



**Wydział Lekarski
Oddział Stomatologiczny**

Marcin Adamiecki

**Rola naturalnych czynników przeciwdrobnoustrojowych
w ślinie pacjentów z przewlekłym zapaleniem przyzębia**

Rozprawa doktorska

**Zakład Patologii Jamy Ustnej
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi**

**Promotor:
dr hab. n. med. prof. UM Sebastian Kłosek**

Łódź 2020

Streszczenie w języku polskim

Wstęp. Przewlekłe zapalenie przyzębia (CP) jest złożonym i wieloprzyczynowym procesem chorobowym aparatu zawieszeniowego zęba, powstającym w następstwie niekontrolowanej lub nieadekwatnej odpowiedzi gospodarza na mikroorganizmy biofilmu poddziąsłowego. Choroba doprowadza do utraty przyczepu łącznotkankowego oraz kości wyrostka zębodołowego z tworzeniem kieszonek przyzębnych i/lub recesji dziąseł. Główną przyczyną przewlekłego zapalenia przyzębia jest infekcja bakteryjna, jednak zasadnicze znaczenie w patogenezie choroby mają mechanizmy obronne gospodarza i wpływ na nie czynników genetycznych. Obecność periopatogenów doprowadza nadreaktywne fenotypy komórek do wydzielania zwiększonej ilości mediatorów zapalnych powodując uszkodzenia tkanek przyzębia. Szacuje się, że wśród dorosłych Polaków (35-44 lat) 15-20% ma zapalenie przyzębia, z czego postać przewlekła stanowi 95,9%. Tak niepokojące dane wskazują na konieczność poprawy diagnostyki i leczenia CP. Tradycyjne metody diagnostyczne oceniające stan przyzębia są tanie, łatwe w użyciu i stosunkowo nieinwazyjne, jednak mają ograniczenia. Oceniają historię choroby, a nie jej aktualny status oraz nie pozwalają zidentyfikować osób będących w grupie ryzyka możliwego w przyszłości zachorowania na zapalenie przyzębia. Obecnie trwają poszukiwania biomarkerów, które mogłyby wspomóc lekarza dentystę w walce z chorobą przyzębia. Wielu badaczy w swoich pracach jako potencjalne biomarkery zapalenia przyzębia wskazuje naturalne czynniki przeciwdrobnoustrojowe (AMP), które należą do najstarszych mechanizmów obronnych wszystkich organizmów i jako cząsteczki efektorowe wrodzonego układu odpornościowego stanowią pierwszą linię obrony przed mikroorganizmami. Są to wszystkie oligopeptydy i polipeptydy o działaniu antydrobnoustrojowym, a także peptydy, które powstały w wyniku oddzielenia się od większych białek oraz peptydy syntetyzowane nierybosomalnie. AMP posiadają szerokie spektrum aktywności przeciwdrobnoustrojowej, ponieważ działają wobec bakterii Gram-dodatnich, Gram-ujemnych, wirusów, a także grzybów oraz pasożytów wewnątrzkomórkowych. AMP nie działają wybiórczo oraz nie są gatunkowo specyficzne. Ogólna zasada działania większości AMP polega na dezintegracji błony komórkowej drobnoustrojów, wobec których peptyd jest aktywny. Pomimo, że związki te od milionów lat funkcjonują w odpowiedzi obronnej gospodarza, patogeny wykazują na nie relatywnie niską odporność. Jest to konsekwencją mechanizmu działania AMP, opartego na jonowych i hydrofobowych interakcjach, do którego trudno jest się bakteriom zaadaptować i uodpornić.

Jako dwie główne rodziny AMP u ssaków wymienia się defensyny i katelicyny. U człowieka wyróżniamy dwie grupy defensyn (typu α i β), których wykryto po sześć w każdym typie oraz jedną katelicynę LL-37. Badania proteomiczne wykazały różnice w ekspresji AMP u pacjentów periodontologicznych w porównaniu z osobami zdrowymi, bądź też w trakcie leczenia choroby przyzębia. Jednym z płynów ustrojowych w którym występują peptydy przeciwdrobnoustrojowe jest ludzka ślina. Duża część badań markerów stanu przyzębia skupia się na płynie szczeliny dziąsłowej, jednak wydaje się, że ślina ma nim przewagę. Zawiera płyny i cząsteczki z różnych miejsc jamy ustnej oraz dróg oddechowych i łatwiej ją pozyskiwać. Naukowcy sugerują, że u pacjentów z przewlekłym zapaleniem przyzębia, którzy mają obniżony poziom LL-37, choroba przebiega w sposób bardziej zaostrowany i obejmuje rozleglejszy obszar. Z kolei spośród ludzkich β -defensyn (hBD), uwagę badaczy jako potencjalny biomarker *periodontitis* zwraca hBD-2. Brak jest dotąd opracowanych przesiewowych testów diagnostycznych ze śliny opartych o substancje przeciwdrobnoustrojowe, pozwalających na wczesne wykrycie choroby, jeszcze przed jej manifestacją w jamie ustnej. Badanie poziomu wybranych czynników przeciwdrobnoustrojowych w ślinie może stanowić cenne narzędzie prognostyczne, ulepszające i ułatwiające planowanie leczenia chorób przyzębia.

Cel pracy. Głównym celem badania było określenie stężenia LL-37 i hBD-2 dla zaawansowanego przewlekłego zapalenia przyzębia w porównaniu do osób bez choroby przyzębia oraz powiązanie ich stężeń z przebiegiem leczenia przewlekłego zapalenia przyzębia oraz w zależności od zastosowanego protokołu terapeutycznego (FMD, QSRP). Dodatkowym celem pracy było porównanie skuteczności wybranych protokołów leczenia przewlekłego zapalenia przyzębia (FMD, QSRP), na podstawie oceny wybranych wskaźników klinicznych stanu przyzębia (API, BoP, PD, CAL, ruchomość zębów wg skali Halla) oraz stężeń interleukiny 1 alfa w ślinie.

Material i metody. Badaniem objęto 24 pacjentów, którzy zgłosili się na wizytę z powodu choroby przyzębia (grupa badana). Byli to pacjenci pierwszorazowi, bez chorób ogólnych modyfikujących przebieg zapalenia przyzębia z rozpoznaniem w trakcie badania stomatologicznego przewlekłym zapaleniem przyzębia o zaawansowanym przebiegu. Grupę kontrolną stanowiło 10 pacjentów ogólnie zdrowych i bez choroby przyzębia. Badanie kliniczne obejmowało dokładną ocenę stanu przyzębia (API, BoP, PD, CAL, ruchomość zębów wg skali Halla). Od wszystkich pacjentów został pobrany 1 ml niestymulowanej śliny z jamy ustnej. Od pacjenta z grupy badanej ślina pobierana była czterokrotnie (po raz pierwszy przed

leczeniem choroby przyzębia, następnie w fazie podtrzymującej leczenia - tydzień, miesiąc i trzy miesiące po zakończonym leczeniu). Materiał po pobraniu został przekazywany do laboratorium, w celu określenia za pomocą testów immunoenzymatycznych (ELISA) stężenia LL-37, hBD-2 oraz IL-1 α . Pacjenci ze zdiagnozowanym przewlekłym zapaleniem przyzębia, zostali podzieleni na dwie podgrupy. Pierwszą podgrupę stanowili pacjenci leczeni zgodnie z protokołem całościowego odkażania jamy ustnej (FMD), a użytym środkiem antyseptycznym była chlorheksydyna. W drugiej podgrupie pacjenci zostali poddani klasycznemu schematowi niechirurgicznego leczenia zapalenia przyzębia - kwadrantowemu skalingowi i root-planningowi (QSRP), z użyciem jako środka odkażającego chlorheksydyny. Wizyty kontrolne odbyły się po 7 dniach od zakończenia fazy aktywnej leczenia, gdzie po raz drugi pobrano 1 ml śliny z jamy ustnej oraz oceniono wybrane wskaźniki. Następnie po miesiącu i po trzech miesiącach, w fazie podtrzymującej leczenia choroby przyzębia, po raz trzeci i czwarty od pacjentów został pobrany 1 ml śliny z jamy ustnej oraz oceniono wybrane wskaźniki. Dla opracowania danych zastosowano metody opisowe i metody wnioskowania statystycznego. Za istotne statystycznie uznano te różnice pomiędzy średnimi (lub częstościami) oraz te zależności pomiędzy zmiennymi, dla których obliczona wartość testu była równa lub większa od wartości krytycznej odczytanej z odpowiednich tablic przy właściwej liczbie stopni swobody i prawdopodobieństwie błędu $p < 0,05$.

Wyniki. Połowę grupy badanej stanowiły kobiety, a drugą połowę mężczyźni (frakcje po 0,05). Natomiast w grupie kontrolnej przeważały kobiety (frakcja 0,8). W grupie badanej pacjenci mieli od 40 do 69 lat, a średnia wieku wynosiła $55,5 \pm 9,2$ lat. W grupie kontrolnej badani mieli od 25 do 53 lat, średnio $35,4 \pm 8,1$ lat. Porównanie średnich wartości stężenia katelicydyny LL-37 i hBD-2 w grupie badanej przed leczeniem z grupą kontrolną nie wykazało istotnych statystycznie różnic (LL-37: $2499,7 \pm 3073,6$ ng/ml vs $809,3 \pm 262,2$ ng/ml, hBD-2: $0,513 \pm 0,87$ ng/ml vs $0,573 \pm 0,609$ ng/ml). Porównanie średnich wartości stężenia IL-1 α w grupie badanej przed leczeniem z grupą kontrolną wykazało istotną statystycznie różnicę ($4871,8 \pm 5265,0$ pg/ml vs $1433,6 \pm 1784,2$ pg/ml). Na kolejnych wizytach po leczeniu następowało systematyczne zmniejszanie się średniej wartości stężenia katelicydyny LL-37 od $2499,7 \pm 3073,6$ ng/ml przed leczeniem, do $1309,7 \pm 1217,7$ ng/ml w ostatnim etapie badania. Zmiany nie okazały się jednak istotne statystycznie. Nie stwierdzono zależności pomiędzy stężeniem ślinowego LL-37 przed leczeniem a API, BoP, PD, CAL i ruchomością zębów. Stwierdzono dodatnią korelację pomiędzy liczbą zębów z PD>5 oraz całkowitą liczbą zębów przed leczeniem choroby przyzębia a stężeniem ślinowego

LL-37 (odpowiednio: $p=0,0349$; $r=0,432$ i $p=0,0266$; $r=0,452$). Nie stwierdzono istotnej statystycznie zależności pomiędzy LL-37 a API, BoP, CAL, zwiększoną ruchomością zębów wg skali Halla i ogólną liczbą zębów po przeprowadzonym leczeniu w całej grupie badanej. Stwierdzono istotną statystycznie zależność pomiędzy LL-37 a: PD badanymi na wizycie kontrolnej 3 miesiące od zakończenia leczenia niechirurgicznego ($r=0,639$; $p<0,001$) oraz liczbą zębów z $PD>5$ badanymi na wizycie kontrolnej miesiąc i 3 miesiące od zakończenia leczenia niechirurgicznego ($r=0,406$; $p=0,0491$ oraz $r=0,744$; $p=0,0000$).

Na kolejnych wizytach po leczeniu następowały nieregularne zmiany średniej wartości stężenia hBD-2 od $0,513 \pm 0,87$ ng/ml przed leczeniem, poprzez zmniejszenie się do $0,170 \pm 0,21$ ng/ml w drugim etapie badania i następnie wzrost w etapie trzecim do $0,402 \pm 0,63$ ng/ml i kolejny wzrost w etapie czwartym do $0,611 \pm 1,42$ ng/ml. Zmiany nie okazały się istotne statystycznie. Nie zauważono zależności pomiędzy stężeniem ślinowej hBD-2 a API, BoP, PD, liczbą zębów z $PD>5$, CAL, ogólną liczbą zębów i ruchomością zębów przed rozpoczętym leczeniem choroby przyzębia. W badaniu nie stwierdzono żadnej istotnej zależności pomiędzy stężen ślinowej hBD-2 i wartości wskaźników API, BoP, PD, $PD>5$, CAL, ruchomości zębów i liczby zębów po niechirurgicznym leczeniu CP.

Po przeprowadzonym leczeniu CP (tydzień, miesiąc i trzy miesiące po aktywnej fazie leczenia) nie stwierdzono także istotnych statystycznie różnic pomiędzy podgrupami FMD i QSRP w zakresie wartości BoP, PD, liczby zębów z $PD>5$, CAL, ruchomości zębów oraz zmian w ogólnej liczbie zębów w toku leczenia. Porównując średnie zmiany wskaźnika API w obu podgrupach po zakończonym leczeniu, większą redukcję wskaźnika obserwowano w podgrupie leczonej zgodnie z protokołem FMD. Jednak istotne statystycznie różnice pomiędzy średnimi API dla FMD w porównaniu do QSRP odnotowano miesiąc (zmniejszenie wskaźnika o 14,23%) i trzy miesiące po zakończonym leczeniu (zmniejszenie wskaźnika o 15,65%). W pracy nie stwierdzono istotności przy porównaniu różnic w stężeniach ślinowych LL-37 i hBD-2 dla obu grup przed leczeniem w stosunku do ich stężenia trzy miesiące po leczeniu. Podczas porównania średnich wartości stężeń IL-1 α (tydzień, miesiąc i trzy miesiące po leczeniu), nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic pomiędzy podgrupami FMD i QSRP.

Wnioski. Stężenia katelicydyny LL-37 są zdecydowanie wyższe u osób z przewlekłym zapaleniem przyzębia niż w grupie kontrolnej. Jednak opublikowane w pracach naukowych i rozprawie znaczne różnice w stężeniach ślinowej LL-37 i hBD-2 u osób periodontologicznie

zdrowych i z chorobą przyzębia, wskazują na złożony model udziału tych czynników w progresji i leczeniu choroby. Badania własne wskazują na trudność w jednoznacznym powiązaniu określonych stężeń ślinowych LL-37 i hBD-2 ze stanem przyzębia i przebiegiem leczenia przewlekłego zapalenia przyzębia. Jednak zaznaczone tendencje do korelacji wyższych stężeń tych czynników z niektórymi parametrami stanu zapalnego przyzębia, jak i ich zmiana podczas interwencji leczniczej, mogą stanowić przesłankę do rozważenia ich, zwłaszcza katelicydyny LL-37, jako potencjalnych markerów leczenia. Ponadto, żaden z zastosowanych protokołów leczniczych (FMD i QSRP) nie miał wpływu na ujawnienie się różnic w zmianach stężeń LL-37 i hBD-2 czy markera kontrolnego IL-1 alfa. Wyniki własne dotyczące porównania skuteczności dwóch protokołów leczenia niechirurgicznego zapalenia przyzębia (FMD i QSRP) na podstawie wybranych parametrów klinicznych (API, BoP, PD, CAL, ruchomość zębów) są w zgodzie z większością badań i nie wskazują wyższości protokołu FMD nad metodą kwadrantową (QSRP). Obie metody są równoważne w klinicznych efektach leczenia.

Streszczenie w języku angielskim

Introduction. Chronic periodontitis (CP) is a complex and pluricausal disease of the tooth-supporting apparatus resulting from an uncontrolled or inadequate host response to subgingival biofilm microorganisms. The disease results in the loss of connective tissue attachment and alveolar bone with the formation of periodontal pockets and / or gingival recessions. The main cause of chronic periodontitis is a bacterial infection, however, the host defense mechanisms and genetic factors are essential in the pathogenesis of the disease. The presence of periopathogens leads overactive cell phenotypes to the secretion of an increased amount of inflammatory mediators, causing damage to periodontal tissues. It is estimated that 15-20% of the adult population (35-44 years old) in Poland have periodontitis, of which the chronic form is 95.9%. Such alarming data indicate the need to improve CP diagnosis and treatment. Traditional diagnostic methods assessing the state of periodontium are cheap, easy to use and relatively non-invasive, but they have limitations. They assess the history of the disease, not its current status and do not allow to identify people who are at risk of possible periodontitis. Currently, biomarkers that could help the dentist in the fight against periodontal disease are sought. Many researchers in their works as potential biomarkers of periodontitis indicate natural antimicrobial peptides (AMP), which belong to the oldest defense mechanisms of all organisms and as effector molecules of the innate immune system constitute the first line of defense against microorganisms. These are all oligopeptides and polypeptides with antimicrobial activity, as well as peptides that were formed as a result of separation from larger proteins and non-ribosome synthesized peptides. AMPs have a broad spectrum of antimicrobial activity because they work against Gram-positive, Gram-negative bacteria, viruses as well as fungi and intracellular parasites. AMPs do not act selectively and are not species specific. The general principle of most AMPs activity are the disintegration of the cell membrane of microorganisms to which the peptides are active. Although these agents have been functioning in the host defense response for millions of years, the pathogens show relatively low resistance to them. This is a consequence of the AMPs action mechanism, based on ionic and hydrophobic interactions, which is difficult for bacteria to adapt and immunize. The two main AMP families in mammals are defensins and cathelicidins. In humans, we distinguish two groups of defensins (type α and β), of which six have been detected in each type and one cathelicidin LL-37. Proteomic studies have shown differences in the expression of AMPs in periodontal patients compared to healthy individuals, or during the treatment of periodontal disease. One of the body

fluids in which there are antimicrobial peptides is human saliva. A large part of the research on periodontal markers focuses on the gingival crevicular fluid, but it seems that saliva has the advantage. It contains fluids and molecules from different areas of the mouth and respiratory tract and is easier to obtain. Researchers suggest that in patients with chronic periodontitis who have a decreased LL-37 level, the disease is more acute and covers a wider area. In turn, among human β -defensins (hBD), researchers' consider hBD-2 as a potential biomarker of periodontitis. There are no screening diagnostic tests for saliva based on antimicrobial agents that allow early detection of the disease even before its manifestation in the oral cavity. The study of the selected antimicrobial agents levels in saliva can be a valuable prognostic tool, improving and facilitating the planning of periodontal diseases treatment.

Aim. The main objective of the study was to determine the concentration of LL-37 and hBD-2 for advanced chronic periodontitis in comparison to persons without periodontal disease and their concentration to the course of chronic periodontitis treatment and depending on the therapeutic protocol used (FMD, QSRP). An additional aim of the study was to compare the effectiveness of selected protocols of chronic periodontitis treatment (FMD, QSRP), based on the evaluation of of selected clinical and laboratory indicators of periodontium.

Material and methods. The study included 24 patients who came for an appointment due to periodontal disease (study group). They were first-time patients, with no general diseases modifying the course of periodontitis with the diagnosis of chronic advanced periodontitis assessed during the dental examination. The control group consisted of 10 generally healthy patients without periodontal disease. The clinical examination included an accurate assessment of periodontal status (API, BoP, PD, CAL, teeth mobility according to the Hall scale). 1 ml of unstimulated saliva from the mouth was taken from all patients. The salivae from the study group patients was taken four times (for the first time before the treatment of periodontal disease, then in the maintenance phase - week, month and three months after the end of treatment). After collection, the material was transferred to the laboratory to determine the concentrations of LL-37, hBD-2 and IL-1 α by means of enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA). Patients diagnosed with chronic periodontitis were divided into two subgroups. The first subgroup consisted of patients treated in accordance with the full-mouth disinfection protocol (FMD), and the antiseptic used was chlorhexidine. In the second subgroup, patients were subjected to the classical scheme of non-surgical treatment of periodontitis - quadrant scaling and root-planning (QSRP), using chlorhexidine as a disinfectant. Follow-up visits took place 7 days after the end of the active treatment phase, where for the second time 1 ml of saliva

from the oral cavity was collected and selected indicators were assessed. Then, after a month and three months, in the maintenance phase of periodontal disease treatment, for the third and fourth time, 1 ml of oral saliva was collected from patients and selected indicators were assessed. Descriptive methods and methods of statistical inference were used for the development of data. Statistically significant differences were found between mean (or frequencies) and those relations between variables for which the calculated test value was equal to or greater than the critical value read from the respective tables with the right number of degrees of freedom and probability of error $p < 0.05$.

Results. Half of the study group were women and the other half were men (fractions of 0.05 each). In the control group, women predominated (fraction 0.8). In the study group, patients were between 40 and 69 years old, and the average age was 55.5 ± 9.2 years. In the control group, the subjects were between 25 and 53 years old, average 35.4 ± 8.1 years. Comparison of median values of cathelicidin LL-37 and hBD-2 levels in the study group before treatment with the control group did not show statistically significant differences (LL-37: $2499,7 \pm 3073,6$ ng/ml vs $809,3 \pm 262,2$ ng/ml, hBD-2: 0.513 ± 0.87 ng/ml vs 0.573 ± 0.609 ng/ml). Comparison of mean values of IL-1 α concentration in the study group before treatment with the control group showed a statistically significant difference ($4871,8 \pm 5265,0$ pg/ml vs $1433,6 \pm 1784,2$ pg/ml). At subsequent visits after treatment, the mean concentration of cathelicidin LL-37 was systematically reduced from 2499.7 ± 307.6 ng/ml before treatment, to 1309.7 ± 1217.7 ng/ml in the last stage of the study. However, the changes did not turn out to be statistically significant. There was no relationship between salivary LL-37 levels before treatment and API, BoP, PD, CAL and teeth mobility. A positive correlation was found between the number of teeth with PD > 5 and the total number of teeth before treatment of periodontal disease and salivary LL-37 (respectively: $p=0.0349$, $r=0.432$ and $p=0.0266$, $r=0.452$). There was no statistically significant relationship between LL-37 and API, BoP, CAL, increased teeth mobility and the total number of teeth after treatment in the whole study group. There was a statistically significant relationship between LL-37 and PD during the follow-up visit 3 months after the end of non-surgical treatment ($r=0.639$, $p<0.001$) and the number of teeth with PD > 5 tested at the control visit month and 3 months after the end of non-surgical treatment ($r=0.406$, $p=0.0491$ and $r=0.744$, $p=0.0000$). On subsequent visits after treatment, there were irregular changes in the mean value of hBD-2 concentration from 0.513 ± 0.87 ng/ml before treatment, by decreasing to 0.170 ± 0.21 ng/ml in the second stage of the study and then increasing in the third stage to 0.402 ± 0.63 ng/ml and another increase in the fourth stage to 0.611 ± 1.42 ng/ml.

The changes were not statistically significant. No relation was found between salivary HBD-2 and API, BoP, PD, number of teeth with PD > 5, CAL, total number of teeth and teeth mobility before the periodontal disease treatment was started. In the study, no significant relationship was found between salivary HBD-2 levels and API, BoP, PD, PD > 5, CAL index values, teeth mobility and number of teeth after CP non-surgical treatment. After CP treatment (week, month and three months after the active treatment phase), there were no statistically significant differences between the FMD and QSRP subgroups in the range of BoP, PD, PD > 5, CAL, teeth mobility and changes in the total number teeth in the course of treatment. Comparing the average changes in the API index in both subgroups after treatment, a greater reduction in the index was observed in the subgroup treated according to the FMD protocol. However, statistically significant differences between API for FMD compared to QSRP were recorded in a month (reduction in the rate by 14.23%) and three months after the end of treatment (decrease in the rate by 15.6%). In the study, no significance was found when comparing differences in salivary LL-37 and hBD-2 concentrations for both groups before treatment in relation to their concentration three months after treatment. While comparing the mean values of IL-1 α concentrations (week, month and three months after treatment), there were no statistically significant differences between the FMD and QSRP subgroups.

Conclusions. The concentration of cathelicidin LL-37 is definitely higher in people with chronic periodontitis than in the control group. However, the significant differences in the salivary LL-37 and hBD-2 concentrations in periodontologically healthy persons, as well as periodontal disease, published in the scientific papers and the dissertation, indicate a complex model of the contribution of these factors to the progression and treatment of the disease. On the basis of our own research it is difficult to indicate binding correlations of LL-37 and hBD-2 concentrations present in saliva with the state of periodontium and the course of chronic periodontitis treatment. However, the marked tendencies to the correlation of higher concentrations of these factors with some periodontal inflammation parameters, as well as their change during therapeutic intervention, may be a reason to consider them, especially cathelicidin LL-37, as potential markers of treatment. In addition, none of the therapeutic protocols that have been applied (FMD and QSRP) had no effect on the disclosures of differences in LL-37 and hBD-2 concentrations or IL-1 alpha control marker. Our own results regarding the comparison of the effectiveness of two non-surgical periodontitis treatment protocols (FMD and QSRP) based on selected clinical parameters (API, BoP, PD, CAL, teeth mobility), are in agreement with the majority of studies and do not indicate the superiority of

the FMD protocol over the quadrant method (QSRP). Both methods are equivalent in the clinical effects of treatment.