

УДК 616.314-084:[616/71-002-074/-076:57.086]

*Сидоренко О.О., Павлов С.В., Возний О.В.*

## ВИКОРИСТАННЯ МОЛЕКУЛЯРНО-БІОХІМІЧНИХ МАРКЕРІВ МЕТАБОЛІЗМУ КІСТКОВОЇ ТКАНИНИ ПРИ СКРИНІНГУ СТОМАТОЛОГІЧНОГО ЗДОРОВ'Я В НАСЕЛЕННЯ

Запорізький державний медичний університет, Запоріжжя, Україна

Нині науковий інтерес і стоматологів, і фахівців у галузі клінічної лабораторної діагностики пов'язаний із використанням ротової рідини як об'єкта діагностичної оцінки молекулярно-біохімічних показників при захворюваннях ротової порожнини. Загальновідомо, що ротова рідина має органічну й неорганічну складову. Неорганічна складова слини представлена макро- і мікроелементами, які можуть бути в складі різноманітних сполук або в іонізованій формі. Органічна частина представлена білками, вуглеводами, ліпідами, необхідними азотистими сполуками (сечовина, сечова кислота), вітамінами, гормонами, органічними й нуклеїновими кислотами [1; 2].

Варто зазначити, що 99 % органічних молекул, які циркулюють у плазмі, ідентифікуються в слині й відображають «регіональну направленість» патобіохімічних процесів. Вищевикладене визначає актуальність і перспективність використання слини в ролі біологічного середовища для визначення фізіологічних процесів і патологічних станів не тільки в ротовій порожнині, а й в організмі. У порівнянні з традиційним методом дослідження крові визначення показників у ротовій рідині має низку переваг: неінвазивність, атравматичність для пацієнта, відсутність стресу, характерного для венепункції; простіші умови зберігання й транспортування завдяки рідинному стану (на відміну від цілісної крові, що має властивість згортатися); можливість взяття біологічного матеріалу в необхідній кількості разів; відсутність необхідності у кваліфікованому персоналі й спеціальному обладнанні при забиранні ротової рідини [3-6].

Сьогодні не викликає сумнівів визначальна роль прозапальних агентів і каскаду патобіохімічних реакцій у процесах деструкції кісткової тканини.

Так, певну діагностичну цінність має лактоферин – поліфункціональний білок із сімейства трансферинів, який синтезується епітеліальними клітинами як один із компонентів імунної системи, наявних у різноманітних секреторних рідинах: секреті носових залоз, грудному молоці; так само важливим є й кателіцидин (LL-37) – антимікробний пептид, локалізований у нейтрофілах, шкірі, слизових, а також у слині [6]. Кілька наукових розвідок описують тісний зв'язок між рівнем LL-37 у слині й захворюваннями ротової порожнини. Зниження концентрації LL-37 у слині пацієнтів із подібними захворюваннями корелює із запальними хворобами тканин пародонта [7].

Крім того, на сьогодні доведена центральна роль матриксних металопротеїназ, остеокальцину в обміні білків сполучної тканини, а також у процесах резорбції й ремоделюванні кісткової тканини [8; 9].

Щороку провідні світові виробники діагностичних тест-систем розробляють нові набори для визначення різноманітних маркерів, у першу чергу методом імуноферментного аналізу. Також для визначення параметрів метаболізму в ротовій рідині використовуються традиційні спектрофотометричні, спектрофлуориметричні методи, методи електрохімілюмінесценції, газової хроматографії, імунохроматографії, мас-спектрометрії, кристалоскопії [1; 3; 5]. Аналіз баз даних, які створюються з метою розширення доступу клініцистів до інформації про компоненти ротової рідини, може сприяти пошуку нових маркерів хвороб.

Отже, запровадження біологічних маркерів у комплекс профілактичних оглядів стоматологічних пацієнтів є актуальним завданням сучасної стоматології й клінічної лабораторної діагностики. Особливе значення це має для стоматологічних пацієнтів, які живуть / працюють під впливом шкідливих хімічних факторів. Це детерміновано, перш за все, необхідністю усвідомлення патогенезу захворювань ротової порожнини, які поглиблюються за рахунок впливу різноманітних хімічних агентів на функціонально активні молекули метаболізму кісткової тканини. Крім того, запровадження біологічних маркерів суттєво важливе й для розробки інтегральних, інформативних критеріїв оцінки стану ротової порожнини, які ґрунтуються не лише на інструментальних і рентгенологічних, а й на лабораторних показниках.

**Метою** дослідження стало вивчення біологічних маркерів ротової рідини при скринінгу стоматологічного здоров'я в населення.

### Матеріали і методи

Результати досліджень базуються на обстеженні 100 пацієнтів, що проводилося на базі стоматологічного центру ННМЦ «Університетська клініка ЗДМУ». Пацієнти були розподілені на дві групи: клінічну, яка складалася з 50 осіб, що працювали в шкідливих для здоров'я умовах (1 група), і контрольну групу з 50 пацієнтів, характер праці яких не пов'язаний зі шкідливою дією хімічних факторів (2 група). Пацієнти обох груп були віком від 30 до 45 років. З метою встановлення

показників норми для досліджуваних біологічних маркерів нами були відібрані соматично й стоматологічно здорові особи молодого віку (n=50) – (3 група). Забір ротової рідини проводили натщесерце в ранкові години шляхом спльовування в стерильну скляну пробірку. Біомасу центрифугували й зберігали при температурі 30<sup>0</sup>С, у дослідних зразках визначали кількість лактоферину (Lactoferrin) – («Нycult Biotech», Нідерланди), каталіцидину (Cathalicidin) – («Нycult Biotech», Нідерланди), MMP8 (Matrix Metalloproteinase-8). Аналіз здійснювали імуноферментним методом, що базується на використанні “сендвіч”-варіанта твердофазного імуноферментного аналізу. Процедура виконували на імуноферментному комплексі «ImmunoChem-2100» (США). Аналіз проводили в 96-ямоквих мікропланшетах, дно лунок яких було покрито моноклональними антитілами до відповідного молекулярного маркера. Зразки ротової рідини вносили до відповідних лунок мікропланшетів та інкубували протягом необхідного часу. Після етапів промивання реагенти видаляли з лунок мікропланшетів, вносили додаткові реагенти, які згодом вимивали. Аналіз проводили з додаванням колориметричного реагенту, результуючий сигнал вимірювали спектрофотометрично при 450 нм. Концентрацію дослідних показників виражали в нг/мл. [10]. Статистично результати опрацьовували за допомогою програми «Statistica 6,0» (пакет «StatStof Inc», USA, № ліцензій AXXR712D833214FAN5). Гіпотезу про нормальність розподілу показників, що досліджували, перевіряли з використанням критерію Шапіро-Уїлка (Shapiro-Wilk test). Для порівняння статистичних характеристик у різних групах використовували множинне порівняння за однофакторним дисперсійним аналізом Крускала-Уолліса (Kruskal-Wallis ANOVA), із попарним зіставленням за критерієм Уїтні-Манна (Whitney-Mann U test) [11].

### Результати дослідження

Аналіз стану ротової порожнини пацієнтів обох клінічних груп показав наявність карієсу (у 100% пацієнтів 1 групи й у 80% пацієнтів 2 групи) і часткової адентії (у 75% пацієнтів 1 групи й у 60% пацієнтів 2 групи). На тлі вищезазначених патологічних змін пацієнти 1 і 2 груп мали захворювання тканин пародонта. Так, у 1 групі зміни спостерігались у 87% обстежених, а в пацієнтів 2 групи ці зміни були менш виражені й становили 67%.

Натомість у пацієнтів обох груп було встановлено статистично вірогідне підвищення вмісту в ротовій рідині лактоферину (у середньому на 81% і на 40% відповідно в 1 і 2 групах) і MMP8 (на 64% і на 24%), а також падіння концентрації каталіцидину (на 87% і на 42%) у порівнянні з пацієнтами 3 клінічної групи (табл. 1).

Крім того, виокремлено більш суттєве накопичення лактоферину й MMP8 у пацієнтів 1 групи порівняно з пацієнтами 2 клінічної групи і значне зниження (більш ніж на 68%) концентрації каталіцидину порівняно з пацієнтами 2 групи.

Таблиця 1  
Уміст лактоферину, кателіцидину й MMP8 у ротовій рідині пацієнтів, що працювали в шкідливих для здоров'я умовах; пацієнтів, характер праці яких не пов'язаний зі шкідливим впливом хімічних факторів; стоматологічно здорових осіб

Клінічні групи	Лактоферин, нг/мл	Кателіцидин, нг/мл	MMP 8 нг/мл
1 група	97,35 [74,2; 129,3]	1,4 [0,5; 2,0]	2,42 [1,1; 3,5]
2 група	30,4 [21,5; 32,2]	4,5 [2,0; 6,1]	1,15 [0,4; 1,5]
3 група	18,23 [8,3; 23,4]	7,8 [2,7; 11,4]	0,87 [0,3; 1,2]

Установлені нами патобіохімічні зміни відображають патологічний процес у ротових порожнинах пацієнтів дослідних груп.

У сучасній практиці Lf використовується в ролі органоспецифічного маркера активації патологічного процесу з метою діагностування й прогнозування перебігу захворювань слизової й пародонта [12].

Водночас, зниження в ротовій порожнині кателіцидину LL37 відображає супресію місцевого імунітету в ній і розцінюється як патогенетичний ланцюг у прогресуванні хвороб слизової, пародонта, у тому числі карієсу зубів у пацієнтів.

Подібна динаміка кателіцидину в пацієнтів 1 групи, на наш погляд, пояснює інтенсивність розвитку хвороб ротової порожнини в пацієнтів цієї категорії. Так, під дією агресивних хімічних факторів гинуть нейтрофіли й макрофаги, унаслідок чого зменшується пул антимікробних пептидів, у тому числі й кателіцидину.

Дослідженнями Chen, X. et al. встановлено, що комбінований хімічний вплив викликає інактивацію позаклітинних секретованих дефензинів (антимікробні хатіонні амфіпатичні пептиди довжиною від 30 до 42 амінокислот із трьохнитковою β-пластинчастою структурою, яка містить три дисульфідні зв'язки) [13; 14]. Показано, що одночасно з а-дефензинами секретія кателіцидину LL-37 забезпечує активну функціональну синергію антимікробних пептидів. Для нейтралізації мікробів пептиди можуть синергічно діяти протеїнами, лізоцимами, а також із традиційними антибіотиками. Деякі антимікробні пептиди, окрім функціонування в якості хемокінів і залучення міграційних і циркуляторних клітин, прискорюють загоєння ран завдяки агіогенезу й епітеліальному відновленню [15].

Вищезазначене певною мірою пояснює і виражену клінічну картину в таких пацієнтів, і більш інтенсивні патобіохімічні процеси в ротовій порожнині. У дослідженнях останнього десятиліття розглядають матриксну металопротеїназу 8 (MMP8) як інтегральний біохімічний показник функціонального метаболізму кісткової тканини в ротовій рідині стоматологічних хворих [16; 17].

Наші дані також корелюють із цими роботами. Дисбаланс трансферинів і антимікробних факто-

рів у пацієнтів 1 групи більш виражений, ніж у пацієнтів 2 групи, в яких спостерігалось підвищення концентрації MMP8 у ротовій рідині (табл. 1).

### Висновок

Отже, проведеними дослідженнями встановлено, що в пацієнтів, праця яких пов'язана із впливом шкідливих хімічних факторів, патологічні процеси в ротовій порожнині відбуваються інтенсивніше, а ушкодження тяжчі, ніж у пацієнтів, які працюють у безпечних умовах.

Ці патологічні процеси спостерігаються на тлі виражених патобіохімічних процесів у ротовій рідині (значне підвищення лактоферину й MMP8 на тлі зниження концентрації кателіцидину).

Наведені факти визначають актуальність і перспективність подальших досліджень згаданих молекулярних маркерів у плані фундаментального вивчення й розуміння патогенезу хвороб ротової порожнини в цієї категорії пацієнтів.

Крім того, ці показники можуть бути використані як незалежні маркери діагностики й скринінгу для забезпечення ефективності лікування хвороб ротової порожнини.

### References

1. Uspenskaya OA, Trefilova OV. Effect of Bleaching on the Biochemical Composition of Oral Fluid and Dental Hard Tissues Structure. *Stomatologiya* 2018; 97 (5): 27-30.
2. Jason L. Brown, William Johnston, Christopher Delaney, Bryn Short, Mark C. Butcher et al. Polymicrobial Oral Biofilm Models: Simplifying the Complex. *J. Med Microbiol.* 2019; 68 (11): 1573-1584.
3. Sydorenko OO., Sydorenko AYul, Voznyi OV, Pavlov SV. Application potential of biomarkers in periodic dental screening protocol for patients working in harmful conditions. *Biological Markers in Fundamental and Clinical Medicine* 2018; 2 (2): 92-94.
4. Malon RS, Sadir S., Balakrishnan M, Córcoles EP. Saliva-based biosensors: noninvasive monitoring tool for clinical diagnostics. *Biomed Res.Int.* 2014; 2014: 5-25.
5. Paulo Henrique Braz-Silva, Mariana Lobo Bergamini, Andressa Pinto Mardegan, Catharina Simioni De Rosa, Bengt Hasseus et al. Inflammatory Profile of Chronic Apical Periodontitis: A Literature Review. *Acta Odontol. Scand.* 2019; 77 (3): 173-180.
6. Turkoglu O, Emingil G, Eren G, Atmaca H, Gingival Crevicular Fluid and Serum hCAP18/LL-37 Levels in Generalized Aggressive Periodontitis. *Clin. Oral. Investig.* 2017; 21 (3): 763-769.
7. Steintraesser L. Host defense peptides and their antimicrobial immunomodulatory duality. *Immunobiology.* 2011; 216 (3): 322-333.
8. Rathnayake N, Gieselmann, DR, Heikkinen, AM, Tervahartiala T, Sorsa T. Salivary et al. Point-of-Care diagnostics of MMP-8 in dentistry and medicine. *Diagnostics* 2017; 7(1): 3-12.
9. Oya Turkoglu, Cakal Candan, Efeoglu Emir Bozkurt The evaluation of periimplant sulcus fluid osteocalcin, osteopontin, and osteonectin levels in periimplant diseases. *Journal of periodontology* 2018; 89 (4): 418-423.
10. Allan VJ. Basic immunofluorescence. Protein localization by fluorescence microscopy: a practical approach: Oxford University Press, United Kingdom; 2000. 26p.
11. Ramsay J, Silverman B. Applied functional data analysis; methods and case studies: Springer, New York; 2020. 1398p.
12. Rivera LEC, Ramos AP, Cabrera SM. Innovative study on lactoferrin in periodontal disease. *Revista Odontologica Mexicana* 2011; 15 (4): 231-237.
13. Xuejun Chen, François Niyonsaba, Hiroko Ushio, Daiju Okuda, Isao Nagaoka, Shigaku Ikeda et al. Synergistic effect of antibacterial agents human beta-defensins, cathelicidin LL-37 and lysozyme against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *J. Dermatol. Sci.* 2005; 40 (2): 123-131.
14. Toshi Horie, Megumi Inomata, Takeshi Into OmpA-Like Proteins of *Porphyromonas gingivalis* Mediate Resistance to the Antimicrobial Peptide LL-37. *J. Pathog.* 2018; 2018: 1-7.
15. Bhat S, Milner S. Antimicrobial peptide in burn and sand wounds. *Curr. Protein Pept. Sci.* 2007; 8 (5): 506-509.
16. Karthikeyan Murthykumar, Sheeja Varghese, Vijayashree J. Priyadharsini Association of MMP8 (-799C/T) (rs11225395) gene polymorphism and chronic periodontitis. *Drug invention today* 2019; 11 (7): 1594-1597.
17. Lin Zhang, Xiue Li, Hong Yan and Lei Huang. Salivary matrix metalloproteinase (MMP)-8 as a biomarker for periodontitis A PRISMA-compliant systematic review and meta-analysis *Medicine (Baltimore)* [Internet]. 2018 Jan; 97 (3): e9642. Available from: [https://journals.lww.com/md-journal/Fulltext/2018/01190/Salivary\\_matrix\\_metalloproteinase\\_MMP\\_8\\_as\\_a.33.aspx](https://journals.lww.com/md-journal/Fulltext/2018/01190/Salivary_matrix_metalloproteinase_MMP_8_as_a.33.aspx)

Стаття надійшла: 26.04.2020 року

### Резюме

Запровадження в комплекс профілактичних оглядів стоматологічних пацієнтів біологічних маркерів – актуальне завдання сучасної стоматології й клінічної лабораторної діагностики. Особливе значення воно має для стоматологічних пацієнтів, які живуть/працюють під впливом шкідливих хімічних факторів.

Проведено комплексне вивчення вмісту лактоферину, кателіцидину й MMP8 у ротовій рідині 50 пацієнтів, що працювали в шкідливих для здоров'я умовах (1 група), і 50 пацієнтів, характер праці яких не пов'язаний зі шкідливою дією хімічних факторів (2 група).

Дослідженнями встановлено, що в пацієнтів, праця яких пов'язана із впливом шкідливих хімічних факторів, інтенсивніше відбуваються патологічні процеси в ротовій порожнині, а ушкодження тяжчі, ніж у пацієнтів, умови праці яких безпечні. Ці патологічні процеси спостерігаються на тлі виражених патобіохімічних процесів у ротовій рідині (значне підвищення лактоферину й MMP8 на тлі зниження концентрації кателіцидину).

**Ключові слова:** лактоферин, кателіцидин, MMP8, ротова рідина, пацієнти, які працюють у шкідливих для здоров'я умовах.

### Резюме

Внедрение биологических маркеров в комплекс профилактических осмотров стоматологических пациентов является актуальной задачей современной стоматологии и клинической лабораторной диагностики. Особое значение оно имеет для стоматологических пациентов, которые проживают либо работают под воздействием вредных химических факторов.

Проведено комплексное изучение содержания лактоферрина, кателицидина и MMP8 в ротовой жидкости 50 пациентов, которые работали во вредных для здоровья условиях (1 группа), и 50 пациентов, характер труда которых не связан с вредным воздействием химических факторов (2 группа).

Исследованиями показано, что у пациентов, работающих под воздействием вредных химических факторов, более интенсивно протекают патологические процессы в ротовой полости, повреждения более значимые, в сравнении с пациентами, работающими без воздействия вредных факторов. Данные процессы протекали на фоне выраженных патобиохимических процессов в ротовой полости (значительный прирост лактоферрина и MMP8 на фоне снижения концентрации кателицидина).

**Ключевые слова:** лактоферрин; кателицидин, MMP8, ротовая жидкость, пациенты, работающие во вредных для здоровья условиях.

UDC 616.314-084:[616/71-002-074/-076:57.086]

## THE USE OF MOLECULAR AND BIOCHEMICAL MARKERS OF BONE METABOLISM FOR SCREENING OF DENTAL HEALTH OF THE POPULATION

*Sydorenko O.O., Pavlov S.V., Voznyi O.V.*

State Medical University, Zaporizhzhia, Ukraine

### Summary

At present, the research interests of both dentists and clinical laboratory diagnosticians lie in the field of using oral fluid as an object of diagnostic estimation of molecular and biochemical markers in oral cavity diseases. It is commonly known that oral fluid has both organic and non-organic components. Non-organic components of saliva are represented by macro- and microelements that can be parts of various compounds or stay in the ionized form. Organic components are represented by proteins, carbohydrates, lipids, essential nitrogenous compounds (urea and uric acid), vitamins, hormones, organic and nucleic acids.

Compared with the traditional method of blood testing, the identification of markers in the oral fluid has several advantages. They are non-invasiveness, atraumatic character for the patient, the absence of stress typical of venipuncture; simpler conditions of storage and transportation due to the liquid state (unlike whole blood, which tends to coagulate); being able to take biological material an unlimited number of times; no need for qualified personnel and special equipment when taking oral fluid.

The introduction of biological markers into the complex of dental checkups is one of the topical tasks of modern dentistry and clinical laboratory diagnostics. This is particularly important for those dental patients whose living or working conditions are accompanied by harmful chemical factors.

The authors have performed complex research of lactoferrin, cathelicidin, and MMP8 present in the oral fluid of 50 patients who worked under harmful conditions (group 1), and of other 50 patients whose work is not associated with the harmful influence of chemical factors (group 2). The oral fluid was collected on an empty stomach in the morning by spitting into a sterile glass tube. The biomass was centrifuged and stored at 300C, and the amount of lactoferrin (Hycto Biotech, the Netherlands), cathelicidin (Hycult Biotech, the Netherlands), and MMP8 (Matrix Metalloproteinase-8) was determined in the test samples. The analysis was performed by enzyme-linked immunosorbent assay based on the use of a "sandwich" variant of solid-phase enzyme-linked immunosorbent assay. The procedure was performed on the enzyme-linked immunosorbent assay ImmunoChem-2100 (USA). The analysis was performed in 96-well microplates, the bottom of the wells was covered with monoclonal antibodies to the corresponding molecular marker.

The analysis of the oral cavity condition in patients of both groups demonstrated the presence of caries (100 % of group 1 patients, 80% of group 2 patients) and partial adentia (75% of group 1 patients, 60% of group 2 patients). Secondary to the above-mentioned abnormalities, group 1 and 2 patients had periodontal diseases. Such abnormalities were registered in 87% of group 1 patients; in group 2 patients, such changes were less explicit and were present in 67% of the patients. On the contrary, it was established that the patients of both groups presented with a statistically significant increase of lactoferrin in the oral fluid (on average, 81% and 40% higher, respectively, in groups 1 and 2) and MMP8 (64% and 24% higher), as well as a decrease in cathelicidin concentration (87% and 42% lower) in comparison with the patients of group 3.

The established pathological biochemical changes indicate pathological processes in the oral cavities of the research groups of patients.

In modern practice, Lf is used as an organ-specific marker of the activation of a pathological process to di-

agnose and predict the course of mucosal and periodontal diseases. At the same time, the decrease in oral cathelicidin LL37 reflects the suppression of local immunity in the oral cavity and is regarded as a pathogenic chain in the progression of diseases of the mucosa, periodontium, including dental caries in patients. Similar dynamics of cathelicidin in group 1 patients, in our opinion, explains the intensity of oral disease development in this category of patients. Thus, neutrophils and macrophages die under the action of aggressive chemical factors, as a result of which the pool of antimicrobial peptides, including cathelicidin, decreases.

The present markers determine the topicality and great potential of further research of the given molecular markers for both fundamental investigations and understanding the pathogenesis of oral cavity diseases in this category of patients. Besides, these indices can be used as independent markers for diagnosis, screening, and effective treatment of oral cavity diseases.

**Keywords:** lactoferrin, cathelicidin, MMP8, oral fluid, patients working under harmful conditions.