

Przewlekłe zapalenie przyzębia a inhibitory cytokin

***Sylwia Małgorzata Słotwińska¹, Anna Maria Wasilewska¹, Robert Słotwiński^{2,3},
Marzanna Zaleska³**

¹Zakład Stomatologii Zachowawczej, Warszawski Uniwersytet Medyczny

Kierownik Zakładu: prof. dr hab. n. med. Elżbieta Jodkowska

²Zakład Immunologii i Żywienia, Warszawski Uniwersytet Medyczny

Kierownik Zakładu: prof. zw. dr hab. med. Robert Słotwiński

³Zespół Kliniczno-Badawczy Chirurgii Transplantacyjnej, Instytut Medycyny Doświadczalnej
i Klinicznej Polskiej Akademii Nauk

Kierownik Zespołu: prof. dr hab. n. med. Marek Durlik

THE CHRONIC PERIODONTITIS AND CYTOKINE INHIBITORS

Summary

Research focused on IL-1 and TNF- α and their inhibitors may be of significant value in diagnosing and assessing progression of periodontal diseases. The aim of this study was to assess occurrence of interleukin-1 receptor antagonist (IL-1Ra) and soluble tumor necrosis factor receptor (sTNF RI) in patients with chronic periodontitis as well as establish significant relationships between the cytokine inhibitors assessed and parameters of clinical periodontal condition. The correlation between IL-1Ra saliva concentration and plaque index, bleeding on probing and clinical attachment level has been found in the chronic periodontitis ($p < 0.05$). It suggests there is a link between IL-1Ra and the chronic periodontitis.

Key words: chronic periodontitis, cytokines, interleukin-1 receptor antagonist (IL-1Ra), soluble tumor necrosis factor receptor (sTNF RI)

WSTĘP

Przewlekłe zapalenie przyzębia jest związane przede wszystkim z występowaniem biofilmu bakteryjnego. Czynnikiem inicjującym reakcję immunologiczno-zapalną odpowiedzialną za destrukcję tkanek przyzębia są bakterie Gram-ujemne izolowane głównie z kieszonek przyzębnych. Odpowiedź immunologiczna gospodarza w obrębie jamy ustnej sprowadza się do wytworzenia mechanizmów odporności prowadzących do eliminacji antygenów. Migracja komórek układu odpornościowego w środowisku zapalnym odbywa się przy udziale cytokin – glikoproteinowych przekaźników sygnału, które łączą się z odpowiednim zewnątrzkomórkowym receptorem na komórce docelowej. Receptory są swoiste dla wiązania tylko jednej cytokiny. Ekspresja białek receptorowych stymulowanych cytokinami poprzedza najczęściej odpowiednie mechanizmy efektorowe komórek docelowych

do zwalczania patogenów. Cytokiny uczestnicząc w komunikacji między układem immunologicznym i reakcją zapalną, wykazują głównie działanie lokalne. Wykazano kluczowy udział IL-1, IL-4, IL-6, IL-8 i TNF- α w indukcji i modulacji mechanizmów efektorowych w patogenezie zapaleń przyzębia (1-4). Badania IL-1 i TNF- α oraz ich inhibitorów mogą mieć istotną wartość w diagnozowaniu i ocenie postępu choroby przyzębia.

CEL PRACY

Celem prezentowanej pracy było zbadanie występowania w ślinie antagonisty receptora interleukiny pierwszej (IL-1Ra) i rozpuszczalnego receptora czynnika martwicy nowotworu (sTNF RI) u pacjentów z przewlekłym zapaleniem przyzębia oraz ustalenie istotnych zależności pomiędzy ocenianymi inhibitorami cytokin a parametrami stanu klinicznego przyzębia.

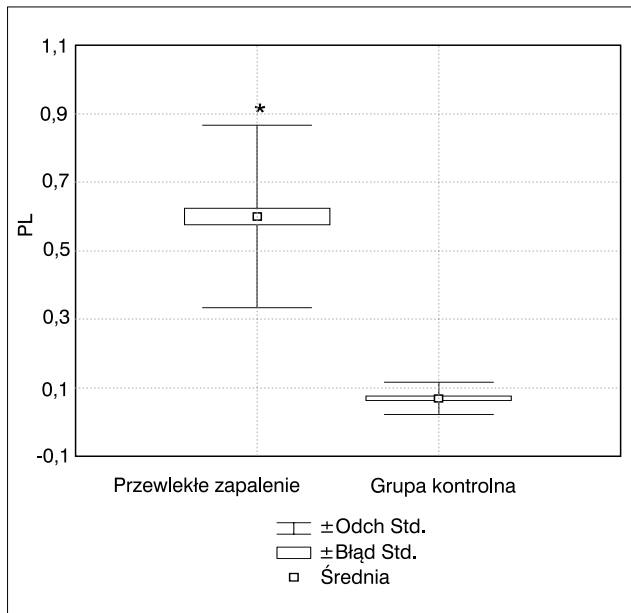
MATERIAŁ I METODY

Badaniami objęto 160 osób w wieku 18-55 lat, w tym 115 osób z przewlekłym zapaleniem przyzębia w wieku 19-55 lat i 45 osób w wieku 18-43 lat z klinicznie zdrowym przyzęciem. Do badań kwalifikowano osoby bez chorób ogólnoustrojowych, niepalące i nieprzyjmujące leków modulujących mikroflorę oraz odpowiedź immunologiczno-zapalną. W badaniu klinicznym oceniano głębokość kieszonki PD (ang. *pocket depth*), położenie przyczepu łącznotkankowego CAL (ang. *clinical attachment level*), odsetek powierzchni zębowych z płytką % PL, krwawienie podczas zgłębnikowania (ang. *bleeding on probing*), % BOP. Do badań immunologicznych pobierano 2 ml mieszanej, niestymulowanej śliny, dwie godziny po śniadaniu. Materiał następnie zamrażano i przechowywano w temperaturze -70°C do czasu badania laboratoryjnego. Stężenie w ślinie wybranych inhibitorów cytokin oznaczano metodą ELISA (Quantikine, R&D System). Przed wykonaniem testów sprawdzano specyficzność reakcji. W analizie statystycznej wykorzystano test U Mann-Whitney oraz test korelacji Pearsona.

WYNIKI

Wyniki badań klinicznych

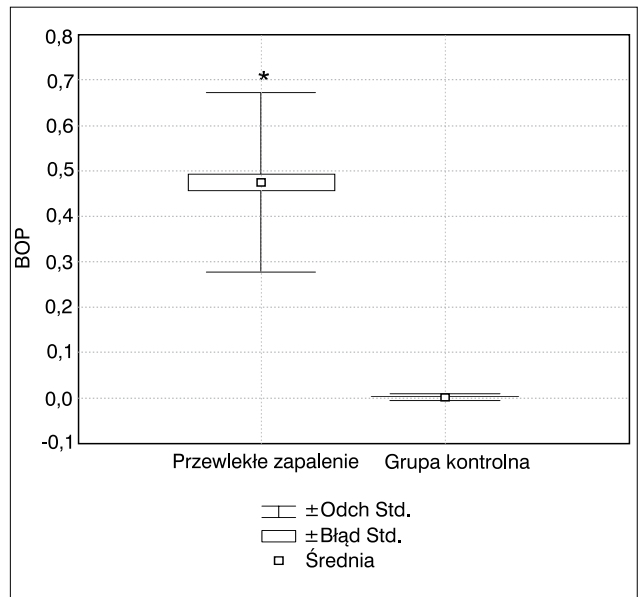
Analiza wyników badań klinicznych stanu higieny jamy ustnej, stanu dziąseł oraz stanu przyzębia w grupie osób z przewlekłym zapaleniem przyzębia i w grupie kontrolnej wykazała różnice istotne statystycznie ($p < 0,001$) pomiędzy badanymi grupami pacjentów



Ryc. 1. Średnia wartość wskaźnika płytki dla pacjentów z przewlekłym zapaleniem przyzębia i w grupie kontrolnej.

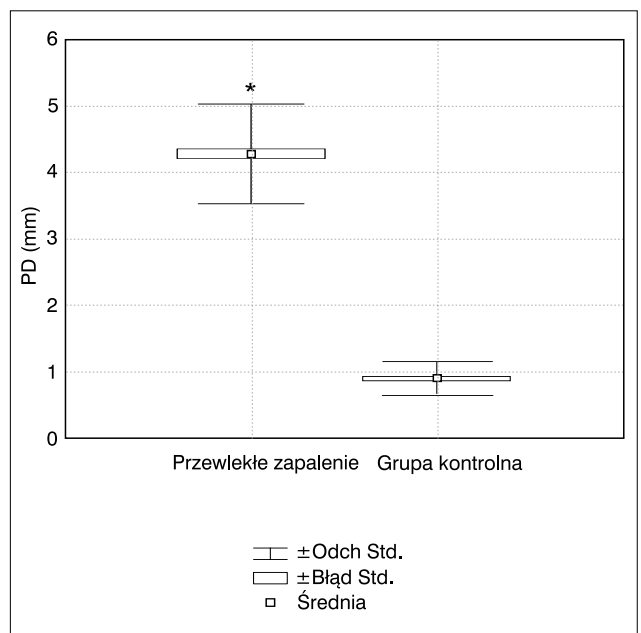
* – różnica znamienna statystycznie w porównaniu z grupą kontrolną ($p < 0,0001$)

(ryc. 1-4). Obecność bakteryjnej płytki nazębnej stwierdzono u wszystkich pacjentów z przewlekłym zapaleniem przyzębia oraz u większości osób z grupy kontrolnej. Średnia wartość odsetkowego wskaźnika



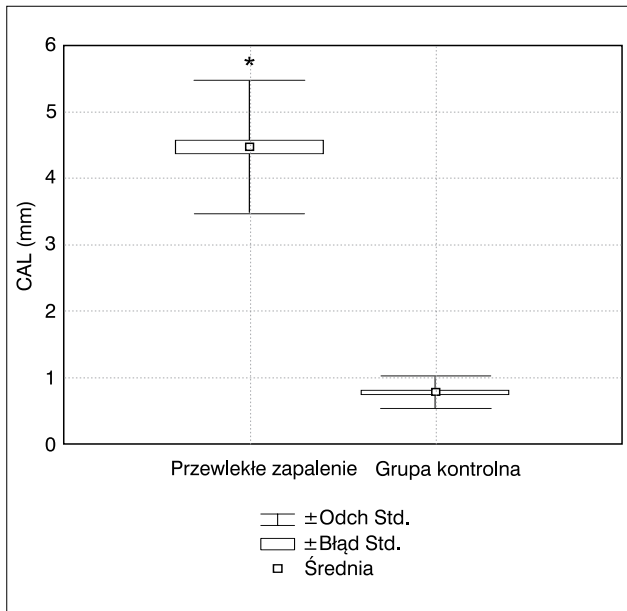
Ryc. 2. Średnia wartość wskaźnika krwawienia dla pacjentów z przewlekłym zapaleniem przyzębia i w grupie kontrolnej.

* – różnica znamienna statystycznie w porównaniu z grupą kontrolną ($p < 0,0001$)



Ryc. 3. Średnia wartość głębokości kieszonek przyzębnych dla pacjentów z przewlekłym zapaleniem przyzębia i w grupie kontrolnej.

* – różnica znamienna statystycznie w porównaniu z grupą kontrolną ($p < 0,0001$)



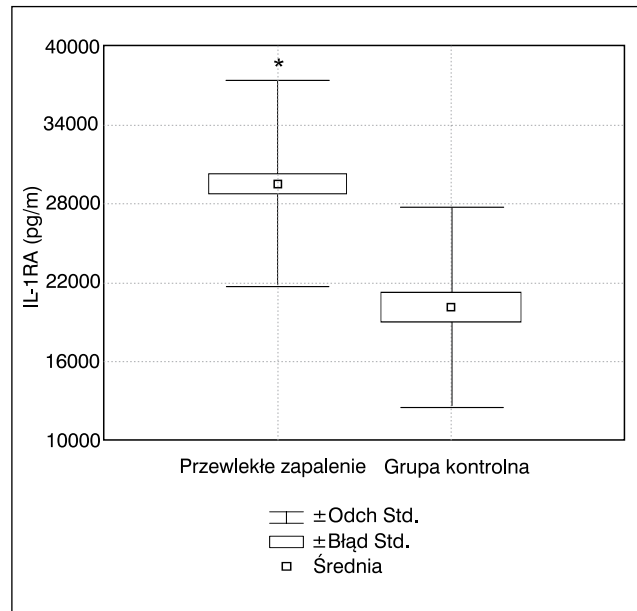
Ryc. 4. Średnia wartość klinicznego położenia przyczepu łącznotkankowego dla pacjentów z przewlekłym zapaleniem przyzębia i w grupie kontrolnej.

* – różnica znamienna statystycznie w porównaniu z grupą kontrolną ($p < 0,0001$)

płytki (% PL) wyniosła 59,97% ($\pm 26,67\%$) u pacjentów z przewlekłym zapaleniem przyzębia oraz 6,82% ($\pm 4,71\%$) u pacjentów z grupy kontrolnej. Wskaźnik krwawienia z kieszonek dziąsłowych (% BOP) wyniósł 45,50% ($\pm 19,72\%$) dla pacjentów z przewlekłym zapaleniem przyzębia oraz 0,18% ($\pm 0,75\%$) dla osób z grupy kontrolnej. Średnia wartość głębokości kieszonek przyzębnych (PD) wyniosła 4,27 ($\pm 0,75$) w grupie pacjentów z przewlekłym zapaleniem przyzębia oraz 0,90 ($\pm 0,25$) dla osób z grupy kontrolnej. Średnia wartość klinicznego położenia przyczepu łącznotkankowego (CAL) wyniosła 4,48 ($\pm 1,00$) w grupie pacjentów z przewlekłym zapaleniem przyzębia oraz 0,81 ($\pm 0,24$) dla osób z grupy kontrolnej.

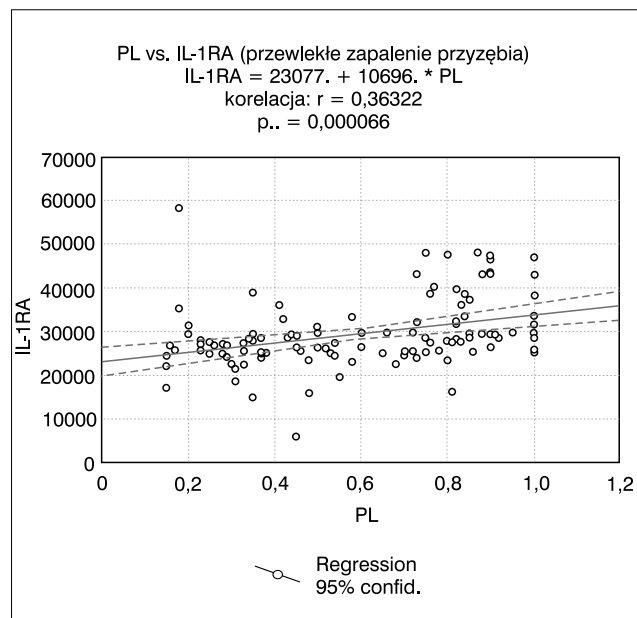
Wyniki badań immunologicznych

Średnie stężenie IL-1Ra (ryc. 5) w ślinie pacjentów z przewlekłym zapaleniem przyzębia wyniosło 29491,75 pg/ml ($\pm 7853,62$) i było istotnie wyższe w porównaniu z wynikami uzyskanymi w grupie kontrolnej: 20088,22 pg/ml ($\pm 7639,59$). Stężenia sTNF RI pacjentów z przewlekłym zapaleniem przyzębia (622,19 pg/ml $\pm 358,53$) oraz u osób z klinicznie zdrowym przyzęciem (689,53 pg/ml $\pm 414,71$) nie różniły się istotnie. Przeprowadzona analiza statystyczna w grupie pacjentów z przewlekłym zapaleniem przyzębia wykazała dodatnią korelację pomiędzy średnimi stężeniami w ślinie IL-1Ra i średnimi wartościami wskaźnika płytki nazębnej, wskaźnika krwawienia oraz średnimi wartościami położenia przyczepu łącznotkankowego (ryc. 6-8). Nie stwierdzono zależności



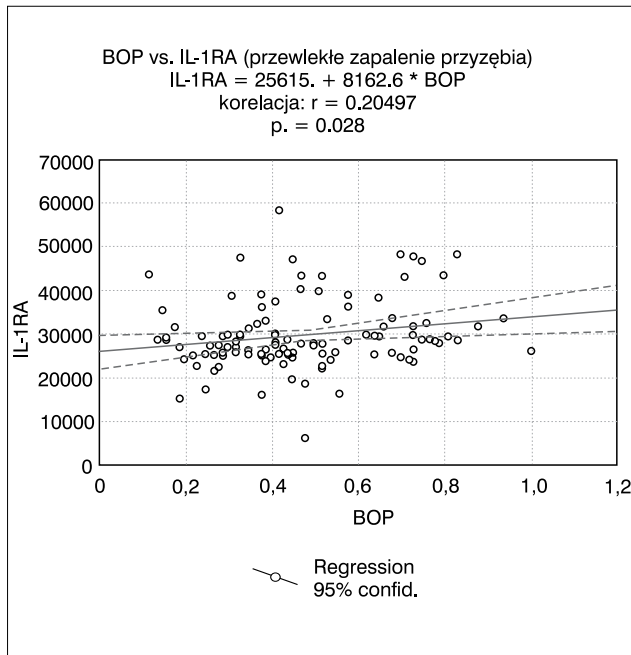
Ryc. 5. Średnie stężenie IL-1 Ra w ślinie pacjentów z przewlekłym zapaleniem przyzębia i w grupie kontrolnej.

* – różnica znamienna statystycznie w porównaniu z grupą kontrolną ($p < 0,0001$)

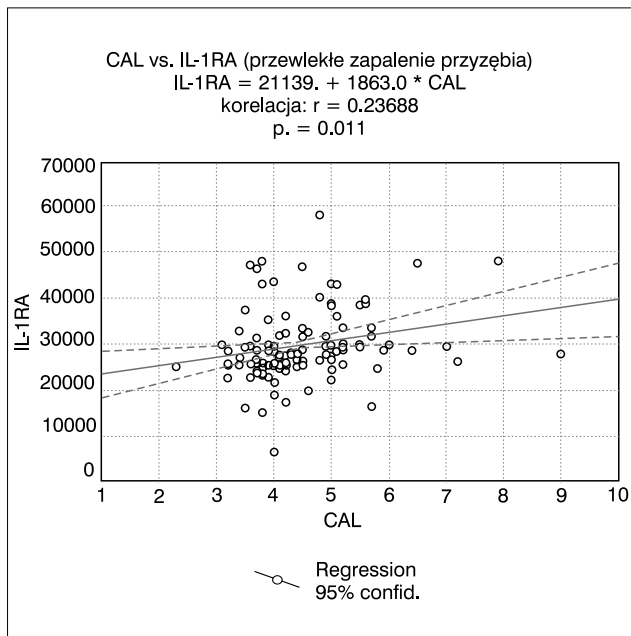


Ryc. 6. Korelacja pomiędzy stężeniem IL-1Ra w ślinie a wskaźnikiem płytki nazębnej (PL) w grupie pacjentów z przewlekłym zapaleniem przyzębia ($p < 0,05$).

pomiędzy średnim stężeniem IL-1Ra w ślinie i głębokością kieszonek dziąsłowych oraz nie wykazano zależności pomiędzy średnim stężeniem IL-1Ra w ślinie i badanymi parametrami klinicznymi w grupie kontrolnej. Analiza statystyczna nie wykazała także korelacji pomiędzy średnim stężeniem sTNF RI w ślinie a



Ryc. 7. Korelacja pomiędzy stężeniem IL-1 Ra w ślinie a wskaźnikiem krwawienia z kieszonek przyzębnych (BOP) w grupie pacjentów z przewlekłym zapaleniem przyzębia ($p < 0,05$).



Ryc. 8. Korelacja pomiędzy stężeniem IL-1Ra w ślinie a klinicznym położeniem przyczepu łącznotkankowego (CAL) w grupie pacjentów z przewlekłym zapaleniem przyzębia ($p < 0,05$).

parametrami stanu klinicznego przyzębia w grupie z przewlekłym zapaleniem przyzębia i u osób z grupy kontrolnej.

DYSKUSJA

W określeniu aktywności choroby przyzębia szczególne znaczenie ma ocena parametrów klinicznych (5, 6). W zaprezentowanych badaniach stwierdzono różnice znamienne statystycznie w średnich wartościach parametrów oceniających poziom higieny jamy ustnej oraz stan dziąseł i przyzębia: % PL, % BOP, PD, CAL pomiędzy pacjentami z przewlekłym zapaleniem przyzębia a grupą kontrolną. W wielu dotychczasowych badaniach wykazano związek pomiędzy wskaźnikami stanu przyzębia a stopniem zaawansowania zapalenia (7, 8). W przeprowadzonych badaniach wykazano również zależności pomiędzy omawianymi parametrami klinicznymi a stężeniem w ślinie antagonisty receptora interleukiny 1 (IL-1Ra): dodatnią korelację stężenia IL-1Ra i wskaźnika płytki nazębnej w grupie pacjentów z przewlekłym zapaleniem przyzębia ($p < 0,05$), dodatnią korelację stężenia IL-1Ra i wskaźnika krwawienia ($p < 0,05$) oraz dodatnią korelację stężenia IL-1Ra i położenia przyczepu łącznotkankowego ($p < 0,05$). Nie stwierdzono zależności pomiędzy średnim stężeniem IL-1Ra w ślinie a głębokością kieszonek oraz pomiędzy średnim stężeniem IL-1Ra i parametrami klinicznymi w grupie kontrolnej. Uzyskane wyniki badań sugerują związek pomiędzy stężeniem w ślinie antagonisty receptora IL-1 (IL-1Ra) a procesem zapalnym toczącym się w przyzębiu. W grupie pacjentów z przewlekłym zapaleniem przyzębia wykazano znamienne wyższe stężenie IL-1Ra w porównaniu do grupy kontrolnej. Według Kabashima i wsp. obecność IL-1Ra w płynie dziąsłowym zawsze świadczy o toczącym się procesie zapalnym, ponieważ u osób z klinicznie zdrowym przyzęciem autorzy nie wykrywali IL-1Ra (9). Holmlund i wsp. oceniali stężenie IL-1Ra w płynie dziąsłowym pobranym z kieszonek przyzębnych przed leczeniem i po zastosowaniu terapii. W materiale pobranym od pacjentów z przewlekłym zapaleniem przyzębia stężenie IL-1Ra było znamienne wyższe w stosunku do jego stężenia w grupie kontrolnej; zaobserwowano także znamienne statystycznie obniżenie stężenia IL-1Ra po leczeniu (10). W wielu innych badaniach wykazano, że IL-1Ra uwalniany przez komórki stymulowane lipopolisacharydami *A. actinomycetemcomitans* hamuje resorpcję tkanki kostnej (11-13). Delima i wsp. zastosowali ludzki, rekombinowany IL-1Ra w postaci iniekcji do brodawek dziąsłowych małp, u których wywołano eksperymentalne zapalenie przyzębia. Po zastosowanym leczeniu zaobserwowano znamienne statystycznie zahamowanie zaniku kości wyrostka zębodołowego o 91% oraz istotną redukcję utraty przyczepu łącznotkankowego o 51% (14). Natomiast wyniki badań Ishihary i wsp. oraz Rawlinsona i wsp. nie potwierdzają wyników opisanych powyżej (15, 16). Autorzy ci wykazali, że w płynie dziąsłowym kieszonek pacjentów z zapaleniem przyzębia stężenie IL-1Ra było niższe w porównaniu do stężenia tej cytokiny w płynie dziąsłowym osób z klinicznie zdrowym przyzęciem, co może sugerować ochronną rolę IL-1Ra oraz świadczyć, że stężenie wytwarzanego inhibitora nie jest wystarczające, aby zaha-

mować proces zapalny. Z badań Rawlinsona wynika, że istnieje odwrócona zależność pomiędzy stężeniem IL-1 α i IL-1Ra w płynie dziąsłowym pacjentów z przewlekłym zapaleniem przyzębia. Należy podkreślić, że wewnątrzkomórkowa forma IL-1Ra może pełnić funkcję tylko wtedy, kiedy jest uwalniana z martwych lub obumierających tkanek razem z IL-1 β w makrofagach i IL-1 α w keratynocytach (16, 17). Waschul i wsp. badając stężenie IL-1Ra i IL-1 β w GCF w wywołanym doświadczalnie zapaleniu dziąseł, nie stwierdzili różnic znamiennych statystycznie w stężeniu tych cytokin (18). Badania własne wykazały obecność IL-1Ra w ślinie osób z klinicznie zdrowym przyzęciem. Opisana glikoproteina w pewnych warunkach może nie wykazywać funkcji inhibitora cytokin podczas toczącego się w przyzęciu procesu zapalnego. Periopatogenne bakterie mogą oddziaływać na sieć cytokinową w tkankach przyzębia i w płynie dziąsłowym poprzez zablokowanie aktywności inhibitorów. Wykazano, że przeciwwzpalne działanie IL-1Ra może zostać zahamowane przez bakterie z gatunku *Porphyromonas gingivalis*, które posiadają zdolność hydrolizowania tej cytokiny (19). Yoshinari i wsp. wprowadzili pojęcie wskaźnika całkowitej aktywności interleukiny 1. Jego wartość jest iloczynem stężenia IL-1 α i IL-1 β oraz stężenia IL-1Ra w GCF. Autorzy uzyskali najwyższą wartość wskaźnika u pacjentów z największą utratą kości wyrostka zębodołowego. Wykazali też dodatnią korelację wskaźnika z parametrami stanu klinicznego (PD, GI) i obniżenie wartości wskaźnika po leczeniu (20). Przeprowadzone badania wykazały brak istotnej różnicy w stężeniu w ślinie sTNF RI u pacjentów z przewlekłym zapaleniem przyzębia i w grupie kontrolnej. Cytokina ta jest wydzielana we wczesnej fazie zapalenia w odpowiedzi na pojawiający się TNF i szybko wraca do stężenia wyjściowego. Nie wykazano również zależności pomiędzy stężeniem sTNF RI a wskaźnikami stanu klinicznego przyzębia. Rozpuszczalne postacie receptorów pełnią rolę fizjologicznych inhibitorów tej cytokiny, a brak istotnej różnicy w stężeniu sTNF RI w grupie pacjentów z zapaleniem przyzębia i w grupie kontrolnej należy tłumaczyć przewlekłością stanu chorobowego przyzębia. Rozpuszczalne receptory czynnika martwicy nowotworów obecne są w surowicy krwi obwodowej i w moczu osób zdrowych. Wzrost ich stężenia stwierdza się w przebiegu różnych infekcji bakteryjnych i wirusowych, np. u chorych z zespołem nabytego upośledzenia odporności (AIDS), a także u osób z chorobami nowotworowymi (21, 22). McFarlane i wsp. badając krew obwodową pacjentów z zapaleniem przyzębia, wykazali dodatnią korelację pomiędzy wzrostem stężenia TNF a rozpuszczalnym receptorem dla TNF (23). Tervahartala i wsp. badając stężenie TNF- α i jego receptorów p55 i p75 w zmienionych zapalnie tkankach przyzębia, zaobserwowali, że wraz ze wzrostem nacieczenia kieszonki przyzębnej makrofagami, fibroblastami i komórkami śródbłonna, nasilała się ekspresja receptora p55 dla TNF- α . Natomiast receptor p75 nie był wykrywany. Podwyższonej ekspresji receptora p55 towarzyszyła

wysoka aktywność kolagenolityczna metaloproteinaz (24). Występowanie nieprawidłowości w ekspresji receptorów błonowych dla TNF na polimorfonuklearnych leukocytach w przebiegu zapalenia przyzębia może być jedną z przyczyn braku istotnej różnicy pomiędzy stężeniem sTNF RI w ślinie u osób z zapaleniem przyzębia i w grupie kontrolnej. Zagadnienie to wymaga dalszych szczegółowych badań. □

Piśmiennictwo

1. Haake SK, Nissengard RJ, Newman MG, Miyasaki KT: Microbial Interactions with the Host in Periodontal Diseases. *Clinical Periodontology* 2000; 8, 132.
2. Dinarello ChA: Induction of Interleukin-1 and Interleukin-1 Receptor Antagonist. *Seminars in Oncology* 1997; 24, 3 (suppl 9), 59-93.
3. Davies DR, Wlodawer A: Cytokines and their receptor complexes. *FASEB J* 1995; 9, 50-56.
4. Gemmell E, Roderick I, Seymour M, Seymour G: Cytokines and prostaglandins in immune homeostasis and tissue destruction. *Periodontology* 2000; 1997, 14, 112.
5. Griffiths G, Wilton J, Curtis M et al.: Detection of high-risk groups and individuals for periodontal diseases. *Clinical assessment of the periodontium. J Clin Periodont* 1998; 15, 403-410.
6. Lang NP, Bragger U: Periodontal diagnosis in the 1990s. *J Clin Periodont* 1991; 18, 370-379.
7. Brown LJ, Loe H: Prevalence, extent, severity and progression of periodontal disease. *Periodontology* 2000; 1993, 2: 57-71.
8. Chapple ILC: Periodontal disease diagnosis: current status and future developments. *J Dent* 1997; 25, 1: 3-15.
9. Kabashima H, Nagata K, Hashiguchi I et al.: Interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-4 in gingival crevicular fluid of patients with inflammatory periodontal disease. *J Oral Path Med* 1996; 25, 449-455.
10. Holmlund A, Hanstrom L, Lerner UH: Bone resorbing activity and cytokine levels in gingival crevicular fluid before and after treatment of periodontal disease. *J Clin Periodontol* 2004; 31, 6: 475-482.
11. Rasmussen L, Hanstrom L, Lerner UH: Characterization of bone resorbing activity in gingival crevicular fluid from patient with periodontitis. *J Clin Periodontol* 2000; 27, 1: 41-52.
12. Nishihara T, Ohsaki Y, Ueda N et al.: Mouse Interleukin-1 Receptor Antagonist Induced by *Actinobacillus Actinomycetemcomitans* lipopolysaccharide Blocks the Effects of Interleukin-1 on Bone Resorption and Osteoclast Like Cell Formation. *Infect Immun* 1994; 62, 2: 390-397.
13. Oates TW, Graves DT, Cochran DL: Clinical, radiographic and biochemical assessment of IL-1/TNF- α antagonist inhibition of bone loss in experimental periodontitis. *J Clin Periodont* 2002; 29, 2: 137-143.
14. Delima AJ, Oates T, Assuma R et al.: Soluble antagonists to interleukin-1 (IL-1) and tumor necrosis factor (TNF) inhibits loss of tissue attachment in experimental periodontitis. *J Clin Periodontol* 2001; 28, 233-240.
15. Ishihara Y, Nishihara T, Kuroyanagi T: Gingival crevicular interleukin-1 and interleukin-1 receptor antagonist levels in periodontally healthy and diseased sites. *J Periodont Res* 1997; 32, 6: 524-529.
16. Rawlinson A, Dalati MHN, Rahman S et al.: Interleukin-1 and IL-1 receptor antagonist in gingival crevicular fluid. *J Clin Periodont* 2000; 27, 10: 738-743.
17. Rawlinson A, Grummitt JM, Walsh TF, Ian Douglas CW: Interleukin-1 and receptor antagonist levels in gingival crevicular fluid in heavy smokers versus non-smokers. *J Clin Periodontol* 2003; 30, 1: 42-48.
18. Waschul B, Herforth A, Stiller-Winkler R et al.: Effect of plaque, psychological stress and gender on crevicular IL-1 β and IL-1 ra secretion. *J Clin Periodontol* 2003; 30, 238-248.
19. Fletcher J, Reddi K, Poole S et al.: Interactions between periodontopathogenic bacteria and cytokines. *J Periodont Res* 1997; 32, 200-205.
20. Yoshinari N, Kawase H, Mitani A et al.: Effects of scaling and root planing on the amounts of interleukin-1 and interleukin-1 receptor antagonist and the mRNA expression of interleukin-1 β in gingival crevicular fluid and gingival tissues. *J Periodont Res* 2004; 39, 158-167.
21. Lilic D, Cant AJ, Abinum M et al.: Chronic mucocutaneous candidiasis. I. Altered antigen-stimulated IL-2, IL-4, IL-6 and interferon-gamma (INF-gamma) production. *Clin Exp Immunol* 1996;

105, 205-212. **22.** Lantz M, Bjönberg F, Olsson I, Richter J: Adherence of Neutrophils Induces Release of Soluble Tumor Necrosis Factor Receptor Forms. *J Immunol* 1994; 152, 1362-1369. **23.** McFarlane CG, Reynolds JJ, Meikle MC: The release of interleukin-1 β , tumor necrosis factor- α and interferon- γ by cultured peripheral blood mononuclear cells from patients with periodontitis. *J Periodont Res* 1990; 25, 207-214. **24.** Tervahartala T et al.: Tumor necrosis factor- α and its receptors, p-55 and p75 in gingival of adult periodontitis. *J Dent Res* 2001; 80, 6: 1535-1539.

nadesłano: 22.04.2011

zaakceptowano do druku: 05.05.2011

Adres do korespondencji:

**Sylvia Małgorzata Słotwińska
Zakład Stomatologii Zachowawczej WUM
ul. Miodowa 18, 00-246 Warszawa
tel.: (22) 502 20 32, 502 20 26, fax: (22) 502 20 38
e-mail: sylwia_slotwinska@yahoo.com*