаторна роля по отношение на пародонталното заболяване.

На европейските географски ширини подобно изследване е проведено в полска популация сред пациенти с пародонтит и здрави контролни индивиди. В изследваната популация данни за присъствие на СС генотип не са открити. Относно разпространението на T-алела се установява неговото доминиране над С-алела при всички изследвани лица. Не се установява статистическа значимост в алелното разпределение в групата на пациентите и на здравите лица. Авторите обобщават, че не може да се направи заключение за влияние на полиморфизъм на IL-17 нито в групата на пушачите, нито на непушачите. Въпреки това те установяват в под-групата на пациентите непушачи намалена честота на С-алела, докато в групата на пушачите тази

честота е повишена. Тези резултати внушават, че значимостта на генния полиморфизъм на IL-17F върху пародонталното заболяване вероятно може да се повлияе от фактора тютюнопушене.

Асоциацията между пародонтит и редица автоимунни заболявания, с които пародонтитът споделя сходни имуно-инфламаторни пътища като ревматоиден артрит, диабет, астма и др. и установената връзка между генен полиморфизъм на IL-17 с тези заболявания предполага възникване на хипотеза за значимост на IL-17 в патогенезата на пародонтита. IL-17F се превръща в потенциален кандидат-ген за определяне на риска от пародонтит. Поради този факт неговото проучване във връзка с пародонталното заболяване придобива актуалност. Дискутабилните резултати относно възможността да се обвърже неговия единичен нуклеотиден полиморфизъм с тежестта на пародонтита предполагат към по-задълбочено проучване на тази връзка. Една от потенциалните причини за липса на асоциация на SNP на IL-17F и пародонтит вероятно се крие в малката бройка изследвани лица, включени в проведените досега научни изследвания.

По задача 3.

По под-задача 3.1. в изследваната от нас извадка се установи забележително превалиране на GG генотип за SNP на IL-23 както сред пациентите с пародонтит, така и сред здравите контролни индивиди. Само три лица бяха регистрирани да притежават рядко срещания генотип GA. Не са установени хомозиготни по A-алела индивиди. Забелязва се, че генотипът GG е еднакво разпространен както в групата на пациентите с пародонтит, така и в групата на контролните индивиди.

За SNP на IL-23 информация може да се получи от изследване на Wang и кол., търсещи връзка на този проинфламаторен цитокин и акутен коронарен синдром. Те изследват група от 240 индивиди – 63 здрави контроли и 147 пациенти с акутен коронарен синдром като хипотезират връзка между генния полиморфизъм и риск от развитие на остър коронарен синдром. Статистическият анализ от данните, получени от обработна на венозна кръв на пациентите в китайската популация, показва наличие на два генотипа – GG и GA. Процентното им разпространение е в полза на GG генотип – 78,8% от здравите контроли и 91,9% от пациентите. GA генотипът се установява при 21,3% от здравите и 8,1% от пациентите. Сходството по отношение на генотипното разпространение с получените от нас данни, макар и в търсене на връзка с различно заболяване, показват тенденция за доминирането на хомозиготност по G- алел и липса на хомозиготност по A-алел. Резултатите на китайските учени навеждат към заключение в посока към протективност на A-алела по отношение на изследваното от тях заболяване.

За разпространението на редкия генотип AA статистически данни са предложени в проучване на китайски учени върху влиянието на генния полиморфизъм на IL-23 и болест на Бехчет. В тяхното проучване данни се събират с цел да се сравнят влиянието на генотиповете спрямо изявата на болестта. В проучването са включени 8 пациенти с AA генотип, 9 пациенти с GA генотип и 10 пациенти с GG генотип. Освен пациентите, включени са и здрави контролни лица с трите генотипа: 10 контроли с AA генотип, 10 –

с GA генотип и 12 здрави индивиди с GG генотип. Резултатите показват, че при пациенти с генотип GG в групата на пациентите се установява повишена експресия на цитокина, в сравнение с хетерозиготните пациенти и пациентите с генотип AA. Проведеното от Jiang и кол. изследване се отличава с две неща: очевидно е присъствието на генотип AA както в групата на пациентите, така и в групата на здравите контроли. Вероятно това носителство е установено на базата на хилядна извадка от многобройната китайска популация, и второ – регистрира се асоциация между генотип GG и клиничната експресия на IL-23 при пациенти с болест на Бехчет.

Връзката между взаимодействието на двата проинфламаторни цитокина IL-17/IL-23 се изследва в патогенезата на редица заболявания. Изследване на това влияние е направено от Saraiva и кол. в Бразилия. Те проучват няколко проинфламаторни цитокина, от които IL-23 и IL-17F при пациенти с пародонтит (разглеждани по тежест и скорост на протичане – агресивен и хроничен по Класификация на пародонталните заболявания от 1999 г.) и здрави контролни индивиди – общо 202 изследвани лица. Анализът, който авторите предлагат, включва диференциране по признак липса на тютюнопушене, както и общо за групата на пушачите и непушачите. При непушачите, както при здравите лица, така и при пациентите с пародонтит, не се установява хомозиготност по A-алел. В под-групата на здравите лица се установява присъствие на GG генотип при 88% от тях, а хетерозиготност се регистрира в 12%. В под-групата на пациентите с пародонтит с риск от бърза прогресия GG генотипът се среща при 80% от тях, а GA генотипът – при 20%. Пациентите с диагноза пародонтит показват сходно разпределение на генотипове – при 82,98% се среща GG генотип, при останалите 17,02% е установен GA генотип. Разгледани общо, без разделение по признак тютюнопушене, AA генотип се регистрира при двама пациенти – един в групата на пациентите с пародонтит с риск от бърза прогресия (агресивен пародонтит) и един в групата на пациентите с пародонтит (хроничен пародонтит). При здравите лица, независимо от модифициращия фактор тютюнопушене, не е установено присъствие на хомозиготност по A-алел. Анализът на алелите също е в полза на доминирането на G-алела. И в трите под-групи – здрави лица, пациенти с пародонтит и пациенти с пародонтит с риск от бърза прогресия G-алелът се среща процентно над 90%. Независимо от тези резултати екипът заключава, че не съществуват данни за различна тежест на пародонтита в изследваната група пациенти във връзка с различните генотипове при изследваните полиморфизми.

Връзката на проинфламаторните цитокини и пародонтита е обект на интерес в проучване, проведено в турска популация от Erdemir и кол. те проучват връзката между полиморфизми на IL-17A, IL-17F и IL-23. По отношение на IL-23 се установяват някои разлики с проведеното от нас проучване. В изследваната популация се установява присъствие на генотип AA – при един от здравите участници и при един пациент с пародонтит. доминирането на генотип GG се установява както при здравите, така и при пациентите с пародонтит – в под-групата на здравите разпространението му е 95,5%, при пациентите с хроничен пародонтит (пародонтит) се установява в 90,4% от пациентите, а при пациентите с агресивен пародонтит – 92,3%. GA генотипът е регистриран при 3,4% от лицата в контролната група; при 8,4% от пациентите с хроничен пародонтит; при 7,7% от пациентите с агресивен пародонтит. не се установява статистически значима разлика по отношение на разпространението на определени генотипове, както и алели при здравите лица и при пациентите с пародонтит.

Нашето изследване се основава на предположението, че някои генни полиморфизми участват в патогенезата на множество хронични заболявания, каквото е пародонтитът. Връзката между IL-23 и IL-17 е считана за възможен път, влияещ върху прогресията на пародонталното заболяване, но и на редица други възпалителни и аутоимунни заболявания. Независимо от научната хипотеза, ролята на тези генни полиморфизми, както и на генните полиморфизми като цяло в разпространението на определени заболявания е различно в специфична популация. Поради тази причина особен интерес за научния екип представлява разпространението на SNP на посочените интерлевкини именно в българска популация – информация, което не е предоставяна до сега по отношение на посочените полиморфизми. Описаните резултати по задача 2 дават основание да се приеме ролята на IL-17F като фактор, оказващ слаб индуктивен ефект спрямо възпалителния процес при пародонтит. Влиянието на IL-23 върху Th17-клетките и стимулираната от тях продукция на IL-17F провокира интерес към взаимното влияние на единичните нуклеотидни полиморфизми на двата проинфламаторни цитокина в едно имуно-медиано заболяване, каквото е пародонтитът.

По задача 4.

Настоящото проучване има потвърдителен характер по отношение на резултатите на други автори, които са се опитали да открият, подобно на нас, доказателства за значимостта на полиморфизма на гена на интерлевкин 13 -1112 във връзка с пародонтитът и не са установили статистически значими разлики. Такива резултати показват Gorgun et al., 2021г., които изследват 120 пациенти с пародонтит и 70 пародонтално здрави лица, като проучват влиянието на SNP на IL-13 при позиция -1112 и A/C полиморфизъм при позиция – 1512, и правят заключение, че IL-13 -1112 генен полиморфизъм не се асоциира с пародонталните заболявания в изследваната от тях популация. Същите автори обаче установяват, че нивата на генната експресия на интерлевкин 13 в гингивалната течност 6 седмици след проведената механична пародонтална терапия (нехирургично лечение) се увеличават статистически значимо в сравнение с нивата от инициалната база данни – преди лечението (при $p < 0.05$). Относно генотипизирането на изследваната турска популация изследователите установяват присъствие на три генотипа – доминиращ СС-генотип, последван от хетерозиготност – СТ-генотип и на последно място е разпространен генотипът ТТ. Данните за разпространението на специфичен генотип значително се приближават до нашите, при които се установи категорично доминиране на хомозиготност по С-алел – 81,43% от пациентите и 86,68% от здравите доброволци. В нашата извадка хомозиготност по Т-алел е усатовена само при едно лице с пародонтит и нито един здрав участник не беше установен като хомозиготен по Т-алел. Относно алелната дистрибуция С-алел се установи при над 90% както при здравите контроли, така и при пациентите с тежък пародонтит, докато Т-алелът се среща в 9,29% от пациентите и 6,67% при здравите лица. Разпределението по алели в изследваната от Gorgun et al.

популация показва сравними резултати в под-групата на пациентите и здравите контролни индивиди, а по отношение на носителството на Т-алел при пациентите в под-групата с хроничен пародонтит разпространението не най-високо, следвано от здравите индивиди и на последно място е процентното съотношение при пациенти, диагностицирани с агресивен пародонтит. В данни от метаанализи, предоставени от Zhang et al. се обсъжда връзката между генен полиморфизъм на IL-13 -1112 и тежест на пародонтита. Въпреки систематизираните клинични данни, в повечето модели не се установява значима връзка между заболяването и полиморфизма.

Изследването на генната експресия на интерлевкин 13 не беше предмет на нашето проучване, но би могло да се направят разсъждения, които потвърждават най-скорошни литературни данни за близката връзка между интерлевкин 13 и интерлевкин 4 (с близка генна локализация, в един клъстер). Изглежда бихме могли да подкрепим схващането за ролята на споменатите интерлевкини като част от протективната имунна реакция на организма, борещ се с пародонталната инфекция. Още повече, други автори твърдят за ролята на интерлевкин 13 при процесите на тъканно ремоделиране. Оттук се обяснява и засиления интерес към този цитокин през последните години, но също и слабо познаване и продължаващото изучаване на участието му в патогенезата на пародонтита. Така например е показано, че IL-13 може да влияе върху костната резорбция чрез промени върху bone protection factor system .

Ще бъдат споменати и авторите Xin Liu и Hui Li, 2022г, които също установяват в своето изследване, че няма асоциация на интерлевкин 13 с патогенезата на пародонтита [12]. Те също, както и други изследователи, внушават за вероятна роля на изследваните от тях цитокини – IL-13 и IL-4, в протективните тъканни процеси - чрез влияние върху остеокластогенезата и активността на Th2 клетките .

При проучване в японска популация за SNP на IL-13 -1111 (-1112) се установява присъствие също на трите генотипа, като ТТ генотипът е най-малко разпространен, подобно на резултатите, получени от нас. Komazaki et al. изследват 53 пациенти с пародонтит и 52 здрави контроли. Установяват , че хомозиготност по С-алела се среща по-често при здравите контроли, отколкото при пациентите с пародонтит. При пациентите с тежък пародонтит се установява дискретно присъствие на СС-генотип – 30,8%, докато при пациентите с умерен пародонтит този процент е почти двоен – 60%. Същевременно хомозиготност по С-алела се среща с по-висока честота при здравите индивиди – 78,8. При пациентите с пародонтит по-често се среща хетерозиготност – по-висока честота се регистрира при пациентите в групата на тежкия пародонтит – 53,8%, срещу 37,5% в групата на пациентите с умерен пародонтит. При здравите контроли хетерозиготност се среща в 13,5% от случаите. Съществена разлика с изследваната от нас популация се установява по отношение на хомозиготност по Т-алел. В нашето изследване само едни пациент прояви ТТ генотип, докато в японската популация 5,5% от пациентите с пародонтит и 7,7% от здравите са носители на този генотип.

Проучване в тайванска популация на полиморфизъм на IL-13 -1112 от Wu et al. през 2010 г. включва 60 пациенти с диагноза агресивен пародонтит (стадий III, рисков клас С), 204 пациенти с хроничен пародонтит и 95 здрави контроли. Пациентите са разгледани както по здравен статус, така и по факторите тютюнопушене и дъвчене на бетелов орех. Генотипизирано показва присъствие на три генотипни изяви като хомозиготност по Т-алела се среща най-рядко. В изследваната популация се установява доминиране на генотип СС. Втори по разпространение е генотип СТ, а най-

дискретна изява се среща при ТТ-генотип. Тези данни подкрепят получените от нашето изследване резултати. Научният екип установява, че СС-генотипът се асоциира с тежък пародонтит с риск от бърза прогресия само при непущачи.

Проучвания в румънска популация, проведени от Talvan et al. също не откриват зависимост между пародонтита и единичен нуклеотиден полиморфизъм на изследвания проинфламаторен цитокин.

В контраст на нашето проучване, Gonzales et al. установяват в немска популация присъствие на ТТ-генотип в 17,2% от пациентите с пародонтит и при почти 10% от здравите. Същевременно в същата популация се регистрира висок процент на хетерозиготност – 50% при пациентите с агресивен пародонтит и 57% при контролите. Те установяват присъствие на Т-алела в 42% от пациентите и 38% от здравите лица. Хомозиготност по С-алел се среща по-рядко в сравнение с нашето изследване. Независимо от различната генотипна характеристика на изследваните в Северна Европа лица – пациенти и здрави контроли, учените не установяват статистическа значимост между присъствието на генен полиморфизъм на IL-13 при позиция – 1112 и пародонтит като подчертават необходимостта от мащабно изследване, обхващащо по-голяма извадка с цел определяне на достоверност на изследваната взаимовръзка.

По задача 5.

В нашето изследване относно SNP на IL-10 на позиция -819 взеха участие 96 изследвани лица. При 58 установихме наличие на СТ-генотип, а 38 – на ТТ-генотип. В изследваната група не се установи СС-генотип. Сравнявайки нашите данни с резултати от сходни проучвания открихме сходства както по отношение на доминиращ генотип в изследваните групи лица, така и относно тежестта на пародонталното заболяване. В данни от мета-анализи за SNP на IL-10 - 819 не се откриват статистически значими връзки между носителството на полиморфизма и пародонталното заболяване. В нашето проучване се установи тенденция за по-голяма загуба на аташман при хетерозиготни пациенти, без статистически значима разлика. Данни от мета-анализи, представени от Zhong и кол., базирани на общо 14 изследвания, внушават липса на асоциация между присъствието на полиморфизма на търсения цитокин и пародонталното заболяване.

Сравнихме нашите резултати с проучване със сходна теоритична постановка, проведено сред македонско население. За разлика от нашето проучване, в което участваха повече пациенти в сравнение със здрави индивиди, в извадката на Atanasovska-Stojanovska et al. са включени значително по-голям брой здрави индивиди за сметка на пациенти с пародонтит. Изследователите откриват наличие на три генотипа – СС генотип (с най-голямо разпространение), СТ и СС, с най-ниско представителство. Те установяват, че и в двете изследвани под-съвкупности – на пациенти и на здрави пробанти, С-алела доминира над Т-алела. В проучването не са представени детайли по отношение на параметри на пародонтита и носителство на определен генотип, но въпреки тези ограничения, учените не съобщават за асоциация

на SNP на IL-10 на позиция -819 с пародонтит при изследваната македонска популация.

Асоциация между SNP на IL-10 и тежък пародонтит се търси и в иранска популация от Esmatpanahi et al. В популацията, която изследват, се получават данни за присъствие на трите генотипа на IL-10 – 819: TT, CT, CC. Подобно на нашите резултати, в изследваната иранска популация доминира хетерозиготност. Анализът на алелните честоти показва сравними дтожности в разпределението на двата алела при пациентите с пародонтит и при здрави лица. Не се установява връзка между тежестта на пародонтита, както и на податливост към пародонтит във връзка с SNP на IL-10 – 819 в проучваната популация.

Интересът към генните полиморфизми на интерлевкините и тяхната потенциална възможност да бъдат използвани като биомаркери в откриването на редица заболявания, вкл. пародонтита, е в основата на научния интерес на Sumer и кол. Авторите не установяват значими зависимости между изследвания полиморфизъм и тежестта на пародонтита, въпреки, че се описва асоциация между IL-10 – 597 и пародонтит.

Клинично проучване, проведено в китайска популация установява в групата на лицата с пародонтално здраве установява най-високо разпространение на CT генотип (42,9%). В групата на пациентите с агресивен пародонтит се установява най-често срещан CT генотип (45,8%). Относно хроничния пародонтит се установява най-често срещан TT генотип – 48,9%. Сравнение с нашите изследвания относно тежък пародонтит с риск от бърза прогресия показва разпространение на CT генотип пред TT генотип, което има потвърдителен характер по отношение на двата генотипа. За разлика от китайската популация, в нашата не беше установена хомозиготност по С-алел.

Moudi и кол. изследват тези полиморфизми на IL-10 в три промоторни региона сред 210 пациенти с пародонтит и 100 здрави лица. В тяхното проучване участие вземат само непушачи. Получените данни относно IL-10 SNP на позиция -819 се различават от нашите по наличието на хомозиготност по С-алел. Същевременно, подобно на нашите резултати, с най-голямо процентно разпределение както в групата на пациентите, така и в групаната на здравите, се характеризира CT генотипът – 56,7% от пациентите и 54,0% от здравите индивиди са хетерозиготни. Авторите сравняват и разпространението на двата алела при двете подгрупи участници. Установява се, че при пациентите Т-алела се среща в 60,5%, а С-алела в 39,5%, а при здравите лица Т-алела е представен с 64,0%, а С-алела – 36,0%. В изследваната от нас популация разпространението на Т-алел при пациенти е 86,84%, а при здравите лица е 85,34%, а С-алелът се установи в 13,16% от пациентите и 14,66% от здравите. Авторите отчитат значимост между генен полиморфизъм на IL-10 – 1082 и пародонтит, но не установяват такава по отношение на останалите два полиморфизма.

Заклучение

Изучаването на генните полиморфизми придобива актуалност в много сфери на хуманната и денталната медицина. Подчертана връзка между някои гени и заболявания сред възрастно и детско население насочва вниманието към методи за ранното им откриване. Допускането, че полиморфизмите оказват клинично влияние е подкрепен от различни изследвания в страната и извън нея. Тези данни водят до разбирането, че определени гени и техните полиморфизми представляват рисков фактор за развитие на някои заболявания и познаването им дава възможност да тяхното използване като маркери в диагностиката [10, 117].

Клиничната диагностика на пародонтита е ограничена по отношение предикцията на бъдеща пародонтална деструкция. В този смисъл откриването на генетични маркери, доказващи връзка със заболяването по отношение на неговата патогенеза, но и прогресия, могат да бъдат използвани като допълнителни диагностични методи. Неинвазивната природа на тези методи (в случая – обтриване на букална мукоза със стерилен тампон) предоставя предимство за извършване на клинична процедура, но и за лесно приемане от страна на пациента.

В опит да дефинираме значими връзки между четири интерлевкина и техните полиморфизми с тежестта на пародонтита и по-конкретно с определени параметри на заболяването ние установихме следните връзки:

По задача 2

- Изследването на единичен нуклеотиден полиморфизъм на IL-17F във връзка с определени параметри на пародонтита показва известни тенденции. При хомозиготните по T-алел пациенти се установи риск от развитие на пародонтални места с дълбочина на сондиране > 7 mm;
- При хетерозиготните пациенти се срещат по-често места със загуба на клиничен аташман ≥ 5 mm, както и високи стойности на коефициента костна загуба спрямо възраст на пациента;
- Допускаме, че при носителите на СТ генотип се срещат по – често експонирани коренови повърхности, докато при пациентите с генотип ТТ клиничното предизвикателство представляват най-дълбоките пародонтални джобове – клинични предизвикателства, третирани с различни клинични модалности;
- При пациентите с пародонтит от мъжки пол има тенденция към по-тежко протичане на пародонтита в сравнение с жените – при някои показатели със статистически значима разлика (BI/Age);
- При пушачите се установяват параметри на тежка пародонтална деструкция, установени със статистически значими разлики (CAL ≥ 5 mm , F 2/3).

По задача 3

- Оралната хигиена, регистрирана с FMPS, при представителите на мъжкия пол е с по-високи, статистически значими стойности, в сравнение с включените в проучването жени;
- При мъжете се установяват повече места в дълбочина на сондиране > 7 mm, места с тежка загуба на клиничен аташман – CAL ≥ 5 mm и по-висока стойност на коефициента BI/age в сравнение с жените със статистически значими разлики по отношение на тежка загуба на клиничен аташман и костна загуба спрямо възраст;
- Пушачите демонстрират повече места с тежка пародонтална деструкция в сравнение с непушачите – установени със статистически значими разлики;
- В нашето проучване за междугенни и междуалелни взаимодействия на два проинфламаторни цитокина – IL-17F и IL-23 установихме връзка между съвместното присъствие на ТТ генотип на IL-17F и GG генотип на IL-23 по отношение на пародонталните места с най-голяма дълбочина на сондиране, регистрирани с PD > 7 mm . Фактът, че тази зависимост има статистически значима разлика без значение присъствието на модифициращ фактор тютюнопушене дава основание да се допусне, че това междугенно и междуалелно взаимодействие носи риск от развитие на много дълбоки пародонтални джобове.

По задача 4

- Не установихме статистически значими разлики относно параметрите на пародонтита при представители на двата генотипа, но при хетерозиготните пациенти установихме по-голямо разпространение на пародонтални места с дълбочина на сондиране > 7 mm;

- Пациентите с СС генотип показаха по-голямо разпространение на места с тежка пародонтална деструкция ($CAL \geq 5 \text{ mm}$) без статистически значима разлика;
- При пушачите костната загуба спрямо възраст има по-висока стойност в сравнение с непушачите;
- Установихме, че при хомозиготните пациенти по-често се срещат места с $CAL \geq 5 \text{ mm}$ и BI/Age .

По задача 5

- Хомозиготните по Т-алел пациенти демонстрират повече места с дълбочина на сондиране $> 7 \text{ mm}$ в сравнение с хетерозиготните, особено изразено при пушачите, въпреки липсата на статистически разлики. Това дава основание да се допусне по-голяма тежест на пародонтита по посочения параметър;
- При пациенти с генотип СТ костната загуба спрямо възраст има стойност над 1;
- При мъжете пародонталното заболяване се характеризира с по-голяма тежест по отношение на параметъра $CAL \geq 5 \text{ mm}$ – статистически значими разлики;
- При пушачите костната загуба спрямо възраст на пациента има по-високи стойности в сравнение с непушачите със статистически значими разлики.

Представените в дисертационния труд проучвания и резултатите от тях ни дават основание да предложим определени гени и техните полиморфизми, които представляват рисков фактор за развитие на някои заболявания включително и пародонтита да бъдат използвани като маркери в диагностиката на тези заболявания. Клиничната диагностика на пародонтита е ограничена по отношение предикцията на бъдеща пародонтална деструкция. В този смисъл откриването на определени генетични маркери, доказващи връзка със заболяването по отношение на неговата патогенеза, но и прогресия, могат да бъдат използвани като допълнителни диагностични методи.

VI. ИЗВОДИ

В изследваната от нас популация са получени данни за разпространението на единични нуклеотидни полиморфизми на два проинфламаторни и два антиинфламаторни цитокина.

1. Установихме, че единичен нуклеотиден полиморфизъм на IL-17F има отношение към по-тежкото протичане на пародонтита – ТТ генотип се асоциира с по-голямо разпространение на пародонтални джобове с дълбочина на сондиране $> 7 \text{ mm}$ ($PD > 7 \text{ mm}$) и по-голяма активност на заболяването, а СТ генотип – с присъствие на повече места с тежка загуба на клиничен аташман ($CAL \geq 5 \text{ mm}$) и по-високи стойности на показателя костна загуба спрямо възраст (BI/Age).

2. При разглеждане на междугенни и междуалелни влияния при SNP на IL-17F IL-23 се установява доминиране на $PD > 7 \text{ mm}$ при комбинация от ТТ генотип на SNP на IL-17F и GG генотип на SNP на IL-23 със статистическа значимост – в подгрупата на пушачите – $p = 0,041$, и общо за всички пациенти – $0,049$.

3. По отношение на SNP на IL-13 установихме, че:

- a. При хомозиготните по С-алел пациенти с нарастване на броя на пародонталните места с дълбочина на сондиране над 7 mm ($PD > 7 \text{ mm}$) се увеличават и местата с най-тежка загуба на аташман ($CAL \geq 5 \text{ mm}$) – вероятен кумулативен ефект на факторите за тежест на пародонтита при пациентите с генотип СС.
- b. В подгрупата на хетерозиготните пациенти се установява по-голямо разпространение на $PD > 7 \text{ mm}$ и по-високи стойности по отношение на ВоР.
- c. В подгрупата на непушачите се срещат по-често вертикални костни дефекти с дълбочина $\geq 3 \text{ mm}$ при СТ генотип, докато при СС генотип този процент е 100. Данните внушават, че полиморфизма сам по себе си би могъл да представлява рисков фактор по отношение на посочените дефекти, независимо от присъствието на модифициращ фактор.
- d. При пациенти с тежък пародонтит и риск от бърза прогресия с генотип СТ се установяват повече места с тежка загуба на клиничен аташман ($CAL \geq 5 \text{ mm}$)
4. При участниците, изследвани за генен полиморфизъм на IL-10 установихме, че:
- a. По отношение на ВI/Аge по-високи стойности се регистрират при хетерозиготните пациенти.
- b. По отношение на $PD > 7 \text{ mm}$ и $CAL \geq 5 \text{ mm}$ повече места с тежка деструкция се наблюдават при хомозиготните по Т-алел пациенти.
- c. При пушачи, носители на СТ генотип $CAL \geq 5 \text{ mm}$ и F 2/3 се срещат по-често в сравнение на със същите параметри при пациенти - пушачи с генотип ТТ.
- d. При пушачи с генотип ТТ най-дълбоките пародонтални джобове ($PD > 7 \text{ mm}$) са по-разпространени в сравнение с пациенти-непушачи с генотип СТ.
5. При пушачите потвърдихме по – тежкото протичане на пародонтита като установихме по-високи стойности на костна загуба спрямо възраст, както и наличие на повече фуркационни лезии и повече пародонтални единици със зъбна подвижност.
6. Потвърдихме, че при мъжете параметрите $PD > 7 \text{ mm}$, $CAL \geq 5 \text{ mm}$ и ВI/Аge имат по-високи стойности в сравнение с жените.

VII. ПРИНОСИ

Оригинални приноси:

1. За първи път е изследван единичен нуклеотиден полиморфизъм на IL-17F във връзка с пародонтит в българска популация. Проучено е генотипното разпространение на полиморфизма, както и значимостта му в тежкия пародонтит. Установена е тенденция към преобладаване на пародонтални джобове с дълбочина над 7 mm при хомозиготни по T-алел пациенти.
2. За първи път е изследван единичен нуклеотиден полиморфизъм на IL-23 във връзка с пародонтит в българска популация.
3. За първи път е проучена възможната взаимовръзка на единичен нуклеотиден полиморфизъм на IL-23 съвместно с единичен нуклеотиден полиморфизъм на IL-17F и тежест на пародонтита. Получени са данни, насочващи към тенденции за по-голяма тежест на пародонтита при присъствие на комбинация от определени алели на двата интерлевкина със статистически значими разлики.
4. За първи път е изследван единичен нуклеотиден полиморфизъм на IL-13 във връзка с пародонтит в българска популация.
5. Получени са оригинални данни за генотипно разпространение, както и информация за значимостта на полиморфизма на IL-13 при тежък пародонтит с риск от бърза прогресия (стадий III рисков клас C).

6. За първи път е изследван IL-10 в българска популация във връзка с пародонтит. Получени са данни за генотипно разпространение и за връзка между полиморфизма и тежестта на пародонтита.

Приноси с потвърдителен характер:

1. Установяване на тенденция към по-тежко протичане на пародонита при пушачи – по параметри PD > 7 mm, CAL ≥ 5 mm и BI/Age, повишена подвижност, фуркационни лезии.
2. Възрастта е фактор, с чието увеличаване нараства броят на местата с дълбочина на сондиране повече от 7 mm (PD >7 mm), както и съотношението костна загуба спрямо възраст на пациента (BI/Age).
3. По – тежко протичане на пародонтита при представители на мъжкия пол, наличие на по-лоша орална хигиена при мъже в сравнение с жени, по-тежка пародонтална деструкция при мъже в сравнение с жените.

VIII. ПУБЛИКАЦИИ И УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ФОРУМИ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

Публикувани статии и участие в проекти и публични изяви:

1. Научни публикации:

- 1.1. Mlachkova A, Pashova-Tasseva Z, Popova H, Kicheva M. Presence of SNP of Interleukin17F in patients with periodontitis in a Bulgarian population. J of IMAB. 2021 Apr-Jun;27(1):3692-3699. DOI: 10.5272/jimab.2021272.3692
- 1.2. Z. Pashova-Tasseva, A. Mlachkova. The role of the interleukin polymorphisms in periodontal disease – a literature review – под печат в сп. „Проблеми на денталната медицина“
- 1.3. Zdravka Pashova-Tasseva, Velitchka Dosseva-Panova, Ekaterina Tosheva, Alexey Savov, Antoaneta Mlachkova. Influence of gene polymorphism of IL-13 and smoking on periodontitis. MEDINFORM.2022; 2: 1473-1483. DOI: 10.18044/ MEDINFORM.202292.1473

2. Научни проекти:

2.1. Изследователски проект по конкурс „Грант -2019“ на тема „Значимост между присъствие на генен полиморфизъм на IL- 17F и тежест на пародонтита“ с водещ изследовател доц. д-р Антоанета Млъчкова, дм. Оценен с висока оценка.

2.2. Изследователски проект по конкурс „Стимулиране на научни изследвания в области с постигнати високи постижения -2020” на тема „Зависимост между присъствие на генен полиморфизъм на IL- 23 и тежест на пародонтита“ с научен ръководител доц. д-р Антоанета Млъчкова, дм.

2.3. Изследователски проект по конкурс „ГРАНТ-2021” на тема „Значимост на генен полиморфизъм на Интерлевкин -13 на позиция (-1112) при пародонтит“ с научен ръководител д-р Величка Досева-Панова, дм. Предстои оценка.

3. Орални презентации:

3.1. З. Пашова-Тасева, А.Млъчкова, ДМ. „Взаимовръзка между проинфламаторни цитокини и пародонтит“. 20-ти научен конгрес на БЗС, 16-18 юни 2022г., Бургас – (ИССВ), България