

СИТУАТИВНИЙ АНАЛІЗ ЕКСПРЕСІЇ АНТИМІКРОБНИХ ПЕПТИДІВ РОТОВОЇ РІДИНИ У ХВОРИХ ІЗ ГЕНЕРАЛІЗОВАНИМ ПАРОДОНТИТОМ, АСОЦІЙОВАНИМ ІЗ НЕПЕРЕНОСИМІСТЮ ГЛЮТЕНУ

Т.В. Кустрьо

ІПО НМУ імені О.О. Богомольця, м. Київ, Україна

Резюме. Генералізований пародонтит є одним із найпоширеніших стоматологічних захворювань, у розвитку та прогресуванні якого відіграє роль чимало факторів. Відповідно до сучасних парадигм патогенезу генералізованого пародонтиту, вагому роль у розвитку даного захворювання відіграють порушення мікробіоценозу ротової порожнини, стану імунної системи організму. Важливе значення в підтримці гомеостазу порожнини рота мають антимікробні пептиди, які на сьогодні розглядаються як природні ендogenous антибіотики та справляють опосередкований вплив на підвищення продукції IgA, IgG, перешкоджають утворенню мікробної плівки на поверхні зуба. Також слід зауважити, що важливим аспектом у прогресуванні генералізованого пародонтиту є наявність супутніх соматичних патологій. Дослідження коморбідності захворювань порожнини рота та внутрішніх органів і систем на сьогодні є актуальним питанням. У наш час велика увага клініцистів та науковців прикута до таких захворювань шлунково-кишкового тракту, як глютен-асоційовані захворювання, до яких належать: целиакія, непереносимість глютену без целиакії тощо. Нерідко в пацієнтів із такими глютен-асоційованими захворюваннями відмічаються різноманітні прояви в порожнині рота.

Ключові слова: антимікробні пептиди, HNP 1-3, LL-37, глютен-асоційовані захворювання, генералізований пародонтит.

Situational analysis of the expression of antimicrobial peptides in oral fluid in patients with general periodontal disease associated with gluten intolerance

T. Kustro

Department of Dentistry Bogomolets National Medical University, Kyiv, Ukraine

Abstract. General periodontal disease is one of the most common dental diseases, in the development and progression of which many factors play a role. According to the pathogenesis of general periodontal disease, a significant role in the development of this disease belongs



DOI: 10.31793/2709-7404.2021.2-4.58

© Т.В. Кустрьо

to microbiocenosis of the oral cavity, the state of the immune system. Antimicrobial peptides play a significant role in homeostasis of the oral cavity and have an indirect effect on increasing the production of IgA, IgG, prevent the formation of microbial film on the tooth surface. It should also be mentioned that an important aspect in the progression of general periodontal disease plays the presence of concomitant somatic pathologies. The study of comorbidity of the oral cavity diseases and other human systems is a topical issue today. Nowadays, great attention of clinicians and scientists is focused on gluten-related diseases, which include: celiac disease, gluten intolerance without celiac disease etc. Often patients with these gluten-related diseases have various manifestations in the oral cavity.

Keywords: antimicrobial peptide, HNP 1-3, LL-37, gluten related disorder, general periodontal disease.

Актуальність

На сьогодні генералізований пародонтит є одним із найпоширеніших стоматологічних захворювань. Зокрема, відповідно до даних мультицентрових епідеміологічних досліджень, поширеність хронічного генералізованого пародонтиту в осіб молодого віку становить понад 60% [1, 2]. Відомо, що генералізований пародонтит є поліетіологічним захворюванням, у розвитку та прогресуванні якого важливу роль відіграють як місцеві, так і системні чинники. Відповідно до сучасних парадигм патогенезу генералізованого пародонтиту, важливе значення має порушення мікробіоти ротової порожнини та формування мікробної біоплівки [3]. Пародонтопатогенні мікроорганізми викликають цілий каскад імунопатологічних реакцій у порожнині рота, зокрема в пародонті. Гострий запальний процес, який виникає як результат дії мікроорганізмів, є проявом фізіологічної захисної реакції, у результаті якої відбувається міграція імунних клітин, вивільнення прозапальних цитокінів та хемокінів [4]. Під час прогресування пародонтиту відбувається резорбція кісткової тканини за рахунок превалювання остеокластичних процесів над остеобластичними.

Із захворюваннями пародонта асоціюється понад 20 видів мікроорганізмів, проте найбільш асоційованими з розвитком та прогресуванням пародонтиту прийнято вважати *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticula* [5]. Згідно з даними літератури, дані пародонтопатогени мають найбільшу вірулентність. Унаслідок дії пародонтопатогенів в ясенній борозні відбувається зміна рН, що суттєво впливає на склад біоплівки пародонтопатогенів. У процесі колонізації відмічається

коадгезія мікроорганізмів (фіксація мікроорганізмів до мікроорганізмів того самого виду) та коагрегація (фіксація мікроорганізмів іншого виду до вже фіксованих мікроорганізмів). Таким чином, сукупність вищевказаних процесів призводить до селективної колонізації тканин із формуванням змішаної мікробної біоплівки.

Одним з актуальних питань сьогодення є вивчення компонентів вродженого імунітету, а саме антимікробних пептидів. Згідно з даними дослідників, існує тісний взаємозв'язок між збільшенням рівня антимікробних пептидів та ступенем тяжкості хронічного генералізованого пародонтиту [6]. На сьогодні антимікробні пептиди розглядаються як природні ендогенні антибіотики. У наш час відомо, що антимікробні пептиди також опосередковують взаємозв'язок вродженого та набутого імунітету. Найбільш вивченими на сьогодні є два види антимікробних пептидів — дефензини та кателіцидини [7, 8]. Дефензини є основними антимікробними катіонними пептидами, які здатні порушувати проникність мембрани грибів та вірусів і спричиняють інгібуючий вплив на внутрішньоклітинні функції патогенного організму. Основними джерелом антимікробних пептидів у ротовій порожнині є епітелій ясен та нейтрофіли, хоча слинні залози також виділяють деяку кількість дефензинів. Протягом останніх років проводиться все більше досліджень щодо ролі антимікробних пептидів у підтримці гомеостазу ротової порожнини. На сьогодні у ротовій рідині визначаються два основні види антимікробних пептидів: альфа- (Human α -defensins (HNPs)) та бета-дефензини (Human β -defensins (hBDs)) [8]. Антимікробні пептиди справляють опосередкований вплив на стимуляцію набутого імунітету, сприяють підвищенню продукції IgA, IgG, перешкоджають утворенню мікробної біоплівки на поверхні зуба. На сьогодні чимало

авторів розглядають антимікробні пептиди як маркери розвитку пародонтиту.

Слід зазначити, що вагома роль у розвитку та прогресуванні генералізованих захворювань пародонта належить системним чинникам, серед яких важливим є наявність супутніх патологій [9]. Відомий тісний взаємозв'язок захворювань пародонта та захворювань шлунково-кишкового тракту. Згідно з даними мультицентрових епідеміологічних досліджень, найпоширенішою хронічною патологією кишківника є глютеніа ентеропатія [10]. Серед нозологічних форм глютен-асоційованих захворювань прийнято виділяти: алергію на пшеницю, целиакию та непереносимість глютену без целиакиї (НГБЦ) [10, 11]. У зв'язку із стрімким зростанням кількості діагностованих випадків целиакиї та НГБЦ дослідження такого виду патологій має важливе клінічне значення. Відомо, що целиакия являє собою хронічне аутоімунне захворювання, яке виникає в генетично схильних осіб унаслідок несприйняття похідних злакових, які містять у своєму складі глютен, та призводить до атрофічних змін у слизовій оболонці тонкої кишки [12]. У свою чергу, на сьогодні НГБЦ є більшою мірою діагнозом виключення та перебігає за своїми неавтоімунним та неалергічним механізмами [13]. Спектр клінічних проявів целиакиї та НГБЦ є варіабельним за рахунок атипичного перебігу захворювання. Зокрема, у дорослому віці в пацієнтів превалюють позакишкові клінічні прояви. Згідно з даними літератури, досить часто в пацієнтів при целиакиї та НГБЦ можна помітити і прояви в порожнині рота, а саме: афтозні стоматити, хейліти, дефекти твердих тканин зуба, захворювання пародонта тощо [14, 15]. Проте в літературі практично не висвітлено взаємозв'язок, особливості клінічних проявів захворювань пародонта при глютен-асоційованих захворюваннях.

Мета роботи — провести ситуативний аналіз експресії антимікробних пептидів ротової рідини в пацієнтів із глютен-асоційованими захворюваннями та спектра пародонтопатогенного мікробіотопу пародонтальних кишень.

Матеріали та методи

Для вирішення поставленої мети відповідно до критеріїв включення та виключення і дизайну дослідження було сформовано три досліджувані групи. До першої групи дослідження (група ГП+Ц) увійшло 30 пацієнтів із генералізованим

пародонтитом початкового — I ступеня на тлі целиакиї. До складу другої групи (група ГП+НГБЦ) увійшло 30 пацієнтів із генералізованим пародонтитом початкового — I ступеня на тлі НГБЦ. До групи КП увійшло 30 пацієнтів із генералізованим пародонтитом початкового — I ступеня без супутньої патології, контрольну групу К становили 30 пацієнтів із клінічно інтактним пародонтом без ознак непереносимості глютену. Критеріями виключення були: пацієнти віком до 19 років та понад 35 років, вагітність і період лактації, наявність тяжких, декомпенсованих супутніх патологій внутрішніх органів і систем (окрім глютен-асоційованих захворювань), злоякісні утворення, наявність гострих запальних захворювань (ГРЗ, бронхіт, пневмонії тощо), алкогольна або наркотична залежність, пацієнти, які на момент проведення дослідження або протягом останніх 4 тижнів до початку дослідження приймали антибактеріальні та протизапальні засоби, відмова від участі в дослідженні.

Верифікація нозологічної форми глютен-асоційованої ентеропатії проводилася гастроентерологом відповідно до загальноприйнятого протоколу. Обстеження порожнини рота, дослідження пародонтального статусу проводилися за допомогою загальноприйнятого уніфікованого протоколу. Систематизацію захворювань пародонта проводили за класифікацією Н.Ф. Данилевського. Дослідження мікрофлори пародонтальних кишень проводили методом полімеразно-ланцюгової реакції (ПЛР) у режимі реального часу. Збір матеріалу проводився в ранковий час, натщесерце, без попередньої гігієнічної обробки порожнини рота за допомогою стерильного паперового зонда, який вводили в ділянку найглибшої пародонтальної кишень. Отриманий за вищевказаною методикою матеріал поміщали в стерильну пробірку типу Eppendorf об'ємом 1,5 мл. За допомогою даного генетично-молекулярного дослідження визначали наявність маркерів таких пародонтопатогенних мікроорганізмів: *Prevotella intermedia*, *Bacteroides forsythus*, *Treponema denticola*, *Actinobacillus actinomycetem comitans*, *Porphyromonas gingivalis*. Також під час дослідження було проведено аналіз LL-37 (кателіцидинів) та HNP 1-3 (α -дефензинів) в ясенній рідині з використанням методу імуноферментного аналізу на апараті RIDER ANTHOOS2020 за допомогою набору Human LL-37 ELISA, Human HNP 1-2 ILISA (Hycult Biotech, Голландія). Отриманий матеріал розводили буферним розчином у 2000 разів перед проведенням

ІФА. Оцінку отриманого результату оцінювали за допомогою спектрофотометрії. Відповідно до дизайну дослідження, нами було проведено аналіз експресії антимікробних пептидів ротової рідини в 60 пацієнтів із генералізованим пародонтитом на тлі целиакії та НГБЦ. В основу даного фрагменту закладено припущення про вірогідні кореляції експресії антимікробних пептидів АМП із виявленням умовно-патогенної мікрофлори — пародонтопатогенів та визначальну роль їх наявності в патогенезі розвитку генералізованого пародонтиту. Було досліджено активність двох основних антимікробних пептидів порожнини рота — LL-37 (кателіцидинів) та HNP 1-3 (α -дефензинів). Контролем слугували 30 клінічно соматично здорових пацієнтів із генералізованим пародонтитом аналогічного віку та статі. Для статистичної обробки було використано програмне забезпечення IBM SPSS Statistics 20. Статистично достовірними вважалися значення, де p — рівень $\leq 0,05$.

Результати та їх обговорення

Пацієнти досліджуваних груп були порівняні за віком (середній вік становив $28,03 \pm 3,3$ року) та рівномірним розподілом за статтю.

Результати дослідження рівня експресії антимікробних пептидів HNP 1-3 (α -дефензин) та LL-37 (кателіцидин) у ротовій рідині пацієнтів із генералізованими захворюваннями пародонта на тлі непереносимості глютену наведено в таблиці.

У пацієнтів досліджуваної групи ГП+Ц рівень експресії HNP 1-3 (α -дефензину) з ГП I ступеня сягав $1748,6 \pm 1037$ нг/мл, у пацієнтів із ГП II ступеня — $5,87 \pm 0,91$ нг/мл, а в пацієнтів групи ГП+НГБЦ — $0,55 \pm 0,18$ нг/мл, що достовірно нижче за показники в групах КП — $0,81 \pm 0,08$ нг/мл та К — $0,98 \pm 0,03$ нг/мл ($p \leq 0,05$). Достовірної різниці між досліджуваними групами осіб із непереносимістю глютену виявлено не було ($p \geq 0,05$).

Рівень експресії антимікробного пептиду HNP 1-3 (α -дефензину) у ротовій рідині в групі ГП+Ц становив $5,87 \pm 0,91$ нг/мл, у групі ГП+НГБЦ — $4,68 \pm 0,28$ нг/мл, отже, достовірних розбіжностей не виявлено ($p \geq 0,05$). Водночас у контрольних групах КП та К показники рівня експресії HNP 1-3 (α -дефензину) дорівнювали $6,14 \pm 1,01$ нг/мл та $7,31 \pm 0,18$ нг/мл відповідно, що свідчило про достовірне відхилення досліджуваного показника в пацієнтів із непереносимістю глютену, у т. ч. із целиакією.

Для розуміння вірогідного чинника впливу на рівень експресії антимікробних пептидів у ротовій рідині хворих на генералізований пародонтит початкового — I ступеня на тлі непереносимості глютену було проведено аналіз результатів генетично-молекулярного дослідження пародонтопатогенного мікробіотопу пародонтальних кишень у пацієнтів досліджуваних груп. Виявлено високу частоту пародонтопатогенів «червоного комплексу» (згідно з класифікацією, запропонованою Socransky&Haffajee, 2005). Зокрема, найчастіше в пародонтальних кишнях пацієнтів із целиакією траплявся *P. Gingivalis*, який було виявлено в 76% випадків, *Treponema denticola* було виявлено в 64%, а *Bacteroides forsythus* — у 44% пацієнтів. У свою чергу, у пацієнтів із НГБЦ *P. Gingivalis* було виявлено в 52% випадків, *Treponema denticola* — у 52%, а *Bacteroides forsythus* — у 48% випадків. У контрольній групі *P. Gingivalis* траплявся в 72% випадків, *Treponema denticola* — у 36%, а *Bacteroides forsythus* — у 32% випадків. *Prevotella intermedia*, який належить до «помаранчевого комплексу», траплявся в 56% пацієнтів із целиакією, у 44% пацієнтів із НГБЦ, а в контрольній групі — у 32% випадків. *A. actinomycetemcomitans* траплявся у 24% пацієнтів із целиакією, 44% пацієнтів із НГБЦ та 36% пацієнтів контрольної групи. Під час дослідження виявлено сильний кореляційний взаємозв'язок між експресією антимікробного пептиду LL-37 та *P. Gingivalis* ($r=0,93$), помірно виражений кореляційний взаємозв'язок між експресією HNP 1-3 та вмістом таких пародонтопатогенних мікроорганізмів, як *P. gingivalis*, *T. forsythia* та *T. Denticola* ($r=0,67$).

Таблиця

Рівень експресії антимікробних пептидів HNP 1-3 (α -дефензин) та LL-37 (кателіцидин) у ротовій рідині пацієнтів із генералізованим пародонтитом на тлі непереносимості глютену (нг/мл, $M \pm m$, $p \leq 0,05$)

Table

The expression level of antimicrobial peptides HNP 1-3 (α -defensin) and LL-37 (cathelicidin) in the oral fluid of patients with generalized periodontitis on the background of gluten intolerance (ng/ml, $M \pm m$, $p \leq 0.05$)

Показник	Групи			
	ГП+Ц (n=30)	ГП+НГБЦ (n=30)	К ГП (n=30)	К (n=30)
LL-37, нг/мл	$0,66 \pm 0,19$	$0,55 \pm 0,18$	$0,81 \pm 0,08$	$0,98 \pm 0,03$
HNP 1-3, нг/мл	$5,87 \pm 0,91$	$4,68 \pm 0,28$	$6,14 \pm 1,01$	$7,31 \pm 0,18$

Висновки

Під час дослідження мікробіоценозу пародонтальних кишень відмічається високий ступінь поширеності пародонтопатогенних мікроорганізмів 1-го порядку з тенденцією до збільшення їхньої кількості при розвитку ГП на тлі непереносимості глютену. При вивченні рівня експресії антимікробного пептиду HNP 1-3 відмічається його стійке збільшення за прогресування захворювання (ГП). Проте при порівнянні отриманих даних експресії

даного антимікробного пептиду його рівень у пацієнтів із глютен-асоційованими захворюваннями є дещо нижчим порівняно з групою контролю. При дослідженні експресії LL-37 в ясенній рідині відмічається зменшення його синтезу при глютензалежних станах. Виявлено кореляційний зв'язок між експресією антимікробного пептиду LL-37 та *P. Gingivalis*. Отримані дані свідчать про можливість оцінки експресії антимікробних пептидів як предиктора розвитку ГП в осіб із непереносимістю глютену.

Список використаної літератури

1. Nazir MA. Prevalence of periodontal disease, its association with systemic diseases and prevention. *Int J Health Sci (Qassim)*. 2017;11(2):72-80.
2. Dye, BA. Global periodontal disease epidemiology. *Periodontology*. 2000;58(1):10-25. doi:10.1111/j.1600-0757.2011.00413.x.
3. Murakami S, Mealey BL, Mariotti A, Chapple ILC. Dental plaque-induced gingival conditions. *J Periodontol*. 2018 Jun;89(1): S17-S27. doi: 10.1002/JPER.17-0095. PMID: 29926958.
4. Pan W, Wang Q, Chen Q. The cytokine network involved in the host immune response to periodontitis. *Int J Oral Sci*. 2019 Nov 5;11(3):30. doi: 10.1038/s41368-019-0064-z. PMID: 31685798; PMCID: PMC6828663.
5. Papone, Virginia et al. Detection and prevalence of periodontal pathogens in a Uruguayan population with chronic periodontitis using conventional methodology and metagenomics. *Odontostomatología [online]*. 2015;17(25) [cited 2021-07-01]:23-32.
6. Jourdain ML, Velard F, Pierrard L, Sergheraert J, Gangloff SC, Braux J. Cationic antimicrobial peptides and periodontal physiopathology: A systematic review. *J Periodontol Res*. 2019 Dec;54(6):589-600. doi: 10.1111/jre.12676. Epub 2019 Jun 19. PMID: 31215656.
7. Славінська В. Аналіз експресії антимікробних пептидів ротової рідини у дітей з ураженнями слизової оболонки порожнини рота, асоційованими atopічним дерматитом. *Norwegian Journal of Development of the International Science*. 2020;52-1:32-35. doi: 10.24412/3453-9875-2020-52-1-32-35.
8. Brancatisano FL, Maisetta G, Barsotti F, Esin S, Miceli M, Gabriele M, Giuca MR, Campa M, Batoni G. Reduced human beta defensin 3 in individuals with periodontal disease. *J Dent Res*. 2011 Feb;90(2):241-5.
9. John V, Alqallaf H, De Bedout T. Periodontal Disease and Systemic Diseases: An Update for the Clinician. *J Indiana Dent Assoc*. 2016 Winter;95(1):16-23. PMID: 26939411.
10. Губская ЕЮ. Новое понимание спектра глютензависимых заболеваний / ЕЮ Губская. *Сучасна гастроентерологія*. 2014;1:160-165.
11. Elli L, Branchi F, Tomba C, Villalta D, Norsa L, Ferretti F, Roncoroni L, Bardella MT. Diagnosis of gluten related disorders: Celiac disease, wheat allergy and non-celiac gluten sensitivity. *World J Gastroenterol*. 2015 Jun 21;21(23):7110-9. doi: 10.3748/wjg.v21.i23.7110. PMID: 26109797; PMCID: PMC4476872.
12. Bascuñán KA, Vespa MC, Araya M. Celiac disease: understanding the gluten-free diet. *Eur J Nutr*. 2017 Mar;56(2):449-459. doi: 10.1007/s00394-016-1238-5. Epub 2016 Jun 22. PMID: 27334430.
13. Cha RR, Kim HJ. [Non-celiac Gluten Sensitivity]. *Korean J Gastroenterol*. 2020 Jan 25;75(1):11-16. Korean. doi: 10.4166/kjg.2020.75.1.11. PMID: 31986568.
14. Cruz IT, Fraiz FC, Celli A, Amenabar JM, Assunção LR. Dental and oral manifestations of celiac disease. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2018 Nov 1;23(6): e639-e645. doi: 10.4317/medoral.22506. PMID: 30341262; PMCID: PMC6260995.
15. Rashid M, Zarkadas M, Anca A, Limeback H. Oral manifestations of celiac disease: a clinical guide for dentists. *J Can Dent Assoc*. 2011;77: b39. PMID: 21507289.