

UNIWERSYTET MEDYCZNY W ŁODZI

WYDZIAŁ LEKARSKI, ODDZIAŁ LEKARSKO-DENTYSTYCZNY

KATEDRA STOMATOLOGII ODTWÓRCZEJ

ZAKŁAD CHOROÓB BŁONY ŚLIZOWEJ JAMY USTNEJ I PRZYŻĘBIA

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych

**„Ocena wpływu wielonienasyconych kwasów
tłuszczowych omega-3 EPA i DHA na skuteczność
niechirurgicznego leczenia zapalenia przyzębia”**

PROMOTOR

**dr hab. n. med. prof. uczelni
Natalia Lewkowicz**

Zakład Chorób Błony Śluzowej Jamy Ustnej i Przyzębia,
Katedra Stomatologii Odtwórczej Uniwersytetu Medycznego
w Łodzi

13. Streszczenie

Wstęp

Wielonienasycone kwasy tłuszczowe (WNKT) omega-3, w tym kwas dokozaheksaenowy (DHA) i eikozapentaenowy (EPA) posiadają szeroki zakres działania przeciwzapalnego, immunoregulującego oraz zwiększającego potencjał antyoksydacyjny. Z tego względu WNKT omega-3 wydają się być substancjami przydatnymi w leczeniu zapalenia przyzębia. Wyniki dotychczasowych badań klinicznych sugerują pozytywny wpływ stosowania kwasów EPA i DHA w ramach leczenia niechirurgicznego zapalenia przyzębia. Jednakże, ze względu na niejednorodne protokoły badawcze, brakuje danych jednoznacznie wspierających korzyści płynące z takiej suplementacji.

Cel pracy

Ocena wpływu zastosowania preparatu zawierającego wyższe wielonienasycone kwasy tłuszczowe omega-3 EPA i DHA na parametry kliniczne, parametry odpowiedzi immunologicznej w ślinie oraz na występowanie periopatogenów w kieszonkach przyzębnych pacjentów z zapaleniem przyzębia leczonych niechirurgicznie.

Material i metody

W eksperymencie medycznym wzięli udział pacjenci skierowani do Zakładu Chorób Błony Śluzowej Jamy Ustnej i Przyzębia Uniwersytetu Medycznego w Łodzi. Badanie zostało przeprowadzone zgodnie z Deklaracją Helsińską, a protokół został zatwierdzony przez Komisję Bioetyczną Uniwersytetu Medycznego w Łodzi (numer referencyjny RNN/251/17/KE) i zarejestrowany na stronie clinicaltrials.gov (NCT04477395). Doświadczenie zostało przeprowadzone w okresie od października 2017 roku do kwietnia 2021 roku. Badaniu poddano 50 uczestników w wieku 22-70 lat z uogólnionym zapaleniem przyzębia stadium III i IV po uzyskaniu pisemnej zgody pacjenta. Badanie miało charakter prospektywnego, randomizowanego badania klinicznego. Ustalono sześciomiesięczny okres trwania badania.

Do badania zostali włączeni pacjenci niepalący, ogólnie zdrowi, którzy nie przyjmowali w przeciągu ostatnich trzech miesięcy żadnych leków. Losowo utworzona została 24-

osobowa grupa doświadczalna oraz 26-osobowa grupa kontrolna. W obu grupach przeprowadzone zostały zabiegi skalingu naddziąsłowego i poddziąsłowego wraz z wygładzeniem powierzchni korzeni (scaling and root planing; SRP) na początku badania oraz po 3 miesiącach wraz z zindywidualizowanym instruktażem higieny jamy ustnej. Osoby znajdujące się w grupie doświadczalnej przyjmowały preparat żywieniowy zawierający WWKT omega-3 EPA i DHA przez okres 6 miesięcy, natomiast w grupie kontrolnej przeprowadzone były wyłącznie niechirurgiczne zabiegi periodontologiczne.

Na początku badania oraz po 3 i 6 miesiącach oceniano parametry kliniczne: full-mouth plaque score (FMPI), bleeding on probing (BOP), probing depth (PD), gingival recession (REC) i clinical attachment loss (CAL). Ocenione zostały także próbki śliny pobrane na początku badania oraz w połowie jego trwania czyli po 3 miesiącach, gdzie określono stężenia pięćdziesięciu czterech cytokin, chemokin i czynników wzrostu. Ponadto została pobrana na początku badania oraz po 6 miesiącach poddziąsłowa płytki bakteryjna, gdzie określono stężenie następujących bakterii: *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*. Na początku eksperymentu i po 6 miesiącach pobrano także próbki krwi na podstawie , których określono jak zmienił się profil lipidowy u pacjentów suplementowanych kwasami omega-3.

Wyniki

Po 3 miesiącach od rozpoczęcia badania w grupie przyjmującej WWKT omega-3 w porównaniu do grupy kontrolnej zaobserwowano istotnie statystycznie niższe wartości BOP (odpowiednio 13,1% vs. 19,0%), większą poprawę CAL (odpowiednio 4,39 mm vs. 5,04 mm) oraz większy odsetek zamkniętych kieszonek ($PD \leq 4$ mm i brak BOP) (59,9% vs 49,8%). Po 6 miesiącach różnice między grupami nie były już istotne statystycznie, z wyjątkiem istotnie niższego BOP w grupie badanej (12,8%) w porównaniu do grupy kontrolnej (16,9%).

Ponadto przeanalizowano parametry kliniczne dla kieszonek o umiarkowanej głębokości PD 4 - 5mm oraz parametry dla głębokich kieszonek $PD \geq 6$ mm. Dla kieszonek 4-5 mm zarówno po 3 jak i 6 miesiącach nie wykazano istotnych różnic pomiędzy grupami. Natomiast analiza parametrów klinicznych dla głębokich kieszonek wykazała znaczące różnice między grupami. Po 3 miesiącach zaobserwowano w grupie badanej istotne spłylenie PD z $6,42 \pm 0,31$ mm do $4,35 \pm 0,98$ mm, zmniejszenie REC, zysk

CAL oraz większy odsetek zamkniętych kieszonek ($PD \leq 4$ mm i brak BOP) (37,5%) w porównaniu do grupy kontrolnej (26,4%). Podobnie po 6 miesiącach wykazano istotne statystycznie zmniejszenie REC i poprawę CAL oraz większy odsetek zamkniętych kieszonek ($PD \leq 4$ mm i brak BOP) u osób spożywających olej rybi (50,2%) w porównaniu do grupy kontrolnej (38,3%).

WWKT omega-3 i ich wpływ na cytokiny, chemokiny i czynniki wzrostu

W przebadanych próbkach śliny poziom prozapalnych interleukin IL-8, IL-17 uległ znacznemu obniżeniu przy jednoczesnym wzroście przeciwzapalnej IL-10 oraz proregeneracyjnego czynnika FGF2 u pacjentów, którzy otrzymywali WWKT omega-3 w porównaniu do pacjentów leczonych wyłącznie niechirurgicznie.

WWKT omega-3 zmniejszają liczebność kluczowych periopatogenów

Po 6 miesiącach liczba wszystkich periopatogenów zmniejszyła się istotnie w grupie badanej w porównaniu z wartością wyjściową, podczas gdy w grupie kontrolnej istotnie spadła tylko liczba *A. actinomycetemcomitans*. Porównanie między grupami wykazało, iż po 6 miesiącach średnia liczebność bakterii była istotnie niższa w grupie badanej w porównaniu z grupą kontrolną.

Spożycie oleju rybiego powoduje zwiększenie udziału kwasów tłuszczowych omega-3 i zmniejszenie udziału omega-6 w surowicy

W grupie pacjentów przyjmujących olej rybi doszło do zwiększenia poziomu kwasów tłuszczowych omega-3 w surowicy oraz zmniejszenia ilości kwasów tłuszczowych omega-6 po 6 miesiącach suplementacji.

Wnioski

Na podstawie uzyskanych wyników badania stwierdza się następujące wnioski:

- Wspomagające stosowanie dużych dawek WWKT omega-3 EPA i DHA podczas niechirurgicznego leczenia zapalenia przyzębia przyniosło krótkoterminowe korzyści kliniczne (głównie po 3 miesiącach), zwłaszcza w głębszych kieszonkach (≥ 6 mm), któremu towarzyszyło obniżenie poziomu cytokin/chemokin prozapalnych w ślinie na rzecz wyższego poziomu przeciwzapalnej IL-10 i proregeneracyjnego czynnika FGF2.

- W grupie badanej po 6 miesiącach doszło do istotnego obniżenia poziomu kluczowych bakterii obecnych w zapaleniu przyzębia w porównaniu do wartości początkowych oraz w zestawieniu wyników po 6 miesiącach z grupą leczoną wyłącznie niechirurgicznie.
- Uzyskano także dodatkową korzyść po przez zwiększenie poziomu kwasów tłuszczowych omega-3 w surowicy krwi osób spożywających olej rybi i tym samym obniżenie poziomu kwasów tłuszczowych omega-6.
- Spożycie oleju rybiego zawierającego duże dawki WWKT omega-3 przez 6 miesięcy było bezpieczne i dobrze tolerowane przez pacjentów.

14. Summary

Introduction

Recently, there is a growing interest in products containing polyunsaturated fatty acids (PUFAs) omega-3, including docosahexaenoic acid (DHA) and eicosapentaenoic acid (EPA). Omega-3 PUFAs were shown to possess therapeutic, anti-inflammatory and protective properties, thus they can be useful substances in the treatment of periodontitis. Current results of clinical trials suggest a positive effect of EPA and DHA acids used in non-surgical treatment of periodontitis. Aside from the potential benefits of omega-3 PUFAs in the patients with periodontitis, the results of the clinical studies assessing their use in combination with non-surgical treatment are still inconclusive.

Aim of the study

This study aimed to evaluate the impact of dietary supplementation with high doses of omega-3 polyunsaturated fatty acids (PUFAs) eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA) on clinical parameters, parameters of the immune response in saliva and the presence of periopathogens in periodontal pockets in patients with periodontitis treated non-surgically.

Materials and methods

Patients were recruited at the Department of Periodontology and Oral Diseases, Medical University of Lodz. The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki, and the protocol was approved by Medical University of Lodz Bioethics Committee (Reference number RNN/251/17/KE) and registered at clinicaltrials.gov (NCT04477395). All assessments and treatments were carried out at the Department of Periodontology and Oral Diseases, Medical University of Lodz from October 2017 to April 2021. The study involved 50 participants aged 22-70 years with generalized periodontitis stage III and IV. After the nature of the study was clearly explained to participants, they signed the consent form for participation. The study was designed as a paralleled-arm, randomized clinical trial. A six-month trial period was set.

The study included non-smoking, generally healthy patients who had not taken any medications within the last three months. A 24-person experimental group and a 26-person control group were created at random. In both groups supragingival and subgingival scaling

and root planning procedures were performed (SRP) at the beginning of the study and after 3 months, along with individualized oral hygiene instruction. Patients in the experimental group were supplemented with fish oil containing high doses of omega-3 PUFA EPA and DHA for 6 months, while in the control group only non-surgical periodontal procedures were performed. Clinical parameters were evaluated at three time points: at baseline, at 3 months and at 6 months. The following clinical parameters were assessed: full mouth plaque index (FMPI), bleeding on probing (BOP), probing depth (PD) and gingival recession (REC). Clinical attachment loss (CAL) was calculated as a sum of PD and REC at respective sites. Moreover salivary samples were taken from all individuals at baseline and after three months and concentrations of fifty-four cytokines, chemokines and growth factors were measured. To evaluate the level of *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola* a sterile number 30 paper endodontic point inserted into the deepest periodontal pocket from each quadrant for 10 s. Samples were taken twice, at baseline before periodontal treatment and after 6 months. At baseline and after 6 months, samples of blood were taken in sterile 3.5 mL tubes containing clotting activator to define the changes in the serum lipids concentrations in the test group after 6-month supplementation with FO in relation to the baseline and to the control group.

Results

After 3 months, statistically significant differences were demonstrated for BOP between test and control groups (13.1% vs. 19.0%, respectively) and CAL (4.39 mm vs. 5.04 mm, respectively) together with significantly higher rates of closed pockets (PD \leq 4 mm and no BOP) (59.9% vs 49.8%). When compared between the groups at 6 months, statistically lower scores for BOP and FMPI were demonstrated in the test group (12.8% and 16.8%, respectively) compared to 16.9% and 25.8% in the control group.

Additionally, we analyzed mean values of clinical parameters for moderate (PD 4 – 5 mm) and deep (PD \geq 6 mm) pockets. For moderate pockets at 3 and 6 months, no statistically significant differences were demonstrated between the groups. However, when compared changes in the initially deep pockets, differences between the groups were evident. At 3 months, a statistically significant reduction of PD (from 6.42 ± 0.31 mm to 4.35 ± 0.98 mm), and REC, and an improvement of CAL in the test group were revealed. Moreover at 3 months a greater percentage of closed pockets (PD \leq 4 mm and no BOP) (37.5%) were

observed compared to the control group (26.4%). Similarly, after 6 months, a statistically significant reduction in REC and improvement in CAL were demonstrated, as well as a greater percentage of closed pockets (PD \leq 4 mm and no BOP) (50.2%) compared to the control group (38.3%).

Omega-3 PUFA affected the levels of key salivary cytokines and chemokines

At baseline, no differences in the mean concentrations of cytokines/chemokines/growth factors between the test and control groups were detected. Conversely, at three months, we found that mean concentrations of pro-inflammatory IL-8, IL-12 and IL-17 were markedly lower, and the concentration of anti-inflammatory IL-10 was significantly higher in the salivary samples of the patients who received omega-3 PUFA in comparison to the patients treated with SRP alone.

Omega-3 PUFAs facilitate key periodontal pathogen clearance

At 6 months, the number of all periopathogens decreased significantly in the test group in comparison to the baseline, while in the control group only the number of *A. actinomycetemcomitans* dropped significantly. When compared between the groups at 6 months, the mean numbers of bacteria were significantly lower in the test group in comparison to the control group

FO intake results in increased proportions of serum n-3 PUFAs and decreased proportions of n-6 PUFAs

We found that FO intake resulted in increased proportions of serum n-3 PUFAs and decreased proportions of n-6 PUFAs in test group after 6 months of supplementation.

Conclusions

Following conclusions were drawn on the basis of the received results of conducted experiment:

- The adjunctive use of omega-3 PUFAs during non-surgical treatment of periodontitis provided short-term clinical benefits (mainly at 3 months), especially in the deeper pockets (\geq 6 mm), accompanied by decrease of pro-inflammatory cytokines/ chemokines levels in saliva in favor of higher levels of the anti-inflammatory IL-10 and the pro-regenerative factor FGF2.

- After 6 months, there was a significant reduction in the level of key periodontal bacteria in the test group compared to the initial values and in the comparison with results after 6 months in the group treated only non-surgically.
- An additional benefit was obtained by increasing the serum levels of omega-3 fatty acids in those consuming fish oil and thereby lowering the levels of omega-6 fatty acids.
- The administration of fish oil containing high doses of omega-3 PUFA for 6 months was safe and well tolerated by patients.