

Određivanje upalnih medijatora PGE₂ i TXB₂ iz gingivne sulkularne tekućine u pacijenata s kroničnim parodontitisom

Determination of inflammation mediators PGE₂ and TXB₂ in gingival crevicular fluid in patients with chronic periodontitis

Ivana Brekalo Pršo¹, Davor Kuiš², Jelena Prpić², Stjepan Špalj³, Sonja Pezelj-Ribarić^{2*}

Sažetak. Cilj: Čimbenici uključeni u patogenezu upalnih parodontnih bolesti su zubni plak, imunosni i upalni i obrambeni sustav domaćina, genetički čimbenici te čimbenici okoliša. Gingivna sulkularna tekućina (GST) sadrži mnoge upalne medijatore, među ostalima i prostaglandin E₂ (PGE₂) i tromboksan E₂ (TXB₂). Za navedene medijatore poznato je da su povezani s pojavom parodontne bolesti. Cilj ovog istraživanja bio je ispitati povezanost između vrijednosti PGE₂ i TXB₂ u GST-u i prisutnosti ili odsutnosti parodontne bolesti. **Ispitanici i metode:** Istraživanje je provedeno na 30 ispitanika s dijagnozom kroničnog parodontitisa (eksperimentalna skupina) i 20 ispitanika koji nemaju parodontitis (kontrolna skupina). Uzorci GST-a uzeti su od svakog ispitanika papirnatom trakom. Vrijednosti PGE₂ i TXB₂ određivane su komercijalnim ELISA testom. **Rezultati:** Vrijednosti PGE₂ i TXB₂ u GST-u bile su statistički značajno veće kod ispitanika s kroničnim parodontitisom u usporedbi s kontrolnom skupinom. **Zaključak:** Rezultati istraživanja upućuju da bi upalni medijatori PGE₂ i TXB₂ u GST-u mogli imati veze s patogenezu parodontne bolesti.

Ključne riječi: gingivna sulkularna tekućina; parodontna bolest; upalni medijatori

Abstract. Aim: Microbial dental plaque, host defense mechanisms, genetic and environmental factors are involved in the pathogenesis of periodontal diseases. Gingival crevicular fluid (GCF) contains various inflammation mediators – prostaglandin E₂ (PGE₂) and thromboxan B₂ (TXB₂), among others. These mediators have been reported to correlate with the progression of periodontal disease. The aim of this study was to examine the relationship between levels of inflammatory mediators PGE₂ and TXB₂ in the GCF and the periodontal status. **Materials and methods:** The study was conducted on 30 chronic periodontitis patients as the experimental group and 20 healthy subjects as control group. Samples of GCF were collected from each patient using paper strips. The levels of PGE₂ and TXB₂ were determined using a commercially available enzyme immunoassay kit (EIA). **Results:** PGE₂ and TXB₂ levels in GCF were significantly higher in chronic periodontitis patients as compared to healthy individuals. **Conclusion:** The results of this study indicate that inflammation mediators PGE₂ and TXB₂ might be implicated in the pathogenesis of periodontal disease.

Key words: gingival crevicular fluid; inflammation mediators; periodontal disease

¹Katedra za endodonciju i restaurativnu stomatologiju, Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci, Rijeka

²Katedra za oralnu medicinu i parodontologiju, Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci, Rijeka

³Katedra za ortodonciju, Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci, Rijeka

***Dopisni autor:**

Prof. dr. sc. Sonja Pezelj-Ribarić
Katedra za oralnu medicinu i parodontologiju
Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci
Krešimirova 40, 51 000 Rijeka
e-mail: sonja.pezelj-ribaric@medri.hr

<http://hrcak.srce.hr/medicina>

UVOD

Parodontne bolesti su grupa upalnih bolesti koje zahvaćaju parodontna tkiva, pri čemu se specifične bakterije i njihovi bioprodukti smatraju glavnim etiološkim čimbenicima¹. Mikrobn i genetički te čimbenici okoliša imaju važnu ulogu u propadanju parodontnih tkiva, posebno u uznapredovanim oblicima bolesti. Mikroorganizmi u oralnom biofilmu pokreću imunološki odgovor domaćina i odgovorni su za simptome parodontitisa, poglavi-

Rezultati ovog istraživanja potvrđuju da upalni medijatori PGB₂ i TXB₂ imaju značajnu ulogu u patogenezi parodontne bolesti. Vrijednosti ovih upalnih medijatora u GST-u značajno su veće kod ispitanika s kroničnim parodontitisom u odnosu na one zdrave. Rezultati također ukazuju da bi navedeni upalni medijatori mogli biti važni stimulan- si u koštanoj resorpciji u oboljelih od parodontne bolesti.

to resorpciju alveolarne kosti. Imunosni i upalni odgovor domaćina djeluje primarno kao zaštita parodontnih tkiva od agresije mikroorganizama, međutim istovremeno uzrokuje i destrukciju parodontnih tkiva jer dolazi do stvaranja i otpuštanja upalnih medijatora². Upalni medijatori prostaglandin E₂ (PGE₂) i tromboksan B₂ (TXB₂) imaju kritičnu ulogu u upalnim procesima u parodontnim tkivima³.

Gram negativni fakultativni anaerob *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* i različite vrste *Bacteroides* i *Porphyromonas* povezane su s agresivnim oblicima parodontitisa⁴. Zajednička karakteristika ovih bakterija je prisutnost lipopolisaharida (LPS) u njihovoj staničnoj stijenci. Upravo su LPS-i vrlo istraživani posljednjih desetljeća i dokazano je kako su upravo oni snažan čimbenik virulencije u patogenezi parodontne bolesti⁵. Bakterijski LPS-i aktiviraju makrofage, fibroblaste, endotelne i druge stanice u parodontnim tkivima koje onda sintetiziraju i otpuštaju razne upalne medijatore kao što su citokini, prostanoidi i razni oksidi. Razine upalnih medijatora povišene su i u životinjskim modelima kod kojih je parodontitis uzrokovan ligaturom^{6,7}.

Mnogi metaboliti arahidonske kiseline povišeni su u upaljenim parodontnim tkivima, a najvažniji

i najsnažniji je prostaglandin E₂ (PGE₂)⁸. Njegovu sintezu stimuliraju upalni medijatori interleukin-1 β (IL-1β) i čimbenik nekroze tumora-α (TNF- α)⁹. Veće vrijednosti PGE₂ nađene u upaljenoj gingivi i sulkusnoj gingivnoj tekućini (SGT) prethode gubitku pričvrstka, što upućuje da bi PGE₂ mogao biti prediktor za pojavu parodontne bolesti. Pretpostavlja se da PGE₂ u gingivi uzrokuje aktivaciju osteoklasta i resorpciju kosti koja definira parodontitis¹⁰. TXB₂ bi također mogao biti prisutan u većoj vrijednosti u SGT-u kod parodontne bolesti¹¹. Čini se da učinak različitih prostaglandina na funkciju ljudskih fibroblasta u gingivi može objasniti patogenezu parodontne bolesti.

Cilj ovog istraživanja je usporediti vrijednosti upalnih medijatora PGE₂ i TXB₂ u gingivnoj sulkularnoj tekućini (GST) kod ispitanika s kroničnim parodontitisom s onima kod ispitanika koji nemaju parodontitis.

ISPITANICI I POSTUPCI

Ispitanici

Istraživanje je provedeno od siječnja 2011. do svibnja 2011. godine na Katedri za oralnu medicinu i parodontologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci. Trideset ispitanika s neliječnim kroničnim parodontitisom činilo je eksperimentalnu skupinu, a 20 ispitanika koji nemaju parodontitis, a po dobi i spolu odgovaraju eksperimentalnoj skupini, činilo je kontrolnu skupinu. Svi postupci s ispitanicima provedeni su u skladu s etičkim standardima i najnovijom deklaracijom helsinške deklaracije.

Kriteriji za uključivanje ispitanika u eksperimentalnu skupinu bili su:

(I) više od 35 godina starosti, (II) nepostojanje sistemskih bolesti ili stanja, (III) nije provedena parodontna ili sistemska antibiotska terapija unazad šest mjeseci, (IV) prisutnost 30 – 50 % resorpcije alveolarne kosti na radiološkoj snimci, (V) prisutnost više parodontnih džepova dubine 5 – 8 mm s krvarenjem pri sondiranju.

Kriteriji za uključivanje ispitanika u kontrolnu skupinu bili su: (I) više od 35 godina starosti, (II) nepostojanje sistemskih bolesti ili stanja, (III) nije provedena parodontna ili sistemska antibiotska terapija unazad šest mjeseci, (IV) ne postoje parodontni džepovi dublji od 3 mm.

Sakupljanje gingivne sulkularne tekućine (GST)

Svakom ispitaniku uzorci GST-a uzeti su papirnatom trakom (Proflow Inc., Amityville, NY, USA) s distalne strane molara. Suho radno polje osigurano je svitcima staničevine kako bi se spriječila kontaminacija papirnatih traka slinom, supragingivni plak uklonjen je kuglicom vate, a zub je osušen zrakom. Papirnata traka postavljena je 1 mm u parodontni sulkus/džep na 30 sekundi. Papirnatu traku kontaminirane krvlju isključene su iz daljnje analize. Volumen apsorbirane tekućine mjereno je prethodno kalibriranim uređajem Peritron 8000 ((Proflow™ Incorporated). Po dvije trake sa svakog zuba (ispitanika) pohranjene su u zatvorene epruvete i odmah pohranjene u zamrzivač na -80 °C.

Izolat iz papirnatih traka dobiven je kroz tri uzastopna centrifugiranja, pri čemu je svaki put korišteno 500 µL PBS puferske otopine (Sigma, St Louis, MO, USA) pri 8000 opm kroz 5 minuta. Dobiveni uzorci pohranjeni su u nove epruvete i ponovno zaleđeni do daljnje analize.

PGE₂ i TXB₂ analiza

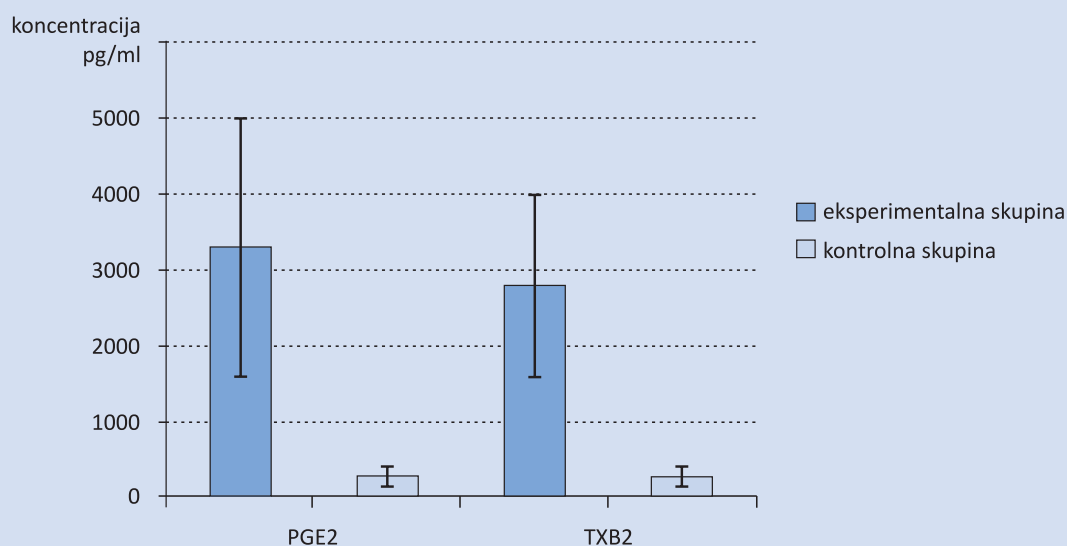
Vrijednost PGE₂ i TXB₂ analizirana je korištenjem komercijalnog ELISA testa prema tvorničkom protokolu (Tytar Zyme PGE₂ and TXB₂ EIA, PerSeptive Biosystems, Connecticut, SAD). Kao primarna protutijela korištena su monoklonalna antitečja

protutijela (anti-PGE₂ i anti-TXB₂) kojima su obložene mikrotitarske posudice. Kao sekundarno protutijelo korišteno je enzimski konjugirano monoklonalno protutijelo. Sva su mjerenja ponovljena po tri puta za svaki uzorak. Optička gustoća standarda i uzoraka mjerena je spektrofotometrom pri valnoj duljini od 570 nm. Ovisno o koncentracijama standarda napravljena je tipična standardna krivulja temeljem koje je određivana razina PGE₂ i TXB₂ u uzorku.

Postaje jasno i da prostaglandini imaju širi spektar djelovanja nego što se to ranije mislilo i da njihove povišene vrijednosti u parodontnim tkivima mogu pokrenuti različite, po zdravlje nepovoljne procese i drugdje u tijelu.

REZULTATI

Vrijednost PGE₂ izmjerena u eksperimentalnoj skupini (srednja vrijednost 3326 pg/ml) statistički je značajno veća nego ona izmjerena u kontrolnoj skupini (srednja vrijednost 269 pg/ml). Isto vrijedi i za izmjerene vrijednosti TXB₂ (eksperimentalna skupina – 2796 pg/ml; kontrolna skupina – 256,15 pg/ml). Za obje uspoređivane koncentracije $p < 0.001$ (slika 1).



Slika 1. Koncentracije PGE₂ i TXB₂ u GST-u izmjerene u eksperimentalnoj i kontrolnoj skupini (srednja vrijednost i standardna devijacija). Razlika je statistički značajna ($p < 0,01$).

RASPRAVA

Sve je više spoznaja u razumijevanju patogenetskih mehanizama tkivne destrukcije u kroničnom parodontitisu. Unatoč činjenici da molekularna razina te destrukcije nije u potpunosti razjašnjena, poznato je da komunikacija između stanica ima važnu ulogu u tim mehanizmima putem međudjelovanja citokina, prostaglandina i ostalih molekula sa specifičnim receptorima na membrana^{3,12}.

Biomehanički markeri razvijeni su s ciljem da postanu alat za predviđanje i kontrolu parodontne bolesti. Uloga prostaglandina u ljudskome je tijelu dobro poznata i dokumentirana, a zanimljiva je njihova uloga u nastanku i razvoju parodontne bolesti¹³. Najznačajniji metabolit arahidonske kiseline koji se oslobađa lokalno i značajno podržava upalnu reakciju u parodontnim tkivima je PGE₂. Makrofagi su glavni izvor PGE₂ u parodontnim tkivima¹⁴. Dokazano je i da je vrijednost različitih prostaglandina u upaljenom parodontnom tkivu veća nego ona u zdravome. Slični su rezultati nađeni i za PGE₂ u GST-u u ispitanika koji boluju od kroničnog parodontitisa u odnosu na one koji boluju od gingivitisa ili su zdravi¹⁵⁻¹⁷.

GST sa svojom kompleksnom mješavinom različitih tvari predstavlja jedinstven materijal za analizu te ima praktičnu važnost u dijagnostici raznih bolesnih stanja.

U ovom istraživanju mjerene su vrijednosti upalnih medijatora u GST-u. Nađeno je da su vrijednosti PGE₂ i TXB₂ veće kod ispitanika oboljelih od kroničnog parodontitisa nego kod ispitanika koji nemaju parodontitis. Korištenjem komercijalnog ELISA testa, preferirane metode za ovakva istraživanje, moguće je vrlo precizno izmjeriti i vrlo male vrijednosti ispitivanih upalnih medijatora^{8,15}. Offenbacher i sur. pokazali su da su visoke vrijednosti PGE₂ u GST-u u korelaciji s onima u perifernoj krvi¹⁸. Takav nalaz potvrđuje teoriju da povećana sinteza prostaglandina u parodontnoj bolesti nije prisutna samo lokalno.

Takvi rezultati, kao i rezultati ovog istraživanja, mogu imati važnu ulogu u predviđanju nastanka parodontne bolesti jer su povišene vrijednosti upalnih medijatora nađene čak šest mjeseci prije klinički uočljivog gubitka pričvrstka¹⁴.

Glavna stimulacija otpuštanju prostaglandina i citokina su LPS-i parodontopatogenih bakterija. Zato su i vrijednosti PGE₂ niže kod ispitanika otpornih na parodontnu bolest u odnosu na one koji su skloni parodontnoj bolesti^{15,17}. Dokazana je i značajna povezanost između vrijednosti PGE₂ u GST-u i razini gubitka pričvrstka kod ispitanika s kroničnim parodontitisom^{15,16}. Na osnovi toga može se zaključiti da je PGE₂ najsnažniji stimulator koštane resorpcije.

TXB₂ je također prisutan u većim vrijednostima u GST-a kod pacijenata s kroničnim parodontitisom, što upućuje da su prostaglandini glavni upalni medijatori kao odgovor na gram-negativnu infekciju kod parodontne bolesti¹¹. Postaje jasno i da prostaglandini imaju širi spektar djelovanja nego što se to ranije mislilo i da njihove povišene vrijednosti u parodontnim tkivima mogu pokrenuti različite, po zdravlje nepovoljne procese i drugdje u tijelu^{1,2}.

ZAKLJUČAK

Rezultati ovog istraživanja potvrđuju da upalni medijatori PGE₂ i TXB₂ imaju značajnu ulogu u patogenezi parodontne bolesti. Vrijednosti ovih upalnih medijatora u GST-u su značajno veće kod ispitanika s kroničnim parodontitisom u odnosu na one zdrave. Takav nalaz podržava koncept da su monociti kod oboljelih ispitanika podraženi od strane LPS-a i da pokazuju veći upalni odgovor u smislu lučenja ispitivanih upalnih medijatora.

Rezultati također ukazuju da bi navedeni upalni medijatori mogli biti važni stimulansi u koštanoj resorpciji u oboljelih od parodontne bolesti. Temeljem raznih *in vivo* opažanja, za očekivati je da bi smanjivanje produkcije ispitivanih upalnih medijatora moglo pridonijeti usporavanju resorpcije alveolarne kosti.

Izjava o sukobu interesa: Autori izjavljuju da ne postoji sukob interesa.

LITERATURA

1. Lindhe J, Lang NP, Karring T (eds). Klinička parodontologija i dentalna implantologija. Zagreb: Nakladni zavod Globus, 2010;58-112.
2. Taubman MA, Valverde P, Han X, Kawai T. Immune response: the key to bone resorption in periodontal disease. *J Periodontol* 2005;76:2033-41.
3. Bascones A, Noronha S, Gomez M, Mota P, Gonzalez Moles MA, Dorrego MV. Tissue destruction in periodon-

- titis: bacteria or cytokines fault? *Quintessence Int* 2005; 36:299-306.
4. Noguchi T, Shiba H, Komatsuzawa H, Mizuno N, Uchida Y, Ouhara K et al. Syntheses of prostaglandin E₂ and E-cadherin and gene expression of β -defensin-2 by human gingival epithelial cells in response to *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Inflammation* 2003;27:341-9.
 5. Lakio L, Paju S, Alfthan G, Tirola T, Asikainen S, Pussinen PJ. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotype d-specific antigen contains the O antigen of lipopolysaccharide. *Infect Immun* 2003;71:5005-11.
 6. Schytte Blix IJ, Helgeland K, Hvattum E, Lyberg T. Lipopolysaccharide from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* stimulates production of interleukin-1 β , tumor necrosis factor- α , interleukin-6 and interleukin-1 receptor antagonist in human whole blood. *J Periodontol Res* 1999;34:34-40.
 7. Hussain MZ, Ghani JC, Zhang B, Enriquez C, Hayashi MR, Wirthlin R. Alterations of fibroblast metabolism in early ligature-induced periodontitis in the cynomolgus monkey. *J Periodontol* 1994;65:771-5.
 8. Haffajee AD, Socransky SS. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontol* 2000 1994;5:78-111.
 9. Yucel-Lindberg T, Hallstrom T, Kats A, Mustafa M, Moeder T. Induction of microsomal prostaglandin E synthase-1 in human gingival fibroblasts. *Inflammation* 2004; 28:89-95.
 10. Choi BK, Moon SY, Cha JH, Kim KW, Yoo YJ. Prostaglandin E₂ is a main mediator in receptor activator of nuclear factor- κ B ligand-dependent osteoclastogenesis induced by *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, and *Treponema socranskii*. *J Periodontol* 2005; 76:813-20.
 11. Bons-Sicard C, Choquet A, Escola R. Localization and quantification of TXB₂ in human healthy and inflammatory gingival mucosa. *J Periodontol Res* 1998;33:27-32.
 12. White RP Jr, Offenbacher S, Phillips C, Haug RH, Blakey GH, Marciani RD. Inflammatory mediators and periodontitis in patients with asymptomatic third molars. *J Oral Maxillofac Surg* 2002;60:1241-5.
 13. Tarannum F, Faizuddin M, Madaiah H. Gingival crevicular fluid prostaglandin E₂ level as a predictor of preterm low birth weight: a pilot investigation. *J Oral Sci* 2011; 53:293-300.
 14. Offenbacher S, Heasman PA, Collins JG. Modulation of host PGE₂ secretion as a determinant of periodontal disease expression. *J Periodontol* 1993;64:432-44.
 15. Heasman PA, Lauffart BL, Preshaw PM. Crevicular fluid prostaglandin E₂ levels in periodontitis-resistant and periodontitis-susceptible adults. *J Clin Periodontol* 1998; 25:1003-7.
 16. Leibur E, Tuhkanen A, Pintson U, Soder PO. Prostaglandin E₂ levels in blood plasma and in crevicular fluid of advanced periodontitis patients before and after surgical therapy. *Oral Dis* 1999;5:223-8.
 17. Fujita Y, Ito H, Sekino S, Numabe Y. Correlations between pentraxin 3 or cytokine levels in gingival crevicular fluid and clinical parameters of chronic periodontitis. *Odontology* 2012;100:215-21.
 18. Offenbacher S, Salvi GE. Induction of prostaglandin release from macrophages by bacterial endotoxin. *Clin Infect Dis* 1999;28:505-13.