

STRESZCZENIE

Wprowadzenie. Zapalenie przyzębia inicjowane jest przez infekcję bakteryjną, a następnie postępuje w wyniku nieprawidłowej odpowiedzi immunologicznej gospodarza, przyczyniając się do powstawania dysbiotycznego biofilmu poddziąsłowego i postępującej destrukcji aparatu zawieszeniowego zębów. Uważa się, że jednym z mechanizmów w etiopatogenezie zapalenia przyzębia jest zaburzenie równowagi oksydo-redukcyjnej.

Występowanie reaktywnych form tlenu jest integralnie związane z metabolizmem wszystkich organizmów tlenowych. W warunkach fizjologicznych RFT pełnią funkcję mediatorów i regulatorów wielu procesów biochemicznych. Stres oksydacyjny można zdefiniować jako sytuację, w której zaburzenie równowagi oksydo-redukcyjnej prowadzi do przejściowego lub przewlekłego nasilenia wytwarzania reaktywnych form tlenu, a w konsekwencji do zaburzenia metabolizmu komórkowego i degradacji składników komórkowych.

Zasadnicze cele podjętych badań to:

1. Ocena tkankowej i ślinowej ekspresji mRNA genów enzymów antyoksydacyjnych (peroksydazy glutationowej i dysmutazy ponadtlenkowej 1) oraz tioredoksyny w zapaleniu przyzębia.
2. Ocena aktywności wykładników prooksydacyjnych (oksydazy NADH, całkowitego potencjału oksydacyjnego i stresu nitrozacyjnego) w płynie dziąsłowym i ślinie w zaawansowanych stadiach zapalenia przyzębia.
3. Określenie aktywności antyoksydantów enzymatycznych (peroksydazy ślinowej, katalazy, dysmutazy ponadtlenkowej 1 i reduktazy glutationowej) w płynie dziąsłowym i ślinie pacjentów z zapaleniem przyzębia.
4. Określenie stężeń antyoksydantów nieenzymatycznych (zredukowanego glutationu, kwasu moczowego, zawartości polifenoli) w płynie dziąsłowym i ślinie pacjentów z zapaleniem przyzębia.
5. Oszacowanie kompleksowej aktywności antyoksydacyjnej płynu dziąsłowego i śliny w przebiegu zapalenia przyzębia.
6. Zbadanie oddziaływania periodontologicznego stresu oksydacyjnego na peroksydację lipidów w płynie dziąsłowym i ślinie.
7. Zbadanie oddziaływania periodontologicznego stresu oksydacyjnego na oksydację i karbonylację białek w płynie dziąsłowym i ślinie.
8. Na podstawie analizy wieloczynnikowej wyłonienie wykładników stresu oksydacyjnego, które w największym stopniu są związane z rozpoznaniem zapalenia przyzębia.
9. Wyłonienie wykładników stresu oksydacyjnego, które najlepiej stratyfikują najbardziej zaawansowane stadia i stopnie zapalenia przyzębia.

Materiał i metody. Do badania zakwalifikowano 60 pacjentów leczonych w Zakładzie Periodontologii Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu z powodu zapalenia przyzębia. Rozpoznanie ustalono na podstawie badania klinicznego na podstawie karty badania. Grupę badaną podzielono na dwie podgrupy zgodnie z wytycznymi ustalonymi podczas warsztatów World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-implant Diseases and Conditions. Pierwsza grupa obejmowała pacjentów w II i III stadium zapalenia przyzębia, a druga pacjentów w IV stadium zapalenia przyzębia. Grupę kontrolną stanowiło 30 osób z klinicznie zdrowym przyzęciem (BOP<10%) dopasowanych wiekiem i płcią do grupy badanej. Po zakwalifikowaniu do grupy badanej lub kontrolnej od pacjentów pobierano ślinę mieszaną (zarówno niestymulowaną, jak i stymulowaną), płyn dziąsłowy oraz tkankę dziąsła. Badania biochemiczne obejmowały ocenę: aktywności enzymu prooksydacyjnego (NOX), aktywności enzymów antyoksydacyjnych (SOD, GPx, GR, CAT), stężenia antyoksydantów nieenzymatycznych (UA, GSH, TPC), stężenie parametrów równowagi oksydo-redukcyjnej (TAC, TOS, OSI, FRAP), stężenie produktu oksydacji lipidów (MDA), zawartość produktów glikooksydacji białek (AGE, AOPP, tryptofanu, kinureniny, N-formylokinureniny, dwutyrozyny i β -amyloidu) oraz stężenie parametrów stresu nitrozacyjnego (NO, S-nitrozotiol, nadtlenoazotynu). Badania molekularne obejmowały ocenę ekspresji mRNA genów SOD1, GPx1, TXN.

Wyniki. Odnotowano istotnie wyższą aktywność enzymu prooksydacyjnego NOX w ślinie niestymulowanej i płynie dziąsłowym oraz znamienne niższą aktywność w ślinie stymulowanej pacjentów z zapaleniami przyzębia w odniesieniu do osób zdrowych. Aktywność enzymów antyoksydacyjnych (GPx, SOD, GR, CAT) w ślinie niestymulowanej była znamienne niższa u pacjentów z grupy kontrolnej w porównaniu do grupy badanej. W ślinie stymulowanej wystąpiła znacząco wyższa aktywność GPx oraz znamienne niższa aktywność SOD i CAT u pacjentów z zapaleniem przyzębia w odniesieniu do osób zdrowych. Zauważono również istotnie niższą aktywność GPx i SOD oraz znacząco wyższą aktywność CAT i GR w płynie dziąsłowym pacjentów z zapaleniami przyzębia w odniesieniu do osób zdrowych. Stężenia antyoksydantów nieenzymatycznych (UA, GSH, TPC), były znacząco niższe w ślinie niestymulowanej i stymulowanej oraz w płynie dziąsłowym u pacjentów z zapaleniami przyzębia w porównaniu do grupy kontrolnej. Zaobserwowano, że stężenie produktu oksydacji lipidów (MDA), oraz zawartość produktów glikooksydacji białek (AGE, AOPP, tryptofanu, kinureniny, N-formylokinureniny, dwutyrozyny i β -amyloidu) były istotnie wyższe w ślinie niestymulowanej i stymulowanej oraz płynie dziąsłowym u pacjentów z zapaleniami przyzębia w odniesieniu do osób zdrowych. Parametry równowagi oksydo-redukcyjnej wykazywały dwojakość: stężenie TAC i FRAP było znacząco niższe, natomiast stężenie TOS i OSI było istotnie wyższe w ślinie niestymulowanej i stymulowanej oraz płynie dziąsłowym u pacjentów z grupy badanej w porównaniu do osób z grupy kontrolnej. Stężenie parametrów stresu nitrozacyjnego (NO, S-nitrozotiol, nadtlenoazotynu) było znamienne wyższe w ślinie niestymulowanej i stymulowanej u pacjentów z zapaleniami przyzębia w odniesieniu do osób zdrowych. Stwierdzono, że ekspresja SOD, GPx i CAT w tkance dziąsła jest niższa u pacjentów z grupy badanej była istotnie niższa, natomiast ekspresja GPx i CAT w ślinie była znamienne wyższa. Sformułowano 9 wniosków.

SUMMARY

Selected antioxidative parameters in patients with periodontitis

Introduction. Periodontitis is initiated by a bacterial infection and it subsequently progresses as a result of abnormal immune response of the host, contributing to the formation of dysbiotic subgingival biofilm and progressive destruction of the attachment apparatus of the teeth. It is believed that one of the mechanisms in the etiopathogenesis of periodontitis is an oxidoreductive balance disorder.

The occurrence of reactive oxygen species is an integral part of the metabolism of all aerobic organisms. In physiological conditions, the ROS act as mediators and regulators of many biochemical processes. Oxidative stress can be defined as a situation in which disturbance in the oxidoreductive balance leads to the temporary or chronic increase in the production of the reactive oxygen species and, as a consequence, to the disturbance in cellular metabolism and degradation of cellular components.

The main objectives of the conducted research are:

1. Evaluation of tissue and salivary mRNA expression of antioxidant enzyme genes (glutathione peroxidase and superoxide dismutase 1) and thioredoxin in periodontitis.
2. Evaluation of prooxidants (NADH oxidase, total oxidative potential and nitrosative stress) activity in gingival fluid and saliva in the advanced stages of periodontitis.
3. Determination of the activity of enzymatic antioxidants (salivary peroxidase, catalase, superoxide dismutase 1 and glutathione reductase) in gingival fluid and saliva of patients with periodontitis.
4. Determination of concentrations of non-enzymatic antioxidants (reduced glutathione, uric acid, polyphenols) in gingival fluid and saliva of patients with periodontitis.
5. Estimation of complex antioxidant activity of gingival fluid and saliva in the course of periodontitis.
6. Study of how the periodontal oxidative stress affects lipid peroxidation in gingival fluid and saliva.
7. Study of the influence of periodontal oxidative stress on the oxidation and protein carbonylation in gingival fluid and saliva.
8. On the basis of multifactorial analysis, oxidative stress indicators, which are most closely related to the diagnosis of periodontitis, were identified.
9. Selection of oxidative stress indicators that best stratify the most advanced stages and levels of periodontitis.

Material and methods. The study involved 60 patients treated for periodontitis in the Department of Periodontology of the Wrocław Medical University. The diagnosis was made in a clinical study on the basis of a medical examination report. The study group was divided into two sub-groups, in accordance with the guidelines established during the World Workshop on the Classification of

Periodontal and Peri-implant Diseases and Conditions. The first group included the patients in the second and third stage of periodontitis, and the second group included the patients in the fourth stage of periodontitis. The control group consisted of 30 patients with clinically healthy periodontium (BoP<10%), age- and gender-matched to the study group. After being classified in the study or control group, mixed saliva (both unstimulated and stimulated), gingival fluid and gum tissue were taken from the patients. Biochemical studies included the evaluation of: activity of prooxidative enzyme (NOX), activity of antioxidant enzymes (SOD, GPx, GR, CAT), concentration of non-enzymatic antioxidants (UA, GSH, TPC), concentration of oxidoreductive balance parameters (TAC, TOS, OSI, FRAP), concentration of lipid peroxidation product (MDA), content of glycoxidation protein products (AGE, AOPP, tryptophan, kynurenine, N'-Formylkynurenine, dityrosine and β -amyloid) and concentration of nitrosative stress parameters (NO, S-nitrosothiol, peroxynitrite). Molecular tests involved the evaluation of the expression of mRNA of SOD1, GPx1, TXN genes.

Results. A significantly higher activity of NOX prooxidative enzyme in unstimulated saliva and gingival fluid as well as a considerably lower activity in stimulated saliva of patients with periodontitis was observed, as compared to healthy subjects. The activity of antioxidant enzymes (GPx, SOD, GR, CAT) in unstimulated saliva was significantly lower in the control group in comparison to the study group. In stimulated saliva, a significantly higher GPx activity as well as a considerably lower SOD and CAT activity in periodontitis patients were observed, as compared to healthy subjects. Significantly lower activity of GPx and SOD, and substantially higher activity of CAT and GR in gingival fluid in patients with periodontitis was also observed, as compared to healthy subjects. Concentrations of nonenzymatic antioxidants (UA, GSH, TPC) were significantly lower in unstimulated and stimulated saliva and gingival fluid in patients with periodontitis, in comparison to the control group. It was observed that the concentration of lipid peroxidation product (MDA) and the content of glycoxidation protein products (AGE, AOPP, tryptophan, kynurenine, N'-Formylkynurenine, dityrosine and β -amyloid) were significantly higher in unstimulated saliva, stimulated saliva and gingival fluid in patients with periodontitis, as compared to healthy subjects. The oxidoreductive balance parameters were twofold: the TAC and FRAP concentrations were significantly lower, while the TOS and OSI concentrations were significantly higher in unstimulated and stimulated saliva and gingival fluid in the study group patients, as opposed to the control group. The concentration of nitrosative stress parameters (NO, S-nitrosothiol, peroxynitrite) was significantly higher in unstimulated and stimulated saliva in patients with periodontitis, as compared to healthy subjects. It was observed that the expression of SOD, GPx and CAT in gum tissue was lower in patients from the study group while the expression of GPx and CAT in saliva was significantly higher.

9 conclusions have been drawn.