ОПРЕДЕЛЯНЕ НА КОНЦЕНТРАЦИИТЕ НА НЯКОИ МАРКЕРИ НА ВЪЗПАЛЕНИЕ И ДЕСТРУКЦИЯ В СЛЮНКА И ГИНГИВАЛЕН ЕКСУДАТ ЗА ДИАГНОЗА НА ПАРОДОНТАЛНИТЕ ЗАБОЛЯВАНИЯ

Т. Болярова и С. Петкова

Факултет по дентална медицина, МУ – София

DETERMINATION OF CONCENTRATION LEVELS OF SOME MARKERS OF INFLAMMATION AND DESTRUCTION IN SALIVA AND GINGIVAL EXUDATE FOR DIAGNOSING PERIODONTAL DISEASES

T. Bolyarova and S. Petkova

Faculty of Dental Medicine, Medical University – Sofia

Резюме. *Пародонтитът е хронично възпалително заболяване, засягащо пародонта и водещо до прогресивна загуба на аташман и кост. Неговото разпространение в популациите в световен мащаб варира от 6 до 50%. Конвенционалните методи за диагностика на пародонтита най-често включват измерване на дълбочината на джобовете, клиничната загуба на аташман, кървене при сондиране и рентгенографски данни за загуба на кост. Тези данни отразяват по-скоро тежестта на пародонтита и настъпилите промени в резултат от развитието на заболяването в минало време, а не дават оценка на активността на заболяването в момента на изследване. Възниква необходимост от въвеждане на нов диагностичен подход с възможности за определяне на промените, които се случват в определен момент в пародонталния комплекс, за предвиждане на риска от прогресия на заболяването на индивида и на определено място, за обосноваване на индивидуален подход в лечението и мониторирането на пародонталното заболяване. В съвременните проучвани оралните течности – гингивална кревикуларна течност и слюнка, се използват като диагностични субстрати за откриване на биомаркери. В обзора се разглежда асоциацията на биомаркерите, съдържащи се в слюнката и гингивалния ексудат, с три важни биологични фази на пародонталните заболявания – възпаление, деструкция на съединителната тъкан и костния метаболизъм. Количественото определяне на тези биомаркери е с потенциална диагностична значимост. Едновременното отчитане на клинични показатели и комбинация биомаркери би довело до ранно поставяне на диагноза, индивидуално съобразено лечение и контрол на пародонталното заболяване.*

Ключови думи: *пародонтално заболяване, биомаркери, диагноза*

Summary. *Periodontitis is a chronic inflammatory disease affecting periodontium and leading to progressive loss of attachment and bone. Its prevalence ranges from 6% to 50% in population worldwide. Conventional methods for diagnosing periodontitis most often include measuring pockets' depth, clinical attachment loss, bleeding on probing and radiographic evidence of bone loss. These data reflects rather severity of periodontitis and the changes due to progression of the disease in the past than provide an assessment of disease activity at the time of study. There is a need to introduce a new diagnostic approach with opportunities to identify changes that occur at some point in periodontal complex in order to predict the risk* *of disease progression of the individual and at definite place, to justify the individual approach in treatment and monitoring of periodontal disease. Current researches use oral fluids – gingival crevicular fluid and saliva as diagnostic substrates for detecting potential biomarkers for periodontal diseases. Saliva components and gingival exudate have been discussed in this review associating with three important biological phases of periodontal disease – inflammation, connective tissue destruction and bone metabolism. The determination of the amount of these components is of potential diagnostic significance. Concurrent recording of clinical parameters and a combination of biomarkers would lead to early diagnosis, individually-reckoned treatment and control of periodontal disease.*

Key words: *пародонтално заболяване, биомаркери, диагноза*

Пародонтитът е хронично възпалително заболяване, засягащо пародонта и водещо до прогресивна загуба на аташман и кост [5]. Неговото разпространение в популациите в световен мащаб варира от 6 до 50% [69].

В съвременната литература пародонтитите се разглеждат като инфекциозни заболявания, предизвикани от бактериалния биофилм, адхериран по зъбната коренова повърхност [16].

Пародонтитите са семейство заболявания, чиито основни патогенетични механизми при изследваната съединителна тъкан и кост са описани от Page (1998) [70]. Съвременната концепция е, че субгингивалният биофилм пропагира апикално в гингивалния сулкус, нарушавайки връзката между коронарната част на свързващия епител и зъба. Свързващият епител се превръща в епител на джоба – образува се пародонтален джоб, при който единствената бариера между бактериалния биофилм и съединителната тъкан е тънкият, на места улцерирал джобен епител, през който бактериалните продукти (като липополизахариди – LPS) и бактериите намират достъп до съединителната тъкан и кръвоносните съдове [70]. Отделените липополизахариди и други вирулентни фактори предимно от Грам-отрицателните микроорганизми от субгингивалния биофилм активират клетките на свързващия и на сулкуларния епител да се делят и да секретират провъзпалителни медиатори, включително IL-8, IL-1β, които привличат и активират неутрофили. Кръвоносните съдове на микроциркулацията стават възпалени и високопропускливи. Ендотелните клетки също се активират. В резултат на това първо неутрофили, а след това и моноцити и лимфоцити мигрират през съдовата стена в извънсъдовото пространство, където образуват възпалително-клетъчния инфилтрат. Инфилтриралите моноцити се активират от липополизахаридите и интерферон-γ (IFN-γ) за секреция на IL-1β, TNF-α, PGE_2 и матриксметалопротеинази (MMP – голяма група ензими, които разграждат колагена и всички компоненти на съединително-тъканния екстрацелуларен матрикс). В патогенезата на пародонтитите се включват клетъчният и хуморалният имунен отговор. Инфилтрираните Т- и В-лимфоцити се активират от различните бактериални антигени и от цитокини и започват да секретират интерлевкини (IL-2, -3, -4, -5, -6, -10) и IFN-γ. Разширяват се Т-клетъчните клонове и се диференцират В-клетки в антитяло-произвеждащи плазматични клетки. IFN-γ индуцира и увеличава продукцията на простагландин E_2 (PGE_2) и матриксметалопротеинази (MMP), а тези молекули медиират деструкцията на екстрацелуларния матрикс на гингивата и пародонталния лигамент и резорбцията на алвеоларната кост [81].

Пародонталните заболявания често се съпътстват от транзиторна бактериемия, която се изразява в навлизането на много микроорганизми и техни продукти (вкл. липополизахариди (LPS) в кръвната циркулация [37, 57, 94] , където те могат да активират директно левкоцити, тромбоцити или ендотелни клетки. Пародонталната лезия се смята за продължително обновяващ се източник за системно разпространение на бактериални антигени, Грам-отрицателни бактерии, които водят до активиране на локалната и системната имунна защита на макроорганизма, свързано с увеличаване продукцията на множество провъзпалителни фактори (цитокини, химиокини) и медиатори на тъканна деструкция [22, 41, 51,74].

Изследвания, публикувани през последните десетилетия, подкрепят съществуването на връзка между пародонталните и множество системни заболявания като сърдечно-съдови, белодробни, диабет, усложнения на бременността и др. [1, 23]. Тези връзки между пародонтални и системни заболявания вероятно се медиират от общи механизми в патогенезата, от които с най-голямо значение са [47]:

– директно включване на бактериите от пародонталната инфекция в патогенетичните процеси на общото заболяване [33];

– включване на възпалителните медиатори на макроорганизма, резултат от пародонталното заболяване, в патогенетичните процеси на общото заболяване [8, 42].

Въз основа на редица епидемиологични, експериментални и клинични проучвания, консенсусен доклад на съвместен семинар на Европейската федерация по пародонтология и Американската академия по пародонтология (2013) определя важността на връзката между пародонтални и системни заболявания и значението на лечението и превенцията на пародонталните заболявания [90].

Конвенционалните методи за диагностика на пародонтита най-често включват измерване на дълбочината на джобовете, клиничната загуба на аташман, кървене при сондиране и рентгенографски данни за загуба на кост. Тези данни отразяват по-скоро тежестта на пародонтита и настъпилите промени в резултат от развитието на заболяването в минало време, а не дават оценка на активността на заболяването в момента на изследване [6]. Не могат да определят чувствителните към пародонтит индивиди, да диагностицират началото на патологичните процеси, да прогнозират местата на следваща деструкция [44] и са свързани с изразходване на много време [73].

Основният етиологичен фактор за пародонталните заболявания е бактериалната плака, но диагностичните тестове, определящи важни пародонтопатогени, също самостоятелно не са достатъчно чувствителни за успешно предсказване на пародонтит, защото е важен и отговорът на организма [53, 92].

Очертава се необходимостта от въвеждане на нов диагностичен подход с възможности за определяне на промените, които се случват в определен момент в пародонталния комплекс, за предвиждане на риска от прогресия на заболяването на индивида и на определено място, за обосноваване на индивидуален подход в лечението и мониторирането на пародонталното заболяване.

Оралните течности – гингивална кревикуларна течност и слюнка, се използват като диагностични субстрати за откриване на биомаркери.

Биомаркерите са субстанция, която е измерена обективно и е оценена като индикатор на нормален биологичен процес, патогенетичен процес или фармакологичен отговор към терапевтична интервенция [10].

Ранни изследвания използват гингивалната кревикуларна течност, в която се изследват предимно присъствието и количеството на ензими, свързани с деструкцията на пародонталния комплекс и с произхода, функцията и количеството на клетъчните компоненти [17]. С въвеждането на нови лабораторни методи, гингивалната течност се изолира и изследва все по-интензивно за присъствието на фактори на отговора на организма, включително компоненти от кръвта и от локалните тъкани на пародонта, както и на фактори от плаковия биофилм [7]. Гингивалната кревикуларна течност е в ниско количество при пародонтално здраве и се увеличава като количество и се обогатява на молекули на възпалението при пародонтално заболяване [7]. Тя има множество диагностични предимства, тъй като възпалителните медиатори и тъканнодеструктивните молекули, които се свързват с пародонтит, могат да се открият в гингивален ексудат. Заедно с това, тя има и недостатъци, когато се използва като диагностичен субстрат. Тази течност отразява процесите, които настъпват на определеното пародонтално място, затова за пълна информация тя би трябвало да се събира около всеки зъб. Събира се с филтърна хартия или микропипета, което изразходва време. Процедурата е технически трудна, като изисква лабораторно оборудване, калибриране, измерване на флуидни обеми. Анализът е скъп, защото трябва да се оцени всяка проба поотделно, необходимите анализи са лабораторни и не биха могли да се извършат около стола на пациента [55].

Съвременни изследвания използват слюнката като субстрат с потенциални диагностични възможности. Анализът на слюнка има своите преимущества. Събирането на слюнка е лесно, неинвазивно и бързо. Слюнката обаче представлява сборна проба от всички пародонтални места и дава оценка на пародонталното заболяване в съзъбието или определя риска на ниво субект, а не на ниво място или зъб, както е при гингивалния ексудат.

Определянето на нивата на евентуални специфични биомаркери обаче би дало възможност на лекуващите да диагностицират наличието на заболяване, да определят нуждите от лечение или нуждите от специфично лечение. Слюнката би могла да се използва за диагностика не само на пародонтални заболявания и зъбен кариес, но и на системни заболявания [48].

Целта на много изследвания е да се използва слюнката като диагностична среда за определяне на орално и системно здраве или болест. Съвременните познания в тази област показват, че биомаркерите на пародонта отразяват биологията на заболяването; налични са в по-големи количества в слюнката на пациенти с пародонтално възпаление и тъканна деструкция; отразяват тежестта на възпалението и тъканната деструкция; отразяват промяната в отговора на терапията; все още не участват в стандартния процес на диагностика и лечение, защото не са достатъчни проучванията в тази област [20, 25, 50, 60, 77, 86].

Много компоненти на слюнката се свързват с пародонталния статус. Това са най-често компоненти на макроорганизма – цитокини, химиокини, ензими, имуноглобулини и др. Съвременните изследвания се фокусират около компоненти, които имат потенциална диагностична значимост, свързана с три важни биологични фази на пародонталното заболяване – възпаление, съединителнотъканна деструкция и костен метаболизъм. Компонентите на слюнката и гингивалния ексудат, които най-често се свързват с възпаление, са: IL (interleukin)-1α, IL-1β, IL-6, IL-8, MCP-1, monocyte chemotactic protein 1, GM-CSF (granulocyte–macrophage colony-stimulating factor), IL-12p40, PGE_2 (prostaglandin E_2). Тези, които най-често се свързват с тъканна деструкция, са MMP (matrix metalloproteinase)-1, 2, 3, 8, 9, 11, 13, 25, TIMP-1, 2 (tissue inhibitor of metalloproteinase), fibronectin. Тези, които най-често се свързват с костния метаболизъм, са osteocalcin, osteonectin, osteoprotegerin, D-pyridinium (ICTR), Mip-1a (macrophage inflammatory protein-1alpha), alkaline phosphatase, α2-HS-glycoprotein, biglycan, bone sialoprotein [20].

Известно е, че съществуват вариации в оценката на биомаркерите при здраве както при отделния човек в различни дни, така и между различните индивиди [88]. Използването на комбинация от биомаркери от различни групи (маркери, свързани с възпаление, маркери, свързани с деструкция, микробиологични маркери, геномни маркери и др.) би имало по-добри диагностични възможности. Търсенията в тази област продължават.

Развитието на слюнчената диагностика се свързва с новите технологии като „lab-on-a-chip" и средствата на основата на микрофлуиди, които биха имали потенциала да използват оралните течности – слюнка и гингивален ексудат, като диагностични субстрати за бързо определяне на рисковия профил по отношение на пародонтално заболяване, на болестната активност в момента и на отговора към терапията [25]. Развитието на продукти „point-of-care" (за приложение в клинични или в домашни условия), използващи слюнка, са в полза на бързата диагностика и на редица общомедицински заболявания [60].

Маркери на възпаление на тъканите на пародонта

Цитокините са разтворими протеинови молекули, които пренасят сигналите от едни клетки към други [3]. Цитокините играят ключова роля в инициирането и поддържането на имунния и възпалителния отговор в патогенезата на пародонталните заболявания чрез стимулирането на вторични медиатори. Тези медиатори провокират последователни процеси, които увеличават възпалителния отговор и водят до продукция на ензими, отговорни за деструкция на съединителна тъкан и костна резорбция. Един провъзпалителен цитокин, който играе важна роля в хроничното възпаление, е интерлевкин-1 – бета (IL-1β). IL-1β се произвежда от множество клетки, включително моноцити, полиморфонуклеарни неутрофили, фибробласти, епителни, ендотелни клетки и остеобласти [28,71].

IL-1β стимулира ензими, необходими за производството на простагландин E_2 (PGE_2), стимулира производството на химиокини [18] и има отношение към активирането и инхибирането на металопротеинази [66]. IL-1β предизвиква остеокластогенеза, която има за резултат костна загуба [28]. Множество „case-control" „cross-sectional" и „longitudinal" изследвания показват, че IL-1β в слюнка и в гингивален ексудат се увеличава по количество при пародонтални заболявания [21, 32, 38], отразява прогресията на пародонталните заболявания [32]. Слюнченият IL-1β се свързва по дозозависим начин с тежестта на пародонталното заболяване и се редуцира след инициална фаза на пародонтално лечение [40].

Макрофагеален възпалителен протеин 1 алфа (MIP-1α) –произвежда се от макрофаги след стимулация от бактериален ендотоксин. Отнася се към химиотаксисни цитокини или химиокини. Той предизвиква остър възпалителен ефект и се включва в синтеза и разпределението на други проинфламаторни цитокини, като IL-1, IL-6 и TNF-α (тумор-некротизиращ фактор алфа). Слюнчената концентрация на този MIP-1α при лица с умерен или тежък хроничен пародонтит е 18 пъти по-висока при пациенти в сравнение със здрави лица [2], което го определя като маркер с възможности за диференциация на пародонтално заболяване от здраве.

Тумор-некрозис фактор алфа (TNF-α) – произвежда се от макрофаги и играе роля в системния възпалителен отговор. При пародонталните заболявания има способността да инхибира синтеза на колаген в костта и индуцира колагеназна активност [28, 60]. Количеството му се увеличава в слюнката при генерализиран хроничен пародонтит и се променя след нехирургична пародонтална терапия [77].

Други изследвания не подкрепят използването на слюнчения TNF-α като биомаркер за пародонтални заболявания, тъй като не се открива статистически значима разлика в концентрацията му при пациенти с хроничен пародонтит и контролни здрави лица или TNF-α се открива в много ниски нива в слюнката [68, 93].

Маркери на деструкция на съединителната тъкан

Матриксните металопротеинази са семейство протеинази, които действат в нормални физиологични условия, като осъществяват тъканно ремоделиране, но действат и по време на пародонтална деструкция, като разграждат колагена на съединителната тъкан и алвеоларната кост и водят до прогресия на пародонталното заболяване. Матриксните металопротеинази са основно протеинази на макроорганизма. Те се произвеждат от кератиноцити, фибробласти, клетки на пародонталния лигамент, циментобласти, остеобласти и остеокласти, както и от клетки на възпалението и имунитета, като неутрофили, моноцити, макрофаги и плазматични клетки [25, 48].

Увеличени нива на **матриксметалопротеиназа-8 (MMP-8) (колагеназа-2)** се откриват при гингивит, непрогресиращ и прогресиращ пародонтит [11, 61]. Увеличената колагеназна активност в гингивална течност и увеличени нива на MMP-8 превалират над протективните възможности на тъканния инхибитор на матриксметалопротеиназа-1 на местата с активно заболяване/нетретирани места в сравнение с неактивните места при пародонтит и при здрави лица [82]. Успешна пародонтална терапия и допълнителна медикация с инхибитори на матриксметалопротеинази показват спиране на прогресията на пародонтита и редуциране на нивата на матриксметалопротеинази в оралните течности – гингивален ексудат и слюнка [82]. Концентрацията на MMP-8 в слюнката е в положителна корелация с клиничните показатели – кървене при сондиране, загуба на клиничен аташман и дълбочина на пародонталния джоб [30, 75]. След механична пародонтална терапия (SRP) се наблюдава статистически значима редукция в слюнчените нива на MMP-8 [43]. MMP-8 се определя като един от най-сигурните биомаркери за отчитане на активността на пародонталното заболяване [77, 82]. MMP-8 се счита и за един от биомаркерите, показващи алвеоларна костна деструкция [31].

Съвременната диагностика, използваща „point of-care" микрофлуидни продукти, открива високи нива на MMP-8 в слюнка при пациенти с пародонтални заболявания [14, 35]. Използването на „lab-on-a-chip" методите за установяване нивата на interleukin-1beta (IL-1beta) и matrix metalloproteinase-8 (MMP-8) в цялостна слюнка допринася за поставянето на по-точна пародонтална диагноза в сравнение с конвенционалната диагностика, а количествата, които се откриват, са близки до тези, открити със стандартните ELISA техники [14].

Нивото на MMP-8 е повишено и в периимплантна сулкуларна течност при периимплантни лезии, което е от много голяма диагностична значимост, защото тази матриксметалопротеиназа е единствената, която се открива на местата с периимплантит при прогресираща костна загуба [4, 45].

Матриксметалопротеиназа-9 (MMP-9) (желатиназа-9) е друга матриксметалопротеиназа, която се произвежда от неутрофили [25].

Има желатинолитична активност и разрушава екстрацелуларните матриксни протеини, включително тип IV колаген. MMP-9 при пародонтит се свързва с тъканната деструкция и имунния отговор [56, 75, 81]. Нейното количество в гингивален ексудат е установено като двукратно по-високо при пародонтални лезии, показващи прогресия, като течността се събира чрез изплакване на устата и изплюване и оценката не е за мястото, а се отнася за субекта [87].

MMP-9 показва увеличени нива в слюнката при клинично изявен пародонтит и редуцирани нива при клинично стабилни състояния и след нехирургично пародонтално лечение [59, 67].

Неутрофилната колагеназа (MMP-8) и желатиназа (MMP-9) са ензими, които биха могли да се използват като диагностични тестове, защото: очевидно имат централна роля в загубата на пародонтален аташман и прогресията на заболяването; демонстрира се положителна връзка между ензимните нива и загубата на аташман и възпалението; съществуват чувствителни и специфични методи за количествено определяне на тези ензими [58].

Аспартатаминотрансфераза (AST) е разтворим ензим, който се намира в клетъчната цитоплазма. По време на активната фаза на пародонталното заболяване клетките умират и аспартатаминотрансфераза се освобождава в заобикалящите тъкани, което я прави значим маркер за отчитане на болестна активност [72]. Прогресията на пародонталното заболяване, което се дефинира чрез увеличаване на дълбочина на пародонталния джоб, клинична загуба на аташман, гингивално кървене, супурация, се свързва с увеличени нива на слюнчената аспартатаминотрансфераза [91]. Отчита се и статистически значима разлика в слюнчените нива на аспартатаминотрансфераза при пациенти с пародонтит в сравнение с тези с гингивит и здрави лица [49, 54]. AST е възможен биомаркер за отчитане състоянието на тъканите на пародонта и дава възможности за диагностика [54].

Колагеназа-3, или MMP-13, е друга колагенолитична протеиназа с широка субстратна специфичност. MMP-13 се произвежда от фибробласти, лимфоцити, макрофаги, плазматични и базални клетки на сулкуларния епител. Увеличени нива на MMP-13 се откриват в гингивални биопсии при пациенти с хроничен пародонтит и те корелират с тежестта на заболяването [64]. MMP-13 се открива в значително по-големи количества в гингивален ексудат при хроничен пародонтит в сравнение със здрави лица и в значително по-големи количества в активните места при прогресиращо пародонтално заболяване, което е в подкрепа на значението ѝ за костната загуба. Тя би могла да се използва за диагноза и определяне на хода на пародонталното заболяване, както и за проследяване на ефикастността на терапията [34]. Не открихме изследвания, показващи нейното присъствие в слюнка и евентуално промяна в количеството ѝ.

Маркери на деструкцията на алвеоларна кост

Загубата на алвеоларна кост е от критично значение за прогресията на пародонтита и нарастват доказателствата за важността на взаимодействията между костния метаболизъм и възпалението [85]. Остеокластогенезата се регулира от три белтъка: RANKL (Receptor Activator of Nuclear Factor-B Ligand), RANK (Receptor Activator of Nuclear Factor-kB) и OPG (Osteoprotegerin). RANKL се експресира като мембранно свързан протеин (mRANKL) или в разтворима форма (sRANKL) от остеобластите. Когато RANKL се свърже с неговия рецептор RANK върху преостеокластни клетки, той предизвиква стимулиране на диференциация и пролиферация на остеокласти [36].

Остеопротогерин (OPG) е циркулиращ протеин, произвеждан от множество клетъчни видове, включително остеобласти, стромални клетки на костния мозък, който инхибира образуването на остеокласти чрез свързване с RANKL. По този начин предотвратява стимулиращото въздействие върху преостеокластите и инхибира взаимодействията RANKL/RANK. Тези три протеина са от съществено значение за диференциацията на остеокластите, направлявана от остеобласти [36]. За RANKL се съобщава, че се увеличава в гингивална течност на местата с активно пародонтално заболяване [7].

OPG е по-често изследван като слюнчен компонент във връзка с пародонтален статус. Найобщо може да се каже, че при пародонтит слюнчената концентрация на RANKL се увеличава, а тази на OPG намалява [9]. Изследване показва намаляване на концентрацията на остеопротегерин при пародонтит в сравнение със здраве [75]. Слюнченият остеопротегерин се свързва с клиничния статус при пародонтални заболявания и концентрациите му значително се редуцират след пародонтална терапия в сравнение с началните стойности [43, 77]. Този компонент в комбинация с други маркери за деструкция на съединителната тъкан, ако се проследи в хода на заболяването, може да се обмисля като предсказващ активност на пародонталното заболяване [48].

За този компонент на слюнката обаче има изследвания, които не показват връзката му с пародонтит, когато той е изследван самостоятелно, а не в комбинация с RANKL [2, 61].

Резултатите от анализи на **съотношението RANKL/остеопротегерин** в биопсичен материал от тъкани на пародонта показват увеличаване при хроничен пародонтит в сравнение с това при здрави лица [15, 19].

Има три изследвания на едновременно отчитане на остеопротегерин и RANKL в слюнка [13, 83, 89]. Две от тези изследвания показват значително увеличаване на нивата на RANKL при пародонтит в сравнение с пародонтално здраве [83, 89] и едно демонстрира намаляване на концентрацията на остеопротегерин при пародонтит [89]. Открива се обаче статистически значимо увеличаване на съотношението RANKL/OPG в слюнка при пациентите с хроничен пародонтит в сравнение със здравите лица [83, 89].

Може да се обобщи, че съотношението RANKL и неговия естествен антагонист OPG е важно в определяне на костната резорбция и костния обмен [46, 63] и това съотношение се увеличава при пародонтит [15,19, 83, 89].

Много различни биомаркери се свързват с костното формиране, резорбция и обмен. От тях изследвани в гингивалната кревикуларна течност и слюнката са и алкална фосфатаза, osteocalcin, osteonectin и collagen telopeptidases [44]. Тези медиатори се свързват с локалния костен метаболизъм при пародонтит, но и със системни състояния като остеопороза или костни метастази.

Pyridinoline cross-links са перспективни биомаркери за костна резорбция при множество остеолитични заболявания. Pyridinoline (hydroxylysil pyridinoline, или Pyr) и deoxypyridinoline (lysyl pyridinoline, или Dpy), N-telopeptides и C-telopeptides са най-добре проучени членове на този клас молекули, получени след колагеново разграждане. Остеокластната костна резорбция води до освобождаване на омрежени имунореактивни телопептиди Pyr и Dpy [27]. Изследвана е възможността на тези молекули да отразят костна деструкция в пародонталния комплекс.

Клинични и експериментални изследвания показват корелация между нивото на **C-telopeptide** в гингивален ексудат и клинични и рентгенографски параметри [24, 80, 84]. Специфични за костната деструкция биомаркери като **pyridinoline cross-linked carboxyterminal telopeptide of type I collagen (ICTP)** могат да бъдат разпространени в тъканите, заобикалящи костта, след това могат да бъдат пренесени чрез гингивалната кревикуларна течност в пародонталния джоб и в устната кухина, така че да станат компонент на слюнката. Carboxyterminal telopeptide of type I collagen (ICTP) е специфичен за деструкцията на алвеоларната кост и се смята за индикатор за разграничаване между пациенти с гингивит и такива с активна пародонтална костна деструкция. Счита се, че увеличени нива на ICTP в гингивален ексудат отразяват костната деструкция и активността на пародонталното заболяване [26]. Слюнчените нива на ICTP показват връзка с пародонталните клинични параметри [30]. Увеличени слюнчени нива на ICTP се откриват при лица с пародонтит в сравнение с контроли (здрави лица), но по-силна връзка се установява, когато този маркер се комбинира с MMP-8 [30]. ICTP се открива в значимо по-голямо количество в слюнка от пациенти с пародонтит в сравнение с тези с гингивит и със здрави лица, което дава основание слюнчените му нива да се обсъждат като биомаркер за прогресията на пародонталното заболяване [62]. ICTP има потенциала да показва следваща костна резорбция и загуба на аташман. Той се редуцира значително след пародонтална терапия [84]. Като се имат предвид специфичността и чувствителността за установяване на костна резорбция, pyridinoline cross-linked carboxyterminal telopeptide of type I collagen в слюнка показва потенциални възможности за диагностика на пародонталните заболявания [25].

Има и противоречиви резултати, при които не се открива ICTP в слюнка, при пациенти с пародонтално заболяване, което вероятно се дължи на инхибирането на сигнала от слюнката [68]. При друго изследване ICTP се открива само при шест лица от контролна група, включваща общо 40 лица, и при един пациент с пародонтит, от изследвани 40 пациенти. Тези данни са малко, за да се обсъжда разлика в нивата между групите, но показват трудности в регистрирането на ICTP в слюнка [2].

Osteocalcin е малък калций-свързващ протеин на костта и е най-разпространеният неколагенов протеин на минерализираната тъкан [52]. Увеличени нива на остеокалцин се откриват по време на усилен костен метаболизъм, при остеопороза, мултиплен миелом, оздравяване на фрактура [25]. Когато остеокалцин се използва в комбинация с биохимични маркери като колагеназа, простагландин E_2, α-2 макроглобин, еластаза и алкална фосфатаза, се увеличава диагностичната чувствителност и специфичност на изследването за установяване на активността на пародонталното заболяване [65]. В друго изследване, използващо конвенционална ELISA техника, остеокалцин, както и PGE_2 и TNF-α се откриват в много ниски нива в слюнка и внушението на авторите е, че вероятно не се отчита реалното им количество [68].

Osteopontin е друг протеин от костния матрикс. Резултати от изследвания показват, че концентрацията на остеопонтин в гингивалния ексудат се увеличава пропорционално на прогресирането на пародонталното заболяване. Когато се приложи нехирургично лечение, нивата на остеопонтин в гингивалния ексудат се редуцират значително. Този компонент се счита за възможен биомаркер за прогресия на пародонталното заболяване [78, 79].

Не открихме изследване на нивата на остеопонтин в слюнка във връзка с пародонталното заболяване, но това практически е възможно и вероятно ще бъде направено в бъдеще, тъй като има подобни изследвания при пациенти с орален тумор и при здрави лица [39].

Заключение

Направените досега изследвания не дават основания да се приеме един биомаркер за достатъчно чувствителен и специфичен показател за поставяне на пародонтална диагноза. Изследванията се ориентират към определяне на комплекс от биомаркери от различни групи, чрез които би било по-сигурно поставянето на диагноза, определянето на потенциалния риск от следваща деструкция, определянето на лечебния план и проследяването на заболяването [60]. В тези групи биомаркери важно значение имат компонентите, свързани с възпалението, компонентите, свързани с деструкцията на съединителна тъкан и с костна деструкция. Например изследване на комбинация на слюнчените нива на IL-1β и MMP-8 показва увеличаване на риска от развитие на пародонтално заболяване 45 пъти [61]. Заедно с тях в изработване на панели от биомаркери с по-голяма специфичност често се включват и пародонтопатогени, генетични и геномни фактори, протеомни фактори [12, 29, 76].

Комбинация от маркери на възпаление и деструкция на съединителна тъкан и кост е с по-големи възможности за поставяне на диагноза, предсказване на прогресия на пародонтално заболяване или стабилност на състоянието. Изследванията показват, че отчитане на нивата на биомаркерите MIP-1α, MMP-8 и остеопротегерин е по-надеждно за мониторирането на пародонталното заболяване [77], както и комбинацията на MIP-1α и остеопротегерин [2]. Друга използвана комбинация е идентифицирането едновременно на слюнчените нива на MMP-8, тъканен инхибитор на металопротеиназа 1 и ICTP, които се откриват в по-големи количества при лица с пародонтално заболяване в сравнение с контроли [30].

Едновременното отчитане на клинични показатели и комбинация от биомаркери или комбинация от тях би довело до ранно поставяне на диагноза, до индивидуално съобразено лечение и контрол на пародонталното заболяване.

Гингивалната течност се състои от серум и компоненти. Може да съдържа продукти на тъканна деструкция, възпалителни медиатори, антитела, които са локално генерирани. Тя отразява локалния отговор на клетките и тъканите на пародонта към бактериалното предизвикателство. В гингивалния ексудат има ясни промени в състава по време на прогресия на пародонталното заболяване. Има медиатори, които могат да се използват за предсказване на по-нататъшния ход на заболяването на конкректно място или на пациент. Изследванията внушават, че съставът на гингивалната течност има потенциал да се използва за откриване на субклинични изменения в тъканния метаболизъм и съединителнотъканното ремоделиране. Много изследвания са насочени към търсене на възможни биомаркери, които да покажат наличие на болестен процес преди разгръщане на клинични симптоми [7]. Количественото определяне на компоненти на гингивалната течност може да се свърже с начало или с прогресия на пародонтално заболяване и има потенциал да подобри възможностите за точна диагноза, прогноза и лечение.

Слюнката е надежден и перспективен субстрат за идентификация и оценяване на специфични биомаркери от различни групи – генетични, микробиологични, възпалителни, отразяващи деструкция. Неинвазивното ѝ събиране я прави предпочитан материал за изследване. Съдържанието на широка гама от потенциални биомаркери я прави перспективен материал за разработване и въвеждане на модерни, бързи тестове в клиничния кабинет и/или в домашни условия за предоставяне на повече информация относно хода на заболяването както за клинициста, така и за пациента.

Обзорът е по Изследователски проект № 534 от 21.01.2016 по „Грант"; Договор № 58 за финансиране от Медицински университет – София.

Библиография

1. Болярова Т., Връзка на пародонталните заболявания с общи заболявания и състояния (обзор). – Обща медицина, 2016, 18(1): 41-46.

2. Al-Sabbagh M. et al. Bone remodeling-associated salivary biomarker MIP-1a distinguishes periodontal disease from health. J. Periodontal Res., 2012, 47, (3): 389-395

3. Alexander M., Damoulis P. The role of cytokines in the pathogenesis of periodontal disease. Curr. Opin. Periodontol., 1994, 2: 39-53.

4. Arakawa H. et al. Matrix metalloproteinase-8 is the major potential collagenase in active peri-implantitis. J Prosthodont Res. 2012, 56, (4): 249-55.

5. Armitage G. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. Ann Periodontol., 1999, 4, (1): 1-6.

6. Armitage G. The complete periodontal examination. Periodontology 2000, 2004, 34, (1): 22-33.

7. Barros SP et al., Gingival crevicular fluid as a source of biomarkers for periodontitis. Periodontology 2000, 2016, 70, (1): 53-64.

8. Beck J., et al. Periodontitis: a risk factor for coronary heart disease? Ann Periodontol, 1998, 3, (1): 127-141.

9. Belibasakis G, Bostanci N., The RANKL-OPG system in clinical periodontology. Journal of Clinical Periodontology, 2012, 39, (3): 239-248.

10. Biomarkers Definitions Working Group. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. Clin Pharmacol Ther, 2001, 69, (3): 89-95.

11. Birkedal-Hansen H.Role of matrix metalloproteinases in human periodontal diseases. J Periodontol, 1993, 64, (5): 474-484

12. Bonne N, Wong D. Salivary biomarker development using genomic, proteomic and metabolomic approaches. Genome Medicine, 82, 2012, 4.

13. Buduneli N. Biyikoglu B, Sherrabeh S, Lappin DF. Saliva concentrations of RANKL and osteoprotegerin in smoker versus non-smoker chronic periodontitis patients. Journal of Clinical Periodontology, 35, 2008, 10, 846-852.

14. Christodoulides N. et al. Lab-on-a-chip methods for point-of-care measurements of salivary biomarkers of periodontitis. Ann N Y Acad Sci., 2007, 1098, 411-28.

15. Crotti T. et al., Receptor activator NF kappaB ligand (RANKL) and osteoprotegerin (OPG) protein expression in periodontitis. J Periodontal Res, 38, 2003, 4, 380-7.

16. Darveau R. Periodontitis: a polymicrobial disruption of host homeostasis. Nat Rev Microbiol 8, 2010, 7, 481-90.

17. Delima A.and Van Dyke T. Origin and function of the cellular components in gingival crevice fluid. Periodontology 2000, 31, 2003, 1, 55-76.

18. Deo V.M. B.,Pathogenesis of periodontitis: role of cytokines in host response.Dent Today, 29, 2010, 9, 60-2, 64-6.

19. Dereka X. et al. RANKL and OPG mRNA level after non-surgical periodontal treatment. Inflammation. 33, 2010, 3, 200-6

20. Ebersole J. et al.Periodontal disease immunology: double indemnity in protecting the host. Periodontology 2000, 62, 2013, 1, 163-202.

21. Engebretson S.GCF IL-1beta profiles in periodontal disease. Journal of Clinical Periodontology 29, 2002, 1, 48-53.

22. Garlet GP.Destructive and protective roles of cytokines in periodontitis: a re-appraisal from host defense and tissue destruction viewpoints J Dent Res 89, 2010, 12, 1349-1363.

23. Genco RJ, Williams RC, editors.Periodontal disease and overall health: A clinician’s guide. 2nd edition.,Copyright (C) by the Colgate-Palmolive Company, 2014.

24. Giannobile W. et al. Crevicular fluid osteocalcin and pyridinoline cross-linked carboxyterminal telopeptide of type I collagen (ICTP) as markers of rapid bone turn-over in periodontitis, Journal of Clinical Periodontology, 22, 1995, 12, 904–910.

25. Giannobile W. et al.Saliva as a diagnostic tool for periodontal disease: current state and future directions, Periodontology 2000, 50, 2009, 52-64.

26. Giannobile W. V. Crevicular fluid biomarkers of oral bone loss. Current Opinion in Periodontology 4, 1997, 11-20.

27. Giannobile WV. C-Telopeptide Pyridinoline Cross-Links: Sensitive Indicators of Periodontal Tissue Destruction. Annals of the New York Academy of Sciences, 878, 1999, 404-412.

28. Graves D, Cochran D.The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction, J Periodontol, 74, 2003, 3, 391-401.

29. Gursoy U, Kononen E, Uitto VJ, Pussinen PJ, Hyvarinen K, et al. Salivary interleukin-1beta concentration and the presence of multiple pathogens in periodontitis. Journal of Clinical Periodontology, 36, 2009, 11, 922-927.

30. Gursoy U. e. al.Salivary MMP-8, TIMP-1, and ICTP as markers of advanced periodontitis. Journal of Clinical Periodontology, 37, 2010, 6, 487-493.

31. Gursoy U. et al, Salivary type I collagen degradation end-products and related matrix metalloproteinases in periodontitis. Journal of Clinical Periodontology, 40, 2013, 1, 18-25.

32. Gursoy U. et al., Use of host- and bacteria-derived salivary markers in detection of periodontitis: a cumulative approach, Dis Markers, 30, 2011, 6, 299-305.

33. HelzbergM., M. Mayer. Dental plaque, platelets, and cardiovascular diseases.Ann Periodontol, 3, 1998, 1, 151-160.

34. Hernandez M. et al., Matrix metalloproteinase – 13 is highly expressed in destructive periodontal disease activity, J Periodontol, 77, 2006, 11, 863-870.

35. Herr A. et al. Microfluidic immunoassays as rapid saliva-based clinical diagnostics. Proc Natl Acad Sci U S A, 104, 2007, 13, 5268-5273.

36. Hienz S, Paliwal S, Ivanovski S. Mechanisms of Bone Resorption in Periodontitis, J Immunol Res, 2015, 615486.

37. Horliana A. et al.,Dissemination of periodontal pathogens in the bloodstream after periodontal procedures: a systematic review,PLoS One, 9, 2014, 5, e98271.

38. Jaedicke K, Preshaw P., Taylor J., Salivary cytokines as biomarkers of periodontal diseases. Periodontology 2000, 70, 2016, 1, 164-83.

39. Katakura A. et al., Comparison of salivary cytokine levels in oral cancer patients and healthy subjects. Bull Tokyo Dent Coll. 48, 2007, 4, 199-203.

40. Kaushik R, Yeltiwar R., Pushpanshu K., Salivary interleukin-1β levels in patients with chronic periodontitis before and after periodontal phase I therapy and healthy controls: a case-control study. J Periodontol,82, 2011, 9, 1353-9.

41. Kebschull M, Demmer RT, Papapanou PN.Gum bug, leave my heart alone!: epidemiologic and mechanistic evidence linking periodontal infections and atherosclerosis (published online ahead of print July 16, 2010). J Dent Res, 89, 2010, 9, 879-902

42. KinaneD., Periodontal diseases contributions to cardiovascular disease: an overview of potential mechanisms. Ann Periodontol, 3, 1998, 1, 142-150

43. Kinney J. et al., Saliva/pathogen biomarker signatures and periodontal disease progression. J Dent Res, 90, 2011, 6, 752-758.

44. Kinney J., Ch. Ramseier, W. Giannobile,, Oral Fluid-Based Biomarkers of Alveolar Bone Loss in Periodontitis. Ann N Y Acad Sci, 2007 , 1098, 230-251.

45. Kivela-Rajamaki M et al, Levels and molecular forms of MMP-7 (matrilysin-1) and MMP-8 (collagenase-2) in diseased human peri-implant sulcular fluid. J Periodontal Res 38, 2003, 6, 583–590.

46. Koide M. et al., Osteoclastic bone resorption induced by innate immune responses. Periodontology 2000, 54, 2010, 1, 235–246.

47. Kornman K.,Interleukin-1 genotypes and the association between periodontitis and cardiovascular disease.J Periodont Res, 34, 1999, 6, 353-357.

48. Korte D. & J. Kinney. Personalized medicine: an update of salivary biomarkers for periodontal diseases Periodontology 2000, 70, 2016, 1, 26-37.

49. Kudva P et al., To estimate salivary aspartate aminotransferase levels in chronic gingivitis and chronic periodontitis patients prior to and following non-surgical periodontal therapy: A clinico-biochemical study. J Indian Soc Periodontol, 18, 2014, 1, 53-8.

50. Lee A. et al., Bacterial and salivary biomarkers predict the gingival inflammatory profile.J Periodontol , 83, 2012, 1, 79-89.

51. Leivadaros et al., A pilot study into measurements of markers of atherosclerosis in periodontitis. J Periodontol, 76, 2005, 1, 121-128.

52. Lian JB, Gundberg CM, Osteocalcin. Biochemical considerations and clinical applications, Clin Orthop, 226, 1988, 267-91.

53. Listgarten M., Loomer P. Microbial identification in the management of periodontal diseases. A systematic review. Ann. Periodontol, 8, 2003, 1, 182-192.

54. Luke R. et al. Estimation of Specific Salivary Enzymatic Biomarkers in Individuals with Gingivitis and Chronic Periodontitis: A Clinical and Biochemical Study. J Int Oral Health, 7, 2015, 9, 54-7.

55. Lynne H.Biomarkers for periodontal disease.RDH Magazine, 2015.

56. Mäkelä M. et al., Matrix metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9) of the oral cavity: cellular origin and relationship to periodontal status. J Dent Res 73, 1994, 8, 1397-406.

57. Matthews D, Impact of everyday oral activities on the risk of bacteraemia is unclear.Evid Based Dent, 13, 2012, 3, 80.

58. McCulloch C., Collagenolytic enzymes in gingival crevicular fluid as diagnostic indicators of periodontitis. Ann N Y Acad Sci, 732, 1994, 6, 152-64.

59. Meschiari C. et al., Salivary MMPs, TIMPs, and MPO levels in periodontal disease patients and controls. Clin Chim Acta, 421, 2013, 5, 140-6.

60. Miller C. et al., Current developments in salivary diagnostics. Biomark Med 4, 2010, 1, 171-189.

61. Miller C. et al., Salivary biomarkers of existing periodontal disease: a cross-sectional study. J Am Dent Assoc, 137, 2006, 3, 322-329.

62. Mishra D. et al. Evaluation of Salivary Levels of Pyridinoline Cross Linked Carboxyterminal Telopeptide of Type I Collagen (ICTP) in Periodontal Health and Disease. J Clin Diagn Res, 9, 2015, 9, 50-55.

63. Nagasawa T. et al. Roles of receptor activator of nuclear factor- kappa-B ligand (RANKL) and osteoprotegerin in periodontal health and disease. Periodontology 2000, 43, 2007, 1, 65-84.

64. Nagasupriya A. et al., Immunohistochemical expression of matrix metalloproteinase-13 in chronic periodontitis. Int J Periodontics Restorative Dent, 34, 2014, 4, e79-84.

65. Nakashima K, Giannopoulou C, Andersen E, Roehrich N, Brochut P, Dubrez B, Cimasoni G., A longitudinal study of various crevicular fluid components as markers of periodontal disease activity. J Clin Periodontol, 23, 1996, 9, 832-838.

66. Nakaya H. et al., Effects of interleukin-1 beta on matrix metalloproteinase-3 levels in human periodontal ligament cells ,J Periodontol, 68, 1997, 6, 517-23.

67. Nędzi-Góra M, Kostrzewa-Janicka J, Górska R. Elastase and metalloproteinase-9 concentrations in saliva in patients with chronic periodontitis. Central-European Journal of Immunology, 39, 2014, 3, 357-364.

68. Ng P. et al., Candidate salivary biomarkers associated with alveolar bone loss: cross-sectional and in vitro studies. FEMS Immunol Med Microbiol 49, 2007, 2, 252-260.

69. Oliver R, L. Brown, H. Loe. Variations in the prevalence and extent of periodontitis. J Am Dent Assoc, 122, 1991, 6, 43-48

70. Page R., The pathobiology of periodontal diseases may affect systemic diseases: inversion of paradigm.Ann Periodontol, 3, 1998, 1, 108-120.

71. Page R.,The role of inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontal disease.J Periodontal Res, 26, 1991, 3 Pt 2, 230-42.

72. Page RC., Host response tests for diagnosing periodontal diseases. J Periodontol, 63, 1992, 4, 356-366.

73. Pihlstrom B., Michalowicz B., Johnson N., Periodontal diseases. Lancet. 366, 2005, 9499, 1809-20.

74. Prabhuet al., Detection of local and systemic citokines in adult periodontitis.J Periodontol. 67, 1996, 5, 515-522.

75. Ramseier C. et al., Identification of pathogen and host response markers correlated with periodontal disease. J Periodontol. 80, 2009, 3, 436-46.

76. Salminen A. et al., Salivary biomarkers of bacterial burden, inflammatory response, and tissue destruction in periodontitis. Journal of Clinical Periodontology, 41, 2014, 5, 442-450.

77. Sexton W. et al.,Salivary biomarkers of periodontal disease in response to treatment.J Clin Periodontol 38, 2011, 5, 434-441.

78. Sharma C, Pradeep A. Plasma and crevicular fluid osteopontin levels in periodontal health and disease. J Periodontal Res, 42 , 2007, 5, 450-5.

79. Sharma C., Pradeep A. Gingival crevicular fluid osteopontin levels in periodontal health and disease, J Periodontol 77, 2006, 10, 1674-1680.

80. Shibutani T et al., Experimentally induced periodontitis in beagle dogs causes rapid increases in osteoclastic resorption of alveolar bone. J. Periodontol 68, 1997, 4, 385-391.

81. Sorsa T. et al., Matrix metalloproteinases: contribution to pathogenesis, diagnosis and treatment of periodontal inflammation.Ann Med, 38 ,2006, 5, 306-21.

82. Sorsa T.et al., Analysis of matrix metalloproteinases, especially MMP-8, in gingival creviclular fluid, mouthrinse and saliva for monitoring periodontal diseases. Periodontol 2000, 70, 2016,1, 142-63.

83. Tabari Z. et al., Salivary soluble receptor activator of nuclear factor kappa B ligand/osteoprotegerin ratio in periodontal disease and health. J Periodontal Implant Sci 43, 2013, 5, 227-232.

84. Talonpoika JT, Hämäläinen MM. Type I carboxyterminal telopeptide in human gingival crevicular fluid in different clinical conditions and after periodontal treatment. J Clin Periodontol, 21, 1994, 5, 21– 34.

85. Taylor J., Protein Biomarkers of Periodontitis in Saliva. ISRN inflammation. 2014, 2014, 593151.

86. Teles R., Likhari V, Socransky S, Haffajee A. Salivary cytokine levels in subjects with chronic periodontitis and in periodontally healthy individuals: a cross-sectional study. J Periodontal Res, 44, 2009, 3, 411-417.

87. Teng Y. et al.,Gingival crevicular fluid gelatinase and its relationship to periodontal disease in human subjects. J Periodontal Res, 27, 1992, 5, 544-552.

88. Thomas M. et al.,Within-Subject Variability in Repeated Measures of Salivary Analytes in Healthy Adults ,J Periodontol, 80, 2009, 7, 1146-1153.

89. Tobon-Arroyave SI et al., Association of salivary levels of the bone remodelling regulators sRANKL and OPG with periodontal clinical status. J Clin Periodontol, 39, 2012, 12, 1132-1140.

90. Tonetti M, Van Dyke T. Working group 1 of the joint EFP / AAP workshop., Periodontitis and atherosclerotic cardiovascular disease: consensus report of the Joint EFP/AAPWorkshop on Periodontitis and Systemic Diseases.J Periodontol, 84, 2013, 4, 24-9.

91. Totan A et al., Salivary aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase and alkaline phosphatase: possible markers in periodontal diseases? Clin Chem Lab Med, 44, 2006, 5, 612-5.

92. Van Dyke T., Proresolving lipid mediators: potential for prevention and treatment of periodontitis. J Clin Periodontol, 38, 2011, 11,119-25.

93. Yousefimanesh H. et al., Evaluation of salivary tumor necrosis factor-alpha in patients with the chronic periodontitis: A case-control study.J Indian Soc Periodontol, 17, 2013, 6, 737-40.

94. Zhang W et al., Incidence and magnitude of bacteraemia caused by flossing and by scaling and root planing, J Clin Periodontol 40, 2013, 1, 41-52.

✉ *Адрес за кореспонденция:*
Доц. д-р Теодора Болярова, дм
Факултет "Дентална медицина"
ул. "Св. Г. Софийски" № 1
1431 София