

МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ- СОФИЯ  
ФАКУЛТЕТ ПО ДЕНТАЛНА МЕДИЦИНА  
КАТЕДРА ПАРОДОНТОЛОГИЯ  
Ръководител: Проф. д-р Христина Попова, дм.

---

Д-р Величка Теодосиева Досева-Панова

**БАКТЕРИАЛНА НАХОДКА И ВЪЗПАЛИТЕЛНИ КОМПОНЕНТИ  
НА ОТГОВОРА НА ОРГАНИЗМА ПРИ ТЕЖЪК ХРОНИЧЕН  
ПАРОДОНТИТ**

**АВТОРЕФЕРАТ**

на дисертационен труд за присъждане на образователна и научна степен  
“ Доктор”

Научна специалност:

Терапевтична дентална медицина

**Научен ръководител:**

Проф. д-р Христина Лазарова Попова, дм.

**Рецензенти:**

Проф. д-р Милена Пенева, дмн.

Проф. д-р Стоян Владимиров, дм.

София, 2018г.

Дисертационният труд съдържа 172 страници и е онагледен с 40 таблици, 53 фигури, 3 схеми и 10 приложения.

Библиографията включва 205 литературни източници, от които 10 на кирилица и 195 на латиница.

Изследванията са извършени в Катедра Пародонтология на Факултета по дентална медицина в Медицински университет - София, лаборатория Проген ООД под ръководството на д-р Мая Кичева, дм. и МИП Фарма ЕООД.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за защита на разширен катедрен съвет на Катедра "Пародонтология" към ФДМ, Медицински университет - София, където докторантът работи като асистент.

Публичната защита на дисертационния труд ще се състои на 16.07.2018г. от 13.30ч. в Първа аудитория на Факултет по Дентална Медицина, МУ- София, ул. „Св. Георги Софийски” №1, съгласно чл.76 и чл.77 от Правилника за условията и реда на придобиване на научни степени и заемане на академични длъжности в МУ-София, и заповед № РК 36-812/04.05.2018г. на ректора на МУ-София, на открито заседание на **научно жури** в състав:

#### **Председател:**

Проф. д-р Христина Лазарова Попова, дм - вътрешен член и научен ръководител.

#### **Членове:**

Проф. д-р Милена Димитрова Пенева, дмн - вътрешен член и рецензент.

Проф. д-р Стоян Боянов Владимир, дм - външен член и рецензент.

Проф. д-р Елка Вакрилова Попова, дм - външен член.

Доц. д-р Веселина Кондева Кондева, дм - външен член.

#### **Резервни членове:**

Проф. д-р Ангелина Илиева Киселова-Янева, дмн - вътрешен член.

Доц. д-р Елена Илиева Фиркова, дм - външен член.

Материалите по защитата са на разположение в библиотеката на Факултета по Дентална Медицина, МУ- София, ул. „Св.Георги Софийски” №1 и са публикувани на интернет страницата на МУ-София.

---

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

## **СЪДЪРЖАНИЕ:**

<b>ВЪВЕДЕНИЕ.....</b>	<b>5</b>
<b>ЦЕЛ И ЗАДАЧИ .....</b>	<b>6</b>
<b>МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ .....</b>	<b>7</b>
<b>РЕЗУЛТАТИ.....</b>	<b>14</b>
<b>ОБЩО ОБСЪЖДАНЕ.....</b>	<b>43</b>
<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....</b>	<b>66</b>
<b>ОБЩИ ИЗВОДИ .....</b>	<b>68</b>
<b>ПРИНОСИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД.....</b>	<b>70</b>
<b>НАУЧНИ ПУБЛИКАЦИИ И СЪОБЩЕНИЯ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД.....</b>	<b>72</b>
<b>УЧАСТИЯ В ПРОЕКТИ.....</b>	<b>73</b>

## ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ:

Aa *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

Pg *Porphyromonas gingivalis*

Tf *Tannerella forsythia*

Td *Treponema denticola*

Pi *Prevotella intermedia*

Pm *Porphyromonas micros*

Fn *Fusobacterium nucleatum*

En *Eubacterium nodatum*

Cg *Campylobacter gingivalis*

Cr *Campilobacter rectus*

RANKL - receptor activator of Nuclear Factor kappa B ligand (*тип I мембранен протеин, експресиран по повърхността на остеокластите, остеобластите, T-клетките и дендритните клетки и улеснява имунния сигнал*)

IL-6 - interleukin-6 (*интерлевкин-6*)

IL-1 - interleukin-1 (*интерлевкин-1*)

TNF- $\alpha$  - tumor necrosis factor alpha (*тумор некротизиращ фактор алфа*)

LT- $\alpha$  - lymphotoxin alpha (*лимфотоксин алфа*)

IFN - interferon (*интерферон*)

CAL - clinical attachment loss (*загуба на аташман*)

BoP - bleeding on probing (*кървене при сондиране*)

PD - probing depth (*дълбочина на сондиране*)

BL - bone loss (*костна загуба*)

Ig A, Ig M, Ig G - immunoglobulins (*имуноглобулини A, G и M*)

SRP – scaling and root planing (*супра- и субгингивално инструментирание*)

## ВЪВЕДЕНИЕ

Пародонталните заболявания са широко разпространени в целия свят, засягат индивиди във всяка възраст и са социално значими. Те представляват широк спектър хетерогенни състояния, вариращи в етиология, клинична експресия, прогресия и прогноза. Напредъкът в последните десетилетия в научните изследвания постигна значително изясняване на природата на различните пародонтални заболявания. Днес се знае, че повечето от тях са възпалително-деструктивни инфекции, свързани с повишени нива на патогенните агенти в денталния биофилм и са в значителна степен афектирани от възпалителния и имунен отговор на организма.

Гингивалните заболявания, свързани с бактериалната плака, са в голяма степен разбрани. Има достатъчно научни доказателства, подкрепящи бактериалната им етиология, съществува консенсус за диагностичните критерии и подходите на третиране и е известна тяхната реверзибилност.

Деструктивните пародонтални заболявания (пародонтити) в повечето случаи са резултат от екстензиране на възпалението от гингивата в подлежащия аташман и кост (хроничен пародонтит) с последваща прогресираща загуба на поддържащ пародонтален аташман.

Няма засега достатъчно ясни доказателства за факторите, въввлечени в прогресията на гингивитите в пародонтити, нито за тези, ангажирани с тежестта и прогресията на хроничните пародонтити. Научните изследвания фокусират върху присъствието и нивата на известни и още недоказани като пародонтопатогени бактерии в пародонталната среда и тяхната връзка с иницирането и прогресията на загубата на пародонтален аташман. Сложната микробиология на пародонтита, интербактериалните взаимоотношения и връзката им с отговора на организма са основния фокус на интерес в изучаване на бактериалната находка при хроничен пародонтит. Продължават опитите да се свържат отделни пародонтопатогени или комплекси от бактерии с различните форми на пародонтални заболявания, тежестта на заболяването и епизодите на прогресия. Необходими са проучвания върху определяне на ясни допълнителни диагностични критерии - микробиологични, биохимични и генетични, които едновременно с клиничните и рентгенографски измервания да служат на клиницистите в по-доброто разбиране и контрол на пародонталния статус на пациенти с хроничен пародонтит.

В съгласие със съвременната парадигма за инфекцията и отговора на организма интензивно се изучават и фактори, определящи характеристиките на деструктивния отговор на организма към патогенните бактерии. Има някои доказателства за генетично предопределена по-висока продукция на инфламаторни фактори от организма, въввлечени в деструкцията на съединителнотъканен аташман и кост, които обуславят и по-високата тежест и степента на прогресия на пародонтита. Установяването и използването на диагностични маркери, разкриващи чувствителността на организма към пародонтопатогените, генетично детерминирани или свързани със средата, може да обясни в голяма степен присъстващия хроничен пародонтит и неговата тежест, както и да предиктира резултатите от активната терапия, стабилност или прогресия при поддържането.

Оправдани са проучвания, които имат за цел детайлното познаване на бактериалната патогенна находка при хроничен пародонтит и характеристиките на отговора на организма и могат да рефлектират в създаване на клиничен и микробиологичен протокол на диагноза на пародонтита. Диагностичните

микробиологични маркери могат да са полезни в планиране на терапията и реализиране на оценката на оздравяването, както и да предиктират прогресия.

### **ЦЕЛ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД:**

**Да се оцени бактериалната находка, възпалителните и генетични компоненти в отговора на организма при тежък хроничен пародонтит.**

### **ЗАДАЧИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД:**

1. Да се проведе скрининг на пациенти за сформиране на подходящи за проучването групи с диагноза хроничен пародонтит.
2. Да се оцени бактериалната находка при хроничен пародонтит:
  - 2.1. Основни пародонтопатогени при пародонтални джобове с различна дълбочина (*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*) във връзка с тежестта на пародонтита;
  - 2.2. Пълен пародонтопатогенен спектър при дълбоки пародонтални джобове (9 контролни щама: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, *Tannerella forsythia*, *Prevotella intermedia*, *Peptostreptococcus* /*Micromonas*/ *micros*, *Fusobacterium nucleatum*, *Eubacterium nodatum*, *Campytophaga gingivalis*) във връзка с тежестта на пародонтита;
  - 2.3. Субгингивално и орално присъствие и нива на *Candida albicans* при хроничен пародонтит.
3. Да се оцени генната експресия на основни проинфламаторни цитокини (интерлевкин 6 (IL-6) и туморнекротизиращ фактор - алфа (TNF- $\alpha$ )) при тежък хроничен пародонтит.
4. Да се оцени генният полиморфизъм на интерлевкин-6 (IL-6), тумор некротизиращ фактор - алфа (TNF- $\alpha$ ) и лимфотоксин алфа (LT- $\alpha$ ) при тежък хроничен пародонтит.
5. Да се получат данни за влиянието на рисковия фактор тютюнопушене при хроничен пародонтит.
6. Създаване на алгоритъм на диференциран подход в диагнозата на тежкия хроничен пародонтит на базата на бактериалната находка и компоненти на отговора на организма.

# СОБСТВЕНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

### 1. МАТЕРИАЛИ

- **Общ брой участници в изследването – 80.** От тях: пациенти с хроничен пародонтит – 70 и индивиди със здрав пародонт – 10.
  - **задача 1.** Скринингово изследване за селекция на пациенти и включване в проучването – общо 156 индивида. От тях 82 индивида отговарят на включващите критерии. Пациентите, отказали участие са 2. В изследването са включени 70 пациента с хроничен пародонтит за оценка на пародонталния статус и 10 индивида със здрав пародонт като контролна група по задача 4.
  - **под-задача 2.1.** Изследването обхваща 20 пациента с диагноза хроничен пародонтит за изследване на присъствието на пародонталните патогени *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* и *Treponema denticola* в пародонтални джобове с различна дълбочина (до 4мм, 4-6мм и над 6мм).
  - **под-задача 2.2.** Изследването обхваща 20 пациента с диагноза хроничен пародонтит за Изследване на едновременното присъствие на: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, *Tannerella forsythia*, *Prevotella intermedia*, *Peptostreptococcus /Micromonas/ micros*, *Fusobacterium nucleatum*, *Eubacterium nodatum*, *Capnocytophaga gingivalis* в дълбоки пародонтални джобове (над 6мм).
  - **под-задача 2.3.** Изследването обхваща 20 пациента с диагноза хроничен пародонтит за изследване на присъствието на *Candida albicans* в дълбоки пародонтални джобове (над 6мм).
  - **задача 3.** В изследването са включени 20 пациента с хроничен пародонтит за изследване на генната експресия на IL-6 и TNF- $\alpha$ .
  - **задача 4.** В изследването са включени 30 пациента с хроничен пародонтит и 10 пародонтално здрави индивиди като контролна група за изследване на генния полиморфизъм на IL-6, TNF- $\alpha$  и LT- $\alpha$ .
  - **задача 5.** В изследването са включени данните от 70 пациента с хроничен пародонтит.

#### **Включващи критерии за изследването:**

- системно здрави пациенти с диагноза умерен или тежък хроничен пародонтит (основен критерий – CAL: при CAL<sub>ср.ст.</sub> 3-4мм диагнозата се определя като умерен пародонтит, при CAL<sub>ср.ст.</sub> 5мм диагнозата се определя като тежък пародонтит; допълнителни критерии: костна загуба над 2мм, дълбочина на джобовете при сондиране над 4мм) (14,19), относително запазена дентиция (15 - 20 налични зъба), нелекувани пародонтално през последната 1 година.
- индивиди със здрав пародонт в контролна група.

**Исключващи критерии:** системно заболяване, системна медикация, бременност, приемали системно антимикробни средства през последните 6 месеца.

## 2. МЕТОДИ

### Скрининг

Етапите на работа за определяне на подходящи пациенти за проучването и регистрирането и обработването на данните са представени на следната схема:

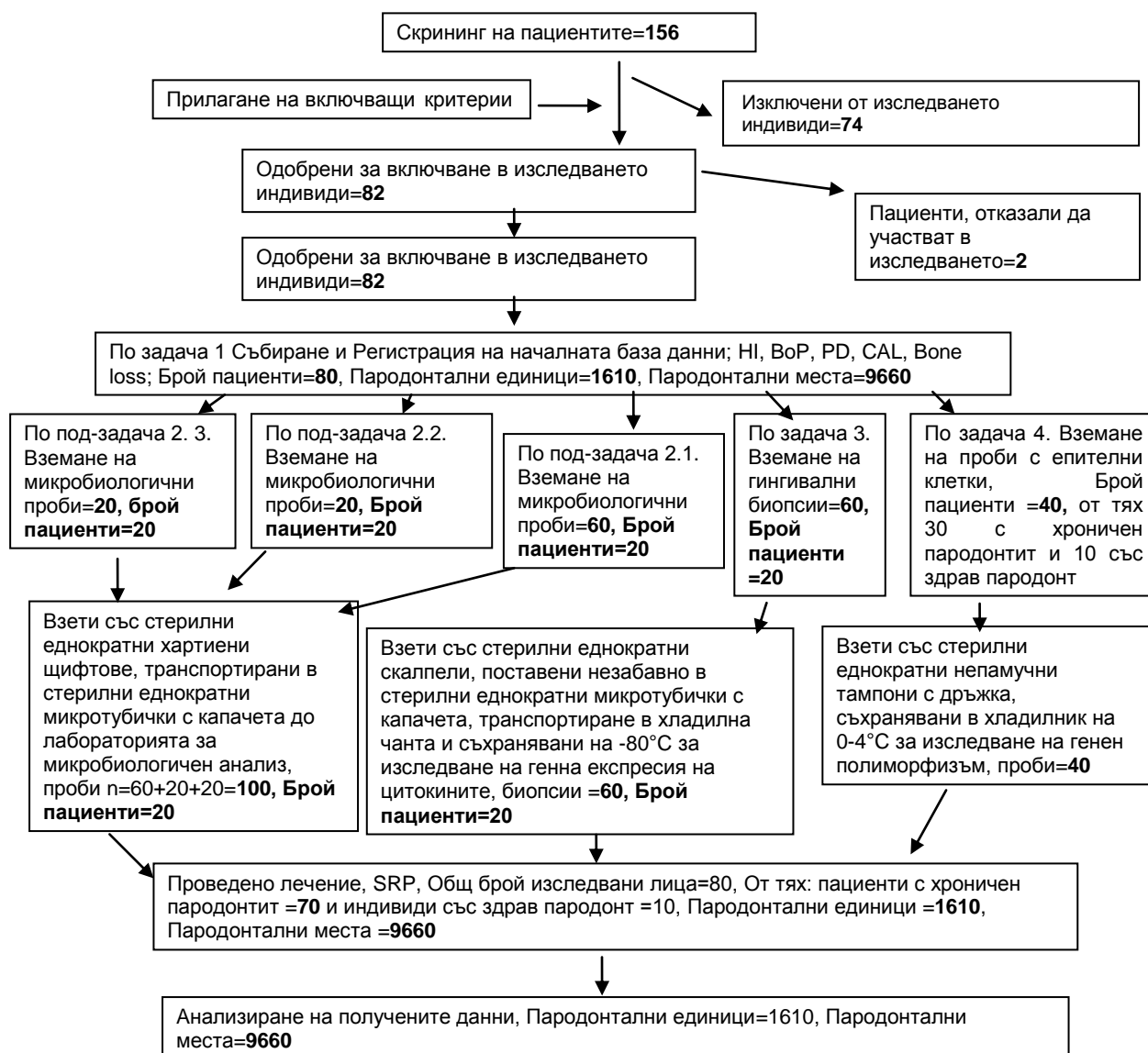


Схема 1. Схематично представяне на материалите и методите за изследването.

Методите в изследването са:

- 2.1. Клинични и рентгенографски;
- 2.2. Лабораторни;
  - 2.2.1. Микробиологични;
  - 2.2.2. Молекулярни;
  - 2.2.3. Генетични;
- 2.3. Статистически.

## **2.1. Клинични и рентгенографски критерии в диагнозата**

Пациентите се изследват по следните клинични параметри:

### **2.1.1. Гингивален статус**

- ✓ Индекс за кървене на гингива (PBI- Papillary bleeding index, за оценка на тежестта и разпространението на гингивалното възпаление, Saxer&Muhleman 1975г.). PBI се представя като числова стойност на средно кървене за определяне тежестта на възпалението и е подходящ за мотивиране на пациентите. Средни стойности до 1 показват леко, 1-2 – умерено и 3-4 - тежко гингивално възпаление.

### **2.1.2. Пародонтални параметри**

- ✓ BoP (bleeding on probing) в % (Ainamo & Bay 1975г.)- пародонталната сонда се въвежда до дъното на пародонталния джоб и се придвижва внимателно около зъбната (коренова) повърхност вестибуларно и орално. При наличие на провокирано кървене при инструментирание пародонталното място (вестибуларна, лингвална, медиална и дистална повърхност) се отбелязва в регистрационната карта като „кървене” - „+”; липса на кървене - „-”. Определя се обхват на кървене в проценти. Тежестта на гингивалното възпаление се изразява чрез процента на кървящите места. Тъй като изследваните места са много на брой, този индекс е предназначен за индивидуалното изследване на данните от различните визити на пациента.
- ✓ Дълбочина на джоба при сондиране в мм (PD- pocket depth). На основата на този параметър оценяваме пародонталните джобове като плитки, средно дълбоки и дълбоки съответно до 4мм, 4-6мм и над 6мм;
- ✓ Загуба на аташман в мм (CAL- clinical attachment level). Този параметър в най-голяма степен служи при определяне на диагнозата по тежест: 1-2мм – лек пародонтит, 3-4мм – умерен по тежест и 5мм – тежък пародонтит (14);
- ✓ Състояние на фуркациите (F- Furcation involvement, Hamp1975г.);
- ✓ Подвижност на зъбите (степени от 1 до 3, Miller`s mobility index 1950г.).

### **2.1.3. Оралнохигиенен статус**

- ✓ Хигиенен индекс (HI- Hygiene index, за оценка на процента свободни от плака зъбни повърхности, O`Leary et al.1972г.).

Данните се въвеждат в пародонтална карта.

\*Измерванията в мм се правят в 6 точки за всеки зъб (медиобукална, букална, дистобукална, медиолингвална, лингвална, дистолингвална), с градуирана пародонтална сонда CP15 (Hu Friedy®).

### **2.1.4. Рентгенографски критерии**

**Рентгенографски методи на изследване** – имат за цел точното определяне на диагнозата „хроничен пародонтит” при селектираните пациенти с регистриране на загубата на интерденталната алвеоларна кост (над 2мм). При пациентите са прилагани

следните рентгенографски техники: 1) ортопантомография и 2) интраорална ретроалвеоларна рентгенография.

## **2.2. Лабораторни методи**

### **2.2.1. Идентификация на субгингивални пародонтопатогени**

– **Във връзка с под-задача 2.1. Селекция на местата за вземане на микробиологичните проби:** при 20 пациента са изследвани три пародонтални патогена в пародонтални джобове с различна дълбочина – плитки (до 4 мм), средно дълбоки (от 4 до 6 мм) и дълбоки (над 6 мм) – 60 микробиологични проби. За избягване на контаминация супрагингивалната зъбна плака от селектирания зъб е отстранявана със стерилен инструмент – скалер или пародонтална кюрета след предварително изолиране с памучна ролка и подсушаване с лека въздушна струя. Във всеки пародонтален джоб се въвежда стерилен ендодонтски хартиен щифт за минимум 10 сек. Книжните щифтове се изваждат от джоба и се поставят веднага в стерилна епруветка от предоставения от фирмата диагностичен кит. Така се изпращат за анализ.

За целите на изследването определянето на прицелните пародонтални патогени (*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* и общ брой микроорганизми) се извърши по Real-Time PCR метод.

Всички места на вземане на микробиологичните проби са отбелязвани в стандартните бланки на PET test.

**Във връзка с под-задача 2.2.** При 20 пациента с диагноза умерен или тежък хроничен пародонтит, поставена на базата на клиничните и рентгенологични диагностични методи се определя присъствието и нивата на основните пародонтопатогени – 9 прицелни щама (*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, *Tannerella forsythia*, *Prevotella intermedia*, *Peptostreptococcus /Micromonas/ micros*, *Fusobacterium nucleatum*, *Eubacterium nodatum*, *Capnocytophaga gingivalis* и общ брой микроорганизми) в дълбоките пародонтални джобове се извърши чрез real-time PCR анализ на апарат Real-time – 20 микробиологични проби.

Всички места на вземане на микробиологичните проби са отбелязвани в стандартните бланки на PET plus test.

**Във връзка с под-задача 2.3.** Изследването обхваща 20 пациента с диагноза умерен или тежък хроничен пародонтит, поставена на базата на клиничните и рентгенологични диагностични методи. Във връзка с изпълнението на тази задача беше приложен real-time PCR анализ за:

- Определено беше присъствието и количеството на изследваните 5 щама на *Candida spp.* в субгингивална плака (*Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*+ общ брой *Candida*);
- Определено беше присъствието и количеството на изследваните 5 щама на *Candida spp.* по орална лигавица (*Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*+ общ брой *Candida*).

Пробите са вземани със стерилен книжен щифт от пародонтални джобове с дълбочина **над 6 мм** при пациенти с хроничен пародонтит (20 проби) и със стерилен памучен тампон от областта на устната лигавица (20 проби) - дорзалната повърхност на езика.

Всички места на вземане на микробиологичните проби са отбелязвани в стандартните бланки на CAT test.

## 2.2.2. Молекулярна оценка на отговора на организма

**Във връзка с изпълнението на задача 3.** Да се оцени отговора на организма чрез нивата на генна експресия на основни проинфламаторни цитокини (интерлевкин 6 (IL-6) и туморнекротизиращ фактор - алфа (TNF- $\alpha$ )) при хроничния пародонтит.

В изследването са включени 20 пациента с умерен или тежък хроничен пародонтит.

**Молекулярно-биологични:** Изследване и определяне нивата на генна експресия на IL-6 и TNF-alpha в гингивалните тъкани – Real-Time PCR метод:

- ✓ Чрез изолиране на РНК от гингивална тъкан;
- ✓ Обратна транскрипция на откритата РНК;
- ✓ Амплификация на получената кДНК с праймери и сонди за IL-6 и TNF-alpha , апарат AB 7 500 Real-Time PCR, TaqMan PCR-реактиви;
- ✓ Анализ на получените резултати, RQ софтуер.

Субстратът за изследването е гингивална тъкан (3/3мм<sup>3</sup> приблизително), която е ексцизирана след поставяне на локална анестезия, и поставена в стерилна пластична епруветка с капаче от 1,5мл. По този начин се транспортира с хладилна чанта до специализирани лаборатории за съхранение на генетичен материал, където се замразява на -80°C до времето на извършване на лабораторния анализ. Тъканта се ексцизира от областта на интерденталната гингива, прилежаща на пародонтални джобове с различна дълбочина – плитки (до 4 мм), средно дълбоки (от 4 до 6 мм) и дълбоки (над 6 мм)- еднократно, три биопсии при всеки пациент (20 пациента), като са взети общо 60 гингивални проби.

За целите на изследването генната експресия на IL-6 и TNF- $\alpha$  в гингивалните тъкани при пародонтит се определи чрез сравнителен количествен анализ – TaqMan Real-Time PCR. Общата РНК се транскрибира до кДНК посредством RT PCR (reverse transcript PCR) метод. Получената кДНК се амплифицира със специфични праймери и сонди за IL-6 и TNF- $\alpha$  на апарат Real-Time PCR чрез TaqMan PCR реактиви. Принципите са идентични на класическия PCR като той дава само качествен анализ. За разлика от него при **TaqMan Real-Time PCR дава количествена оценка** като се използват: флуоресцентно белязана специфична TaqMan сонда и двойка небелязани праймери. Благодарение на 5'-3' екзонуклеазната активност на Taq-полимеразата при достигане на сондата по време на амплификация Taq-полимеразата срязва сондата и се отделя флуоресценция. **TaqMan Real-Time PCR е по-специфичен анализ** в сравнение с PCR тъй като данните се снемат в експоненциалната фаза, когато факторите на средата не са ограничаващи и не се налага след-амплификационна детекция на резултата. Протокол за определяне на генна експресия на IL6 и TNF в гингивална тъкан, взети чрез биопсия в съседство на пародонтални джобове с три различни дълбочини, при референтен АСТВ ген - приложение 1 от дисертационния труд.

## 2.2.3. Оценка на отговора на организма чрез генетични изследвания

**Във връзка с изпълнението на задача 4.** Да се оцени отговора на организма чрез присъствието на генен полиморфизъм за инфламаторните цитокини интерлевкин-6 (IL-6), тумор некротизиращ фактор - алфа (TNF- $\alpha$ ) и лимфотоксин алфа (LT- $\alpha$ ) при тежък хроничен пародонтит.

В изследването са включени 30 пациента с поставена диагноза „хроничен пародонтит” и 10 пародонтално здрави индивиди като контролна група.

За целта на изследването генетичният материал е взет от областта на букалната лигавица, сутрин, без пациента да извършва орално-хигиенни процедури, преди провеждане на професионална пародонтална терапия, чрез стерилен тампон за ДНК изследване, съхраняван на 0-4 °С до момента на извършване на лабораторния анализ.

Лабораторни методи на изследване: PCR RFLP ДНК анализ на полиморфизъм TNF-А (G-308A), IL-6 (G-174C), IL-6 (G-597A) и LT-A (A+252G). Протокол: Изолиране на ДНК от тампони с епителни клетки от букална лигавица чрез органична екстракция – приложение 2 от дисертационния труд.

### 2.3. Статистически методи

#### Използвани статистически програми:

1. Дескриптивна статистика, корелационен анализ, t-тест, ANOVA – IBM SPSS Statistics Version 19, в табличен вид е представено честотното разпределение на разглежданите признаци, разбити по групи на изследване. Вариационен анализ – изчисляване оценките на централната тенденция и разсейване.
2. Тест  $\chi^2$  и екзактен тест на Фишер – за проверка на хипотези за наличие на връзка между категорийни променливи.
3. Непараметричен тест на Шапиро-Уилк – за проверка вида на разпределението.
4. Непараметричен тест на Ман-Уитни – за проверка на хипотези за различие между две независими извадки
5. Изготвяне на хистограми – Statistica Version 8
6. Клъстерен анализ – Minitab® 16.1.0
7. Принципен компонентен анализ - XLStat Pro 7.5

Статистическият анализ на данните при **задача 3**, е извършен след прилагане на алгоритъм за отстраняване на екстремните стойности („outliers”), основаващ се на междуквartilното разстояние:  $[Q_1 - k(Q_3 - Q_1), Q_3 + k(Q_3 - Q_1)]$ , като в случая е използван коефициент  $k=1,5$ . За изследване на взаимовръзките между клиничните параметри на пародонтита и експресията на изследваните проинфламаторни фактори са използвани рангов Spearman корелационен анализ. Корелационен анализ – метод за установяване/доказване на взаимовръзка между 2 или повече показателя. Корелационен индекс (R) е степента, в която две променливи са взаимно свързани. R има стойност от (-1) до 1:

$0 < R < 0,3$  – слаба корелация

$0,3 < R < 0,5$  – умерена корелация

$0,5 < R < 0,7$  – значителна корелация

$0,7 < R < 0,9$  – висока корелация

$0,9 < R < 1,0$  - много висока корелация

Когато R е с положителен знак има права зависимост между двете променливи (т.е. при по-висока стойност на 1 показател имаме (може да очакваме) по-висока стойност на 2-ия показател). Когато знакът е отрицателен, има обратна зависимост (т.е. при по-висока стойност на 1-ия показател имаме по-ниска на 2-ия показател).

За установяване на значими различия между отделните показатели са приложени t-тест на Student, а в случаите на ненормално разпределение и/или липса на равенство на дисперсиите – съответно U-тест на Mann-Whitney. За установяване на значими различия между dCt и ddCt на IL6 и TNF при различна дълбочина на пробата е

приложен чифтен t-тест (Paired t-test) с цел да се неутрализира съпътстващия ефект на факторите възраст, пол, тютюнопушене, количество на *T. denticola*, *P. gingivalis* и др.

Процентилите са изчислени по стандартния метод (Нека  $k$  да бъде най-голямото цяло число по-малко или равно на  $(N+1)*p/100$ , и нека  $f = (N+1)*p/100 - k$ .; Използва се следната формула:  $v=f*x_{k+1}+(1-f)*x_k$ ). При представените бокс-плотове са отбелязани медианата, 25, 75, 10, 90 процентил, както и стойностите, показващи най-съществени отклонения. Въз основа на разликите между 75 и 25 процентил е съдено за значимостта в степента на флукуациите. За значими различия са приети тези, при които разликата е по-голяма от 50 %.

В това проучване за референтен ген е използван АСТВ (ген за  $\beta$ -актин). Като калибратор са използвани генните експресии от пробите, взети от различна дълбочина.

## СОБСТВЕНИ РЕЗУЛТАТИ

**Резултати по задача 1.** Да се проведе скрининг на пациенти за сформиране на подходящи за проучването групи с диагноза хроничен пародонтит.

В табличен вид са представени данните за всички пациенти с хроничен пародонтит (70 пациента) и контролната група със здрав пародонт (10 индивида) (таблица 4).

Таблица 4. Параметри на хроничния пародонтит в изследваната група.

Изследвана група	Клинична и рентгенографска характеристика на пациентите	Средно аритметична	Стандартно отклонение	Брой случаи с хроничен пародонтит	P	t
Пациенти	Възраст	49.47	8.25	70	0.001	5.83
Контрола		23.80	1.48	10		
Пациенти	РВІ средна стойност	2.19	0.64	70	<0.001	10.84
Контрола		0.36	0.117	10		
Пациенти	РDmm средна стойност	3.81	0.77	70	<0.001	13.13
Контрола		0.85	0.165	10		
Пациенти	САLmm средна стойност	4.47	1.12	70	<0.001	12.51
Контрола		0	0	10		
Пациенти	Bone lossmm средна стойност	3.06	1.33	70	<0.001	7.22
Контрола		0	0	10		

Данните по инициалния статус показват, че:

- средната възраст на пациентите е 49,47 години като възрастта на участниците в изследването варира между 38 и 70 години.
- РВІ има средна стойност 2,19, което показва наличието на умерено изразено маргинално гингивално възпаление.
- РD има средна стойност е 3,81 мм, но от данните се установи, че варира между 3 и 6 мм, което е средно за отделните пациенти и показва присъствие на умерено дълбоки и дълбоки пародонтални джобове.
- САL средна стойност е 4,5 мм като данните показаха, че варира между 3 и 8 мм, което отговаря на критериите за умерен и тежък хроничен пародонтит.
- Bone loss е със средна стойност 3,06 мм с вариране от 2 до 6 мм, което показва умерена до тежка загуба на маргиналната интердентална алвеоларна кост.

Таблица 5. Орална хигиена и кървене при сондиране.

	Клинични параметри	Средно аритметична	Ст. отклонение	Брой случаи с хроничен пародонтит	P	t
Пациенти	HI%	6.76	3.95	70	<0.001	22.91
Контрола		79.90	3.67	10		
Пациенти	BoP%	95.77	11.84	70	<0.001	25.44
Контрола		0	0	10		

От таблица 5 се вижда, че:

- хигиенният индекс има средна стойност 6,76% като според получените инициални данни варира между 0% и 30%, което показва преобладаване на заети с дентална плака зъбни повърхности.
- BoP е средно 95,77% като данните показваха, че стойностите се движат между 70% и 100%, което е обективен признак за широк обхват на възпалителния процес в гингивата – епител и съединителна тъкан.

#### Анализ на корелациите между параметрите на пародонтита в изследваната група пациенти

Таблица 6. Корелационна зависимост между параметрите на пародонтита.

		HI%	BoP	PBI	PD	CAL	BoneLoss
<b>Възраст</b>	R-коэффициент	0.11	-0.02	0.10	0.09	0.06	-0.05
	P - коэффициент	0.38	0.90	0.40	0.44	0.61	0.69
<b>HI%</b>	R-коэффициент		-0.20	<b>-0.21*</b>	<b>-0.34*</b>	<b>-0.27*</b>	<b>-0.44*</b>
	P - коэффициент		0.11	0.08	0.00	0.03	0.00
<b>PBI</b>	R-коэффициент			0.17	<b>0.32*</b>	<b>0.26*</b>	<b>0.37*</b>
	P - коэффициент			0.15	0.01	0.03	0.00
<b>BoP</b>	R-коэффициент				0.10	0.01	0.11
	P - коэффициент				0.39	0.92	0.37
<b>PD</b>	R-коэффициент					<b>0.89*</b>	<b>0.84*</b>
	P - коэффициент					0.00	0.00
<b>CAL</b>	R-коэффициент						<b>0.79*</b>
	P - коэффициент						0.00

! Значимите корелации са отбелязани с \*

Установени са статистически значими коефициенти на корелация, които показват, че съществува обективна връзка между съответните показатели. Така например беше установена силна положителна корелация между дълбочината на джобовете при сондиране и загубата на аташман (0.89) и между дълбочината при сондиране и костната загуба (0.84). Установи се и силна положителна корелация между загубата на аташман и костната загуба (0.79). Умерено силна отрицателна връзка се установи между хигиенния индекс и дълбочината при сондиране (-34), както и между хигиенния индекс и костната загуба (-44). Умерена по сила положителна корелация е установена между РВІ от една страна и от друга - дълбочината при сондиране (0.32) и костната загуба (0.37). Анализът показва по-слаба отрицателна корелация между хигиенния индекс и РВІ (-0.21), както и между хигиенният индекс загубата на аташман (-0.27). Установи се и по-слаба положителна връзка между РВІ и загубата на аташман (0.26).

**Резултати по задача 2.** Да се оцени бактериалната находка при хроничен пародонтит.

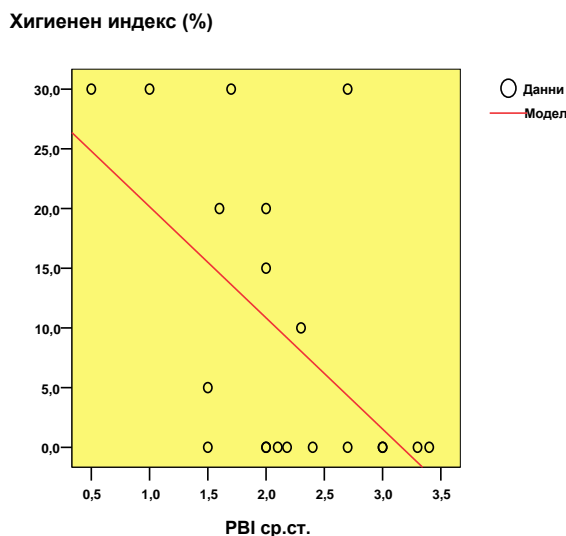
Таблица 7. Параметри на пародонтита при различна дълбочина на джоба.

Показатели (средни стойности)	Брой пациенти	$\bar{X}$	SD
РВІ средна стойност	20	2,14	0,74
PD – средна стойност	20	3,88	0,82
PD ≤ 4 mm (брой)	20	51,80	19,64
PD 4 – 6 mm (брой)	20	25,80	10,42
PD > 6 mm (брой)	20	7,80	9,04
CAL mm средна стойност	20	4,40	1,21
Bone loss (mm)	20	3,04	1,48

Данните за основните диагностични критерии показват, че:

- С най-голям брой и най-високи относителни дялове (разпространение) са джобовете под 4 мм.
- Броят на пародонталните джобове с дълбочина на сондиране между 4 и 6 мм е по-малък и най-малък е броят на дълбоките пародонтални джобове.
- Средната стойност за загубата на аташман (CAL=4,40 мм) показва, че при изследваните пациенти преобладава тежък хроничен пародонтит.
- Средна стойност 2,14 за РВІ говори за умерено гингивално възпаление. При изследваните пациенти се установи умерена по тежест костна загуба (средно 3,04 мм).

Фигура 1. Корелация между оралнохигиенния статус (хигиенния индекс) на пациентите и тежестта на гингивалното възпаление (РВІ средна стойност).

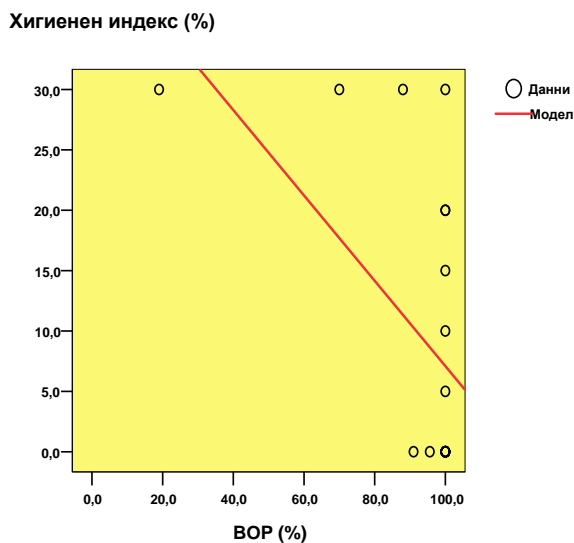


Проведеният регресионен анализ установи наличие на линейна зависимост ( $p=0.011$ ,  $R^2 = 0.309$ ) между хигиенния индекс и РВІ средна стойност:

$$HI = 29,467 - 9,313 * PBI_{mean}$$

където HI е хигиенния индекс в %, а  $PBI_{mean}$  – РВІ средна стойност на гингивалното кървене. Зависимостта има правопрпорционален характер - като средностатистическото намаление на HI (свободните от плака повърхности) с около 9% статистически води до увеличението на РВІ средна стойност с 1 единица (фигура 1).

Фигура 2. Корелация между оралнохигиенния статус (хигиенния индекс) и ВОР - % на кървящите места.

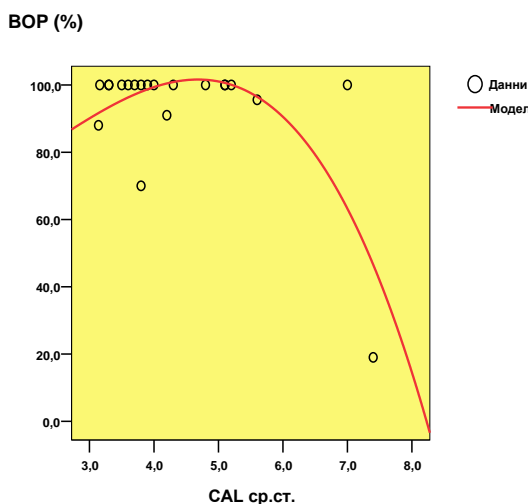


Проведеният регресионен анализ установи наличие на линейна зависимост ( $p=0.015$ ,  $R^2 = 0.287$ ) между хигиенния индекс и BoP разпространение - % на кървящите места:

$$HI = 42,428 - 0,353 * BoP,$$

където HI е хигиенния индекс в % свободни от плака повърхности, а BoP разпространение - % на кървящите места. Анализът показва обратно пропорционален характер като среднестатистическото увеличение на HI с около 0,4% (увеличение на свободните от плака повърхности) води до намаление на BoP с 1% (фигура 2).

Фигура 3. Корелация между загуба на аташман (CALmean) и кървене при сондиране (BoP (%)).

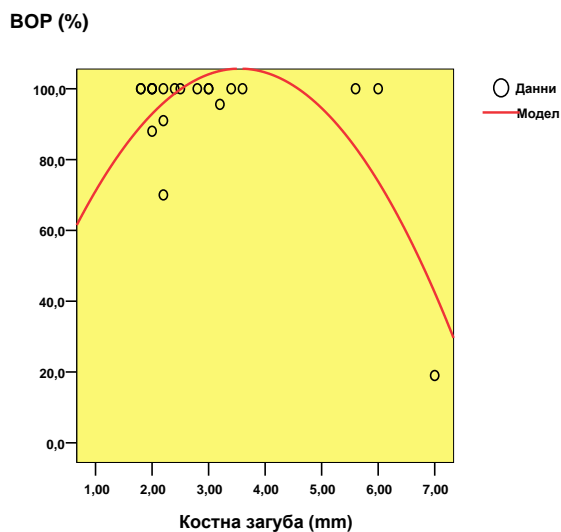


Проведеният регресионен анализ установи наличие на зависимост ( $p=0.002$ ,  $R^2 = 0.527$ ) между BoP разпространение - % на кървящите места и CAL mm средна стойност – загуба на аташман средна стойност, която се описва най-добре от следното кубично уравнение:

$$BoP = 62,390 + 5,369CALmean^2 - 0,765CALmean^3,$$

където BoP е разпространение в проценти на кървящите места, а CALmean – средна стойност – загуба на аташман средна стойност. От фигура 11 се вижда, че при изследваните пациенти BoP (% кървящи места) се увеличава плавно до около 4,5 средна стойност на CALmean, след което се задържа до средните стойности на загубата на аташман от около 6mm и при по-високите стойности кривата показва намаление на разпространението на кървенето при сондиране вероятно поради по начало малкото разпространение на дълбоките джобове с голяма загуба на аташман в групата. Установената статистически достоверна зависимост на загубата на аташман (CALmean) от разпространението на параметъра BoP потвърждава данни от други изследвания в литературата за това, че кървенето при сондиране има диагностична стойност в определяне на тежестта на пародонтита и рисковия профил на пациентите с хроничен пародонтит.

Фигура 4. Корелация между костна загуба и кървене при сондиране (BoP (%))(p=0.001).

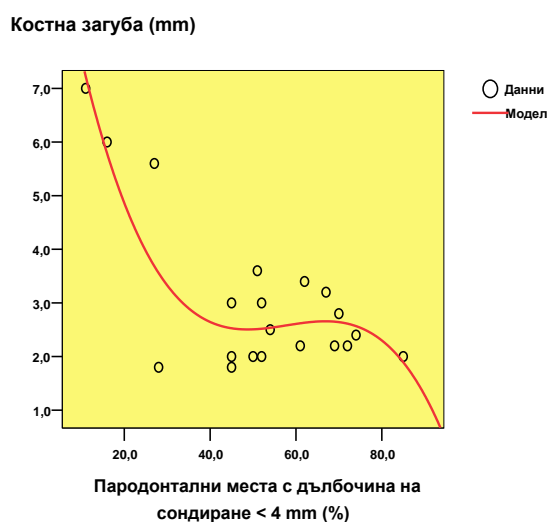


Проведеният регресионен анализ установи наличие на зависимост (p=0.001, R2 = 0.583) между BoP разпространение - % на кървящите места и загубата на кост, която се описва най-добре от следното квадратично уравнение:

$$BoP = 38,679 + 37,745 \text{ Bone loss} - 5,315 \text{ Bone loss}^2,$$

където BoP е разпространение в проценти на кървящите места, а Bone loss – костна загуба в мм. От фигура 4 се вижда, че BoP се увеличава плавно до около 3,6 средна стойност на Bone loss, след което кривата показва намаление на разпространение на кървенето идентично на показаното на фигура 3.

Фигура 5. Корелация между костна загуба и дълбочина на сондиране < 4 mm.



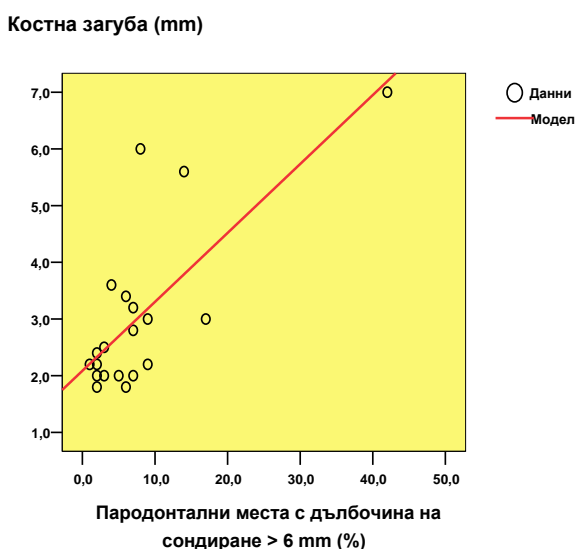
Проведеният регресионен анализ установи наличие на зависимост (p<0.001, R2 = 0.729) между костната загуба и пародонтални места с дълбочина на сондиране < 4 mm, която се описва най-добре от следното кубично уравнение:

$$\text{Bone loss} = 11,718 - 0,500\text{PD\_LT\_4mm} + 0,009\text{PD\_LT\_4mm}^2 - 5,11 \cdot 10^{-5} \text{PD\_LT\_4mm}^2,$$

където: Bone loss е костна загуба в мм, а PD\_LT\_4mm - пародонтални места с дълбочина на сондиране < 4 mm. От фиг. 5 се вижда, че с увеличаването на PD\_LT\_4mm до около 40% Bone loss намалява рязко до около 2,7, след това се задържа на приблизително еднакво ниво до PD\_LT\_4mm около 75%, след което отново пада.

Проведеният регресионен анализ не установи наличие на зависимост ( $p > 0.05$ ) между костната загуба и пародонтални места с дълбочина на сондиране между 4 и 6 mm при изследваните пациенти.

Фигура 6. Корелация между костна загуба и дълбочина на сондиране > 6 mm.



Проведеният регресионен анализ установи наличие на зависимост ( $p < 0.001$ ,  $R^2 = 0.729$ ) между костната загуба и пародонтални места с дълбочина на сондиране > 6 mm, която се описва най-добре от следното линейно уравнение:

$$\text{Bone loss} = 2,087 + 0,122\text{PD\_GT\_6mm},$$

където Bone loss е костна загуба в мм, а PD\_GT\_6mm - пародонтални места с дълбочина на сондиране > 6 mm. Зависимостта има право-пропорционален характер, като увеличението на PD\_GT\_6mm с 1% води до средностатистическо увеличение на Bone loss с около 0,12 mm (фигура 6).

**Резултати по под-задача 2.1.** Основни пародонтопатогени при пародонтални джобове с различна дълбочина (*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*) във връзка с тежестта на пародонтита.

Количеството на изследваните бактерии се характеризира с по-ниски нива в плитките джобове и се повишава паралелно с увеличаване на дълбочината на джоба.

Таблица 8. Пародонтопатогени при различна дълбочина на пародонталните джобове.

МИКРООРГАНИЗМИ (брой)	n	$\bar{X}$	SD
A.a. $\leq 4$ mm, 4 – 6 mm, >6 mm	20	0	0
<i>P. gingivalis</i> $\leq 4$ mm	20	90920,00	181159,87
<i>P. gingivalis</i> 4 – 6 mm	20	288750,50	597514,48
<i>P. gingivalis</i> > 6 mm	20	522025,00	647118,45
<i>T. denticola</i> $\leq 4$ mm	20	56045,00	57772,95
<i>T. denticola</i> 4 – 6 mm	20	140930,00	194928,60
<i>T. denticola</i> > 6 mm	20	698250,00	1328814,86
Общ брой микроорганизми в пробите $\leq 4$ mm	20	48070000,00	84774481,64
Общ брой микроорганизми в пробите 4 – 6 mm	20	33970000,00	39995251,03
Общ брой микроорганизми в пробите > 6 mm	20	103490000,00	156556029,65

Представените на таблица 8 данни показват, че:

- Най-голям брой пародонтопатогени и от двата вида - *P. gingivalis* и *T. denticola*, са идентифицирани при джобовете, които са по-дълбоки от 6 мм;
- Общият бактериален товар показва най-високи стойности също при джобовете с най-голямата изследвана дълбочина – >6мм.
- Нивата на изследваните пародонтопатогени са най-ниски в джобове с дълбочина < 4 мм.

При изследването на общия брой микроорганизми във връзка с различна дълбочина на сондиране се установява, че средният общ брой микроорганизми при джобове с дълбочина над 6 мм е сигнификантно по-голям от този при джобове с по-малка дълбочина (таблица 9).

Таблица 9. Общ брой микроорганизми (МО) в зависимост от дълбочината на пародонталния джоб (PD).

Общ брой МО PD	n	$\bar{X}$	SD
Дълбочина на сондиране < 4 mm	20	48070000,00 <sup>a</sup>	84774481,64
Дълбочина на сондиране 4 – 6 mm	20	33970000,00 <sup>a</sup>	39995251,03
Дълбочина на сондиране > 6 mm	20	<b>103490000,00<sup>b</sup></b>	156556029,65

На таблицата е показана установената значима разлика за общия бактериален брой при дълбоките пародонтални джобове.

\* - еднаквите букви по вертикалите означават липса на сигнификантна разлика, а различните – наличие на такава (**p<0,05**)

Във връзка с поставената цел е анализирана разликата в количеството *T. denticola* в джобовете с различна дълбочина – < 4 mm, 4-6 mm и > 6 mm. (таблица 10).

Таблица 10. Сравнителен анализ на разпределението на *T. denticola* според дълбочината на джобовете.

T. denticola PD	n	$\bar{X}$	SD
Джоб < 4 mm	20	56045,00 <sup>a</sup>	57772,95
Джоб 4 – 6 mm	20	140930,00 <sup>a</sup>	194928,60
Джоб > 6 mm	20	<b>698250,00<sup>b</sup></b>	1328814,86

От таблицата се вижда установената статистически значима разлика за количеството на Td в групата на дълбоките пародонтални джобове (>6mm).

\* - еднаквите букви по хоризонталите означават липса на сигнификантна разлика, а различните – наличие на такава (**p<0,05**)

Резултатите, представени на таблица 10 показват, че:

- Средният брой *T. denticola* (количество) при джобове с дълбочина над 6mm е сигнификантно по-голям от този при джобовете с по-малка дълбочина;
- Няма установена статистически значима разлика в преваленцията на *T. denticola* (%) в джобовете с различна дълбочина.

Таблица 11. Сравнителен анализ за количеството на *P. gingivalis* според дълбочината на джобовете.

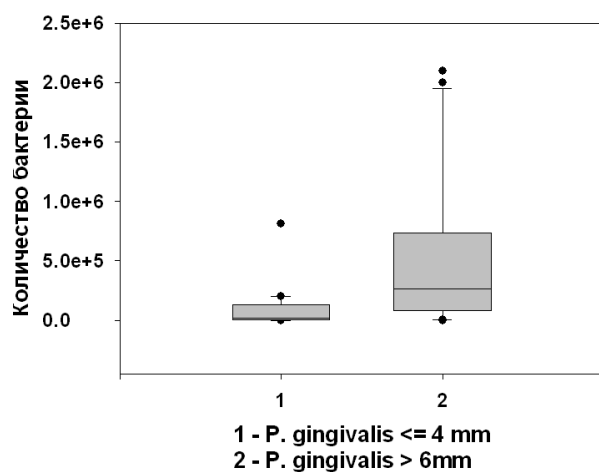
<i>P. gingivalis</i>	n	$\bar{X}$	SD
Джоб < 4 mm	20	90920,00 <sup>a</sup>	181159,87
Джоб 4 – 6 mm	20	288750,50 <sup>ac</sup>	597514,48
Джоб > 6 mm	20	<b>522025,00<sup>bc</sup></b>	647118,45

\* - еднаквите букви по хоризонталите означават липса на сигнификантна разлика, а различните – наличие на такава ( $p < 0,05$ )

Данните на таблица 11 показват, че:

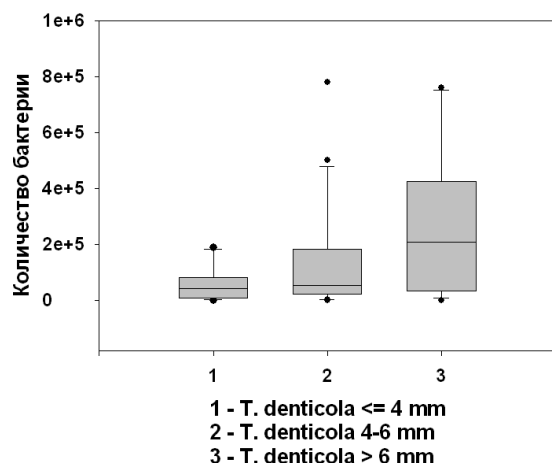
- Средният брой на пародонтопатогените от вида *P. gingivalis* (количество) при джобове с дълбочина над 6 мм е сигнификантно по-голям от този при джобове с дълбочина под 4 мм;
- Няма установена статистически значима разлика в преваляцията на *P. gingivalis* (%) при различните дълбочини на джобовете.

Фигура 7. Разпространение на *P.gingivalis*.



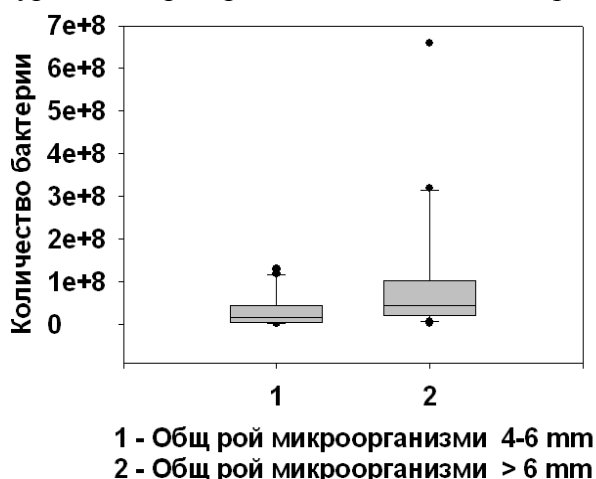
Фигурата показва, че количеството на този микроорганизъм в пробите с  $PD > 6\text{mm}$  е статистически значимо по-голямо от количеството в пробите с  $PD < 4\text{mm}$ .

Фигура 8. Разпространение на *T.denticola*.



Фигурата показва статистически достоверна разлика при детекцията на *T.denticola* в пробите от пародонтални джобове с дълбочина на сондиране над 6мм в сравнение с пробите от джобовете с дълбочина 4-6мм и с дълбочина <4мм.

Фигура 9. Разпространение на общия бактериален товар.



Фигурата показва, че са установени статистически значими разлики в общия брой микроорганизми между пробите с PD>6мм и тези от по-малки стойности на дълбочина на джоба при сондиране.

**Резултати по под-задача 2.2.** Пълен пародонтопатогенен спектър основни пародонтопатогени при дълбоки пародонтални джобове (9 контролни щама: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, *Tannerella forsythia*, *Prevotella intermedia*, *Peptostreptococcus /Micromonas/ micros*, *Fusobacterium nucleatum*, *Eubacterium nodatum*, *Capnocytophaga gingivalis*) във връзка с тежестта на пародонтита.

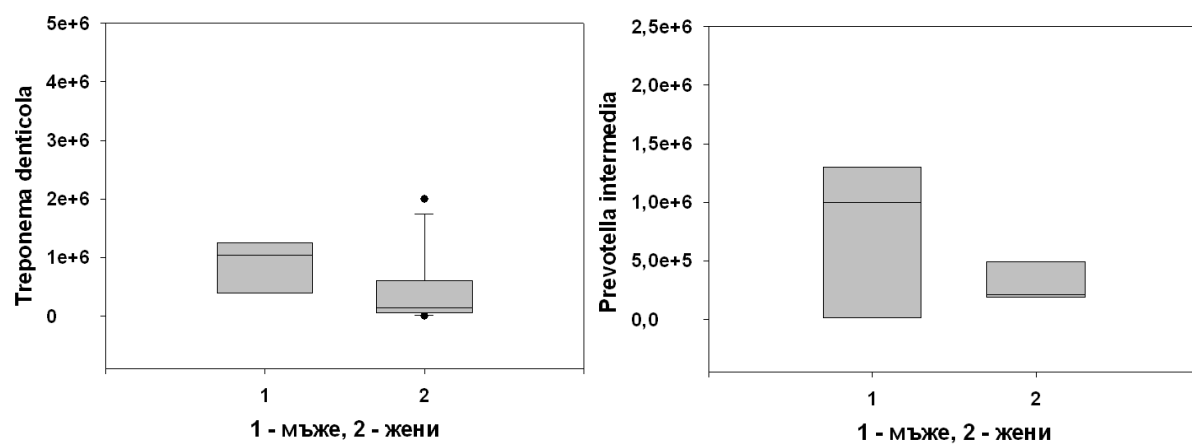
Установени са взаимовръзки между общата бактериална маса и изследваните микроорганизми:

- ОБМ + (N) *Tannerella forsythia* (R=0,46)
- - (%) *Porphyromonas gingivalis* (R=-0,71)
- - *Peptostreptococcus micros*

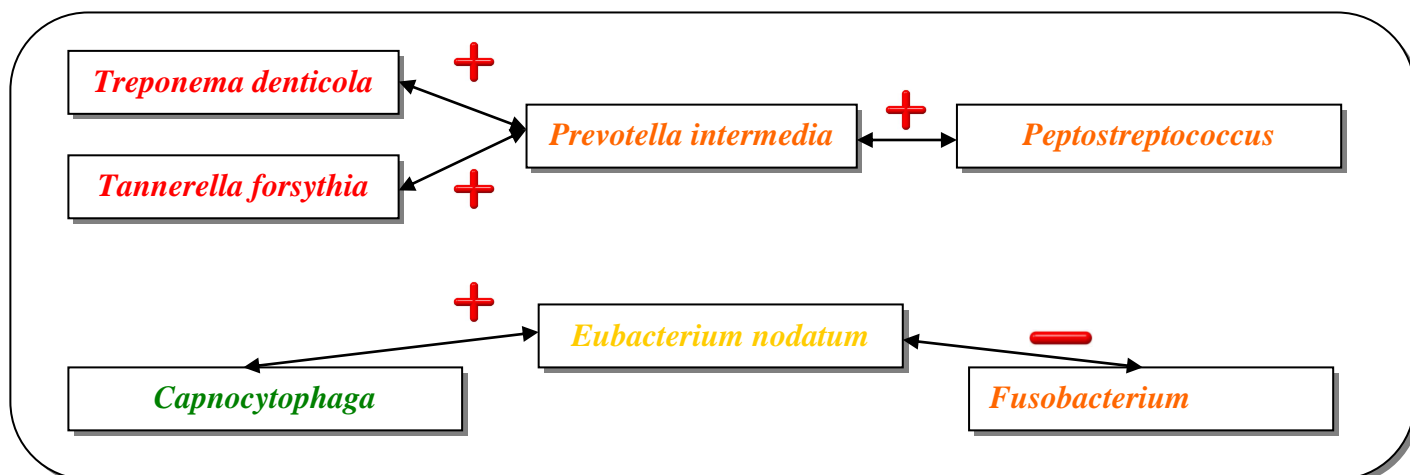
Общият брой микроорганизми показва значима правопрпорционална зависимост единствено с *Tannerella forsythia* ( $R=0,46$ ) и по-силна обратнопропорционална взаимовръзка с процентния дял на *Porphyromonas gingivalis* ( $R=-0,71$ ) и *Peptostreptococcus micros* ( $R=-0,60$ ). Т.е. При пациенти с малък общ брой микроорганизми се наблюдава малък брой на *Tannerella forsythia* и увеличен процентен дял на *Porphyromonas gingivalis* и *Peptostreptococcus micros*.

### Достоверни разлики между изследваните микробиологични параметри и пола на пациентите

Фигури 10 и 11. Количества на *Treponema denticola* и *Prevotella intermedia* в зависимост от пола.



Количеството на *Treponema denticola* ( $P=0,05$ ) и *Prevotella intermedia* ( $P=0,07$ ) показват достоверни различия в зависимост от пола на пациентите. При мъжете количествата и на двата вида бактерии (микробиологични параметри) са значително по-високи в сравнение с тези при жените и стойностите варират в по-широки граници. Фигура 12. Взаимовръзки между изследваните микроорганизми.



Установени са значими взаимовръзки между количествата на изследваните видове бактерии при проведен рангов корелационен анализ (Spearman). С положителен знак са представени положителните корелационни коефициенти, а с отрицателен знак са означени отрицателните корелационни коефициенти.

**Корелации между загубата на кост (Bone Loss, mm) и изследваните клинични и микробиологични параметри на пародонтита**

Таблица 12. Значими корелации между изследваните параметри.

Bone Loss, mm	Показател	Корелационен коефициент (R), при P<0,05
		Общ брой микроорганизми
	% дял на <i>Porphyromonas gingivalis</i>	0,487
	% дял на <i>Tannerella forsythia</i>	0,546
	% дял на <i>Peptostreptococcus(Micromonas) micros</i>	0,519
	HI %	-0,648
	PD mm средно	0,523
	PD 4-6mm	0,545
	CAL	0,570

Костната загуба показва значими взаимовръзки с голям брой от изследваните показатели – присъствието на плака, дълбочината на джобовете, загубата на аташман и присъствието на основни пародонтопатогени в пародонталната среда.

**Корелации между дълбочината на джоба (PD mm средни стойности) и изследваните параметри на пародонтита**

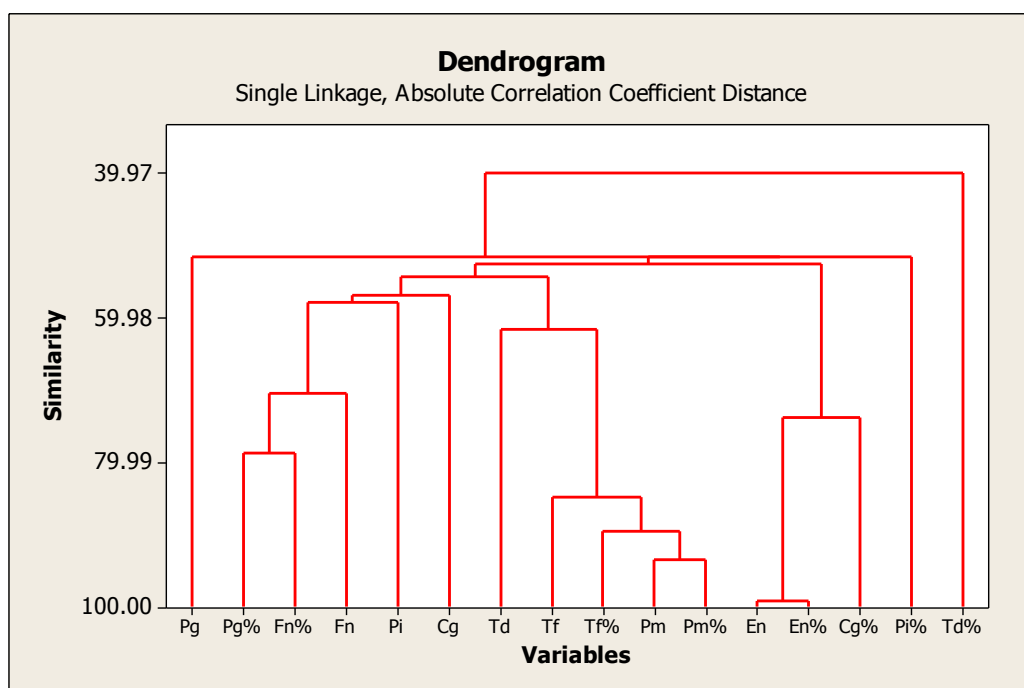
Таблица 13. Значими корелации на средната дълбочина на джоба с други параметри на пародонтита.

PD mm средни стойности	Показател	Корелационен коефициент (P<0,05)
		% дял на <i>Tannerella forsythia</i>
	CAL	0,721
	Bone loss, mm	0,523

От таблицата се вижда, че дълбочината на джоба корелира статистически достоверно със загубата на аташман (0,721 – силна връзка), загубата на кост (0,523 – значима връзка) и преваленцията на *Tannerella forsythia* (0,469 – умерена връзка).

## Резултати за междубактериалните връзки след клъстерен анализ

Резултатите от този анализ са представени като дендрограми на фигура 13. Фигура 13. Дендрограма с корелационни разстояния, отразяваща взаимовръзката между изследваните видове бактерии и процентните им дялове в микробното съобщество.



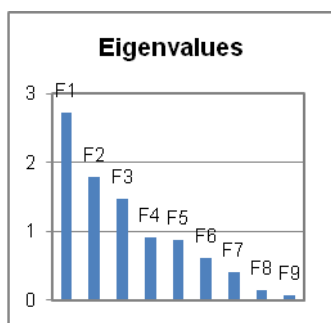
На базата на този вид анализ в настоящото изследване получихме резултати, които позволяват обособяването на 2 основни групи от микробни видове:

- 1 група: Tf – Pm – Td – Fn – Pg (Представители на червения и оранжевия комплекс)
- 2 група: Pi – Cg – En (Представители на оранжев, оранжево-асоцииран и зелен комплекс)

Получаваните резултати потвърждават литературни данни за асоциациите на *P.gingivalis* с микроорганизми от червения и оранжевия комплекси на Sokransky и по-специално: *Tf*, *Fn*, *Td*. Тези микроорганизми взаимно усилват своите растеж, вирулентност и активност, което обуславя по-висока степен на тъканна деструкция. Направеният анализ и групирането на пародонтопатогените в това проучване е в подкрепа на синергични отношения на изолираните микроорганизми и е в съответствие с доказателствата в литературата за здравата им връзка с патогенезата на пародонталните заболявания. От друга страна е известен инхибиторен ефект на *P.gingivalis* спрямо *P.intermedia*, което може да е обяснение за връзката, установена при проведеното от нас изследване между *P.intermedia* и *C.gingivalis* и *E.nodatum*. *C.gingivalis* попада в зеления комплекс на Sokransky, който се свързва със състоянието на пародонтално здраве, но макар и по-рядко, се съобщава да е бил изолиран и от места с развита пародонтална лезия.

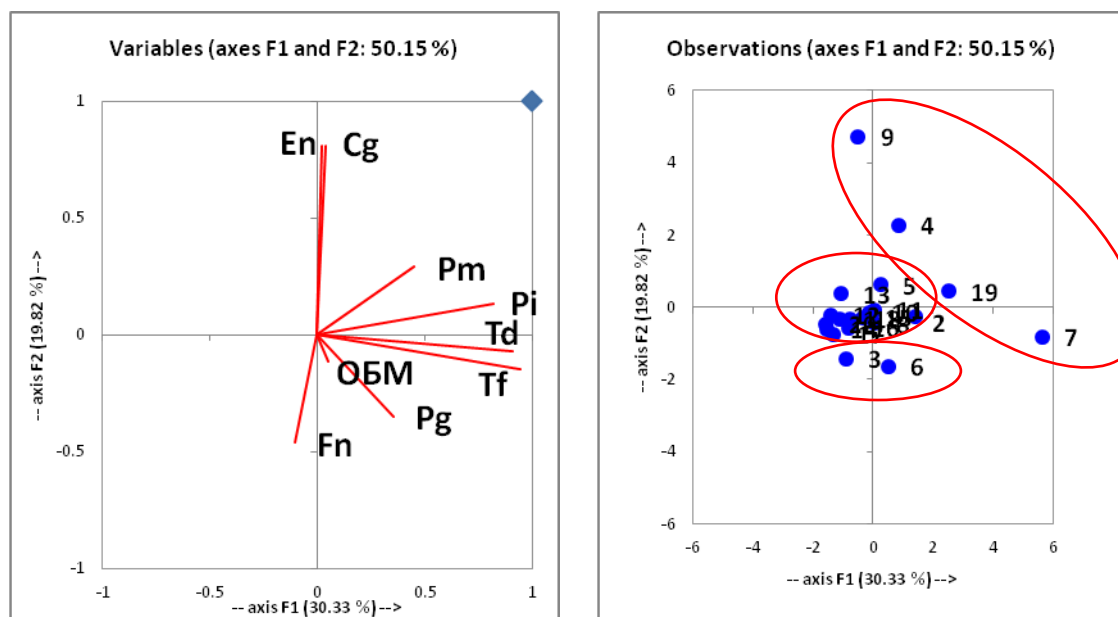
## РСА на изследваните групи бактерии

Фигура 14. Изследване на микробиологичните показатели по факториални оси: от F1 до F9.



При включване на 9 микробиологични показатели първите две аксиси включват 50,15 % от общата инертност. В този случай отново, в съответствие с изискванията на теста, са анализирани първите 2 факториални оси.

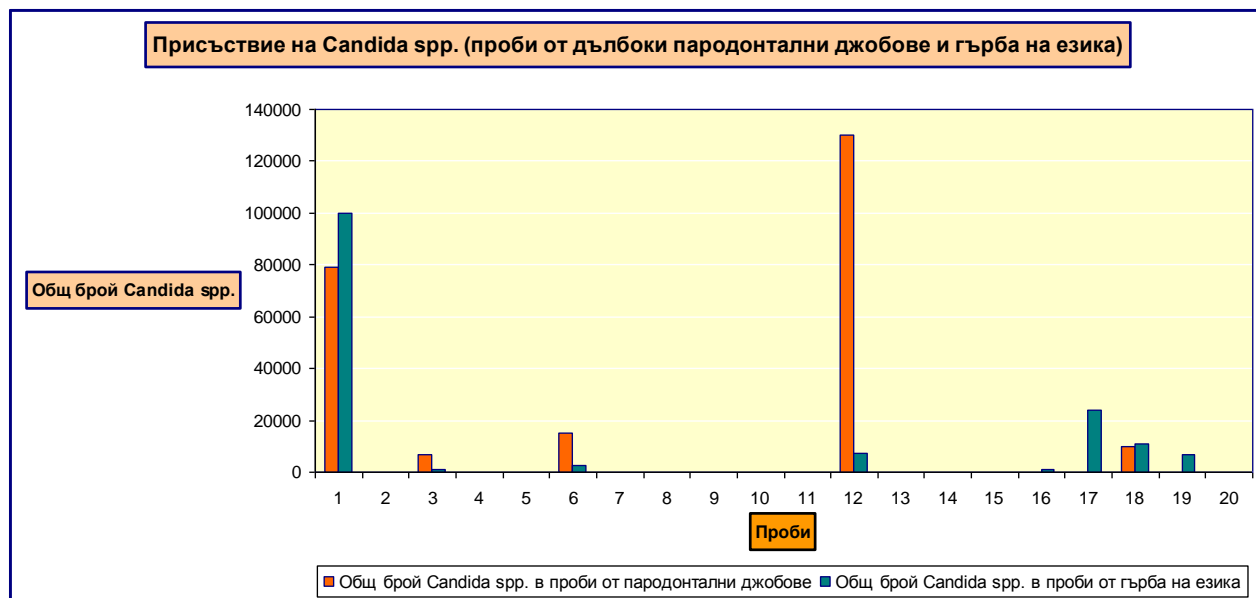
Фигури 15 и 16. Принципен компонентен анализ на микроорганизмите, включени в изследването. В изследваните пародонтални места при настоящото проучване не се установи наличието на *A. Actinomycetemcomitans*. Затова този показател не е включен в анализа.



За да бъдат разграничени пациентите и групите от пациенти в зависимост от изследвания комплекс от микробиологични показатели, бе проведен принципен компонентен анализ (РСА). Pm, Pi, Td, Tf, Pg и ОБМ (обща бактериална маса) показват добра взаимовръзка помежду си като допринасят основно за формирането на първата аксиса. Втората аксиса се формира основно на базата на En, Cg и Fn като първите два вида бактерии имат силна правопрпорционална зависимост помежду си, а Fn – обратнопропорционална спрямо останалите два.

**Резултати по под-задача 2.3.** Субгингивално и орално присъствие на *Candida albicans* при хроничен пародонтит.

Фигура 17. Установено присъствие на *Candida spp.* в дълбоките пародонтални джобове и оралната мукоза при пациенти с хроничен пародонтит.



Резултатите, получени при нашето изследване по отношение на детекцията на *Candida albicans* по орална лигавица – гърба на езика, показаха, че *C. albicans* присъства при 6 от изследваните 20 пациента с пародонтит в количество  $N \times 10^2$  до  $N \times 10^4$ ; *C. glabrata* присъства в една от взетите проби ( $N \times 10^4$ ); *C. parapsilosis* – само в една проба ( $N \times 10^3$ ). Резултатите нямат статистическа достоверност. Те са представени графично на фигура 17.

**Резултати по задача 3.** Да се оцени генната експресия на основни проинфламаторни цитокини (интерлевкин 6 (IL-6) и туморнекротизиращ фактор - алфа (TNF- $\alpha$ )) при тежък хроничен пародонтит.

Таблица 14. Сравнителен анализ на генната експресия при проби, взети от различна дълбочина, изразена като dCt (Ct (ген – Ct (референтен ген - ACTB))) на IL6 и TNF.

Показател	Дълбочина на джобовете, прилежащи на пробите от гингива									P - коефициент		
	$\leq 4$ мм			4 – 6 мм			$> 6$ мм			Paired t-test		
	n	$\bar{X}$	SD	n	$\bar{X}$	SD	n	$\bar{X}$	SD	$\leq 4$ мм / 4 – 6 мм	$\leq 4$ мм / $> 6$ мм	4 – 6 мм / $> 6$ мм
dCt (IL6)	11	14.5	2.5	10	15.9	4.2	11	16.8	3.4	0.45	<b>0.048*</b>	0.48
dCt (TNF)	16	7.3	3.6	16	7.3	2.6	16	8.6	1.8	0.94	0.11	<b>0.064**</b>

N – брой изследвани пациенти,

$\bar{X}$  - средно-аритметична стойност,

SD – стандартно отклонение

\*\* Статистически достоверните различия са подчертани (P-коефициент  $< 0.06$ )

Таблица 15. Сравнителен анализ на генната експресия при проби, взети от различна дълбочина, изразена като **ddCt** на IL6 и TNF.

Показател	Дълбочина на джобовете, прилежащи на пробите от гингива									P - коефициент		
	(1) dCt (4 – 6 мм) - dCt (≤ 4 мм)			(2) dCt (> 6 мм) - dCt (≤ 4 мм)			(3) dCt (>6 мм) - dCt (4 – 6 мм)			Paired t-test		
	n	$\bar{X}$	SD	n	$\bar{X}$	SD	n	$\bar{X}$	SD	(1) / (2)	(1) / (3)	(2) / (3)
<b>ddCT (IL6)</b>	12	2.05	5.08	10	3.2	2.0	13	0.2	4.8	0.458	0.963	0.233
<b>ddCT (TNF)</b>	17	0.25	2.39	15	1.7	2.4	17	0.98	2.6	<b>0.016*</b>	0.216	0.734

N – брой изследвани пациенти

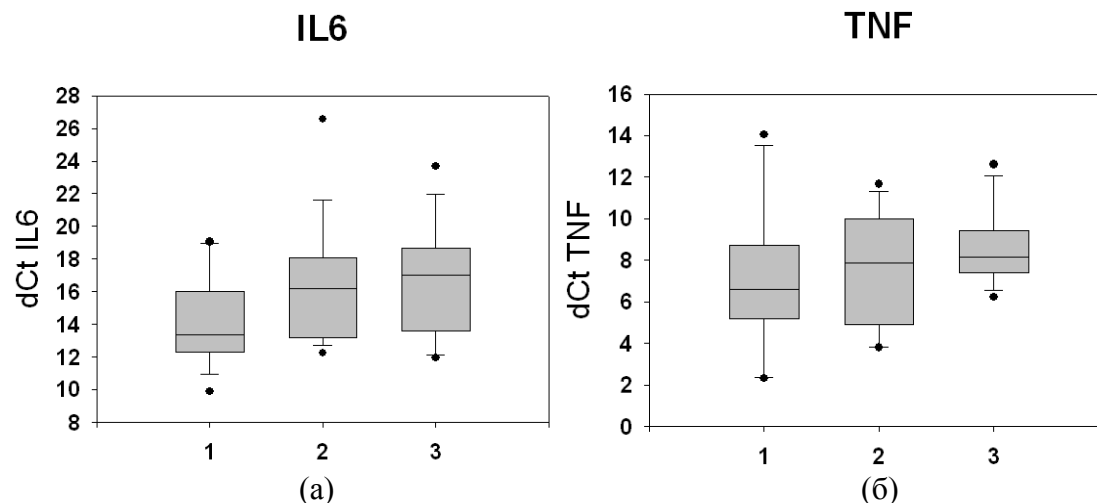
$\bar{X}$  - средно-аритметична стойност

SD – стандартно отклонение

\* Статистически достоверните различия са подчертани (P-коефициент < 0.05).

Значими различия се установяват единствено по отношение на генната експресия (изразена като ddCt) на TNF между пробите, калибрирани спрямо местата с най-малката дълбочина на джоба (PD ≤ 4 мм). (p=0,016).

Фигури 18 и 19. dCt на гените (а) IL6 и (б) TNF при (1) PD ≤ 4мм, (2) PD 4–6мм, (3) PD>6мм.



На таблица 15 са показани коефициентите на значимост на разликите в генната експресия на изследваните инфламаторни фактори във връзка с бактериалната находка и дълбочината на джоба (тежестта на пародонтита).

Таблица 15. Значими взаимовръзки между генната експресия и количествата на изследваните бактерии.

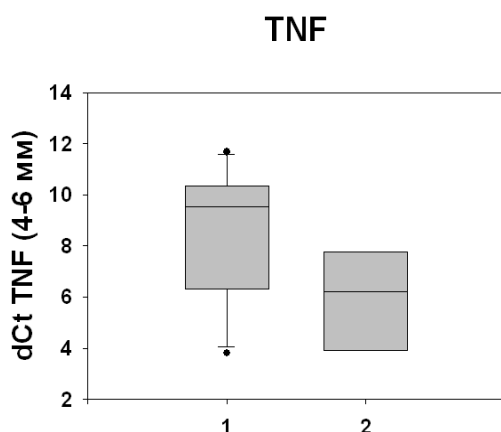
Статистически достоверна взаимовръзка между изследваните показатели		Корелационен коефициент (R)
<b>P. gingivalis 4-6mm</b>	ddCT IL6 (dCt (> 6 мм) - dCt (≤ 4 мм))	0.745
	Степен на промяна IL6 (dCt (> 6 мм) - dCt (≤ 4 мм))	-0.767
<b>T. denticola &lt;4mm</b>	dCt IL6 (> 6 мм)	0.525
	ddCT IL6 (dCt (> 6 мм) - dCt (≤ 4 мм))	0.867
	Степен на промяна IL6 (dCt (> 6 мм) - dCt (≤ 4 мм))	-0.817
<b>T. denticola 4-6mm</b>	dCt TNF (≤ 4 мм)	-0.579
	ddCT TNF (dCt (> 6 мм) - dCt (≤ 4 мм))	0.619
	Степен на промяна TNF (dCt (> 6 мм) - dCt (≤ 4 мм))	-0.557
	Степен на промяна TNF (dCt (>6 мм) - dCt (4 – 6 мм))	-0.533
<b>T. denticola &gt;6mm</b>	dCt IL6 (> 6 мм)	0.538
	dCt TNF (> 6 мм)	0.544
	ddCT IL6 (dCt (>6 мм) - dCt (4 – 6 мм))	0.566
<b>Общ брой 4-6mm</b>	Степен на промяна TNF (dCt (> 6 мм) - dCt (≤ 4 мм))	0.545
	Степен на промяна TNF (dCt (>6 мм) - dCt (4 – 6 мм))	-0.7

Показаните на таблица 15 резултати сочат, че докато количеството на *P. gingivalis* на местата с умерена дълбочина на джоба (PD 4-6 мм) и общият брой бактерии на същите места (PD 4-6 мм) корелират с промяната на генната експресия на IL6, количеството на *T. denticola* на местата с умерена дълбочина (PD 4-6 мм) корелира с генната експресия и степента на промяна на генната експресия на TNF.

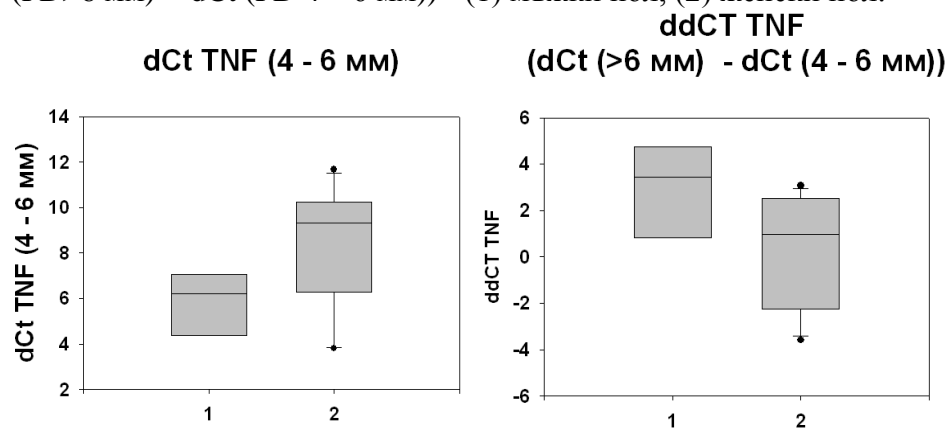
Значими различия се установяват относно генната експресия (изразена като dCt) на IL6 между пробите взети от местата с плитки и дълбоки джобове (≤ 4 мм и > 6 мм), както на TNF при местата с умерени и дълбоки джобове (4 – 6 мм / > 6 мм).

- Резултатите от изследването демонстрират значими разлики в генната експресия на TNF (dCt 4-6 мм) при двата пола. (p=0.044)
- Данните показват и статистическа достоверност на разликите в генната експресия на TNF при пациентите с места с различна тежест на пародонтита. (p=0.056)
- При жените и пациентите с умерена тежест на заболяване (загуба на аташман, дълбочина на джоба при сондиране, костна загуба) dCt на TNF се увеличава. (P-коефициент < 0.07)

Фигура 20. dCt на генната експресия на TNF при пациенти с различна тежест - (1) умерен (2) тежък.



Фигури 21 и 22. Представена е генната експресия на TNF при пациенти с различен пол при местата с умерена и голяма дълбочина на джоба: (А) dCt и (Б) ddCt (dCt (PD>6 мм) - dCt (PD 4 – 6 мм)) - (1) мъжки пол, (2) женски пол.



Резултатите показват, че има различия в генната експресия на TNF (dCt 4-6 мм) при двата пола при  $p=0.044$ . Данните показват и статистическа достоверност на разликите в генната експресия на TNF при пациентите с места с различна тежест на пародонтита. При жените и пациентите с умерена тежест на заболяване (показано на фигура 20) dCt на TNF се увеличава ( $p<0.07$ ).

На таблица 16 са показани и коефициентите на значимост на разликите в генната експресия на изследваните инфламаторни фактори във връзка с кървенето при сондиране и костната загуба (тежестта на пародонтита).

Таблица 16. Значими различия между генната експресия и параметрите BoP и Bone loss.

Статистически достоверна взаимовръзка между изследваните показатели*		Корелационен коефициент (R)
<b>BoP</b>	Степен на промяна IL6 (dCt (> 6 мм) - dCt (≤ 4 мм))	<b>-0.775</b>
	ddCT TNF (dCt (4 – 6 мм) - dCt (≤ 4 мм))	<b>0.494</b>
	ddCT TNF (dCt (> 6 мм) - dCt (≤ 4 мм))	<b>0.501</b>
<b>Bone loss mm</b>	ddCT TNF (dCt (>6 мм) - dCt (4 – 6 мм))	<b>0.526</b>
	Степен на промяна TNF (dCt (>6 мм) - dCt (4 – 6 мм))	<b>-0.568</b>

\* p<0,06

От таблица 16 се вижда, че е установена статистическа значимост между кървенето при сондиране и промяната в генните експресии от пробите при по-голяма дълбочина на джоба при сондиране спрямо по-малката дълбочина: PD>6мм спрямо PD<4мм – за интерлевкин-6; PD>6мм спрямо PD<4мм и PD 4-6мм спрямо PD<4мм – за TNF. Освен това има статистическа значимост между костната загуба и промяната в генните експресии от пробите при по-голяма дълбочина на джоба при сондиране спрямо по-малката дълбочина: PD>6мм спрямо PD<4мм и PD>6мм спрямо PD 4-6мм за TNF.

**Резултати по задача 4.** Да се оцени генният полиморфизъм на интерлевкин-6 (IL-6), тумор некротизиращ фактор - алфа (TNF-α) и лимфотоксин алфа (LT-α) при тежък хроничен пародонтит.

Проучването цели откриването на връзка между развитието и тежестта на хроничния пародонтит и присъствието на генен полиморфизъм за определени инфламаторни фактори, описани да са свързани с деструкция на пародонтален аташман. Резултатите, получени в това проучване, са обработени статистически и са представени в табличен и графичен вид.

Таблица 17. Разпределение на генотиповете за IL-6, LT-A и TNF-A при отделните групи пациенти в проведеното изследване.

Генотипове	Контролна група (здрав пародонт)		Пациент и с умерен хроничен пародонтит		Пациенти с тежък хроничен пародонтит		P-коefficient
	n	%	n	%	n	%	
<b>IL-6 (G-174C)</b>	10		12		18		
CC	2	20.0%			1	5.6%	
GC	8	80.0%	8	66.7%	8	44.4%	
GG			4	33.3%	9	50.0%	<b>0.05</b>
<b>IL-6 (G-597A)</b>							
AA	2	20.0%			1	5.6%	
GA	8	80.0%	8	66.7%	8	44.4%	
GG			4	33.3%	9	50.0%	<b>0.05</b>
<b>LT-A (A252G)</b>							
AA			7	58.3%	4	22.2%	
AG	10	100.0%	4	33.3%	12	66.7%	
GG			1	8.3%	2	11.1%	<b>0.02</b>
<b>TNF-A (G-308A)</b>							
AA					1	5.6%	
GA	7	70.0%	4	33.3%	5	27.8%	
GG	3	30.0%	8	66.7%	12	66.7%	0.20

- Процентите са сравнени чрез Chi-square тест!

#### Анализ на получените резултати:

- Сигнификантна разлика се установява при полиморфизма на LT- $\alpha$  – преваленция на генотип GG при пациентите с тежък пародонтит.
- По отношение на получените резултати за генните полиморфизми на IL-6 (G-597A) и IL-6 (G-174C) генотипове – и при двата генотипа при пациентите с тежък пародонтит се установи по-често генотип GG.

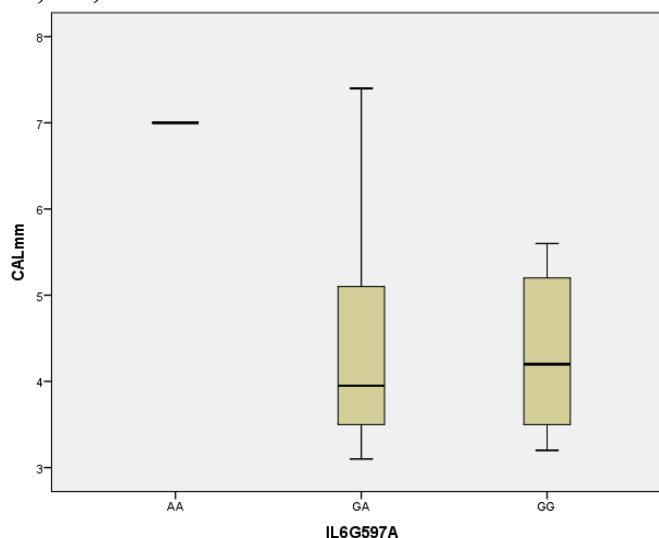
Въз основа на представените резултати може да се направят **основни обобщени изводи** за връзката на откриваните генотипове и състоянието на пародонта:

- Най-голяма обвързаност се наблюдава между генотиповете на LT-A и тежестта на пародонтита (**P = 0.02**)!
- По-слаба зависимост има между откриваните генотипове и състоянието на пародонта засяга генотиповете на IL-6.
- Връзката между IL-6 (G-174C) и IL-6 (G-597A) е изключително силна (**P<0.001**)!
- За разлика от генотиповете на LT-A и генотиповете на IL-6 при TNF-A няма статически достоверна зависимост ( $P > 0.05$ ) относно присъствието на изследваните генотипове и състоянието на пародонта.

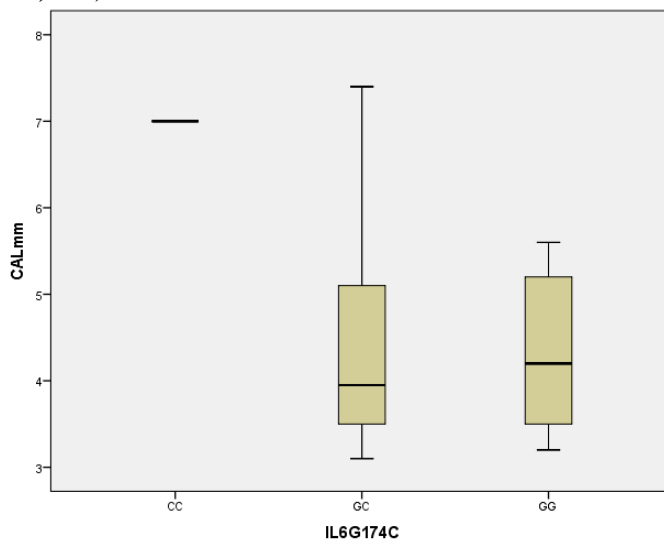
#### Установени са:

- По-високи стойности на CAL mm при присъствие на GG при LT-A (A252G) в сравнение с AG ( $p = 0,018$ ).
- По-високи стойности на CAL mm при присъствие на GG при IL-6 (G-597A) в сравнение с GA ( $p = 0,067$ ).
- По-високи стойности на CAL mm при присъствие на GG при IL-6 (G-174C) в сравнение с GC ( $p = 0,067$ ).

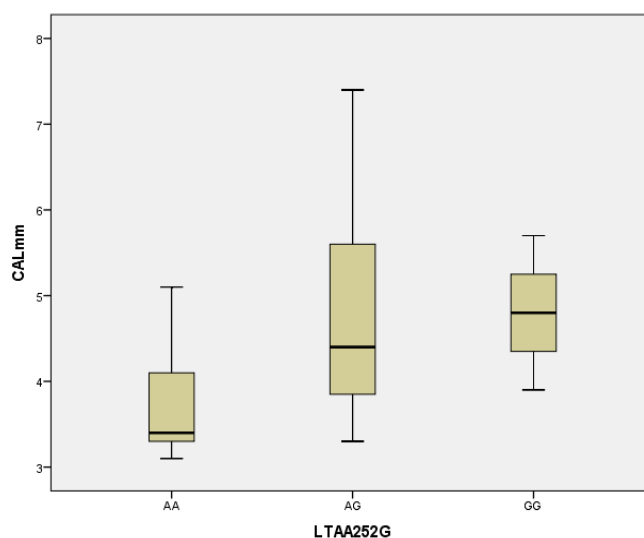
Фигура 23. IL-6 (G-174C) – По-високи стойности на CAL mm при присъствие на GG в сравнение с GC ( $p = 0,067$ ).



Фигура 24. IL-6 (G-597A) – По-високи стойности на CAL mm при присъствие на GG в сравнение с GA ( $p = 0,067$ ).



Фигура 25. LT-A (A252G) - По-високи стойности на CAL mm при присъствие на GG в сравнение с AG ( $p = 0,018$ ).



Оценката в изследването на IL-6 (G-597A) и IL-6 (G-174C), както и на TNF- $\alpha$  (G-308A) полиморфизми показва, че генотип GG се асоциира умерено с хроничния пародонтит при българските пациенти.

Като резултат от това бихме могли да предположим, че алел G може да играе важна (значима) роля в развитието и прогресията на пародонталното заболяване в тази изследваната популация.

За да проверим прогностичната стойност на изследваните показатели проведохме селекция чрез регресионен анализ - Backward Elimination.

Анализът на получените данни показва, че основният показател (генотип), чрез който може да се предскаже **тежестта на хроничния пародонтит е LT-A (A252G)** (таблица 18)! (**p=0.02**)

При разработения на базата на логистична регресия предиктивен модел е с обща точност 70%.

Таблица 18. Класификационна таблица за тежест на пародонтита.

Наблюдавани случаи	Предсказани случаи		Процент правилно предсказани
	Умерен пародонтит	Тежък пародонтит	
Умерен пародонтит	7	5	<b>58.3%</b>
Тежък пародонтит	4	14	<b>77.8%</b>
<b>Обща точност</b>			<b>70%</b>

Комбинирането на горния показател с генотиповете на другите три показателя (**IL-6 (G-174C), IL-6 (G-597A) и TNF-A (G-308A)**) не повиши общата точност на модела!

#### **Обобщение от модела:**

**Тежките пародонтити са най-често свързани с присъствието на генотип на LT-A (A252G) AG, докато по-леките са свързани с присъствието на AA!**

**Резултати по задача 5.** Да се получат данни за влиянието на рисковия фактор тютюнопушене при хроничен пародонтит.

В рамките на нашето изследване е направен анализ на връзката на тютюнопушенето като рисков фактор и тежестта на пародонтита като са използвани основни клинични параметри като дълбочината на джоба при сондиране и загубата на прикрепване.

Таблица 19. Влияние на тютюнопушенето върху дълбочина на джоба и загуба на аташман.

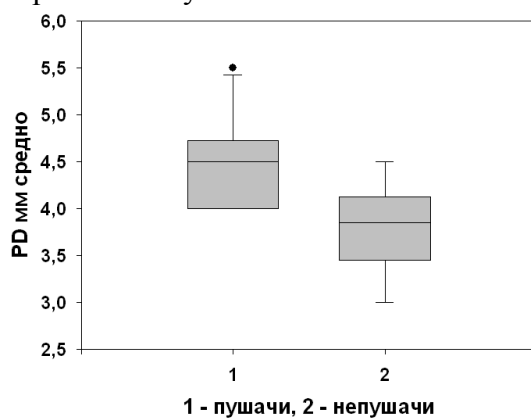
Показатели	Непушачи			Пушачи			p
	n	$\bar{X}$	SD	n	$\bar{X}$	SD	
Дълбочина на сондиране – средна ст. (mm)	10	3,57	0,72	10	4,18	0,84	<b>0,063</b>
Загуба на аташман средна стойност (mm)	10	4,06	1,14	10	4,73	1,23	0,123

От получените резултати (таблица 19) може да се заключи, че:

- Тютюнопушенето оказва влияние с гранична сигнификантност ( $p=0,063$ ) върху параметъра дълбочина на сондиране – средна ст. (mm);
- Присъствието на фактора пушене е свързано с по-високи стойности на основните изследвани параметри, свързани с тежестта на хроничния пародонтит – дълбочина на сондиране и загуба на аташман, но без да се установява статистическа значимост ( $p=0,123$ ).

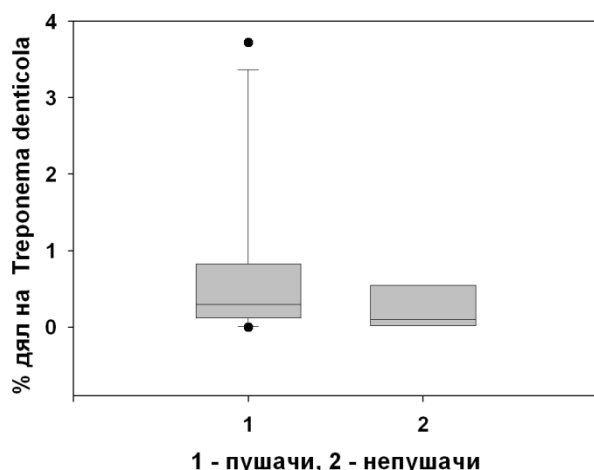
#### Достоверни разлики в зависимост от фактора тютюнопушене

Фигура 26. Графика на зависимостта между дълбочината на джоба (PD) и рисковия фактор тютюнопушене.

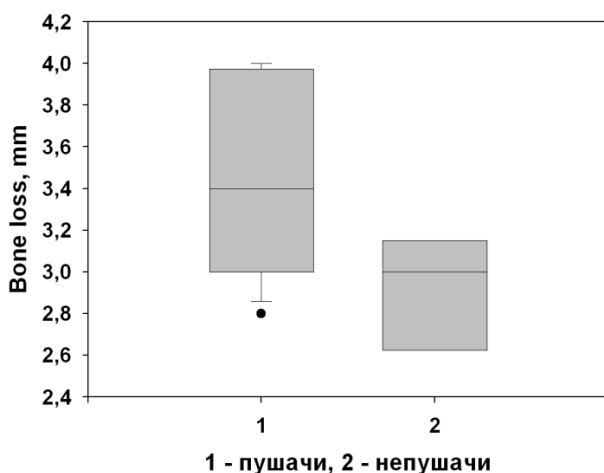


Достоверни различия се установяват относно „PD mm средна стойност” като при пушачите стойностите на дълбочината на джоба са значимо по-високи (фигура 26).

Фигура 27. Преваленция на *Treponema denticola* в дълбоките пародонтални джобове при рисковия фактор тютюнопушене.



Фигура 28. Зависимост между костната загуба (Bone loss) и рисковия фактор тютюнопушене.



Макар и с по-ниска степен на достоверност, може да приемем, че различия се наблюдават и по отношение на процентното присъствие на *Treponema denticola* ( $P = 0,9$ ) в пародонталните джобове (**микробиологичен параметър**) и загубата на **кост** (Bone loss) ( $P=0,9$ ) (фигура 27 и фигура 28). При пушачите се наблюдава по-висок процент от *Treponema denticola*, както и по-висока степен на костна загуба.

Таблица 20. Корелация между дълбочината на джоба и фактора тютюнопушене.

PD mm (средни стойности)	Показател	Корелационен коефициент (R)
	Тютюнопушене	0,648

От таблицата се вижда, че дълбочината на джоба корелира статистически достоверно с рисковия фактор тютюнопушене при изследваните пациенти с хроничен пародонтит.

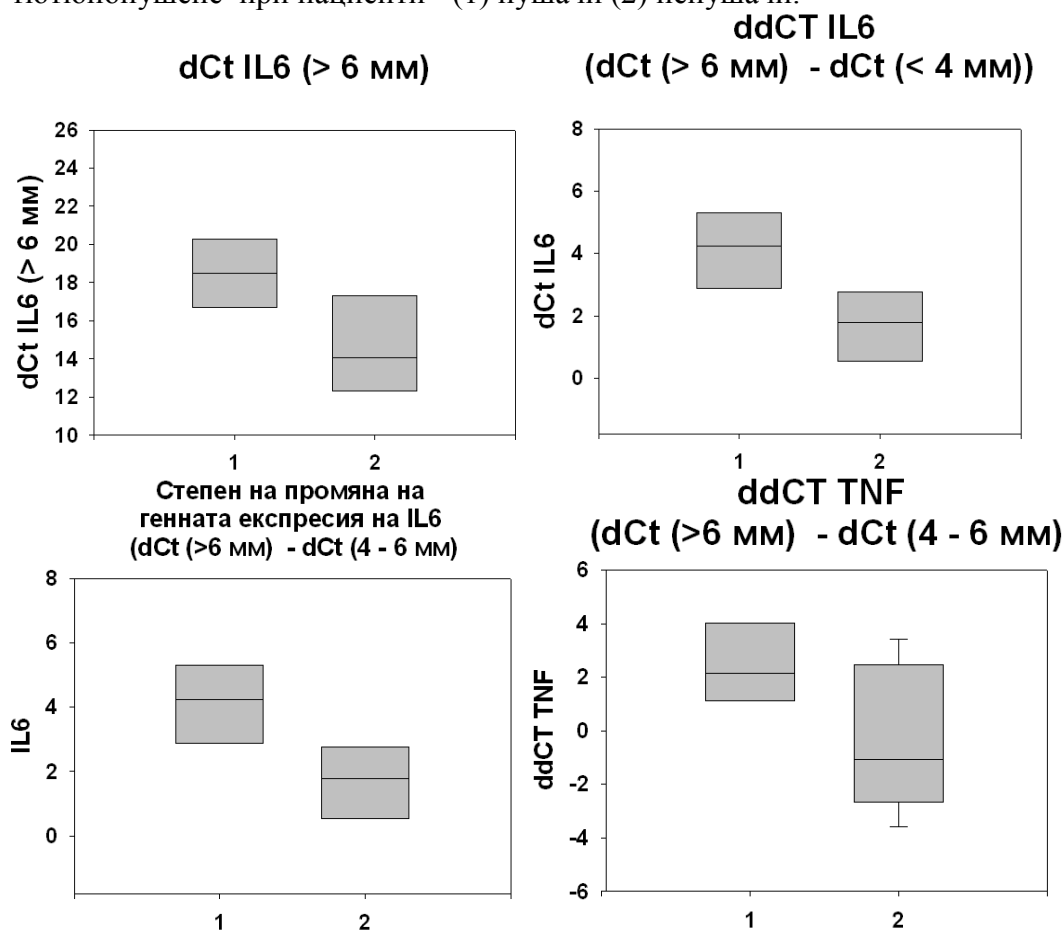
Таблица 21. Сравнение на генните експресии в зависимост от фактора тютюнопушене при пациентите с хроничен пародонтит.

Показател	P – коэффициент (t-test / Mann- Whitney U тест)	$\bar{X}$ (пушачи)	$\bar{X}$ (непушачи)
dCt IL6 ( $\leq 4$ мм)	0.870	14.1	14.3
dCt TNF ( $\leq 4$ мм)	0.885	6.9	6.5
dCt IL6 (4 – 6 мм)	0.753	16.0	16.6
dCt TNF (4 – 6 мм)	0.302	6.9	8.3
<b>dCt IL6 (&gt; 6 мм)</b>	<b><u>0.011*</u></b>	18.5	14.3
dCt TNF (> 6 мм)	<b><u>0.070</u></b>	9.4	7.8
ddCT IL6 (dCt (4 – 6 мм) - dCt ( $\leq 4$ мм))	0.563	1.15	3.0
Степен на промяна IL6 (dCt (4 – 6 мм) - dCt ( $\leq 4$ мм))	0.421	0.2	0.1
<b>ddCT IL6 (dCt (&gt; 6 мм) - dCt (<math>\leq 4</math> мм))</b>	<b><u>0.051*</u></b>	4.2	1.7
Степен на промяна IL6 (dCt (> 6 мм) - dCt ( $\leq 4$ мм))	0.226	0.1	0.2
<b>ddCT IL6 (dCt (&gt;6 мм) - dCt (4 – 6 мм))</b>	<b><u>0.018*</u></b>	3.4	-2.6
Степен на промяна IL6 (dCt (>6 мм) - dCt (4 – 6 мм))	<b><u>0.052*</u></b>	0.2	3.2
ddCT TNF (dCt (4 – 6 мм) - dCt ( $\leq 4$ мм))	0.251	-0.5	0.9
Степен на промяна TNF (dCt (4 – 6 мм) - dCt ( $\leq 4$ мм))	0.121	1.3	0.3
ddCT TNF (dCt (> 6 мм) - dCt ( $\leq 4$ мм))	0.867	2.1	1.2
Степен на промяна TNF (dCt (> 6 мм) - dCt ( $\leq 4$ мм))	0.301	0.3	0.7
<b>ddCT TNF (dCt (&gt;6 мм) - dCt (4 – 6 мм))</b>	<b><u>0.049*</u></b>	2.1	-1.1
Степен на промяна TNF (dCt (>6 мм) - dCt (4 – 6 мм))	0.152	0.2	0.5

**\*p<0.06**

Присъствието на фактора тютюнопушене се отразява статистически значимо върху генната експресия (dCt IL-6 (>6 мм)) и разликите в експресията на TNF (ddCT TNF (dCt (>6 мм) - dCt (4 – 6 мм))) и IL-6 ddCT IL6 (dCt (> 6 мм) - dCt ( $\leq 4$  мм)) ddCT IL6 (dCt (>6 мм) - dCt (4 – 6 мм)) при **p<0.06**.

Фигури 29-32. Генна експресия на ген **TNF** и промени в зависимост от фактора тютюнопушене при пациенти - (1) пушачи (2) непушачи.



Представените на фигури 29-32 данни позволяват да се заключи, че **тютюнопушенето** като рисков фактор оказва значимо влияние върху изследваните генни експресии. Присъствието на този фактор се отразява върху експресията предимно в местата с по-голяма дълбочина на джоба (PD > 6 мм), както и върху различията в експресията на IL6 и TNF между местата с голяма и умерена дълбочина (PD > 6 мм) и (PD 4-6 мм).

Данните потвърждават значим ефект на пушенето като рисков фактор върху тежестта на пародонтита.

**Резултати по задача 6.** Създаване на алгоритъм за диференциран подход в инициалната диагноза на тежкия хроничен пародонтит на базата на бактериалната находка и компоненти на отговора на организма.

Анализирайки получените резултати в настоящото изследване и съобразявайки се със съвременните схващания за лечението на тежките пародонтити, предлагаме следната схема за алгоритъм:

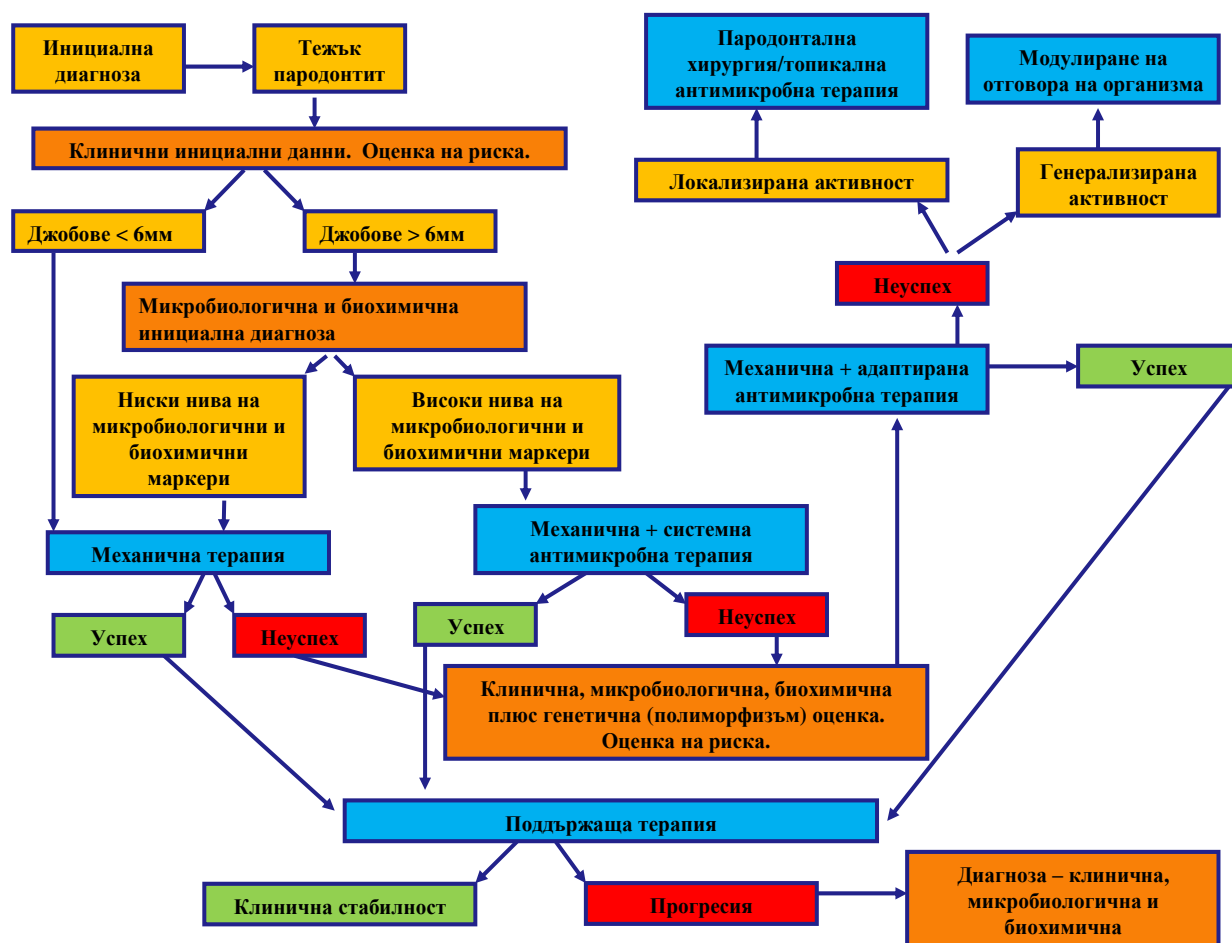


Схема 2. Алгоритъм на подход при лечението на тежък хроничен пародонтит.

При микробиологични и биохимични показатели за стабилност терапията се оценява като успешна и лечението може да продължи с поддържаща фаза. Намалената експресия на свързаните с имунния отговор и възпалението цитокини може да означава, че пародонталната терапия води до намаляване интензитета на микробното дразнене, което от своя страна води и до намалена стимулация на възпалението и имунния отговор.

Редуцираната експресия на интерлевкини може да се дължи на по-добрата регулация на отговора на организма в резултат на редуцираните нива на вирулентните микроорганизми. Данни от генетичните изследвания могат да потвърдят или отхвърлят генетична предиспозиция за продукция на възпалителни фактори и така да помогнат в планиране на следваща терапия.

На базата на данни за неуспех в разрешаването на присъствието на дълбоки пародонтални места (джоб>6мм или джобове>6мм) и данни за високи нива на субгингивални пародонтопатогени, високи нива на инфламаторни фактори и генен полиморфизъм се препоръчват и допълнителни стратегии при лечението на тежкия хроничен пародонтит – таргетна антиинфекциозна терапия, пародонтална хирургия, модулиране отговора на организма.

## ОБСЪЖДАНЕ

**Обсъждане по задача 1.** Да се проведе скрининг на пациенти за сформирани на подходящи за проучването групи с диагноза хроничен пародонтит.

Литературата и клиничната практика сочат хроничния пародонтит за най-често срещания пародонтит, чиято преваленция и тежест се увеличават с възрастта. Заболяването може да засегне различен брой зъби, да прогресира неравномерно и в напредналите стадии води до загуба на зъбите. Диагнозата хроничен пародонтит сега основно се поставя на базата на клиничното изследване за присъствие на гингивално възпаление, пародонтални джобове и загуба на аташман, и се потвърждава от рентгенографските доказателства за костна загуба.

Клинично хроничните пародонтити се характеризират с гингивално възпаление - промени в цвета (зачервяване), контура (оточност) и консистенцията на гингивата, но също и кървене при сондиране в пародонталния джоб, загуба на прикрепване. Може да присъстват също и гингивална хиперплазия и/или ретракция на гингивата.

**Диагнозата** при пациентите с пародонтит цели не само установяването на тъканната деструкция, но и нейния обхват и тежест – броя на засегнатите пародонтални места и обема на загубен аташман и алвеоларна кост. **Измерванията** с пародонтална сонда се извършват във всички области на съзъбието и за всички зъбни повърхности – вестибуларна, орална, медиална, дистална, съобразно съвременната парадигма за място-специфичната деструкция на пародонта при пародонтит.

На базата на клиничните характеристики на пародонтита са създадени индексни системи за оценка на гингивалния и пародонтален статус. Детайлното определяне на степента на развитие на възпалителната гингивална лезия е обект на хистологично изследване. В клиничната практика приетият критерий за оценка на наличие на възпаление, както и за определяне на неговата тежест, е симптома „кървене при сондиране”. Присъствието на кървене от дъното на джоба се смята за сигурен знак за присъствието на възпаление с всички познати хистологични характеристики. **Диагнозата на базата на кървене** в пародонталния джоб след лечение може да е индикатор за ефективността на приложената терапия, ориентир за рефрактерност или рецидив.

От съществена важност в диагнозата на пародонтита с цел планиране на адекватна терапия е определяне тежестта на заболяването. В съвременната литература са приети основни критерии за тежестта на пародонтита, които се определят чрез клинични и рентгенографски изследвания – загуба на аташман и загуба на кост.

Във връзка с това съществуват различни схеми за определяне на **тежестта на пародонтита**. В недалечното минало беше позната системата, при която лекия пародонтит се характеризира с костна загуба в коронарната 1/3 на корена; умерения – в средната трета и тежкия – в апикалната 1/3 на корена на зъба, която не е загубила своята валидност.

---

Забележка: В автореферата номерата на цитираните заглавия съответстват на номерата в дисертационния труд.

От 1999г. е приета съвременната класификация на пародонталните заболявания на „ААР“ (American Academy of Periodontology), която определя тежестта на хроничния пародонтит на базата на загубата на клиничен аташман (CAL) по следния начин:

- Лек - 1–2 мм средна загуба на аташман (CAL);
- Умерен - 3 - 4 мм средна загуба на аташман (CAL);
- Тежък - 5 мм средна загуба на аташман (CAL).

**Диагнозата на тежестта** на хроничния пародонтит съобразява и други показатели като: костната загуба, дълбочината на пародонталните джобове при сондиране, засягането на фуркациите, подвижността на зъбите. Кървенето при сондиране е сензитивен метод за активност на гингивалното възпаление, но не се смята за толкова добър предиктор на прогресията на заболяването колкото например супурацията. Но от друга страна – липсата на кървене при сондиране се приема като индикатор за стабилизиране на пародонтита. Прецизната диагноза на тежестта на пародонтита изисква включването на всички критерии.

В хода на пародонталното заболяване загубата на аташман обикновено е свързана с присъствието на пародонтални джобове. **Дълбочината на пародонталния джоб** в инициалната диагноза е основен критерий за определяне на прогнозата и избора на лечебен подход. Днес се отдава значение и на специфичната архитектура на пародонталния джоб, морфологията на костните дефекти, както и на присъстващата бактериална флора. Така например пародонталният джоб може да се разгледа като пространство, съставено от: една апикална част (епителното и съединителнотъканно прикрепване), една мека стена (епитела на джоба повече или по-малко улцериран), една твърда стена (корена на зъба с контаминиран цемент, биофилм и зъбен камък), и отворен към оралната среда. Дълбочината на джоба при сондиране се измерва с дистанцията между гингивалния ръб и позицията на върха на градуирана пародонтална сонда (която трябва да е в дъното на джоба). Пародонталният джоб е изпълнен с гингивална течност, адхерирани и не-адхерирани бактерии, вируси, паразити, гъбички, поломорфонуклеарни неутрофили и епителни клетки и е обект на микробиологична и биохимична диагноза.

Сложната характеристика на пародонталния джоб и факторите, свързани с локалното определяне на актуалната пародонтална загуба, както и прогнозата на всяко място и общо на заболяването, както и предикцията на прогресията, изисква получаване на информация, по-широка в сравнение само с регистрация на вече настъпилата загуба. Съобразяването само на дълбочината на джоба, която освен това често е резултат на свръхизмерване, тъй като при възпаление пародонталната сонда пенетрира през свързващия епител, супракресталните фибри и дори пародонталния лигамент, е недостатъчно за пълно интерпретиране на пародонталния статус на пациента (32). Трябва да подчертаем обаче съществената роля на дълбочината на джоба при сондиране при дефинирането на тежестта на пародонтита, особено когато нашият основен критерий – загубата на аташман не може да се определи. Това е често явление особено при напредналите пародонтити, където по различни причини позицията на емайло-циментовата граница не може да се установи с точност. При това логично е да разглеждаме умерено дълбоките и дълбоките пародонтални джобове като източник на инфекцията, която се поддържа, и да приемаме присъствието им за значимо за тежестта на хроничния пародонтит.

Идентифицирането на микробния състав на пародонталния джоб може да послужи за откриване на предразположените към инфекция места при пациентите с пародонтит. По този начин би могло да се направи оценка на риска от прогресия и да

се използват резултатите от микробиологичния анализ за предикцията на рисковите места. Активно се търсят бактериални маркери в местата с персистираща прогресия на деструкцията и случаите на незадовоителен отговор към терапията.

Причините за прогресията и рецидива на пародонталната деструкция биха могли да бъдат както пропуски в пародонталната поддържаща терапия, така и повторното свръхрастване на вирулентни патогенни бактерии, които колонизират не само пародонталните джобове, но също и гърба на езика, оралната мукоза и тонзилите. В случаите на тежките пародонтити и пародонтитите с лош отговор към проведената терапия микробната идентификация цели да определи бактериалния рисков профил на пародонтита и да подобри ефикасността на пародонталното лечение. Това би било полезно за ограничаване на неконтролируемото назначаване на широкоспектърни антибиотици в ежедневната практика. Лекарите по дентална медицина би трябвало да селектират пациентите за микробиологичните изследвания, а това са пациенти с тежък пародонтит, агресивен и рефрактерен, рецидив, място-специфична активност (когато прогресират загубата на аташман и дълбочината на джоба, при персистиращо кървене при сондиране и супурация). Показаната връзка между пародонталните патогени и активността на пародонталното заболяване служи за основа на решенията за прилагане на микробиологичните тестове в клиничната практика (126).

**Загубата на аташман** се определя чрез градуирана пародонтална сонда като дистанцията между цемента-емайловата граница и дъното на джоба (свързващия епител) в мм. Това е параметър с голяма значимост за определяне тежестта на пародонтита и/или стабилността на пародонталния статус след лечение или прогресията на заболяването.

В популацията варират формите на пародонтит, които показват и различия в степените на прогресия на заболяванията във времето. На съвременното ниво на познанието **регистрирането на прогресията** на пародонтита, особено на малка прогресия, е проблем за клинициста. Персистиращото кървене от джоба може да е свързано с локална прогресия. За сигурен критерий на прогресия на пародонтита се приема **допълнителната загуба на аташман** – локализирана или генерализирана, с който критерий всъщност се осъществява късна диагноза като се имат предвид и несвършенствата на сондирането с ръчни пародонтални сонди. Загуба на аташман минимум 2мм за една година се приема за индикатор за прогресия на заболяването.

Изследванията на нелекувани индивиди за по-дълги интервали от време показват прогресиране на пародонтита, изразено като **0.05-0.3мм** загуба на аташман/година (прогресивен модел). Когато популацията се изследва в по-къси интервали от време индивидуалните места демонстрират и къси фази за загуба на прикрепване, редуващи се с периоди без активност на заболяването (с прекъсване и ремисии). От съвременна гледна точка и двата типа прогресия може да се разглеждат като манифестация на един и същи феномен – някои места бележат подобрене, докато други – прогресират, по т. нар. цикличен модел. Пациентите с хроничен пародонтит обикновено показват слаба прогресия на загубата на аташман и костната загуба. В някои случаи обаче се установява по-бърза загуба, която може да е свързана с присъствие на локални фактори – неблагоприятна анатомия на зъбите, позиция, които стават също фактор за прогресията. Други фактори – тютюнопушене, диабет, генетичен профил с увеличена продукция на инфламаторни цитокини, също играят основна роля за по-бързите деструктивни процеси в пародонта. Идентифицирането на някои от тези фактори е необходимо в диагнозата на предикцията и контрола на прогресията на хроничния пародонтит.

При напредване на пародонтита в областта на многокореновите зъби, деструктивният процес може да обхване и областта на фуркацията. Точното определяне на присъствието и размера на загубата на пародонтална поддръжка във фуркационната област има значимо отношение към прецизната диагноза и коректния лечебен план, както и определя в значителна степен прогнозата на заболяването.

**Прогнозата** се дефинира като предвиждане на хода, продължителността и резултата от протичане на заболяването на базата на познанията за етиологията и патогенезата на пародонталните заболявания и присъствието на индивидуални рискови фактори.

Известни са факторите при определяне на прогнозата на пародонтита: загуба на аташман, костна загуба, дълбочина на пародонталните джобове, тип на костната загуба и др. От тях дълбочината на пародонталните джобове се приема с по-ниска стойност като значимост в сравнение с определянето на загубата на аташман тъй като сама по себе си дълбочината може да е свързана само с промени в меките тъкани. В литературата е прието становището, че зъбите с по-дълбоки джобове, но с малка загуба на аташман и малка костна загуба имат по-добра прогноза в сравнение със зъби с плитки джобове и голяма загуба на кост и аташман. Въпреки това се обсъжда и мнението, че по-дълбоките джобове могат да са източник за ре-инфекция и да са свързани с прогресиране на заболяването.

Характеристиката на морфологията на костната загуба е необходима в инициалната диагноза на пародонтита. Хоризонталната костна загуба не е задължително свързана с добрата прогноза на заболяването. Така например ангуларните костни дефекти с по-голям брой запазени костни стени и благоприятен костен контур биха могли да реагират добре на регенеративната пародонтална терапия и така да се спечели пародонтална поддръжка, а при супраосалните костни джобове регенеративна терапия не е индицирана и подобряването на височината на интерденталната кост не е постижимо.

Възрастта има също значение при определяне на прогнозата на заболяването. При пациентите в по-млада възраст прогнозата е по-лоша в сравнение с по-възрастните заради по-краткия интервал на изявата и прогресията на пародонтита.

Трябва да подчертаем, че използваните в настоящото проучване материали, клинични критерии и методи са съобразени със съвременното становище в диагнозата на хроничния пародонтит. През 2015г. ААР публикува осъвременената си концепция за класификацията на пародонталните заболявания на базата на класификацията от 1999г. Тя потвърждава схващането за хроничния пародонтит като инфекциозно заболяване, характеризиращо се с различен обхват и тежест, с възпаление в поддържащите зъбите тъкани, кървене при сондиране, >3мм дълбочина на пародонталния джоб при установени загуба на аташман и рентгенографска костна загуба (14).

## **Обсъждане по задача 2.**

**Обсъждане по под-задача 2.1.** Основни пародонтопатогени при пародонтални джобове с различна дълбочина (*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*) във връзка с тежестта на пародонтита.

Голямото разпространение и социалната значимост на хроничния пародонтит поставят това пародонтално заболяване в центъра на интересите на проучванията в последните няколко десетилетия. С особена значимост са изследванията, свързани с изясняване на присъствието и нивата на пародонтопатогените в пародонталната среда,

резултатите от които да добавят информация за инфекциозната етиология на хроничния пародонтит, да подобрят диагнозата на тежките и прогресиращи случаи на хроничен пародонтит и да предоставят критерии за успешна пародонтална терапия. Има литературни данни за високи нива на познати пародонтопатогени в дълбоките пародонтални джобове, които се свързват с напредналата загуба на аташман и кост, както и се оценяват като източник на инфекция за останалите пародонтални места (33,154,174,177,182).

Получените данни от изследваните пациенти показват, че при пациентите с тежък хроничен пародонтит средната измерена дълбочина на джоба при сондиране е **4,2мм**, а на представената хистограма (фигура 4 в приложение 4) се вижда, че преобладаващата част от пациентите имат средна дълбочина на сондиране, близка повече до **5мм**.

Проведеният регресионен анализ установи наличие на зависимост ( $p < 0.001$ ,  $R^2 = 0.729$ ) между костната загуба и пародонтални места с дълбочина на сондиране  $> 6$  mm. Зависимостта има право-пропорционален характер, като увеличението на PD\_GT\_6mm с 1% води до средностатистическо увеличение на Bone loss с около 0,12 mm (фигура 6, стр.20).

Клиничните характеристики на пародонтита като загуба на аташман, дълбочина на джоба при сондиране и кървене при сондиране, имат известни ограничения при оценката на прогнозата на заболяването. Въпреки това литературни данни показват, че дълбоките места представляват по-голям риск за прогресия в сравнение с плитките места, както при лекувани, така и при нелекувани пациенти (60). Клинични изследвания все пак демонстрират, че измерената дълбочина на джоба при сондиране не може категорично да се използва за истински точен предиктор на бъдеща прогресия на пародонтита (60). Ето защо се търсят допълнителни маркери за предикция на прогресията на пародонтита като присъствието и нивата на пародонтални патогени, както и нивата на генната експресия на цитокините.

Сравняването на дълбоките и плитките места показва, че дълбоките пародонтални джобове се характеризират с по-голямо разпространение на кървенето при сондиране, увеличени нива на пародонтални патогени, по-слаба ефективност на орално-хигиенните процедури и на професионалното инструментирание, насочени към отстраняване на субгингивалния биофилм и обработката на кореновите повърхности (60,65,66,138,155,183).

В настоящото изследване единият от фокусите е връзката на дълбочината на джоба при сондиране с присъствието на патогенни бактериалните видове. Получените резултати за количественото представяне на изследваните пародонтални патогени: *T. denticola* и *P. gingivalis*, е в съгласие с данните от литературата, които показват увеличаване нивата на патогенните микроорганизми при пародонтит паралелно с увеличаването на дълбочината на джоба (61a,64,137,157,181).

При проведеното от нас проучване установихме *P. gingivalis* (фигура 33) и *T. denticola* (фигура 34) в по-големи количества в по-дълбоките пародонтални джобове на пациенти с хроничен пародонтит. Изследваните микроорганизми се откриват и в плитките пародонтални джобове (до 4мм) при пациентите с хроничен пародонтит, но в значително по-малки количества. Установена е ясна тенденция на повишаване на нивата при джобовете с дълбочина 4-6мм, която продължава при джобовете над 6мм, като същото се наблюдава и по отношение на общия брой пародонтопатогени / проба (таблица 22). Като цяло в нашето проучване *T. denticola* и *P. gingivalis* бяха установени в голям процент от взетите субгингивалните проби от джобове с различна дълбочина (*P. gingivalis* - в 95,8%; *T. denticola* - в 98,2%).

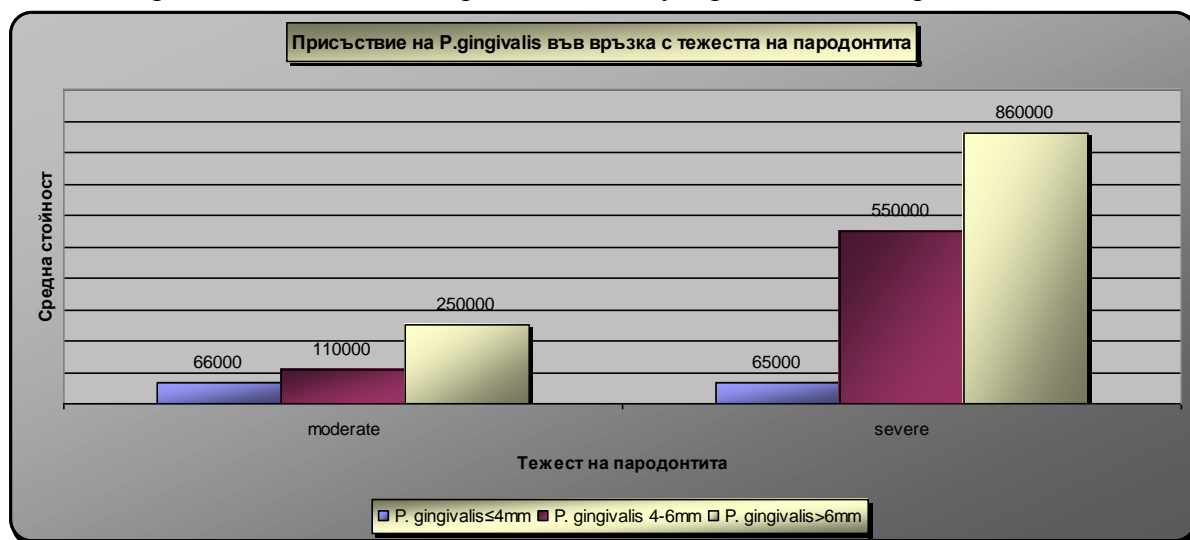
Таблица 22. Нива на пародонталните патогени в пародонтални джобове с различна дълбочина.

Пародонтални джобове	МО	<i>P. gingivalis</i>	<i>T. denticola</i>
плитки		$7,4 \times 10^4$	$5,9 \times 10^4$
средно дълбоки		$3,4 \times 10^5$	$1,6 \times 10^5$
дълбоки		$5,3 \times 10^5$	$7,4 \times 10^5$

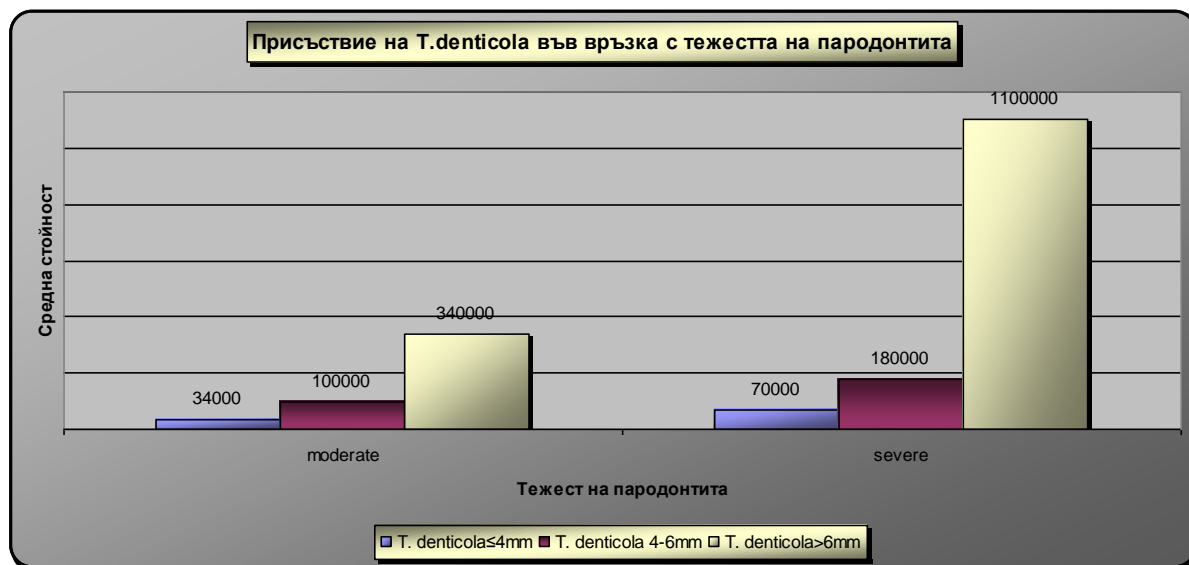
Тези патогени са тясно свързани с умерените и дълбоки пародонтални места, но те също така присъстват в по-ниски нива и в плитките пародонтални джобове. Вероятно тези патогени могат да съществуват в малки количества дори в плитките пародонтални места, да пролиферират в резултат на възпалителния процес, и да се размножават в благоприятна за тях среда с достатъчно налични хранителни вещества и на фона на нарушения интегритет на епителните клетки. Знае се, че в дълбоките пародонтални джобове тези условия са по-благоприятни за бактериите. Това може до известна степен да обясни по-високи нива на откритите пародонтопатогени в поддълбоките пародонтални джобове.

Данните са в съгласие с твърденията на други автори, че тези два патогенни микроорганизма, откривани във високи нива в дълбоки джобове, имат съществена роля в иницирането и/или разгръщането на патогенезата при пародонталните заболявания. Едно логично обяснение за присъствието им в плитките пародонтални места е вероятното инфектиране на тези места от пародонтопатогените от налични поддълбоки места, както и от други известни потенциални резервоари (като напр. тонзилите или гърба на езика) (64,137,157,181).

Фигура 33. Резултати за присъствието на *P.gingivalis* в плитки, средно дълбоки и дълбоки пародонтални джобове при пациенти с умерен и тежък пародонтит.



Фигура 34. Резултати за присъствието на *T.denticola* в плитки, средно дълбоки и дълбоки пародонтални джобове при пациенти с умерен и тежък пародонтит.



Получените резултати (фигури 33 и 34) категорично показват връзката между микробната находка и дълбочината на пародонталните джобове като критерий за тежестта на пародонтита. Количеството на изследваните микроорганизми прогресивно нараства с измерването на по-голяма дълбочина на сондиране както при пациентите с умерен пародонтит, така и при пациентите с тежък пародонтит. Данните ясно демонстрират висшко степен на положителни корелации между присъствието на *P. gingivalis* и *T. denticola* и тежестта на хроничния пародонтит. Те внушават значима роля на изследваните микроорганизми в иницирането и прогресията на пародонталната лезия.

Има данни, че широк спектър от предимно Грам-негативни бактерии и спирохети като: *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Tannerella forsythia*, *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, *Eikenella corrodens*, *Prevotella intermedia*, са позитивно асоциирани с тежестта и прогресията на пародонтита (23). Едновременно присъствие на *P.gingivalis*, *T.forsythia* и *T.denticola* се открива по-често в субгингивалната плака от места с пародонтална заболяване (голяма дълбочина на джоба, присъствие на кървене при сондиране) в сравнение със здрави места. Находката може да рефлектира в протокол на клинично поведение за прецизна диагноза при хроничен пародонтит. Основните клинични ситуации, когато се препоръчват бактериологичните изследвания са при тежки пародонтити, недобър резултат от инициалната терапия, рецидиви, пародонтити, асоциирани с общи патологии (34).

Присъствието на някои патогени позволява да се прецени еволюцията на пародонталните лезии (*P. gingivalis*). Едновременното присъствие на дадени бактериални видове (*A. actinomycetemcomitans*, *P.gingivalis*, *Pr.intermedia*, *T. forsythia*, *T.denticola*) може да потенцира тяхната вирулентност и да ускори процеса на деструкция на пародонталните тъкани. Присъствието на *P.gingivalis*, *T. forsythia* и *T.denticola* едновременно показва симбиотична колонизация с трите таргетни вида и се приема като индикатор за риск от прогресия на пародонтита (23,34,61a,171a).

Получените данни при изпълнението на под-задача 2.1. ясно показват значимостта на клиничните показатели за тежестта на пародонтите, както и на детекцията на пародонталните патогени *Porphyromonas gingivalis* и *Treponema*

*denticola* и на общия брой микроорганизми в развитието на пародонтита. Те също така потвърждават категорично събраните литературни данни за здрави синергични взаимовръзки между микроорганизмите от червения комплекс на Socransky. Едновременното им присъствие в пробите от пародонталните джобове се обсъжда и като рисков фактор за очакван лош отговор към бъдещото нехирургично лечение (117,157,175,182).

**Обсъждане по под-задача 2.2.** Пълен пародонтопатогенен спектър при дълбоки пародонтални джобове (9 контролни щама: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, *Tannerella forsythia*, *Prevotella intermedia*, *Peptostreptococcus* /*Micromonas*/ *micros*, *Fusobacterium nucleatum*, *Eubacterium nodatum*, *Capnocytophaga gingivalis*) във връзка с тежестта на пародонтита

Литературните данни свидетелстват за присъствието на определени Грам-отрицателни анаеробни микроорганизми в субгингивалното пространство при пациенти с хроничен пародонтит (23,23а,50,64,69,77). Обсъжда се широко ролята им във връзка с тежестта на пародонтита, както и участието им в процесите на прогресиращата деструкция на меките тъкани и костта (28,35,42).

При проведеното от нас изследване общият брой микроорганизми показва значима правопрпорционална зависимост единствено с *Tannerella forsythia* ( $R=0,46$ ) и по-силна обратнопропорционална взаимовръзка с процентния дял на *Porphyromonas gingivalis* ( $R=-0,71$ ) и *Peptostreptococcus micros* ( $R=-0,60$ ). Т.е. При пациенти с малък общ брой микроорганизми се наблюдава малък брой на *Tannerella forsythia* и увеличен процентен дял на *Porphyromonas gingivalis* и *Peptostreptococcus micros*.

В настоящото проучване бяха установени значими взаимовръзки между количествата на изследваните видове бактерии при проведен рангов корелационен анализ (Spearman): положителни корелации между *Treponema denticola*, *Tannerella forsythia*, *Prevotella intermedia*, *Peptostreptococcus* от една страна и между *Eubacterium nodatum*, *Capnocytophaga gingivalis* от друга, а отрицателна корелация –между *Eubacterium nodatum* и *Fusobacterium nucleatum*.

Както е показано от Hamlet et al. 2001г. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* проявява различно поведение в сравнение с останалите патогени и е детектиран с пониска честота в дълбоките пародонтални джобове (69). Това би могло да бъде обяснено с факта, че този патогенен микроорганизъм е факултативен анаероб. При нашите изследвания не установихме присъствието на този микроорганизъм в субгинагивалните проби при хроничен пародонтит. Това още веднъж потвърждава данните от литературата тъй като присъствието на Аа се свързва силно с агресивните пародонтити и по-специално локализирания ювенилен пародонтит и не е откриван често при хроничен пародонтит.

Резултатите от настоящето изследване във връзка с изпълнението на задачата отново силно потвърждават данните от реферираната литература за присъствието на определени пародонтопатогени в субгингивалното пространство при хроничен пародонтит (23а,35,63,77,97,155,179).

Дълбоките пародонтални джобове се определят като по-благоприятна среда за развитие на анаеробните микроорганизми и следователно може да се очаква тези патогени да присъстват в по-големи количества в местата с по-голяма дълбочина на сондиране. При изследването си Farias et al. 2012г. съобщават, че в местата с дълбочина на джоба при сондиране >8мм е установена по-висока честота на откриване на комбинацията от *Tf* и *Pg*, и *Tf*, *Td* и *Pg* (50). Това още веднъж потвърждава строгата

асоциация на хроничния пародонтит и бактериите от червения комплекс, показано от Socransky et al. 1998г. и Hamlet et al. 2001г. (69,157). Известно е изследването на Socransky et al. 2000г. във връзка с нивата на пародонтални патогени при пациенти с пародонтит, асоциирани с полиморфизъм на интерлевкин-1 $\beta$ . Средният бактериален товар е установено да се променя сигнификантно в зависимост от различните категории пародонтални джобове (>4мм; 4-6мм и >6мм) с най-високи стойности за всеки бактериален вид в най-дълбоките пародонтални джобове. Авторите отново категорично определят асоциацията на трите детектирани микроорганизма: *Pg*, *Tf* и *Td* и внушават участието им в патогенезата на пародонтита.

В изследването си Zambon също показва строга асоциация между *Pg* и *Tf* от една страна, и от друга – между тези микроорганизми и патогенезата на пародонтита като определя присъствието им за признак за загуба на пародонтални тъкани и тежка костна резорбция (183). Едновременното присъствие на тези микроорганизми в дълбоките пародонтални места внушава разгръщането на симбиотични взаимоотношения между вирулентните видове, което води до бъдеща прогресия на пародонталното заболяване (72,183).

Прилагането на микробиологичните тестове следва да е насочено към оформянето на по-верен лечебен план на базата на получената информация. Rapanou et al. внушават, че микробния състав на пародонталния джоб е детерминант от генната експресия в гингивалната тъкан и би могло да служи за идентификация на по-податливите или предразположени места на основата на персистиращата прогресия или незадоволителен отговор към лечението (126).

Основна причина за загуба на зъбите в нашето съвремие е пародонтитът. Превенцията на пародонтита е неделима част от общото и оралното здраве. Повечето пациенти имат добър отговор към конвенционалното пародонтално лечение и субгингивалното инструментирание заедно с качествен персонален плаков контрол е най-адекватния избор в инициалната терапия на умерените и леките по тежест хронични пародонтити. При някои пациенти обаче сме свидетели на продължаваща активност на възпалението и лош отговор въпреки полжените усилия и от пациента, и от клинициста.

**В заключение** трябва да подчертаем, че микробиологичният анализ не бива да се приема като част от рутинното първоначално изследване на пациентите с пародонтит. Добре би било този тип анализ да се адаптира към по-специфичните клинични ситуации, в които да се потърси определен микробен профил във връзка с клиничните и рентгенографски характеристики с цел таргетна и ефективна антимикробна терапия.

### **Обсъждане по под-задача 2.3.** Субгингивално и орално присъствие на *Candida albicans* при хроничен пародонтит.

Изследванията върху микробния състав на субгингивалната плака показват присъствието на много бактериални видове, но относително малък брой патогенни микроорганизми са асоциирани силно с хроничния пародонтит (*Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, *Tannerella forsythia* и др.). Увеличените им нива са важен параметър при оценяването им като пародонтопатогени (63,64,68,82,127,154). Автори се опитват да свържат и присъствието на други бактериални видове при хроничния пародонти, за които няма категорични доказателства, че участват в иницирането и прогресията на заболяването (22,30,107,142,176). Откриването в субгингивалната плака при пациенти с пародонтит на такива видове с неизяснена роля и съвременната концепция за пародонтита като заболяване с полимикробна смесена инфекция биха могли да обяснят случаи на лош отговор към проведената

конвенционална терапия в клиничната практика. Тъй като в литературата се обсъжда присъствието и значимостта на *Candida* инфекцията в оралната среда при пациенти с пародонтит, се насочихме към изследване на присъствието и нивата на *Candida spp.* в дълбоки пародонтални джобове и по оралната мукоза при пациенти с хроничен пародонтит.

В настоящото проучване не беше установено да съществува корелация на *Candida spp.* с клиничната експресия на пародонтита. Въпреки че резултатите не са статистически значими в случаите с хронични пародонтити при системно здравни лица, такива изследвания може би биха били полезни в случаите с различни системни заболявания и състояния, като се има предвид риска от *Candida* инфекция (136,141). Има данни в литературата за това, че увеличени нива на *Candida spp.* по оралната лигавица и в пародонталните джобове могат да се свържат със състояния на имуносупресия и нарушено микробно равновесие (напр. след хирургична интервенция, тежки вирусни и бактериални инфекции на оралната мукоза, след продължителна антибиотична терапия, при HIV инфекция, присъствие на пластмасови протезни конструкции). В настоящото изследване пациентите с хроничен пародонтит са системно здрави и приемаме, че установената ниска честота на присъствие на *Candida spp.* е резултат, съответен на литературните данни (110). В същото време установената бактериална находка в това изследване потвърждава данните в литературата за здравата връзка на тежкия хроничен пародонтит с присъствието на високи нива на основните пародонтални патогени: *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, *Tannerella forsythia*, *Prevotella intermedia*, *Peptostreptococcus/Micromonas/micros*, *Fusobacterium nucleatum*, *Eubacterium nodatum* (63,64,66,102,143,159,177). Настоящото проучване показва ясна корелация на нивата на тези микроорганизми за тежестта на пародонтита чрез основните клинични параметри - тежестта на гингивалното възпаление, дълбочината на пародонталните джобове, загубата на клиничен аташман и костната загуба.

**Резултатите от това проучване са в подкрепа на необходимостта от допълнителни микробиологични тестове в случаи на тежки пародонтити с наличие на дълбоки пародонтални джобове и данни за пациента, които го свързват с някоя от рисковите системни групи като пациенти с диабет, хронични бъбречни заболявания, сърдечно-съдови заболявания, HIV инфекция.**

**Обсъждане по задача 3.** Да се оцени генната експресия на основни проинфламаторни цитокини (интерлевкин 6 (IL-6) и туморнекротизиращ фактор - алфа (TNF- $\alpha$ )) при тежък хроничен пародонтит.

Вроденият и придобит имунитет играят без съмнение ключова роля както в прогресията, така и в ремисията на пародонталното заболяване (19,21,42).

Напредъкът в последните десетилетия в разгадаването на характеристиките на отговора на организма безспорно доведе до по-добро познание на механизмите на прогресия на гингивалното възпаление в деструкция на поддържащи структури. Съвременните усилия на изследователите се фокусират върху откриване на диагностични подходи, целящи ранна оценка на деструктивния отговор на организма и в резултат установяване на терапевтични стратегии за контрол.

Учените от години се фокусират върху регулаторната роля на инфламаторните молекули в патогенезата на пародонталните заболявания, разглеждайки я в двете посоки - деструктивна и протективна (7,21,47,158a,166a,167).

Като резултат от матурацията на биофилма, патогенните бактерии в пародонталните джобове освобождават редица вирулентни фактори, антигени или други продукти, които преодоляват защитните механизми на организма. Това причинява клетъчни и тъканни разстройства на базата на нарушаване на инфламаторния регулаторен механизъм, изразено чрез функцията на неутрофилите, моноцитите/ макрофагите, дендритни клетки, Т-клетки, В-клетки. Фагоцитиращите клетки имат сравнително къс живот и това в комбинация с персистиращия бактериален товар, усилената продукция на проинфламаторни медиатори (вкл. интерлевкини, тумор-некротизиращ фактор и др.) на фона на едно хронично възпаление довежда до промени в придобития имунен отговор. При една напреднала пародонтална лезия това се изразява в засягане и на алвеоларната кост и продължаваща загуба на колаген. Henderson et al. изследват RANKL, интерлевкин-1, интерлевкин-6, тумор-некротизиращ фактор, простагландин E2 и намират, че тези показатели са сигнификантно асоциирани с костната загуба при пародонталната инфекция. И тук се подчертава нарушението в баланса между остеобластната и остеокластната активности заради освобождаваните бактериални продукти и инфламаторни цитокини (74). Затова в съвременната литература се отделя внимание именно на продуцираните в резултат на локалния възпалителен отговор цитокини като част от нарушената макроорганизъм-микробна хомеостаза. В резултат на бактериалната инфекция кератиноцитите експресират множество цитокини като интерлевкин 1-алфа, интерлевкин 1-бета, тумор-некротизиращ фактор-алфа. В рамките на възпалението гингивалните фибробласти са стимулирани от цитокините, освобождавани от макрофагите от съединителната тъкан, да синтезират самите те цитокини. По този механизъм и интерлевкин 1-бета и тумор-некротизиращ фактор-алфа действат стимулиращо на експресията и освобождаването на интерлевкин-6.

Според заключението на Geivelis et al. интерлевкин-6 е проинфламаторен цитокин, асоцииран с пародонталните деструктивни промени в тъканите и се предлага за един вид „биомаркер” за оценка на прогресията на пародонтита (58).

Локалните нива на цитокините изглежда да са в зависимост от микробиотата, асоциирана с пародонтит (85а). Има обаче недостатъчно проучвания относно промените в нивата на цитокините във връзка с общия бактериален товар и композиция на субгингивалния биофилм. Teles et al. изследват *in vivo* връзките между състава на субгингивалната зъбна плака и нивата на осем цитокини в кревикуларната течност (между които и IL-6 и TNF- $\alpha$ ) при пародонтално здрави индивиди и при пациенти с генерализиран агресивен пародонтит. Те намират, че цитокините профили при здрави индивиди са предимно хомогенни и повече от 50% от всички цитокини представлява интерлевкин-10. Групата на пациентите с генерализиран агресивен пародонтит се характеризира с разнообразна находка при различните микробни проби. При тази група са установени статистически значими по-високи нива на 6 от 40 изследвани вида патогенни бактерии, между които са и изследваните от нас: *P. gingivalis* и *T. denticola*.

Резултатите на Teles et al. са демонстративни за повишената експресия на IL-13, IL-6 и IL-1b ( $p < 0.001$ ) при агресивен пародонтит. Авторите заключават, че различните субгингивални бактериални профили се отличават с различна експресия на цитокините в гингивалната кревикуларна течност (169).

Като резултат от прегледа на литературата бихме могли да обобщим, че регулирането на нивата на цитокините най-вероятно се дирижира от присъстващата микрофлора при пародонтит, но в проведените до този момент изследвания са показани твърде ограничени данни по отношение на промените в нивата на цитокините във връзка с общата маса и състав на субгингивалния биофилм (12,16).

Има данни, че субгингивалния биофилм може да се представлява със значителни вариации в микробния си състав (92). Освен това проучвания върху субгингивалната бактериална находка при пародонтит показват, че близки пародонтални места, дори около един и същи зъб, могат да се различават значително по нива и пропорции на колонизиращите бактериални видове (156). В пародонталната литература за сега е малко оценено въздействието на това микробно разнообразие върху богатата с освободени цитокини среда в съседните пародонтални тъкани. В тази връзка Teles et al. изказват хипотезата, че при пародонталните заболявания съществува голямо разнообразие в състава на субгингивалната микрофлора и че това многообразие се придружава и от голямо разнообразие в профилите на експресирани цитокини в сравнение със здравия пародонт (168).

Една от целите, които си поставихме в нашето изследване, беше и да проучим евентуалните асоциации между състава на субгингивалния биофилм (*A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *T. Denticola*) и нивата на смятани за едни от най-значимите цитокини - **IL-6** и **TNF- $\alpha$** , освободени в прилежащите гингивални тъкани. В нашето изследване открихме, че количеството на пародонталния патоген *P. gingivalis* в пародонтални джобове с дълбочина 4-6 мм и общия брой бактерии в тези джобове корелират с промяната на генната експресия на **IL-6**, както и, че количеството на пародонталния патоген *T. denticola* в същите джобове корелира с генната експресия и степента на промяна на генната експресия на **TNF- $\alpha$** . Анализът на основни инфламаторни цитокини в гингивата на пациенти с хроничен пародонтит показва, че:

- Промяната в генната експресия на **IL-6** в гингивата на пациенти с хроничен пародонтит корелира с количеството на пародонталния патоген *P. gingivalis* в джобовете с дълбочина 4-6мм (PD 4-6 мм), както и с общия брой бактерии в тези джобове.
- Генната експресия и степента на промяна на генната експресия на **TNF- $\alpha$**  при хроничен пародонтит корелира с количеството на *T. denticola* при джобовете с дълбочина 4-6мм (PD 4-6 мм).

Увеличените нива на генна експресия на изследваните цитокини в съседство с по-дълбоките пародонтални джобове ние свързваме не само с системната им продукция в отговор на пародонталната инфекция, но и с локално продуцираните възпалителни медиатори и цитокини. Нашите резултати потвърждават разсъжденията на автори, които доказват, че в lamina propria, прилежаща на епитела на пародонталния джоб, както и в непосредствена близост до възпалената гингива, се откриват **IL-6** – съдържащи клетки (39,46).

Резултатите от изследването демонстрират значими разлики в генната експресия на **TNF** (dCt 4-6 мм) при двата пола. Данните показват и статистическа достоверност на разликите в генната експресия на **TNF** при пациентите с места с различна тежест на пародонтита. При жените и пациентите с умерена тежест на заболяване (загуба на аташман, дълбочина на джоба при сондиране, костна загуба) dCt се увеличава (P-коефициент < 0.07). Получените резултати насочват към това, че очакваме повишени нива на цитокините в гингивата при пациентите от мъжки пол и с тежък хроничен пародонтит. Може да се направи положителна асоциация на повишените стойности на клиничните параметри: загуба на аташман и дълбочина на джоба при сондиране, а също и на костната загуба, с повишени нива на изследваните цитокини в гингивата. Тези данни биха могли да обяснят един по-лош отговор към провежданата нехирургична терапия и до необходимост от обсъждане на допълнителна хирургична и/или системна антимикробна и/или системна имуномодулираща терапия.

При изследването установихме статистическа значимост между кървенето при сондиране и промяната в генните експресии от пробите при по-голяма дълбочина на джоба при сондиране спрямо по-малката дълбочина: PD>6мм спрямо PD<4мм – за интерлевкин-6; PD>6мм спрямо PD<4мм и PD 4-6мм спрямо PD<4мм – за TNF(R=0.8). От получените резултати можем да заключим, че пародонталното заболяване води до повишаване на генната експресия на изследваните цитокини в гингивата. Тази находка е в тясна зависимост от тежестта на пародонталното възпаление, изразена чрез кървенето при сондиране и дълбочината на пародонталните джобове. Следователно тези клинични параметри следва да се вземат предвид с висока стойност при диагнозата и лечението на тежките пародонтити.

Установена беше също и статистическа значимост между костната загуба и промяната в генните експресии от пробите при по-голяма дълбочина на джоба при сондиране спрямо по-плитките пародонтални джобове: 1) PD>6мм спрямо PD<4мм и 2) PD>6мм спрямо PD 4-6мм за TNF(R=0.6). На таблица 32 са показани коефициентите на значимост (R=0.8) на разликите в генната експресия на изследваните инфламаторни фактори във връзка с различната дълбочина на джоба при сондиране (тежестта на пародонтита). Установени са статистически достоверни корелации между степента на генна експресия на интерлевкин 6 (4-6мм) и степените на промяна на генната експресия на TNF в зависимост от дълбочината на джоба при сондиране – от дълбоките към плитките места. Установени са също статистически достоверни корелации между степента на генна експресия на TNF (>6мм) и (4-6мм), и степените на промяна на генната експресия на интерлевкин 6 в зависимост от дълбочината на джоба при сондиране – от дълбоките към плитките места. От таблицата се вижда установената положителна корелация между степените на промяна на нивата на генна експресия на изследваните интерлевкини в дълбоките, средно-дълбоките и плитките пародонтални места.

Проучването показва връзка на генната експресия на IL6 при местата с умерена дълбочина ( PD 4–6 мм) с възрастта на пациентите като dSt на изследвания ген нараства с увеличаване на възрастта (R =0.7).

В реферираната литература се срещат предимно данни, които са следствие от проучваната експресия на дадени инфламаторни маркери под влиянието на конкретни вирулентни фактории на определени микроорганизми (127,167). В този смисъл редица автори установяват такава «причинно-следствена» връзка. Оскъдни са обаче данните за потенциалното участие на разгледаните биомаркери в патогенезата на пародонталните заболявания, отнесено към факта, че невинаги наличната бактериална флора предизвиква толкова усилена експресия, както и, че не се предизвиква истински специфичен имунен отговор. Това значи, че на практика не можем да очакваме като отговор на присъствието на определен бактерия експресията на определен цитокин. Вероятно изглежда на този етап на познанието тълкуването на Dixon et al., че имунната система е в състояние да разпознае някои бактериални видове като нестрашаващи здравето и да избере да не активира деструктивния тип отговор и по този начин да се позволи колонизирането на макроорганизъм-съвместимите видове (45).

Установените корелации в това проучване имат генерална стойност при определяне на значимостта на определени фактори (възраст, пол, тютюнопушене) като рискови фактори на хроничния пародонтит. Рисковите фактори по определение са фактори, които увеличават вероятността от заболяемост. Присъствието на бактериална плака е предпоставка за иницирането на пародонталното заболяване. Литературните данни показват, че преваленцията и тежестта на пародонтита нарастват с възрастта. Полът също би могъл да оказва влияние върху тежестта на

пародонтите – мъжкият пол се свързва с по-голяма загуба на аташман. При пародонтит фактори като пол, възраст, социално-икономически, генетични (рискните детерминанти) могат да играят съществена роля при определяне на терапевтичния подход и план, докато други допълнителни фактори като тютюнопушене, стрес, диабет могат да влияят върху отговора към пародонталната терапия.

Оценката на рисковите фактори би позволила по-точното анализиране на хода на пародонталното заболяване, съобразяване на стратегиите и интервенциите, детерминирането и модифицирането на лечебния план и прогноза.

**Обсъждане по задача 4.** Да се оцени генният полиморфизъм на интерлевкин-6 (IL-6), тумор некротизиращ фактор - алфа (TNF- $\alpha$ ) и лимфотоксин алфа (LT- $\alpha$ ) при тежък хроничен пародонтит.

Имунният статус и имунният отговор имат съществено значение за прогресията, обхвата, хода и ремисията на пародонтита (19,21,42).

Трудностите, с които се сблъскват учените, са именно в начина да бъде оценена активността на заболяването на базата на оценка на деструктивния и на протективния имунен отговор. За това е необходимо да се имат предвид както клиничния пародонтален статус, така и присъстващите бактериални агенти, и от трета страна – някои генетични фактори в разгръщането на патогенния имунен отговор. Първото изследване за генен полиморфизъм на цитокини е представено в литературата от Kornman като той открива статистически значима асоциация между тежкия хроничен пародонтит и композитния генотип, по-точно - алел 2 от единичния генен полиморфизъм (single nucleotide polymorphism - SNP) на IL-1A+4845 и IL-1B+3954 локализиран в хромозома 2q13 (89). Това дава основание на други автори да стартират проучвания за ролята на генния полиморфизъм на IL-1 като фактор за тежестта на пародонтита при различни популации и етнически групи (6,18,86,89,110).

В литературата се увеличава информацията за опити за идентифициране на генетични фактори във връзка с пародонтита (71,113,125).

Основно място в тях заемат изследванията за полиморфизъм на интерлевкин 1 бета (IL 1 $\beta$ ), интерлевкин-6 (IL-6) и тумор некротизиращ фактор алфа (TNF- $\alpha$ ). Интересът към факторите, обуславящи продукцията на тези цитокини е разбираем тъй като е известна роля на възпалителните фактори в патофизиологията на възпалението (176), включително при пародонталните заболявания (13,48,51,105).

В настоящото проучване ние изследвахме полиморфизма на IL-6 , в позиции -597 и -174, полиморфизма на TNF- $\alpha$  в позиция -308, и полиморфизма на LT- $\alpha$  в позиция -252. При направения анализ на резултатите не се установиха значими различия в разпространението на полиморфизмите на IL-6, TNF- $\alpha$  и LT- $\alpha$  генотипове между контролната група и пациентите с пародонтит. Затова ние интерпретираме получените данни само като даващи оценка за тенденции и преобладаване на даден генотип. Все пак сигнификантна разлика се открива при полиморфизма на LT- $\alpha$  – преваленция на генотип GG при пациентите с тежък пародонтит. По отношение на получените резултати за генните полиморфизми на IL-6 (G-597A) и IL-6 (G-174C) генотипове – и при двата генотипа при пациентите с тежък пародонтит се установи по-често генотип GG. При пациентите с пародонтит честотата на срещане на генотип GG на TNF- $\alpha$  (G-308A) беше установено да е сигнификантно по-голяма в сравнение със здравите контроли.

Подобно на интерлевкин -1 $\beta$ , тумор некротизиращият фактор алфа (TNF- $\alpha$ ) се смята също за ключов цитокин при развитието на инфламаторния отговор при пародонтит и би могло да се допусне, че е от значение за ефективността на имунния

отговор, както и за степента на клиничните резултати в хода на антиинфламаторната терапия на заболяването (76,150).

In vitro проучвания показват индивидуални различия в продукцията на TNF- $\alpha$  при различни възпалителни стимули (11). Автори представят доказателства за значимостта на полиморфизма на TNF- $\alpha$  (по-точно транзицията на гуанин - guanine (G) в аденин - adenine (A) на TNF- $\alpha$  – 308 алел и увеличен риск при заболявания като: улцеративен колит и болестта на Crohn, paediatric-onset inflammatory bowel disease (36) и пародонтит (56). От друга страна автори установяват, че носителството на алел LT- $\alpha$ -252 (по-рано левкотоксин алфа е наричан тумор некротизиращ фактор бета) е било свързано с увеличената продукция на TNF- $\alpha$  както in vitro (112), така и in vivo (73,107).

През 1998г. Kornman и Di Giovine съобщават за увеличена TNF- $\alpha$ -308n2 алелна честота при пациенти от бялата раса с хроничен пародонтит в сравнение с пародонтално здрави индивиди. Освен това авторите установяват и корелация с тежестта на пародонталното заболяване (49). Също така Galbraith et al. (1999) намират TNF- $\alpha$ -308n2 алел за рисков фактор по отношение тежестта на хроничния пародонтит (56,90). През 2003г. Lin et al. демонстрират също повишена честота на TNF- $\alpha$ -308n2 алел при китайски пациенти с хроничен пародонтит (57).

Противоположни са обаче резултатите на Fassmann et al. (2003), които не показват при чешки пациенти TNF- $\alpha$  (-308G/A)-полиморфизъм да е асоцииран с хроничния пародонтит (51).

Във връзка с пародонталните заболявания през последните години са изследвани и други генни полиморфизми като например на IL-6 ((-174) G/C, (-190) C/T и (-597) G/A) (143,144).

Да припомним изследванията на други автори (Raunio et al., 2007г.) във връзка с IL-6-174 генен полиморфизъм GG генотип, където се демонстрира корелация между разпространението на умерения и тежкия пародонтит, изследвания генотип и серумната концентрация на IL-6 (132).

Данните от нашето проучване и от литературата са лимитирани, за да подкрепят силно асоциирането на генния полиморфизъм на TNF- $\alpha$  в позиция -308, на IL-6 в позиция -597 и -174, и на LT- $\alpha$  в позиция -252 с хроничния пародонтит. Но от друга страна оценката в изследването на IL-6 (G-597A) и IL-6 (G-174C), както и на TNF- $\alpha$  (G-308A) полиморфизми показва, че генотип GG се асоциира умерено с хроничния пародонтит при българските пациенти. Като резултат от това бихме могли да предположим, че алел G може да играе важна роля в развитието и прогресията на пародонталното заболяване в изследваната популация.

Някои автори също свързват носителството на GG генотип за силно асоциирано със системната инфекция и възпаление при пародонтит (39). Открихме и литературни данни, които свидетелстват, че хомозиготността по алел G за IL-6 (G-174C) се свързва с по-висока степен на колонизация и развитие на някои от пародонталните патогени - *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Tannerella forsythia* и *Porphyromonas gingivalis* (132). На базата на нашите резултати за изследваните групи пациенти можем да заключим, че генният полиморфизъм може да играе важна роля при определяне на диагнозата, прогнозата и разрешаването на тежкия хроничен пародонтит. Само част от генетично предразположените и/или патоген-експонирани индивиди развиват тежко деструктивно пародонтално заболяване (10-15% е честотата на тежкия хроничен пародонтит). Индивидуалната предразположеност към хронични възпалителни заболявания като хроничния пародонтит може да е свързана както с генетични фактори, така и с фактори от средата. Някои от тях се характеризират с по-слаб, умерен или по-силен ефект. Точността на генетичните тестове в случаите на

моногенетични заболявания е голяма. Те имат ниска генетична сложност, но в същото време – висока наследственост, тежест и ранно начало. Това са случаи, в които генетичните тестове са особено полезни (агресивните пародонтити и тежките хронични пародонтити). Други заболявания имат по-голяма генетична сложност, ниска честота в популацията (<1%) и допълнителни променливи фактори: на средата, поведението, начина на живот. При тях генетичните тестове не биха имали много висока диагностична стойност. Хроничният пародонтит има по-висок риск в популацията, но и много други не-генетични рискови фактори, които при различни условия могат да реагират помежду си или с даден генетичен фактор.

Получените от нас резултати съответстват на получените и от други изследователи и публикувани в литературата (144а). Проучването носи полезна информация за тенденцията и честотата на разпределение на изследваните генотипове, което би могло да се потвърди в бъдещи по-обхватни проучвания.

Получените резултати за намесата на генетични фактори в патологичния процес при пародонталните заболявания биха могли да придобият клиничен израз, имащ отношение към диагнозата, клиничното протичане, третиране и контрол при пациентите с пародонтит. Необходими са още бъдещи усилия за осъществяване на интегриран анализ с индивидуален диагностичен модел на пациента.

**Обсъждане по задача 5.** Да се получат данни за влиянието на рисковия фактор тютюнопушене при хроничен пародонтит.

При настоящото изследване се оцени влиянието на тютюнопушенето върху тежестта на пародонтита като за целта са използвани основни клинични параметри като дълбочината на джоба при сондиране и загубата на прикрепване. Получените резултати показват статистически значима връзка на фактора тютюнопушенето с клиничния параметър дълбочина на сондиране (средна ст. (mm)) при ( $p=0.063$ ). При пациентите пушачи се установиха по-високи средни стойности на измерените загуба на аташман и дълбочина при сондиране в сравнение с непушачите.

Епидемиологични проучвания за оценка на потенциалните рискови фактори за пародонталните заболявания са установили увеличен риск от загуба на клиничен аташман в присъствието на някои от тях. Статистическа значимост на риска за пародонтит е установена в много от изследванията за следните фактори: присъствието на увеличени нива на *P. gingivalis*, мъжкия пол, тютюнопушенето, възрастта.

Известно е, че цигареният дим съдържа повече от 4,000 различни токсични субстанции - Neasman et al. изследват възможните странични ефекти на тютюнопушенето и ги разпределят в следните категории:

- свързани със специфични микроорганизми (пародонтопатогени) – между тях два от търсените от нас: *P. gingivalis* и *T. denticola*;
- предизвикване на периферна вазоконстрикция и оттук –ограничен локален защитен отговор към патогенните бактерии, понижено кислородно насищане в пародонталните джобове и благоприятен растеж на анаеробните бактерии;
- увреждане на неутрофилната функция, повлияване дегранулацията на гранулоцитите, отделяне на повишени нива на тумор-некротизиращ фактор-алфа, което би могло да има отношение към съединителнотъканната и костната деструкция;
- увеличена експресия на цитокини, главно потвърдена за интерлевкин - 1 бета, интерлевкин-6, интерлевкин-8;

- намалена пролиферативна способност на Т и В лимфоцитите и способност да произвеждат протективни антитела;
- забавени оздравителни процеси (72).

В съвременната литература широко се дискутират механизмите на модифициране на отговора на организма от определени фактори на обкръжаващата среда. Проучванията на рисковите фактори за пародонтит ясно демонстрират тютюнопушенето като потенциален рисков фактор за пародонтално заболяване. Физиологичните ефекти на тютюнопушенето включват влиянието върху вазоконстрикцията и ревакуларизацията, продукцията на колаген и колагеназа, кислородния транспорт, заздравяването на раните. През 1995г. Schenkein et al. изследват влиянието на тютюнопушенето при пациенти с агресивен пародонтит. Те, подобно и на други изследователи, намират сигнификантни асоциации с увеличените нива на антителата срещу патогените *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* и *Porphyromonas gingivalis*, и също така с тежестта на заболяването (165). Техните наблюдения им дават основание да определят тютюнопушенето като рисков фактор за модифициране на имунния отговор на организма и следователно за повлияване на клиничната експресия на заболяването. Редица други автори също показват, че тютюнопушенето може да повлияе различни аспекти от възпалителния отговор (химиотаксис, фагоцитоза). Според Schenkein, 2006 тютюнопушенето може да стимулира продукцията на проинфламаторни цитокини като IL-1, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , и по този начин да се намесва чрез увеличаване на костната резорбция и понижаване на костното формиране (15,25,124,147). Според Bergström (2004) могат да се разграничат основни характеристики на тютюнопушене-асоциирано пародонтално заболяване: деструкция на поддържащите зъбите тъкани, загуба на клиничен аташман, костна загуба, формиране на пародонтални джобове, и загуба на зъби (24). Прегледът на литературата през последните 20 години показва доказателства за това, че при пушачите се установява по-голяма костна загуба и загуба на съединително-тъканно прикрепване, по-дълбоки пародонтални джобове и по-значима загуба на зъби от дентицията в сравнение с непушачите (15,24,25,165). Получените от нас резултати са в съгласие с резултатите и опита на съвременните научни изследвания като подчертават силната връзка на тютюнопушенето като рисков фактор с пародонталните заболявания. Данните показват присъствието на пародонтални места (джобове) с по-голяма дълбочина на сондиране и по-изразена костна загуба при влиянието на фактора тютюнопушене. Резултатите свидетелстват за повишеното присъствие на *Treponema denticola* в субгингивалните проби от дълбоките пародонтални джобове при пушачите в сравнение с непушачите. Някои разлики с получените резултати от други проучвания биха могли да се обяснят чрез различните условия на оценяване. Така например по-слабо присъствие на микроорганизми може да е следствие от по-голям брой на плитките пародонтални места, които са изследвани (пародонтални джобове).

Получените резултати в нашето проучване потвърждават доказателствата от литературата за значимостта на пушенето като рисков фактор за пародонтит от обкръжаващата среда. За клиничната практика е важно пациентите да бъдат информирани, че тютюнопушенето влияе както върху тежестта на пародонтита, така и върху оздравителните възможности на пародонталните тъкани. Установено е, че пушачите имат по-лош отговор спрямо провежданото пародонтално лечение в сравнение с непушачите. Присъствието на фактора пушене влошава прогнозата на заболяването и при по-тежките пародонтити тя може да стигне до съмнителна и безнадеждна. По тази причина отказът от тютюнопушене при леките и умерените пародонтити би могъл да доведе до подобряване и прогнозата на пародонтита (121).

Интерес представляват за нас литературни данни за влиянието върху нивата на IL6 и TNF не само на факторите пол и възраст, но и на тютюнопушенето. Автори са установили повишени серумни нива на IL6 при женския пол в сравнение с мъжкия пол, при пушачите в сравнение с непушачите, а също и при по-възрастните пациенти (132). В нашето проучване се установи, че тютюнопушенето като рисков фактор оказва значимо влияние върху изследваните генни експресии. Присъствието на този фактор се отразява като повишена експресия предимно в местата с по-голяма дълбочина на джоба (PD > 6 мм), и също върху разликите в генните експресии (ddCt) на IL6 и TNF между дълбоките пародонтални джобове (PD > 6 мм) и по-плитките места (PD 4-6 мм). Данните потвърждават значим ефект на пушенето върху тежестта на пародонтита.

**Обсъждане по задача 6.** Създаване на алгоритъм на диференциран подход в инициалната диагноза на тежкия хроничен пародонтит на базата на бактериалната находка и компоненти на отговора на организма.

Хроничният пародонтит е широко разпространено заболяване в целия свят. Веднъж установена, загубата на поддържащи зъбите структури, свързана с това заболяване, има тенденция да прогресира и без адекватно лечение води до загуба на зъби. Нарастването на познанието за етиологията и механизмите на деструкция на тъканите при пародонтит доведоха до експериментиране на нови подходи както в диагнозата, така и в контрола на заболяването. Днес се знае, че иницирането и прогресията на загубата на пародонтален аташман е свързано с нивата на пародонтопатогените в денталния биофилм и в значителна степен се определя от отговора на организма, детерминиран от генетични характеристики и фактори от средата (19,21,42,155,154). Всички тези фактори са свързани с клиничната експресия на заболяването, с неговата прогресия, отговор към терапията и рецидивите и прогресията.

Съвременната диагноза на пародонтита продължава да е базирана на измервания, показващи наличие на вече загубени пародонтални структури и основната деформация пародонтален джоб. Така традиционното сондиране с определяне на параметрите на джоба и рентгенографски регистрираната загуба на кост е твърде късна диагноза при пародонтит, а използваните критерии са с ограничена диагностична стойност за изхода от терапията, както и в определянето на прогнозата на заболяването (14,19,60). Повечето автори все пак показват консенсус, че пародонталното сондиране и рентгенографията са основни методи в диагнозата и достатъчни при леките и умерени пародонтити. Тежките пародонтити с манифестация на места с повече от две трети от дължината на корена загуба на кост, формиране на ангуларни дефекти и ангажиране на фуркациите и с присъствие на дълбоки пародонтални джобове поставят необходимост от изясняване на причините и механизмите на тежката пародонтална деструкция в опитите за по-добър контрол на заболяването и по-дълго запазване на зъбите на пациента. Високи диагностични изисквания поставят и случаите на лош отговор към терапията.

Изследванията показват, включително тези в настоящия дисертационен труд, че допълнителни подходи с идентификация на известните пародонтопатогени на място-специфично ниво могат да са полезни в разграничаване на различните форми на пародонтит и в планиране на пародонталната терапия при тежки хронични пародонтити. Получените в настоящите проучвания високи нива за пародонтопатогени от червения и оранжевия комплекс в дълбоките пародонтални джобове на пациенти с голяма загуба на пародонт показват от една страна връзката на нивата на изследваните

пародонтопатогени със степента на загубата на тъкани и от друга страна подчертават необходимостта от микробиологичен мониторинг при дълбоки пародонтални места. Резултатите от настоящите проучвания внушават необходимост дълбоки пародонтални джобове с клинични признаци на активност да бъдат изследвани с микробиологични тестове и адекватно третирани. Персистирането на високи нива на пародонтопатогени в такива случаи е индикация за допълнителни антимикробни или хирургични подходи на третиране. Успехът на допълнителната терапия може да бъде потвърден с микробиологичен тест, показващ елиминиране или значителна редукция на пародонтопатогените.

Съвременната концепция за пародонтита силно фокусира върху отговора на организма към микробното дразнене в иницирането и прогресията на заболяването. Познати са в известна степен механизмите на стимулиране на клетките на организма от пародонталните патогени и активиране на тези клетки в посока на деструктивни ефекти върху пародонта. Актуални са проучвания върху фактори на възпалението и на имунния отговор с цел да бъдат по-добре разбрани процесите на деструкция, свързани с фактори от организма. Данните от такива проучвания внушават, че могат да бъдат категоризирани някои инфламаторни цитокини като маркери на деструкцията (20,46,47,91,134). Проучванията в този дисертационен труд показват повишени нива на интерлевкин-6 и тумор некротизиращ фактор алфа в гингивалните тъкани при тежък хроничен пародонтит и особено във връзка с дълбоки пародонтални места, показали присъствие във високи нива на основните пародонтални патогени.

При повечето пациенти с хроничен пародонтит е налице добър отговор към конвенционалното пародонтално лечение. Супра- и субгингивалното инструментирание заедно с качествен плаков контрол е адекватният избор в инициалната терапия на леките и умерените по тежест хронични пародонтити. При някои пациенти обаче отговорът към това лечение е лош независимо от положените усилия и в тези случаи заболяването продължава да прогресира. При някои пациенти се установява рецидивирание на пародонталната деструкция. Търсят се причините както в пропуски в пародонталната поддържаща терапия, така и в повторното свръх-разрастване на вирулентни патогенни бактерии. Установено е, че тези микроорганизми колонизират не само пародонталните джобове, но също и тонзилите, гърба на езика, оралната мукоза. В случаите на тежки пародонтални лезии е целесъобразно определянето качествено и количествено на патогените, които са основно отговорни за активната пародонтална деструкция. Микробната идентификация цели идентифициране на бактериален рисков профил (МО-микробен профил) на пародонтита с цел подобряване на ефикасността на пародонталното лечение. Това се отнася особено за случаите на тежките пародонтити и пародонтитите с лош отговор към проведената терапия.

Литературните данни внушават значимост на микробиологичната диагноза при някои пародонтални заболявания в различни етапи. Едновременно с това се изтъкват някои ограничения и неразрешени въпроси по повод рутинната употреба на микробиологичния анализ в конвенционалното лечение на пациентите с пародонтит:

- Кога да се изследва?
- Къде да се изследва?
- Как да се изследва?
- Каква е приложимостта на резултатите от изследването в клиничните решения?

Според някои автори има две основни клинични ситуации, в които микробиологичните тестове се препоръчват: първо – в случаите на агресивен пародонтит и второ – в случаите на рефрактерност на пародонталното заболяване. Разглеждат се два основни периода за извършване на микробиологичния анализ: още в инициалната фаза от лечението при агресивния пародонтит, и след завършване на традиционната пародонтална терапия за пациентите, които демонстрират рефрактерност. В поддържащата фаза диагностичните трудности за клиницистите са свързани с възможността да умеят да разпознават и диференцират състоянието на рефрактерност и това, свързано с рецидив на пародонтита.

Следователно микробиологичният анализ не трябва да се приема като част от рутинното начално изследване на пациентите с пародонтит. Добре е той да се отнесе до по-специфични клинични ситуации с цел да се идентифицира микробен профил за таргетна и ефективна антимикробна терапия. При умерените хронични пародонтити бактериалната находка ще бъде полезна в определянето на рискови места за персистираща прогресия или незадоволителен отговор към терапията.

Данните от литературата сочат, че регулярно провежданата професионална терапия в комбинация с личните орално-хигиенни грижи, би могло да доведе до това, че композицията на субгингивалната флора при пациентите с хроничен пародонтит да се доближи до тази, установяваща се при пародонтално здравите лица и да се поддържа такава за дълго време. Установяването на подходяща поддържаща програма би осигурило една по-дълговременна стабилност на пародонта.

Получените данни за инфекцията ще послужат за изготвяне на индивидуална програма при хроничен пародонтит при съобразяване на обхвата и тежестта, плаковия контрол и кооперативност на пациента и наличната в дълбоките места инфекция. Смятаме, че анализът на бактериалната находка трябва да бъде ориентиран към пациентите с тежък хроничен пародонтит, агресивен пародонтит, рефрактерен, рецидив, както и при място-специфична активност (прогресия на загубата на аташман и дълбочината на джоба, кървене при сондиране, супурация).

В настоящото изследване получихме данни за значими разлики при разпределението на генотиповете при пациенти с тежък хроничен пародонтит и различна степен на плак-контрол. Установи се, че присъствието на алел G се открива при минималните стойности на HI (=0% свободни от плака повърхности) при: IL6G174C генен полиморфизъм; IL6G597A генен полиморфизъм и LTAA252G генен полиморфизъм. Това ни дава основание да смятаме, че в условията на установена генетична податливост количеството на плаката е фактор с още по-голяма етиологична значимост за заболяването, а качественият плаков контрол би играл важна роля при пародонталната терапия и поддържането на резултата от лечението.

Определянето на присъствието и нивата на бактериите, както и преваленцията на патогенните бактерии в инициалната диагноза може да е част от квалифицирането на тежестта на пародонтита, детерминира терапевтични подходи, в реоценката може да помогне в идентифицирането на рефрактерността и в поддържащата фаза да потвърди стабилност на пародонталния статус или да предиктира или покаже рецидив или прогресия.

Изследването на повече на брой бактериални видове и при по-голям брой индивиди в научните проучвания би било полезно за създаване на критерии за съвместимата с пародонталното здраве микрофлора, и също така и за такава, свързана с патогенезата на пародонтита.

Има необходимост за клиничната практика от ясен протокол на микробиологичен анализ:

- в инициалната диагноза на хроничния пародонтит с цел потвърждаване на диагнозата, определяне на терапевтичните подходи и като база данни за оценка на ефектите от инициалната терапия, както и прогнозата на заболяването;
- при реоценката за оценка на резултатите от нехирургичната терапия и планиране на допълнителна терапия;
- в поддържащата фаза за оценка на прогнозата на заболяването и предикция и диагноза на рецидива и прогресията.

Въз основа на получените в това проучване данни за микробиологичната находка при хроничен пародонтит и установените корелации между присъствието и нивата на основни пародонтопатогени и тежестта на пародонтита (загуба на аташман и дълбоки джобове) препоръчваме микробиологична диагноза при пациенти с тежък хроничен пародонтит да се проведе в инициалната терапия при пациенти с дълбоки пародонтални джобове, където се очаква труден контрол на инфекцията. Следователно важните критерии за необходимост от микробиологичен профил са тежестта на пародонтита и локализирана или генерализирана активност на заболяването. При получените резултати от най-голям интерес е присъствието и нивата на пародонталните патогени от “червения комплекс”: *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, *Tannerella forsythia*”.

На базата на получените резултати в проучванията в дисертационния труд и литературни данни, както и след анализ на значимостта на микробиологичната, биохимична диагноза и идентифициране на генен полиморфизъм предлагаме протокол на мониториране на пациент с тежък хроничен пародонтит при следната последователност на допълнителни тестове:

## 1. Инициална диагноза

- Клинична диагноза
- Микробиологична диагноза
- Биохимична диагноза
- Идентификация на генен полиморфизъм за повишена продукция на инфламаторни фактори

### 1.1. Нехирургична антиинфекциозна терапия

- Постигане на персонален плак-контрол
- SRP
- Допълнителна антимикубна терапия съобразена с резултатите от допълнителната инициална диагноза

### 1.2. Реоценка

- Клинична диагноза за реоценка
- Микробиологична диагноза за реоценка
- Биохимична диагноза за реоценка
- Планиране на таргетна антимикубна терапия или хирургична терапия

## 2. Хирургична антиинфекциозна/реконструктивна терапия

- Мекотъканна хирургия за елиминиране на джоба
- Костна хирургия за елиминиране на костни дефекти
- Регенеративна пародонтална терапия
- Реконструкция на алвеоларни места

## 2.1. Оценка след хирургичната антиинфекциозна/реконструктивна терапия

- Клинична диагноза за оценка
- Микробиологична диагноза за оценка
- Биохимична диагноза за оценка
- Планиране на поддържаща терапия

## 3. Поддържаща пародонтална терапия

- Клинична диагноза за оценка и прогноза
- Микробиологична диагноза за оценка и прогноза
- Биохимична диагноза за оценка и прогноза
- Планиране на допълнителни терапии (антимикробна, модулиране на отговора на организма) в поддържащата терапия

Схема 3. Допълнителна диагноза в терапията на тежък хроничен пародонтит.

В отговор на пародонталната бактериална инфекция организмът реагира с различни механизми. Данните от литературата и от настоящото проучване показват, че в регулаторните процеси участват много ензими и субстанции като: простагландини, цитокини и металопротеинази, манифестирани в пародонталната среда. Едни от най-значимите от тях са: интерлевкин 1, интерлевкин 6 и тумор некротизиращия фактор алфа (39,79,86,88,89,93,104,119,178). Анализът на данните показва, че количеството на тези възпалителни фактори има значение за тежестта на хроничния пародонтит, за отговора към терапията и за прогнозата на заболяването.

Заедно с това е показана и значимостта на генетични фактори, въввлечени в патогенезата на пародонталните заболявания, които могат да са обект на допълнителна диагноза при хроничен пародонтит. Генетичната предиспозиция обаче не може да се разглежда едностранно без да се вземат предвид и допълнителни рискови фактори като: системни заболявания (диабет, HIV), ревматоиден артрит, тютюнопушене, лоша орална хигиена, стрес, възраст, патогенни бактерии, дълбочина на пародонталните джобове.

На базата на резултатите от проучването на експресията на цитокини и присъствието на генен полиморфизъм в дисертационния труд може да се направи внушението, че има необходимост от по-добро дефиниране на случаите, в които се налага изследване за генен полиморфизъм при пациенти с хроничен пародонтит. Това предполага дефиниране на ясни критерии след анализ на клиничните характеристики на пародонтита (87,114,123,178).

При тежките хронични пародонтити допълнителната диагноза е част от **инициалната диагноза**. При клинична стабилност след нехирургичната терапия допълнителните диагностични методи само могат да потвърдят стабилност на микробиологично и биохимично ниво. В случай на неуспех на конвенционалната терапия обаче допълнителната диагностика е необходима за идентифициране на резидуалната инфекция или настъпила реколонизация.

**Допълнителната диагноза служи както за оценка на резултатите** (от самостоятелната механична терапия; от механичната терапия, съчетана с допълнителна антимикробна терапия), така и при вземането на решения за бъдещи

лечебни процедури. При микробиологични и биохимични показатели за стабилност терапията се оценява като успешна и лечението може да продължи с поддържаща фаза. Намалената експресия на свързаните с имунния отговор и възпалението цитокини може да означава, че пародонталната терапия води до намаляване интензитета на микробното дразнене, което от своя страна води и до намалена стимулация на възпалението и имунния отговор. Редуцираната експресия на интерлевкини може да се дължи на по-добрата регулация на отговора на организма в резултат на редуцираните нива на вирулентните микроорганизми. Данни от генетичните изследвания могат да потвърдят или отхвърлят генетична предиспозиция за продукция на възпалителни фактори и така да помогнат в планиране на следваща терапия.

На базата на данни за неуспех в разрешаването на присъствието на дълбоки пародонтални места (джоб>6мм или джобове>6мм) и данни за високи нива на субгингивални пародонтопатогени, високи нива на инфламаторни фактори и генен полиморфизъм се препоръчват и допълнителни стратегии при лечението на тежкия хроничен пародонтит – таргетна антиинфекциозна терапия, пародонтална хирургия, модулиране отговора на организма.

Настоящото проучване демонстрира връзката на пародонталната инфекция и тежестта на хроничния пародонтит с експресията на изследваните възпалителни фактори и в зависимост от присъствието на генен полиморфизъм за продукция на някои цитокини.

Данните, получени в проучването, и литературни данни, позволяват създаване на **алгоритъм за допълнителна диагноза**, свързана с изследваните микробиологична находка, възпалителни и генетични фактори като маркери за тежест и прогресия (8,131).

Допълнителната диагноза на базата на микробиологичен анализ и оценка на експресията на инфламаторни фактори и генетична предиспозиция позволява детайлно планиране на пародонталната терапия, коректна оценка на резултатите от активната терапия, както и адекватен контрол в поддържащата фаза.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Независимо от усилията на много изследователи да се разшири и обогати обема на методите за диагноза на пародонталните заболявания, към момента традиционните методи, базирани на основни клинични параметри като кървенето при сондиране, дълбочината на пародонталните джобове при сондиране, загубата на клиничен аташман, и на рентгенографски методи, са най-широко прилаганите при поставянето на пародонталната диагноза. Със сигурност липсата на признаци на гингивално възпаление и наличието на плитки пародонтални джобове имат висока прогнозна стойност за стабилност на статуса. Такива клинични параметри детерминират крайната цел при лечение на пациенти с пародонтит. Някои допълнителни изследвания като например микробиологични и генетични тестове биха били полезни при диагнозата на тежките пародонтити в инициалната диагноза и в мониторирането на пародонтално болни пациенти. Настоящото изследване дава достатъчно доказателства, че определени пародонтопатогени имат здрава връзка с пародонтита. Трябва да се вземе предвид обаче, че пародонталните патогени се открива да присъстват както в активни места на пародонтална деструкция, така и в неактивни места, макар и в по-ниска преваленция и количество. Същите патогенни микроорганизми биха могли да се изолират и от оралната среда на пациенти с гингивит или дори при пародонтално здрави лица и така само идентификацията на някои микроорганизми има ограничена стойност в диагнозата.

Липсата на категорични доказателства за някои потенциални инфекциозни агенти да са във връзка с тежестта на хроничния пародонтит, както в литературата, така и в резултатите от настоящото проучване, ще обоснове допълнителни проучвания за доказването или отхвърлянето на значимостта им при хроничен пародонтит.

В рефериранията литература са описани значими различия в преваленцията на пародонталните патогенни бактерии в зависимост от раса, етническа принадлежност, географското положение, както и приложената методология. Някои от изследваните при нашето проучване патогенни микроорганизми са добре познати като асоциирани с прогресията и тежестта на пародонталното заболяване. В България обаче има малко изследвания, фокусирани върху компонентите на субгингивалната микробиота. Липсват и по-категорични данни за изследвани взаимовръзки по отношение на модифициращи рискови фактори като: тютюнопушене, пол, възраст. Още повече не сме открили данни, свързани с комплексно изследване на взаимовръзки между патогенните микроорганизми, вродения и придобит имунен отговор, ефектите от обкръжаващата среда и предиспониращи генетични фактори в нашата страна. В нашето проучване се интересувахме и установихме значими взаимовръзки между редица показатели на пародонтита, в това число и клинични и параклинични. По своята същност и в такъв обем това изследване е първо по рода си за България.

Резултатите от настоящото изследване демонстрират хроничния пародонтит като заболяване, основно свързано с нивата на пародонтопатогените субгингивално. От друга страна данните за оценката на отговора на тъканите към бактериалния товар и установената корелация на нивата на експресия на основни проинфламаторни фактори в проучването внушават значима стойност на оценката на тези фактори в определяне на диагнозата на индивиди с хроничен пародонтит. Настоящото изследване значимо обогатява литературните данни за популацията като оценява както детекцията на пародонтопатогените (*A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *T. denticola*) в пародонталните джобове с различни дълбочини (до 4мм, 4-6мм и над 6мм),

така и генната експресия на два от значимите в патогенезата на пародонтита цитокини (IL-6 и TNF- $\alpha$ ) в гингивалните тъкани. Освен това са получени данни за генния полиморфизъм на таргетни цитокини (TNF-A (G-308A), IL-6 (G-174C), IL-6 (G-597A) и LT-A (A+252G). Данните от литературата са твърде малко в търсенето на по-тесни взаимовръзки между нивата на експресирани цитокини, състава на субгингивалната дентална плака, съпоставимо освен това с дълбочината на джоба и с тежестта на пародонталното заболяване. Не намерихме данни да е направено подобно изследване в България.

Проучвания върху значимостта на генетичните фактори за хроничния пародонтит в реферираната литература не дават ясен отговор за значимостта и механизмите на влияние на присъствието на полиморфизъм за инфламаторни цитокини върху експресията на хроничния пародонтит. В направеното от нас изследване честотата на генния полиморфизъм на LT-A (A252G) беше установено да се увеличава при пациентите с тежък хроничен пародонтит. Противоречивите засега данни от литературата дават основание да се предприемат изследвания върху генни полиморфизми на важни цитокини, за които се знае, че са въввлечени в протективно-деструктивния имунен отговор при пародонталните заболявания.

Получените резултати при настоящото проучване предизвикват с необходимост от по-широко разгръщане на проблема, сериозна дискусия и са повод за още по-голям интерес в бъдеще.

## ИЗВОДИ

Изследванията в настоящия дисертационен труд са фокусирани върху клиничната експресия, микробиологичната находка и биохимични характеристики на хроничния пародонтит с интерес към тежката деструкция на пародонт в някои случаи на манифестация на заболяването.

Целта на проучванията е изследване на връзката между клиничните параметри и специфичността на инфекцията, както и тежестта на загубата на пародонтални структури, свързана с индивидуалния отговор на организма.

Резултатите и изводите от проучванията в дисертационния труд допринасят за допълнително характеризиране на присъствието и нивата на пародонтопатогените в пародонталния джоб при хроничен пародонтит. Характеризирането на микробната находка съответно на тежестта на лезията в проучването е полезно за диагностичния протокол при хроничен пародонтит с диференциране на индикациите и интерпретацията на данните от микробиологичния анализ.

Едновременното характеризиране на локалния отговор към нивата на пародонтопатогените в дълбоките пародонтални джобове в това проучване осигурява данни за значимостта на отговора на организма в деструктивния процес при пародонтит. Оценката на гена експресия на два от значимите в патогенезата на пародонтита цитокини (IL-6 и TNF- $\alpha$ ) в гингивата, прилежаща на джобове с голяма дълбочина показва значимостта на бактериалния товар и присъствието на специфични пародонтопатогени във високи нива за предизвикване на деструктивен отговор локално.

Изследванията на генетична предиспозиция при хроничен пародонтит в дисертационния труд с установяване на присъствието на генен полиморфизъм и корелация със степента на загуба на пародонтални структури обосновава необходимост от допълнителни изследвания при пациентите с тежък хроничен пародонтит за детайлна диагноза на заболяването с откриване на значими патогенетични фактори за планиране на адекватен контрол.

Резултатите, получени в проучванията в дисертационния труд и статистическият им анализ позволяват да се направят следните изводи:

1. Резултатите показват, че загубата на аташман и кървенето при сондиране са с важна диагностична стойност във връзка с тежестта на заболяването при тежък хроничен пародонтит.
2. Изследванията демонстрират здравата връзка между пародонталните патогени и пародонтита.
3. Направена е идентификация на представители на *Candida spp.* в субгингивални проби от дълбоки пародонтални джобове.
4. Проучването показва, че генната експресия на IL-6 и TNF- $\alpha$  има значима връзка с възрастта и пола, и корелира значимо с:
  - количеството на пародонталните патогени *P. gingivalis* и *T. Denticola*;
  - основните клинични и рентгенологични параметри;
  - тежестта на пародонтита.
5. Данните показват обвързване на тежестта на пародонтита при присъствие на генен полиморфизъм на IL-6 (G-174C), IL-6 (G-597A), TNF-A (G-308A) и LT-A (A252G), свързан с хомозиготните по алел G индивиди (GG).
6. Изследването показва, че основният генен показател, който би могъл да се квалифицира като предиктор на тежестта на пародонтита е полиморфизма на LT-A (A252G).
7. Резултатите от проучването подкрепят значимостта на тютюнопушенето като рисков фактор за тежкия хроничен пародонтит.

Изводите от проучванията в дисертационния труд са в основата на създаването на протокол на диагноза при хроничния пародонтит, който да включва откриване на допълнителни характеристики на отговора на организма при пациентите с тежък хроничен пародонтит.

## ПРИНОСИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

### Приноси с оригинален характер, касаещи българска популация:

1. Проучването предоставя допълнителни данни, отнесени до детекцията на пародонтопатогените (*A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *T. denticola*) в пародонталните джобове с различни дълбочини (до 4мм, 4-6мм и над 6мм) при пациенти с хроничен пародонтит.
2. Изследването показва повишена продукция на IL-6 и TNF- $\alpha$  в гингивалните тъкани при пациенти с хроничен пародонтит.
3. Направена е оценка на взаимовръзката между генната експресия на IL6 и TNF от една страна и фактори на пациента - възраст и пол.
4. Установена е взаимовръзка между нивата на пародонтопатогените и генната експресия на два от значимите в патогенезата на пародонтита цитокини (IL-6 и TNF- $\alpha$ ).
5. Значими различия се установяват относно генната експресия (изразена като dCt) на IL6 между пробите, взети от изследваните плитки джобове ( $\leq 4$  мм) и дълбоките места ( $> 6$  мм), както за TNF при местата с умерена и голяма дълбочина (4 – 6 мм /  $> 6$  мм) (**p<0.06**).
6. Установени са значими взаимовръзки между генната експресия на IL-6 и TNF- $\alpha$  и показателите кървене при сондиране и костна загуба (**p<0.06**).
7. Установено е, че присъствието на рисковия фактор тютюнопушене е свързано с по-високи стойности на изследваните параметри (дълбочина на джоба при сондиране и загуба на прикрепване) и различия в генната експресия на IL-6 и TNF $\alpha$ .
8. Данните от изследването на генен полиморфизъм на **IL-6 174C**, **IL-6 -597** и **TNF-A 308** показват асоцииране на генотип GG (хомозиготните по алел G – индивиди) с хроничния пародонтит при изследваната група.
9. За предикция на **тежестта на пародонтита** може да се използват данните за генния полиморфизъм на **LT-A (A252G)** (**p=0.02**).

### Приноси с потвърдителен характер:

1. Резултатите от настоящото изследване потвърждават характера на умерения и хроничен пародонтит като заболяване, основно свързано с нивата на пародонтопатогените субгингивално.
2. Потвърждава се здравата връзка на микроорганизмите от червения и оранжевия комплекс с етиологията и патогенезата на хроничния пародонтит.
3. Установената статистически достоверна зависимост на загубата на аташман (CALcp) от разпространението на параметъра BoP (**p=0.002**) потвърждава данни от други изследвания в литературата за това, че кървенето при сондиране има диагностична стойност в определяне на рисковия профил на пациентите с хроничен пародонтит.
4. Статистически достоверните данни (**p=0.001**) за зависимост на костната загуба от BoP (разпространение на кървящите места) потвърждават значимостта на процента на кървящите места за тежестта на пародонтита, изразена и чрез загубата на кост.
5. Получените данни потвърждават значимостта на изследваните цитокини във връзка с тежестта на хроничния пародонтит.

**Приноси с практично-приложен характер:**

1. Приложен е алгоритъм за диференциран подход на допълнителна диагноза в мониторирането на тежък хроничен пародонтит с данни за бактериалната находка, възпалителни медиатори и генетични фактори.

## НАУЧНИ ПУБЛИКАЦИИ И СЪОБЩЕНИЯ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

### 1. Научни публикации

- **Хр. Попова, В. Досева, Вл. Панов.** Микробиологичен анализ при диагностика и мониторинг на пародонталните заболявания - PЕТ тест. II-ри Научен Конгрес на БЗС – СК, гр. София, 13-14 октомври 2012г. Сборник публикации. Стр. 37-39.
- **Chr. Popova, V. Dosseva-Panova, Vl. Panov.** Clinical and microbiological data in patients with chronic periodontitis. Journal of IMAV, 2013, vol.19, issue 4, p.313-316.
- **Chr. Popova, A. Kisselova-Janeva, V. Dosseva-Panova, Vl. Panov.** Subgingival microbiota in severe chronic periodontitis. Journal of IMAV, 2014, vol.20, issue 3, p 554-557. Публикация
- **Досева-Панова, Хр. Попова, А. Киселова-Янева, Вл. Панов.** Идентификация на *Candida spp.* при пациенти с хроничен пародонтит. III-ри Научен Конгрес на БЗС – СК, гр. София, 23-24 ноември 2013г. Сборник публикации. 29-33стр.

### 2. Доклади на научни конгреси

- **Хр. Попова, В. Досева, Вл. Панов.** Микробиологичен анализ при диагностика и мониторинг на пародонталните заболявания - PЕТ тест. II-ри Научен Конгрес на БЗС – СК, гр. София, 13-14 октомври 2012г. Постер
- **В. Досева-Панова, Хр. Попова, А. Киселова-Янева, Вл. Панов.** Идентификация на *Candida spp.* при пациенти с хрониче пародонтит.. III-ри Научен Конгрес на БЗС – Столична колегия, гр. София, 23-24 ноември 2013г. Постер
- **V. Dosseva-Panova, A. Mlachkova, Chr. Popova, M. Kicheva.** Evaluation of interleukin-6, Lymphotoxin-alpha and TNF- $\alpha$  gene polymorphisms in chronic periodontitis. 25-th Jubilee Annual Assembly of International Medical Association Bulgaria (IMAB)14 - 17 May 2015, Varna, Bulgaria, Poster

## УЧАСТИЯ В ПРОЕКТИ

1. Субгингивален микробиологичен профил във връзка с активността на деструкцията (експресия на IL-6 и TNF- $\alpha$ ) при хроничен пародонтит Проект № 11, финансиран от Медицински университет - София, Грант, Договор № 1, от 17.07.2012г. Научният отчет е приет с **Отлична** оценка по скалата на СМН. Присъдена е **наградата "Signum laudis pro scientiae meritis"** за най-успешна научна разработка в научна област Дентална медицина, финансирана от Медицински университет – София чрез конкурс „Грант” през периода 2012-2013г.
2. Идентификация на *Candida spp.* и суспектни пародонтални патогени при пациенти с тежък хроничен пародонтит - София, Грант, Проект №8, Договор № 13/2013 г. Научният отчет е приет с **Висока** оценка по скалата на СМН.
3. Присъствие на генен полиморфизъм за основни инфламаторни цитокини (интерлевкин-6 (IL-6) - алел IL-6-174 и G-597A, тумор некротизиращ фактор алфа (TNF- $\alpha$ ) – алел -308, и лимфотоксин алфа (LT- $\alpha$ )) във връзка с хроничен пародонтит - София, Грант, Проект №5, Договор №16/2014г. Научният отчет е приет с **Отлична** оценка по скалата на СМН.