

<https://doi.org/10.15388/vu.thesis.321>

<https://orcid.org/0000-0002-1084-7198>

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Adomas Rovas

Periodontitui ir reumatoidiniam artritui specifinių mikroRNR raiška ir sąsajos su klinikiniais rodikliais

DAKTARO DISERTACIJA

Medicinos ir sveikatos mokslai

Odontologija (M 002)

VILNIUS 2022

Disertacija rengta 2017-2021 metais Vilniaus universiteto Medicinos fakulteto, Odontologijos instituto, Klinikinės odontologijos centre.

Mokslinius tyrimus iš dalies rėmė Lietuvos mokslo taryba (LMT) Europos regioninės plėtros fondo lėšomis.

Mokslinė vadovė – prof. dr. Alina Pūrienė (Vilniaus universitetas, medicinos ir sveikatos mokslai, odontologija – M 002).

Mokslinė konsultantė – prof. dr. Sonata Jarmalaitė (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biologija – N 010).

Gynimo taryba:

Pirmininkas – Prof. dr. Vygandas Rutkūnas (Vilniaus universitetas, medicinos ir sveikatos mokslai, odontologija – M 002).

Nariai:

prof. dr. Nomedą Basevičienė (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, medicinos ir sveikatos mokslai, odontologija – M 002),

prof. dr. Jolanta Dadonienė (Vilniaus universitetas medicinos ir sveikatos mokslai, medicina – M 001),

prof. dr. Agnieszka Drożdżik (Ščecino universitetas, Lenkija, medicinos ir sveikatos mokslai, odontologija – M 002,)

prof. dr. Laura Linkevičienė (Vilniaus universitetas medicinos ir sveikatos mokslai, odontologija – M 002).

Disertacija ginama viešame Gynimo tarybos posėdyje 2022 m. liepos 1 dieną, 12.00 valandą, Vilniaus universiteto ligoninės Žalgirio klinikos Didžiojoje auditorijoje.

Adresas: Žalgirio g. 117, 08215 Vilnius, Lietuva.

Disertaciją galima peržiūrėti VU bibliotekoje ir VU interneto svetainėje adresu: <https://www.vu.lt/naujienos/ivykiu-kalendorius>

<https://doi.org/10.15388/vu.thesis.321>

<https://orcid.org/0000-0002-1084-7198>

VILNIUS UNIVERSITY

Adomas Rovas

Expression of periodontitis and rheumathoid arthritis specific microRNAs and associations with clinical status

DOCTORAL DISSERTATION

Medicine and Health sciences
Odontology (M 002)

VILNIUS 2022

The dissertation was prepared between 2017 and 2021 in Vilnius University, Faculty of Medicine, Institute of Odontology, Centre of Clinical Odontology.

The research was partially funded by the Research Council of Lithuania (LMT) from European regional Development Fund.

Academic supervisor – Prof. Dr. Alina Pūrienė (Vilnius University, Medicine and health sciences, Odontology M 002).

Academic consultant – Prof. Dr. Sonata Jarmalaitė (Vilnius University, Natural sciences, Biology – N 010).

This doctoral dissertation will be defended in a public meeting of the Dissertation Defence Panel:

Chairman – Prof. Dr. Vygandas Rutkūnas (Vilnius University, Medicine and health sciences, Odontology – M 002).

Members:

Prof. Dr. Nomeda Basevičienė (Lithuanian university of health sciences, Medicine and health sciences, Odontology – M 002),

Prof. Dr. Jolanta Dadonienė (Vilnius University, Medicine and health sciences, Medicine – M 001),

Prof. Dr. Agnieszka Drożdżik (Pomeranian Medical University, Poland, Medicine and health sciences, Odontology – M 002),

Prof. Dr. Laura Linkevičienė (Vilnius University, Medicine and health sciences, Odontology – M 002).

The dissertation shall be defended at a public meeting of the Dissertation Defence Panel at 12:00 on July 1st, 2022 in Main meeting room of of the Vilnius University Hospital Žalgiris clinic.

Address: Žalgirio str. 117, LT-08215 Vilnius, Lithuania.

The text of this dissertation can be accessed at the libraries of Vilnius University, as well as on the website of Vilnius University: www.vu.lt/lt/naujienos/ivykiu-kalendorius

SANTRUMPOS

AAP – Amerikos periodontologų akademija (angl. *American Academy of Periodontology*)

ACR – Amerikos reumatologų kolegija (angl. *American College of Rheumatology*)

AGE – glikeminiai produktai (angl. *Advanced glycation end products*)

Anti-CCP – antikūnai prieš ciklinį citrulinizuotą peptidą

Anti-PPAD – antikūnai prieš peptidilarginino deiminazę

AT – atvirkštinės transkripcijos reakcija

AT-kPGR – kiekybinė atvirkštinės transkriptazės polimerazinė grandininė reakcija

AUC – plotas po ROC kreive (angl. *area under the ROC curve*)

bDMARDs – biologiniai ligos eigą modifikuojantys antireumatiniai vaistai (angl. *biologic disease-modifying antirheumatic drugs*)

BOP – kraujavimo po zondavimo indeksas (angl. *bleeding on probing*)

CD – cukrinis diabetas

CDC – ligų kontrolės ir prevencijos centras (angl. *Center for Disease Control*)

COX – ciklooksigenazė (angl. *Cyclooxygenase*)

CRB – reaktyvusis C baltymas

DAMP – su pažeidimu susijusios molekulinės struktūros (angl. *damage-associated molecular patterns*)

DAS28 – ligos aktyvumo indeksas vertinant 28 sąnarius (angl. *Disease Activity Score*)

DMARDs – ligos eigą modifikuojantys antireumatiniai vaistai (angl. *disease-modifying antirheumatic drugs*)

DVS – dantenuų vagelės skystis

EFP – Europos periodontologų federacija (angl. *European Federation of Periodontology*)

EM – ekstraląstelinis matriksas

ENG – eritrocitų nusėdimo greitis

FC – raiškos skirtumas kartais (angl. *fold change*)

GK – gliukokortikosteroidai

HAQ – sveikatos vertinimo klausimynas (angl. *health assessment questionnaire*)

HbA1c – glikozilintas hemoglobinas
HLA – audinių suderinamumo antigenai (angl. *human leukocyte antigen*)
HS – vandenilio sulfatas
Ig – imunoglobulinas
IL – interleukinas
iRNR – informacinė RNR
I κ B – slopinantys baltymai
KMI – kūno masės indeksas
KNL – kaulo netekimo lygis
LPS – lipopolisacharidai (angl. *lipopolysaccharide*)
miRNR – mikroRNR (angl. *microRNA*)
MMP – matrikso metaloproteinazė
NF- κ B – branduolio veiksnys kapa B (angl. *nuclear factor kappa light chain enhancer of activated B cells*)
NVNU – nesteroidiniai vaistai nuo uždegimo
OPG – osteoprotegerinas
PAMP – su patogenais susijusios molekulinės struktūros (angl. *pathogen-associated molecular patterns*)
PD – periodontitas
PJN – periodonto jungties netekimas
PPAD – peptidilarginino deiminazė
PRR – patogenų atpažinimo receptoriai (angl. *pattern recognition receptor*)
RA – reumatoidinis artritas
RAID – reumatoidinio artrito ligos poveikio klausimynas (angl. *Rheumatoid Arthritis Impact of Disease*)
RANKL – branduolio faktoriaus kapa B ligando receptorių aktyvatorius (angl. *Receptor activator of the nuclear factor kappa B ligand*)
RF – reumatoidinis faktorius
SD – standartinis nuokrypis
sDMARDs – sintetiniai ligos eigą modifikuojantys antireumatiniai vaistai (angl. *synthetic disease-modifying antirheumatic drugs*)
ŠKS – širdies ir kraujagyslių sistema
TLR – *Toll* tipo receptoriai (angl. *toll-like receptor*)
TNF- α – naviko nekrozės faktorius α (angl. *Tumor necrosis factor α*)
VAS – vizualinė analogijos skalė
ZG – zondavimo gylys

TURINYS

| | |
|--|----|
| 1. ĮVADAS..... | 9 |
| 1.1 Įžanga..... | 9 |
| 1.2 Darbo naujumas ir aktualumas..... | 10 |
| 1.3 Darbo tikslas ir uždaviniai..... | 11 |
| 1.4 Tyrimo hipotezė ir ginamieji teiginiai..... | 12 |
| 2. LITERATŪROS APŽVALGA..... | 13 |
| 2.1 Periodonto audinių ligos, periodontito paplitimas..... | 13 |
| 2.1.1 Periodonto ligų patogenezė..... | 15 |
| 2.1.2 Periodontito ryšys su kitomis ligomis..... | 20 |
| 2.2 Reumatoidinis artritas..... | 25 |
| 2.2.1 Reumatoidinio artrito ir periodontito sąsajos..... | 27 |
| 2.2.2 Reumatoidinio artrito gydymui skiriami vaistai ir jų poveikis periodontitui..... | 31 |
| 2.3 miRNR..... | 33 |
| 2.3.1 miRNR biogenezė..... | 33 |
| 2.3.2 miRNR veikimo mechanizmai..... | 36 |
| 2.3.3 miRNR vaidmuo imuninio ir uždegiminio atsako reguliavime..... | 36 |
| 2.3.4 Cirkuliuojančios miRNR..... | 38 |
| 3. TYRIMO METODIKA..... | 40 |
| 3.1 Tyrimo dizainas ir tiriamųjų įtraukimas į tyrimą..... | 40 |
| 3.2 Tyrimo imties dydžio skaičiavimai..... | 42 |
| 3.3 Periodontologinės būklės vertinimas..... | 42 |
| 3.4 Reumatologinės būklės įvertinimas..... | 45 |
| 3.5 Biologinių mėginių surinkimas..... | 45 |
| 3.5.1 Dantenu audinio surinkimas..... | 45 |
| 3.5.2 Dantenu vagelės skysčio surinkimas..... | 46 |
| 3.5.3 Seilių surinkimas..... | 46 |
| 3.5.4 Kraujo plazmos surinkimas..... | 46 |
| 3.6 Biologinių mėginių genetiniai tyrimai..... | 47 |
| 3.6.1 Visuminės RNR skyrimas..... | 47 |
| 3.6.2 Visuminės RNR raiškos analizė..... | 47 |
| 3.6.3 Komplementarios DNR sintezė..... | 49 |
| 3.6.4 Kiekybinė atvirkštinės transkriptazės polimerazinė grandininė reakcija..... | 50 |
| 3.7 Statistinė analizė..... | 51 |
| 3.8 Doktoranto ir kitų tyrėjų indėlis..... | 52 |

| | |
|---|-----|
| 4. REZULTATAI | 53 |
| 4.1 Demografiniai ir klinikiniai tiriamųjų duomenys..... | 53 |
| 4.2 Periodontito ir reumatoidinio atrito klinikinės eigos sąsajos | 54 |
| 4.3 Žvalgomasis miRNR sąsajų tyrimas | 58 |
| 4.4 Pagrindinis miRNR sąsajų tyrimas | 59 |
| 4.4.1 Visuminė miRNR raiškos analizė dantenu audiniuose..... | 60 |
| 4.4.2 miRNR raiškos validavimas dantenu audiniuose | 63 |
| 4.4.3 miRNR analizė dantenu vagelės skystyje..... | 68 |
| 4.4.4 miRNR kiekio tyrimas seiliu mėginiuose..... | 70 |
| 4.4.5 miRNR kiekio tyrimas kraujo plazmoje | 71 |
| 4.4.6 Cirkuliuojančių miRNR diagnostinio potencialo vertinimas . | 72 |
| 5. REZULTATŲ APTARIMAS | 75 |
| 5.1 Periodontito paplitimas, PD ir RA klinikinės eigos sąsajos..... | 75 |
| 5.2 miRNR sąsajų tyrimas, miRNR raiškos analizė dantenu audinyje ... | 77 |
| 5.3 miRNR analizė organizmo skysčiuose..... | 81 |
| IŠVADOS..... | 85 |
| PRAKTINĖS REKOMENDACIJOS | 86 |
| LITERATŪROS SĄRAŠAS..... | 87 |
| SUMMARY | 116 |
| PADĖKA..... | 152 |
| PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS | 153 |
| PRIEDAI | 155 |

1. ĮVADAS

1.1 Įžanga

Periodontitas (PD) yra infekcinė liga, apibūdinama jungiamojo audinio uždegimine destrukcija, dėl kurios netenkama periodonto jungties ir rezorbuojamas alveolinis kaulas. PD yra labiausiai paplitusi lėtinė uždegiminė liga, kurios dažnis siekia iki 70 proc. suaugusiųjų populiacijos, priklausomai nuo amžiaus ir tyrimuose naudojamų diagnostinių kriterijų [1]. Periodontito paplitimas didėja proporcingai gyventojų amžiui [2]. Atsižvelgiant į populiacijos senėjimo tendenciją bei didėjančią rizikos veiksnių pasireiškimą, ateityje galima tikėtis didėjančio PD paplitimo. PD yra viena pagrindinių dantų netekimo priežasčių [3]. Ši liga yra siejama su dažnesniu kitų sisteminių ligų pasireiškimu. Lėtinis anaerobinių bakterijų kiekio padidėjimas burnoje siejamas su didesne rizika sirgti bakterinės kilmės pneumonija, lėtine obstrukcine plaučių liga bei kitomis kvėpavimo sistemos ligomis ir vėžiniais susirgimais [4]. Periodonto patogeninių bakterijų patekimas į kraujotaką prisideda prie aterosklerozinių pakitimų formavimosi, didina infekcinio endokardito bei infarkto išsivystymo riziką [5]. Visgi, yra manoma, kad didžiausią neigiamą poveikį organizmui periodontitas sukelia dėl mažo intensyvumo lėtinio uždegimo, kuris moduliuoja imuninės sistemos veiklą ir tokiu būdu didina riziką sirgti įvairiomis ligomis, įskaitant endokrininius ir autoimuninius susirgimus [6].

Viena labiausiai su periodontitu siejamų autoimuninių ligų yra reumatoidinis artritas (RA) [7]. RA paplitimas bendrojoje populiacijoje siekia 0,3-1 proc., tuo tarpu, tikimybė sirgti RA yra didesnė PD sergantiems asmenims [8, 9]. Periodonto patologijos klinikinė eiga koreliuoja su RA ligos intensyvumu, o po sėkmingo periodontologinio gydymo, stebimas RA klinikinių simptomų aktyvumo sumažėjimas [10, 11]. Įvairiais klinikiniais ir epidemiologiniais tyrimais nustatomos asociacijos tarp PD ir RA yra grindžiamos šių ligų patogenezės panašumais [12]. Abi ligos yra charakterizuojamos padidėjusia uždegiminių citokinų produkcija paskatinančia jungiamojo ir kaulinio audinio rezorbciją [13]. Taip pat, PD ir RA būdingi bendri aplinkos rizikos bei genetiniai veiksniai, įskaitant žmogaus leukocitų antigenų (angl. *human leukocyte antigen*, HLA) ir DRB1 geno alelio raišką [14]. Tobulėjant tyrimo metodams atskleidžiama vis daugiau PD ir RA sąsajų, visgi, itin kompleksinė abiejų ligų patogenezė dar nėra iki galo ištirta.

Pastaruoju metu vis daugiau dėmesio skiriama epigenetiniams genų raiškos reguliavimui, kuris galimai turi įtakos daugelio ligų etiopatogenezei. Vienas iš epigenetinių reguliavimo mechanizmų yra su mikroRNR (miRNR) susijęs

postraskripcinis genų raiškos moduliavimas. miRNR yra nekoduojančių, viengrandžių RNR klasė. Brandi miRNR vidutiniškai yra sudaryta iš 19-25 nukleotidų. Šiuo metu duomenų bazėse užregistruota maždaug 2600 miRNR, iš kurių validuota daugiau nei 1100 miRNR [16]. miRNR daugiausiai neigiamai veikia genus taikinius, slopindamos tolimesnę specifinių informacinių RNR (iRNR) transliaciją bei baltymų sintezę. Apie 60 proc. žmogaus baltymus koduojančių genų raišką reguliuoja miRNR, todėl miRNR yra neatsiejamos nuo daugelio organizme vykstančių fiziologinių ir patologinių procesų [17]. miRNR trūkumas arba perteklius yra aptinkamas įvairių ligų atveju, o cirkuliuojančių miRNR kiekio nustatymas yra laikomas vienu perspektyviausių diagnostinių metodų.

Šio disertacijos darbo metu buvo siekiama nustatyti su PD susijusias miRNR, kurių kiekio įvertinimas organizmo skysčiuose ateityje galėtų būti taikomas PD diagnostikai. Tyrimo metu taikyta veiksmų seka naudojama kituose panašaus pobūdžio tyrimuose [18]. Pirmiausia, visuminės miRNR raiškos metodu, kuriuo galima vertinti 2569 miRNR raišką, buvo nustatytas dantenu miRNR raiškos profilis ir palyginti miRNR raiškos skirtumai tarp periodontito pažeistų ir sveikų dantenu. Remiantis šiame tyrimo etape gautais duomenimis buvo atrinkta 15 potencialiai su periodontitu susijusių miRNR. Šių miRNR raiška vertinta didesnėje dantenu mėginių imtyje. Dantenu audinyje keturios (miR-140-3p, miR-145-5p, miR-146a-5p ir miR-195-5p) labiausiai su PD susijusios ir su įvairiais klinikiniais-patologiniais PD rodikliais koreliavusios miRNR buvo atrinktos tolesniam tyrimui bei diagnostinio potencialo vertinimui organizmo skysčiuose: dantenu vagelės skystyje (DVS), seilėse ir kraujo plazmoje. Visuose tyrimo etapuose buvo atsižvelgiama į RA diagnozę, RA klinikinius-patologinius rodiklius bei RA gydymui skiriamų vaistų vartojimą, siekiant tiksliau identifikuoti su uždegimu susijusias miRNR bei potencialiai pagilinti šiuo metu turimas fundamentalias žinias apie PD ir RA tarpusavio ryšį.

1.2 Darbo naujumas ir aktualumas

Su periodontitu susijusių molekulių nustatymas yra aktualus dėl keleto priežasčių. Visų pirma, molekulių žymenų identifikavimu seilėse ar DVS paremta neinvazyvi periodontito diagnostika yra aktuali siekiant sukurti alternatyvius periodontologinės būklės įvertinimo metodus, neparemtus klinikine apžiūra ir periodontologiniu ištyrimu. Tikėtina, kad neinvazyvūs diagnostiniai metodai padidintų pacientų bendradarbiavimą, o lengvai prieinama, savalaikė PD diagnostika sumažintų PD daromą žalą organizmo sveikatai. Taip pat, molekulių žymenų identifikavimas ateityje galėtų būti

taikomas siekiant įvertinti riziką sirgti periodontitu ar kuriant miRNR paremtus terapinius preparatus. Specifinės miRNR iš kitų molekulių PD žymenų išsiskiria savo nebaltymine kilme, maža molekuline mase, dideliu stabilumu organizmo skysčiuose bei nebrangia gamyba. Visgi, bendras organizme aptinkamų miRNR kiekis yra didelis ir kinta skirtinguose audiniuose, o šios molekulės yra susijusios su įvairiomis ligomis, todėl reikalingi kompleksiniai tyrimai, kuriuose yra vertinamos miRNR sąsajos su PD įvairiose terpėse ir yra atsižvelgiama į galimą gretutinių ligų ar kitų modifikuojančių veiksnių įtaką miRNR raiškai.

Šio biomedicininio tyrimo metu pirmą kartą vienoje tiriamųjų imtyje buvo atliekamas su PD susijusių miRNR nustatymas dantenų audinyje ir atrinktų miRNR kiekio įvertinimas dantenų vagelės skystyje, seilėse ir kraujo plazmoje. Remiantis iki šiol publikuotos mokslinės literatūros duomenimis, miRNR sąsajos su PD buvo vertintos tik vienoje ar dviejose terpėse (pvz., kraujo plazmoje ir (ar) seilėse) [19]. Mūsų tyrimo metu surinkti duomenys leidžia palyginti skirtingų organizmo skysčių miRNR pokyčių dėsninumą ir diagnostines savybes. Taip pat, autorių žiniomis, tai yra pirmasis tyrimas, kuriame buvo vertinamos RA ir RA gydymui skiriamų vaistų vartojimo sąsajos su miRNR raiška dantenose.

1.3 Darbo tikslas ir uždaviniai

Darbo tikslas

Nustatyti su periodontitu susijusias miRNR, įvertinti šių miRNR diagnostinį potencialą periodontito diagnostikai, tiriant sergančiųjų dantenų vagelės skystį, seiles ir kraujo plazmą, bei iširti miRNR sąsajas su reumatoidiniu artritu ir klinikiniais-patologiniais periodontito bei reumatoidinio artrito rodikliais.

Uždaviniai

1. Iširti visuminį miRNR raiškos profilį periodontito pažeistuose ir sveikuose dantenų audiniuose, įvertinti sąsajas su reumatologine būkle.
2. Atrinktas miRNR validuoti didesnėje dantenų mėginių imtyje ir įvertinti miRNR raiškos ryšį su periodontitu bei reumatoidiniu artritu ir šių ligų klinikiniais-patologiniais rodikliais.
3. Įvertinti atrinktų miRNR (miR-140-3p, miR-145-5p, miR-146a-5p ir miR-195-5p) sąsajas su periodontitu bei jo klinikiniais-patologiniais rodikliais, tiriant dantenų vagelės skystį, seiles ir kraujo plazmą.

4. Įvertinti miR-140-3p, miR-145-5p, miR-146a-5p ir miR-195-5p diagnostinį potencialą periodontito diagnostikai, tiriant dantenuų vagelės skystį, seilės ir kraujo plazmą, bei palyginti skirtingų ėminių diagnostines savybes.

1.4 Tyrimo hipotezė ir ginamieji teiginiai

Tyrimo hipotezė – miRNR raiška dantenuų audinyje bei miRNR kiekis dantenuų vagelės skystyje, seilėse ir kraujo plazmoje yra susijęs su periodontitu ir reumatoidiniu artritu bei šių ligų klinikiniais-patologiniais rodikliais, o atrinktų miRNR kiekio įvertinimas organizmo skysčiuose gali turėti reikšmingą diagnostinę vertę periodontito diagnostikai.

Ginamieji teiginiai:

1. Visuminė miRNR raiška periodontito pažeistuose dantenuų audiniuose skiriasi nuo sveikų dantenuų audinių miRNR raiškos ir yra susijusi su reumatologine būkle.
2. Periodontito pažeistuose dantenuų audiniuose miR-145-5p, miR-140-3p ir miR-195-5p raiška yra reikšmingai padidėjusi ir koreliuoja su PD klinikiniais-patologiniais rodikliais.
3. Dantenuų vagelės skystyje ir kraujo plazmoje esančių miR-140-3p, miR-145-5p ir miR-146a-5p, o seilėse – miR-145-5p kiekis reikšmingai siejasi su PD ir (arba) klinikiniais-patologiniais PD rodikliais.
4. Vertinant miR-140-3p, miR-145-5p, miR-146a-5p ir miR-195-5p kiekį, dantenuų vagelės skystyje šių miRNR diagnostinės savybės periodontito diagnostikai yra geresnės nei seilėse ar kraujo plazmoje. DVS miR-140-3p/-145-5p/-146a-5p derinio diagnostinė vertė yra didesnė nei pavienių miRNR.

2. LITERATŪROS APŽVALGA

2.1 Periodonto audinių ligos, periodontito paplitimas

Periodontas (gr. περί *peri-*, reiškia „apie, aplink“, *-odont*, reiškia – „dantis“) – tai dantį supančių audinių kompleksas sudarytas iš dantenu, alveolės kaulo, periodonto raiščio ir šaknies cemento. Periodonto pagrindinė funkcija – danties įtvirtinimas alveolės kaule. Periodonto audiniai gali būti skirstomi į viršūninius bei kraštinius periodonto audinius. Apie šaknies viršūnę esančių audinių uždegimas sukeltas danties šaknies kanale esančių mikroorganizmų yra vadinamas viršūniniu periodontitu [20]. Šiame moksliniame darbe terminas „periodontitas“ yra vartojamas apibūdinant periodonto audinių pažeidimus paveikiančius kraštinių periodontą. Pagrindinės kraštinio periodonto ligos yra gingivitas ir periodontitas. Gingivitas yra apibūdinamas kaip grįžtamas uždegimas dantenose. Gingivito metu nepažeidžiamos kitos periodonto struktūros (alveolės kaulas, periodonto raištis, šaknies cementas) dėl to, sustabdžius uždegimą, pažeisti audiniai gali atsinaujinti. Periodontitas yra lėtinė infekcinė liga apibūdinama jungiamojo audinio uždegimine destrukcija, dėl kurios netenkama periodonto jungties ir rezorbuojasi alveolinis kaulas. Periodontito sukelti pažeidimai yra negrįžtami ir ligos negydant, ilgainiui susilpnėja periodonto funkcijos ir prarandami dantys.

Bendras PD dažnis siekia nuo 10 - 70 proc. populiacijos [1]. PD paplitimo dažnio skirtumai tarp tyrimų yra susiję su taikomais diagnostiniais kriterijais, amžiaus skirtumu bei geografiniais ypatumais. Kassebaum N. ir bendraautorai 2014 m. atliko sistemine straipsnių apie periodontito paplitimą apžvalgą, kurioje apibendrino 72 tyrimų duomenis iš 37 skirtingų pasaulio šalių, apimančius beveik 0,3 milijono tiriamųjų, vyresnių nei 15 metų [21]. Apžvalgoje teigiama, kad sunkia periodontito forma serga 11,2 proc. pasaulio gyventojų. Sunkus periodontitas yra 6 pasaulyje labiausiai paplitusi liga, paveikianti 743 milijono gyventojų. PD paplitimas didėja proporcingai gyventojų amžiui – nustatyta, kad 68 proc. vyresnių nei 65 metų gyventojų Jungtinėse Amerikos Valstijose serga vidutiniu ar sunkiu periodontitu [22]. Remiantis Skudutytės ir bendraautorių atliktu tyrimu (2000 m.), Lietuvoje PD nustatytas 82 proc. 35-44 metų amžiaus asmenų ir 95 proc. 65-74 metų amžiaus asmenų [23].

Periodonto ligų epidemiologinis vertinimas yra itin apsunkintas dėl skirtingų diagnostinių kriterijų taikymo. Per pastaruosius dešimtmečius buvo sukurtos bent kelios periodonto ligų klasifikacijos. Naujų klasifikacinių kriterijų įvedimas apsunkina PD ligos paplitimo palyginimą tarp tyrimų.

Moksliniuose tyrimuose itin plačiai buvo taikoma 1989 m. Pasaulio sveikatos organizacijos pasiūlyta klasifikacija, paremta CPI / CPITN (*angl. Community Periodontal Index / Community Periodontal Index of Treatment Needs*) indeksu. Ši sistema įgalina per sąlyginai trumpą laiką įvertinti didelės apimties tiriamųjų imtį. Klasifikacija buvo paremta iš esmės zondavimo gylio (ZG) įvertinimu ir nebuvo atsižvelgta į periodonto jungties netekimą (PJN), dantų recesijas, dantų paslankumą, o tai galėjo turėti įtakos diagnozės tikslumui [24]. 1999 metais Amerikos periodontologų akademija (*angl. American Academy of Periodontology, AAP*) pasiūlė patobulintą klasifikacijos versiją. Šioje klasifikacijoje esminis kriterijus buvo periodonto jungties netekimo lygis [25]. Pastarojoje klasifikacijoje PD buvo skirstomas į lėtinį ir agresyvų, atsižvelgiant į PD ligos klinikinius požymius. Dar viena epidemiologiniuose tyrimuose plačiai taikoma klasifikacija – JAV ligų kontrolės ir prevencijos centro (*angl. Center for Disease Control, CDC*) kartu su AAP pateikta CDC / AAP klasifikacija. PD diagnozei nustatyti buvo atsižvelgiama į du pagrindinius kriterijus – ZG ir PJN. Daugelis iki šiol atliktų mokslinių tyrimų naudojo vieną iš anksčiau aprašytų klasifikacinių kriterijų arba pasiūlė savo PD atvejo apibrėžimą. Siekiant patobulinti ir patikslinti periodonto ligų klasifikaciją, 2017 m. AAP kartu su Europos periodontologų federacija (*angl. European Federation of Periodontology, EFP*) pasiūlė naujausią klasifikacijos versiją, kuri šiuo metu yra plačiai taikoma [26]. Ši klasifikacija buvo viešai pristatyta 2018 m., todėl neretai ji yra vadinama 2018 m. periodonto ligų klasifikacija. Klasifikacijos autoriai nustatė, jog trūksta įrodymų teigti, kad PD ir agresyvus periodontitas turi reikšmingų skirtumų, todėl šios ligos buvo apjungtos ir bendrai pavadintos periodontitu. Taip pat, buvo pristatytos PD stadijos ir klasės. Stadijos atspindi periodonto ligos sunkumą. Stadijų įvertinimui atsižvelgiama į PJN, periodontito netektų dantų skaičių, okliuzijos sutrikimus ir kitus veiksnius. Klasės yra skirtos įvertinti PD ligos progresavimą ir paremtos kaulo netekimo lygio (KNL) ir amžiaus santykiu, dokumentuotu PJN ir kitais kriterijais. Itin svarbu, kad šioje klasifikacijoje išskirta sveikų periodonto audinių su ankstesniu periodonto jungties netekimu sąvoka. Tokiu būdu, PD sirgę ir sėkmingai išgydyti pacientai gali būti priskiriami periodontologiškai sveikų asmenų grupei. Atsižvelgiant į tai, jog 2018 m. klasifikacija turi reikšmingų pranašumų lyginant su ankstesnėmis, ir yra paskutinė pripažinta, būtent ši klasifikacija buvo taikyta šiame biomedicininiam tyrime.

Visos aprašytos klasifikacijos remiasi klinikinių periodontologinės būklės rodiklių įvertinimu, įskaitant ZG, PJN, KNL. Vertinant vien tik šiuos rodiklius neretai negalima tiksliai nustatyti PD ligos aktyvumo bei nėra galimybės

įvertinti tikimybės sirgti PD ateityje. Pastaruoju metu vis daugiau dėmesio skiriama neinvazyviai PD diagnostikai naudojant DVS arba seilių mėginius. Taip pat, netrūksta tyrimų, kurie vertintų su PD susijusių molekulių koncentraciją kraujo plazmoje. Iš šių paminėtų terpių, DVS yra glaudžiausiai susijusi su periodonto audiniais, nes DVS susidaro filtruojantis audinių skysčiui pro jungties epitelio ląsteles. DVS sudėtis ir kiekis yra tiesiogiai proporcingas uždegimo aktyvumui periodonto audiniuose. Įvairios diagnostiškos aktualios molekulės ir ląstelės yra vertinamos DVS, siekiant įvertinti jų diagnostinę vertę, įskaitant periodonto patogenus (*Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ir kt.) [27], bakterijų metabolizmo produktus (sieros junginiai, specifinės proteazės) [28], uždegimo žymenis (matriksinio metaloproteinazės (MMP), neutrofilų elastazė, šarminė fosfatazė ir kt.) [29], audinių irimo metu išsiskiriančias molekules (kolageno fragmentai ir kt.) [30] bei kitus junginius. Visgi, DVS surinkimas yra susijęs su tam tikru diskomfortu pacientams. Dėl šios priežasties seilės tiriamos kaip alternatyvus neinvazyvios PD diagnostikos metodas. Seilėse aptinkamos įvairios lokaliai išskiriamos organinės kilmės medžiagos įskaitant baltymus, metabolitus bei genetinę medžiagą. Kooijman G. vadovaujama tyrėjų grupė patentavo baltymų kombinacijų identifikavimą seilėse, siekiant nustatyti lengvą ir pažengusią periodontitą [31]. Kiekybiškai ir kokybiškai nustatoma baltymų piruvato kinazės, MMP-9, S100 kalcijū surišančio baltymo A9, S100 kalcijū surišančio baltymo A8, hemoglobino sudarančias grandines β kombinacija. Taip pat, siekiant atskirti lengvą PD nuo pažengusios ligos, Chatterjea S. patentavo IL-1β, IL-6, MMP-9, MMP-3 baltymų kombinacijos seilės kokybinį ir kiekybinį identifikavimą [32]. Visgi, tiek seilėse, tiek DVS daugelio pavienių medžiagų diagnostinės savybės ne visais atvejais yra pakankamos klinikiniam pritaikymui, todėl tyrimai šioje srityje yra vykdomi toliau [33].

2.1.1 Periodonto ligų patogenezė

Mikroorganizmų reikšmė periodontito patogenezėje

Pagrindinis periodonto ligų etiologinis veiksnys yra mikroorganizmai, reziduojantys ant dantų esančiame minkštajame apnaše. Minkštojo apnašo formavimasis apima keletą etapų. Iš karto po dantų nuvalymo prie danties paviršiaus ima jungtis seilių glikoproteinai, keratinai, mucinai, fosfoproteinai ir kiti baltymai, kurie suformuoja maždaug 1 mm storio organinį sluoksnį, vadinamą pelikule [34]. Dalis burnoje laisvai reziduojančių bakterijų – *Streptococcus spp.*, *Actinomyces spp.*, *Veillonella spp.*, *Lactobacillus spp.* –

turi specialius membranos receptorius, kurių pagalba gali jungtis prie pelikulės baltymų. Šie „pirminiai kolonizatoriai“ sudaro sąlygas toliau jungtis kitų rūšių bakterijoms – *P. Intermedia*, *Capnocytophafia spp.*, *F. Nucleatum*, *P. gingivalis* ir kt. [35]. Bakterijų kolonijoje ima formuotis nauji metaboliniai keliai – vienų mikroorganizmų metabolitai yra panaudojami kitų mikroorganizmų, didėja kolonijos apimtis, kinta pH, mažėja deguonies gradientas, susidaro sąlygos daugintis obligatiniams anaerobams [35]. Heterogeniška dantų apnašo mikroaplinka sudaro palankias sąlygas įvairių rūšių mikroorganizmams daugintis. Pilnai subrendusiame minkštajame apnaše, skirtingų autorių duomenimis, nustatoma daugiau nei 700 įvairių mikroorganizmų rūšių [36, 37]. Minkštajame apnaše be bakterijų aptinkama ir įvairių grybų, pirmuonių bei virusų [38]. Pastarojo meto tyrimai atskleidė, kad įvairios mieliagrybių rūšys, įskaitant *Candida parapsilosis*, *Rhodotorula spp.*, *Candida dubliniensis*, *Candida tropicalis* ir *Candida albicans*, reikšmingai prisideda prie periodonto ligų patogenezės [39]. Sąveikaudama su *P. gingivalis* per adheziją vykdančius baltymus, *Candida albicans* paveikia *P. gingivalis* genų raišką bei didina šios bakterijos virulentiškumą [40]. Taip pat, *Candida albicans* išorinės sienelės komponentai skatina *P. gingivalis* invaziją į epitelines ląsteles, tačiau tikslūs veikimo mechanizmai nėra žinomi [41].

S. Socransky ir bendraautorių 1998 m. atliktas tyrimas atskleidė, kad dalis bakterijų yra susijusios genetiškai ir funkciškai, dėl to jos buvo priskirtos vadinamiesiems kompleksams [42]. Geltonojo, žaliojo ir violetinio komplekso bakterijos (*Streptococcus spp.*, *Actinomyces* ir kt.) vienos iš pirmųjų pradeda augti ant besiformuojančio dantų apnašo [43]. Oranžinio komplekso mikroorganizmų (*Campylobacter gracilis*, *C. rectus*, *C. showae*, *E. nodatum*, *F. nucleatum subspecies*, *F. periodonticum*, *P. micros*, *P. intermedia*, *P. nigrescens*, *S. constellatus*) pradeda daugėti apnašui brestant. Tai iš esmės gramneigiami obligatiniai ar fakultatyviniai anaerobiniai mikroorganizmai. Tuo tarpu, raudonajam kompleksui priskiriamos bakterijos – *P. gingivalis*, *T. denticola*, *T. forsythia* – neretai yra aptinkamos kartu dėl jas siejančių glaudžių metabolinių ryšių [44]. Šios bakterijos dažniausiai aptinkamos su oranžinio komplekso patogenais, dėl to manoma, kad raudonojo komplekso mikroorganizmų daugėjimas yra paskutinis dantų apnašo brendimo etapas. *P. gingivalis*, *T. denticola*, *T. forsythia* yra stipriai susijusios su klinikiniais periodontito simptomais – giliomis periodonto kišenėmis ir kraujavimu po zondavimo – dėl to jos yra vadinamos pagrindiniais periodonto patogenais [45].

Dalis apnašo mikroorganizmų, o ypač raudonajam kompleksui priskiriamos bakterijos, glaudžiai kontaktuoja su dantenų vagelės epiteliumi ir skatina periodonto audinių destrukciją. *P. gingivalis*, *T. denticola*, *T. forsythia* išskiria proteolizinius fermentus, kurių poveikyje ardomi aplinkinių audinių baltymai, o susidariusias aminorūgštis mikroorganizmai metabolizuoja [45]. Didžioji dalis (85 proc.) audinius ardančio poveikio yra priskiriama *P. gingivalis* išskiriamoms cisteino proteazėms (angl. *gingipains*), kurių poveikyje suardomi fibroblastus ekstraląsteliniame matrikse (EM) fiksuojantys baltymai – fibronektinas ir tenascinas-C [46, 47]. Tai lemia fibroblastų atpalaidavimą iš EM ir jų palaipsnišką irimą, kas reikšmingai prisideda prie periodonto audinių destrukcijos.

Dalis bakterijų proteazių poveikyje susidariusių metabolitų provokuoja imuninį atsaką bei prisideda prie tolesnio periodonto audinių ardymo ir periodontito progresavimo. Vandenilio sulfitas (HS) susidaro apnašo bakterijoms skaidant aminorūgštį L-cisteiną bei glutationą. HS yra aktyvus sieros junginys, į kurį monocitai reaguoja išskirdami uždegiminius citokinus IL-1β ir IL-18 [48]. Taip pat, HS paskatina fibroblastų apoptozę bei geba ardyti organizmo baltymų sulfidines jungtis [49]. Tuo tarpu, skaidydamos L-metationą, bakterijos į aplinką išskiria kitus aktyvius, audinių ardymą skatinančius, sieros junginius: metilmerkaptaną, dimetilo disulfidą, dimetilo sulfidą [50]. Be sieros junginių, periodonto patogenų veikla lemia kitų metabolitų kiekio didėjimą periodonto audiniuose, įskaitant amoniako, piruvato bei įvairių trumpagrandžių riebalų rūgščių (propiono, acto, sviesto, skruzdžių, pieno ir kt.) [51-54]. Šie metabolitai gali lemti epitelinių ląstelių ir fibroblastų apoptozę, slopinti epitelio fibroblastų augimą bei paskatinti aktyvių deguonies formų susidarymą [55]. Be tiesioginio neigiamo poveikio aplinkiniams audiniams, šie metabolitai keičia apnašo pH, bei oksidacijos-redukcijos potencialą bei sudaro palankias sąlygas obligatinių anaerobų dauginimuisi.

Imuninio atsako svarba periodontito patogenezėje

Įgimto imuninio atsako ląstelės – makrofagai, dendritinės ląstelės bei neutrofilai – pirmiausiai atpažįsta dantų apnaše reziduojančius mikroorganizmus [56, 57]. Šios ląstelės reaguoja į įvairias su patogenais susijusias molekulinės struktūras (angl. *pathogen-associated molecular patterns*, PAMP) bei su pažeidimu susijusias molekulinės struktūras (angl. *damage-associated molecular patterns*, DAMP). Pagrindiniai PAMP yra bakterijų sienelės lipopolisacharidai (LPS), lipoteichoinė rūgštis, peptidoglikanai, N-formilmietioninas bei lipoproteinai. Tuo tarpu, DAMP

išsiskiria vykstant ląstelių nekrozei, kai viduląsteliniai komponentai patenka į aplinkinius audinius [58, 59].

PAMP ir DAMP atpažinimas vyksta per ląstelių membranose esančius patogenų atpažinimo receptorius (angl. *pattern recognition receptors*, PRR). Žmogaus organizme yra žinomi penki PRR tipai, iš kurių pagrindinis yra *Toll* receptorius (angl. *toll-like receptor*, TLR) [60]. Gramneigiamų bakterijų LPS yra atpažįstami per TLR4 receptorių, tuo tarpu gramteigiamų bakterijų lipoteichoinė rūgštis jungiasi su TLR2 receptoriumi [61]. PAMP sąveika su *Toll* receptoriumi aktyvina signalo perdavimo kelius, kurie reguliuoja skirtingus transkripcinius ir potranskripcinius procesus. Branduolio veiksnys kapa B (angl. *nuclear factor kappa light chain enhancer of activated B cells*, NF- κ B) priklauso indukuojamųjų transkripcijos veiksnių šeimai, kurie neretai vadinami pagrindiniais žmogaus uždegimo mediatoriais [62]. NF- κ B gali būti aktyvinamas dviem būdais – kanoniniu ir nekanoniniu / alternatyviu. Kanoniniu būdu NF- κ B aktyvuojamas, kai nuo jo atsijungia slopinantys baltymai (I κ B), dėl ligandų sąveikos su įvairiais receptoriais, įskaitant jau minėtus *Toll* receptorių bei citokinių, TNF šeimos, T-ląstelių ir B-ląstelių receptorių [63]. Alternatyviuoju būdu NF- κ B aktyvuojamas, kai ligandas susijungia su TNF šeimos specifiniais receptoriais: LT β R, BAFFR, CD40 ir RANK [64,65]. Aktyvuotas NF- κ B patenka į ląstelės branduolį ir prisijungia prie specifinės DNR srities bei paskatina genų taikinių transkripciją. Priklausomai nuo ląstelių tipo, NF- κ B aktyvacija lemia įvairių uždegiminių citokinių (IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-12 naviko nekrozės faktoriaus α (angl. *Tumor necrosis factor α* , TNF- α), chemokinių (MCP-1, IL-18, RANTES, MP-2, CXCL1, CXCL10), anti-apoptozinių veiksnių, adhezijos molekulių produkciją [62]. Pavyzdžiui, įgyto imuninio atsako ląstelės – makrofagai – aktyvuoti per TLR4 receptorių sąveiką su LPS, diferencijuojasi į M1 potipį [66]. M1 makrofagai išskiria IL-1, IL-6, IL-12, TNF- α citokinus bei chemokinus [67]. Šių mediatorių poveikyje vyksta neutrofilų migracija į pažeidimo vietą, įgyto imuniteto ląstelių diferenciacija bei aktyvacija.

Įgyto imuninio atsako aktyvavimas itin svarbus periodontito patogenezėje. Epitelyje reziduojančios antigeną pateikiančios T ląstelės yra aktyvuojamos uždegiminių citokinių. Jos vystosi į skirtingus T ląstelių potipius, priklausomai nuo jų gaminamų citokinių. Th1 gamina IL-2, IFN- γ , bei RANK (priskiriamos ląsteliniam imunitetui), Th2 gamina IL-4, IL-5, IL-10 (priskiriamos humoraliniam imunitetui) [68]. T ląstelės sustiprina uždegiminį atsaką produkuodamos citokinus, kurie paskatina didesnę neutrofilų migraciją į pažeidimo vietą bei stimuliuoja B ląsteles. Pastarosios ląstelės dauginasi sudarydamos klonus bei diferencijuojasi į plazmines

ląsteles gaminančias imunoglobulinus (Ig) [69]. IgG jungiasi su periodonto patogenais ir padeda fagocituojančioms ląstelėms atpažinti patogeninius mikroorganizmus [70].

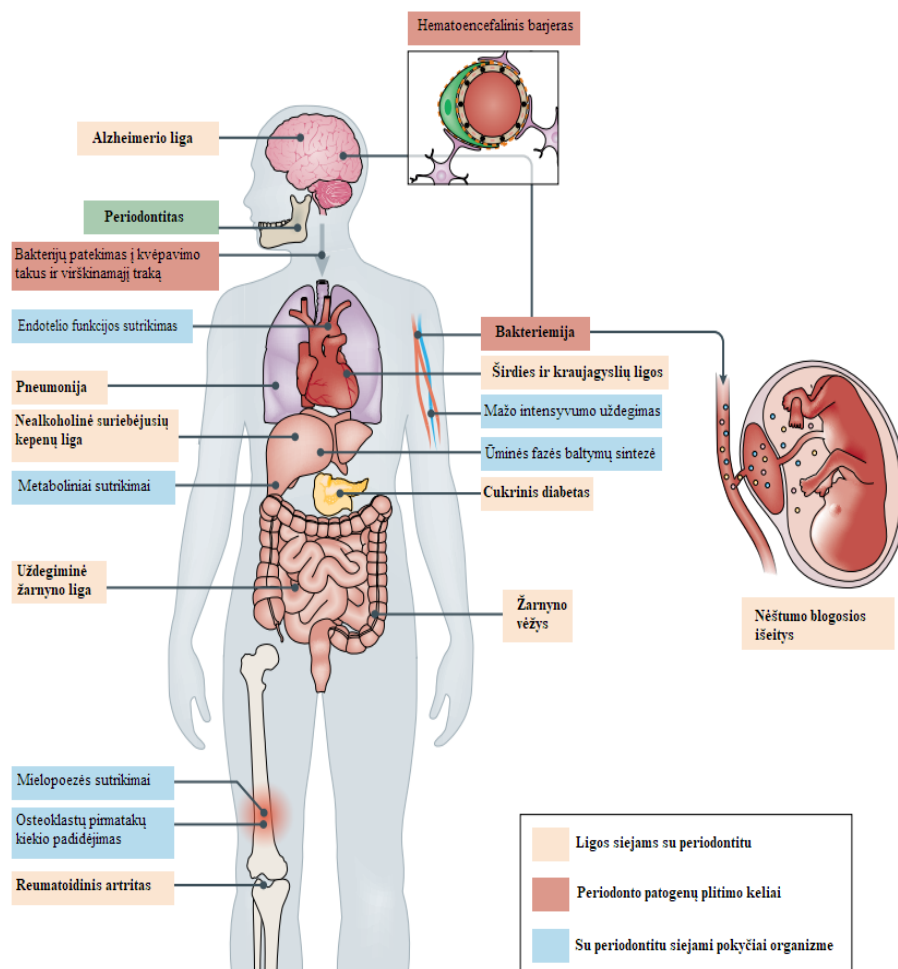
Aktyvuotos imuninės ląstelės įvairiais būdais stengiasi sunaikinti periodonto patogenus. Neutrofilai fagocituoja IgG žymėtus mikroorganizmus bei išskiria į aplinką MMP-8. Pastaroji ardo ne tik periodonto patogenus, bet ir ekstraląstelinio matrikso baltymus. Neutrofilų aktyvumas turi reikšmingos įtakos periodontito progresavimui. Tiek esant neutrofilų hiperaktyvacijai, tiek ir neutrofilų nepakankamumui vystosi sunkus, greitai progresuojantis periodontitas [71]. Normos ribose neutrofilai apriboja pažeidimo vietą ir neleidžia periodonto patogenams plisti į gilesnius audinius. Fagocitų tiesioginė žala periodonto audiniams tik iš dalies paaiškina imuninio atsako svarbą periodontito progresavimui.

Yra žinoma, kad padidėjusi uždegiminių citokinų produkcija turi įtakos apie dantis esančio kaulinio audinio homeostazei. Fiziologinėmis sąlygomis egzistuojanti pusiausvyra tarp kaulą formuojančių ląstelių (osteoklastų) ir kaulą ardančių ląstelių (osteoklastų) yra sutrikdoma dėl padidėjusios osteoklastų aktyvacijos. Osteoklastai formuojasi iš monocitų-makrofagų linijos hematopoetinių pirmtakų, kurie migruoja į pažeidimo vietą pagal IL-8 gradientą [72]. Osteoklastų pirmtakų diferenciaciją paskatina branduolio faktoriaus kappa B ligando receptorių aktyvatorius (RANKL). RANKL jungiasi su preosteoklastų paviršiuje esančiu RANK receptoriumi ir tokiu būdu paskatina osteoklastų diferenciaciją ir aktyvaciją [73]. Esant normaliai kaulinio audinio homeostazei nuo RANKL-RANK sąveikos apsaugo receptorių osteoprotegerinas (OPG), kuris sujungia ir inaktyvuoja RANKL ligandą. Dėl padidėjusios TNF- α ir IL-1 uždegiminių citokinų koncentracijos, padidėja RANKL sintezė osteoklastuose, sutrinka RANKL ir OPG balansas, dėl ko paskatinama osteoklastų diferenciacija ir aktyvacija bei vyksta kaulinio audinio rezorbcija [74, 75]. Taip pat, TNF- α slopina kaulą atstatančių osteoblastų funkciją ir tokiu būdu dar labiau išbalansuojama kaulinio audinio homeostazė [76].

Idealiomis sąlygomis, įgimto ir įgyto imuniteto aktyvacijos sukelta audringa uždegiminė reakcija turėtų sunaikinti patogenus. Visgi, dėl tam tikrų periodonto patogenų gebėjimo „išsisukti“ nuo imuninės sistemos bei dėl bendro mikroorganizmų kolonijos atsparumo, uždegimo metu periodonto audiniuose patogeninės bakterijos nėra sunaikinamos. Vyksta nuolatinė imuninių ląstelių aktyvacija, uždegiminių mediatorių produkcija bei vystosi lėtinė uždegiminė būklė.

2.1.2 Periodontito ryšys su kitomis ligomis

Periodonto patologijos neigiamas poveikis organizmui neapsiriboja periodonto audiniais. Šiuo metu yra nustatyta keletas patogenezinių kelių, kuriais periodonto patogenai veikia toliau nuo danties esančius audinius ir organus (1 pav.).



1 pav. Periodontito ryšys su sisteminėmis ligomis (pritaikyta pagal Hajishengallis ir kt., 2021) [6].

Bakterijų patekimas į kvėpavimo takus ir virškinamąjį traktą

Viename miligrame bakterinio apnašo yra 10^8 vienetų mikroorganizmų [77]. Šie mikroorganizmai ilgainiui išplinta burnoje, patenka į virškinamąjį traktą

ar kvėpavimo takus. Žinoma, kad *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Actinomyces israelii*, *Capnocytophaga species*, *Eikenella corrodens*, *Prevotella intermedia*, *Porphyromonas gingivalis* ir *Streptococcus constellatus* aspiracija į plaučius gali sukelti bakterinę pneumoniją [78, 79]. Įprastai, nosiaryklėje reziduojantys mikroorganizmai į plaučius nepatenka dėl gynybinių mechanizmų – kosulio, virpamojo epitelio gebėjimo pašalinti mikroorganizmus bei imuninės sistemos veiklos. Visgi, dėl įvairių gretutinių susirgimų ar vartojamų vaistų, nusilpus apsauginiams mechanizms padidėja bakterijų patekimo į plaučius rizika. Taip pat, periodontito metu į kvėpavimo takus aspiruojami citokinai bei bakteriniai fermentai. Bakterinės kilmės proteazės pažeidžia kvėpavimo takų virpamąjį epitelį ir pagerina bakterijų adheziją prie epitelio. Tuo tarpu, su seilėmis aspiruoti uždegiminiai citokinai provokuoja uždegiminį atsaką plaučiuose dar prieš patenkant patogeniniams mikroorganizmams [80]. 2016 m. Cagnani ir bendraautorė atliktoje sisteminėje apžvalgoje teigiama, jog yra stiprus ryšys tarp periodontito ir aspiracinės bakterinės pneumonijos [81]. Tuo tarpu, bakterijų patekimas į burną ir virškinamąjį traktą didina navikinių susirgimų riziką. Periodonto patogenų išprovokuotas uždegiminis atsakas lemia laisvųjų radikalų išsiskyrimą, kurie sukelia DNR pažeidimus bei vyksta lipidų peroksidacija ir trikdomas postransliacinis baltymų modifikavimas [82]. Žinoma, kad periodontitas iki 5 kartų padidina riziką sirgti burnos plokščialąsteline karcinoma. Ištyrus karcinomos pažeistus burnos ir stemplės audinius nustatyti itin dideli *P. gingivalis* kiekiai [83, 84].

Bakterijų patekimas į sisteminę kraujotaką

Dantis ir periodonto audinius supa gausus kraujagyslių tinklas. Periodontitui pažeidus jungiamojo ir epitelinio audinio vientisumą, atsiranda galimybė bakterijoms patekti į aplinkines kraujagysles ir išplisti į sisteminę kraujotaką. Žinoma, kad kasdienių procedūrų metu (kramtymo, dantų valymo) ar odontologinių procedūrų metu (profesionalios burnos higienos, dantų šalinimo ir kt.) vyksta bakterijų patekimas į sisteminę kraujotaką – bakteriemija. Bakteriemijos apimtis priklauso periodontito sunkumo, periodontito pažeistų dantų skaičiaus bei nuo procedūros pobūdžio. Sunkus, daugelį dantų pažeidęs periodontitas gali lemti maždaug plaštakos pločio infekcijos „vartų“ susidarymą [85]. Manoma, kad būtent dėl periodontito daugiausia bakterijų patenka į sisteminę kraujotaką, nepaisant to, kad žmogaus organizme yra daugiau sričių, kuriose gausiai reziduoja bakterijos. Pavyzdžiui, žarnyne aptinkama itin gausi bakterinė mikroflora sunkiau patenka į kraujotaką, nes mikroorganizmai nuolat keliauja virškinamuoju

traktu dėl žarnyno peristaltikos. Tai sumažina galimybę pažeisti apsauginį epitelinį barjerą. Tuo tarpu, net ir patekusios į sisteminę kraujotaką žarnyno bakterijos per kepenų vartų veną yra nugabenamos į kepenis, kuriose specializuoti makrofagai (angl. *Kupffer cells*) fagocituoja patogenus ir neleidžia jiems toliau plisti po organizmą [85]. Periodontito atveju į kraujotaką patekusios bakterijos gali plisti po organizmą, nes jos nėra taip efektyviai fagocituojamos. *P. gingivalis* gali patekti į epitelines, endotelines, lygiojo raumens ląsteles bei į makrofagus ir tokiu būdu išvengti imuninio atsako [86]. Periodonto patogenų (*P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia*, *T. forsythia*) DNR aptinkama aterosklerozinėse plokštelėse besiformuojančiose įvairiose širdies ir kraujagyslių sistemos (ŠKS) vietose [87]. Aterosklerozinės plokštelės susidaro vykstant uždegimui endotelyje, kurį išprovokuoja pažeidimai, mažo tankio lipoproteinų agregacija, hipertenzija ar kiti veiksniai [88]. *In vitro* tyrimais nustatyta, kad *P. gingivalis* išskiriamos išorinės sienelės vezikulės paskatina trombocitų agregaciją, trombu formavimąsi bei provokuoja uždegiminį atsaką [89]. 2016 m. Mougeot ir bendraautorių atliktame tyrime nustatyta, kad ŠKS ligomis sergantiems pacientams, net sveikų arterijų (kurios naudojamos koronarinių kraujagyslių šuntavimui) sienelėse aptinkama *P. gingivalis* [90]. Tuo tarpu, bet kokia predisponuojanti ŠKS sistemos pažeidimai dar labiau padidina bakterijų adhezijos tikimybę ir apimtį. Pavyzdžiui, esant širdies mitralinio vožtuvo prolapsui, stenozei, aortos vožtuvo regurgitacijai ar esant protezuotiems vožtuvams reikšmingai padidėja infekcinio endokardito rizika dėl periodonto patogenų agregacijos įskaitant *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Eikenella corrodens*, *Streptococcus species*, *Capnocytophaga*, *Neisseria*, *Lactobacillus* [91]. Bendrai, širdies ir kraujagyslių sistemos ligos yra iki 50 proc. dažnesnės periodontitu sergantiems pacientams [91].

Periodonto patogenai iš ŠKS gali patekti į įvairius organizmo audinius. 2019 metais atliktas tyrimas atskleidė, kad Alzheimerio liga sergančių pacientų smegenyse ir cerebrospinaliniame skystyje aptinkama *P. gingivalis* DNR bei šios bakterijos išskiriamų cisteino proteazių [92]. Autoriai, norėdami sumažinti klaidingai teigiamo rezultato tikimybę, įvertino ir kitos organizme reziduojančios bakterijos, *H. Pylori*, genetinės medžiagos kiekį smegenyse, tačiau jos neaptiko nei viename mėginyje. Šis atradimas sustiprina prielaidą, kad periodonto patogenų patekimas į sisteminę kraujotaką ir išplitimas po organus ir audinius yra didesnis nei kitų mikroorganizmų, kuriuos organizmas geba efektyviai neutralizuoti [85]. Atsižvelgiant į periodonto patogenų virulentiškumą ir žinant, kad Alzheimerio ligos patogenezėi reikšmingos

įtakos turi uždegiminiai procesai, pastarasis atradimas padeda geriau suprasti, kodėl periodontitas yra pripažintas Alzheimerio ligos rizikos veiksnys [93]. Remiantis epidemiologiniais tyrimais, periodontitas buvo siejamas su priešlaikiniu gimdymu ir mažu naujagimio svoriu jau daugelį metų [94]. Pastarojo meto tyrimuose teigiama, kad periodontitas padidina priešlaikinio gimdymo ir mažo kūdikio svorio riziką [95-97]. *In vitro* tyrimais nustatyta, kad *P. gingivalis*, kuris su sisteminė kraujotaka patenka į placentą, paskatina placentos trofoblastų apoptozę [98]. Dėl sutrikdytos vaisiaus kraujotakos didėja įvairių nėštumo blogųjų išeičių tikimybė – vaisiaus augimo sutrikdymo, priešlaikinio gimdymo, mažo naujagimio svorio, nėštuminio diabeto. Tai, jog periodontito neigiamas poveikis kenkia ankstyvuojui nėštumo periodu, patvirtina tyrimai, kuriais nustatyta, jog periodontologinis gydymas nėštumo metu nesumažina įvairių blogųjų nėštumo išeičių tikimybės [99]. Tuo tarpu, prieš nėštumą atliktas periodontologinis gydymas reikšmingai sumažina blogųjų nėštumo išeičių tikimybę.

Lėtinė uždegiminė būklė

Ūmus uždegimas, kuris greitai ir efektyviai pašalina patogenus yra itin naudingas apsauginis mechanizmas. Visgi, užsitęsęs uždegimas, kurio metu patogenai nėra sunaikinami, bet imuninė sistema yra nuolatinei aktyvuojama, neigiamai veikia organizmą. Lėtinio uždegimo metu nuolat produkuojamos aktyviosios deguonies formos, kurios ilgainiui pažeidžia aplinkinius audinius ir ląsteles bei sukelia DNR pažeidimus. Taip pat, pažeistos ląstelės bei aktyvuotos imuninės ląstelės nuolat išskiria uždegiminius citokinus. Nustatyta, kad IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α , PGE2, IFN- γ ir kiti citokinai iš periodonto audinių patenka į sisteminę kraujotaką [100, 101]. Be to, į kraujotaką patekusios pačios bakterijos ar jų virulentiškumo veiksniai paskatina citokinų produkciją toliau nuo periodonto esančiuose audiniuose [102]. Sisteminėje kraujotakoje padidėjusi citokinų koncentracija nulemia ūminės fazės baltymų sintezę – reaktyviojo C baltymo (CRP), komplemento komponentų, fibrinogeno ir kt. [102]. Šie veiksniai savo ruožtu veikia įvairius organizmo procesus įskaitant imuninį atsaką bei hormonų pusiausvyrą ir paskatina vadinamuosius ardymo („anabolinius“) procesus, kurie siejami ne tik su įvairiomis ligomis, bet ir su bendru organizmo senėjimu [103].

Svarbu paminėti, kad anksčiau aprašytas bakterijų patekimas į virškinamąjį traktą, kvėpavimo takus ar sisteminę kraujotaką visada lydimas lėtinės uždegiminės būklės. Visgi, kai kurios ligos su periodontitu labiausiai siejamos būtent dėl lėtinių uždegiminių procesų, o ne dėl tiesioginio periodonto bakterijų patekimo į audinius ar organus.

Cukrinio diabeto (CD) patogenezėje reikšmingą vaidmenį turi uždegiminiai procesai. Padidėjusi IL-6 ir TNF- α koncentracija serume siejama su padidinta rizika sirgti II tipo (nuo insulino nepriklausomu) CD [104]. IL-6 ir TNF- α yra pagrindiniai CRB sintezę kepenyse skatinantys citokinai. CRB neigiamai veikia insulino signalinius kelius bei didina rezistentiškumą insulinui [105]. Tyrimais nustatyta, kad CRB, nepriklausomai nuo kūno masės indekso (KMI) bei fizinio aktyvumo, reikšmingai padidina CD išsivystymo riziką [106]. Tuo tarpu, prielaida, kad CRB padidėja dėl pačios ligos atmesta, nes nustatyta, kad I tipo (nuo insulino priklausomu) CD sergantiems pacientams nėra nustatoma padidėjusi CRB koncentracija [107]. Visos lėtinės uždegiminės būklės, didinančios CRB koncentraciją, didina riziką susirgti II tipo CD, įskaitant periodonto patologiją. Remiantis 2018 m. atlikta sistemine tyrimų apžvalga, periodontitas didina glikozilinto hemoglobino (HbA1c) ir gliukozės kiekį kraujyje bei ikidiabetinių būklių dažnį, o sunkus periodontitas reikšmingai padidina riziką sirgti II tipo CD [108]. Tuo tarpu, pacientams jau sergantiems CD dėl periodontito nustatomas didesnis HbA1c kiekis bei didėja su diabetu susijusių komplikacijų rizika. Po sėkmingo periodontologinio gydymo stebima sumažėjusi serumo CRB ir HbA1c koncentracija [109]. Diabeto sąlygoti kraujagysliniai pakitimai bei imuninės sistemos funkcijos sutrikdymas savo ruožtu neigiamai veikia periodontito eigą. Taip pat, dėl CD padidėja glikeminių produktų (angl. *Advanced glycation end products*, AGE) koncentracija periodonto audiniuose [105]. Makrofagai specialių receptorių pagalba reaguoja į AGE išskirdami IL-1 β , TNF- α , IL-6, sutrikdomas RANKL / OPG balansas ir paskatinamas intensyvesnis kaulinio audinio irimas [110, 111]. Dėl šių reikšmingų sąsajų tarp CD ir periodontito įvairios Europos ir Amerikos asociacijos pateikė rekomendacijas medicinos srities specialistams, kuriose akcentuojama periodonto patologijos įtaka CD eigai ir komplikacijų išsivystymo tikimybei [105].

Nepaisant akivaizdžios neigiamos periodonto patologijos įtakos visam organizmui, periodontitą su įvairiomis sisteminėmis ligomis siejančių įrodymų lygmuo skiriasi. Neretai periodontitą su gretutinėmis ligomis sieja bendri rizikos veiksniai, socialiniai-ekonominiai ypatumai, genetinė predispozicija ar pan. Visgi, tobulėjantys tyrimo metodai, atrandamos naujos medžiagos ar nustatomi nauji patogenetiniai mechanizmai leidžia kai kurių ligų sąsajas laikyti itin reikšmingomis ir galimai net atskleidžia priežastinius ryšius. Vienos iš tokių, glaudžiai susijusių ligų – periodontitas ir reumatoidinis artritas.

2.2 Reumatoidinis artritas

RA – yra sisteminė autoimuninė liga, pasireišianti lėtiniu, progresuojančiu, destruktiniu sąnarių uždegimu [112]. Tai dažniausia uždegiminė sąnarių liga, kuri paveikia maždaug 1 proc. visos populiacijos [113]. Ligai progresuojant vystosi įvairūs pažeistų sąnarių funkcijos sutrikimai dėl kurių pacientų judesiai tampa riboti ir skausmingi, kas ilgainiui lemia asmenų darbingumo praradimą ir itin neigiamai veikia gyvenimo kokybę. Negydoma liga gali sukelti gyvybei pavojingas komplikacijas. RA ligos eiga priklauso nuo diagnozės nustatymo laiko ir nuo medikamentinio gydymo tinkamumo [114].

RA diagnozė nustatoma remiantis ACR / EULAR (angl. *American College of Rheumatology / European League Against Rheumatism*) kriterijais, kurie apima klinikinės būklės įvertinimą, CRB, eritrocitų nusėdimo greičio (ENG) nustatymą, bei serologinius tyrimus, kuriais vertinama reumatoidinio faktoriaus (RF) ir anti-CCP kiekis [115]. Atsižvelgiant į tai ar serume aptinkama anti-CCP ir RF, liga skirstoma į seropozityvų arba seronegatyvų reumatoidinį artritą. Reumatoidinis faktorius aptinkamas ne tik sergant RA, dėl to yra mažai specifiškas šiai ligai. Pastaruoju metu daugiau dėmesio skiriama anti-CCP nustatymui serume, nes šie autoantikūnai yra itin specifiški RA (98 proc.) [7]. Apie 67 proc. RA sergančių pacientų serume aptinkami anti-CCP [116]. Didžiajai daugumai asmenų (70 proc.) anti-CCP gali būti aptinkami serume keletą metų prieš RA ligos diagnozavimą [117]. Ligos klinikinės eigos vertinimui naudojamas ligos aktyvumo indeksas (angl. *Disease Activity Score*, DAS 28) [118]. DAS28 vertinama 28 sąnarių patinimas ir skausmingumas bei nustatoma ENG ir (arba) CRB koncentracija. Skausmo įvertinimui naudojama vizualinė analogijos skalė (VAS) [119]. Ligos gydymui naudojami medikamentiniai preparatai, slopinantys uždegimą ir imuninį atsaką: nesteroidiniai vaistai nuo uždegimo (NVNU), gliukokortikosteroidai (GK), biologiniai ligos eigą modifikuojantys antireumatiniai vaistai (angl. *biologic disease-modifying antirheumatic drugs*, bDMARDs), sintetiniai ligos eigą modifikuojantys antireumatiniai vaistai (angl. *synthetic disease-modifying antirheumatic drugs*, sDMARDs) [120].

RA etiologija ir patogenezė nėra tiksliai žinoma, nes apima kompleksinę įvairių aplinkos, infekcinių, hormoninių veiksnių bei genetinio polinkio sąveiką. Nepaisant to, galima išskirti kelis patogenezinius mechanizmus, kurie turi reikšmingos įtakos ligos atsiradimui ir progresavimui – autoantikūnų formavimasis ir uždegiminiai procesai.

Autoantikūnai gali susidaryti dėl organizme vykstančio baltymų citrulinizavimo. Peptidilarginino deiminazė yra nuo kalcio priklausomas fermentas, kuris vykdo postransliacinę baltymų modifikaciją ir pakeičia teigiamai įkrautą aminorūgštį arginimą į krūvio neturinčią aminorūgštį citruliną. Dėl to sumažėja baltymo teigiamas krūvis, didėja hidrofobiškumas ir keičiasi baltymo trimatė struktūra. Citrulinas nėra koduojamas DNR ir baltymų sudėtyje atsiranda tik dėl deiminazių vykdomos modifikacijos. Citrulinizuoti baltymai organizme atlieka itin svarbias funkcijas, įskaitant epidermio formavimąsi (filagrinas), smegenų vystymąsi (mielino bazinis proteinas) bei genų ekspresijos reguliavimą per chromatino remodeliavimą [121-123]. Žinomi 5 tipai citrulinizaciją vykdančių PPAD fermentų. Itin mažai žinoma apie PPAD lokalizaciją audiniuose ir ląstelėse bei apie šių fermentų aktyvaciją. Manoma, kad PPAD aktyvuojamas uždegiminių būklių metu bei dalyvauja ląstelių apoptozėje, nekrozėje ir netozėje. Pastarasis procesas apima neutrofilų gaminamas ekstraląstelines gaudykles, sudarytas iš chromatininės struktūros, skirtos gaudyti įvairius mikroorganizmus, ir yra laikomos vienu pirmųjų gynybos linijų prieš patogenus [123]. Citrulinizuoti baltymai aptinkami sinoviniame skystyje osteoarito, reaktyviojo artrito metu bei po trauminių pažeidimų, taip pat aptinkami tonzilėse lėtinio tonzilito metu bei žarnyne sergant uždegimine žarnyno liga [124-126]. Taigi, uždegiminių būklių metu padidėjus PPAD aktyvacijai gali būti citrulinizuojami įvairūs organizmo baltymai, įskaitant fibriną, vientiną, fibronektiną, α -enolazę, II tipo kolageną, histonus ir kt. [127]. Kintant citrulinizuotų baltymų trimatei struktūrai, atsidengia nauji antigenų epitopai, kurie atpažįstami antigeną pateikiančių ląstelių [128]. Antigenai pateikiami B ląstelėms, kurios dauginasi sudarydamos klonus ir diferencijuojasi į imunoglobulinius gaminančias plazmines ląsteles. Diferenciacijos metu vyksta mutacijos, dėl kurių kinta imunoglobulinų gebėjimas identifikuoti ir jungtis su antigenais. Manoma, kad dėl šių mutacijų dalis naujai susiformavusių imunoglobulinų nebeatpažįsta citrulinizuotų baltymų kaip organizmo komponentų ir tai gali prisidėti prie autoimuninio atsako [129].

Ilgai trunkantis, progresuojantis uždegimas reikšmingai prisideda prie RA ligos patogenezės. Dėl padidėjusios imuninių ląstelių (T ir B limfocitų, makrofagų, neutrofilų, dendritinių ląstelių ir kt.) migracijos ir aktyvacijos sąnarinėje ertmėje vyksta uždegiminių citokinų produkcija. Dėl perteklinės TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-17, granulocitų-makrofagų kolonijas stimuliuojančio faktoriaus bei RANKL ekspresijos, sinovijos fibroblastai bei chondrocitai išskiria kolageną ardančius fermentus (matrikso metaloproteinazes) bei vyksta osteoklastų aktyvacija [130]. Visa tai lemia sąnario kremzlės ir kaulo irimą.

2.2.1 Reumatoidinio artrito ir periodontito sąsajos

Periodontito ir reumatoidinio artrito sąsajos yra tiriamos jau daugiau nei pusę amžiaus, o tobulėjantys tyrimo metodai padeda atskleisti vis daugiau šias ligas siejančių etiologinių ir patogenezinių ryšių [131]. Manoma, kad tarp PD ir RA egzistuoja abipusis ryšys. Nustatyta, kad RA sergantys pacientai turi didesnę periodontito išsivystymo riziką, didesnę periodonto jungties netekimo lygį bei daugiau prarastų dantų, lyginant su RA nesergančiais asmenimis [132], įvairių RA ir PD molekulinį biožymenų (pvz.: IL-21, resistino, adipokino ir kt.), kurių koncentracijos koreliuoja tarpusavyje [133-135]. Visgi, RA gydymui skiriami sisteminiai priešuždegiminiai vaistai bei TNF- α inhibitoriai mažina uždegimą periodonto audiniuose ir tokiu būdu gali maskuoti tikrąjį RA poveikį periodontitui [136-138]. Tuo tarpu, periodontito įtaka RA yra mažai abejotina. Ilgalaikiai moksliniai tyrimai atskleidė, kad periodontitas didina RA išsivystymo riziką [139, 140]. Sunki periodontitu sergantiems pacientams buvo nustatomas didesnis RA ligos aktyvumas remiantis DAS28 kriterijais, lyginant su lengvesnėmis periodontito formomis sergančiais pacientais ar išvis nesergančiais periodontitu [141]. Periodontito įtaka RA klinikinei eigai grindžiama tyrimais, kuriais nustatoma, kad, pagerinus periodontologinę būklę, pagerėja ir RA eiga. Ortiz (2009 m.) bei Al-Katma (2007 m.) ir bendraautorių atlikti tyrimai atskleidė, kad po konservatyvaus periodontologinio gydymo sumažėja TNF- α koncentracija bei ENG ir DAS28 rodikliai [142, 143], RA gydymui naudojami biologiniai preparatai reikšmingai pagerino RA eigą tik sunkiu periodontitu nesergantiems pacientams [145].

Manoma, kad genetinė predispozicija iki 50 proc. padidina riziką sirgti PD ir RA [146, 147]. RA ligai įtakos turi keliolika genų nukleotidų polimorfizmų, dėl kurių kinta imuninės sistemos veikla, įskaitant NF- κ B signalinį kelią (REL, TNFAIP3, TRAF1) ar T ląstelių aktyvaciją (PTP22, AFF3, CD28, CD40, CTLA4, IL2RA, IL2, IL-21, STAT4) ir kt. [112]. Nustatyta, kad kai kurių genų polimorfizmai padidina riziką sirgti kartu RA ir periodontitu: IL-1 β (rs1143634), KCNQ1 (rs2237892), IFN γ (rs2430561) [148-150]. Kitas svarbus abi ligas siejantis veiksnys – audinių suderinamumo antigenai – HLA. Ląstelių paviršiuje aptinkami HLA padeda imuninei sistemai identifikuoti, kurios ląstelės priklauso organizmui. Tam tikri HLA-DRB1 geno aleliai, dėl kurių kinta HLA-DR receptoriaus beta grandinės struktūra bei imuninės sistemos gebėjimas identifikuoti organizmo ląsteles, reikšmingai padidina RA išsivystymo riziką bei lemia sunkesnę ligos eigą [151]. Ypatingai šie genetiniai pakitimai padidina riziką sirgti seropozityvia

RA forma, nes ženkliai padidėja autoantikūnų prieš citrulinizuotus baltymus koncentracija. HLA-DBR1 geno polimorfizmas taip pat padidina riziką sirgti periodontitu iki 2 kartų ir yra siejamas su greitai progresuojančia periodontito forma [114, 152]. Tiek periodontito, tiek RA atveju tam tikri HLA-DBR1 geno aleliai lemia didesnę kaulinę destrukciją.

RA ir PD sieja bendras rizikos veiksnys – rūkymas. Periodontito atveju dėl rūkymo kinta dantų apnašo mikrobiomo sudėtis, nes daugėja gramneigiamų anaerobinių periodonto patogeninių bakterijų [153]. Taip pat, kinta imuninis atsakas, didėja neutrofilų bei proteolizinių fermentų (metaloproteinazių, elastazės ir kt.) aktyvacija, o tai lemia didesnę periodonto audinių ardymą [153]. Rūkymas siejamas su didesne uždegiminių citokinių koncentracija. Dėl IL-1, IL-6 kiekio padidėjimo bei RANKL / OPG balanso pokyčių paskatinama osteoklastų aktyvacija bei kaulo irimas [154]. Be to, dėl susilpnėjusios kraujotakos blogėja organizmo reparacinės savybės, kas prisideda prie periodontito progresavimo [155]. RA atveju dėl rūkymo didėja PPAD aktyvumas plaučiuose ir didėja baltymų citrulinizacija [156]. Kaip jau minėta, citrulinizuoti baltymai, ypač pacientams su genetinė predispozicija, ilgai gali lemti imuninės tolerancijos praradimą, autoantikūnų formavimąsi bei padidinti riziką sirgti seropozityvia RA forma [157].

P. gingivalis peptidilarginino deiminazės svarba PD ir RA

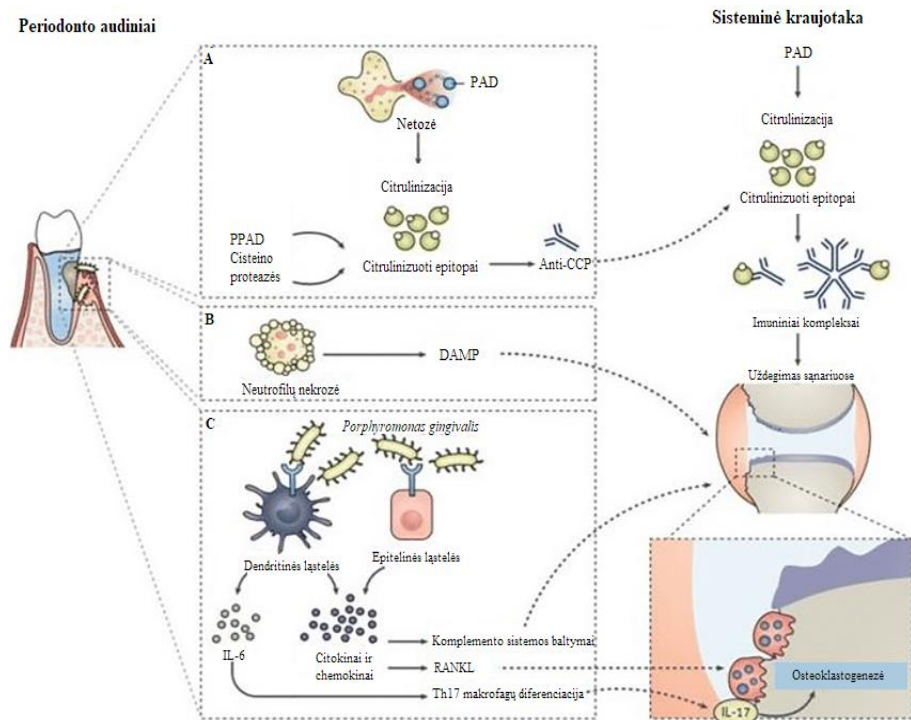
P. gingivalis yra vienintelis žinomas mikroorganizmas turintis fermentą peptidilarginino deiminazę. PPAD skiriasi nuo žinduolių organizme aptinkamos PAD, nes nėra priklausoma nuo kalcio bei gali citrulinizuoti baltymus esant aukštesniam pH [158]. PPAD taip pat geba citrulinizuoti laisvą arginimą, priešingai nei PAD, kuris modifikuoja tik baltymų sudėtyje esantį arginimą. PPAD geba citrulinizuoti ir C-arginimą. *P. gingivalis* argininui specifiskomis cisteino proteazėmis skaido baltymus ties aminorūgštimi argininu, o susidarę peptidai su C-argininio liekana yra citrulinizuojami PPAD [159]. *P. gingivalis* štamai, neturintys argininui specifiskų proteazių, nevykdo baltymų citrulinizacijos, taigi, galima teigti, kad PPAD yra priklausomas nuo minėtų proteazių veiklos. Cisteino proteazės skaido įvairius aplinkinius organizmo baltymus, įskaitant fibrinogeną, α -enolazę, fibriną, vimentiną bei bradikinimą, epitelinį augimo faktorių, o susidarę peptidai yra citrulinizuojami [160]. Taip pat žinoma, kad PPAD geba vykdyti autocitrulinizaciją [161]. 7 iš 18 PPAD arginino aminorūgščių gali būti citrulinizuotos [159].

Manoma, kad PPAD yra itin svarbus *P. gingivalis* fermentas, padedantis šiam mikroorganizmui išgyventi organizme nepalankiomis sąlygomis. Citrulinizacijos metu išsiskiria energija, kurios susidarymui nereikalingas

deguonis. Tokiu būdu palengvinamas *P. gingivalis* augimas anaerobinėmis sąlygomis. Susidaręs šalutinis produktas – amoniakas – padeda *P. gingivalis* palaikyti reikiamą pH, net ir keičiantis burnos pH, pavyzdžiui, dantų valymo metu. Tuo tarpu, priklausomai nuo citrulinizuojamo baltymo skiriasi ir biologinis poveikis. Epitelinio augimo faktoriaus deiminavimas sutrikdo šio citokino veiklą bei lėtina pažeisto epitelio gijimą [162], PPAD deiminoja komplemento komponentą C5a, o susidariusi citrulinizuota šio baltymo forma daug sunkiau jungiasi su C5a receptoriais [163]. Dėl to reikšmingai sumažėja neutrofilų chemotaksis bei fagocitozė. Tyrimais nustatyta, kad PPAD fermento koncentracija tiesiogiai neigiamai koreliuoja su neutrofilų aktyvumu [164]. Manoma, kad fibrinogeno citrulinizacija mažina kraujo krešumą, o bradikinino skaidymas ir citrulinizacija yra svarbūs reguliuojant pažeistų periodonto audinių aprūpinimą krauju ir plazmos baltymais.

Manoma, kad *P. gingivalis* yra pagrindinis PD ir RA siejantis etiopatogenetinis veiksnys. Siūlomos kelios hipotezės, paaiškinančios šio patogeno vaidmenį autoimunizacijoje (2 pav.). Kaip jau minėta, PPAD citrulinizuoja C-galo arginino liekaną. Kadangi, organizmo PPAD nesugeba citrulinizuoti šioje padėtyje esančio arginino, atsiranda nauji epitopai. Kelinama hipotezė, kad šie epitopai reaguoja su T-ląstelėmis ir paskatina antikūnų susidarymą, kurie reaguoja tiek su PPAD citrulinizuotais baltymais, tiek ir su organizmo baltymais. Ireland ir bendraautorių atliktas *in vivo* tyrimas (2006 m.) su pelėmis iš dalies pagrindžia šią hipotezę [165]. Buvo nustatyta, kad C-gale citrulinizuotas lizocimas susijungė su T-ląstelių receptoriais. Šios sąveikos pasekmė buvo autoantikūnų susidarymas, kurie galėjo jungtis ne tik su citrulinizuotu lizocimu, bet ir su nepaveiktu lizocimu. Tikėtina, kad C-gale citrulinizuoti peptidai susidarę iš suskaidytos enolazės ir fibrinogeno gali lemti imuninės tolerancijos praradimą ir autoantikūnų formavimąsi asmenims su genetinė predispozicija. Kita hipotezė kaip *P. gingivalis* dalyvauja autoimunizacijoje grindžiama PPAD gebėjimu vykdyti autocitrulinizaciją RA sergančių pacientų serume aptikti IgG specifiskai besijungiantys su citrulinizuotu PPAD. Tuo tarpu, *P. gingivalis* štamai su neaktyviu PPAD nebuvo susiję su šių specifinių IgG sinteze [159]. 40 proc. RA sergančių pacientų nustatyti antikūnai prieš PPAD (anti-PPAD) [158]. Žinant, kad antikūnai prieš citrulinizuotus baltymus geba jungtis nespecifiskai, yra manoma, kad anti-PPAD gali būti nepriklausomas etiologinis veiksnys, prisidedantis prie autoimunizacijos, o anti-PPAD koncentracija turėtų būti vertinama epidemiologiniuose tyrimuose. Trečioji hipotezė grindžiama jau anksčiau minėtu uždegimo poveikiu PPAD fermentams. Žinoma, kad PAD-2 ir PAD-4 yra aptinkami dantenų audiniuose, o jų koncentracija ir aktyvumas

koreliuoja su periodonto patologijos klinikiniais parametrais [166, 167]. Suaktyvėjusi organizmo deiminazių veikla lemia citrulinizuotų baltymų kiekio padidėjimą bei vyksta citrulinizuotais baltymais padengtų periodonto patogenų fagocitozė, kas paskatina antikūnų formavimąsi. Dar viena hipotezė, kuri atskleidžia kaip *P. gingivalis* dalyvauja autoimunizacijoje, nėra tiesiogiai susijusi su deiminazėmis. Žinoma, kad *P. gingivalis* citozolyje aptinkama enolazė yra 97 proc. identiška citrulinizuotai žinduolių α -enolazei, žinomai kaip citrulinizuotas enolazės peptidas-1 [168]. Taigi prieš bakterinės kilmės enolazę susidarę antikūnai gali kryžmiškai reaguoti su žinduolių enolaze.



2 pav. Periodontito sąsajos su reumatoidiniu artritu (pritaikyta pagal Jajoo ir kt., 2020) [169]. **(A)** Neutrofilų netozės metu atpalaiduojamos peptidilarginino deiminazių (PAD) bei *P. gingivalis* išskiriamų peptidilarginino deiminazių (PPAD) poveikyje vyksta baltymų citrulinizacija ir susidaro autoantikūnai prieš ciklinį citrulinizuotą peptidą (anti-CCP); **(B)** Neutrofilų nektozė, kuri lemia su pažeidimu susijusių molekulinį struktūrų (DAMP) išsiskyrimą; **(C)** *P. gingivalis* išprovokuotas imuninis atsakas ir uždegiminių citokinų kiekio padidėjimas.

2.2.2 Reumatoidinio artrito gydymui skiriami vaistai ir jų poveikis periodontitui

Ligos eigą modifikuojantys antireumatiniai vaistai (angl. *disease-modifying antirheumatic drugs, DMARDs*) yra RA gydymui skirtų vaistų grupė. Anksčiau RA gydymui buvo naudojami įvairūs empiriniu būdu atrinkti preparatai (aukso druskos, hidroksichlorokvinas ir kt.). Šiuo metu plačiai gydymui naudojami DMARDs skirstomi į sintetinius cheminius junginius (metotreksatas, sulfasalazinas, leflunomidas, otofacinibas) ir biologinę terapiją.

Metotreksatas skiriamas gydyti aktyvų RA. Tai – folio rūgšties antagonistas, kuris priklauso citotoksinių-antimetabolinių preparatų grupei. Metotreksatas konkurenciniu būdu slopina fermentą dihidrofoliato reduktazę ir tokiu būdu slopina DNR sintezę. Kliniškai metotreksatas pasižymi priešuždegiminiu ir imunosupresiniu poveikiu. Šis preparatas gali būti vartojamas kaip monoterapija arba kartu su kitais DMARDs. Sulfasalazinas yra aminosalicilo rūgštis pasižyminti priešuždegiminiu poveikiu. Veikiamas storajame žarnyne esančių bakterijų, sulfasalazinas skyla į mesalaziną ir sulfapiridiną. Šis preparatas slopina ciklooksigenazę ir lipoksigenazę, dėl ko sumažėja prostaglandinų, leukotrienų ir kitų uždegiminių mediatorių sintezė [170]. Leflunomidas – selektyvus imunosupresantas, pasižymintis antiproliferaciniu ir priešuždegiminiu poveikiu. Leflunomidas vartojamas autoimuninių ligų gydymui bei po organų transplantacijų, siekiant sumažinti organo atmetimo riziką. Aktyvusis leflunomido metabolitas slopina fermentą dihidroorotatdehidrogenazę. Šio fermento funkcijos sutrikdymas sukelia pirimidinų trūkumą ir tokiu būdu slopina T ląstelių proliferaciją [171]. Ciklosporinas yra imunosupresiniu poveikiu pasižymintis peptidas. Šis preparatas, kaip ir leflunomidas, taip pat slopina T ląstelių proliferaciją. Be to, ciklosporinas slopina osteoklastų formavimąsi ir tokiu būdu slopina kaulo irimą [172]. Prednizolonas yra sisteminio poveikio kortikosteroidas. Šis GK skiriamas gydyti įvairias būkles, įskaitant sunkius alerginius bei vėžinius susirgimus, odos, širdies ir kraujagyslių bei kvėpavimo sistemos ligas. Veikdamas per intraląstelinį gliukokortikoidų receptorių, prednizolonas slopina įvairių uždegiminių genų transkripciją.

Biologinė terapija apima baltymus ir antikūnus, kuriais specifiskai veikiama tam tikrų imuninių komponentų veikla ar koncentracija. Šiai vaistų grupei priskiriami infliksimabas, adalimumambas, etanerceptas, golimumabas, rituksimabas, abataceptas ir kt. Šie vaistai neretai yra vartojami kartu su metotreksatu, nes jų skyrimas indikuotinas, kai gydymas vien metotreksatu ar kitais ligą modifikuojančiais vaistais yra neveiksmingas.

Etanerceptas jungiasi su TNF- α ir lifotoksinų receptoriais ir konkurenciniu būdu slopina šių citokininų poveikį [173]. Adalimumabas – monokloninis TNF antikūnas, kuris specifiniu būdu jungiasi prie TNF- α ir inaktyvuoja jį. Šie preparatai, kartu su infliksimabu, certolizumabu ir golimumabu vadinami TNF inhibitoriais, nes tikslingai slopina TNF- α biologinį poveikį [174]. Abataceptas – fuzinis baltymas, moduluojantis nuo T-ląstelių priklausomą antikūnų gamybą. Abatacepto imunosupresinės savybės yra stipresnės nei TNF inhibitorių [175, 176].

Biologinės terapijos įtaka periodontito eigai buvo įrodyta klinikiniais tyrimais. Mayer su bendraautoriais nustatė (2009 m.), kad TNF inhibitoriumi infliksimabu gydytiems RA sergantiems pacientams buvo stebima mažesnė periodontito sukelta kaulinė rezorbcija, lyginant su RA sergančiais pacientais, kuriems nebuvo taikyta biologinė terapija ar reumatologiškai sveikiems asmenims [177]. Taip pat, infliksimabas buvo susijęs su mažesne TNF- α koncentracija dantenuų vagelės skystyje. Kitame tyrime, vertinant periodonto būklę prieš ir po gydymo infliksimabu, nustatyta, kad šio biologinio preparato taikymas buvos susijęs su reikšmingai mažesniu periodonto jungties netekimu ir tai neturėjo jokio teigiamo poveikio dantenuų uždegimui ar kišenių zondavimo gyliui [178]. Tiriant kito TNF inhibitoriaus – adalimumabo – įtaką periodonto audinių būklei, nustatytas reikšmingas dantenuų uždegimo sumažėjimas, kuris kliniškai pasireiškė sumažėjusiu kraujavimu po zondavimo bei mažesniu kišenių zondavimo gyliu, bet nepastebėta periodonto jungties netekimo pokyčio [179].

Itin reikšmingu poveikiu periodonto audiniams pasižymi IL-6 inhibitorius – tocilizumabas. RA sergantiems pacientams, prieš skiriant šį preparatą buvo atliktas klinikinis periodontologinės ir reumatologinės būklės vertinimas bei buvo nustatyta serumo IL-6 ir MMP-3 koncentracija [180]. Po 8 savaičių gydymo tocilizumabu atliktas pakartotinis klinikinis bei laboratorinis ištyrimas ir patvirtinta visapusiškai reikšmingai pagerėjusi periodonto audinių būklė: sumažėjo dantenuų indeksas ($p < 0,01$), kraujavimo po zondavimo indeksas (BOP) ($p < 0,003$), ZG ($p < 0,0001$) ir PJN ($p < 0,005$). Taip pat, nustatyta sumažėjusi serumo IL-6, MMP-3 bei citrulinizuotų baltymų koncentracija. Įdomu, kad geriausi periodontologinės būklės rodikliai nustatyti tiems pacientams, kuriems buvo stebimas reikšmingiausias RA būklės pagerėjimas.

RA gydymui neretai skiriami nesteroidiniai vaistai nuo uždegimo. Ciklooksigenazę (COX) 1 slopinantys NVNU vadinami neselektyviais NVNU. Jiems priskiriami aspirinas, ibuprofenas, naproksenas, piroksikamas ir kt. COX-2 slopinantys vaistiniai preparatai vadinami selektyviais NVNU

arba „koksibais“. COX-2 inhibitoriams priskiriami meloksikamas, nimesulidas, celekoksibas ir kt. Tiek COX-1 tiek ir COX-2 inhibicija teigiamai veikia periodonto audinių būklę ir mažina audinių uždegimą. Deja, šių vaistų poveikis yra trumpalaikis ir, nustojus vartoti NVNU, teigiamų rezultatų nebestebima [181].

RA eigai koreguoti skiriami įvairūs sisteminiai preparatai, pasižymintys skirtingu poveikiu periodonto audiniams. Ne biologinių RA ligos eigą modifikuojančių preparatų poveikis yra itin menkai ištirtas, dėl to tikslus poveikis periodonto audiniams neaiškus. Be to, biologinių preparatų poveikis skiriasi priklausomai nuo vaistų veikimo pobūdžio. TNF inhibitoriai turi nežymų teigiamą poveikį periodonto audiniams, nors efektas skiriasi priklausomai nuo konkretaus vartojamo preparato, o IL-6 inhibitoriai itin reikšmingai sumažina periodonto jungties netekimą, kišenių zondavimo gylį, kraujavimo po zondavimo indeksą bei uždegiminių mediatorių serumo koncentraciją.

2.3 miRNR

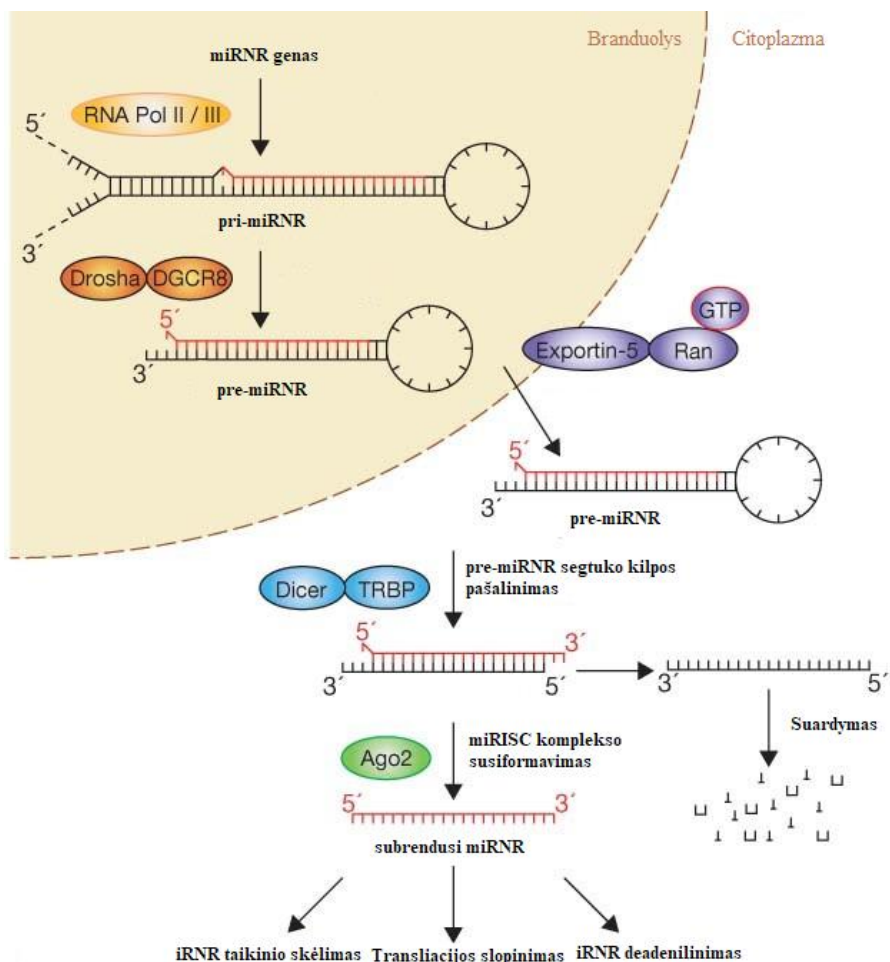
Epigenetikos mokslas studijuoja paveldimus genų funkcijos pokyčius, nesusijusius su branduolio DNR nukleotidų sekų pokyčiais. Vienas iš epigenetinių reguliavimo mechanizmų genų raiškos moduliavimas susijęs su mikroRNR arba miRNR (angl. *microRNA*, *miRNA*). Tai – mažos, nekuoduojančios, viengrandės RNR, susidedančios iš 19-25 nukleotidų. miRNR specifiskai jungiasi prie iRNR ir dažniausiai neigiamai veikia tolesnę specifinių iRNR translacią bei baltymų sintezę. Beveik 60 proc. žmogaus baltymus koduojančių iRNR transkriptų raiška priklauso nuo prie jų prisijungusių miRNR, todėl miRNR neatsiejama nuo daugelio organizme vykstančių fiziologinių ir patologinių procesų reguliavimo [17]. miRNR trūkumas arba perteklius susijęs su atitinkamų baltymų sintezės pokyčiais, dėl to miRNR itin plačiai tiriamos kaip alternatyvus metodas įvairių būklių bei ligų diagnostikai ir gydymui.

2.3.1 miRNR biogeneze

miRNR yra endogeninės kilmės molekulės. miRNR koduojantys genai vadinami *MIR*, o atsižvelgiant į jų lokalizaciją, *MIR* genai gali būti introniniai, egzoniniai ir tarpgeniniai [182]. Apie pusę miRNR genų yra išsidėstę tarpgeniniuose regionuose ir turi savo promotorius. Introninės *MIR* yra išsidėsčiusios kitų genų nekoduojančiose srityse ir dažniausiai jos yra transkribuojamos kartu su genu į kurį yra įsiterpusios. Egzoninės *MIR*

aptinkamos nekoduojančių genų egzonuose ir (arba) intronuose [183]. miRNR biogenezė vyksta dviem būdais: kanoniniu ir nekanoniniu.

Kanoninė miRNR biogenezė. Kanoninis biogenezės kelias yra pagrindinis miRNR sintezės būdas (3 pav.) Kanoniniu keliu susiformuoja 99 proc. visų miRNR. Vykdydama miRNR genų transkripciją, branduolyje RNR polimerazė II (RNR Pol II) sudaro pirminį miRNR transkriptą (pri-miRNR). Pirminis transkriptas yra kelių šimtų nukleotidų ilgio, kurio antrinė struktūra yra panaši į plaukų smeigtuką (angl. *hairpin*) [184]. Ši struktūra atpažįstama mikroprocesoriaus kompleksu, kuris sudarytas iš RNazių III *Drosha* ir baltymo DGCR (angl. *double-stranded RNA-binding domain, Pasha*). *Pasha* / *Drosha* kompleksas atkerpa apie ~60 – 70 nukleotidų ilgio miRNR pirmtaką, vadinamą pre-miRNR [185]. Prekursorinė miRNR (angl. *pre-mRNA*), susijungusi su baltymu Eksportinu-5 bei RanGTP (angl. *Ras-related nuclear protein – guanosine-5`-triphosphate*) yra išnešama iš branduolio į citoplazmą tolesniam brendimui [184]. Citoplazmoje prekursorinė miRNR jungiasi su RNaze III *Dicer* bei TRBP. Šis kompleksas pašalina prekursorinės miRNR segtuko kilpą ir susidaro apie ~22 nukleotidų ilgio miRNR dupleksas. Viena iš duplekso grandinių jungiasi su *Argonaute* baltymais (žmogaus organizme aptinkami Ago1-4) ir susidaro miRISC (angl. *RNA-induced silencing complex*) [186]. Su Argonautų šeimos baltymais susijungusi viengrandė miRNR yra laikoma subrendusia miRNR. Kita duplekso grandinė, nesujungta į kompleksą, dažniausiai suardoma.



3 pav. miRNR biogenezės schema (pritaikyta pagal Winter ir kt., 2009) [187].

Nekanoninė miRNR biogenezė. miRNR biogenezė nekanoniniu keliu skiriasi nuo kanoninio kelio dalyvaujančių baltymų kombinacijomis. Išskiriami du pagrindiniai nekanoniniai keliai: nuo mikroprocesoriaus *Pasha* / *Drosha* nepriklausomas ir nuo *Dicer* nepriklausomas kelias. Iš iRNR intronų susidaranti miRNR, kurios bėsta nedalyvaujant mikroprocesoriaus kompleksui ir vadinamos mitronais. Struktūriškai mitronai panašūs į prekursorines miRNR, todėl tolesnis jų brendimas yra panašus – prie jų branduolyje jungiasi Eksportinas-5, o į citoplazmą patekę mitronai apdorojami *Dicer*. Tuo tarpu, nuo *Dicer* nepriklausomu nekanoniu keliu bėstančios miRNR pirmiausia branduolyje apdorojamos mikroprocesoriaus kompleksu. Susidarę endogeniniai plaukų smeigtuko formos transkriptai yra per trumpi, kad būtų kerpami *Dicer*, todėl prie Ago baltymų prisijungia visas

smeigtuko formos transkriptas. Ago baltymai ir ribonukleazė PARN sukarmo transkriptą iki funkciškai aktyvios formos [188]. Nekanoniais miRNR biogenezės keliais susidaro tik apie 1 proc. miRNR ir daugelis jų negausiai aptinkamos bei nekonservatyvios [189].

2.3.2 miRNR veikimo mechanizmai

Brandi miRNR jungiasi prie netransliuojamo iRNR transkripto 3` galo ir inicijuoja iRNR kirpimą arba slopina transliaciją. miRNR bei baltymų kompleksas prisijungimas veikia kaip tiesioginė kliūtis, kuri trukdo ribosomoms prisijungti prie iRNR ir vykdyti baltymų transliaciją. Kitais atvejais, miRNR baltymų kompleksas prisijungimas veikia kaip žymė iRNR transkripto deadenilinimui ir metilintų guaninino nukleotidų nuėmimui, kas lemia iRNR suskaldymą. Tikslus veikimo mechanizmas priklauso nuo miRNR 2-8 nukleotidų reguliacinio regiono sekos (angl. *seed region*) ir komplementarumo su taikinio iRNR – kuo tiksliau miRNR atitinka iRNR seką, tuo didesnė tikimybė, kad iRNR transkriptas bus kerpamas [190]. Visgi, daugelis miRNR ir iRNR sąveikų žmonių organizme yra nepilnai komplementarios. Tokiu atveju dalyvaujant GW182 ir PABC baltymams, iRNR transkriptas yra deadenilinamas katalizuojančiais deadenilazių kompleksais – PAN2-PAN3 ir CCR4-NOT. Prie deadenilintų iRNR prisijungia DCP2 baltymas (angl. *decapping protein 2*), kuris pašalina 5`m⁷G kepurę. Galiausiai tokia iRNR degraduojama veikiant egzoribonukleazei 1 (XRN1).

miRNR gebėjimas slopinti genų raišką yra plačiai ištirtas, tačiau pastebėta, kad miRNR gali prisidėti ir prie genų raiškos skatinimo. *In vitro* tyrimais įrodyta, kad Ago2 ir FXR1 (angl. *fragile-x-mental retardation related protein 1*) baltymai gali jungtis prie ARE (angl. AU-rich elements) regionų 3`UTR srityse ir tokiu būdu aktyvinti transliaciją [191]. Esant aminorūgščių trūkumui, miRNR aktyvina genus prisijungdamos prie iRNR transkriptų koduojančių ribosominius baltymus. Tokiu būdu, organizme susidarius specifinėms sąlygoms, miRNR gali aktyvinti transliaciją [192].

2.3.3 miRNR vaidmuo imuninio ir uždegiminio atsako reguliavime

miRNR itin reikšmingai prisideda prie imuninės sistemos funkcijų homeostazės palaikymo moduluodamos imuninių ląstelių brendimą, proliferaciją, diferenciaciją, aktyvaciją ir kitus procesus [193]. Kaip aprašyta anksčiau, įgimto imuninio atsako reguliavime itin svarbų vaidmenį turi TLR receptoriai, kurie atpažįsta antigeną ir inicijuoja signalo perdavimą per uždegiminių mediatorių kaskadą. Tai lemia uždegiminių citokininų

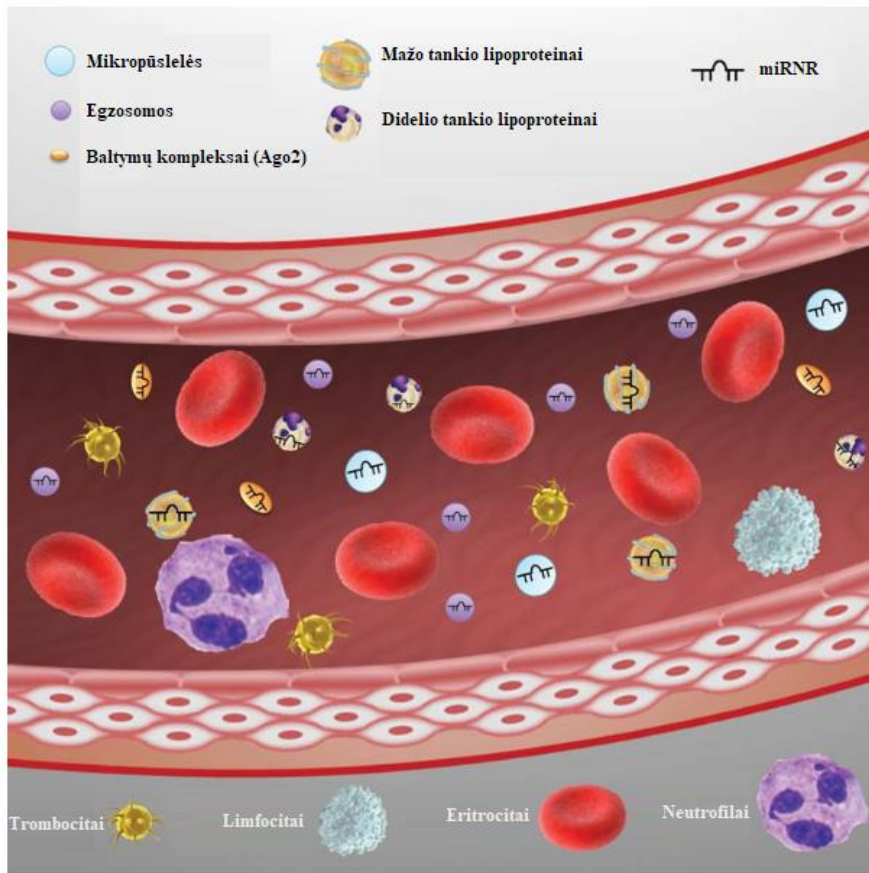
koncentracijos padidėjimą ir tolesnį uždegiminio atsako skatinimą. Šio proceso etapai reguliuojami miRNR [193]. Imuniniame atsake dalyvaujančių NK ląstelių (angl. *natural killer*), kuriose nevyksta *Dicer* ar DGCR8 baltymų raiška sutrinka miRNR brendimas, o tai pasireiškia sutrikusia NK receptorių aktyvinimo funkcija [194]. *Dicer* baltymo trūkumas dendritinėse Langerhanso ląstelėse pasireiškia padidėjusiu šių ląstelių apoptozės lygiu ir bendru kiekiu sumažėjimu. Tuo tarpu, įgyto imuninio atsako reguliavime miRNR poveikis pasireiškia per T ir B ląstelių vystymosi ir diferenciacijos procesų reguliavimą. Panašiai kaip ir Langerhanso ląstelių atveju, esant *Dicer* baltymo trūkumui (pavyzdžiui, atsiradusiam dėl *Dicer* baltymą koduojančio geno delecijos), vyksta ankstyva T ląstelių apoptozė ir bendras šių ląstelių kiekio sumažėjimas. Panašiu principu *Dicer* ir Ago2 baltymų trūkumas neigiamai veikia ir B ląstelių diferenciaciją ir lemia funkciškai aktyvių B ląstelių kiekio sumažėjimą. *Dicer* ir *Drosha* baltymų kiekio sumažėjimas *Treg* ląstelėse yra susijęs su ankstyvu autoimuninių ligų vystymusi [195]. Pateiktuose pavyzdžiuose aprašomas neigiamas poveikis imuninės sistemos funkcionavimui, kai trūksta miRNR brendimui būtinų baltymų ir sutrinka daugelio miRNR raiška. Visgi, pavienių miRNR kiekio padidėjimas ar sumažėjimas taip pat turi reikšmingos įtakos imuninio ir uždegiminio atsako moduliavimui.

Nustatyta, kad uždegimo intensyvumui periodonto audiniuose bei osteoklastų diferenciacijai didelę įtaką daro kelios dešimtys pakitusios raiškos miRNR [196]. Keletas diagnostiniu ir terapiniu požiūriu perspektyvių miRNR: miR-146a, miR-218, miR-34a, miR-223, miR-142-3p, miR-148a. Periodonto patogenų lipopolisacharidai, TNF- α , IL-1 β inicijuoja miR-146a kiekio padidėjimą per NF- κ B aktyvaciją. miR-146a slopina IL-1 β , IL-6, IL-8 sintezę ir mažina uždegimo intensyvumą. Sumažėjusi miR-146a raiška siejama su patologine kaulo rezorbija [197]. Eksperimentiniu būdu padidinta miR-146a koncentracija reikšmingai sumažina uždegiminę reakciją periodonto audiniuose [198]. Žinoma, kad miR-218 slopina TNF receptorių ir NF- κ B signalinio kelio aktyvumą ir neigiamai veikia osteoklastų diferenciaciją bei mažina kaulo rezorbiją [199]. miR-34a slopina osteoklastams specifiško augimo veiksnio Tgif2 (angl. *Transforming growth factor-beta-induced factor 2*) raišką ir mažina osteoklastų aktyvaciją per RANKL signalo slopinimą [200]. Mokslo tyrimais nustatytas miR-223 padidėjimas dantenu audiniuose sergant periodontitu [201]. miR-142-3p kiekio padidėjimas slopina monocitų diferenciaciją į makrofagus bei dendritinių ląstelių diferenciaciją į osteoklastus. Tokiu būdu miR-142-3p slopina 3 pagrindinių osteoklastų pirmtakų (monocitų, makrofagų ir

dendritinių ląstelių) vartimą osteoklastais [202]. miR-148a reikšmingai padidėja M-CSF ir RANKL indukuotos osteoklastogenezės metu. Pelėms su sumažėjusiu kaulų tankiu skiriant miR-148a antagonistą buvo slopinama kaulo rezorbcija ir atstatytas fiziologinis kaulų tankis [203].

2.3.4 Cirkuliuojančios miRNR

miRNR yra nedidelės molekulės, kurios išlieka išskirtinai stabilios daugelyje organizmo skysčių, įskaitant kraujo plazmą ir serumą, seiles, šlapimą ir kt.[204]. Iš ląstelių į organizmo skysčius patenkančios miRNR funkcionuoja sudarydamos įvairius kompleksus su baltymais, o tai lemia jų padidėjusį atsparumą nukleazių poveikiui (4 pav.). Užląstelinėje aplinkoje aptinkamos miRNR yra supakuojamos į membranines pūsleles, kurios skiriasi savo dydžiu ir susidarymo pobūdžiu. Mikropūslelės yra ~ 50 – 1000 nm dydžio lipidinės pūslelės, kurios susidaro iš ląstelių membranos miRNR atsiskyrimo metu. Egzosomos yra ~30 – 100 nm dydžio struktūros, kurios susidaro kelių pūslelių struktūroms (angl. *multivesicular bodies*) susijungus su plazmine ląstelės membrana [206]. miRNR gali būti supakuotos į apoptotinius kūnelius bei didelio tankio lipoproteinų (angl. *high density lipoprotein*) daleles arba miRNR gali jungtis su Ago šeimos baltymais.



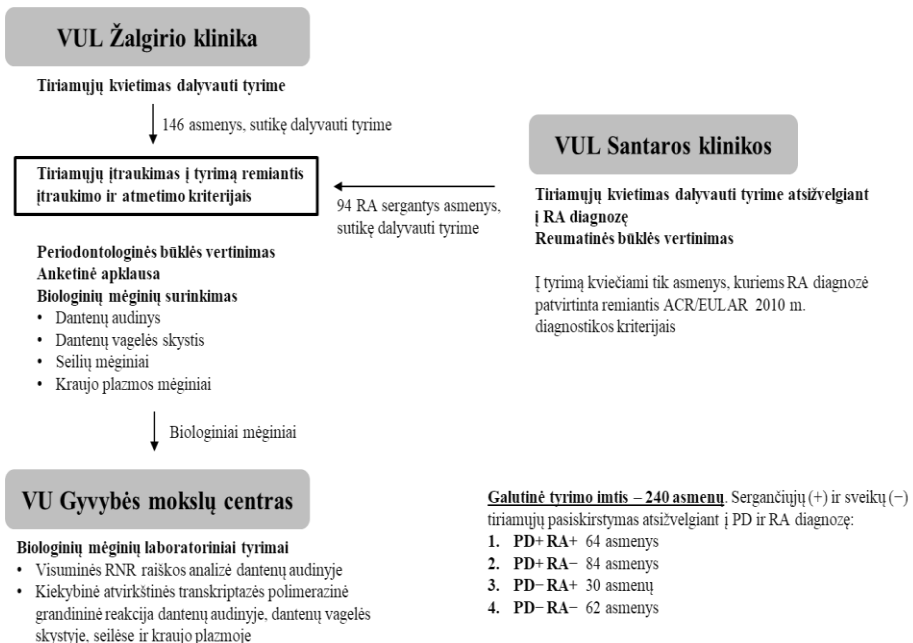
4 pav. Cirkuliuojančių miRNR transportavimas kraujotakos sistema (pritaikyta pagal Zampetaki ir kt., 2012) [205].

Jau minėtas miRNR potencialas reguliuoti įvairių organizmo procesų homeostazę bei itin palankios diagnostinės savybės (nedidelis molekulinis dydis, miRNR stabilumas užląstelinėje aplinkoje ir kt.) lėmė tai, jog miRNR yra vienos plačiausiai tiriamų diagnostinių medžiagų. Uždegimas periodonto audiniuose yra susijęs su uždegiminių mediatorių ir miRNR raiškos pokyčiais. Šie viduląsteliniai miRNR kiekio pokyčiai gali būti aptinkami ir užląstelinėje aplinkoje, pavyzdžiui dantenų vagelės skystyje, seilėse ar kraujo plazmoje [19]. Visgi iki šiol atlikti tyrimai pateikia prieštaringus rezultatus ir ypač trūksta tyrimų, kuriuose toje pačioje imtyje būtų įvertinti miRNR raiškos pokyčiai dantenose ir tų pačių miRNR kiekio pokyčiai užląstelinėje aplinkoje, įskaitant DVS, seiles ir kraujo plazmą.

3. TYRIMO METODIKA

3.1 Tyrimo dizainas ir tiriamųjų įtraukimas į tyrimą

Biomedicininio tyrimo metu taikytas vienmomentinis skerspjūvio metodas. Tiriamųjų įtraukimo į tyrimą laikotarpiu 2018-2020 m., patogiosios netikimybinės atrankos metodu asmenys buvo kviečiami dalyvauti tyrime, atsižvelgiant į įtraukimo ir atmetimo kriterijus (1 lentelė). Tiriamųjų įtraukimas vienu metu vyko dviejuose tyrimo centruose: Vilniaus universiteto ligoninės Žalgirio klinikoje (VUL ŽK) ir Vilniaus universiteto ligoninės Santaros klinikų (VUL SK) Reumatologijos centre. Siekiant suformuoti RA sergančių pacientų palyginamąją grupę, VUL SK į tyrimą buvo kviečiami tik asmenys su patvirtinta RA ligos diagnoze, remiantis Amerikos reumatologų kolegijos (angl. *American College of Rheumatology*, ACR) 2010 m. kriterijais [115]. Visi asmenys, sutikę dalyvauti tyrime buvo nukreipiami į VUL ŽK periodontologinės būklės įvertinimui ir galutiniam įtraukimui į tyrimą. Tiriamųjų atranka vyko, kol buvo suformuota iš anksto numatyta 240 asmenų imtis. Tiriamųjų atrankos bei bendra tyrimo schema pateikta 5 paveiksle.



5 pav. Tiriamųjų įtraukimo, ištyrimo, tyrimo etapų schema bei tyrimo imties duomenys.

Mokslinio tyrimo klinikinis etapas, kurį sudarė periodontologinės būklės vertinimas, anketinė apklausa (demografiniai duomenys, periodontologinei būklei įtakos galintys turėti veiksniai), biologinių mėginių surinkimas bei RA pacientų reumatologinės būklės vertinimas buvo atliekamas VUL ŽK bei VUL SK, bendradarbiaujant su gyd. reumatologais. Tyrimo laboratorinis etapas, kurį sudarė miRNR raiškos ir kiekio vertinimas biologiniuose mėginiuose, buvo atliekamas VU Gyvybės mokslų centre (VU GMC), bendradarbiaujant su mokslininkais atliekančiais genetinius tyrimus.

Tyrimui išduotas Vilniaus regioninio biomedicininų tyrimų etikos komiteto leidimas (2018-02-06, Nr. 158200-18-992-500).

1 lentelė. Pacientų įtraukimo į tyrimą ir atmetimo kriterijai.

| Įtraukimo kriterijai | Atmetimo kriterijai |
|---|---|
| <p><u>Bendrieji:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Vyresni nei 18 metų asmenys • Asmenys, sutinkantys dalyvauti tyrime ir pasirašę informuoto asmens sutikimo formą <p><u>PD sergančių asmenų grupės įtraukimo kriterijai:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • PD diagnozė patvirtinta remiantis 2018 metų klasifikaciniais kriterijais, paskelbtais pasaulinėse periodonto ir periimplantinių ligų ir būklių dirbtuvėse (angl. <i>World Workshop on the classification of Periodontal and Peri-implant Diseases and Conditions</i>) <p><u>RA sergančių asmenų grupės įtraukimo kriterijai:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • RA diagnozė patvirtinta remiantis ACR / EULAR 2010 m. diagnostikos kriterijais (arba 1987 m. ACR RA diagnostikos kriterijais, jei diagnozė nustatyta iki 2010 m.) | <ul style="list-style-type: none"> • Jaunesni nei 18 m. asmenys • Sergantieji autoimuninėmis nereumatinėmis ligomis • Nėštumas • Lėtinės dekompenсуotos patologijos (pvz., širdies nepakankamumas, kepenų cirozė ir kt.) • Diagnozuotas navikinis susirgimas burnos ir veido srityje • Pastarųjų 6 mėnesių laikotarpyje atlikta profesionali burnos higiena arba periodontologinis gydymas • Pilna adentija • Medikamentinis gydymas, kuris gali turėti reikšmingos įtakos klinikinei periodonto patologijos išraiškai: kalcio kanalo blokatoriai, antiepiletiniai preparatai, ciklosporinai. |

3.2 Tyrimo imties dydžio skaičiavimai

Imties dydis buvo apskaičiuotas nustatant minimalų reikalingą biologinių mėginių kiekį miRNR raiškos ir kiekio sąsajų tyrimui. Skaičiavimai atlikti siekiant išlaikyti minimalią 80 proc. kriterijaus galią bei 5 proc. α reikšmingumo lygį ($\alpha = 0,05$):

- miRNR raiškos dantenu audinyje sąsajoms su PD įvertinimui, siekiant atskleisti vidutinio dydžio skirtumus tarp grupių (efekto dydis, $d = 0,6$), buvo reikalinga bent 72 dantenu biopsijų imtis. Skaičiavimai atlikti atsižvelgiant į anksčiau atliktus panašaus pobūdžio tyrimus [207, 208].
- miRNR kiekio organizmo skysčiuose sąsajoms su PD įvertinimui, darant prielaidą, kad miRNR kiekio skirtumai tarp grupių bus vidutiniai ($d = 0,4$), buvo reikalinga bent 156 biologinių mėginių imtis. Siekiant atskleisti mažus skirtumus ar koreliacijas ($d = 0,2$), buvo reikalinga 193 mėginių imtis.

Atsižvelgiant į tai, kad tik kokybiškai ir kiekybiškai tinkami biologiniai mėginiai gali būti naudojami galutinei duomenų analizei ir, siekiant išlaikyti apskaičiuotus imties dydžio parametrus, į tyrimą buvo įtraukta ~20 proc. daugiau tiriamųjų, suformuojant galutinę 240 asmenų imtį.

3.3 Periodontologinės būklės vertinimas

Periodontologinė būklė buvo vertinama atliekant burnos apžiūrą bei pilną periodontologinį ir rentgenologinį ištyrimą. Bendro pobūdžio burnos gleivinės apžiūra buvo skirta įvertinti gleivinės pakitimus, kurie gali turėti neigiamos įtakos tyrimo rezultatams, įskaitant erozijas, opas, aftas, fistules, navikinius pakitimus, autoimuninės kilmės gleivinės pokyčius ir kt. Periodontologinis ištyrimas buvo atliekamas naudojant periodontologinį zondą su spalviniu žymėjimu kas 3 mm. Visi dantys, išskyrus protinius dantis, buvo zonduojami šešiuose taškuose. Periodontologinio ištyrimo metu buvo vertinama: ZG, PJN, BOP, apnašų indeksas, pūliavimas iš periodontologinių kišenių, dantų paslankumas, furkacijų defektai, netektų dantų ir implantų skaičius. Rentgenologinis ištyrimas buvo skirtas įvertinti rentgenologiškai stebimą KNL, furkacijų pažeidimus, endodontinės kilmės židinių buvimą. Periodontologinė diagnozė buvo nustatyta remiantis 2018 metais paskelbta pasaulinėse periodonto ir periimplantinių ligų ir būklių dirbtuvėse (angl. *World Workshop on the classification of Periodontal and Peri-implant Diseases and Conditions*) priimta klasifikacija [26]. Periodontito atvejis diagnozuojamas esant periodonto jungties netekimui interproksimaliniuose

paviršiuose prie dviejų ar daugiau ne greta esančių dantų arba nustačius bukalinių paviršių PJN ≥ 3 mm bei ZG > 3 mm prie dviejų ar daugiau dantų. Nustačius periodontito diagnozę buvo įvertinamas ligos sunkumas pagal stadijas, atsižvelgiant į klasifikacinius kriterijus: didžiausią periodonto jungties netekimo lygį, rentgenologinį kaulo netekimo lygį, dantų netekimą dėl periodontito (2 lentelė).

2 lentelė. Periodontito klasifikacija pagal stadijas.

| Klasifikaciniai kriterijai | Periodontito stadijos | | | |
|--------------------------------------|--|--|---|---|
| | I stadija | II stadija | III stadija | IV stadija |
| Didžiausias jungties netekimo lygis | 1-2 mm | 3-4 mm | ≥ 5 mm | ≥ 5 mm |
| Rentgenologinis kaulo netekimo lygis | Vainikinis šaknies trečdalis (<15 proc.) | Vainikinis šaknies trečdalis (15-33 proc.) | Siekia vidurinį ar viršūninį šaknies trečdalį | Siekia vidurinį ar viršūninį šaknies trečdalį |
| Dantų netekimas | Nėra dantų netekimo dėl periodontito | | ≤ 4 netekti dantys dėl periodontito | ≥ 5 netekti dantys dėl periodontito |

Periodontito diagnozės neatitinkantys pacientai buvo priskiriami periodontologiškai sveikų pacientų grupei. Šiai kategorijai priskirti pacientai su sveikomis dantenomis ir periodonto audiniais bei pacientai su gingivitu. Kliniškai sveikos dantenos ir periodonto audiniai bei gingivitas gali būti diagnozuojami ir stebint periodonto jungties bei kaulo netekimą (3 lentelė). Atraminių periodonto audinių netekimas gali būti nustatomas po sėkmingo periodontologinio gydymo arba nesergant periodontitu (pavyzdžiui, atsiradęs dėl dantų recesijų ar chirurginio klinikinio vainiko prailginimo procedūros). 3 lentelėje pateiktus klasifikacinius kriterijus atitikę pacientai tyrimo tikslais buvo priskirti periodontologiškai sveikų asmenų grupei.

3 lentelė. Klasifikaciniai kriterijai sveikų dantenių ir periodonto audinių bei gingivito.

| Klasifikaciniai kriterijai | Nėra periodonto jungties netekimo | | Periodonto jungties netekimas po sėkmingo periodontito gydymo | | Periodonto jungties netekimas nesusijęs su periodontitu | |
|---|---|-------------|---|--------------|---|-------------|
| | Sveikos dantenos ir periodonto audiniai | Gingivitas | Sveikos dantenos ir periodonto audiniai | Gingivitas | Sveikos dantenos ir periodonto audiniai | Gingivitas |
| Periodonto jungties netekimas | Ne | Ne | Taip | Taip | Taip | Taip |
| Zondavimo gylis | ≤ 3 mm | ≤ 3 mm | ≤ 4 mm* | ≤ 4 mm* | ≤ 3 mm | ≤ 3 mm |
| Kraujavimo po zondavimo indeksas | < 10 % | ≥ 10 % | < 10 % | ≥ 10 % | < 10 % | ≥ 10 % |
| Rentgenologiškai stebimas kaulo netekimas | Ne | Ne | Taip | Taip | Galimas | Galimas |

* Nei viena po zondavimo kraujuojanti kišenė nėra gilesnė nei 4 mm.

Periodontologinei būklei įtakos galintys turėti veiksniai bei demografiniai duomenys buvo vertinami anketos pagalba. Buvo vertinama: dantų valymo dažnis, tarpdančių šepetėlio ar tarpdančių siūlo naudojimas, apsilankymų pas odontologą dažnis, taikomas medikamentinis gydymas, gretutiniai susirgimai, alkoholio vartojimas, rūkymo dažnis, ūgis, svoris.

3.4 Reumatologinės būklės įvertinimas

RA sergantiems asmenims, kuriems diagnozė patvirtinta remiantis ACR 2010 m. kriterijais [115] buvo atliktas išsamus reumatologinės būklės vertinimas. Vertinti klinikiniai reumatologinės būklės duomenys: DAS28, VAS, ligos pradžia, diagnozės nustatymo data, skausmingi / sutinę / deformuoti sąnariai, šiuo metu taikomas RA gydymas, gydymo trukmė, prieš tai taikytas RA gydymas, gretutinės ligos [118, 119].

Tiriamiesiems buvo atlikta anketinė apklausa sudaryta iš klausimynų: reumatoidinio artrito ligos poveikio klausimynas (angl. *Rheumatoid arthritis impact of disease*, RAID) ir sveikatos vertinimo klausimynas (angl. *health assessment questionnaire*, HAQ) [209, 210].

3.5 Biologinių mėginių surinkimas

Iš tiriamųjų, sutikusių dalyvauti tyrime buvo renkami biologiniai mėginiai: dantenų audinys, DVS, seilės, kraujo plazma. Surinkti biologiniai mėginiai buvo apdorojami ir laikomi – 20 °C temperatūroje iki transportavimo į VU GMC Žmogaus genomo tyrimų laboratoriją miRNR raiškos ir kiekio nustatymui.

3.5.1 Dantenų audinio surinkimas

PD sergantiems pacientams dantenų audiniai buvo renkami konservatyvaus periodontologinio gydymo metu. Atlikus pasirinktos srities nuskausminimą vietiniu anestetiku, ties giliausia periodontologine kišene buvo atliekamas podanteninių konkrementų šalinimas rankiniais ir ultragarsiniais instrumentais. Procedūros metu kiurete surinkti dantenų audiniai (apie 2 mm²) buvo patalpinami į sterilų 2,5 ml mėgintuvėlį su „RNAlater“ (*Thermo Fisher Scientific, TFS*) tirpalu, kuris stabilizuoja audinio RNR apsaugodamas nuo endogeninių RNR skaidančių fermentų veiklos.

Periodontologiškai sveikiems tyrimo dalyviams periodonto audiniai buvo renkami esant indikacijoms atlikti chirurgines intervencijas – chirurginį

klinikinio vainiko prailginimą, mukogingivalinę plastiką, gingivektomiją. Nustačius, kad pasirinktos srities dantenu audiniai neturi klinikinių uždegimo požymių (edemos, eritemos, kraujavimo po zondavimo), naudojant vietinį anestetiką buvo paimama apie 2 mm² dantenu audinio ir patalpinama į sterilų 2,5 ml mėgintuvėlį su „RNAlater“ (TFS) stabilizuojančiu tirpalu.

3.5.2 Dantenu vagelės skysčio surinkimas

Periodontologiškai sveikiems tiriamiesiems dantenu vagelės skystis buvo renkamas ties centrinių kandžių gomuriniiais paviršiais, o PD sergantiems pacientams dantenu vagelės skystis buvo renkamas ties giliausiomis periodontologinėmis kišenėmis. Pasirinktoje vietoje, ant dantų esantis apnašas ir seilės buvo nuvalyti naudojant vatą bei sritis buvo nusauginama oro srove ir izoliuojama vatos voleliais. Į pasirinktų dantų dantenu vageles buvo įvedami penki sterilūs popieriniai sauskaiščiai (Nr. 30, *Orbis*) ir laikomi 30 sekundžių. Krauju užteršti sauskaiščiai buvo eliminuojami. Visi vienam pacientui naudoti sauskaiščiai buvo patalpinti į sterilų mėgintuvėlį su „RNAlater“ (TFS) stabilizuojančiu tirpalu.

3.5.3 Seilių surinkimas

Tiriamieji buvo informuoti, kad 2 valandas iki numatyto tyrimo negalima valgyti, gerti, rūkyti ir valyti dantų. Tiriamieji išspjovė burnoje esančias seiles bei 1 minutę skalavo burną su distiliuotu vandeniu. Praėjus 5 min po skalavimo vandeniu, tiriamieji naujai susidariusias seiles išspjovė į sterilų indą. Surinkus 4-5 ml seilių, jos buvo centrifuguojamos 15 min 2600 × g. Išcentrifugavus, naudojant automatinę vienkartinę pipetę, 1 ml seilių supernatanto buvo atskiriama nuo nuosėdų. Seilių supernatantas buvo patalpinamas į sterilų 2 ml mėgintuvėlį, į kurį buvo įdedama RNazės slopiklių „SUPERase-In“ (*Ambion Inc*).

3.5.4 Kraujo plazmos surinkimas

Laboratorinės medicinos specialistai atliko kraujo plazmos surinkimą, kuris buvo atliekamas standartinė adata iš periferinės venos renkant kraują į 10 ml talpos mėgintuvėlį su EDTA antikoagulantu. Iš karto po kraujo paėmimo kraujas buvo centrifuguojamas 15 min 2600 × g kambario temperatūroje. Išcentrifugavus, naudojant automatinę vienkartinę pipetę, kraujo plazma buvo atskiriama nuo eritrocitų bei leukocitų masės ir patalpinama į sterilius 2 ml mėgintuvėlius.

3.6 Biologinių mėginių genetiniai tyrimai

Biologinių mėginių genetiniai tyrimai buvo atliekami VU GMC Žmogaus genomo tyrimų laboratorijoje. Dalis surinktų biologinių mėginių buvo panaudota metodo optimizavimui ir pavadinta žvalgomoju tyrimu. Žvalgomojo tyrimo imtis buvo apskaičiuota remiantis anksčiau atliktais panašios tematikos tyrimais [211, 212], siekiant išlaikyti minimalią 80 proc. kriterijaus galią bei 5 proc. α reikšmingumo lygį ($\alpha = 0,05$) numatytam efekto dydžiui ($d = 0,8$). Apskaičiavus, jog reikalinga bent 42 biologinių mėginių imtis į žvalgomąjį tyrimą, buvo įtrauktas 61 tiriamasis.

Po metodologinių korekcijų (žr. 2.6.1.), atliktas tyrimas su maksimalia mėginių imtimi ir pavadintas pagrindiniu tyrimu.

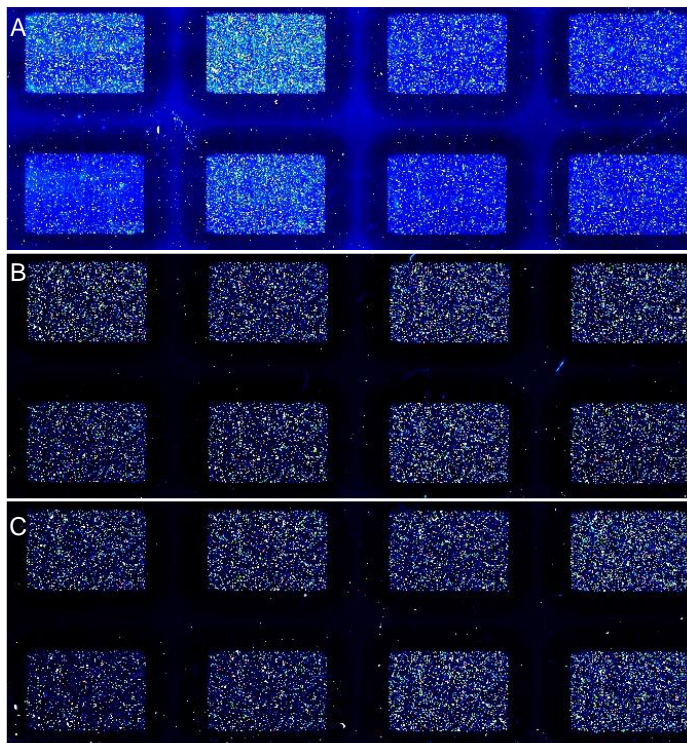
3.6.1 Visuminės RNR skyrimas

Užšaldyti dantenų audiniai buvo mechaniškai homogenizuojami iki smulkių miltelių naudojant grūstuvėlę ir piestelę. Iš susmulkinto dantenų audinio buvo skiriama visuminė RNR naudojant *TRIzol™* (*Invitrogen*, *TFS*, *JAV*) reagentą pagal gamintojo rekomendacijas. Seilių, DVS ir kraujo plazmos mėginių RNR skyrimui buvo naudojamas *miRNeasy Mini Kit* (*Qiagen*) rinkinys, remiantis gamintojo protokolu.

Išskirta RNR koncentracija ir kokybiniai parametrai buvo tiriami *NanoDrop 2000* spektrofotometru (*Thermo Scientific*) ir *Qubit 4* (*Invitrogen*, *TFS*) fluorometru. *Qubit 4* prietaisu buvo tikrinama išskirtos RNR koncentracija (*Qubit RNA High Sensitivity Assay Kit*) ir RNR integralumas (*RNA Integrity and Quality assay*). Tolimesniuose tyrimuose buvo naudojama tik pakankamos koncentracijos ir geros kokybės RNR.

3.6.2 Visuminės RNR raiškos analizė

Visuminės miRNR raiškos tyrimui buvo atrinkti gerai charakterizuotų tiriamųjų dantenų mėginiai – periodontologiškai sveiki asmenys turėjo kliniškai sveikas dantenas be ankstesnio periodonto audinių netekimo, o periodontitu sergantys pacientai sirgo sunkiu (IV stadijos) periodontitu. Žvalgomojo tyrimo metu visuminės miRNR raiškos vertinimo metu buvo pastebėtas aukštas foninis fluorescencijos lygis, kurį galimai lėmė didelis kiekis neprisijungusio dažo. Papildomai atlikus neprisijungusio dažo valymą kolonėlėmis gautas gardelių fluorescencijos lygis buvo daug mažesnis (6 pav.). Atsižvelgiant į tai, pagrindinio tyrimo metu nuspręsta mikrogardelių analizę atlikti su neprisijungusio dažo valymo etapu.



6 pav. Mikrogardelių foninis fluorescencijos lygis be neprisijungusio dažo valymo (A) ir su neprisijungusio dažo valymu kolonėlėmis (B, C).

miRNR raiškos analizė buvo atlikta naudojant 100 ng visuminės RNR. Tiriamoji medžiaga buvo maišoma su sintetinė kontrolinė miRNR (*Spike-In solution, Agilent Technologies*), defosforilinama, denatūruojama ir žymima 3-pCp cianinu, laikantis *miRNA Microarray System with miRNA Complete Labeling and Hyb Kit (AT)* protokolo. Žymėti mėginiai išdžiovinti koncentracijoje, resuspenduoti ir hibridizuoti ant *Human microRNA Microarray 8 x 60K* formato mikrogardelių (*Agilent Technologies*). Hibridizacija vykdyta 20 val. 55 °C temperatūroje hibridizavimo krosnyje. Mikrogardelės plautos genų raiškos gardelių plovimo buferiu rinkiniu (*Agilent Technologies*) ir nedelsiant skenuotos *Agilent SureScan* skeneriu. Buvo naudojama specializuota programinė įranga: skenavimui – *Agilent Microarray Scan Control*, žalių miRNR raiškos duomenų išgavimui – *Feature Extraction software v10.7*, o miRNR raiškos statistinei analizei – *GeneSpring GX v.14.9*. Statistiniam palyginimui naudotas nepriklausomų imčių *t*-kriterijaus testas, skirtumai laikyti statistiškai reikšmingais, kai P reikšmė $\leq 0,050$, o raiškos kiekis kartais siekė bent 1,5 karto.

3.6.3 Komplementarios DNR sintezė

Komplementari DNR (kDNR) reikalinga miRNR analizei dantenu audiniuose ir organizmo skysčiuose buvo sintetinama atvirkštinės transkripcijos (AT) reakcijos metodu.

miRNR raiškos validavimui dantenu audinio mėginiuose reikalinga kDNR buvo sintetinama AT reakcijos metu, naudojant *TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit* rinkinį ir specifinį *RT Primer Pool* pradmenų mišinį (*Applied Biosystems, ABI, TFS*), remiantis gamintojo protokolu. Į paruoštą, sumaišytą ir išcentrifuguotą reakcijos mišinį, kurį sudarė 10 × AT reakcijos buferis, deoksinukleotidų mišinys (100 nM), minėtų pradmenų mišinys, atvirkštinė transkriptazė *MultiScribe™* (50 U/μL), RNazių inhibitorius (20 U/μL) ir vanduo be nukleazių, buvo įnešta 350 ng visuminės RNR ir 5 min inkubuota ant ledo (4 lentelė). Atvirkštinė transkripcijos reakcija buvo vykdoma gamintojo rekomenduojamu režimu: 30 min 16 °C, 30 min 42 °C, 5 min 85 °C.

4 Lentelė. Atvirkštinės transkriptazės reakcijos mišinio komponentai kiekvienai reakcijai

| Komponentas | Tūris (μL) |
|---|--------------|
| AT reakcijos pradmenų mišinys | 6,00 |
| 10 × AT reakcijos buferis | 1,50 |
| Deoksinukleotidų mišinys (100 nm) | 0,3 |
| Atvirkštinė transkriptazė <i>MultiScribe™</i> (50 U/μl) | 3,00 |
| RNazių inhibitorius (20 U/μl) | 0,19 |
| Vanduo be nukleazių | 1,01 |
| Bendras tūris | 12,00 |

miRNR tyrimui seilių, DVS ir kraujo plazmos mėginiuose reikalingos kDNR sintetinimo procedūrai taip pat naudotas *TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit* rinkinys, bet vietoje pradmenų mišinio buvo naudojami atrinktų miRNR (miR-140-3p, -145-5p, -146a-5p, -195-5p) smeigtuko formos pradmenis *TaqMan® MicroRNA Assay* (gamintojo kodai: 002234, 002278, 000468 ir 000494, atitinkamai), remiantis gamintojo protokolu (viskas iš *ABI, TFS*). Remiantis gamintojo rekomendacijomis, buvo ruošiamas pradinis reakcijos mišinys, kurį sudarė 10 × AT reakcijos buferis, deoksinukleotidų mišinys (100 nm), atvirkštinė transkriptazė *MultiScribe™* (50 U/μl), RNazių

inhibitorius (20 U/μl) ir vanduo be nukleazių (5 lentelė). Į paruoštą ir išcentrifuguotą reakcijos mišinį buvo įnešama 1,5 μl kiekvienai atrinktai miRNR specifinių AT reakcijos pradmenų ir 2,5 μl visuminės RNR. Mėgintuvėlis su galutiniu reakcijos mišiniu buvo išcentrifuguojamas ir inkubuojamas termocikleryje gamintojo rekomenduojamomis temperatūrinėmis sąlygomis. Susintetinta kDNR iš karto buvo naudojama tolesniuose tyrimo etapuose arba iki panaudojimo saugoma – 20 °C temperatūroje.

5 Lentelė. AT reakcijos mišinio komponentai kiekvienai reakcijai

| Komponentas | Tūris (μl) |
|---|-------------|
| 10 × AT reakcijos buferis | 0,75 |
| Deoksinukleotidų mišinys (100 nm) | 0,07 |
| Atvirkštinė transkriptazė <i>MultiScribe</i> TM (50 U/μl) | 0,50 |
| RNazių inhibitorius (20 U/μl) | 0,10 |
| Vanduo be nukleazių | 2,08 |
| Bendras tūris | 3,50 |

3.6.4 Kiekybinė atvirkštinės transkriptazės polimerazinė grandininė reakcija

Tyrimo kiekybinė atvirkštinės transkriptazės polimerazinė grandininė reakcija (AT-kPGR) taikyta miRNR raiškos pokyčių validavimui dantenų audiniuose ir miRNR kiekio nustatymui seilėse, DVS ir kraujo plazmoje.

miRNR raiškos validavimas AT-kPGR metodu dantenų audiniuose buvo atliekamas, naudojant pagal vartotojo užsakymą pagamintas mažo tankio *TaqMan* gardeles (angl. *Customized TaqMan® Low Density Arrays*, (ABI, TFS)). Gardelėmis vienu metu 8 mėginiuose galima vertinti 16 miRNR raišką, atliekant po tris pakartojimus. Kiekvienam mėginiui buvo ruošiamas atskiras reakcijos mišinys, sudarytas iš 2 x *TaqMan Universal Master Mix II, No AmpErase UNG*, vandens be nukleazių ir kDNR. Į paruoštos gardelės užpildymo rezervuarą buvo suleista 100 μl reakcijos mišinio ir centrifuguota 2 min 2000 rpm greičiu. Gardelės užsandarintos ir patalpintos į *ViiA7*TM *Real-Time PCR* sistemą ir naudojant *ViiA7*TM *7 Software v1.2* programinę įrangą, numatytomis sąlygomis paleidžiama reakcijos vykdymo programa.

miRNR kiekio nustatymui seilių, DVS ir kraujo plazmos mėginiuose AT-kPGR metodu buvo naudojami pradmenų ir zondų mišiniai *TaqMan*TM *MicroRNA Assays*, remiantis gamintojo protokolu. Kiekviena atrinkta miRNR buvo tiriamą atliekant tris pakartojimus. Į 10 μl tūryje vykdomos reakcijos

sudėtį įeina $2 \times \text{TaqMan}^{\text{TM}} \text{ Universal Master Mix II, No AmpErase UNG, } 20 \times \text{TaqMan}^{\text{TM}} \text{ MicroRNA Assay}$ (abu iš *ABI, TFS*), 1,33 μl kDNR produkto ir vanduo be RNazių. Reakcija vykdoma *ViiA7TM Real-Time* sistema (*ABI, TFS*), naudojant *ViiA7 Software v1.2* programinę įrangą gamintojo numatytomis sąlygomis.

3.7 Statistinė analizė

Kiekybiniai kintamieji buvo aprašomi nurodant vidurkį \pm standartinį nuokrypį (SD), kokybiniai kintamieji – dažnių lentelės ir (arba) procentinę išraišką. Kintamųjų normalusis pasiskirstymas buvo tikrinamas taikant Shapiro-Wilk kriterijų. Dviejų nepriklausomų parametrinių kiekybinių kintamųjų palyginimui taikytas t-kriterijaus testas, tuo tarpu, neparametriniai kiekybiniai kintamieji lyginti *Mann-Whitney U* kriterijumi. Kokybiniai duomenys lyginti taikant *Chi* kvadrato kriterijų arba *Fisher* tikslųjį testą. Koreliacijoms tarp kintamųjų apskaičiuoti taikytas Spirmeno koreliacijos koeficientas.

Visuminės miRNR raiškos statistinė analizė atlikta naudojant *GeneSpring GX v14.9 (Aligent Technologies)* programinę įrangą. Raiškos skirtumai palyginti taikant nepriklausomų imčių t-kriterijaus testą. Skirtumai laikyti statistiškai reikšmingais, kai P reikšmė buvo $< 0,05$, o raiškos skirtumas (angl. *fold change, FC*) kartais siekė bent 1,5 karto.

miRNR kiekio įvertinimu organizmo skysčiuose naudota *GenEx software, v7.0 (MultiD Analyses AB, Švedija)* programinė įranga. Gauti duomenys buvo normalizuoti pagal sintetinę kontrolę – cel-miR-39. Gauti duomenys buvo normalizuoti ir konvertuoti į logaritminę skalę (\log_2). Analizė tarp tiriamųjų grupių atlikta naudojant t-kriterijaus testą ir Spirmeno koreliacijų analizę.

miRNR diagnostinis potencialas įvertintas atlikus ROC (angl. *Receiver Operating Characteristic*) kreivių analizę ir apskaičiuojant jautrumą, specifiškumą bei ploto po kreive įvertį AUC (angl. *area under the ROC curve*). Atlikus regresinę analizę apskaičiuotas miRNR derinių diagnostinis potencialas.

Duomenų analizei papildomai naudota *GPower 3.1.9 (University of Düsseldorf, Vokietija)*, *GraphPad Prism v8 (GraphPad Software, Inc., San Diego, JAV)* *SPSS 20.0 (IBM, Armonkas, Niujorkas, JAV)* programinės įrangos. Visais atvejais skirtumai laikyti statistiškai reikšmingais, kai P-reikšmė buvo $\leq 0,050$.

3.8 Doktoranto ir kitų tyrėjų indėlis

Doktorantas Adomas Rovas parengė biomedicininio tyrimo protokolą, dalyvavo įtraukiant tiriamuosius į tyrimą, atliko tiriamųjų klinikinį periodontologinės būklės ištyrimą, anketinę apklausą. Adomas Rovas atliko tiriamųjų biologinės medžiagos surinkimą ir biologinės medžiagos paruošimą genetiniams tyrimams. Doktorantas atliko dalį (~ 30 proc.) genetinių tyrimų. Doktorantas atliko genetinių tyrimų rezultatų analizę, naudojant specializuotą programinę įrangą. Doktorantas buvo pagrindinis autorius rengiant tris mokslinius straipsnius paremtus gautų duomenų analize. Pristatė gautus duomenis mokslinėse konferencijose.

Kitą genetinių tyrimų dalį atliko Dr. Kristina Šnipaitienė ir Benita Buragaitė-Staponkienė. Tyrėjos išmokino doktorantą kaip atlikti genetinius tyrimus bei interpretuoti gautus rezultatus naudojant specializuotą programinę įrangą. Dr. Kristina Šnipaitienė ir Benita Buragaitė-Staponkienė taip pat prisidėjo prie rezultatų analizės ir aprašymo mokslinėse publikacijose.

Gydytojos reumatologės Eglė Pucevičienė ir prof. dr. Irena Butrimienė dalyvavo įtraukiant tiriamuosius į tyrimą bei dokumentavo tiriamųjų reumatologinės būklės duomenis bei prisidėjo prie reumatologinių parametru analizės ir aprašymo mokslinėse publikacijose.

Prof. dr. Sonata Jarmalaitė buvo pagrindinė biomedicininio tyrimo konsultantė. Profesorė buvo atsakinga už genetinių tyrimų dalį, taip pat vertino parengtas publikacijas, pateikė vertingas pastabas dėl publikacijų turinio ir pateikimo spaudai.

Prof. dr. Alina Pūrienė buvo darbo vadovė atsakinga už biomedicininio tyrimo dizainą bei eigą. Profesorė pateikė vertingas pastabas, susijusias su tiriamųjų atranka, periodontologinės būklės vertinimu, duomenų analize, taip pat kritiškai vertino mokslines publikacijas ir pateikė vertingas pastabas dėl publikacijų turinio ir pateikimo spaudai.

4. REZULTATAI

4.1 Demografiniai ir klinikiniai tiriamųjų duomenys

Iš viso į biomedicininį tyrimą buvo įtraukta 240 asmenų (5 pav.). Remiantis periodontologinio ištyrimo duomenimis, asmenys atitinkantys PD atvejo apibrėžimą buvo priskirti periodontitu sergančių tiriamųjų grupei (PD+, N = 148). Iš jų beveik pusė (N = 68, 45,95 proc.) sirgo sunkia ligos forma (III-IV stadijos), 46 asmenys (31,08 proc.) sirgo vidutinio sunkumo PD (II stadijos) ir 34 (22,97 proc.) sirgo lengva ligos forma (I stadijos). Vidutinis PD pacientų amžius įtraukimo į tyrimą metu buvo $53,92 \pm 10,44$ metai. Įtraukimo laikotarpiu tyrime sutikę dalyvauti ir periodontologiniam ištyrimui atvykę asmenys, kurie neatitiko PD atvejo kriterijų, buvo priskirti periodontologiškai sveikų tiriamųjų grupei (PD-, N = 92). Palyginamosios grupės amžiaus vidurkis įtraukimo į tyrimą metu buvo $47,53 \pm 14,01$. Bendrojoje populiacijoje stebimos PD paplitimo sąsajos su vyresniu amžiumi bei vyriška lytimi atsiskleidė ir tyrimo imtyje nustačius statistiškai reikšmingai didesnę amžių bei didesnę procentą vyriškos lyties atstovų tarp PD sergančiųjų. Išsami aprašomųjų ir klinikinų-patologinių duomenų analizė pateikta 6 lentelėje.

6 lentelė. Tiriamųjų demografinės ir klinikinės-patologinės charakteristikos.

| Kintamasis | PD+ (N = 148) | PD- (N = 92) | P reikšmė |
|---|----------------------|---------------------|-------------------|
| Amžius (metai) | 53,92 ± 10,44 | 47,53 ± 14,01 | < 0,001 |
| Lytis (moterys / vyrai) | 118/30 | 83/9 | 0,047 |
| <u>Periodontologinės būklės rodikliai:</u> | | | |
| PJN (mm) | 2,15 ± 0,94 | 1,09 ± 0,7 | < 0,001 |
| ZG (mm) | 2,68 ± 0,55 | 1,97 ± 0,29 | |
| BOP (%) | 44,03 ± 16,91 | 13,23 ± 5,58 | |
| KNL (%) | 26,05 ± 8,36 | 14,91 ± 4,71 | |
| Netekti dantys (N) | 4,94 ± 4,54 | 2,47 ± 2,97 | |
| <u>Periodontito stadijos (N, %):</u> | | | |
| I stadija | 34 (22,97) | | |
| II stadija | 46 (31,08) | - | - |
| III stadija | 23 (15,54) | | |
| IV stadija | 45 (30,41) | | |
| III ar IV stadija | 68 (45,95) | | |
| <u>Apsilankymų pas odontologą dažnis (N):</u> | | | |
| Kartą per metus ar rečiau | 101 | 59 | 0,574 |
| Du ar daugiau kartų per metus | 47 | 33 | |

6 lentelė. Tiriamųjų demografinės ir klinikinės-patologinės charakteristikos (tęsinys).

| Kintamasis | PD+ (N = 148) | PD- (N = 92) | P reikšmė |
|----------------------------------|----------------------|---------------------|------------------|
| <u>Dantų valymo dažnis (N):</u> | | | |
| Kartą per dieną arba rečiau | 39 | 18 | 0,276 |
| Du ar daugiau kartų per dieną | 109 | 74 | |
| <u>Tarpdančių valymas (N):</u> | | | |
| Taip | 103 | 81 | 0,001 |
| Ne | 45 | 11 | |
| <u>Rūkymas (N):</u> | | | |
| Taip | 28 | 5 | 0,005 |
| Ne | 79 | 65 | |
| Anksčiau rūkė | 41 | 22 | |
| <u>Alkoholio vartojimas (N):</u> | | | |
| Kartą per savaitę | 23 | 14 | 0,920 |
| Kartą per mėnesį | 82 | 49 | |
| Niekada | 43 | 29 | |
| <u>Išsilavinimas (N):</u> | | | |
| Vidurinis | 28 | 7 | 0,046 |
| Aukštasis neuniversitetinis | 34 | 21 | |
| Aukštasis universitetinis | 86 | 64 | |
| KMI (kg/m ²) | 25,46 ± 4,08 | 24,33 ± 4,13 | 0,039 |

Duomenys pateikti nurodant vidurkį ± standartinį nuokrypį arba N, proc. Skirtumai tarp periodontitu sergančių (PD+) ir periodontologiškai sveikų tiriamųjų (PD-) pateikti nurodant P reikšmę, statistiškai reikšmingi skirtumai paryškinti. Santrumpos: BOP – kraujavimo po zondavimo indeksas; KMI – kūno masės indeksas, KNL – rentgenologiškai stebimas kaulo netekimo lygis; N – tiriamųjų skaičius; PD – periodontitas; PJN – periodonto jungties netekimo lygis; ZG – zondavimo gylis.

4.2 Periodontito ir reumatoidinio atrito klinikinės eigos sąsajos

Biomedicininio tyrimo metu buvo siekiama įvertinti PD ir RA klinikinės eigos sąsajas. Šiam tikslui įgyvendinti į tyrimą buvo įtraukti 94 asmenys, kuriems VUL SK Reumatologijos centre buvo diagnozuotas RA. Įvertinus RA tiriamųjų periodontologinę būklę, nustatyta, kad 64 (68,09 proc.) sirgo PD ir 30 (31,91 proc.) buvo periodontologiškai sveiki. RA sergančių tiriamųjų demografinės ir klinikinės-patologinės charakteristikos pateiktos 7 lentelėje.

7 lentelė. RA sergančių tiriamųjų (N = 94) demografinės ir klinikinės-patologinės charakteristikos.

| Kintamasis | Vertė |
|---|---------------|
| Amžius (metai) | 54,15 ± 11,04 |
| Lytis (moterys / vyrai) | 85/9 |
| <u>RA ligos aktyvumas remiantis DAS28 reikšme (N, %):</u> | |
| Didelis | 25 (26,60) |
| Vidutinis | 48 (51,06) |
| Nedidelis | 7 (7,45) |
| Remisija | 14 (14,89) |
| DAS28 | 4,19 ± 1,42 |
| RAID | 4,45 ± 2,27 |
| HAQ | 0,86 ± 0,62 |
| RA trukmė (metais) | 12,83 ± 10,49 |
| <u>Vaistų vartojimas (N):</u> | |
| bDMARDs | 46 |
| sDMARDs | 63 |
| GK | 60 |
| bDMARDs derinant su sDMARDs | 37 |
| bDMARDs derinant su GK | 29 |

Duomenys pateikti nurodant vidurkį ± standartinį nuokrypį arba N, proc. Santrumpos: bDMARDs – biologiniai ligos eigą modifikuojantys antireumatiniai vaistai; DAS28 – ligos aktyvumo indeksas; GK – gliukokortikosteroidai; HAQ – sveikatos vertinimo klausimynas; N – tiriamųjų skaičius; PD – periodontitas; RA – reumatoidinis artritas; RAID – reumatoidinio artrito ligos poveikio klausimynas; sDMARDs – sintetiniai ligos eigą modifikuojantys antireumatiniai vaistai.

RA ligos bei RA gydymui skiriamų vaistų vartojimo sąsajos su PD klinicine eiga buvo vertintos PD sergančių asmenų imtyje, tiriamuosius skirstant pagal reumatinę būklę į PD ir RA sergančius asmenis (PD+RA+, N = 64, 43,24 proc.) bei PD sergančius reumatologiškai sveikus tiriamuosius (PD+RA-, N = 84, 56,76 proc.). Tiriamųjų amžius ir lytis tarp grupių statistiškai reikšmingai nesiskyrė. Išsami demografinių, antropometrinių duomenų analizė pateikta S1 priedų lentelėje. Nurodytoje tiriamųjų imtyje PD klinikinės eigos sunkumą vertinant pagal 2018 m. periodonto ir

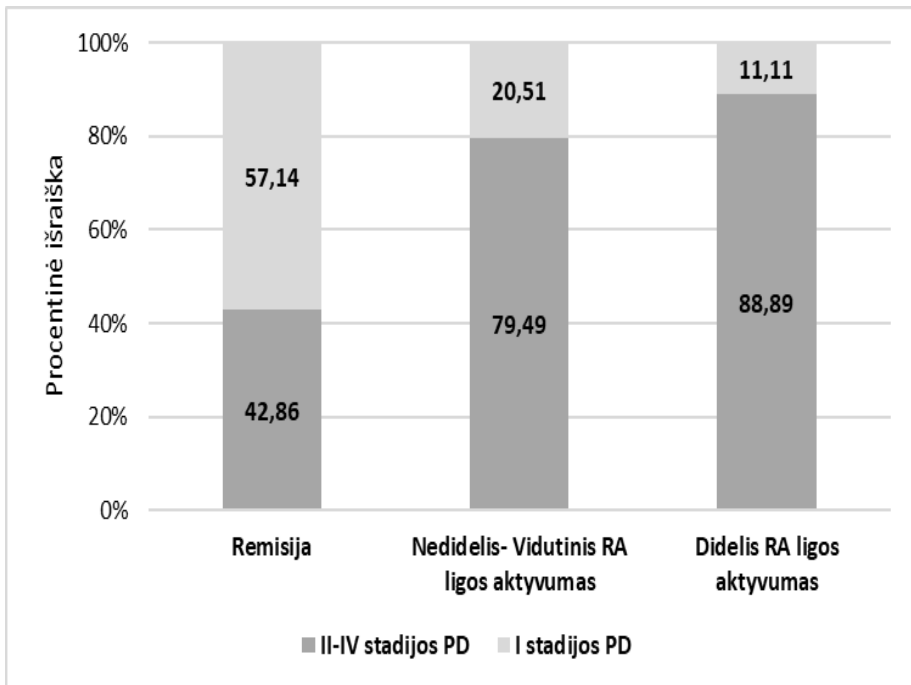
periimplantinių ligų ir būklių klasifikacijos kriterijus, nebuvo nustatyta reikšmingo PD sunkumo stadijų skirtumo tarp PD+RA+ ir PD+RA- grupių. Tuo tarpu, PD ligos sunkumą apibūdinant remiantis vidutinėmis periodontologinio ištyrimo metu vertinamų rodiklių reikšmėmis, buvo nustatyta, kad vidutinis ZG buvo reikšmingai didesnis tarp abiem ligomis sergančių pacientų (8 lentelė). Taip pat, PD sergantys RA pacientai buvo netekę daugiau dantų lyginant su reumatologiškai sveikais PD sergančiais asmenimis ($6,27 \pm 4,79$ lyginant su $3,93 \pm 4,08$, $P = 0,001$).

8 lentelė. Periodontologinės būklės palyginimas tarp periodontitu ir reumatoidiniu artritu sergančių tiriamųjų (PD+RA+) bei periodontitu sergančių reumatologiškai sveikų asmenų (PD+RA-).

| Kintamasis | PD+RA+(N = 64) | PD+RA-(N =84) | P reikšmė |
|--|-----------------------|----------------------|----------------------|
| <u>Periodontito stadijos (N.%):</u> | | | |
| I stadija | 14 (21,88 %) | 20 (23,81 %) | 0,765 |
| II stadija | 22 (34,38 %) | 24 (28,57 %) | |
| III stadija | 8 (12,50 %) | 15 (17,86 %) | |
| IV stadija | 20 (31,25 %) | 25 (29,76 %) | |
| III ar IV stadija | 28 (43,75 %) | 40 (47,62 %) | |
| <u>Periodontologinės būklės rodikliai:</u> | | | |
| PJN (mm) | $2,31 \pm 0,9$ | $2,02 \pm 0,95$ | 0,057 |
| ZG (mm) | $2,81 \pm 0,59$ | $2,58 \pm 0,49$ | 0,009 |
| BOP (%) | $44,14 \pm 16,68$ | $43,95 \pm 17,18$ | 0,281 |
| KNL (%) | $26,91 \pm 8,32$ | $25,42 \pm 8,34$ | 0,947 |
| Netekti dantys (N) | $6,27 \pm 4,79$ | $3,93 \pm 4,08$ | 0,001 |

Duomenys pateikti nurodant vidurkį \pm standartinę nuokrypį arba N, proc. Skirtumai pateikti nurodant P reikšmę, statistškai reikšmingi skirtumai paryškinti. Santrumpos: BOP – kraujavimo po zondavimo indeksas; KNL – rentgenologiškai stebimas kaulo netekimo lygis; N – tiriamųjų skaičius; PJN – periodonto jungties netekimo lygis; ZG – zondavimo gylis.

Tiriamųjų sergančių PD ir RA grupėje sunkios ar vidutinės eigos PD (II-IV stadija) buvo daugiau nei dvigubai dažnesnis tarp pacientų sergančių aktyvia RA liga lyginant su RA remisijoje esančiais tiriamaisiais (88,89 proc. lyginant su 42,86 proc., $P = 0,042$) (7 pav.).



7 pav. Reumatoidinio artrito (RA) ligos aktyvumo sąsajos su periodontito (PD) sunkumu. Nurodyta procentinė išraiška vidutiniu-sunkių PD (II-IV stadijos) sergančių pacientų, priklausomai nuo RA ligos aktyvumo kategorijos.

Taip pat, RA remisija buvo susijusi su mažesniu PJN lyginant su aktyvesne RA ligos forma ($1,67 \pm 0,78$ mm lyginant su $2,39 \pm 0,89$ mm, $P = 0,045$). RA pacientams, kurie savo būklę, apibrėžtą RAID, vertinusiems kaip sunkesnę, buvo būdingas didesnis vidutinis PJN ($2,43 \pm 0,9$ mm lyginant su $1,87 \pm 0,8$ mm, $P = 0,046$). Įvertinus RA gydymui skiriamų medikamentų (bDMARDs, sDMARDs, GK) sąsajas su PD eiga, nustatyta, kad biologinė terapija buvo susijusi su mažesnėmis vidutinėmis periodontologinių rodiklių reikšmėmis, tačiau tik BOP pokytis buvo statistiškai reikšmingas (9 lentelė).

9 lentelė. Periodontitu ir reumatoidiniu artritu sergančių pacientų periodontologinės būklės rodiklių palyginimas, priklausomai nuo biologinės terapijos skyrimo.

| Kintamasis | Pacientai gydomi bDMARDs (N = 26) | Pacientai negydomi bDMARDs (N = 38) | P reikšmė |
|--|--|--|------------------|
| <u>Periodontologinės būklės rodikliai:</u> | | | |
| PJN (mm) | 2,11 ± 0,80 | 2,45 ± 0,95 | 0,133 |
| ZG (mm) | 2,72 ± 0,43 | 2,88 ± 0,67 | 0,269 |
| BOP (%) | 38,46 ± 12,76 | 48,03 ± 18,05 | 0,016 |
| KNL (%) | 24,85 ± 7,05 | 28,33 ± 8,90 | 0,101 |
| Netekti dantys (N) | 5,50 ± 3,76 | 6,79 ± 5,37 | 0,294 |

Duomenys pateikti nurodant vidurkį ± standartinę nuokrypį. Skirtumai pateikti nurodant P reikšmę, statistiškai reikšmingi skirtumai paryškinti. Santrumpos: bDMARDs – biologiniai ligos eigą modifikuojantys antireumatiniai vaistai.

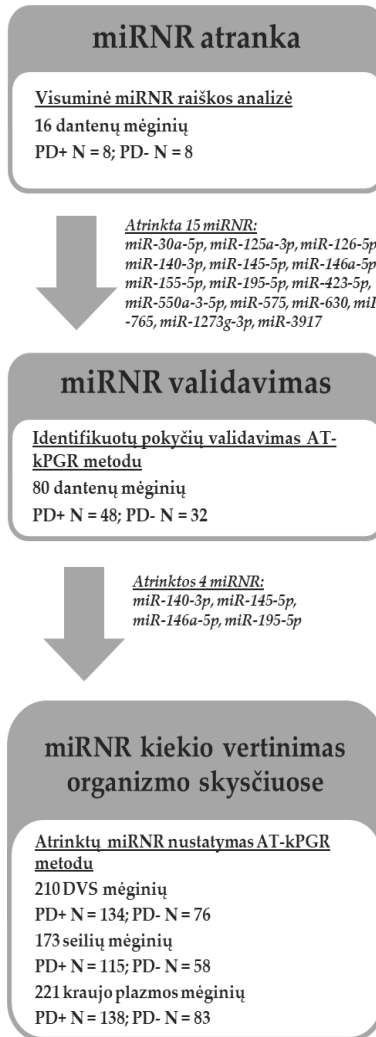
4.3 Žvalgomas miRNR sąsajų tyrimas

Žvalgomas miRNR sąsajų tyrimas atliktas mažesnėje (N = 61) biologinių mėginių imtyje, siekiant optimizuoti metodologiją ir tiksliau suplanuoti pagrindinio tyrimo eigą. Siekiant atrinkti PD specifines miRNR, kurias būtų galima nustatyti organizmo skysčiuose, pirmiausia atlikta visuminė miRNR analizė 4 sveikų ir 4 PD pažeistų dantų mėginiuose. Nustatytos 53 statistiškai reikšmingai pakitusios raiškos miRNR, iš kurių 30 (56,60 proc.) miRNR raiška buvo padidėjusi periodontito pažeistuose dantų audiniuose. Tarp padidėjusios raiškos miRNR išsiskyrė miR-199a-5p ir miR-3198, kurių raiška buvo atitinkamai padidėjusi 23,9 ir 31,9 karto. AT-kPGR metodu validavus reikšmingai tarp uždegiminių (N = 30) ir sveikų dantų audinių (N = 31) besiskiriančias ir su įvairiais periodontologinės būklės klinikiniais rodikliais koreliuojančias miRNR, buvo atrinktos 4 miRNR (miR-199a-5p, miR-483-5p, miR-3198, miR-4299), kurių kiekis buvo įvertintas DVS, seilėse ir kraujo plazmoje. Nustatyta, kad asmenų sergančių PD dantų vagelės skystyje miR-3198 kiekis buvo reikšmingai padidėjęs (FC = 1,7, P = 0,019) bei turėjo reikšmingą AUC vertę periodontito diagnostikai (AUC = 0,72, P = 0,008). DVS aptinkamų miR-3198 ir miR-4299 derinio AUC vertė

periodontito diagnostikai siekė 0,86 ($P < 0,001$). Vertinant tiriamųjų seilių mėginius nustatyta, kad miR-199a-5p kiekis buvo reikšmingai padidėjęs 11,3 karto ($P = 0,045$) sunkiu PD sergančių tiriamųjų seilėse, palyginus su periodontologiškai sveikų asmenų seilių mėginiais. Tuo tarpu, PD sergančių asmenų plazmoje nustatyta sumažėjusi miR-199a-5p koncentracija ($FC = -4,8$, $P = 0,008$) lyginant su periodontologiškai sveikų asmenų plazmos mėginiais. Kraujo plazmoje aptinkama miR-199a-5 turėjo reikšmingą AUC vertę periodontito diagnostikai ($AUC = 0,66$, $P = 0,032$).

4.4 Pagrindinis miRNR sąsajų tyrimas

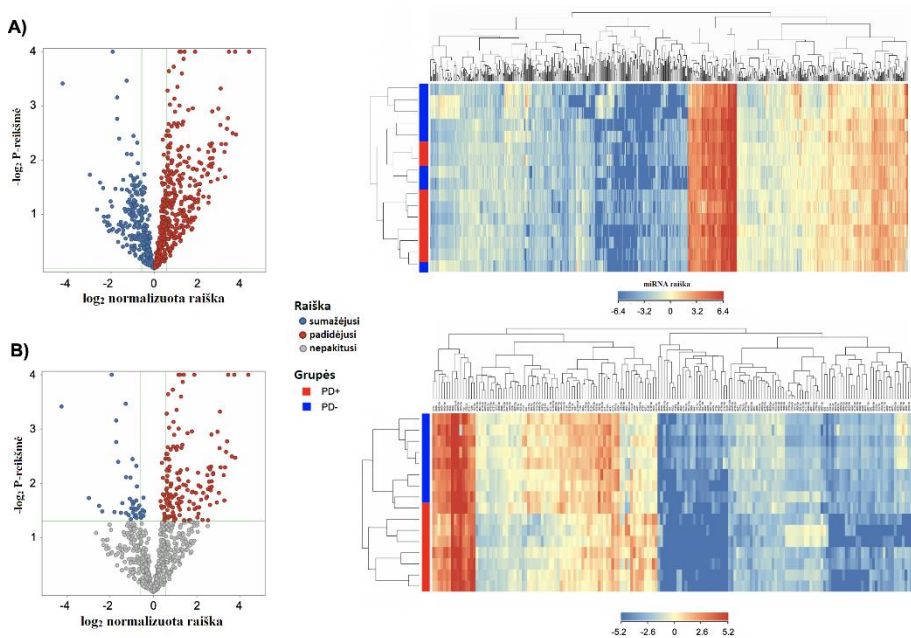
Pagrindinis miRNR sąsajų tyrimas atliktas taikant žvalgomoju tyrimu patikrintą ir optimizuotą veiksmų seką. Tiriamojoje populiacijoje su PD labiausiai susijusios miRNR buvo atrinktos atliekant visuminės raiškos tyrimą 16 dantenu mėginių ir validuojant atrinktus taikinius 80 dantenu mėginių imtyje. Atrinktų miR-140-3p, -145-5p, -146a-5p ir -195-5p kiekis buvo vertinamas kiekybiškai ir kokybiškai tinkamų organizmo skysčių imtyje: DVS ($N = 210$), seilėse ($N = 173$), kraujo plazmoje ($N = 221$). Bendra miRNR tyrimo schema pateikta 8 paveiksle.



8 pav. miRNR tyrimo schema.

4.4.1 Visuminė miRNR raiškos analizė dantenu audiniuose

Visuminė miRNR raiškos analizė atlikta tiriant 8 PD pažeistus bei 8 sveikus dantenu audinius. Abiejose grupėse 4 tiriamieji sirgo RA. Iš 2569 miRNR, kurių raiška gali būti vertinama pasirinktu tyrimo metodu, buvo analizuojamos tik tos miRNR, kurių raiška buvo nustatyta ≥ 25 proc. mėginių (N = 760 miRNR) (9A pav.). Gauti duomenys buvo vertinami lyginant PD sergančių ir periodontologiškai sveikų asmenų miRNR raiškos skirtumus visuose 16 dantenu biopsijų bei atskirai lyginant mėginius atsižvelgiant į PD ir RA diagnozę.



9 pav. miRNR raiškos profilis periodontitu (PD) sergančių ir nesergančių tiriamųjų dantenu audiniuose. **(A)** miRNR, kurių raiška vyko ≥ 25 proc. mėginių; **(B)** miRNR, kurių raiškos pokytis buvo statistiškai reikšmingas ($FC \geq 1,5$, $P \leq 0,050$).

miRNR raiškos palyginimas tarp PD+ ir PD- tiriamųjų grupių. Palyginus miRNR raišką PD pažeistuose ir sveikuose dantenu audiniuose (PD+, N=8 lyginant su PD-, N=8) nustatytos 177 miRNR, kurių raiška buvo statistiškai reikšmingai pakitusi bent 1,5 karto (9B pav.). Daugumos miRNR (N = 140, 79,10 proc.) raiška buvo padidėjusi periodontito pažeistuose audiniuose, įskaitant 8 miRNR (miR-3609, -4539, -378c, -4441, -30c-2-3p, -30a-3p, -5008-5p, -4697-5p), kurių raiška buvo padidėjusi daugiau nei 10 kartų. Iš 37 miRNR, kurių raiška buvo sumažėjusi PD pažeistuose audiniuose, išsiskyrė miR-3065-3p, kurios raiškos sumažėjimas siekė 19 kartų. Pilnas reikšmingai pakitusių miRNR sąrašas pateiktas S2 lentelėje.

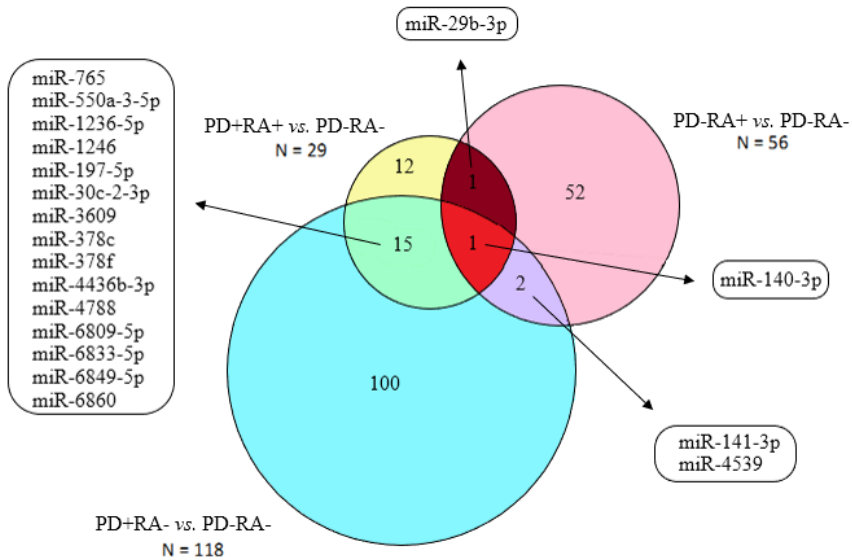
Reumatologiškai sveikų tiriamųjų miRNR raiškos palyginimas. Siekiant įvertinti miRNR specifiškumą periodontitui, buvo palyginti PD pažeisti audiniai su sveikais dantenu audiniais tarp RA nesergančių pacientų (PD+RA-, N = 4 lyginant su PD-RA-, N = 4) ir nustatyta 118 reikšmingai pakitusios raiškos miRNR. Daugumos miRNR (N = 77, 65,25 proc.) raiška buvo padidėjusi, įskaitant 13 miRNR, kurių raiška buvo išaugusi > 10 kartų (miR-

378c, -450a, 3064, 3192-3p, ir kt.). Iš sumažėjusios raiškos miRNR tik šešių miRNR (miR-197-5p, -203a-3p, -210-3p, -375, -1246, -6746-5p) raiška buvo mažesnė > 3 kartus PD pažeistuose audiniuose (S3 lentelė).

PD ir RA sergančių tiriamųjų miRNR raiškos palyginimas. miRNR sąsajos su uždegiminėmis ligomis vertintos lyginant PD ir RA sergančius pacientus su periodontologiškai bei reumatologiškai sveikais tiriamaisiais (PD+RA+, N = 4 lyginant su PD-RA-, N = 4). Buvo nustatytos 29 pakitusios raiškos miRNR, iš kurių dauguma (N=22, 75,86 proc.) buvo padidėjusios raiškos, įskaitant miR-550a-3-5p, -140-3p, -765 ir kt. Trijų miRNR (miR-378c, -3609, -4436b-3p) raiškos pokytis siekė > 10 kartų. Iš sumažėjusios raiškos miRNR išsiskyrė miR-3065-3p, kurios raiškos pokytis siekė -11,3 karto (S4 lentelė).

miRNR raiškos sąsajos su RA. Palyginus tik RA sergančių asmenų sveikus dantenų audinius su reumatologiškai sveikų tiriamųjų sveikais dantenų audiniais (PD-RA+, N = 4 lyginant su PD-RA-, N = 4) nustatytos 56 pakitusios raiškos miRNR. Priešingai nei PD atveju, RA sergančių asmenų dantenų audiniuose daugumos miRNR raiška (N = 50, 89,29 proc.) buvo sumažėjusi, įskaitant miR-4539 ir miR-3620-5p, kurių raiška buvo pakitusi > 20 kartų. Dar dešimties miRNR (miR-34c-5p, -424-3p, -551b-3p, -3065-5p ir kt.) raiškos pokytis siekė nuo 10 iki 20 kartų. Iš 6 padidėjusios raiškos miRNR išsiskyrė miR-4701-5p, kurios raiška padidėjo 34 kartus (S5 lentelė).

miRNR raiškos dėsningumas ir atranka validavimui. Dalies miRNR reikšmingas pokytis buvo pakartotinai nustatomas keliuose palyginamosiose grupėse. Išsiskyrė miR-140-3p, kurios reikšmingi pokyčiai nustatyti visuose palyginimuose: miR-140-3p buvo padidėjusi PD+RA-, PD+RA+ bei sumažėjusi PD-RA+ mėginiuose lyginant juos su PD-RA-. Daugiau nei pusės (N = 16, 55,17 proc.) miRNR, kurių pakitusi raiška stebėta lyginant PD+RA+ su PD-RA-, reikšmingi raiškos pokyčiai buvo nustatyti ir PD+RA- palyginime su PD-RA-. Tuo tarpu, PD-RA+ palyginimas su PD-RA- atskleidė, kad tik 4-ių iš 56-ių miRNR reikšmingi raiškos pokyčiai buvo nustatyti ir PD+RA- bei PD+RA+ palyginimuose su PD-RA- (10 pav.).



10 pav. Reikšmingai besiskiriančių miRNR raiškos palyginimas tarp trijų palyginamųjų grupių atsižvelgiant į periodontito (PD) ir reumatoidinio artrito (RA) diagnozę.

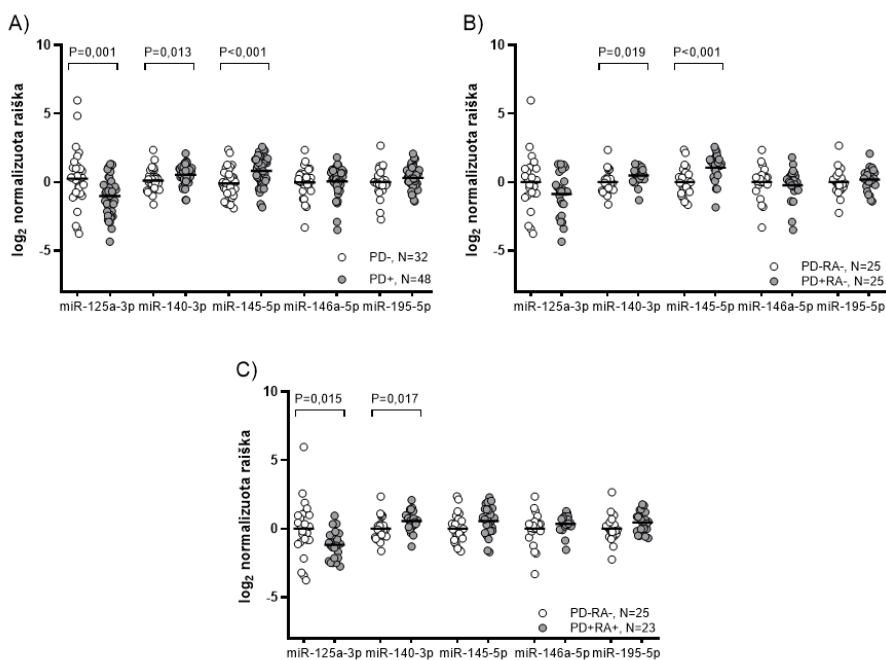
Įvertinus miRNR raiškos skirtumus tarp PD pažeistų ir sveikų dantenu audinių bei atsižvelgiant į palyginamųjų grupių analizės metu gautus duomenis, buvo atrinktos labiausiai su periodontitu susijusios 15 miRNR (miR-30a-5p, -125a-3p, -126-5p, -140-3p, -145-5p, -146a-5p, -155-5p, -195-5p, -423-5p, -550a-3-5p, -575, -630, -765, -1273g-3p, ir -3917) tyrimui didesnėje dantenu mėginių imtyje (N = 80) AT-kPGR metodu.

4.4.2 miRNR raiškos validavimas dantenu audiniuose

Visuminės raiškos analizės metodu atrinktų 15 miRNR raiška buvo tiriama 48 PD pažeistuose ir 32 sveikuose dantenu audiniuose. PD sergančių pacientų grupėje 23 asmenims buvo diagnozuotas RA, o periodontologiškai sveikų tiriamųjų grupėje – 7 asmenims.

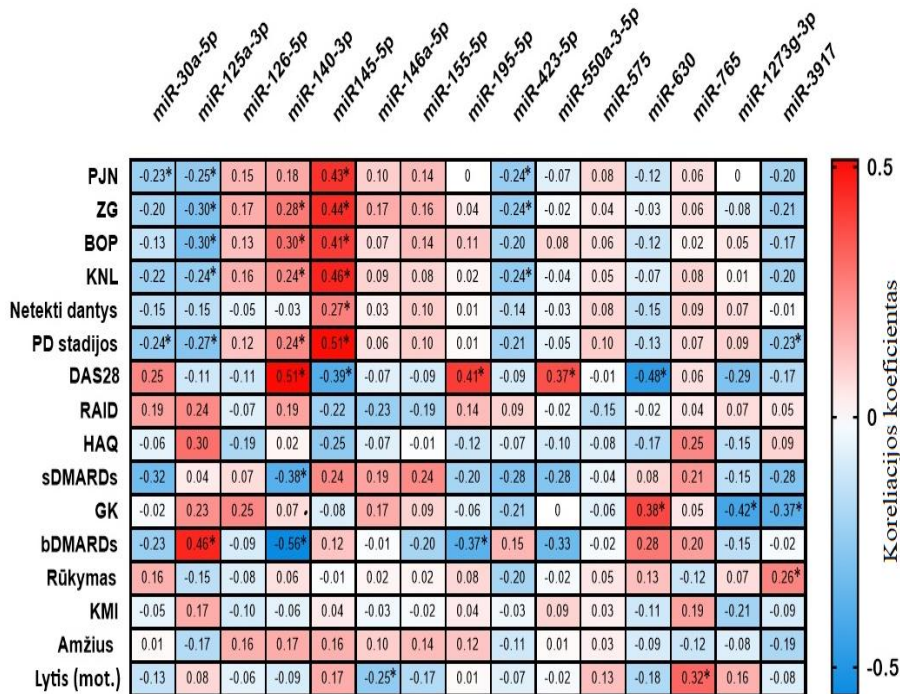
miRNR raiškos palyginimas tarp tiriamųjų grupių. PD pažeistuose dantenu audiniuose buvo nustatytas 9 miRNR raiškos padidėjimas, įskaitant reikšmingą miR-140-3p (FC = 1,3, P = 0,013) ir miR-145-5p (FC = 1,9, P < 0,001) raiškos pokytį. Šių miRNR raiškos padidėjimas fiksuotas ir visuminės

raiškos analizės metu. Iš 6 sumažėjusios raiškos miRNR, reikšmingas pokytis nustatytas miR-125a-3p ($FC = -2,4$, $P = 0,001$) atveju (11A pav.). miR-140-3p ir miR-145-5p reikšmingas raiškos padidėjimas taip pat fiksuotas reumatologiškai sveikų tiriamųjų PD pažeistuose dantenu audiniuose (PD+RA-, $N = 25$ lyginant su PD-RA-, $N = 25$) (11B pav.). Minėtame palyginime reikšmingas raiškos sumažėjimas uždegiminiuose dantenu audiniuose nustatytas tik miR-630 ($FC = -1,7$, $P = 0,02$) atveju. Lyginant RA sergančių asmenų PD pažeistus audinius su reumatologiškai sveikų tiriamųjų sveikais dantenu audiniais (PD+RA+, $N = 23$ lyginant su PD-RA-, $N = 25$), pakartotinai nustatytas miR-140-3p raiškos padidėjimas ($FC = 1,5$, $P = 0,017$) PD pažeistuose audiniuose. Tuo tarpu, PD paveiktuose audiniuose reikšmingai sumažėjusios buvo miR-125a-3p ($FC = -2,3$, $P = 0,015$) ir miR-1273g-3p ($FC = -1,5$, $P = 0,013$) (11C pav.).



11 pav. Santykinė miR-125a-3p, miR-140-3p, miR-145-5p, miR-146a-5p ir miR-195-5p raiška dantenu audiniuose. **(A)** miRNR raiška lyginant periodontito (PD) pažeistus audinius ir sveikus dantenu audinius; **(B)** miRNR raiškos palyginimas tarp PD pažeistų ir sveikų dantenu audinių vertinant tik reumatologiškai sveikų pacientų mėginius; **(C)** miRNR raiškos palyginimas PD ir reumatoidiniu artritu (RA) sergančių tiriamųjų dantenose bei sveikų tiriamųjų sveikose dantenose. Juodi brūkšniai žymi medianą.

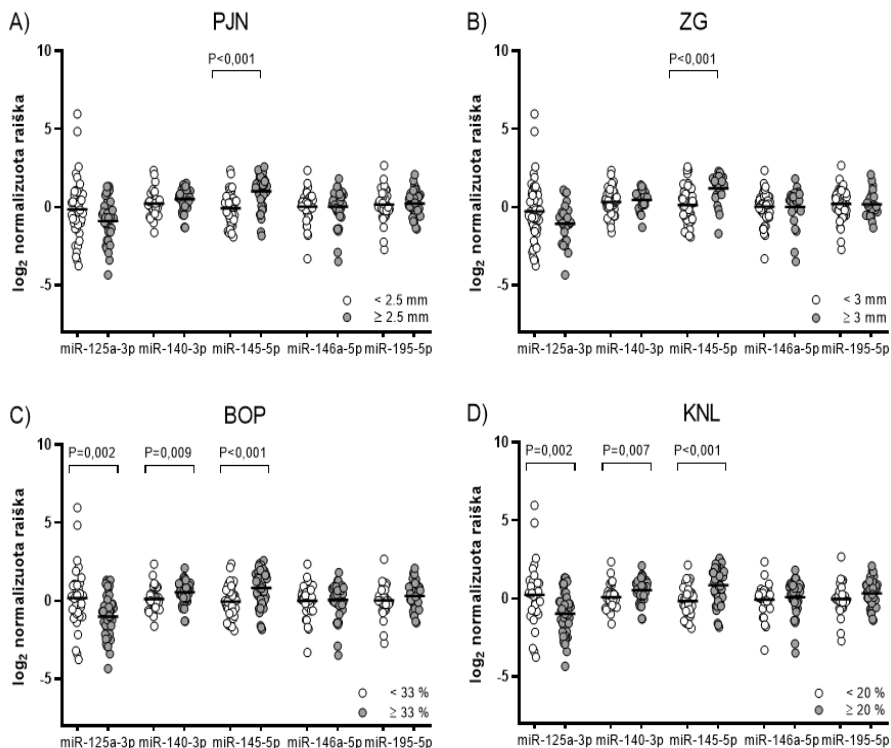
miRNR raiškos sąsajos su klinikiniais ir pataloginiais rodikliais. Vertinant dantenu audinio miRNR raiškos sąsajas su klinikiniais ir pataloginiais rodikliais, pirmiausiai buvo atlikta apžvalginė koreliacijų matricos analizė (12 pav.). Sunkesnę PD ligos eigą apibūdinantys PD klinikiniai rodikliai teigiamai koreliavo su miR-145-5p (PjN, $r = 0,43$, $P < 0,001$; ZG, $r = 0,44$, $P < 0,001$; BOP, $r = 0,41$, $P < 0,001$; KNL, $r = 0,46$, $P < 0,001$; netekti dantys, $r = 0,27$, $P = 0,018$; PD stadijos, $r = 0,51$, $P < 0,001$), miR-140-3p (ZG, $r = 0,28$, $P = 0,013$; BOP, $r = 0,30$, $P = 0,007$; KNL, $r = 0,24$, $P = 0,032$; PD stadijos, $r = 0,24$, $P = 0,031$) bei neigiamai koreliavo su miR-30a-5p (PjN, $r = -0,23$, $P = 0,040$; PD stadijos, $r = -0,24$, $P = 0,035$), miR-125a-3p (PjN, $r = -0,25$, $P = 0,026$; ZG, $r = -0,30$, $P = 0,008$; BOP, $r = -0,30$, $P = 0,006$; KNL, $r = -0,24$, $P = 0,036$; PD stadijos, $r = -0,27$, $P = 0,015$) ir miR-423-5p (PjN, $r = -0,24$, $P = 0,035$; ZG, $r = -0,24$, $P = 0,032$; KNL, $r = -0,24$, $P = 0,031$). Buvo nustatytos penkių miRNR reikšmingos koreliacijos su didesniu RA ligos aktyvumu, remiantis DAS28 įverčiu: miR-140-3p ($r = 0,51$, $P = 0,004$), miR-145-5p ($r = -0,39$, $P = 0,034$), miR-195-5p ($r = 0,41$, $P = 0,026$), miR-550a-3-5p ($r = 0,37$, $P = 0,046$), miR-630 ($r = -0,48$, $P = 0,008$). Šešios miRNR koreliavo su RA gydymui skiriamų medikamentų vartojimu: sDMARDs su miR-140-3p ($r = -0,38$, $P = 0,039$), GK su miR-630 ($r = 0,38$, $P = 0,037$), miR-1273g-3p ($r = -0,42$, $P = 0,019$), miR-3917 ($r = -0,37$, $P = 0,042$), bDMARDs su miR-125a-3p ($r = 0,46$, $P = 0,011$), miR-140-3p ($r = -0,56$, $P = 0,001$) ir miR-195-5p ($r = -0,37$, $P = 0,044$). Pažymėtina, kad miR-140-3p, miR-195-5p, miR-630 atveju, reikšmingos koreliacijos su RA ligos aktyvumu ir RA gydymui skiriamų preparatų vartojimu buvo priešingos krypties. Panaši priešingos krypties koreliacija pastebėta ir tarp PD ligos sunkumo bei bDMARDs vartojimo miR-140-3p bei miR-125a-3p atveju.



12 pav. miRNR raiškos dantenu audinyje koreliacija su klinikiniais-patologiniais bei demografiniais rodikliais. Nurodytas Spirmeno koreliacijos koeficientas, reikšmingos koreliacijos pažymėtos žvaigždute (*). Santrumpos: bDMARDs – biologiniai ligos eigą modifikuojantys antireumatiniai vaistai; BOP – kraujavimo po zondavimo indeksas; DAS28 – RA ligos aktyvumo indeksas; GK – gliukokortikosteroidai; HAQ – sveikatos vertinimo klausimynas; KMI – kūno masės indeksas; KNL – rentgenologiškai stebimas kaulo netekimo lygis; PD – periodontitas; PJN – periodonto jungties netekimo lygis; RA – reumatoidinis artritas; RAID – reumatoidinio artrito ligos poveikio klausimynas; sDMARDs – sintetiniai ligos eigą modifikuojantys antireumatiniai agentai; ZG – zondavimo gylis.

Detalesnė miRNR sąsajų analizė su PD ligos klinicine eiga buvo atlikta vertinant skirtumus tarp PD stadijų bei PJN, ZG, BOP, KNL ribinių verčių. Pacientų sergančių IV ir III stadijos sunkiu PD dantenu mėginiuose nustatyta 2,2 karto padidėjusi miR-145-5p ($P < 0,001$) bei 1,3 karto padidėjusi miR-140-3p ($P = 0,026$) ir 2,2 karto sumažėjusi miR-125a-3p ($P = 0,007$) raiška lyginant su sveikais dantenu audiniais. Vidutinio sunkumo (II stadijos) PD sergančių pacientų dantenose nustatyta reikšmingai pakitusi miR-125a-3p ($FC = -3,5$, $P = 0,014$) ir miR-195-5p ($FC = 1,7$, $P = 0,039$) lyginant su sveikais dantenu audiniais. Lengvos formos (I stadijos) PD lyginant su sveikomis

dantenomis nebuvo nustatyta reikšmingų miRNR raiškos pokyčių. miRNR raiškos sąsajos su PD klinikinių parametru ribinėmis vertėmis pateikta 13 paveiksle.



13 pav. Santykinė miR-125a-3p, miR-140-3p, miR-145-5p, miR-146a-5p ir miR-195-5p raiška, lyginant ribines periodontologinių rodiklių vertes: **(A)** periodontito jungties netekimo lygio (CAL); **(B)** zondavimo gylio (ZG); **(C)** kraujavimo po zondavimo indekso (BOP); **(D)** rentgenologinio kaulo netekimo (KNL). Juodi brūkšniai žymi medianą.

RA ligos aktyvumas ir RA gydymui skiriamų vaistų vartojimas buvo susijęs su miRNR raiška dantenų audinyje. Aktyvia RA ligos forma sergančių pacientų ($DAS28 \geq 3,2$) dantenose nustatyta 2,7 karto mažesnė miR-145-5p ($P = 0,023$), 1,8 karto mažesnė miR-1273g-3p ($P = 0,012$) ir 2,5 karto didesnė miR-575 ($P = 0,045$) raiška lyginant su pacientais sergančiais gerai kontroliuojama RA ($DAS28 < 3,2$). RA gydymui skiriami bDMARDs buvo susiję su sumažėjusia miR-140-3p ($FC = -1,6$, $P = 0,004$), miR-195-5p ($FC = -1,6$, $P = 0,035$) ir padidėjusia miR-125a-3p ($FC = 2,6$, $P = 0,017$), o

sDMARDs – su padidėjusia miR-126 (FC = 1,46, P = 0,03) ir sumažėjusia miR-1273g-3p (FC = -1,4, P = 0,045) raiška.

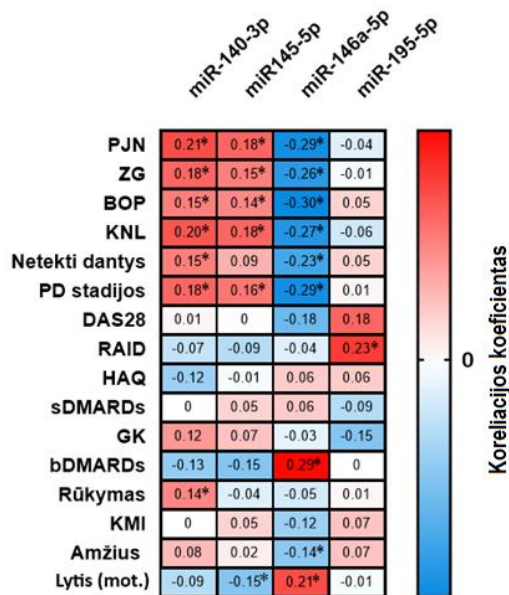
miRNR atranka tyrimui organizmo skysčiuose. Atsižvelgiant į tyrimo imtyje nustatytas sąsajas su PD diagnoze ir ligos klinikine eiga bei remiantis publikuotais duomenimis, tyrimui organizmo skysčiuose (DVS, seilėse, kraujo plazmoje) buvo atrinktos miR-140-3p, miR-145-5p, miR-146a-5p ir miR-195-5p.

4.4.3 miRNR analizė dantenu vagelės skystyje

DVS miRNR tyrimui naudota 210 tinkamos kokybės mėginių su pakankama miRNR koncentracija. Iš jų, 134 mėginiai surinkti ties giliausiomis periodontologinėmis kišenėmis iš PD sergančių asmenų ir 76 DVS mėginiai surinkti iš sveikų dantenu vagelių.

miRNR kiekio palyginimas tarp tiriamųjų grupių. Tiriamųjų, sergančių PD, dantenu vagelės skystyje buvo nustatytas reikšmingas miR-146a-5p (FC = -1,3, P < 0,001) kiekio sumažėjimas lyginant su periodontologiškai sveikais tiriamaisiais. Šių miRNR reikšmingi pokyčiai nustatyti ir lyginant PD bei RA sergančių pacientų DVS su sveikais asmenimis (PD+RA+, N = 34 lyginant su PD-RA- N = 38): miR-145-5p (FC = 1,3, P = 0,042), miR-146a-5p (FC = -1,4, P = 0,001).

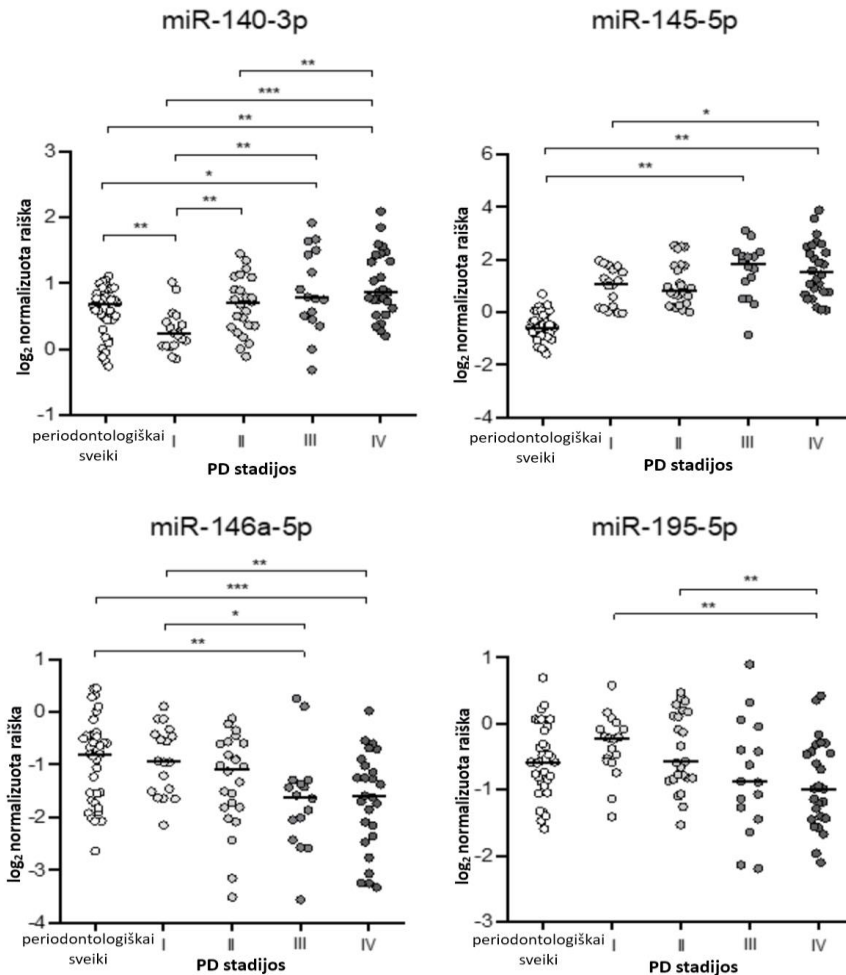
miRNR raiškos sąsajos su klinikiniais ir patologiniais rodikliais. Apžvalginė koreliacijų analizė su PD ir RA klinikiniais rodikliais atskleidė, kad DVS miR-140-3p ir miR-145-5p silpnai teigiamai koreliavo su daugeliu PD parametrų būdingų sunkesnei ligos eigai (14 pav.), panaši tendencija buvo stebima tiriant šių miRNR raišką dantenu audinyje. Tuo tarpu, DVS miR-146a-5p neigiamai koreliavo su PD ligos rodikliais: PJN ($r = -0,29$, P < 0,001), ZG ($r = -0,26$, P < 0,001), BOP ($r = -0,30$, P < 0,001), KNL ($r = -0,27$, P < 0,001) ir netektų dantų skaičiumi ($r = -0,23$, P = 0,001). miR-146a-5p reikšmingai teigiamai koreliavo su bDMARDs ($r = 0,29$, P = 0,008).



14 pav. miRNR kiekio DVS koreliacija su klinikiniais-patologiniais bei demografiniais rodikliais. Nurodytas Spirmeno koreliacijos koeficientas, reikšmingos koreliacijos pažymėtos žvaigždute (*). Santrumpos: bDMARDs – biologiniai ligos eigą modifikuojantys antireumatiniai vaistai; BOP – kraujavimo po zondavimo indeksas; DAS28 – RA ligos aktyvumo indeksas; GK – gliukokortikosteroidai; HAQ – sveikatos vertinimo klausimynas; KMI – kūno masės indeksas; KNL – rentgenologiškai stebimas kaulo netekimo lygis; PD – periodontitas; PJN – periodonto jungties netekimo lygis; RA – reumatoidinis artritas; RAID – reumatoidinio artrito ligos poveikio klausimynas; sDMARDs – sintetiniai ligos eigą modifikuojantys antireumatiniai agentai; ZG – zondavimo gylis.

Sąsajos tarp miRNR DVS kiekio ir BOP bei KNL buvo stebimos ir grupuojant tiriamuosius pagal šių rodiklių ribines vertes. Didesnis kraujavimo po zondavimo indeksas ($BOP \geq 33$ proc.) buvo susijęs su miR-146a-5p kiekio sumažėjimu ($FC = -1,3, P < 0,001$). Taip pat, stebima didesnė alveolinio kaulo rezorbcija ($KNL \geq 20$ proc.) buvo susijusi su miR-140-3p ($FC = 1,2, P = 0,004$) kiekio padidėjimu bei miR-146a-5p ($FC = -1,4, P < 0,001$) sumažėjimu tiriamųjų DVS. PD klinikinę eigą apibūdinant stadijomis buvo nustatyta, kad sunkiausios formos PD (IV stadija) buvo susijusi su miR-140-3p ($FC = 1,2, P = 0,002$), miR-145-5p ($FC = 1,5, P = 0,007$), miR-146a-5p ($FC = -1,7, P < 0,001$) DVS kiekio pokyčiais lyginant su PD nesergančių asmenų DVS. Visi

reikšmingi skirtumai tarp miRNR kiekio ir PD stadijų grafiškai pavaizduoti 15 paveiksle.



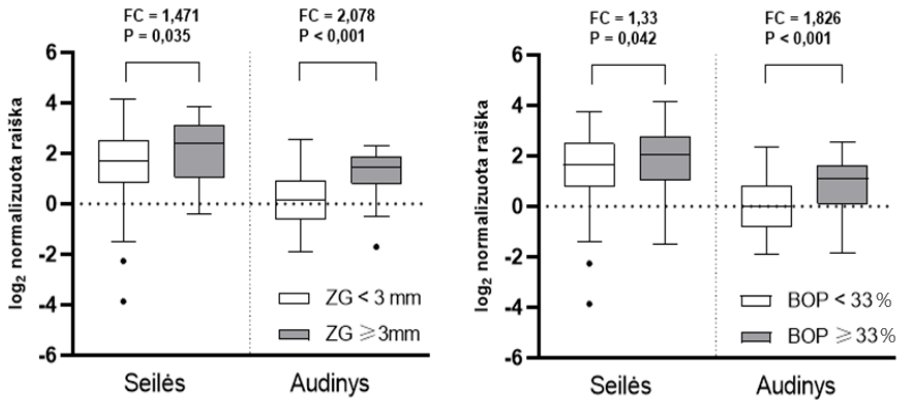
15 pav. miR-140-3p, miR-145-5p, miR-146a-5p ir miR-195-5p kiekis dantenų vagelės skystyje priklausomai nuo periodontito (PD) sunkumo stadijų. Horizontalios linijos diagramos viduje žymi normalizuotų duomenų medianą, reikšmingi skirtumai pažymėti atitinkamai: * $P < 0,050$, ** $P < 0,010$ ir *** $P < 0,001$.

4.4.4 miRNR kiekio tyrimas seilių mėginiuose

Ištyrus miRNR kiekį 173 seilių mėginiuose, nustatyta, kad PD sergančių asmenų ($N = 115$) seilėse miR-140-3p, -145-5p, -146a-5p ir -195-5p kiekis

reikšmingai nesiskyrė nuo periodontologiškai sveikų tiriamųjų (N = 58) seilėse aptinkamo kiekio.

miRNR raiškos sąsajos su klinikiniais ir patologiniais rodikliais. Detalesnės analizės metu vertinant PD klinikinių parametru ribinių verčių asociacijas buvo nustatyta, kad miR-145-5p kiekis seilių mėginiuose buvo reikšmingai susijęs su BOP ir ZG. Pacientų, kurių kraujavimo po zondavimo indeksas buvo ≥ 33 proc., seilėse nustatytas miR-145-5p kiekio padidėjimas ($P = 0,042$), lyginant su asmenimis, kuriems nustatyta mažesnė indekso reikšmė. Taip pat, didesnis nei 3 mm vidutinis ZG buvo susijęs su 1,5 karto padidėjusiu miR-145-5p kiekiu ($P = 0,034$), lyginant su mažesniu vidutiniu ZG. Pažymėtina, kad seilių mėginiuose nustatytos miR-145-5p sąsajos su PD klinikinių parametru ribinėmis vertėmis buvo panašios su dantenų mėginiuose nustatytomis sąsajomis, tačiau kiekybinis pokytis seilėse buvo mažesnis (16 pav.).



16 pav. miR-145-5p kiekio palyginimas seilių mėginiuose ir dantenų audinyje atsižvelgiant į (A) vidutinį zondavimo gylį (ZG) ir (B) kraujavimo po zondavimo indeksą (BOP). Horizontalios linijos diagramos viduje žymi normalizuotų duomenų medianą.

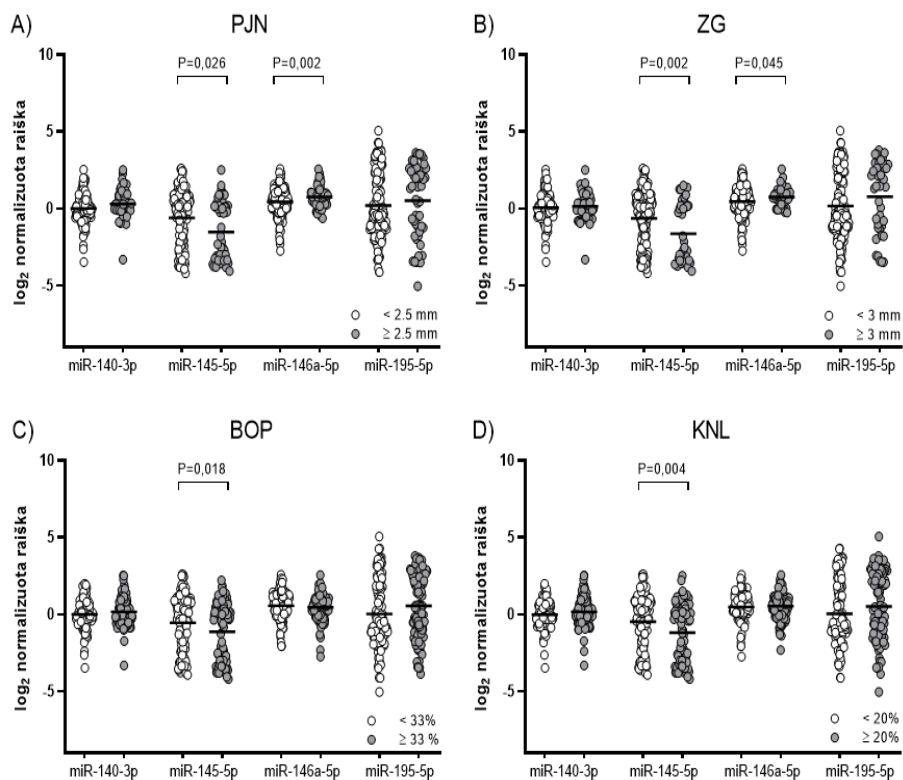
4.4.5 miRNR kiekio tyrimas kraujo plazmoje

Kraujo plazmoje miRNR kiekis buvo įvertintas 221 mėginyje, iš jų 138 paimti iš PD sergančių asmenų ir 83 paimti iš periodontologiškai sveikų tiriamųjų.

miRNR kiekio palyginimas tarp tiriamųjų grupių. Lyginant su periodontologiškai sveikais tiriamaisiais, PD sergančių asmenų kraujo plazmoje buvo padidėjęs miR-140-3p kiekis ($P = 0,030$). Pažymėtina, kad

miR-140-3p kiekio padidėjimas taip pat buvo nustatytas PD pažeistų dantenu mėginiuose.

miRNR raiškos sąsajos su klinikiniais-patologiniais rodikliais. PD klinikinę eigą vertinant pagal periodontologinės būklės rodiklius buvo nustatyta, kad sunkesnės eigos PD buvo susijęs su miR-145-5p kiekio sumažėjimu ir miR-146a-5p kiekio padidėjimu kraujo plazmoje (17 pav.)

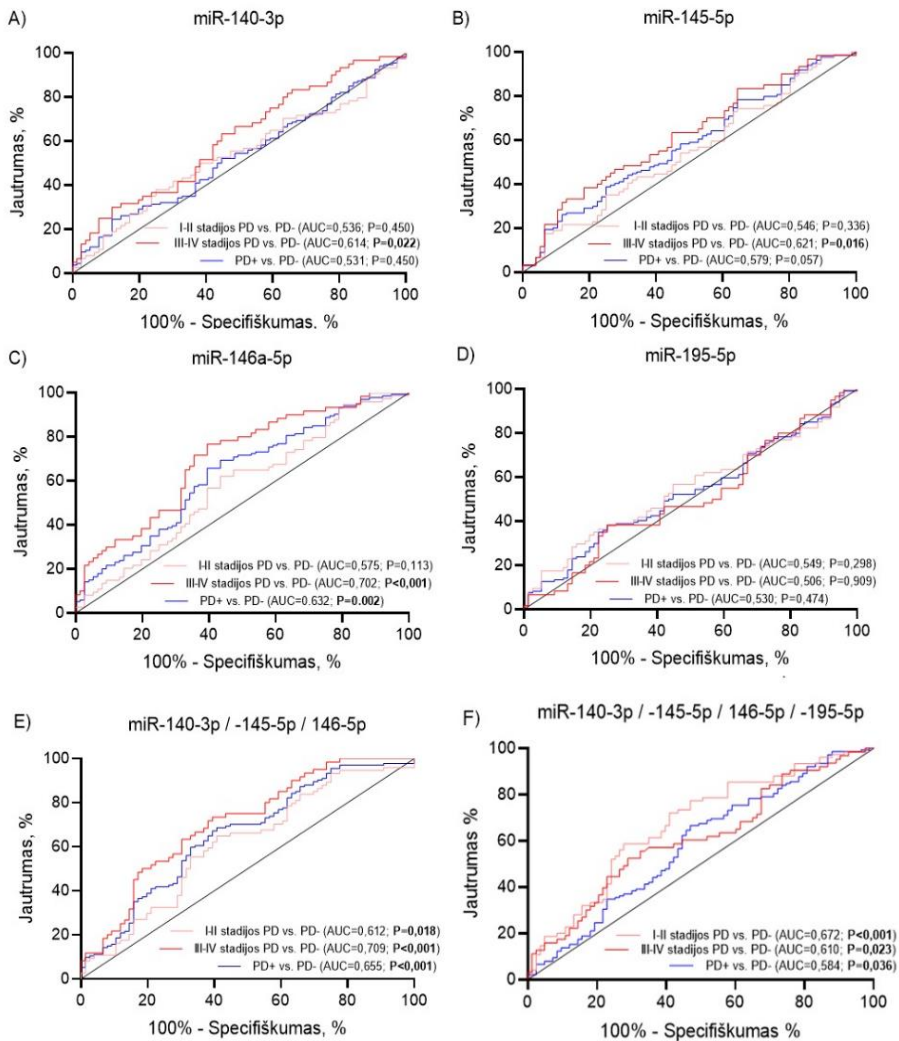


17 pav. miR-140-3p, miR-145-5p, miR-146a-5p ir miR-195-5p kiekio palyginimas kraujo plazmoje lyginant ribines periodontologinių rodiklių vertes: **(A)** periodontito jungties netekimo lygio (CAL); **(B)** zondavimo gylio (ZG); **(C)** kraujavimo po zondavimo indekso (BOP); **(D)** rentgenologinio kaulo netekimo (KNL). Juodi brūkšniai žymi medianą.

4.4.6 Cirkuliuojančių miRNR diagnostinio potencialo vertinimas

DVS, seilėse ir kraujo plazmoje tirtų miR-140-3p, -145-5p, -146a-5p ir -195-5p diagnostinis potencialas įvertintas atlikus ROC analizę, apskaičiuojant plotą po ROC kreive (AUC) bei įvertinant jautrumą ir specifiskumą kiekvienai miRNR ir jų deriniams.

Lyginant PD sergančius asmenis su periodontologiškai sveikais tiriamaisiais DVS atveju, miR-146a-5p jautrumas buvo 61,2 proc., specifiškumas – 60,5 proc., o AUC siekė 0,63 ($P = 0,002$). Siekiant įvertinti diagnostinę vertę skirtingo sunkumo PD stadijomis identifikuoti, atlikta analizė palyginus tik sunkiu PD (III-IV stadija) bei tik vidutiniu ar lengvu PD (II, I stadija) sergančius asmenis su periodontologiškai sveikais asmenimis. Nustatyta, kad nei viena iš tirtų miRNR nepasižymėjo reikšmingu diagnostiniu potencialu vidutinės ar lengvos formos PD atveju. Tuo tarpu, lyginant sunkia PD forma sergančiuosius su PD nesergančiais asmenimis, 3 iš 4 tirtų miRNR pasižymėjo reikšminga AUC verte: miR-140-3p (AUC = 0,614, jautrumas – 58,33 proc., specifiškumas – 57,89 proc., $P = 0,022$) (18A pav.), miR-145-5p (AUC = 0,621, jautrumas – 56,67 proc., specifiškumas – 56,58 proc., $P = 0,016$) (18B pav.) ir miR-146a-5p (AUC = 0,702, jautrumas – 66,67 proc., specifiškumas – 65,79 proc., $P < 0,001$) (18C pav.). Atlikus logistinę regresinę analizę ir apjungus miR-140-3p, miR-145-5p ir miR-146a-5p, gautas didžiausias diagnostinis potencialas: vertinant PD buvimą (AUC = 0,655, jautrumas – 62,69 proc., specifiškumas – 61,84 proc., $P < 0,001$), I-II stadijos PD (AUC = 0,612, jautrumas – 60,81 proc., specifiškumas – 60,53 proc., $P = 0,018$) ir III-IV stadijos PD (AUC = 0,709, jautrumas – 66,67 proc., specifiškumas – 65,79 proc., $P < 0,001$) (18E pav.).



18 pav. Dantenu vagelės skystyje (A-E) ir kraujo plazmoje (F) cirkuliuojančių miRNR ROC kreivių analizė. Santrumpos: PD – periodontitas; AUC – plotas po ROC kreive.

Seilėse nei pavienės miRNR nei jų deriniai neturėjo statistškai reikšmingos diagnostinės vertės. Tuo tarpu, kraujo plazmoje visų tirtų miRNR derinys buvo reikšmingai susijęs su PD ir su I-II bei III-IV stadijos liga (18F pav.).

5. REZULTATŲ APITARIMAS

5.1 Periodontito paplitimas, PD ir RA klinikinės eigos sąsajos

Periodontitas yra itin plačiai paplitusi lėtinė uždegiminė liga, tačiau ligos dažnis skirtingų tyrimų duomenimis varijuoja nuo 10 proc. iki 70 proc.. Tyrimuose aprašomas PD paplitimo dažnis skiriasi dėl skirtingų diagnostinių kriterijų taikymo PD ligai nustatyti bei dėl tiriamųjų amžiaus skirtumo. Šiame tyrime taikant 2018 m. periodonto ir periimplantinių ligų klasifikacijoje pateiktus PD atvejo diagnostinius kriterijus, PD buvo nustatytas 61,7 proc. tiriamųjų. Taip pat, literatūroje aprašomas PD dažnio ryšys su amžiumi buvo stebimas mūsų tyrimo imtyje, nes vidutinis PD sergančių asmenų amžius buvo didesnis už periodontologiškai sveikų asmenų amžiaus vidurkį (atitinkamai 53,92 m. ir 47,53 m.). Nepaisant akademinėje bendruomenėje išliekančios diskusijos dėl tikslaus PD ligos paplitimo, manoma, kad PD dažniausiai diagnozuojamas tik pažengusiose ligos stadijose [213]. Šiame tyrime iš 148 asmenų, kuriems buvo diagnozuotas PD, beveik pusė 45,9 proc. sirgo sunkia ligos forma. Laiku nediagnozuota liga progresuoja sukeldama vis sunkesnius klinikinius simptomus, tokius kaip kraujavimą ir pūliavimą iš periodonto kišenių, dantų paslankumo didėjimą bei dantų praradimą. Tyrimais įrodytas ryšys tarp PD ir dantų netekimo buvo stebimas ir mūsų tiriamojoje imtyje, nes PD sergantys tiriamieji buvo netekę dvigubai daugiau dantų lyginant su periodontologiškai sveikais asmenimis. Dantų netekimas yra siejamas su kramtymo, estetiniais bei fonetiniais sunkumais bei bendrai pablogėjusia gyvenimo kokybe ir sumažėjusiu darbingumu [214]. Visgi, PD sukeliama žala neapsiriboja pokyčiais burnoje. Mokslinėje literatūroje daugėja įrodymų, kad PD yra susijęs su didesne RA, aterosklerozės, cukrinio diabeto ir kitų ligų rizika bei su sunkesne šių ligų klinicine eiga [6]. Atsižvelgiant į didelį PD paplitimą bei ligos daromą žalą, 2018 m. išleistose gairėse buvo akcentuojamas poreikis gerinti ankstyvąją PD ligos diagnostiką ieškant molekulinį diagnostinių ligos žymenų [26]. Šio tyrimo pagrindinis tikslas buvo identifikuoti periodontitui specifines miRNR ir įvertinti jų diagnostinį potencialą organizmo skysčiuose.

Atsižvelgiant į miRNR molekulių svarbą uždegiminio ir imuninio atsako moduliavime, į šį biomedicininį tyrimą buvo įtraukti pacientai, sergantys autoimunine liga – reumatoidiniu artritu. RA pacientų įtraukimas buvo aktualus siekiant tiksliau identifikuoti su uždegimu susijusias miRNR bei galimai išplėsti šiuo metu turimas žinias apie PD ir RA tarpusavio sąsajas. Iš 94 įtrauktų į tyrimą RA sergančių pacientų, 68,1 proc. sirgo PD. Didelis PD paplitimo dažnis tarp RA pacientų nustatytas ir kituose tyrimuose ir siekė nuo

68 iki 97 proc. [11, 215, 216]. 2020 m. atliktoje sisteminėje apžvalgoje ir meta-analizėje įvertinta > 1 mln. tiriamųjų imtis ir nustatyta, kad PD sergantiems asmenims rizika sirgti RA buvo didesnė (ŠS 1,7, P < 0,001) [9]. Taip pat, tyrimais nustatyta, kad sunkesnė PD ligos forma yra susijusi su didesniu RA ligos aktyvumu, o periodontologinis gydymas sumažina RA ligos aktyvumą bei biocheminių uždegimo žymenų koncentraciją [10,11]. Mūsų tyrimo imtyje taip pat buvo stebima reikšminga asociacija tarp šių ligų klinikinės eigos – vidutinė ar sunki PD forma buvo dvigubai dažnesnė tarp didelio aktyvumo RA sergančių pacientų lyginant su RA remisijoje esančiais pacientais (88,9 proc. lyginant su 42,9 proc., P = 0,042). Taip pat, RA remisijoje esantiems pacientams buvo būdingas mažesnis periodonto atraminių audinių netekimas. Pastarojo meto tyrimai pateikė įrodymų, kad PD gali turėti priežastinį poveikį RA išsivystymui ir ligos sunkumui. Vieno iš pagrindinių periodonto patogenų, *P. gingivalis*, išskiriamas fermentas PPAAD geba deimINUOTI aplinkinius periodonto baltymus. Tai lemia naujų citrulinizuotų epitopų atsiradimą, kurie gali jungtis su imuninės sistemos ląstelėmis bei paskatinti autoantikūnų raišką [128]. Žiurkėms dirbtinai sukėlus PD, buvo nustatyta padidėjusi anti-CCP ir RF koncentracija serume bei periodonto audiniuose [217]. Įvairiuose epidemiologiniuose bei eksperimentiniuose tyrimuose ir sisteminėse apžvalgose laikomasi bendros nuostatos, kad PD neigiamai veikia RA ligos eigą, o šiam teiginiui paantrina ir mūsų imtyje stebėtos asociacijos.

Tuo tarpu, RA įtaką periodonto audiniams vertinantys tyrimai pateikia prieštarigus rezultatus [12]. Tokio pobūdžio tyrimai atliekami lyginant RA sergančių ir nesergančių asmenų periodontologinę būklę bendroje populiacijoje arba tik tarp asmenų su diagnozuotu PD. Kai vertinama RA įtaka bendroje populiacijoje (t.y., į tyrimą įtraukiant ir periodontologiškai sveikus asmenis), daugelis tyrimų atskleidžia, kad RA yra susijęs su sunkesne PD eiga [218, 219]. Visgi, kai vertinamos RA asociacijos su PD tik PD sergančių asmenų imtyje, neretai nėra nustatoma reikšmingų sąsajų [12]. Šio biomedicininio tyrimo klinikinės dalies analizė būtent ir buvo orientuota į RA, kaip PD eigą modifikuojančio veiksnio, vertinimą. Šiuo tikslu palygintas PD pacientų ligos sunkumas tarp sergančių ir nesergančių RA. PD sunkumą apibūdinant pagal 2018 m. periodonto ligų klasifikacijoje aprašytas ligos sunkumo stadijas, nebuvo nustatyta reikšmingų sąsajų su reumatologine būkle. Visgi PD klinikinę eigą vertinant pagal objektyvius periodontologinio ištyrimo duomenis, nustatyta, kad RA pacientams būdingas didesnis vidutinis kišenių zondavimo gylis bei didesnis netektų dantų skaičius, lyginant su reumatologiškai sveikais tiriamaisiais. Remiantis Hussain ir kolegų 2020 m.

atlikta sistemine apžvalga ir metaanalize, RA nebuvo susijęs su sunkesne periodontologine būkle PD sergančių asmenų imtyje [12]. Apžvalgos autoriai pripažįsta, kad šiam rezultatui įtakos galėjo turėti RA pacientų vartojami biologiniai ligos eigą modifikuojantys vaistai. Nustatyta, kad bDMARDs reikšmingai mažina uždegiminių mediatorių koncentraciją kraujyje, o citokinų kiekio sumažėjimas nustatomas ir DVS [177, 220]. Taip pat, anti-TNF- α gydomiems pacientams būdingas mažesnis kraujavimo po zondavimo indeksas bei kišenių zondavimo gylis [177, 220]. Šio tyrimo metu taip pat atskleistos sąsajos tarp bDMARDs ir geresnės periodontologinės būklės, nes nustatyta, kad PD ir RA sergančių pacientų grupėje bDMARDs buvo susiję su vidutiniškai mažesnėmis PJN, ZG, KNL vertėmis bei reikšmingai mažesniu kraujavimo po zondavimo indeksu. Šie duomenys papildė Hussain ir kolegų išsakytą prielaidą, kad RA galimai turi neigiamos įtakos PD eigai, tačiau medikamentinis RA gydymas teigiamai veikia ir periodonto audinius, todėl RA ligos įtaka PD yra nustatoma ne visuose tyrimuose.

5.2 miRNR sąsajų tyrimas, miRNR raiškos analizė dantenu audinyje

Biomedicininio tyrimo metu potencialiai su PD susijusios, diagnostinę vertę turinčios miRNR buvo identifikuojamos atliekant miRNR sąsajų tyrimą dantenu audinyje bei įvertinant modifikuojančių veiksnių įtaką – RA ir RA gydymui skiriamų vaistų vartojimo. Šiam tikslui įgyvendinti buvo pasirinkta panašiuose tyrimuose taikyta veiksmų seka [221, 222]. Pirmiausiai, dantenu audinyje buvo vertinama 2569 miRNR raiška mikrogardelių metodu. Atsižvelgiant į miRNR raiškos skirtumus tarp PD pažeistų ir sveikų dantenu audinių, atrinkta 15 miRNR, kurios vertintos AT-kPGR metodu didesnėje imtyje dantenu mėginių. Atrinkus 4 miRNR, galimai susijusias su PD, jų kiekis bei diagnostinė vertė buvo vertinama organizmo skysčiuose. Autorių žiniomis tai pirmasis tyrimas, kurio metu vienoje tiriamųjų imtyje buvo vertinami miRNR raiškos pokyčiai dantenu audinyje bei miRNR kiekio pokyčiai DVS, seilėse ir kraujo plazmoje. Taip pat, anksčiau nebuvo vertintos RA bei RA gydymui skiriamų vaistų vartojimo sąsajos su miRNR raiška dantenu audinyje.

Dantenu audinyje atliktus visuminės miRNR raiškos vertinimą, nustatyta, kad PD pažeistus audinius lyginant su sveikais dantenu 177-ių miRNR raiška skyrėsi statistiškai reikšmingai ($FC > 1,5$ karto, $P < 0,050$). Iš jų, 79,1 proc. buvo padidėjusios raiškos. Stoecklin-Wasmer ir kolegų 2012 m. atliktame tyrime ištyrus 16 dantenu mėginių mikrogardelių metodu, kuriuo galima vertinti 1349 miRNR raišką, nustatytos 91 padidėjusios raiškos ir 68 sumažėjusios raiškos miRNR periodontito pažeistuose audiniuose [221].

Minėto tyrimo visuminės raiškos rezultatai iš dalies sutapo su mūsų tyrimo metu nustatytu miRNR raiškos padidėjimu PD audiniuose, ypač miR-30a-5p, -125a-3p, -126a-5p, -140-3p, -145-5p, -146a-5p, -155-5p, -195-5p, -575, -765, -3917 bei dešimties kitų miRNR atveju, kai Xie ir kolegų 2011 m. atliktame tyrime 20 dantenu mėginių vertinta 1769 miRNR raiška ir nustatyta 91 miRNR raiškos padidėjimas (įskaitant miR-126, miR-195-5p ir kt.) bei 34 miRNR raiškos sumažėjimas [212]. 2020 m. atliktoje sisteminėje apžvalgoje ir meta-analizėje, kurioje buvo vertinami visi tinkamos kokybės tyrimai apie miRNR sąsajas su PD, buvo teigiama, kad daugelis tyrimų visuminės miRNR raiškos metodu nustato bendrą miRNR raiškos padidėjimą PD pažeistuose audiniuose [19]. Svarbu paminėti, kad daugelis anksčiau atliktų tyrimų dantenose visuminės raiškos metodu vertino mažiau nei 2569 miRNR, kurios buvo tirtos šiame biomediciniame tyrime. Taip pat, daugeliu atveju imties dydis naudojamas visuminei analizei buvo panašus arba mažesnis. Sisteminės apžvalgos autoriai teigė, kad rezultatai tarp studijų skiriasi ir juos yra sunku palyginti dėl tyrimų heterogeniškumo, tačiau miR-146a-5p bei miR-142-3p išsiskyrė kaip dažniausiai reikšmingai su PD susijusios miRNR. Pažymėtina, kad miR-146a-5p PD pažeistuose audiniuose gali būti padidėjusios arba sumažėjusios raiškos. Šio biomedicininio tyrimo visuminės analizės tyrimu nustatyta 2,1 karto padidėjusi miR-146a-5p raiška PD paveiktuose audiniuose ($P = 0,016$).

Remiantis 2021 m. atlikta sisteminė apžvalga ir metaanalize, iki šiol tik 6 tyrimai vertinę miRNR sąsajas su PD atsižvelgė į galimą modifikuojančių veiksnių (nutukimo, cukrinio diabeto, išeminės širdies ligos) įtaką [223]. Naqvi ir kolegų 2019 m. atliktas tyrimas atskleidė, kad tarp nutukimą turinčių tiriamųjų PD buvo susijęs su 41 pakitusios raiškos miRNR, o tarp normalų KMI turinčių tiriamųjų – 21 pakitusios raiškos miRNR [224]. Perri ir kolegų atliktame tyrime (2011 m.) vertintos 88 miRNR raiškos dantenu audinyje ir nustatyta, kad dalies miRNR raiškos padidėjimas buvo didesnis tarp PD sergančių ir atsvarų turinčių asmenų, lyginant su PD sergančiais asmenimis be atsvario [225]. Paminėti tyrimai ir kiti tyrimai vertinę modifikuojančių veiksnių įtaką miRNR sąsajoms su PD teigia, kad būklės, kurios yra siejamos su padidėjusiu uždegiminiu atsaku periodonto audiniuose turi įtakos miRNR raiškai. Mūsų tyrime taip pat nustatyti reikšmingi visuminės miRNR raiškos skirtumai atsižvelgiant į pacientų reumatologinę būklę. Palyginus su sveikomis dantenomis, PD pažeistuose audiniuose nustatyta pakitusi 29 miRNR raiška tarp RA sergančių asmenų ir 118 miRNR tarp reumatologiškai sveikų tiriamųjų. Svarbu, kad RA pacientų sveikas dantenos palyginus su reumatologiškai sveikų tiriamųjų sveikomis dantenomis, buvo nustatytos 56

pakitusias raiškos miRNR. Priešingai nei PD atveju, didžioji dalis (89,3 proc.) miRNR buvo sumažėjusios raiškos RA sergančių asmenų dantenose. Mūsų tyrimo duomenys iš dalies sutampa su anksčiau minėtuose tyrimuose pateikta prielaida, kad būklės, kurios turi įtakos uždegiminio atsako moduliavimui, yra susijusios su miRNR raiškos pokyčiais dantenų audinyje, visgi negalima vienareikšmiškai teigti, kad RA siejamas su uždegiminių miRNR raiškos padidėjimu.

Didesnėje dantenų audinių imtyje (N = 80) vertinant 15 miRNR raišką AT-kPGR metodu buvo nustatyta, kad miR-140-3p, miR-145-5p, miR-195-5p buvo susijusios su PD ir (arba) ligos sunkumu. miR-145-5p raiška PD pažeistuose audiniuose buvo reikšmingai padidėjusi 1,9 karto bei teigiamai koreliavo su visais sunkesnei PD eigai būdingais klinikiniais rodikliais (PJM, ZG, BOP, KNL, $r = 0,41 - 0,46$, $P < 0,001$). Liu ir kolegų 2020 m. atliktame *in vitro* tyrime nustatyta, kad dantenų epitelyje miR-145-5p raiška koreliavo su TNF- α koncentracija, o bendras miR-145-5p raiškos padidėjimas yra tiesiogiai proporcingas TNF- α kiekiui [226]. Mūsų tyrime taip pat buvo stebima koreliacija tarp miR-145-5p raiškos ir PD sunkumo stadijų ($r = 0,51$, $P < 0,001$), o didžiausias raiškos skirtumas užfiksuotas lyginant sunkiu PD (IV ir III stadijos) sergančius tiriamuosius su periodontologiškai sveikais asmenimis (FC = 2,2, $P < 0,001$). Manoma, kad miR-145-5p yra svarbi kaulinio audinio formavimuisi, nes šios miRNR slopinimas paskatina osteogeninę diferenciaciją [227]. Remiantis pastarųjų metų tyrimais, miR-140-3p taip pat gali dalyvauti kaulo remodeliacijoje skatindama osteoblastų diferenciaciją per Wnt ir TGF- β signalinius kelius [228, 229]. Šiame biomediciniame tyrime, miR-140-3p raiškos padidėjimas buvo stebimas PD pažeistuose audiniuose (FC = 1,33, $P = 0,013$) bei koreliavo su PD klinikiniais rodikliais (ZG, BOP, KNL, $r = 0,24 - 0,30$, $P < 0,050$) ir PD stadijomis (PD stadijos, $r = 0,24$, $P = 0,031$). Mūsų tyrimo imtyje, miR-195-5p taip pat buvo susijusi su sunkesnės eigos PD. Manoma, kad miR-195-5p taip pat dalyvauja kaulinio audinio homeostazėje. Chang ir kolegų 2017 m. atliktame tyrime nustatyta miR-195-5p buvo susijusi su osteogeninės diferenciacijos slopinimu periodonto audiniuose [230]. Panašų neigiamą miR-195-5p poveikį kaulo remodeliacijai atskleidė ir Grünhagen bei kolegų atliktas tyrimas (2015 m.), radęs, kad padidėjusi miR-195-5p raiška sutrikdo kaulų morfogeninio baltymo funkcijas [231]. Šiame tyrime be sąsajų su PD ligos sunkumu, miR-195-5p koreliavo ir su sunkesne RA ligos eiga ($r = 0,41$, $P = 0,026$). Pažymėtina, kad miR-140-3p ir miR-195-5p raiška dantenose buvo mažesnė tarp biologiniais RA ligos eigą modifikuojančiais preparatais gydomų pacientų. Šio tyrimo metu nebuvo atliekamas gydymui skiriamų medikamentų kumuliacinės dozės

skaičiavimas bei vaistų vartojimo trukmės vertinimas, todėl gautų rezultatų priežastinis ryšys turėtų būti vertinamas atskiru tyrimu. Visgi, šiame tyrime nustatytos asociacijos tarp bDMARDs vartojimo ir miRNR raiškos paantrina prielaidai, kad bDMARDs teigiamai veikia periodonto audinius, o šis poveikis gali būti nustatomas ir per miRNR raišką.

Dalies validavimui atrinktų miRNR - miR-30a-5p, miR-125a-3p, miR-423-5p, miR-630, miR-1273g-3p - raiška buvo sumažėjusi PD pažeistuose audiniuose ir (arba) neigiamai koreliavo su PD ligos klinikiniais rodikliais. Iš jų išsiskyrė miR-125a-3p, kurios raiška uždegiminėse dantenose buvo sumažėjusi 2,4 karto bei neigiamai koreliavo su daugeliu sunkesnės PD eigos rodiklių. Tyrimais nustatyta, kad miR-125a-3p sumažėjimas yra susijęs su navikinių ląstelių proliferacija [232], intensyvesniu uždegimu RA pažeistose sinovijaus ląstelėse [233] bei danties pulpos audiniuose [234]. Šios miRNR diagnostinės ir terapinės savybės plačiai tiriamos onkologijoje [235, 236]. Tuo tarpu, periodontologijos srityje, Kamal ir kolegos (2020 m.) nustatė miR-125a-3p kiekio padidėjimą tiriamųjų sergančių PD seilėse mikrogardelių metodu, visgi, autoriai teigia, kad tai yra preliminarus tyrimas ir rezultatai turi būti interpretuojami atsizvelgiant į tai, kad identifikuoti pokyčiai nebuvo validuoti AT-kPGR metodu [237]. Šiame tyrime būtent validavimo metu buvo atskleistas miR-125a-3p raiškos sumažėjimas, nepaisant to, kad mikrogardelių tyrimas atskleidė miR-125a padidėjimą PD pažeistuose audiniuose.

Atliktame tyrime miRNR identifikavimui pasirinkta analizė mikrogardelėmis ir identifikuotų pokyčių validavimas AT-kPGR metodu yra plačiausiai naudojami tyrimo metodai panašaus pobūdžio tyrimuose [18]. Visgi, ne visi mikrogardelėmis identifikuoti pokyčiai buvo validuoti AT-kPGR metodu, o miR-125a-3p atveju šiais metodais netgi nustatyta priešinga raiška PD pažeistuose audiniuose. Panašūs neatitikimai tarp mikrogardelių ir AT-kPGR rezultatų gauti ir kituose tyrimuose, o tai galimai susiję su šių metodų technoliniais aspektais [238-240]. Dalis panašių tyrimų, kurie siekia įvertinti miRNR sąsajas su PD ir nustatyti šių miRNR kiekį organizmo skysčiuose ne visais atvejais atlieka mikrogardelėmis nustatytų pokyčių validavimą AT-kPGR metodu arba vertina miRNR sąsajas tiesiogiai pasirinktoje terpėje (pvz., kraujo plazmoje ar seilėse) be miRNR analizės dantenų audinyje [18]. Siekiant kuo objektyvesnių rezultatų, šiame tyrime organizmo skysčiuose buvo vertintos tik tos miRNR, kurių raiška buvo padidėjusi dantenų audinyje. Trys iš keturių atrinktų miRNR (miR-140-3p, miR-145-5p, miR-195) buvo reikšmingai padidėjusios PD pažeistuose audiniuose tiek vertinant mikrogardelių, tiek ir AT-kPGR metodu. Tuo tarpu, ketvirtosios atrinktos miRNR (miR-146a) padidėjusi raiška PD pažeistuose

audiniuose fiksuota tik mikrogardelių metodu. Visgi, miR-146a-5p yra viena iš labiausiai su PD siejamų miRNR nepaisant to, kad tyrimai nustato šios miRNR padidėjimą ir sumažėjimą PD pažeistuose audiniuose [19].

5.3 miRNR analizė organizmo skysčiuose

miRNR analizė DVS, seilėse ir kraujo plazmoje buvo atlikta vertinant miR-140-3p, -145-5p, -146a-5p ir -195-5p kiekio sąsajas su PD klinikiniais ir patologiniais rodikliais bei apskaičiuojant šių miRNR diagnostinį potencialą. DVS išsiskyrė kaip labiausiai miRNR raišką dantenose atkartojanti diagnostinė terpė. Tai galimai susiję su DVS formavimusi, nes DVS susidaro audinių skysčiui filtruojantis į dantenų vagelę per jungties epitelio ląsteles. DVS sudėtis ir kiekis kinta priklausomai nuo dantenų būklės, esant uždegimui – DVS kiekis didėja bei jame padaugėja įvairių uždegiminių mediatorių koncentracija [241]. Šiame tyrime nustatytas miR-140-3p bei miR-145-5p raiškos padidėjimas PD pažeistuose audiniuose taip pat buvo stebimas ir dantenų vagelės skystyje. miR-140-3p ir miR-145-5p kiekis DVS koreliavo su daugeliu klinikinių rodiklių būdingų sunkesnei PD eigai, o didžiausias šių miRNR kiekis nustatytas sunkiu PD sergančių asmenų dantenų vagelės skystyje. Saito ir kolegų 2017 m. atliktas tyrimas taip pat atskleidė padidėjusią miR-145-5p koncentraciją PD sergančiųjų asmenų DVS [242], kai kituose tyrimuose, kurie analizavo su PD susijusių miRNR DVS koncentraciją, nevertintas miR-140-3p ir miR-145-5p kiekis. Įdomu tai, kad mūsų tyrime nustatytas reikšmingas miR-146a-5p kiekio sumažėjimas PD sergančių asmenų DVS bei šios miRNR neigiama koreliacija su daugeliu sunkesnei PD eigai būdingų rodiklių. miR-146a-5p yra itin plačiai tiriama periodontologijoje dėl šios miRNR dalyvavimo uždegiminio atsako moduliavime. Manoma, kad miR-146a-5p neigiamu grįžtamuoju ryšiu slopina TNF- α raišką veikdama per NF- κ B signalinį kelią [243]. Nustatyta, kad monocitines ląsteles paveikus LPS padidėja miR-146a-5p raiška, kuri mažina NF- κ B kelio aktyvaciją ir slopina uždegiminį atsaką [244]. Ši apsauginė monocitų savybė svarbi apsisaugant nuo ilgai trunkančio, lėtinio uždegimo. Atsižvelgiant į tai, anksčiau buvo daryta prielaida, kad miR-146a-5p kiekio sumažėjimas gali būti susijęs su ilgai trunkančiomis lėtinėmis uždegiminėmis būklėmis tokiomis kaip PD [208]. Eksperimentiniu tyrimu su pelėmis nustatyta, kad intraveniniu būdu leidžiama miR-146a-5p sumažina TNF- α , Mcp-1 ir IL-6 koncentraciją dantenose [198]. Atsižvelgiant į ankstesnių mokslo tyrimų duomenis, galima daryti prielaidą, kad miR-146a-5p koncentracija kinta skirtingose uždegimo stadijose, o šios miRNR trūkumas gali būti susijęs su sunkesne PD ligos eiga.

Įvertinus atrinktų miRNR diagnostines savybes DVS, tik miR-146a-5p turėjo reikšmingą AUC vertę, o jautrumas ir specifiškumas atitinkamai siekė 61,2 proc. ir 60,5 proc. Pavienių molekulių žema diagnostinė vertė periodontologijoje aprašyta ir ankstiniuose tyrimuose, kurie vertino pagrindinius uždegiminius mediatorius – IL-1 β (jautrumas – 78,7 proc., specifiškumas – 78,0 proc.) ir MMP-8 (jautrumas – 75,5 proc., specifiškumas – 77,0 proc.) [33, 245]. Įrodyta, kad molekulių deriniai pasižymi geresnėmis diagnostinėmis savybėmis nei pavienės molekulės. Jin ir kolegų 2020 m. atliktame tyrime 17 miRNR kombinacijos vertinimas dantenų audinyje turėjo 0,996 AUC [246]. Tuo tarpu, onkologijoje klinikinėje praktikoje taikomas diagnostikos rinkinys paremtas 10 miRNR kombinacija [247]. Šio tyrimo metu, įvertinus tirtų miRNR derinių diagnostines savybes, miR-140-3p/-145-5p/-146a-5p derinys pasižymėjo aukščiausia AUC reikšmė – 0,665. Svarbu, kad šiame tyrime buvo stebima tendencija, jog kai kurių miRNR reikšmingos asociacijos yra nustatomos tik lyginant sunkios formos PD su periodontologiškai sveikais asmenimis (pvz., miR-140-3p ir miR-145-5p kiekis DVS). Atsižvelgiant į tai, mes įvertinome atrinktų miRNR diagnostines savybes sunkios (III – IV stadijos) bei lengvos ir vidutinės (I-II stadijos) PD eigos atveju. Sunkios formos PD diagnostikoje, miR-140-3p, miR-145-5p ir miR-146a-5p turėjo reikšmingą diagnostinę vertę, o šių molekulių kombinacija pasižymėjo aukščiausia AUC reikšmė, kuri siekė 0,71. Pažymėtina, kad pavienės miRNR neturėjo reikšmingų diagnostinių savybių lengvo ar vidutinio sunkumo PD atveju, tačiau miR-140-3p/-145-5p/-146a-5p derinys pasižymėjo reikšminga diagnostine verte. Remiantis šio ir ankstesnių tyrimų duomenimis, galima daryti prielaidą, kad, siekiant pagerinti miRNR diagnostines savybes ar siekiant nustatyti PD ankstyvose stadijose, racionalu analizuoti didesnės apimties miRNR derinių diagnostinę vertę.

Seilių mėginiuose įvertinus miR-140-3p, miR-145-5p, miR-146a-5p, miR-195-5p kiekio sąsajas su PD nustatyta, kad tik miR-145-5p koncentracijos padidėjimas buvo susijęs su PD klinikiniais rodikliais (BOP ir ZG). Šios miRNR padidėjusi raiška mūsų tyrime taip pat nustatyta PD pažeistuose audiniuose. Visgi, kitų miRNR kiekis seilėse nebuvo susijęs su PD bei nebuvo nustatyta reikšmingų diagnostinių savybių. Nors seilių miRNR diagnostika plačiai tiriama įvairių navikų atveju [248], periodontologijos srityje atlikta nedaug tyrimų, o gauti rezultatai prieštaringi [223]. Fujimori ir kolegų 2021 m. atliktame tyrime iš 84 tirtų miRNR, tik miR-381-3p buvo reikšmingai didesnės koncentracijos tarp sunkiu PD sergančių tiriamųjų [239]. Kitame šių tyrėjų grupės tyrime nustatytos nenuoseklios miRNR sąsajos su PD vertinant mikorgardelių ir AT-kPGR metodu [249]. Tikėtina, tai susiję su

pasirinktu metodu bei seilių mėginių paruošimu. Ši prielaida patikrinta Han ir kolegų atliktame tyrime (2020 m.), kuriame buvo lyginta, kaip skiriasi miRNR diagnostinė vertė tiriant bendrą seilių miRNR kiekį arba vertinant tik iš seilių išskirtų egzosomų miRNR kiekį [250]. Tyrėjai atskleidė, kad vertinant bendrą seilių miRNR kiekį nebuvo nustatyta reikšmingų miRNR sąsajų su PD. Tuo tarpu, vertinant tik egzosomų miRNR kiekį, miR-140-5p, miR-146a-5p ir miR-628-5p buvo reikšmingai padidėjusios tiriamųjų sergančių PD seilių mėginiuose. Mūsų tyrime buvo taikytas bendro seilių miRNR kiekio įvertinimas didžiausioje iki šiol aprašytoje seilių mėginių imtyje, bet, nustatytos tik pavienės asociacijos tarp miR-145-5p kiekio ir PD klinikinių rodiklių. Tikėtina, kad tolesnius tyrimus šioje srityje būtų tikslinga atlikti ne tik vertinant kitų miRNR sąsajas, bet ir taikant alternatyvius miRNR išskyrimo metodus.

Šio tyrimo metu taip pat įvertintos atrinktų miRNR sąsajos PD sergančiųjų kraujo plazmoje. DVS bei seilių atveju miRNR pokyčiai galimai susiję su tiesioginiu molekulių patekimu į šias terpes. Tuo tarpu, kraujo plazmoje, tikėtina, pakitusi plazmos miRNR koncentracija yra labiau susijusi su PD sukeliama lėtine uždegimine būkle ar kitais antriniais padariniais. Šiame tyrime kraujo plazmoje nustatytas miR-140-3p ir miR-146a-5p kiekio padidėjimas bei miR-145-5p kiekio sumažėjimas buvo susijęs su PD. Panašius duomenis gavo Bagavad ir kolegos (2019 m.), kurie nustatė miR-146a-5p kiekio padidėjimą [211], o Yoneda ir bendraautorai (2019 m.) nustatė miR-664a-3p, miR-501-5p ir miR-21-3p kiekio padidėjimą PD sergančiųjų serume [240]. Mūsų tyrime plazmoje nustatytas miR-140-3p ir miR-146a-5p kiekio padidėjimas taip pat buvo stebimas ir dantenų audinyje. Visgi, miR-145-5p, kuri buvo padidėjusi PD pažeistuose audiniuose, plazmoje buvo sumažėjusios koncentracijos. Šiuo metu nėra publikuotų tyrimų, kuriuose toje pačioje imtyje būtų vertinama miRNR raiška dantenose ir koncentracija kraujo plazmoje. Tuo tarpu, Kamal ir kolegų atliktas tyrimas palygino su PD susijusių miRNR kiekį plazmoje bei seilėse ir nustatė, kad miRNR koncentracijos bei sąsajos su PD šiose terpėse skiriasi [237]. Tyrėjai teigė, kad plazmos mėginiuose miRNR pasižymi geresnėmis diagnostinėmis savybėmis. Šiam teiginiui paantrina ir mūsų tyrime gauti duomenys, nes plazmoje, priešingai nei seilėse, miR-140-3p/-145-5p/-146a-5p/-195-5p derinys turėjo reikšmingą diagnostinę vertę ($AUC = 0,584$).

Šio tyrimo dizainas susijęs su keletu trūkumų ir privalumų. Didelė tiriamųjų imtis yra nehomogeniška ir buvo nustatyti amžiaus, lyties ir kt., skirtumai tarp grupių. Taip pat, dalies surinktų mėginių miRNR koncentracija buvo nepakankama analizei, todėl skiriasi biologinių mėginių imties dydžiai.

Visgi, tai yra pirmasis didelės apimties tyrimas taikęs nuoseklų miRNR atrinkimą PD pažeistuose audiniuose ir tų pačių miRNR įvertinimą DVS, seilėse ir plazmoje. Kaip ir ankstesniuose tyrimuose, miRNR raiška dantenose ne visada sutapo vertinant visuminės raiškos ir AT-kPGR metodu. Vis dėl to, miR-140-3p ir miR-145-5p išsiskyrė kaip itin su PD dantenose susijusios miRNR. Įvertinus 4 atrinktų miRNR kieki DVS buvo atskleista daug sąsajų, kurios nustatytos ir dantenose – įskaitant miR-140-3p ir miR-145-5p koreliaciją su PD klinikiniais rodikliais ir kt., bet seilėse buvo stebėtos tik pavienės sąsajos su PD, įskaitant miR-145-5p asociacijas su BOP ir ZG. Šis tyrimas ir ankstesni tyrimai atskleidžia, kad seilėse miRNR sąsajos su PD sunkiai nustatomos. Pažymėtina, kad kraujo plazmoje miR-140-3p, miR-145-5p ir miR-146a-5p buvo susijusios su PD, visgi kiekybiniai skirtumai plazmoje buvo nenuoseklūs lyginant su dantenu audiniu. Galiausiai, RA ir biologiniai ligos eigą modifikuojantys vaistai buvo susiję su PD klinikinės eigos rodikliais bei su miRNR raiška dantenu audinyje.

IŠVADOS

1. Visuminės miRNR raiškos metodu nustatytos 177 reikšmingai pakitusios raiškos miRNR lyginant periodontito pažeistus ir sveikus dantenu audinius. Daugumos miRNR (N = 140) raiška buvo padidėjusi periodontito pažeistuose dantenu audiniuose. Tyrimo imtyje stebėtos asociacijos tarp periodontito ir reumatoidinio artrito klinikinės eigos atsiskleidė ir per miRNR raiškos pokyčius dantenose, nes buvo stebimos tam tikrų miRNR raiškos sąsajos su reumatologine būkle.
2. AT-kPGR metodu nustatyta padidėjusi miR-145-5p ($P < 0,001$) ir miR-140-3p ($P = 0,013$) raiška periodontito pažeistuose dantenu audiniuose. Sunkios ir (arba) vidutinės formos periodontito atveju nustatytas didesnis miR-145-5p, miR-140-3p, miR-195-5p kiekis dantenose. Šiame skerspjūvio tyrime biologinių vaistų vartojimas buvo susijęs su mažesne miR-140-3p, miR-195-5p bei didesne miR-125a-3p raiška dantenu audiniuose.
3. Sunkių periodontitu sergančių asmenų dantenu vagelės skystyje nustatytas didesnis miR-140-3p, miR-145-5p ir mažesnis miR-146a-5p kiekis lyginant su periodontologiškai sveikų asmenų DVS. Seilių mėginiuose miR-145-5p kiekis buvo susijęs su didesniu kraujavimo po zondavimo indeksu bei vidutiniu zondavimo gyliu. Kraujo plazmoje miR-140-3p ir miR-146a-5p kiekio padidėjimas bei miR-145-5p kiekio sumažėjimas buvo susijęs su periodontitu ir (arba) klinikiniais ligos rodikliais.
4. Tyrimo imtyje dantenu vagelės skystyje aptinkamų miRNR diagnostinės savybės periodontito diagnostikai buvo geresnės nei seilėse ar kraujo plazmoje aptinkamų miRNR. Dantenu vagelės skystyje miR-140-3p/-145-5p/-146a-5p derinio diagnostinė vertė ($AUC = 0,655$, jautrumas – 62,69 proc., specifiskumas – 61,84 proc., $P < 0,001$) buvo didesnė nei pavienių miRNR.

PRAKTINĖS REKOMENDACIJOS

Klinikiniam naudojimui

- Atsižvelgiant į tyrimo imtyje nustatytą didelį PD paplitimą RA sergančių pacientų grupėje, asmenims, kuriems diagnozuotas RA rekomenduojama atlikti periodontologinės būklės įvertinimą ir, esant indikacijoms, skirti gydymą. Lėtinės infekcijos periodonto audiniuose slopinimas yra aktualus siekiant efektyvesnės RA simptomų kontrolės.
- RA sergančių asmenų PD klinikinė išraiška gali būti susijusi su biologinių ligos eigą modifikuojančių vaistų vartojimu. Rekomenduojama į tai atsižvelgti vertinant periodontologinio gydymo rezultatus ir renkantis PD gydymo taktiką.

Mokslo tikslams

- DVS aptinkamų miRNR (konkrečiai - miR-140-3p, miR-145-5p, miR-146a-5p) diagnostinės savybės PD diagnostikai yra geresnės nei seilėse ar kraujo plazmoje aptinkamų miRNR. Siekiant sukurti miRNR nustatymu paremtą neinvazyvų PD diagnostikos metodą, rekomenduojama tyrimus tęsti tiriant miRNR sąsajas su PD dantenu vagelės skystyje.
- Atsižvelgiant į tai, jog šiame tyrime ir kituose publikuotuose tyrimuose seilėse nustatytos tik pavienės miRNR kiekio sąsajos su PD klinikiniais-patologiniais rodikliais, rekomenduojama seilių miRNR kiekį vertinti taikant alternatyvius miRNR išskyrimo metodus.
- miRNR derinių diagnostinės savybės yra geresnės nei pavienių miRNR. Tobulinant miRNR paremtus diagnostinius metodus rekomenduojama tęsti potencialiai su PD susijusių miRNR identifikavimą ir jų derinių diagnostinių savybių vertinimą.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Page RC, Eke PI. Case definitions for use in population-based surveillance of periodontitis. *J Periodontol.* 2007 Jul;78(7 Suppl):1387-99. doi: 10.1902/jop.2007.060264. PMID: 17608611.
2. Eke PI, Dye BA, Wei L, Thornton-Evans GO, Genco RJ; CDC Periodontal Disease Surveillance workgroup: James Beck (University of North Carolina, Chapel Hill, USA), Gordon Douglass (Past President, American Academy of Periodontology), Roy Page (University of Washin. Prevalence of periodontitis in adults in the United States: 2009 and 2010. *J Dent Res.* 2012 Oct;91(10):914-20. doi: 10.1177/0022034512457373. Epub 2012 Aug 30. PMID: 22935673.
3. Haworth S, Shungin D, Kwak SY, Kim HY, West NX, Thomas SJ, Franks PW, Timpson NJ, Shin MJ, Johansson I. Tooth loss is a complex measure of oral disease: Determinants and methodological considerations. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2018 Dec;46(6):555-562. doi: 10.1111/cdoe.12391. Epub 2018 Jun 29. PMID: 29956852; PMCID: PMC6282797.
4. Bansal M, Khatri M, Taneja V. Potential role of periodontal infection in respiratory diseases - a review. *J Med Life.* 2013 Sep 15;6(3):244-8. Epub 2013 Sep 25. PMID: 24155782; PMCID: PMC3786481.
5. Sanz M, Marco Del Castillo A, Jepsen S, Gonzalez-Juanatey JR, D'Aiuto F, Bouchard P, Chapple I, Dietrich T, Gotsman I, Graziani F, Herrera D, Loos B, Madianos P, Michel JB, Perel P, Pieske B, Shapira L, Shechter M, Tonetti M, Vlachopoulos C, Wimmer G. Periodontitis and cardiovascular diseases: Consensus report. *J Clin Periodontol.* 2020 Mar;47(3):268-288. doi: 10.1111/jcpe.13189. Epub 2020 Feb 3. PMID: 32011025; PMCID: PMC7027895.
6. Hajishengallis G, Chavakis T. Local and systemic mechanisms linking periodontal disease and inflammatory comorbidities. *Nat Rev Immunol.* 2021 Jul;21(7):426-440. doi: 10.1038/s41577-020-00488-6. Epub 2021 Jan 28. PMID: 33510490; PMCID: PMC7841384.
7. Bingham CO 3rd, Moni M. Periodontal disease and rheumatoid arthritis: the evidence accumulates for complex pathobiologic interactions. *Curr Opin Rheumatol.* 2013 May;25(3):345-53. doi: 10.1097/BOR.0b013e32835fb8ec. PMID: 23455329; PMCID: PMC4495574.
8. van der Woude D, van der Helm-van Mil AHM. Update on the epidemiology, risk factors, and disease outcomes of rheumatoid arthritis.

- Best Pract Res Clin Rheumatol. 2018 Apr;32(2):174-187. doi: 10.1016/j.berh.2018.10.005. Epub 2018 Nov 16. PMID: 30527425.
9. Qiao Y, Wang Z, Li Y, Han Y, Zhou Y, Cao X. Rheumatoid arthritis risk in periodontitis patients: A systematic review and meta-analysis. *Joint Bone Spine*. 2020 Dec;87(6):556-564. doi: 10.1016/j.jbspin.2020.04.024. Epub 2020 Jun 25. PMID: 32593704.
 10. Del Rei Daltro Rosa CD, de Luna Gomes JM, Dantas de Moraes SL, Araujo Lemos CA, Minatel L, Justino de Oliveira Limirio JP, Pellizzer EP. Does non-surgical periodontal treatment influence on rheumatoid arthritis? A systematic review and meta-analysis. *Saudi Dent J*. 2021 Dec;33(8):795-804. doi: 10.1016/j.sdentj.2021.09.007. Epub 2021 Sep 14. PMID: 34916763; PMCID: PMC8670789.
 11. Rodríguez-Lozano B, González-Febles J, Garnier-Rodríguez JL, Dadlani S, Bustabad-Reyes S, Sanz M, Sánchez-Alonso F, Sánchez-Piedra C, González-Dávila E, Díaz-González F. Association between severity of periodontitis and clinical activity in rheumatoid arthritis patients: a case-control study. *Arthritis Res Ther*. 2019 Jan 18;21(1):27. doi: 10.1186/s13075-019-1808-z. PMID: 30658685; PMCID: PMC6339403.
 12. Hussain SB, Botelho J, Machado V, Zehra SA, Mendes JJ, Ciurtin C, Orlandi M, D'Aiuto F. Is there a bidirectional association between rheumatoid arthritis and periodontitis? A systematic review and meta-analysis. *Semin Arthritis Rheum*. 2020 Jun;50(3):414-422. doi: 10.1016/j.semarthrit.2020.01.009. Epub 2020 Jan 31. PMID: 32113837.
 13. Kobayashi T, Yoshie H. Host Responses in the Link Between Periodontitis and Rheumatoid Arthritis. *Curr Oral Health Rep*. 2015;2(1):1-8. doi: 10.1007/s40496-014-0039-2. PMID: 25657893; PMCID: PMC4312392.
 14. Marotte H, Farge P, Gaudin P, Alexandre C, Mougin B, Miossec P. The association between periodontal disease and joint destruction in rheumatoid arthritis extends the link between the HLA-DR shared epitope and severity of bone destruction. *Ann Rheum Dis*. 2006 Jul;65(7):905-9. doi: 10.1136/ard.2005.036913. Epub 2005 Nov 10. PMID: 16284099; PMCID: PMC1798215.
 15. Silosi I, Cojocar M, Foia L, Boldeanu MV, Petrescu F, Surlin P, Biciusca V. Significance of circulating and crevicular matrix metalloproteinase-9 in rheumatoid arthritis-chronic periodontitis association. *J Immunol Res*. 2015;2015:218060. doi: 10.1155/2015/218060. Epub 2015 Mar 3. PMID: 25821836; PMCID: PMC4363716.

16. Plotnikova O, Baranova A, Skoblov M. Comprehensive Analysis of Human microRNA-mRNA Interactome. *Front Genet.* 2019 Oct 8;10:933. doi: 10.3389/fgene.2019.00933. PMID: 31649721; PMCID: PMC6792129.
17. Catto JW, Alcaraz A, Bjartell AS, De Vere White R, Evans CP, Fussel S, Hamdy FC, Kallioniemi O, Mengual L, Schlomm T, Visakorpi T. MicroRNA in prostate, bladder, and kidney cancer: a systematic review. *Eur Urol.* 2011 May;59(5):671-81. doi: 10.1016/j.eururo.2011.01.044. Epub 2011 Feb 1. PMID: 21296484.
18. Li J, Wang R, Ge Y, Chen D, Wu B, Fang F. Assessment of microRNA-144-5p and its putative targets in inflamed gingiva from chronic periodontitis patients. *J Periodontal Res.* 2019 Jun;54(3):266-277. doi: 10.1111/jre.12627. Epub 2018 Nov 18. PMID: 30450635.
19. Asaad F, Garaicoa-Pazmiño C, Dahlin C, Larsson L. Expression of MicroRNAs in Periodontal and Peri-Implant Diseases: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Int J Mol Sci.* 2020 Jun 10;21(11):4147. doi: 10.3390/ijms21114147. PMID: 32532036; PMCID: PMC7312949.
20. Nair PN. On the causes of persistent apical periodontitis: a review. *Int Endod J.* 2006 Apr;39(4):249-81. doi: 10.1111/j.1365-2591.2006.01099.x. PMID: 16584489.
21. Kassebaum NJ, Bernabé E, Dahiya M, Bhandari B, Murray CJ, Marcenes W. Global burden of severe periodontitis in 1990-2010: a systematic review and meta-regression. *J Dent Res.* 2014 Nov;93(11):1045-53. doi: 10.1177/0022034514552491. Epub 2014 Sep 26. PMID: 25261053; PMCID: PMC4293771.
22. Eke PI, Wei L, Borgnakke WS, Thornton-Evans G, Zhang X, Lu H, McGuire LC, Genco RJ. Periodontitis prevalence in adults \geq 65 years of age, in the USA. *Periodontol 2000.* 2016 Oct;72(1):76-95. doi: 10.1111/prd.12145. PMID: 27501492; PMCID: PMC8223257.
23. Skuduryte R, Aleksejuniene J, Eriksen HM. Dental caries in adult Lithuanians. *Acta odontologica Scandinavica*, 2000, 58(4): P.143-147.
24. Natto ZS, Abu Ahmad RH, Alsharif LT, Alrowithi HF, Alsini DA, Salih HA, Bissada NF. Chronic Periodontitis Case Definitions and Confounders in Periodontal Research: A Systematic Assessment. *Biomed Res Int.* 2018 Nov 28;2018:4578782. doi: 10.1155/2018/4578782. PMID: 30622957; PMCID: PMC6304204.
25. Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol.* 1999 Dec;4(1):1-6. doi: 10.1902/annals.1999.4.1.1. PMID: 10863370.

26. Tonetti MS, Greenwell H, Kornman KS. Staging and grading of periodontitis: Framework and proposal of a new classification and case definition. *J Periodontol.* 2018 Jun;89 Suppl 1:S159-S172. doi: 10.1002/JPER.18-0006. Erratum in: *J Periodontol.* 2018 Dec;89(12):1475. PMID: 29926952.
27. D'Ercole S, Catamo G, Piccolomini R. Diagnosis in periodontology: a further aid through microbiological tests. *Crit Rev Microbiol.* 2008;34(1):33-41. doi: 10.1080/10408410701693317. PMID: 18259979.
28. Morita M, Wang HL. Relationship of sulcular sulfide level to severity of periodontal disease and BANA test. *J Periodontol.* 2001 Jan;72(1):74-8. doi: 10.1902/jop.2001.72.1.74. PMID: 11210076.
29. Lamster IB, Ahlo JK. Analysis of gingival crevicular fluid as applied to the diagnosis of oral and systemic diseases. *Ann N Y Acad Sci.* 2007 Mar;1098:216-29. doi: 10.1196/annals.1384.027. PMID: 17435131.
30. Huynh QN, Wang S, Tafolla E, Gansky SA, Kapila S, Armitage GC, Kapila YL. Specific fibronectin fragments as markers of periodontal disease status. *J Periodontol.* 2002 Oct;73(10):1101-10. doi: 10.1902/jop.2002.73.10.1101. PMID: 12416766.
31. Kooijman G, Rmaile AH, Glasse C, De Jager MKJ, Chapple ILC, Grant MM, Preshw P, Taylor J, Hartkamp MAV. Diagnostics of mild or advanced periodontitis. European Patent No. EP3553525A1.2018. European Patent Office.
32. Chatterjea S, De Jager MKJ, Rmaile AH, Kooijman G, Hartkamp MAV, Preshw P, Taylor J. Diagnostics of mild or advanced periodontitis based on salivary Il-1beta and MMP-9.European Patent No. EP3407068A1. 2017. European Patent Office.
33. Kim HD, Shin MS, Kim HT, Kim MS, Ahn YB. Incipient periodontitis and salivary molecules among Korean adults: association and screening ability. *J Clin Periodontol.* 2016 Dec;43(12):1032-1040. doi: 10.1111/jcpe.12607. Epub 2016 Oct 3. PMID: 27487155.
34. Lendenmann U, Grogan J, Oppenheim FG. Saliva and dental pellicle--a review. *Adv Dent Res.* 2000 Dec;14:22-8. doi: 10.1177/08959374000140010301. PMID: 11842920.
35. Huang R, Li M, Gregory RL. Bacterial interactions in dental biofilm. Virulence. 2011 Sep-Oct;2(5):435-44. doi: 10.4161/viru.2.5.16140. Epub 2011 Sep 1. PMID: 21778817; PMCID: PMC3322631.
36. Aas JA, Paster BJ, Stokes LN, Olsen I, Dewhirst FE. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J Clin Microbiol.* 2005 Nov;43(11):5721-

32. doi: 10.1128/JCM.43.11.5721-5732.2005. PMID: 16272510; PMCID: PMC1287824.
37. Gao L, Xu T, Huang G, Jiang S, Gu Y, Chen F. Oral microbiomes: more and more importance in oral cavity and whole body. *Protein Cell*. 2018 May;9(5):488-500. doi: 10.1007/s13238-018-0548-1. Epub 2018 May 7. PMID: 29736705; PMCID: PMC5960472.
38. Radaic A, Kapila YL. The oralome and its dysbiosis: New insights into oral microbiome-host interactions. *Comput Struct Biotechnol J*. 2021 Feb 27;19:1335-1360. doi: 10.1016/j.csbj.2021.02.010. PMID: 33777334; PMCID: PMC7960681.
39. Bandara HMHN, Panduwawala CP, Samaranyake LP. Biodiversity of the human oral mycobioeme in health and disease. *Oral Dis*. 2019 Mar;25(2):363-371. doi: 10.1111/odi.12899. Epub 2018 Jun 11. PMID: 29786923.
40. Sztukowska MN, Dutton LC, Delaney C, Ramsdale M, Ramage G, Jenkinson HF, Nobbs AH, Lamont RJ. Community Development between *Porphyromonas gingivalis* and *Candida albicans* Mediated by InJ and Als3. *mBio*. 2018 Apr 24;9(2):e00202-18. doi: 10.1128/mBio.00202-18. PMID: 29691333; PMCID: PMC5915736.
41. Tamai R, Sugamata M, Kiyoura Y. *Candida albicans* enhances invasion of human gingival epithelial cells and gingival fibroblasts by *Porphyromonas gingivalis*. *Microb Pathog*. 2011 Oct;51(4):250-4. doi: 10.1016/j.micpath.2011.06.009. Epub 2011 Jul 1. PMID: 21742026.
42. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol*. 1998 Feb;25(2):134-44. doi: 10.1111/j.1600-051x.1998.tb02419.x. PMID: 9495612.
43. Abu Fanas S, Brigi C, Varma SR, Desai V, Senok A, D'souza J. The prevalence of novel periodontal pathogens and bacterial complexes in Stage II generalized periodontitis based on 16S rRNA next generation sequencing. *J Appl Oral Sci*. 2021 May 17;29:e20200787. doi: 10.1590/1678-7757-2020-0787. PMID: 34008792; PMCID: PMC8128322.
44. Nayak A, Bhat K, Shivanaikar S, Pushpa P, Kugaji M, Kumbar V. Detection of red complex organisms in chronic periodontitis by multiplex polymerase chain reaction. *J Adv Clin Res Insights* 2018;5:139-44 DOI:10.15713/ins.jcri.231
45. Holt SC, Ebersole JL. *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, and *Tannerella forsythia*: the "red complex", a prototype polybacterial

- pathogenic consortium in periodontitis. *Periodontol* 2000. 2005;38:72-122. doi: 10.1111/j.1600-0757.2005.00113.x. PMID: 15853938.
46. O'Brien-Simpson NM, Veith PD, Dashper SG, Reynolds EC. *Porphyromonas gingivalis* gingipains: the molecular teeth of a microbial vampire. *Curr Protein Pept Sci*. 2003 Dec;4(6):409-26. doi: 10.2174/1389203033487009. PMID: 14683427.
 47. Li N, Collyer CA. Gingipains from *Porphyromonas gingivalis* - Complex domain structures confer diverse functions. *Eur J Microbiol Immunol (Bp)*. 2011 Mar;1(1):41-58. doi: 10.1556/EuJMI.1.2011.1.7. PMID: 24466435; PMCID: PMC3894813.
 48. Basic A, Alizadehgharib S, Dahlén G, Dahlgren U. Hydrogen sulfide exposure induces NLRP3 inflammasome-dependent IL-1 β and IL-18 secretion in human mononuclear leukocytes *in vitro*. *Clin Exp Dent Res*. 2017 Jul 3;3(3):115-120. doi: 10.1002/cre2.69. PMID: 29744188; PMCID: PMC5719819.
 49. Zhang JH, Dong Z, Chu L. Hydrogen sulfide induces apoptosis in human periodontium cells. *J Periodontal Res*. 2010 Feb;45(1):71-8. doi: 10.1111/j.1600-0765.2009.01202.x. Epub 2009 Jul 8. PMID: 19602114.
 50. Nakano Y, Yoshimura M, Koga T. Methyl mercaptan production by periodontal bacteria. *Int Dent J*. 2002 Jun;52 Suppl 3:217-20. doi: 10.1002/j.1875-595x.2002.tb00928.x. PMID: 12090456.
 51. Niederman R, Zhang J, Kashket S. Short-chain carboxylic-acid-stimulated, PMN-mediated gingival inflammation. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1997;8(3):269-90. doi: 10.1177/10454411970080030301. PMID: 9260044.
 52. Niederman R, Buyle-Bodin Y, Lu BY, Robinson P, Naleway C. Short-chain carboxylic acid concentration in human gingival crevicular fluid. *J Dent Res*. 1997 Jan;76(1):575-9. doi: 10.1177/00220345970760010801. PMID: 9042080.
 53. Qiqiang L, Huanxin M, Xuejun G. Longitudinal study of volatile fatty acids in the gingival crevicular fluid of patients with periodontitis before and after nonsurgical therapy. *J Periodontal Res*. 2012 Dec;47(6):740-9. doi: 10.1111/j.1600-0765.2012.01489.x. Epub 2012 May 17. PMID: 22594616.
 54. Lu R, Meng H, Gao X, Xu L, Feng X. Effect of non-surgical periodontal treatment on short chain fatty acid levels in gingival crevicular fluid of patients with generalized aggressive periodontitis. *J Periodontal Res*. 2014 Oct;49(5):574-83. doi: 10.1111/jre.12137. PMID: 25340203.

55. Tsuda H, Ochiai K, Suzuki N, Otsuka K. Butyrate, a bacterial metabolite, induces apoptosis and autophagic cell death in gingival epithelial cells. *J Periodontal Res.* 2010 Oct;45(5):626-34. doi: 10.1111/j.1600-0765.2010.01277.x. Epub 2010 Jun 10. PMID: 20546110.
56. Garlet GP, Avila-Campos MJ, Milanezi CM, Ferreira BR, Silva JS. *Actinobacillus actinomycetemcomitans*-induced periodontal disease in mice: patterns of cytokine, chemokine, and chemokine receptor expression and leukocyte migration. *Microbes Infect.* 2005 Apr;7(4):738-47. doi: 10.1016/j.micinf.2005.01.012. Epub 2005 Mar 22. PMID: 15850760.
57. Venkatesan G, Upoor A, Naik DG. Redefining the role of dendritic cells in periodontics. *J Indian Soc Periodontol.* 2013 Nov;17(6):700-5. doi: 10.4103/0972-124X.124467. PMID: 24554876; PMCID: PMC3917196.
58. Newton K, Dixit VM. Signaling in innate immunity and inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2012 Mar 1;4(3):a006049. doi: 10.1101/cshperspect.a006049. PMID: 22296764; PMCID: PMC3282411.
59. Mogensen TH. Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. *Clin Microbiol Rev.* 2009 Apr;22(2):240-73, Table of Contents. doi: 10.1128/CMR.00046-08. PMID: 19366914; PMCID: PMC2668232.
60. Kawasaki T, Kawai T. Toll-like receptor signaling pathways. *Front Immunol.* 2014 Sep 25;5:461. doi: 10.3389/fimmu.2014.00461. PMID: 25309543; PMCID: PMC4174766.
61. Hans M, Hans VM. Toll-like receptors and their dual role in periodontitis: a review. *J Oral Sci.* 2011 Sep;53(3):263-71. doi: 10.2334/josnusd.53.263. PMID: 21959652.
62. Liu T, Zhang L, Joo D, Sun SC. NF- κ B signaling in inflammation. *Signal Transduct Target Ther.* 2017;2:17023-. doi: 10.1038/sigtrans.2017.23. Epub 2017 Jul 14. PMID: 29158945; PMCID: PMC5661633.
63. Zhang H, Sun SC. NF- κ B in inflammation and renal diseases. *Cell Biosci.* 2015 Nov 16;5:63. doi: 10.1186/s13578-015-0056-4. PMID: 26579219; PMCID: PMC4647710.
64. Sun SC. The noncanonical NF- κ B pathway. *Immunol Rev.* 2012 Mar;246(1):125-40. doi: 10.1111/j.1600-065X.2011.01088.x. PMID: 22435551; PMCID: PMC3313452.
65. Sun SC, Liu ZG. A special issue on NF- κ B signaling and function. *Cell Res.* 2011 Jan;21(1):1-2. doi: 10.1038/cr.2011.1. Epub 2011 Jan 3. PMID: 21196938; PMCID: PMC3193411.

66. O'Shea JJ, Paul WE. Mechanisms underlying lineage commitment and plasticity of helper CD4+ T cells. *Science*. 2010 Feb 26;327(5969):1098-102. doi: 10.1126/science.1178334. PMID: 20185720; PMCID: PMC2997673.
67. Wang N, Liang H, Zen K. Molecular mechanisms that influence the macrophage m1-m2 polarization balance. *Front Immunol*. 2014 Nov 28;5:614. doi: 10.3389/fimmu.2014.00614. PMID: 25506346; PMCID: PMC4246889.
68. Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol*. 1986 Apr 1;136(7):2348-57. PMID: 2419430.
69. Aoki-Nonaka Y, Nakajima T, Miyauchi S, Miyazawa H, Yamada H, Domon H, Tabeta K, Yamazaki K. Natural killer T cells mediate alveolar bone resorption and a systemic inflammatory response in response to oral infection of mice with *Porphyromonas gingivalis*. *J Periodontol Res*. 2014 Feb;49(1):69-76. doi: 10.1111/jre.12080. Epub 2013 Apr 16. PMID: 23586756.
70. Cekici A, Kantarci A, Hasturk H, Van Dyke TE. Inflammatory and immune pathways in the pathogenesis of periodontal disease. *Periodontol 2000*. 2014 Feb;64(1):57-80. doi: 10.1111/prd.12002. PMID: 24320956; PMCID: PMC4500791.
71. Herrmann JM, Meyle J. Neutrophil activation and periodontal tissue injury. *Periodontol 2000*. 2015 Oct;69(1):111-27. doi: 10.1111/prd.12088. PMID: 26252405.
72. Alnaeeli M, Park J, Mahamed D, Penninger JM, Teng YT. Dendritic cells at the osteo-immune interface: implications for inflammation-induced bone loss. *J Bone Miner Res*. 2007 Jun;22(6):775-80. doi: 10.1359/jbmr.070314. PMID: 17352656.
73. Jin Q, Cirelli JA, Park CH, Sugai JV, Taba M Jr, Kostenuik PJ, Giannobile WV. RANKL inhibition through osteoprotegerin blocks bone loss in experimental periodontitis. *J Periodontol*. 2007 Jul;78(7):1300-8. doi: 10.1902/jop.2007.070073. PMID: 17608585; PMCID: PMC2583091.
74. Wei S, Kitaura H, Zhou P, Ross FP, Teitelbaum SL. IL-1 mediates TNF-induced osteoclastogenesis. *J Clin Invest*. 2005 Feb;115(2):282-90. doi: 10.1172/JCI23394. PMID: 15668736; PMCID: PMC544608.
75. Yakar N, Guncu GN, Akman AC, Pinar A, Karabulut E, Nohutcu RM. Evaluation of gingival crevicular fluid and peri-implant crevicular fluid levels of sclerostin, TWEAK, RANKL and OPG. *Cytokine*. 2019

- Jan;113:433-439. doi: 10.1016/j.cyto.2018.10.021. Epub 2018 Oct 28. PMID: 30377055.
76. Diarra D, Stolina M, Polzer K, Zwerina J, Ominsky MS, Dwyer D, Korb A, Smolen J, Hoffmann M, Scheinecker C, van der Heide D, Landewe R, Lacey D, Richards WG, Schett G. Dickkopf-1 is a master regulator of joint remodeling. *Nat Med.* 2007 Feb;13(2):156-63. doi: 10.1038/nm1538. Epub 2007 Jan 21. PMID: 17237793.
 77. Socransky SS, Haffajee AD. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontol* 2000. 2002;28:12-55. doi: 10.1034/j.1600-0757.2002.280102.x. PMID: 12013340.
 78. Yang LC, Suen YJ, Wang YH, Lin TC, Yu HC, Chang YC. The Association of Periodontal Treatment and Decreased Pneumonia: A Nationwide Population-Based Cohort Study. *Int J Environ Res Public Health.* 2020 Jan 5;17(1):356. doi: 10.3390/ijerph17010356. PMID: 31948027; PMCID: PMC6982322.
 79. Paju S, Scannapieco FA. Oral biofilms, periodontitis, and pulmonary infections. *Oral Dis.* 2007 Nov;13(6):508-12. doi: 10.1111/j.1601-0825.2007.01410a.x. PMID: 17944664; PMCID: PMC2258093.
 80. Scannapieco FA, Stewart EM, Mylotte JM. Colonization of dental plaque by respiratory pathogens in medical intensive care patients. *Crit Care Med.* 1992 Jun;20(6):740-5. doi: 10.1097/00003246-199206000-00007. PMID: 1597025.
 81. CAGNANI A, BARROS AM de S, SOUSA LLA de, ZANIN L, BERGAMASCHI C de C, PERUZZO DC, FLÓRIO FM,. Periodontal disease as a risk factor for aspiration pneumonia: a systematic review . 2016. *Bioscience Journal* , vol. 32, no. 3. DOI 10.14393/BJ-v32n3a2016-33210.
 82. Hussain SP, Hofseth LJ, Harris CC. Radical causes of cancer. *Nat Rev Cancer.* 2003 Apr;3(4):276-85. doi: 10.1038/nrc1046. PMID: 12671666.
 83. Gao S, Li S, Ma Z, Liang S, Shan T, Zhang M, Zhu X, Zhang P, Liu G, Zhou F, Yuan X, Jia R, Potempa J, Scott DA, Lamont RJ, Wang H, Feng X. Presence of *Porphyromonas gingivalis* in esophagus and its association with the clinicopathological characteristics and survival in patients with esophageal cancer. *Infect Agent Cancer.* 2016 Jan 19;11:3. doi: 10.1186/s13027-016-0049-x. PMID: 26788120; PMCID: PMC4717526.
 84. Javed F, Warnakulasuriya S. Is there a relationship between periodontal disease and oral cancer? A systematic review of currently available evidence. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2016 Jan;97:197-205. doi: 10.1016/j.critrevonc.2015.08.018. Epub 2015 Aug 20. PMID: 26343577.

85. Iwai T. Periodontal bacteremia and various vascular diseases. *J Periodontal Res.* 2009 Dec;44(6):689-94. doi: 10.1111/j.1600-0765.2008.01165.x. PMID: 19874452.
86. Hussain M, Stover CM, Dupont A. *P. gingivalis* in Periodontal Disease and Atherosclerosis - Scenes of Action for Antimicrobial Peptides and Complement. *Front Immunol.* 2015 Feb 10;6:45. doi: 10.3389/fimmu.2015.00045. PMID: 25713575; PMCID: PMC4322733.
87. Haraszthy VI, Zambon JJ, Trevisan M, Zeid M, Genco RJ. Identification of periodontal pathogens in atheromatous plaques. *J Periodontol.* 2000 Oct;71(10):1554-60. doi: 10.1902/jop.2000.71.10.1554. PMID: 11063387.
88. Ference BA, Ginsberg HN, Graham I, Ray KK, Packard CJ, Bruckert E, Hegele RA, Krauss RM, Raal FJ, Schunkert H, Watts GF, Borén J, Fazio S, Horton JD, Masana L, Nicholls SJ, Nordestgaard BG, van de Sluis B, Taskinen MR, Tokgözoğlu L, Landmesser U, Laufs U, Wiklund O, Stock JK, Chapman MJ, Catapano AL. Low-density lipoproteins cause atherosclerotic cardiovascular disease. 1. Evidence from genetic, epidemiologic, and clinical studies. A consensus statement from the European Atherosclerosis Society Consensus Panel. *Eur Heart J.* 2017 Aug 21;38(32):2459-2472. doi: 10.1093/eurheartj/ehx144. PMID: 28444290; PMCID: PMC5837225.
89. Herzberg MC, Meyer MW. Effects of oral flora on platelets: possible consequences in cardiovascular disease. *J Periodontol.* 1996 Oct;67(10 Suppl):1138-42. doi: 10.1902/jop.1996.67.10s.1138. PMID: 8910832.
90. Mougeot JC, Stevens CB, Paster BJ, Brennan MT, Lockhart PB, Mougeot FK. *Porphyromonas gingivalis* is the most abundant species detected in coronary and femoral arteries. *J Oral Microbiol.* 2017 Feb 8;9(1):1281562. doi: 10.1080/20002297.2017.1281562. PMID: 28326156; PMCID: PMC5328378.
91. Bartova J, Sommerova P, Lyuya-Mi Y, Mysak J, Prochazkova J, Duskova J, Janatova T, Podzimek S. Periodontitis as a risk factor of atherosclerosis. *J Immunol Res.* 2014;2014:636893. doi: 10.1155/2014/636893. Epub 2014 Mar 23. PMID: 24741613; PMCID: PMC3987959.
92. Dominy SS, Lynch C, Ermini F, Benedyk M, Marczyk A, Konradi A, Nguyen M, Haditsch U, Raha D, Griffin C, Holsinger LJ, Arastu-Kapur S, Kaba S, Lee A, Ryder MI, Potempa B, Mydel P, Hellvard A, Adamowicz K, Hasturk H, Walker GD, Reynolds EC, Faull RLM, Curtis MA, Dragunow M, Potempa J. *Porphyromonas gingivalis* in Alzheimer's disease brains: Evidence for disease causation and treatment with small-

- molecule inhibitors. *Sci Adv.* 2019 Jan 23;5(1):eaau3333. doi: 10.1126/sciadv.aau3333. PMID: 30746447; PMCID: PMC6357742.
93. Pritchard AB, Crean S, Olsen I, Singhrao SK. Periodontitis, Microbiomes and their Role in Alzheimer's Disease. *Front Aging Neurosci.* 2017 Oct 24;9:336. doi: 10.3389/fnagi.2017.00336. PMID: 29114218; PMCID: PMC5660720.
94. Figuero E, Han YW, Furuichi Y. Periodontal diseases and adverse pregnancy outcomes: Mechanisms. *Periodontol* 2000. 2020 Jun;83(1):175-188. doi: 10.1111/prd.12295. PMID: 32385886.
95. Jarjoura K, Devine PC, Perez-Delboy A, Herrera-Abreu M, D'Alton M, Papapanou PN. Markers of periodontal infection and preterm birth. *Am J Obstet Gynecol.* 2005 Feb;192(2):513-9. doi: 10.1016/j.ajog.2004.07.018. PMID: 15695995.
96. Chambrone L, Guglielmetti MR, Pannuti CM, Chambrone LA. Evidence grade associating periodontitis to preterm birth and/or low birth weight: I. A systematic review of prospective cohort studies. *J Clin Periodontol.* 2011 Sep;38(9):795-808. doi: 10.1111/j.1600-051X.2011.01755.x. Epub 2011 Jun 26. PMID: 21707694.
97. Kumar A, Basra M, Begum N, Rani V, Prasad S, Lamba AK, Verma M, Agarwal S, Sharma S. Association of maternal periodontal health with adverse pregnancy outcome. *J Obstet Gynaecol Res.* 2013 Jan;39(1):40-5. doi: 10.1111/j.1447-0756.2012.01957.x. Epub 2012 Jul 29. PMID: 22845916.
98. Riewe SD, Mans JJ, Hirano T, Katz J, Shiverick KT, Brown TA, Lamont RJ. Human trophoblast responses to *Porphyromonas gingivalis* infection. *Mol Oral Microbiol.* 2010 Aug;25(4):252-9. doi: 10.1111/j.2041-1014.2010.00573.x. PMID: 20618699; PMCID: PMC3665294.
99. Govindasamy R, Periyasamy S, Narayanan M, Balaji VR, Dhanasekaran M, Karthikeyan B. The influence of nonsurgical periodontal therapy on the occurrence of adverse pregnancy outcomes: A systematic review of the current evidence. *J Indian Soc Periodontol.* 2020 Jan-Feb;24(1):7-14. doi: 10.4103/jisp.jisp_228_19. Epub 2020 Jan 2. PMID: 31983838; PMCID: PMC6961443.
100. Kampits C, Montenegro MM, Ribeiro IW, Furtado MV, Polanczyk CA, Rösing CK, Haas AN. Periodontal disease and inflammatory blood cytokines in patients with stable coronary artery disease. *J Appl Oral Sci.* 2016 Jul-Aug;24(4):352-8. doi: 10.1590/1678-775720160082. PMID: 27556206; PMCID: PMC4990364.

- 101.Li X, Kolltveit KM, Tronstad L, Olsen I. Systemic diseases caused by oral infection. *Clin Microbiol Rev.* 2000 Oct;13(4):547-58. doi: 10.1128/CMR.13.4.547. PMID: 11023956; PMCID: PMC88948.
- 102.Van Dyke TE, van Winkelhoff AJ. Infection and inflammatory mechanisms. *J Clin Periodontol.* 2013 Apr;40 Suppl 14:S1-7. doi: 10.1111/jcpe.12088. PMID: 23627321.
- 103.Franceschi C, Campisi J. Chronic inflammation (inflammaging) and its potential contribution to age-associated diseases. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2014 Jun;69 Suppl 1:S4-9. doi: 10.1093/gerona/glu057. PMID: 24833586.
- 104.Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes.* 2005 Jun;54(6):1615-25. doi: 10.2337/diabetes.54.6.1615. PMID: 15919781.
- 105.Preshaw PM, Alba AL, Herrera D, Jepsen S, Konstantinidis A, Makrilakis K, Taylor R. Periodontitis and diabetes: a two-way relationship. *Diabetologia.* 2012 Jan;55(1):21-31. doi: 10.1007/s00125-011-2342-y. Epub 2011 Nov 6. PMID: 22057194; PMCID: PMC3228943.
- 106.Hu FB, Meigs JB, Li TY, Rifai N, Manson JE. Inflammatory markers and risk of developing type 2 diabetes in women. *Diabetes.* 2004 Mar;53(3):693-700. doi: 10.2337/diabetes.53.3.693. PMID: 14988254.
- 107.Crook MA, Tutt P, Simpson H, Pickup JC. Serum sialic acid and acute phase proteins in type 1 and type 2 diabetes mellitus. *Clin Chim Acta.* 1993 Oct 15;219(1-2):131-8. doi: 10.1016/0009-8981(93)90204-h. PMID: 7508342.
- 108.Graziani F, Gennai S, Solini A, Petrini M. A systematic review and meta-analysis of epidemiologic observational evidence on the effect of periodontitis on diabetes An update of the EFP-AAP review. *J Clin Periodontol.* 2018 Feb;45(2):167-187. doi: 10.1111/jcpe.12837. Epub 2017 Dec 26. PMID: 29277926.
- 109.Simpson TC, Weldon JC, Worthington HV, Needleman I, Wild SH, Moles DR, Stevenson B, Furness S, Iheozor-Ejiofor Z. Treatment of periodontal disease for glycaemic control in people with diabetes mellitus. *Cochrane Database Syst Rev.* 2015 Nov 6;2015(11):CD004714. doi: 10.1002/14651858.CD004714.pub3. PMID: 26545069; PMCID: PMC6486035.
- 110.Polak D, Shapira L. An update on the evidence for pathogenic mechanisms that may link periodontitis and diabetes. *J Clin Periodontol.* 2018 Feb;45(2):150-166. doi: 10.1111/jcpe.12803. Epub 2017 Dec 26. PMID: 29280184.

111. Taylor JJ, Preshaw PM, Lalla E. A review of the evidence for pathogenic mechanisms that may link periodontitis and diabetes. *J Clin Periodontol.* 2013 Apr;40 Suppl 14:S113-34. doi: 10.1111/jcpe.12059. PMID: 23627323.
112. McInnes IB, Schett G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *N Engl J Med.* 2011 Dec 8;365(23):2205-19. doi: 10.1056/NEJMra1004965. PMID: 22150039.
113. Gibofsky A. Overview of epidemiology, pathophysiology, and diagnosis of rheumatoid arthritis. *Am J Manag Care.* 2012 Dec;18(13 Suppl):S295-302. PMID: 23327517.
114. McInnes IB, Schett G. Pathogenetic insights from the treatment of rheumatoid arthritis. *Lancet.* 2017 Jun 10;389(10086):2328-2337. doi: 10.1016/S0140-6736(17)31472-1. PMID: 28612747.
115. Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, Funovits J, Felson DT, Bingham CO 3rd, Birnbaum NS, Burmester GR, Bykerk VP, Cohen MD, Combe B, Costenbader KH, Dougados M, Emery P, Ferraccioli G, Hazes JM, Hobbs K, Huizinga TW, Kavanaugh A, Kay J, Kvien TK, Laing T, Mease P, Ménard HA, Moreland LW, Naden RL, Pincus T, Smolen JS, Stanislawski-Biernat E, Symmons D, Tak PP, Upchurch KS, Vencovský J, Wolfe F, Hawker G. 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum.* 2010 Sep;62(9):2569-81. doi: 10.1002/art.27584. PMID: 20872595.
116. Nishimura K, Sugiyama D, Kogata Y, Tsuji G, Nakazawa T, Kawano S, Saigo K, Morinobu A, Koshihara M, Kuntz KM, Kamae I, Kumagai S. Meta-analysis: diagnostic accuracy of anti-cyclic citrullinated peptide antibody and rheumatoid factor for rheumatoid arthritis. *Ann Intern Med.* 2007 Jun 5;146(11):797-808. doi: 10.7326/0003-4819-146-11-200706050-00008. PMID: 17548411.
117. van de Stadt LA, de Koning MH, van de Stadt RJ, Wolbink G, Dijkmans BA, Hamann D, van Schaardenburg D. Development of the anti-citrullinated protein antibody repertoire prior to the onset of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2011 Nov;63(11):3226-33. doi: 10.1002/art.30537. PMID: 21792832.
118. van Riel PL, Renskers L. The Disease Activity Score (DAS) and the Disease Activity Score using 28 joint counts (DAS28) in the management of rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol.* 2016 Sep-Oct;34(5 Suppl 101):S40-S44. Epub 2016 Oct 18. PMID: 27762189.

119. Massy-Westropp N, Ahern M, Krishnan J. A visual analogue scale for assessment of the impact of rheumatoid arthritis in the hand: validity and repeatability. *J Hand Ther.* 2005 Jan-Mar;18(1):30-3. doi: 10.1197/j.jht.2004.10.003. PMID: 15674784.
120. Singh JA, Saag KG, Bridges SL Jr, Akl EA, Bannuru RR, Sullivan MC, Vaysbrot E, McNaughton C, Osani M, Shmerling RH, Curtis JR, Furst DE, Parks D, Kavanaugh A, O'Dell J, King C, Leong A, Matteson EL, Schousboe JT, Drevlow B, Ginsberg S, Grober J, St Clair EW, Tindall E, Miller AS, McAlindon T. 2015 American College of Rheumatology Guideline for the Treatment of Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheumatol.* 2016 Jan;68(1):1-26. doi: 10.1002/art.39480. Epub 2015 Nov 6. PMID: 26545940.
121. van Venrooij WJ, Pruijn GJ. Citrullination: a small change for a protein with great consequences for rheumatoid arthritis. *Arthritis Res.* 2000;2(4):249-51. doi: 10.1186/ar95. Epub 2000 May 24. PMID: 11094435; PMCID: PMC130012.
122. György B, Tóth E, Tarcsa E, Falus A, Buzás EI. Citrullination: a posttranslational modification in health and disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2006;38(10):1662-77. doi: 10.1016/j.biocel.2006.03.008. Epub 2006 Mar 30. PMID: 16730216.
123. Wang Y, Li M, Stadler S, Correll S, Li P, Wang D, Hayama R, Leonelli L, Han H, Grigoryev SA, Allis CD, Coonrod SA. Histone hypercitrullination mediates chromatin decondensation and neutrophil extracellular trap formation. *J Cell Biol.* 2009 Jan 26;184(2):205-13. doi: 10.1083/jcb.200806072. Epub 2009 Jan 19. PMID: 19153223; PMCID: PMC2654299.
124. Dragoni G, De Hertogh G, Vermeire S. The Role of Citrullination in Inflammatory Bowel Disease: A Neglected Player in Triggering Inflammation and Fibrosis? *Inflamm Bowel Dis.* 2021 Jan 1;27(1):134-144. doi: 10.1093/ibd/izaa095. PMID: 32426830.
125. Lazarus RC, Buonora JE, Flora MN, Freedy JG, Holstein GR, Martinelli GP, Jacobowitz DM, Mueller GP. Protein Citrullination: A Proposed Mechanism for Pathology in Traumatic Brain Injury. *Front Neurol.* 2015 Sep 22;6:204. doi: 10.3389/fneur.2015.00204. PMID: 26441823; PMCID: PMC4585288.
126. Makrygiannakis D, af Klint E, Lundberg IE, Löfberg R, Ulfgren AK, Klareskog L, Catrina AI. Citrullination is an inflammation-dependent process. *Ann Rheum Dis.* 2006 Sep;65(9):1219-22. doi:

- 10.1136/ard.2005.049403. Epub 2006 Mar 15. PMID: 16540548; PMCID: PMC1798285.
127. Guo Q, Wang Y, Xu D, Nossent J, Pavlos NJ, Xu J. Rheumatoid arthritis: pathological mechanisms and modern pharmacologic therapies. *Bone Res.* 2018 Apr 27;6:15. doi: 10.1038/s41413-018-0016-9. PMID: 29736302; PMCID: PMC5920070.
128. Carrasco-Marín E, Paz-Miguel JE, López-Mato P, Alvarez-Domínguez C, Leyva-Cobián F. Oxidation of defined antigens allows protein unfolding and increases both proteolytic processing and exposes peptide epitopes which are recognized by specific T cells. *Immunology.* 1998 Nov;95(3):314-21. doi: 10.1046/j.1365-2567.1998.00618.x. PMID: 9824492; PMCID: PMC1364395.
129. Pratesi F, Petit Teixeira E, Sidney J, Michou L, Puxeddu I, Sette A, Cornelis F, Migliorini P. HLA shared epitope and ACPA: just a marker or an active player? *Autoimmun Rev.* 2013 Oct;12(12):1182-7. doi: 10.1016/j.autrev.2013.08.002. Epub 2013 Aug 16. PMID: 23958703.
130. Weyand CM. New insights into the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford).* 2000 Jun;39 Suppl 1:3-8. doi: 10.1093/oxfordjournals.rheumatology.a031491. PMID: 11001373.
131. Snyderman R, McCarty GA. Analogous mechanisms of tissue destruction in rheumatoid arthritis and periodontal disease. In: Genco RJ, Mergenhagen SE, editors. *Host-parasite interaction in periodontal diseases.* Washington: American Society of Microbiology; 1982. p. 354–62.
132. Tang Q, Fu H, Qin B, Hu Z, Liu Y, Liang Y, Zhou L, Yang Z, Zhong R. A Possible Link Between Rheumatoid Arthritis and Periodontitis: A Systematic Review and Meta-analysis. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 2017 Jan/Feb;37(1):79-86. doi: 10.11607/prd.2656. PMID: 27977821.
133. Mootha A, Malaiappan S, Jayakumar ND, Varghese SS, Toby Thomas J. The effect of periodontitis on expression of interleukin-21: a systematic review. *Int J Inflam* 2016;2016:1–8. doi.org/10.1155/2016/3507503
134. Akram Z, Rahim ZHA, Taiyeb-Ali TB, Shahdan MSA, Baharuddin NA, Vaithilingam RD, et al. Resistin as potential biomarker for chronic periodontitis: a systematic review and meta-analysis *Arch Oral Biol* 2017;73:311–20 Doi:10.1016/j.archoralbio.2016.08.016.
135. Chaparro-Sanabria JA, Bautista-Molano W, Bello-Gualtero JM, Chila-Moreno L, Castillo DM, Valle-Oñate R, Chalem P, Romero-Sánchez C. Association of adipokines with rheumatic disease activity indexes and

- periodontal disease in patients with early rheumatoid arthritis and their first-degree relatives. *Int J Rheum Dis*. 2019 Nov;22(11):1990-2000. doi: 10.1111/1756-185X.13724. Epub 2019 Oct 29. PMID: 31659869.
136. Heredia-P AM, Lafaurie GI, Bautista-Molano W, Trujillo TG, Chalem-Choueka P, Bello-Gualtero JM, Pacheco-Tena C, Chila-Moreno L, Romero-Sánchez C. Predictive factors related to the progression of periodontal disease in patients with early rheumatoid arthritis: a cohort study. *BMC Oral Health*. 2019 Nov 8;19(1):240. doi: 10.1186/s12903-019-0939-6. PMID: 31703715; PMCID: PMC6842164.
137. Romero-Sanchez C, Rodríguez C, Santos-Moreno P, Mesa AM, Lafaurie GI, Giraldo-Q S, De-Avila J, Castillo DM, Duran M, Chalem PC, Bello Gualtero JM, Valle-Oñate R. Is the Treatment with Biological or Non-biological DMARDs a Modifier of Periodontal Condition in Patients with Rheumatoid Arthritis? *Curr Rheumatol Rev*. 2017;13(2):139-151. doi: 10.2174/1573397113666170407161520. PMID: 28403797.
138. Han JY, Reynolds MA. Effect of anti-rheumatic agents on periodontal parameters and biomarkers of inflammation: a systematic review and meta-analysis. *J Periodontal Implant Sci*. 2012 Feb;42(1):3-12. doi: 10.5051/jpis.2012.42.1.3. Epub 2012 Feb 29. PMID: 22413068; PMCID: PMC3296933.
139. Chen HH, Huang N, Chen YM, Chen TJ, Chou P, Lee YL, Chou YJ, Lan JL, Lai KL, Lin CH, Chen DY. Association between a history of periodontitis and the risk of rheumatoid arthritis: a nationwide, population-based, case-control study. *Ann Rheum Dis*. 2013 Jul;72(7):1206-11. doi: 10.1136/annrheumdis-2012-201593. Epub 2012 Aug 31. PMID: 22941768.
140. Potikuri D, Dannana KC, Kanchinadam S, Agrawal S, Kancharla A, Rajasekhar L, Pothuraju S, Gumdal N. Periodontal disease is significantly higher in non-smoking treatment-naive rheumatoid arthritis patients: results from a case-control study. *Ann Rheum Dis*. 2012 Sep;71(9):1541-4. doi: 10.1136/annrheumdis-2011-200380. PMID: 22875903.
141. Prevoo ML, van 't Hof MA, Kuper HH, van Leeuwen MA, van de Putte LB, van Riel PL. Modified disease activity scores that include twenty-eight-joint counts. Development and validation in a prospective longitudinal study of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 1995 Jan;38(1):44-8. doi: 10.1002/art.1780380107. PMID: 7818570.
142. Ortiz P, Bissada NF, Palomo L, Han YW, Al-Zahrani MS, Panneerselvam A, Askari A. Periodontal therapy reduces the severity of active rheumatoid arthritis in patients treated with or without tumor

- necrosis factor inhibitors. *J Periodontol.* 2009 Apr;80(4):535-40. doi: 10.1902/jop.2009.080447. PMID: 19335072; PMCID: PMC2884010.
143. Al-Katma MK, Bissada NF, Bordeaux JM, Sue J, Askari AD. Control of periodontal infection reduces the severity of active rheumatoid arthritis. *J Clin Rheumatol.* 2007 Jun;13(3):134-7. doi: 10.1097/RHU.0b013e3180690616. PMID: 17551378.
144. Rosenstein ED, Kushner L, Kramer N. Rheumatoid Arthritis and Periodontal Disease: A Rheumatologist's Perspective. *Current Oral Health Reports.* 015. 2. 10.1007/s40496-014-0038-3.
145. Savioli C, Ribeiro AC, Fabri GM, Calich AL, Carvalho J, Silva CA, Viana VS, Bonfá E, Siqueira JT. Persistent periodontal disease hampers anti-tumor necrosis factor treatment response in rheumatoid arthritis. *J Clin Rheumatol.* 2012 Jun;18(4):180-4. doi: 10.1097/RHU.0b013e31825828be. PMID: 22647860.
146. Scott DL, Wolfe F, Huizinga TW. Rheumatoid arthritis. *Lancet.* 2010 Sep 25;376(9746):1094-108. doi: 10.1016/S0140-6736(10)60826-4. PMID: 20870100.
147. Laine ML, Loos BG, Crielaard W. Gene polymorphisms in chronic periodontitis. *Int J Dent.* 2010;2010:324719. doi: 10.1155/2010/324719. Epub 2010 Feb 9. PMID: 20339487; PMCID: PMC2844543.
148. Silvestre FJ, Silvestre-Rangil J, Bagán L, Bagán JV. Effect of nonsurgical periodontal treatment in patients with periodontitis and rheumatoid arthritis: A systematic review. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2016 May 1;21(3):e349-54. doi: 10.4317/medoral.20974. PMID: 26946202; PMCID: PMC4867209.
149. Kobayashi T, Kido JI, Ishihara Y, Omori K, Ito S, Matsuura T, Bando T, Wada J, Murasawa A, Nakazono K, Mitani A, Takashiba S, Nagata T, Yoshie H. The KCNQ1 gene polymorphism as a shared genetic risk for rheumatoid arthritis and chronic periodontitis in Japanese adults: A pilot case-control study. *J Periodontol.* 2018 Mar;89(3):315-324. doi: 10.1002/JPER.17-0412. Epub 2018 Mar 12. PMID: 29520783.
150. Schulz S, Pütz N, Jurianz E, Schaller HG, Reichert S. Are There Any Common Genetic Risk Markers for Rheumatoid Arthritis and Periodontal Diseases? A Case-Control Study. *Mediators Inflamm.* 2019 Feb 12;2019:2907062. doi: 10.1155/2019/2907062. PMID: 30890897; PMCID: PMC6390239.
151. Ronninger M, Seddighzadeh M, Eike MC, Plant D, Daha NA, Skinningsrud B, Worthington J, Kvien TK, Toes RE, Lie BA, Alfredsson L, Padyukov L. Interaction analysis between HLA-DRB1 shared epitope

- alleles and MHC class II transactivator CIITA gene with regard to risk of rheumatoid arthritis. *PLoS One*. 2012;7(3):e32861. doi: 10.1371/journal.pone.0032861. Epub 2012 Mar 26. PMID: 22461888; PMCID: PMC3312880.
152. Bonfil JJ, Dillier FL, Mercier P, Revirion D, Foti B, Sambuc R, Brodeur JM, Sedarat C. A "case control" study on the rôle of HLA DR4 in severe periodontitis and rapidly progressive periodontitis. Identification of types and subtypes using molecular biology (PCR.SSO). *J Clin Periodontol*. 1999 Feb;26(2):77-84. doi: 10.1034/j.1600-051x.1999.260203.x. PMID: 10048640.
153. Matthews JB, Chen FM, Milward MR, Ling MR, Chapple IL. Neutrophil superoxide production in the presence of cigarette smoke extract, nicotine and cotinine. *J Clin Periodontol*. 2012 Jul;39(7):626-34. doi: 10.1111/j.1600-051X.2012.01894.x. Epub 2012 May 21. PMID: 22607095.
154. Leite FR, de Aquino SG, Guimarães MR, Cirelli JA, Zamboni DS, Silva JS, Junior CR. Relevance of the myeloid differentiation factor 88 (MyD88) on RANKL, OPG, and nod expressions induced by TLR and IL-1R signaling in bone marrow stromal cells. *Inflammation*. 2015 Feb;38(1):1-8. doi: 10.1007/s10753-014-0001-4. PMID: 25125146.
155. Palmer RM, Wilson RF, Hasan AS, Scott DA. Mechanisms of action of environmental factors--tobacco smoking. *J Clin Periodontol*. 2005;32 Suppl 6:180-95. doi: 10.1111/j.1600-051X.2005.00786.x. PMID: 16128837.
156. Catrina AI, Ytterberg AJ, Reynisdottir G, Malmström V, Klareskog L. Lungs, joints and immunity against citrullinated proteins in rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol*. 2014 Nov;10(11):645-53. doi: 10.1038/nrrheum.2014.115. Epub 2014 Jul 29. PMID: 25072264.
157. Ancuta C, Iordache C, Ancuta E, Mihailov C. Rheumatoid Arthritis and Periodontal Disease: A Complex Interplay. In *New Developments in the Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis*. InTech, (2017). DOI: 10.5772/65863.
158. Koziel J, Mydel P, Potempa J. The link between periodontal disease and rheumatoid arthritis: an updated review. *Curr Rheumatol Rep*. 2014 Mar;16(3):408. doi: 10.1007/s11926-014-0408-9. PMID: 24458478; PMCID: PMC3930831.
159. Quirke AM, Lugli EB, Wegner N, Hamilton BC, Charles P, Chowdhury M, Ytterberg AJ, Zubarev RA, Potempa J, Culshaw S, Guo Y, Fisher BA, Thiele G, Mikuls TR, Venables PJ. Heightened immune response to

- autocitrullinated *Porphyromonas gingivalis* peptidylarginine deiminase: a potential mechanism for breaching immunologic tolerance in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2014 Jan;73(1):263-9. doi: 10.1136/annrheumdis-2012-202726. Epub 2013 Mar 5. PMID: 23463691; PMCID: PMC3888615.
160. Wegner N, Wait R, Sroka A, Eick S, Nguyen KA, Lundberg K, Kinloch A, Culshaw S, Potempa J, Venables PJ. Peptidylarginine deiminase from *Porphyromonas gingivalis* citrullinates human fibrinogen and α -enolase: implications for autoimmunity in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2010 Sep;62(9):2662-72. doi: 10.1002/art.27552. PMID: 20506214; PMCID: PMC2941529.
161. Rodríguez SB, Stitt BL, Ash DE. Expression of peptidylarginine deiminase from *Porphyromonas gingivalis* in *Escherichia coli*: enzyme purification and characterization. *Arch Biochem Biophys.* 2009 Aug 1;488(1):14-22. doi: 10.1016/j.abb.2009.06.010. Epub 2009 Jun 21. PMID: 19545534; PMCID: PMC2752837.
162. Pyrc K, Milewska A, Kantyka T, Sroka A, Maresz K, Kozieł J, Nguyen KA, Enghild JJ, Knudsen AD, Potempa J. Inactivation of epidermal growth factor by *Porphyromonas gingivalis* as a potential mechanism for periodontal tissue damage. *Infect Immun.* 2013 Jan;81(1):55-64. doi: 10.1128/IAI.00830-12. Epub 2012 Oct 22. PMID: 23090954; PMCID: PMC3536129.
163. Munenaga S, Ouhara K, Hamamoto Y, Kajiya M, Takeda K, Yamasaki S, Kawai T, Mizuno N, Fujita T, Sugiyama E, Kurihara H. The involvement of C5a in the progression of experimental arthritis with *Porphyromonas gingivalis* infection in SKG mice. *Arthritis Res Ther.* 2018 Nov 3;20(1):247. doi: 10.1186/s13075-018-1744-3. PMID: 30390695; PMCID: PMC6235227.
164. Monk PN, Scola AM, Madala P, Fairlie DP. Function, structure and therapeutic potential of complement C5a receptors. *Br J Pharmacol.* 2007 Oct;152(4):429-48. doi: 10.1038/sj.bjp.0707332. Epub 2007 Jul 2. PMID: 17603557; PMCID: PMC2050825.
165. Ireland J, Herzog J, Unanue ER Cutting edge: unique T cells that recognize citrullinated peptides are a feature of protein immunization. *J Immunol.* 2006, 177(3):1421-1425 doi.org/10.4049/jimmunol.177.3.1421
166. Nesse W, Westra J, van der Wal JE, Abbas F, Nicholas AP, Vissink A, Brouwer E. The periodontium of periodontitis patients contains

- citrullinated proteins which may play a role in ACPA (anti-citrullinated protein antibody) formation. *J Clin Periodontol*, 2012, 39(7):599-607
167. Harvey GP, Fitzsimmons TR, Dhamarpatni AA, Marchant C, Haynes DR, Bartold PM. Expression of peptidylarginine deiminase-2 and -4, citrullinated proteins and anti-citrullinated protein antibodies in human gingiva. *J Periodontal Res*, 2013, 48(2):252-261
168. Lundberg K, Kinloch A, Fisher BA, Wegner N, Wait R, Charles P, Mikuls TR, Venables PJ. Antibodies to citrullinated alpha-enolase peptide 1 are specific for rheumatoid arthritis and cross-react with bacterial enolase. *Arthritis Rheum*, 2008, 58(10):3009-3019
169. Jajoo NS, Shelke AU, Bajaj RS. Periodontitis and Rheumatoid Arthritis: the Common Thread. *Clinic Rev Bone Miner Metab*, 2020, 18, 18–30. <https://doi.org/10.1007/s12018-020-09271-6>
170. Ma MZ, Chen G, Wang P, Lu WH, Zhu CF, Song M, Yang J, Wen S, Xu RH, Hu Y, Huang P. Xc- inhibitor sulfasalazine sensitizes colorectal cancer to cisplatin by a GSH-dependent mechanism. *Cancer Lett*. 2015 Nov 1;368(1):88-96. doi: 10.1016/j.canlet.2015.07.031. Epub 2015 Aug 5. PMID: 26254540.
171. Herrmann ML, Schleyerbach R, Kirschbaum BJ. Leflunomide: an immunomodulatory drug for the treatment of rheumatoid arthritis and other autoimmune diseases. *Immunopharmacology*. 2000 May;47(2-3):273-89. doi: 10.1016/s0162-3109(00)00191-0. PMID: 10878294.
172. Tugwell P, Pincus T, Yocum D, Stein M, Gluck O, Kraag G, McKendry R, Tesser J, Baker P, Wells G. Combination therapy with cyclosporine and methotrexate in severe rheumatoid arthritis. The Methotrexate-Cyclosporine Combination Study Group. *N Engl J Med*. 1995 Jul 20;333(3):137-41. doi: 10.1056/NEJM199507203330301. PMID: 7791814.
173. Vaudo G, Marchesi S, Gerli R, Allegrucci R, Giordano A, Siepi D, Pirro M, Shoenfeld Y, Schillaci G, Mannarino E. Endothelial dysfunction in young patients with rheumatoid arthritis and low disease activity. *Ann Rheum Dis*. 2004 Jan;63(1):31-5. doi: 10.1136/ard.2003.007740. PMID: 14672888; PMCID: PMC1754717.
174. Lis K, Kuzawińska O, Bałkowiec-Iskra E. Tumor necrosis factor inhibitors - state of knowledge. *Arch Med Sci*. 2014 Dec 22;10(6):1175-85. doi: 10.5114/aoms.2014.47827. PMID: 25624856; PMCID: PMC4296073.
175. Genovese MC, Becker JC, Schiff M, Luggen M, Sherrer Y, Kremer J, Birbara C, Box J, Natarajan K, Nuamah I, Li T, Aranda R, Hagerty DT,

- Dougados M. Abatacept for rheumatoid arthritis refractory to tumor necrosis factor alpha inhibition. *N Engl J Med.* 2005 Sep 15;353(11):1114-23. doi: 10.1056/NEJMoa050524. Erratum in: *N Engl J Med.* 2005 Nov 24;353(21):2311. PMID: 16162882.
- 176.Salliot C, Dougados M, Gossec L. Risk of serious infections during rituximab, abatacept and anakinra treatments for rheumatoid arthritis: meta-analyses of randomised placebo-controlled trials. *Ann Rheum Dis.* 2009 Jan;68(1):25-32. doi: 10.1136/ard.2007.083188. Epub 2008 Jan 18. PMID: 18203761; PMCID: PMC2596305.
- 177.Mayer Y, Balbir-Gurman A, Machtei EE. Anti-tumor necrosis factor-alpha therapy and periodontal parameters in patients with rheumatoid arthritis. *J Periodontol.* 2009 Sep;80(9):1414-20. doi: 10.1902/jop.2009.090015. PMID: 19722791.
- 178.Pers JO, Saraux A, Pierre R, Youinou P. Anti-TNF-alpha immunotherapy is associated with increased gingival inflammation without clinical attachment loss in subjects with rheumatoid arthritis. *J Periodontol.* 2008 Sep;79(9):1645-51. doi: 10.1902/jop.2008.070616. PMID: 18771364.
- 179.Kobayashi T, Yokoyama T, Ito S, Kobayashi D, Yamagata A, Okada M, Oofusa K, Narita I, Murasawa A, Nakazono K, Yoshie H. Periodontal and serum protein profiles in patients with rheumatoid arthritis treated with tumor necrosis factor inhibitor adalimumab. *J Periodontol.* 2014 Nov;85(11):1480-8. doi: 10.1902/jop.2014.140194. Epub 2014 May 26. PMID: 24857321.
- 180.Kobayashi T, Okada M, Ito S, Kobayashi D, Ishida K, Kojima A, Narita I, Murasawa A, Yoshie H. Assessment of interleukin-6 receptor inhibition therapy on periodontal condition in patients with rheumatoid arthritis and chronic periodontitis. *J Periodontol.* 2014 Jan;85(1):57-67. doi: 10.1902/jop.2013.120696. Epub 2013 Mar 14. PMID: 23489234.
- 181.Salvi GE, Lang NP. The effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs (selective and non-selective) on the treatment of periodontal diseases. *Curr Pharm Des.* 2005;11(14):1757-69. doi: 10.2174/1381612053764878. PMID: 15892673.
- 182.Okamura K, Hagen JW, Duan H, Tyler DM, Lai E. The mirtron pathway generates microRNA-class regulatory RNAs in *Drosophila*. *Cell.* 2007;130:89–100
- 183.Rodriguez A, Griffiths-Jones S, Ashurst JL, Bradley A. Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Res.* 2004;14:1902–1910

184. Kim VN, Han J, Siomi MC. Biogenesis of small RNAs in animals. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2009 Feb;10(2):126-39. doi: 10.1038/nrm2632. PMID: 19165215.
185. Denli AM, Tops BB, Plasterk RH, Ketting RF, Hannon GJ. Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature.* 2004 Nov 11;432(7014):231-5. doi: 10.1038/nature03049. Epub 2004 Nov 7. PMID: 15531879.
186. Lee Y, Hur I, Park SY, Kim YK, Suh MR, Kim VN. The role of PACT in the RNA silencing pathway. *EMBO J.* 2006 Feb 8;25(3):522-32. doi: 10.1038/sj.emboj.7600942. Epub 2006 Jan 19. PMID: 16424907; PMCID: PMC1383527.
187. Winter J, Jung S, Keller S, Gregory RI, Diederichs S. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nat Cell Biol.* 2009 Mar;11(3):228-34. doi: 10.1038/ncb0309-228. PMID: 19255566.
188. Yang JS, Maurin T, Robine N, Rasmussen KD, Jeffrey KL, Chandwani R, Papapetrou EP, Sadelain M, O'Carroll D, Lai EC. Conserved vertebrate mir-451 provides a platform for Dicer-independent, Ago2-mediated microRNA biogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010 Aug 24;107(34):15163-8. doi: 10.1073/pnas.1006432107. Epub 2010 Aug 10. PMID: 20699384; PMCID: PMC2930549.
189. Ha M, Kim VN. Regulation of microRNA biogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014 Aug;15(8):509-24. doi: 10.1038/nrm3838. Epub 2014 Jul 16. PMID: 25027649.
190. Willard SS, Koochekpour S. Regulators of gene expression as biomarkers for prostate cancer. *Am J Cancer Res.* 2012;2(6):620-57. Epub 2012 Nov 20. PMID: 23226612; PMCID: PMC3512182.
191. Vasudevan S, Steitz JA. AU-rich-element-mediated upregulation of translation by FXR1 and Argonaute 2. *Cell.* 2007 Mar 23;128(6):1105-18. doi: 10.1016/j.cell.2007.01.038. PMID: 17382880; PMCID: PMC3430382.
192. Ørom UA, Nielsen FC, Lund AH. MicroRNA-10a binds the 5'UTR of ribosomal protein mRNAs and enhances their translation. *Mol Cell.* 2008 May 23;30(4):460-71. doi: 10.1016/j.molcel.2008.05.001. PMID: 18498749.
193. Raisch J, Darfeuille-Michaud A, Nguyen HT. Role of microRNAs in the immune system, inflammation and cancer. *World J Gastroenterol.* 2013 May 28;19(20):2985-96. doi: 10.3748/wjg.v19.i20.2985. PMID: 23716978; PMCID: PMC3662938.

194. Bezman NA, Cedars E, Steiner DF, Blelloch R, Hesslein DG, Lanier LL. Distinct requirements of microRNAs in NK cell activation, survival, and function. *J Immunol.* 2010 Oct 1;185(7):3835-46. doi: 10.4049/jimmunol.1000980. Epub 2010 Aug 30. PMID: 20805417; PMCID: PMC2943981.
195. O'Connell RM, Rao DS, Chaudhuri AA, Baltimore D. Physiological and pathological roles for microRNAs in the immune system. *Nat Rev Immunol.* 2010 Feb;10(2):111-22. doi: 10.1038/nri2708. PMID: 20098459.
196. Luan X, Zhou X, Trombetta-eSilva J, Francis M, Gaharwar AK, Atsawasuwan P, Diekwisch TGH. MicroRNAs and Periodontal Homeostasis. *J Dent Res.* 2017 May;96(5):491-500. doi: 10.1177/0022034516685711. Epub 2017 Jan 9. PMID: 28068481; PMCID: PMC5453493.
197. Nakasa T, Shibuya H, Nagata Y, Niimoto T, Ochi M. The inhibitory effect of microRNA-146a expression on bone destruction in collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum.* 2011 Jun;63(6):1582-90. doi: 10.1002/art.30321. PMID: 21425254.
198. Sanada T, Sano T, Sotomaru Y, Alshargabi R, Yamawaki Y, Yamashita A, Matsunaga H, Iwashita M, Shinjo T, Kanematsu T, Asano T, Nishimura F. Anti-inflammatory effects of miRNA-146a induced in adipose and periodontal tissues. *Biochem Biophys Rep.* 2020 Apr 21;22:100757. doi: 10.1016/j.bbrep.2020.100757. PMID: 32346618; PMCID: PMC7178317.
199. Wang W, Yang L, Zhang D, Gao C, Wu J, Zhu Y, Zhang H. MicroRNA-218 Negatively Regulates Osteoclastogenic Differentiation by Repressing the Nuclear Factor- κ B Signaling Pathway and Targeting Tumor Necrosis Factor Receptor 1. *Cell Physiol Biochem.* 2018;48(1):339-347. doi: 10.1159/000491740. Epub 2018 Jul 17. PMID: 30016774.
200. Krzeszinski JY, Wei W, Huynh H, Jin Z, Wang X, Chang TC, Xie XJ, He L, Mangala LS, Lopez-Berestein G, Sood AK, Mendell JT, Wan Y. miR-34a blocks osteoporosis and bone metastasis by inhibiting osteoclastogenesis and Tgif2. *Nature.* 2014 Aug 28;512(7515):431-5. doi: 10.1038/nature13375. Epub 2014 Jun 25. Retraction in: *Nature.* 2020 Jun;582(7810):134. Erratum in: *Nature.* 2019 Jun;570(7761):E51. PMID: 25043055; PMCID: PMC4149606.
201. Schmalz G, Li S, Burkhardt R, Rinke S, Krause F, Haak R, Ziebolz D. MicroRNAs as Salivary Markers for Periodontal Diseases: A New Diagnostic Approach? *Biomed Res Int.* 2016;2016:1027525. doi:

- 10.1155/2016/1027525. Epub 2016 Jun 27. PMID: 27429973; PMCID: PMC4939343.
- 202.Sonda N, Simonato F, Peranzoni E, Calì B, Bortoluzzi S, Bisognin A, Wang E, Marincola FM, Naldini L, Gentner B, Trautwein C, Sackett SD, Zanovello P, Molon B, Bronte V. miR-142-3p prevents macrophage differentiation during cancer-induced myelopoiesis. *Immunity*. 2013 Jun 27;38(6):1236-49. doi: 10.1016/j.immuni.2013.06.004. PMID: 23809164.
- 203.Cheng P, Chen C, He HB, Hu R, Zhou HD, Xie H, Zhu W, Dai RC, Wu XP, Liao EY, Luo XH. miR-148a regulates osteoclastogenesis by targeting V-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog B. *J Bone Miner Res*. 2013 May;28(5):1180-90. doi: 10.1002/jbmr.1845. PMID: 23225151.
- 204.Cortez MA, Bueso-Ramos C, Ferdin J, Lopez-Berestein G, Sood AK, Calin GA. MicroRNAs in body fluids--the mix of hormones and biomarkers. *Nat Rev Clin Oncol*. 2011 Jun 7;8(8):467-77. doi: 10.1038/nrclinonc.2011.76. PMID: 21647195; PMCID: PMC3423224.
- 205.Zampetaki A, Willeit P, Drozdov I, Kiechl S, Mayr M. Profiling of circulating microRNAs: from single biomarkers to re-wired networks. *Cardiovasc Res*. 2012 Mar 15;93(4):555-62. doi: 10.1093/cvr/cvr266. Epub 2011 Oct 25. PMID: 22028337; PMCID: PMC3291086.
- 206.Nik Mohamed Kamal NNSB, Shahidan WNS. Non-Exosomal and Exosomal Circulatory MicroRNAs: Which Are More Valid as Biomarkers? *Front Pharmacol*. 2020 Jan 20;10:1500. doi: 10.3389/fphar.2019.01500. PMID: 32038230; PMCID: PMC6984169.
- 207.Motedayyen H, Ghotloo S, Saffari M, Sattari M, Amid R. Evaluation of MicroRNA-146a and Its Targets in Gingival Tissues of Patients With Chronic Periodontitis. *J Periodontol*. 2015 Dec;86(12):1380-5. doi: 10.1902/jop.2015.150319. Epub 2015 Aug 27. PMID: 26313020.
- 208.Ghotloo S, Motedayyen H, Amani D, Saffari M, Sattari M. Assessment of microRNA-146a in generalized aggressive periodontitis and its association with disease severity. *J Periodontal Res*. 2019 Feb;54(1):27-32. doi: 10.1111/jre.12538. Epub 2018 Oct 17. PMID: 30328616.
- 209.Bruce B Fries JF. The health assessment questionnaire (HAQ). *Clin Exp Rheumatol*. 2005;23 Suppl 39:S14-S18.
- 210.Gossec L, Dougados M, Rincheval N, Balanescu A, Boumpas DT, Canadello S, Carmona L, Daurès JP, de Wit M, Dijkmans BA, Englbrecht M, Gunendi Z, Heiberg T, Kirwan JR, Mola EM, Matucci-Cerinic M, Otsa K, Schett G, Sokka T, Wells GA, Aanerud GJ, Celano A, Dudkin A,

- Hernandez C, Koutsogianni K, Akca FN, Petre AM, Richards P, Scholte-Voshaar M, Von Krause G, Kvien TK. Elaboration of the preliminary Rheumatoid Arthritis Impact of Disease (RAID) score: a EULAR initiative. *Ann Rheum Dis.* 2009 Nov;68(11):1680-5. doi: 10.1136/ard.2008.100271.
211. Bagavad Gita J, George AV, Pavithra N, Chandrasekaran SC, Latchumanadhas K, Gnanamani A. Dysregulation of miR-146a by periodontal pathogens: A risk for acute coronary syndrome. *J Periodontol.* 2019 Jul;90(7):756-765. doi: 10.1002/JPER.18-0466. Epub 2019 Jan 25. PMID: 30618100
212. Xie YF, Shu R, Jiang SY, Liu DL, Zhang XL. Comparison of microRNA profiles of human periodontal diseased and healthy gingival tissues. *Int J Oral Sci.* 2011 Jul;3(3):125-34. doi: 10.4248/IJOS11046. PMID: 21789961; PMCID: PMC3470093.
213. Frencken JE, Sharma P, Stenhouse L, Green D, Laverty D, Dietrich T. Global epidemiology of dental caries and severe periodontitis - a comprehensive review. *J Clin Periodontol.* 2017 Mar;44 Suppl 18:S94-S105. doi: 10.1111/jcpe.12677. PMID: 28266116.
214. Tonetti MS, Jepsen S, Jin L, Otomo-Corgel J. Impact of the global burden of periodontal diseases on health, nutrition and wellbeing of mankind: A call for global action. *J Clin Periodontol.* 2017 May;44(5):456-462. doi: 10.1111/jcpe.12732. Epub 2017 May 8. PMID: 28419559.
215. Äyräväinen L, Leirisalo-Repo M, Kuuliala A, Ahola K, Koivuniemi R, Meurman JH, Heikkinen AM (2017) Periodontitis in early and chronic rheumatoid arthritis: a prospective follow-up study in Finnish population. *BMJ Open.* <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2016-011916>
216. Zhao R, Gu C, Zhang Q, Zhou W, Feng G, Feng X, Dong C, Gu Z. Periodontal disease in Chinese patients with rheumatoid arthritis: A case-control study. *Oral Dis.* 2019 Nov;25(8):2003-2009. doi: 10.1111/odi.13176
217. Corrêa MG, Sacchetti SB, Ribeiro FV, Pimentel SP, Casarin RC, Cirano FR, Casati MZ. Periodontitis increases rheumatic factor serum levels and citrullinated proteins in gingival tissues and alter cytokine balance in arthritic rats. *PLoS One.* 2017 Mar 30;12(3):e0174442. doi: 10.1371/journal.pone.0174442. PMID: 28358812; PMCID: PMC5373534.
218. Fuggle NR, Smith TO, Kaul A, Sofat N. Hand to Mouth: A Systematic Review and Meta-Analysis of the Association between Rheumatoid

- Arthritis and Periodontitis. *Front Immunol.* 2016 Mar 2;7:80. doi: 10.3389/fimmu.2016.00080. PMID: 26973655; PMCID: PMC4774606.
- 219.Araújo VM, Melo IM, Lima V. Relationship between Periodontitis and Rheumatoid Arthritis: Review of the Literature. *Mediators Inflamm.* 2015;2015:259074. doi: 10.1155/2015/259074. Epub 2015 Aug 4. PMID: 26347200; PMCID: PMC4539505.
- 220.Mayer Y, Elimelech R, Balbir-Gurman A, Braun-Moscovici Y, Machtei EE. Periodontal condition of patients with autoimmune diseases and the effect of anti-tumor necrosis factor- α therapy. *J Periodontol.* 2013 Feb;84(2):136-42. doi: 10.1902/jop.2012.120009. Epub 2012 Apr 23. PMID: 22524332.
- 221.Stoecklin-Wasmer C, Guarnieri P, Celenti R, Demmer RT, Kebschull M, Papapanou PN. MicroRNAs and their target genes in gingival tissues. *J Dent Res.* 2012 Oct;91(10):934-40. doi: 10.1177/0022034512456551. Epub 2012 Aug 9. PMID: 22879578; PMCID: PMC3446831.
- 222.Stuopelyte K, Daniunaite K, Bakavicius A, Lazutka JR, Jankevicius F, Jarmalaite S. The utility of urine-circulating miRNAs for detection of prostate cancer. *Br J Cancer.* 2016 Sep 6;115(6):707-15. doi: 10.1038/bjc.2016.233. Epub 2016 Aug 4. PMID: 27490805; PMCID: PMC5023772.
- 223.Micó-Martínez P, Almiñana-Pastor PJ, Alpiste-Illueca F, López-Roldán A. MicroRNAs and periodontal disease: a qualitative systematic review of human studies. *J Periodontal Implant Sci.* 2021 Dec;51(6):386-397. doi: 10.5051/jpis.2007540377. PMID: 34965618; PMCID: PMC8718333.
- 224.Naqvi AR, Brambila MF, Martínez G, Chapa G, Nares S. Dysregulation of human miRNAs and increased prevalence of HHV miRNAs in obese periodontitis subjects. *J Clin Periodontol.* 2019 Jan;46(1):51-61. doi: 10.1111/jcpe.13040. PMID: 30499589; PMCID: PMC6340734.
- 225.Perri R, Nares S, Zhang S, Barros SP, Offenbacher S. MicroRNA modulation in obesity and periodontitis. *J Dent Res.* 2012 Jan;91(1):33-8. doi: 10.1177/0022034511425045. Epub 2011 Oct 31. PMID: 22043006; PMCID: PMC3232116.
- 226.Liu X, Su K, Kuang S, Fu M, Zhang Z. miR-16-5p and miR-145-5p trigger apoptosis in human gingival epithelial cells by down-regulating BACH2. *Int J Clin Exp Pathol.* 2020 May 1;13(5):901-911. PMID: 32509061; PMCID: PMC7270702.
- 227.Liu X, Zhu W, Wang L, Wu J, Ding F, Song Y. miR-145-5p suppresses osteogenic differentiation of adipose-derived stem cells by targeting

- semaphorin 3A. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 2019 Mar;55(3):189-202. doi: 10.1007/s11626-019-00318-7. Epub 2019 Feb 11. PMID: 30747413.
- 228.Fushimi S, Nohno T, Nagatsuka H, Katsuyama H. Involvement of miR-140-3p in Wnt3a and TGF β 3 signaling pathways during osteoblast differentiation in MC3T3-E1 cells. *Genes Cells.* 2018 Jul;23(7):517-527. doi: 10.1111/gtc.12591. Epub 2018 May 9. PMID: 29740905.
- 229.Liu QP, Wu TH, Zheng H, Chen SJ, Chen YH, Chen L, Lin Z. MiR-140-3p overexpression activates the Wnt signaling pathway to promote fracture healing. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2019 Jul;23(14):6011-6017. doi: 10.26355/eurrev_201907_18410. PMID: 31364103.
- 230.Chang M, Lin H, Fu H, Wang B, Han G, Fan M. MicroRNA-195-5p Regulates Osteogenic Differentiation of Periodontal Ligament Cells Under Mechanical Loading. *J Cell Physiol.* 2017 Dec;232(12):3762-3774. doi: 10.1002/jcp.25856. Epub 2017 May 3. PMID: 28181691.
- 231.Grünhagen J, Bhushan R, Degenkolbe E, Jäger M, Knaus P, Mundlos S, Robinson PN, Ott CE. MiR-497~195 cluster microRNAs regulate osteoblast differentiation by targeting BMP signaling. *J Bone Miner Res.* 2015 May;30(5):796-808. doi: 10.1002/jbmr.2412. PMID: 25407900.
- 232.Song M, Wang N, Li Z, Zhang Y, Zheng Y, Yi P, Chen J. miR-125a-3p suppresses the growth and progression of papillary thyroid carcinoma cell by targeting MMP11. *J Cell Biochem.* 2020 Feb;121(2):984-995. doi: 10.1002/jcb.29333. Epub 2019 Sep 6. PMID: 31489990.
- 233.Wang Y, Yin Z, Zhang N, Song H, Zhang Q, Hao X, Wang Z. MiR-125a-3p inhibits cell proliferation and inflammation responses in fibroblast-like synovial cells in rheumatoid arthritis by mediating the Wnt/ β -catenin and NF- κ B pathways via targeting MAST3. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2021 Dec 1;21(4):560-567. PMID: 34854396; PMCID: PMC8672414.
- 234.Wang J, Zheng Y, Bai B, Song Y, Zheng K, Xiao J, Liang Y, Bao L, Zhou Q, Ji L, Feng X. MicroRNA-125a-3p participates in odontoblastic differentiation of dental pulp stem cells by targeting Fyn. *Cytotechnology.* 2020 Feb;72(1):69-79. doi: 10.1007/s10616-019-00358-7. Epub 2020 Jan 18. PMID: 31953701; PMCID: PMC7002700.
- 235.Ninio-Many L, Hikri E, Burg-Golani T, Stemmer SM, Shalgi R, Ben-Aharon I. miR-125a Induces HER2 Expression and Sensitivity to Trastuzumab in Triple-Negative Breast Cancer Lines. *Front Oncol.* 2020 Feb 28;10:191. doi: 10.3389/fonc.2020.00191. PMID: 32185126; PMCID: PMC7058585.

236. Wang J, Yan F, Zhao Q, Zhan F, Wang R, Wang L, Zhang Y, Huang X. Circulating exosomal miR-125a-3p as a novel biomarker for early-stage colon cancer. *Sci Rep.* 2017 Jun 23;7(1):4150. doi: 10.1038/s41598-017-04386-1. PMID: 28646161; PMCID: PMC5482839.
237. Nik Mohamed Kamal NNS, Awang RAR, Mohamad S, Shahidan WNS. Plasma- and Saliva Exosome Profile Reveals a Distinct MicroRNA Signature in Chronic Periodontitis. *Front Physiol.* 2020 Nov 30;11:587381. doi: 10.3389/fphys.2020.587381. PMID: 33329037; PMCID: PMC7733931.
238. Pritchard CC, Cheng HH, Tewari M. MicroRNA profiling: approaches and considerations. *Nat Rev Genet.* 2012 Apr 18;13(5):358-69. doi: 10.1038/nrg3198. PMID: 22510765; PMCID: PMC4517822.
239. Fujimori K, Yoneda T, Tomofuji T, Ekuni D, Azuma T, Maruyama T, Mizuno H, Sugiura Y, Morita M. Detection of Salivary miRNAs Reflecting Chronic Periodontitis: A Pilot Study. *Molecules.* 2019 Mar 15;24(6):1034. doi: 10.3390/molecules24061034. PMID: 30875931; PMCID: PMC6470766.
240. Yoneda T, Tomofuji T, Ekuni D, Azuma T, Maruyama T, Fujimori K, Sugiura Y, Morita M. Serum microRNAs and chronic periodontitis: A case-control study. *Arch Oral Biol.* 2019 May;101:57-63. doi: 10.1016/j.archoralbio.2019.03.009. Epub 2019 Mar 13. PMID: 30889506.
241. Subbarao KC, Nattuthurai GS, Sundararajan SK, Sujith I, Joseph J, Syedshah YP. Gingival Crevicular Fluid: An Overview. *J Pharm Bioallied Sci.* 2019 May;11(Suppl 2):S135-S139. doi: 10.4103/JPBS.JPBS_56_19. PMID: 31198325; PMCID: PMC6555362.
242. Saito A, Horie M, Ejiri K, Aoki A, Katagiri S, Maekawa S, Suzuki S, Kong S, Yamauchi T, Yamaguchi Y, Izumi Y, Ohshima M. MicroRNA profiling in gingival crevicular fluid of periodontitis-a pilot study. *FEBS Open Bio.* 2017 Jun 5;7(7):981-994. doi: 10.1002/2211-5463.12238. PMID: 28680811; PMCID: PMC5494293.
243. Nahid MA, Pauley KM, Satoh M, Chan EK. miR-146a is critical for endotoxin-induced tolerance: IMPLICATION IN INNATE IMMUNITY. *J Biol Chem.* 2009 Dec 11;284(50):34590-9. doi: 10.1074/jbc.M109.056317. Epub 2009 Oct 19. PMID: 19840932; PMCID: PMC2787321.
244. Taganov KD, Boldin MP, Chang KJ, Baltimore D. NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006

- Aug 15;103(33):12481-6. doi: 10.1073/pnas.0605298103. Epub 2006 Aug 2. PMID: 16885212; PMCID: PMC1567904.
245. Alassiri S, Parnanen P, Rathnayake N, Johannsen G, Heikkinen AM, Lazzara R, van der Schoor P, van der Schoor JG, Tervahartiala T, Gieselmann D, Sorsa T. The Ability of Quantitative, Specific, and Sensitive Point-of-Care/Chair-Side Oral Fluid Immunotests for aMMP-8 to Detect Periodontal and Peri-Implant Diseases. *Dis Markers*. 2018 Aug 5;2018:1306396. doi: 10.1155/2018/1306396. PMID: 30154936; PMCID: PMC6098860.
246. Jin SH, Zhou JG, Guan XY, Bai GH, Liu JG, Chen LW. Development of an miRNA-Array-Based Diagnostic Signature for Periodontitis. *Front Genet*. 2020 Dec 16;11:577585. doi: 10.3389/fgene.2020.577585. PMID: 33391341; PMCID: PMC7772397.
247. Sistrunk JW, Shifrin A, Frager M, Bardales RH, Thomas J, Fishman N, Goldberg P, Guttler R, Grant E. Clinical performance of multiplatform mutation panel and microRNA risk classifier in indeterminate thyroid nodules. *J Am Soc Cytopathol*. 2020 Jul-Aug;9(4):232-241. doi: 10.1016/j.jasc.2020.02.002. Epub 2020 Mar 10. PMID: 32247769.
248. Galvão-Lima LJ, Morais AHF, Valentim RAM, Barreto EJSS. miRNAs as biomarkers for early cancer detection and their application in the development of new diagnostic tools. *Biomed Eng Online*. 2021 Feb 16;20(1):21. doi: 10.1186/s12938-021-00857-9. PMID: 33593374; PMCID: PMC7885381.
249. Fujimori K, Yoneda T, Tomofuji T, Ekuni D, Azuma T, Maruyama T, Sugiura Y, Morita M. Detection of Salivary miRNAs That Predict Chronic Periodontitis Progression: A Cohort Study. *Int J Environ Res Public Health*. 2021 Jul 29;18(15):8010. doi: 10.3390/ijerph18158010. PMID: 34360304; PMCID: PMC8345340.
250. Han P, Bartold PM, Salomon C, Ivanovski S. Salivary Small Extracellular Vesicles Associated miRNAs in Periodontal Status-A Pilot Study. *Int J Mol Sci*. 2020 Apr 17;21(8):2809. doi: 10.3390/ijms21082809. PMID: 32316600; PMCID: PMC7215885.
251. Cuevas-González MV, Suaste-Olmos F, García-Calderón AG, Tovar-Carrillo KL, Espinosa-Cristóbal LF, Nava-Martínez SD, Cuevas-González JC, Zambrano-Galván G, Saucedo-Acuña RA, Donohue-Cornejo A. Expression of MicroRNAs in Periodontal Disease: A Systematic Review. *Biomed Res Int*. 2021 Jan 19;2021:2069410. doi: 10.1155/2021/2069410. PMID: 33542918; PMCID: PMC7840252.

SUMMARY

INTRODUCTION

Periodontitis (PD) is an infectious disease characterized by inflammatory destruction of the connective tissue which leads to periodontal attachment loss and resorption of the alveolar bone. PD is one of the most common chronic inflammatory diseases, with an estimated prevalence of up to 70% in the adult population [1]. The prevalence of PD increases proportionally with age [2]. Given the aging trend of the population and the increasing incidence of risk factors for PD, a higher prevalence of PD is expected in the future. PD is one of the major causes of tooth loss, however the negative impact of the disease is not limited to oral health [3]. Long-lasting bacterial load in the oral cavity is associated with an increased risk of chronic obstructive pulmonary disease, bacterial pneumonia, and other respiratory diseases as well as oral cancers [4]. PD-induced bacteremia is related to the formation of atherosclerotic plaque, and increased risk of developing infectious endocarditis and myocardial infarction [5]. It is believed that the inflammatory burden associated with PD is one of the major pathological pathways linking PD with various systemic comorbidities, namely autoimmune diseases [6].

Rheumatoid arthritis (RA) is an autoimmune disease which is considered to be closely associated with PD [7]. The prevalence of RA in the general population is 0.3–1%, whereas individuals with PD are more likely to develop RA [8, 9]. The clinical course of periodontal pathology correlates with RA disease activity, and following successful periodontal treatment, a decrease in the severity of clinical symptoms of RA is observed [10, 11]. The association between PD and RA has been widely documented with revealed similarities in the diseases' pathogenesis, namely the overproduction of pro-inflammatory cytokines, connective tissue breakdown, and a chronic inflammatory state [12, 13]. Moreover, PD and RA share common environmental risk and genetic factors [14]. Scientific advances have led to the discovery of new pathological pathways linking PD and RA; however, the highly complex pathogenesis of both diseases is yet to be fully unraveled.

Recently, there has been an increasing focus on the epigenetic regulation of gene expression, which may have an impact on the etiopathogenesis of multiple diseases. One of the epigenetic regulatory mechanisms is post-transcriptional modulation of gene expression associated with microRNA (miRNA). miRNAs are a group of single-stranded non-coding RNA molecules which are directly involved in the regulation of gene expression through post-transcriptional modulation of target messenger RNA molecules

(mRNAs). Mature miRNA on average consists of 19-25 nucleotides. Approximately 2,600 miRNAs are currently recorded in the databases, of which over 1,100 miRNAs have been validated [16]. miRNAs cause translational repression of mRNAs by initiation of mRNA degradation or prevention of its translation. miRNAs are an integral part of various regulatory networks that fine-tune RNA and, subsequently, protein expression levels which leads to downregulation or exacerbation of multiple physiological and pathological processes in the human body [17]. Aberrant miRNA expression has been associated with multiple diseases and conditions, providing therapeutic options for disease management. Moreover, disease-associated miRNA deregulation is reflected in various biological fluids such as gingival crevicular fluid (GCF), blood plasma, and saliva [19].

The aim of this dissertation was to identify miRNAs associated with PD which could be detected in bodily fluids and utilized for PD diagnostics in the future. The present study followed a multiphase approach employed previously [18]. Initially a genome-wide miRNA assessment which enables the assessment of 2569 miRNAs was performed in gingival tissue samples, and 15 miRNAs, potentially associated with PD, were selected for further analysis. Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-qPCR) in a larger sample of gingival tissues was performed in order to validate microarray results. Four target miRNAs (miR-140-3p, -145-5p, -146a-5p and -195-5p) were selected for further assessment in GCF, saliva, and blood plasma. Participants with RA were included aiming to more accurately select inflammation-related miRNAs and to assess previously unexplored PD and RA associations through miRNAs.

Novelty and relevance of the work

In the field of periodontology, the number of studies analyzing miRNA associations with PD is increasing; however, multiple studies employ miRNA analysis based only on RT-qPCR [19]. In our study, microarray analysis of gingival tissue was performed to select PD-associated miRNAs which were then further analyzed by means of RT-qPCR in gingival samples, saliva, gingival crevicular fluid, and blood plasma. To the best of our knowledge, this is the first study to encompass analysis of PD-related miRNAs in aforementioned samples for corresponding participants. Moreover, the association between gingival miRNA expression and RA or antirheumatic drugs was not published previously.

The authors believe that the findings of this study provide useful data for future studies aiming to develop non-invasive PD diagnostic methods which would help tackle the issue of high PD prevalence. Moreover, the study adds to the body of knowledge linking PD with RA.

The aim of the study was to identify PD-related miRNAs and to evaluate the diagnostic potential of target miRNAs for PD diagnostics in saliva, GCF, and blood plasma, and to assess miRNA associations with RA and clinical-pathological parameters of both diseases.

Tasks

1. To assess genome-wide miRNA expression profile in periodontitis-affected and healthy gingival tissues, to evaluate associations with RA status.
2. To validate selected miRNAs in a larger sample of gingival tissues and to examine miRNA expression associations with PD, RA and clinical-pathological parameters of both diseases.
3. To assess selected miRNAs (miR-140-3p, miR-145-5p, miR-146a-5p and miR-195-5p) associations with PD and clinical-pathological parameters in GCF, saliva, and blood plasma.
4. To determine and compare diagnostic properties of miR-140-3p, miR-145-5p, miR-146a-5p and miR-195-5p for PD diagnostics in GCF, saliva, and blood plasma.

The hypothesis of the study is that the expression of miRNA in the gingival tissue and the amount of miRNA in the GCF, saliva, and blood plasma are associated with periodontitis, rheumatoid arthritis, and the clinical-pathological parameters of these diseases.

Defensive statements:

1. Genome-wide miRNA expression profile differs in PD-affected and healthy gingival tissues and it is associated with rheumatological status.
2. The expression of miR-140-3p, miR-145-5p and miR-146a-5p is higher in PD-affected tissues and correlates with clinical-pathological parameters of PD.
3. The levels of miR-140-3p, miR-145-5p, miR-146a-5p in GCF and blood plasma as well as the levels of miR-145-5p in saliva are associated with PD and / or clinical-pathological parameters of PD.

4. In the present sample, GCF levels of miR-140-3p, miR-145-5p, miR-146a-5p, and miR-195-5p presented with the higher diagnostic value as compared to saliva and blood plasma. The combination of miR-140-3p / miR-145-5p / miR-146a-5p in GCF had better diagnostic performance as compared to individual miRNAs.

METHODOLOGY

Study design and inclusion of subjects in the study

In total, 240 participants undergoing dental or rheumatological treatment at Vilnius University (VU) Hospital Santaros and Zalgiris Clinics during the enrollment period (2018-2020) were invited to participate in the cross-sectional study based on the inclusion and exclusion criteria (Table 1). The enrollment of the subjects took place simultaneously in both research centers. In order to form a comparative group of patients with RA, 94 participants with confirmed diagnosis of RA according to the ACR/EULAR 2010 criteria [115] were invited to participate. The study details were explained to the participants and a written informed consent was obtained prior to enrollment. The enrollment of participants and study design is presented in Figure 1.

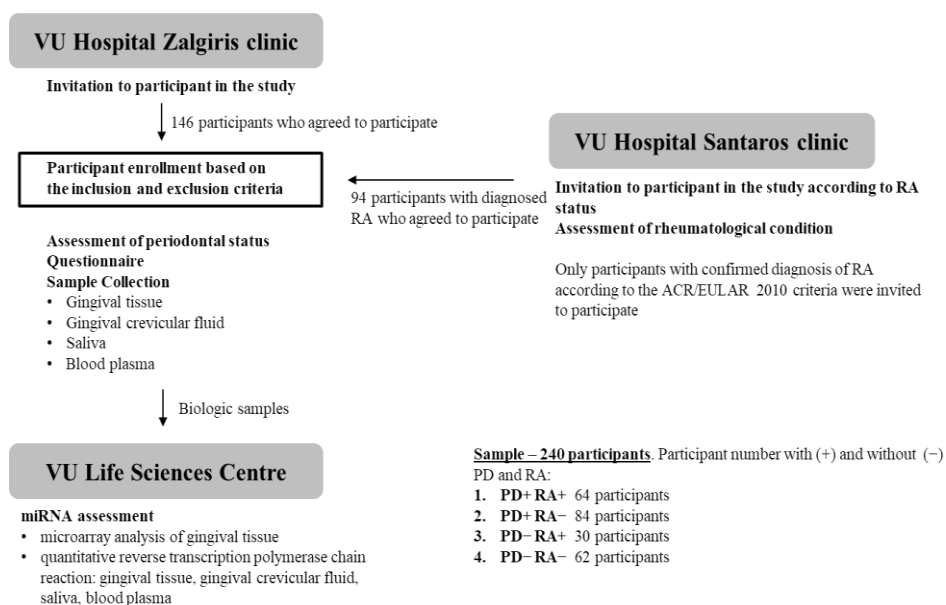


Fig. 1. Participant enrollment and study design.

The research was authorized by the Vilnius Regional Biomedical Research Ethics Committee (February 6, 2018, No. 158200-18-992-500).

Table 1. Criteria for inclusion and exclusion of patients.

| Inclusion criteria | Exclusion criteria |
|---|---|
| <p><u>General:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Persons over 18 years of age • Individuals who agree to participate in the study and have signed an informed consent form <p><u>Criteria for inclusion for PD group:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • The diagnosis of PD has been confirmed according to the 2018 classification criteria of periodontal diseases <p><u>Criteria for inclusion for RA group:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • The diagnosis of RA was confirmed according to ACR / EULAR 2010 diagnostic criteria | <ul style="list-style-type: none"> • Persons under 18 years of age • Patients with autoimmune non-rheumatic diseases • Pregnancy • Chronic pathologies (e.g., heart failure, cirrhosis of the liver, etc.) • Tumors of the mouth and face • Professional oral hygiene or periodontal treatment has been performed in the last 6 months • Full adentia • Medication that may significantly affect the clinical manifestations of periodontal pathology: calcium channel blockers, antiepileptics preparations, cyclosporins. |

Assessment of periodontal status

Periodontal examination was performed by one researcher periodontist and consisted of clinical examination, X-ray analysis, and a questionnaire. Full mouth probing at six sites per tooth (mesio-buccal, mid-buccal, disto-buccal, mesio-lingual, mid-lingual, and disto-lingual) was performed using periodontal probe. During clinical examination the following periodontal outcome parameters were documented: clinical attachment loss (CAL), probing pocket depth (PPD), bleeding on probing (BOP), and number of missing teeth. Panoramic X-rays performed at the day of examination were used for computer-based analysis of bone loss (BL). A questionnaire was used to assess oral health related behaviors and sociodemographic variables.

Periodontal diagnosis was determined according to the 2018 American Academy of Periodontology (AAP) and the European Federation of Periodontology (EFP) classification of periodontal diseases guidelines [26].

Accordingly, participants with periodontitis presented with clinically detectable PD-related interdental CAL at ≥ 2 non-adjacent teeth or having a buccal or oral CAL ≥ 3 mm with pocketing > 3 mm detectable at ≥ 2 teeth. Staging of PD was used to define disease severity: initial – stage I, moderate – stage II, severe – stage III, advanced severe – stage IV.

Assessment of rheumatological condition

RA status assessment was performed by one researcher rheumatologist. RA clinical status was evaluated by disease Activity Score 28 C-reactive protein (DAS28) and a patient-derived questionnaires provided to all RA subjects: Rheumatoid Arthritis Impact of Disease (RAID) and Health Assessment Questionnaire (HAQ) [118, 209, 210]. RAID was used to quantify the impact of disease and HAQ - disability in activities of daily living. Data regarding RA treatment with glucocorticoids, conventional synthetic or biologic disease-modifying antirheumatic drugs, was collected from medical records.

Sample Collection

Gingival tissue sampling. Gingival tissue sampling for participants with PD was performed from the deepest periodontal pocket during periodontal treatment. Healthy gingival tissues were harvested during surgical crown lengthening or other non-research-related interventional procedures. Upon collection, gingival samples were immediately placed in aqueous RNA stabilization solution RNeasy Protect (Qiagen, USA).

GCF sampling. For periodontally healthy participants, GCF was collected from the palatal groove of maxillary incisors. For participants with PD, GCF was collected from the deepest periodontal pockets. Prior to sample collection, supragingival plaque and saliva were removed and the sampling site was isolated with cotton pellets. A total of five sterile absorbent paper points were inserted in the dental groove/periodontal pocket and left in place for 30 seconds. Any paper points contaminated with blood were discarded. Paper points were placed in an aqueous RNeasy Protect Stabilization Solution (Qiagen, USA).

Saliva sampling. Participants were asked to refrain from drinking, eating, smoking, and tooth brushing at least 2 hours prior to the unstimulated saliva sampling procedure. Participants rinsed their mouth with distilled water for 1 min. At least 2 mL of saliva was collected into a sterile tube and the saliva

was centrifuged at $2600 \times g$ for 15 min. Afterwards, salivary supernatant was separated from cellular phase and transferred into 2 mL sterile tubes, then RNase inhibitor SUPERase™ (TFS, USA) was added.

Blood sampling. Blood sampling was performed by collecting 10 mL of peripheral blood into sterile BD Vacutainer® tubes (Becton-Dickinson, Barricor™, USA) containing dipotassium ethylenediaminetetraacetic acid (K2 EDTA anticoagulant). Samples were centrifuged at $2000 \times g$ for 15 min. Plasma was separated and transferred into 2 mL sterile tubes.

RNA extraction

Total RNA from snap-frozen, ground gingival tissue samples and liquid biopsy samples (GCF, saliva and blood plasma) were isolated using *Trizol*™ (Invitrogen, TFS, USA) reagent and *miRNeasy Mini Kit* (Qiagen, Hilden, Germany), respectively, according to manufacturers' instructions. Following the treatment with *Trizol*™ reagent, chloroform was added to gingival tissue lysate and centrifuged. RNA from aqueous phase was precipitated using isopropanol, washed several times with ethanol, air-dried and re-dissolved in RNase-free water. To *QIAzol*® *Lysis Reagent* (Qiagen) treated liquid biopsy samples, 25 fmol synthetic spike-in control cel-miR-39 (manufacturer's assay ID – 000200, Applied Biosystems (ABI), TFS, USA) and chloroform was added. Subsequent RNA purification procedure was carried out by following manufacturer's instructions. Purified RNA was eluted in RNase-free water. Assessment of RNA quality and quantity was performed using *NanoDrop 2000* spectrophotometer (Thermo Scientific, USA) and *Qubit 4* fluorometer (Invitrogen, TFS). Extracted RNA was stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ until use.

MiRNA microarray analysis

A total of 16 gingival tissue samples were used for global miRNA expression profiling. Briefly, 100 ng of total RNA was labeled with 3-pCp cyanine dye using *miRNA Complete Labeling and Hyb Kit* along with *MicroRNA Spike-In Kit* (both from Agilent Technologies (AT), USA). Labeled samples were hybridized onto *Human microRNA 8 x 60K* format microarrays (AT) at $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 20 h. Scanning of the microarray slides was performed using *Agilent SureScan* scanner (AT). Array images were analyzed and further data processing was carried out using *Feature Extraction v10.7* and *GeneSpring GX v14.9* (both from AT) software packages, respectively.

TaqMan Low Density arrays

To evaluate the expression of selected miRNAs in 80 gingival tissue samples, custom-designed *TaqMan Low Density Arrays* (ABI, TFS) were used. *TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit* and specific *RT Primer Pool* mix (ABI, TFS) were used to reverse transcribe RNA into cDNA, following manufacturer's instructions for cDNA synthesis without preamplification step. Reverse transcription (RT) reaction was performed in 15 µL volume and contained 350 ng of input RNA. For quantitative reverse transcription PCR (RT-qPCR), TLDA cards were loaded with reaction mix, containing 2× *TaqMan Universal Master Mix II, No UNG*, nuclease-free water and synthesized cDNA, and then run on *ViiA7™ Real-Time PCR System* by using *ViiA 7 Software v1.2* (all from ABI, TFS).

cDNA synthesis and Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction

The abundance of miR-140-3p, -145-5p, -146a-5p and -195-5p in GCF, saliva and blood plasma was evaluated by the means of RT-qPCR using *TaqMan® MicroRNA Assays* (manufacturer's assay IDs – 002234, 002278, 000468 and 000494, respectively, ABI, TFS). RT reaction was carried out using *TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit* (ABI, TFS), following manufacturer's instructions. The final volume of each reaction for every gene in every sample was 7.5 µL, containing specific stem-loop RT primers and 2.5 µL (1-10 ng) of total RNA. 1.33 µL of RT product, 2× *TaqMan™ Universal Master Mix II, no UNG*, 20× miRNA assays (both from ABI, TFS), and RNase-free water in a final reaction volume of 10 µL were used for RT-qPCR. All samples were run in technical triplicates on *ViiA7™ Real-Time PCR System* by using *ViiA 7 Software v1.2* (all from ABI, TFS).

Statistical analysis

Continuous variables were depicted as mean ± standard deviation (SD). Clinical variables were compared performing Shapiro-Wilk normality test followed by Student t-test or Mann-Whitney U test. Categorical variables were assessed with chi-squared test. MiRNA levels were normalized using spiked-in cel-miR-39 and log₂-transformed. Gingival miRNA expression correlation with clinical variables was evaluated by performing Spearman correlation analysis. The diagnostic value for identifying PD patients from periodontally healthy participants was assessed by calculating the area under the receiver-operator characteristic (ROC) curve (AUC). A value of $P \leq 0.050$ was considered statistically significant.

Statistical software was utilized for data analysis and sample size calculation, including GPower 3.1.9 (University of Düsseldorf, Germany), GenEx software, v7.0 (MultiD Analyses AB, Sweden) and SPSS 20.0 (IBM, Armonk, NY).

RESULTS

Participant characteristics and clinical findings

A total of 240 individuals were included in the biomedical study (Fig. 1). Participants fulfilling the definition of a PD case were regarded as a periodontitis group (PD +, N = 148). Of these, almost half (N = 68, 45.95%) had severe disease (stage III-IV), 46 (31.08%) had moderate PD (stage II), and 34 (22.97%) an initial form of the disease (stage I). The mean age of PD patients at enrollment was 53.92 ± 10.44 years. Participants not fulfilling PD case definition were considered as periodontally healthy (PD-, N = 92). The mean age of the periodontally healthy participant group at enrollment was 47.53 ± 14.01 . A detailed analysis of descriptive and clinical-pathological data is provided in Table 2.

Table 2. Demographic and clinical-pathological characteristics of the subjects.

| Variable | PD + (N = 48) | PD-(N = 92) | P value |
|--|-------------------|-------------------|------------------|
| Age (years) | 53.92 ± 10.44 | 47.53 ± 14.01 | <0.001 |
| Gender (female / male) | 118/30 | 83/9 | 0.047 |
| <u>Periodontal parameters:</u> | | | |
| CAL (mm) | 2.15 ± 0.94 | 1.09 ± 0.7 | <0.001 |
| PPD (mm) | 2.68 ± 0.55 | 1.97 ± 0.29 | |
| BOP (%) | 44.03 ± 16.91 | 13.23 ± 5.58 | |
| BL (%) | 26.05 ± 8.36 | 14.91 ± 4.71 | |
| Lost teeth (N) | 4.94 ± 4.54 | 2.47 ± 2.97 | |
| <u>Stages of periodontitis (N, %):</u> | | | |
| Stage I. | 34 (22.97) | | |
| Stage II | 46 (31.08) | - | - |
| Stage III | 23 (15.54) | | |
| Stage IV | 45 (30.41) | | |
| Stage III or IV | 68 (45.95) | | |
| <u>Annual dental prophylaxis (N):</u> | | | |
| Once a year or less | 101 | 59 | 0.574 |
| Two or more times a year | 47 | 33 | |
| <u>Tooth brushing frequency (N):</u> | | | |
| Once a day or less | 39 | 18 | 0.276 |
| Two or more times a day | 109 | 74 | |

Table 2. Demographic and clinical-pathological characteristics of the subjects (continuation).

| Variable | PD + (N = 48) | PD-(N = 92) | P value |
|---------------------------------------|----------------------|--------------------|----------------|
| <u>Approximal teeth cleaning (N):</u> | | | |
| Yes | 103 | 81 | 0.001 |
| No | 45 | 11 | |
| <u>Smoking (N):</u> | | | |
| Current smoker | 28 | 5 | 0.005 |
| Never | 79 | 65 | |
| Former | 41 | 22 | |
| <u>Alcohol consumption (N):</u> | | | |
| Once a week | 23 | 14 | 0.920 |
| Once a month | 82 | 49 | |
| Never | 43 | 29 | |
| <u>Education (N):</u> | | | |
| Secondary | 28 | 7 | 0.046 |
| Higher non-university | 34 | 21 | |
| University education | 86 | 64 | |
| BMI (kg / m ²) | 25.46 ± 4.08 | 24.33 ± 4.13 | 0.039 |

Data are presented as mean ± standard deviation or N, %. Differences between periodontitis patients (PD +) and periodontally healthy subjects (PD-) are reported with a P value, statistically significant differences are highlighted. Abbreviations: BL - bone loss; BMI - body mass index; BOP – bleeding on probing index; CAL – clinical attachment loss; N - number of subjects; PD - periodontitis; PPD – probing pocket depth.

Associations between clinical status of periodontitis and rheumatoid arthritis

Assessing the periodontological status of 94 RA patients included in the study, 64 (68.09%) had PD and 30 (31.91%) were periodontally healthy. The demographic and clinical-pathological characteristics of RA patients are presented in Table 3.

Table 3. Demographic and clinical-pathological characteristics of RA patients (N = 94).

| Variable | Value |
|---|---------------|
| Age (years) | 54.15 ± 11.04 |
| Gender (female / male) | 85/9 |
| <u>RA disease activity based on DAS28 score (N, %):</u> | |
| High | 25 (26.60) |
| Moderate | 48 (51.06) |
| Low | 7 (7.45) |
| Remission | 14 (14.89) |
| DAS28 | 4.19 ± 1.42 |
| RAID | 4.45 ± 2.27 |
| HAQ | 0.86 ± 0.62 |
| RA duration (years) | 12.83 ± 10.49 |
| <u>Medication use (N):</u> | |
| bDMARDs | 46 |
| sDMARDs | 63 |
| GK | 60 |
| bDMARDs in combination with sDMARDs | 37 |
| bDMARDs in combination with GK | 29 |

Data are presented as mean ± standard deviation or N, %. Abbreviations: bDMARDs - biological disease-modifying antirheumatic drugs; DAS28 - disease activity score; GK - glucocorticoids; HAQ - Health Assessment Questionnaire; N - number of participants; PD - periodontitis; RA rheumatoid arthritis; RAID - Rheumatoid arthritis impact of disease; sDMARDs - synthetic disease-modifying antirheumatic drugs.

The association of RA disease and RA treatment with the clinical course of PD was assessed in a sample of PD patients by dividing subjects into patients with PD and RA (PD + RA +, N = 64, 43.24%) and rheumatologically healthy subjects (PD + RA-, N = 84, 56.76%) (Table 4).

Table 4. Comparison of periodontal status between subjects with periodontitis and rheumatoid arthritis (PD+ RA+) and rheumatologically healthy subjects with periodontitis (PD + RA-).

| Variable | PD + RA + (N = 64) | PD + RA- (N = 84) | P value |
|--|--------------------|-------------------|--------------|
| <u>Stages of periodontitis</u> <u>(N, %):</u> | | | |
| Stage I | 14 (21.88%) | 20 (23.81%) | 0.765 |
| Stage II | 22 (34.38%) | 24 (28.57%) | |
| Stage III | 8 (12.50%) | 15 (17.86%) | |
| Stage IV | 20 (31.25%) | 25 (29.76%) | |
| Stage III or IV | 28 (43.75%) | 40 (47.62%) | |
| <u>Periodontal parameters:</u> | | | |
| CAL (mm) | 2.31 ± 0.9 | 2.02 ± 0.95 | 0.057 |
| PPD (mm) | 2.81 ± 0.59 | 2.58 ± 0.49 | 0.009 |
| BOP (%) | 44.14 ± 16.68 | 43.95 ± 17.18 | 0.281 |
| BL (%) | 26.91 ± 8.32 | 25.42 ± 8.34 | 0.947 |
| Lost teeth (N) | 6.27 ± 4.79 | 3.93 ± 4.08 | 0.001 |

Data are presented as mean ± standard deviation or N, %. Differences are reported with a P value, statistically significant differences are highlighted. Abbreviations: BOP - bleeding on probing; BL - bone loss; CAL - clinical attachment loss; PPD - probing pocket depth, N - number of subjects.

In the PD and RA groups, severe or moderate PD (stage II-IV) was more than twice as common in patients with active RA compared to those in RA remission (88.89% vs. 42.86%, P = 0.042). (Fig. 2).

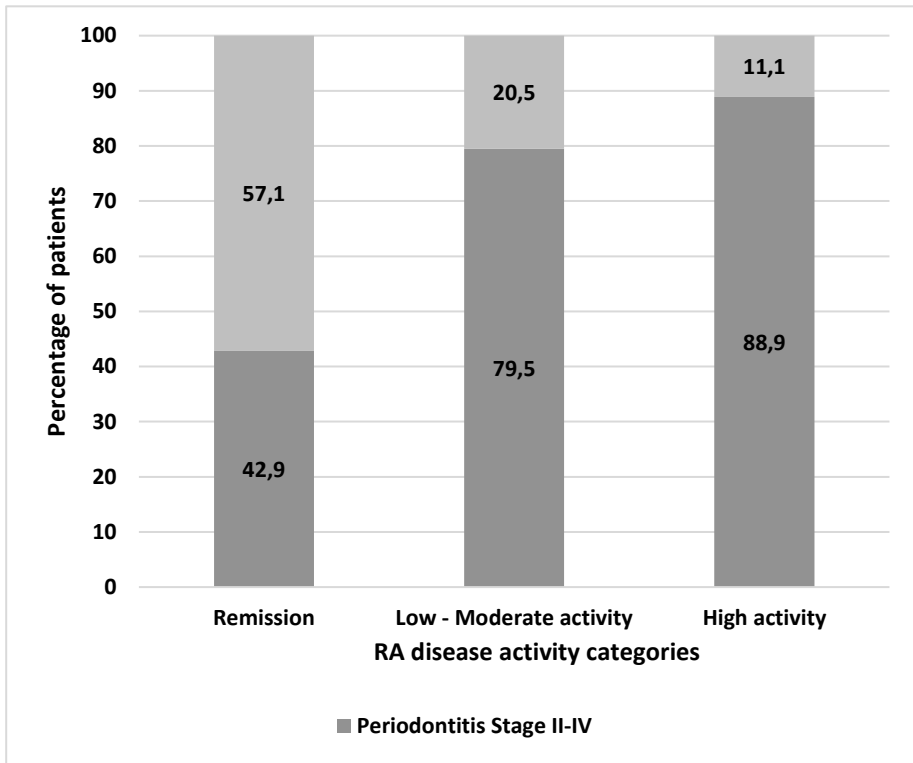


Figure 2. Rheumatoid arthritis (RA) disease activity association with periodontitis (PD) severity. Percentage of participants with moderate to severe (Stage II – IV) as compared to initial (Stage I) periodontitis amongst RA patients with varying disease activity categorized according to disease activity score (DAS28).

Also, RA patients in remission as compared to participants with higher RA disease activity had lower mean CAL (1.67 ± 0.78 mm vs 2.39 ± 0.89 mm, $P = 0.045$). Similarly, RA patients who rated their condition defined by RAID as more severe, had a higher mean CAL (2.43 ± 0.9 mm vs. 1.87 ± 0.8 mm, $P = 0.046$). Evaluating the association of RA treatment (bDMARDs, sDMARDs, GKK) with the clinical status of PD, it was found that biologic therapy was associated with lower scores of mean CAL, PPD, BOP, BL and number of missing teeth, however it was only significant for BOP (Table 5).

Table 5. Comparison of periodontal outcome parameters in patients with periodontitis and rheumatoid arthritis with regard to the bDMARDs treatment.

| Variable | Patients treated with bDMARDs (N = 26) | Patients not treated with bDMARDs (N = 38) | P value |
|--------------------------------|--|--|--------------|
| <u>Periodontal parameters:</u> | | | |
| CAL (mm) | 2.11 ± 0.80 | 2.45 ± 0.95 | 0.133 |
| PPD (mm) | 2.72 ± 0.43 | 2.88 ± 0.67 | 0.269 |
| BOP (%) | 38.46 ± 12.76 | 48.03 ± 18.05 | 0.016 |
| BL (%) | 24.85 ± 7.05 | 28.33 ± 8.90 | 0.101 |
| Missing teeth (N) | 5.50 ± 3.76 | 6.79 ± 5.37 | 0.294 |

Data are presented as mean ± standard deviation or N, %. Differences between groups are reported with a P value, statistically significant differences are highlighted. Abbreviations: bDMARDs: biologic disease-modifying antirheumatic drugs; BOP - bleeding on probing; BL - bone loss; CAL - clinical attachment loss; N - number of participants; PPD - periodontal probing depth.

miRNA associations preliminary study

A preliminary study assessing miRNA associations was performed in a smaller sample (N = 61) of biological samples aiming to optimize the methodology. In order to select PD-specific miRNAs that could be detected in body fluids, a total miRNA analysis was performed on 4 samples of healthy and 4 PD-affected gingiva. 53 statistically significant deregulated miRNAs were identified, of which 30 (56.60%) miRNAs had higher expression in periodontitis-affected gingival tissue. Among the upregulated miRNAs, miR-199a-5p and miR-3198 had the highest fold change (FC) of 23.9 and 31.9, respectively. 4 miRNAs (miR-199a-5p, miR-483-5p, miR-3198, miR-4299) were selected and evaluated in GCF, saliva, and plasma. The amount of miR-3198 in the GCF of subjects with PD was found to be significantly increased (FC = 1.7, P = 0.019) and had significant AUC value for the diagnosis of periodontitis (AUC = 0.72, P = 0.008). The AUC of the combination of miR-3198 and miR-4299 detected in GCF was 0.86 (P < 0.001). In saliva the levels of miR-199a-5p were 11.3-fold (P = 0.045) higher among participants with severe PD as compared to periodontally healthy subjects. Meanwhile, lower

levels of miR-199a-5p were observed in the plasma of PD participants (FC = -4.8, P = 0.008) as compared to periodontally healthy individuals. Plasma miR-199a-5 had significant AUC for the diagnosis of periodontitis (AUC = 0.66, P = 0.032).

miRNA associations main study

The main study of miRNA associations was performed utilizing the approach optimized in the preliminary study. PD-associated miRNAs were selected by performing genome-wide miRNA assessment in 16 gingival samples. Results were validated by RT-qPCR analysis in a larger sample of gingival tissues (N = 80). The levels of miR-140-3p, -145-5p, -146a-5p and -195-5p were evaluated in bodily fluids: GCF (N = 210), saliva (N = 173), and blood plasma (N = 221). An overview of the study design is shown in Fig. 3.

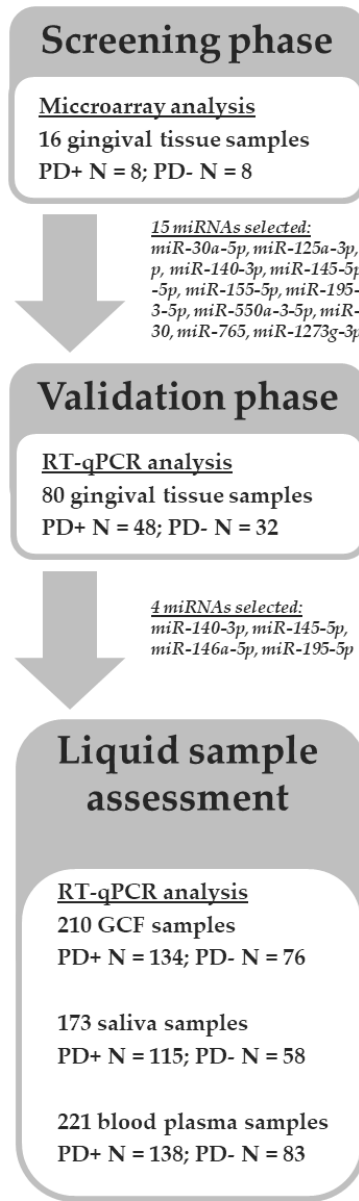


Fig. 3. miRNA assessment overview.

Genome-wide miRNA expression profiling in gingival tissues

The initial step was to screen candidate miRNAs reflecting PD by performing high-throughput analysis which enables the detection of 2569 miRNAs. A total of 16 gingival samples were preselected for microarray analysis: 8 PD-affected tissues and 8 healthy gingival tissues. In both groups,

4 patients were diagnosed with RA. Only miRNAs that were detected in $\geq 25\%$ of samples were used in further analysis (N = 760) (Fig. 4A)

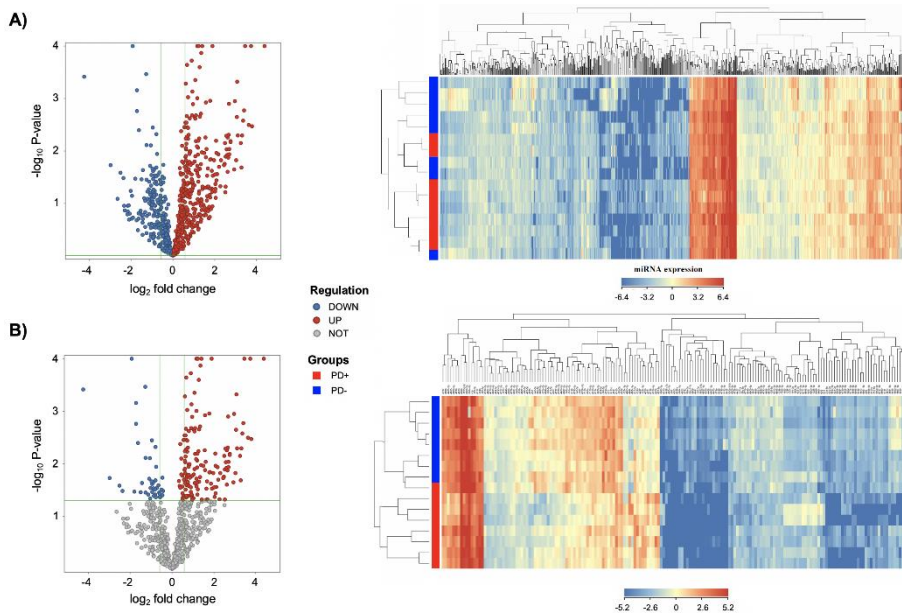


Fig. 4. Volcano plot and hierarchical clustering of differentially expressed miRNAs in periodontitis-affected (PD+) (N = 8) and healthy (PD-) (N = 8) gingival tissue samples. **(A)** MiRNA expression profile obtained after initial processing of data including only miRNAs that were detected in at least 25 % of the samples (N = 760); **(B)** Significantly deregulated miRNAs (fold change ≥ 1.5 or ≤ -1.5 ; $P \leq 0.05$) between PD+ and PD- groups (N = 177). Each column represents individual miRNA, and each row represents an individual sample. The expression, represented by color, ranges from low (blue) to high (red), as indicated by the scale bars.

Comparison of miRNA expression between PD + and PD- groups. Comparison of miRNA expression in PD-affected and healthy gingival tissues (PD +, N = 8 vs. PD-, N = 8) revealed 177 significantly deregulated miRNAs. In PD-affected tissues, the majority of miRNAs (N = 140, 79.10%) were upregulated as compared to healthy tissues (Fig. 4B), including 8 miRNAs (miR-3609, -4539, -378c, -4441, -30c-2-3p, -30a -3p, -5008-5p, -4697-5p) with more than a 10-fold increase in expression.

Comparison of miRNA expression among rheumatologically healthy participants. To assess the specificity of miRNA for periodontitis, PD-affected tissues were compared with healthy gingival tissue collected from patients without RA (PD + RA-, N = 4 vs. PD-RA-, N = 4). One-hundred and

eighteen significantly deregulated miRNAs were revealed. The expression of most miRNAs (N = 77, 65.25%) was increased, including 13 miRNAs with > 10-fold upregulation (miR-378c, -450a, 3064, 3192-3p, etc.). Among downregulated miRNAs, only six (miR-197-5p, -203a-3p, -210-3p, -375, -1246, -6746-5p) had lower > 3-fold decreased expression in PD-affected tissues.

Comparison of miRNA expression in PD and RA participants. The association of miRNAs with inflammatory diseases was assessed by comparing patients with PD and RA with periodontally and rheumatologically healthy participants (PD + RA +, N = 4 vs. PD-RA-, N = 4). Twenty-nine significantly deregulated miRNAs were identified, most of which (N = 22, 75.86%) had increased expression, including miR-550a-3-5p, -140-3p, -765, and others. The upregulation of three miRNAs (miR-378c, -3609, -4436b-3p) was > 10-fold. Among downregulated miRNAs, miR-3065-3p had the highest fold change of -11.3.

miRNA expression associations with RA. Healthy gingival tissues collected from individuals with RA were compared with healthy gingiva of rheumatologically healthy participants (PD-RA +, N = 4 vs. PD-RA-, N = 4) revealing 56 deregulated miRNAs. The expression of most miRNAs (N = 50, 89.29%) was downregulated in the RA patients` gingival tissues, including miR-4539 and miR-3620-5p, whose expression was altered > 20-fold. The change in expression of another ten miRNAs (miR-34c-5p, -424-3p, -551b-3p, -3065-5p, etc.) ranged from 10 to 20-fold. Of the 6 upregulated miRNAs, miR-4701-5p had the highest fold change of 34.

miRNA expression patterns among groups. Several miRNAs were significantly deregulated in various groups. miR-140-3p was upregulated in PD+RA- and PD+RA+ groups while it was downregulated in the PD-RA+ group as compared to PD-RA-. More than half (N = 16, 55.17%) of the miRNAs which were significantly deregulated in PD+RA+ comparison with PD-RA- also showed significant changes in PD + RA- comparison with PD-RA-. Detailed representation of miRNA expression patterns is given in Figure 5.

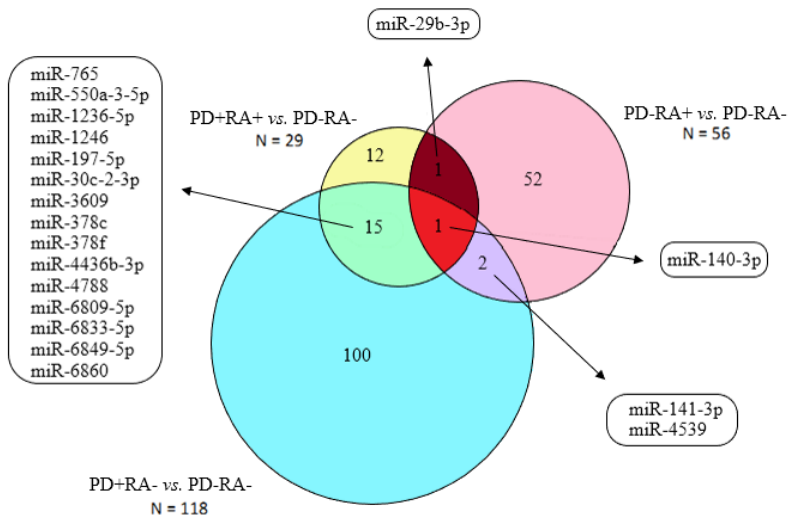


Fig. 5. miRNA expression patterns with regard to periodontitis (PD) and rheumatoid arthritis (RA) status.

Initial screening of miRNA expression in PD-affected tissues, revealed a number of potentially PD-related miRNAs (miR-30a-5p, -125a-3p, -126-5p, -140-3p, -145-5p, -146a-5p, -155-5p, -195-5p, -423-5p, -550a-3-5p, -575, -630, -765, -1273g-3p, and -3917) which were further analyzed in an extended cohort of 80 gingival tissues by means of RT-qPCR.

Validation of miRNA expression in gingival tissues

RT-qPCR analysis of gingival tissue samples evaluating the expression of selected miRNAs was performed to validate genome-wide miRNA profiling results. Forty-eight PD affected and 32 healthy gingival tissues were assessed. Among participants with PD, 23 had RA, while among periodontally healthy participants, 7 were diagnosed with RA.

Comparison of miRNA expression between groups. In accordance to microarray analysis, PD-affected tissues had a higher expression of miR-140-3p (FC = 1.3, P = 0.013) and miR-145-5p (FC = 1.9, P < 0.001), while the levels of miR-125a-3p (FC = -2.4, P = 0.001) were lower in inflamed tissues (Fig. 6A). Meanwhile, among participants without RA, similarly significant upregulation of miR-140-3p and miR-145-5p in PD-affected tissues was revealed (Fig. 6B). In the aforementioned comparison, a significant downregulation in PD-affected gingival tissues was found only in the case of miR-630 (FC = -1.7, P = 0.02). Furthermore, inflamed gingival tissues of RA

patients had higher levels of miR-140-3p (FC = 1.5, P = 0.017) and lower levels of miR-125a-3p (FC = -2.3, P = 0.015) as well as miR-1273g-3p (FC = -1.5, P = 0.013) as compared to healthy participants (Fig. 6C).

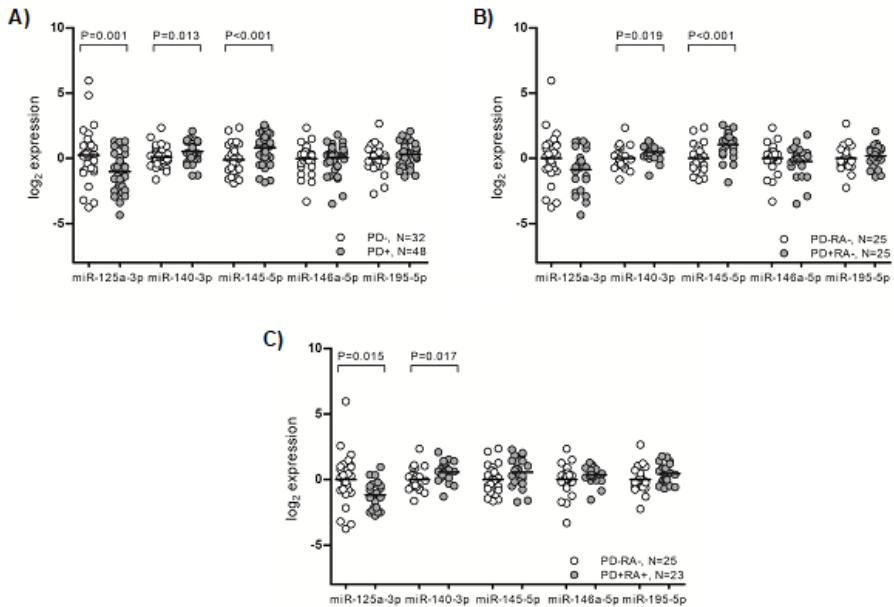


Fig. 6. MiR-125a-3p, miR-140-3p, miR-145-5p, miR-146a-5p, and miR-195-5p expression in gingival tissues collected from patients with periodontitis (PD), rheumatoid arthritis (RA), and healthy participants. (A) MiRNA expression comparison between PD+ and PD- groups irrespective of RA status including all available samples. (B, C) Subgroup analysis comparing tissues of PD patients without RA (PD+ RA-) and with RA (PD+ RA+) and tissues of healthy participants (PD- RA-). The black lines denote median values.

miRNA expression associations with clinical variables. To assess the association of gingival miRNA expression with clinical and pathological variables, a correlation matrix analysis was performed (Fig. 7). Periodontal outcome parameters indicating worse PD clinical status correlated positively with miR-145-5p (CAL, $r = 0.43$, $P < 0.001$; PPD, $r = 0.44$, $P < 0.001$; BOP, $r = 0.41$, $P < 0.001$; BL, $r = 0.46$, $P < 0.001$; missing teeth, $r = 0.27$, $P = 0.018$; PD stages, $r = 0.51$, $P < 0.001$), miR-140-3p (PPD, $r = 0.28$, $P = 0.013$; BOP, $r = 0.30$, $P = 0.007$; BL, $r = 0.24$, $P = 0.032$; PD stages, $r = 0.24$, $P = 0.031$) and correlated negatively with miR-30a-5p (CAL, $r = -0.23$, $P = 0.040$; PD stages, $r = -0.24$, $P = 0.035$), miR-125a-3p (CAL, $r = -0.25$, $P = 0.026$, PPD,

$r = -0.30$, $P = 0.008$, BOP, $r = -0.30$, $P = 0.006$, BL, $r = -0.24$, $P = 0.036$, PD stages, $r = -0$, $P = 0.015$) and miR-423-5p (CAL, $r = -0.24$, $P = 0.035$; PPD, $r = -0.24$, $P = 0.032$; BL, $r = -0.24$, $P = 0.031$). Significant correlations of five miRNAs with higher RA disease activity according to DAS28 were observed: miR-140-3p ($r = 0.51$, $P = 0.004$), miR-145-5p ($r = -0.39$, $P = 0.034$), miR-195-5p ($r = 0.41$, $P = 0.026$), miR-550a-3-5p ($r = 0.37$, $P = 0.046$), miR-630 ($r = -0.48$, $P = 0.008$). Six miRNAs correlated with medication used for RA treatment: sDMARDs with miR-140-3p ($r = -0.38$, $P = 0.039$), GKK with miR-630 ($r = 0.38$, $P = 0.037$), miR-1273g -3p ($r = -0.42$, $P = 0.019$), miR-3917 ($r = -0.37$, $P = 0.042$), bDMARDs with miR-125a-3p ($r = 0.46$, $P = 0.011$), miR-140-3p ($r = -0.56$, $P = 0.001$) and miR-195-5p ($r = -0.37$, $P = 0.044$). In the case of miR-140-3p, miR-195-5p, and miR-630, significant correlations with RA disease activity and the use of drugs for the treatment of RA were in opposite directions. A similar opposite correlation was observed between the severity of PD disease and the use of bDMARDs in miR-140-3p and miR-125a-3p.

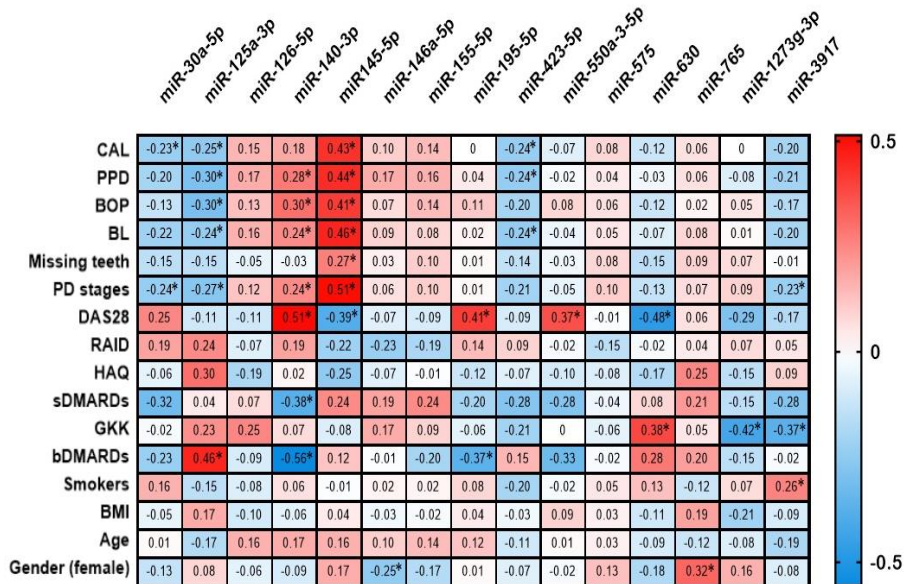


Fig. 7. Correlation matrix analysis between gingival levels of miRNAs and clinical variables. Spearman correlations represented by color as indicated by the scale bar: positive correlation (red), negative correlation (blue), no correlation (white). Significant correlations indicated as follows: * $P < 0.050$, ** $P < 0.010$. bDMARDs - biologic disease-modifying antirheumatic drugs; BL - bone loss; BMI - body mass index; BOP - bleeding on probing; CAL -

clinical attachment loss; DAS28 - Disease Activity Score; GKK - glucocorticoids; HAQ - health assessment questionnaire; PD - periodontitis; PPD - periodontal probing depth; RAID - rheumatoid arthritis impact of disease; sDMARDs - synthetic disease-modifying antirheumatic drugs.

A more detailed analysis of miRNA associations with periodontal status was performed assessing differences between PD stages and CAL, PPD, BOP, BL cut-off values. Gingival tissues collected from participants with stage IV and III severe PD, revealed a 2.2-fold increase in miR-145-5p ($P < 0.001$) and a 1.3-fold increase in miR-140-3p ($P = 0.026$) while the expression of miR-125a-3p was decreased ($FC = -2.2$, $P = 0.007$). Significantly deregulated miR-125a-3p ($FC = -3.5$, $P = 0.014$) and miR-195-5p ($FC = 1.7$, $P = 0.039$) were observed in gingival tissues participants with moderate (stage II) PD compared to healthy gingiva. Initial (stage I) PD was not associated with significant changes in miRNA expression. The association between miRNA expression and cut-off values of periodontal outcome parameters is shown in Figure 8.

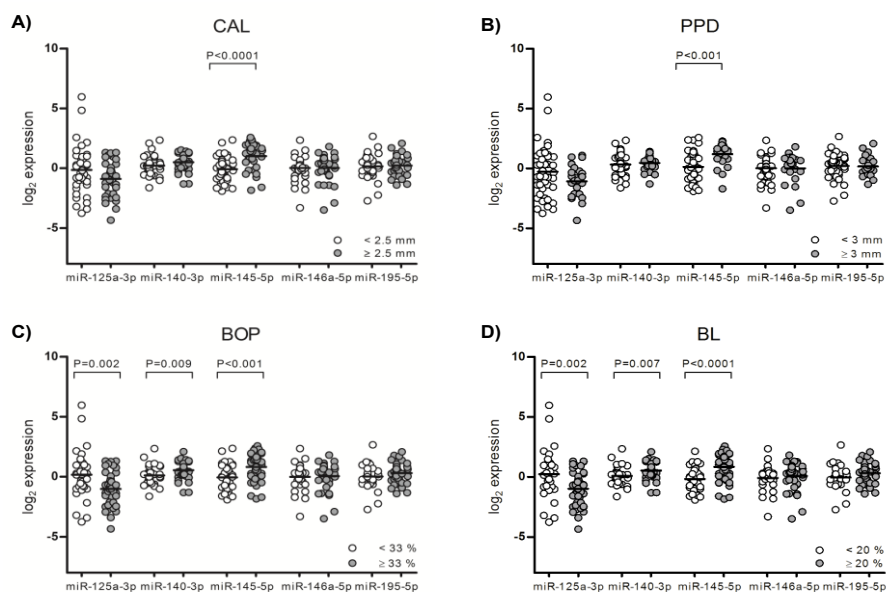


Fig. 8. Relative expression of miR-125a-3p, 140-3p, -145-5p, -146a-5p, -195-5p in gingival tissue evaluated by means of RT-qPCR. Comparison of cut-off points of (A) mean clinical attachment loss (CAL); (B) periodontal probing depth (PPD); (C) bleeding on probing (BOP); (D) bone loss (BL). The black lines denote median values.

RA status represented by DAS28 score and the treatment with DMARDs correlated with gingival miRNA expression. Patients with active RA (DAS28 ≥ 3.2) had 2.7-fold lower miR-145-5p ($P = 0.023$), 1.8-fold lower miR-1273g-3p ($P = 0.012$), and 2.5-fold higher miR-575 ($P = 0.045$) expression in gingival tissues as compared with patients with well-controlled RA (DAS28 < 3.2). Participants receiving bDMARDs had lower levels of miR-140-3p (FC = -1.6, $P = 0.004$) and miR-195-5p (FC = -1.6, $P = 0.036$) and higher levels of miR-125a-3p (FC = 2.5, $P = 0.017$) as compared to participant who were not receiving bDMARDs. Meanwhile, sDMARDs were associated with levels of miR-126 (FC = 1.46, $P = 0.03$) and miR-1273g-3p (FC = -1.4, $P = 0.045$) in gingival tissue.

Selection of miRNAs for assessment in bodily fluids. Based on the results of miRNA expression analysis in gingival tissues, four miRNAs, namely miR-140-3p, -145-5p, -146a-5p and -195-5p, were selected for further assessment in a larger sample of salivary (N=173) and blood plasma specimens (N = 221). Downregulated miRNAs were excluded from further analysis. Inclusion of miR-140-3p, -145-5p, -146a-5p and -195-5p was based on observed increased expression related to PD presence and/or severity as well as previously published data.

miRNA analysis in GCF

The levels of selected miRNAs were assessed in 210 GCF samples: 134 samples were collected at the deepest periodontal pockets from PD patients and 76 GCF samples were collected from healthy gingival grooves.

Comparison of miRNA levels between study groups. There was a significant decrease in miR-146a-5p (FC = -1.3, < 0.001) and an almost significant increase in miR-145-5p (FC = 1.2, $P = 0.057$) levels in GCF collected from participants with PD as compared to periodontally healthy individuals. Significant alterations in GCF levels of miRNAs were also observed when comparing PD and RA patients with healthy participants (PD + RA +, N = 34 vs. PD-RA- N = 38): miR-145-5p (FC = 1.3, $P = 0.042$), miR-146a-5p (FC = -1.4, $P = 0.001$).

miRNA GCF levels associations with clinical variables. A correlation analysis revealed that GCF levels of miR-140-3p and miR-145-5p had a weak positive correlation with PD outcome parameters indicating worse clinical status of PD (Fig. 9). Meanwhile, miR-146a-5p negatively correlated with PD outcome variables: CAL ($r = -0.29$, $P < 0.001$), PPD ($r = -0.26$, $P < 0.001$), BOP ($r = -0.30$, $P < 0.001$), BL ($r = -0.27$, $P < 0.001$) missing teeth ($r = -0.23$, $P = 0.001$).

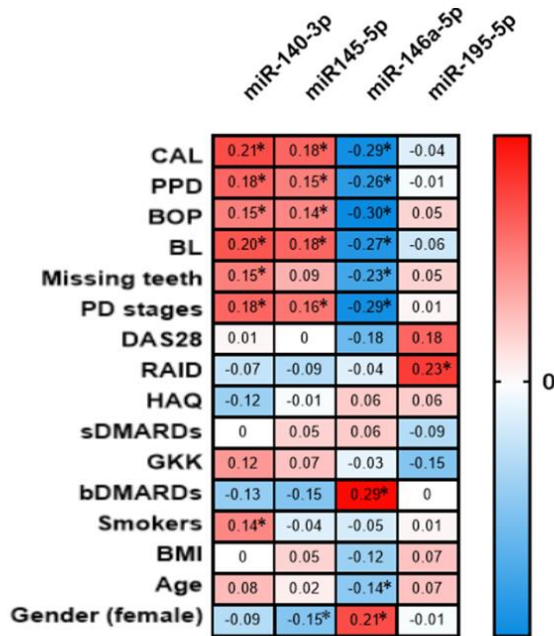


Fig. 9. Correlation matrix analysis between gingival crevicular fluid miRNA levels and clinical variables. Spearman correlations represented by color as indicated by the scale bar: positive correlation (red), negative correlation (blue), no correlation (white). Significant correlations indicated as follows: * $P < 0.050$, ** $P < 0.010$. bDMARDs - biologic disease-modifying antirheumatic drugs; BL - bone loss; BMI - body mass index; BOP - bleeding on probing; CAL - clinical attachment loss; DAS28 - Disease Activity Score; GKK - glucocorticoids; HAQ - health assessment questionnaire; PD - periodontitis; PPD - periodontal probing depth; RAID - Rheumatoid arthritis impact of disease; sDMARDs - synthetic disease-modifying antirheumatic drugs.

Assessment of cut-off values of periodontal outcome parameters, revealed that BOP and BL were associated with miRNA GCF levels. A higher bleeding on probing index ($BOP \geq 33\%$) was associated with a decrease in miR-146a-5p ($FC = -1.3$, $P < 0.001$). Also, more advanced alveolar bone resorption ($BL \geq 20\%$) was associated with an increase in miR-140-3p ($FC = 1.2$, $P = 0.004$) and a decrease in miR-146a-5p ($FC = -1.4$, $P < 0.001$) GCF levels. Advanced severe PD (stage IV) was found to be associated with miR-140-3p ($FC = 1.2$, $P = 0.002$), miR-145-5p ($FC = 1.5$, $P = 0.007$), miR-146a-5p ($FC = -1.7$, $P <$

0.001) levels in GCF as compared to participants without PD. A detailed representation of miRNA levels of PD stages is presented in Fig. 10.

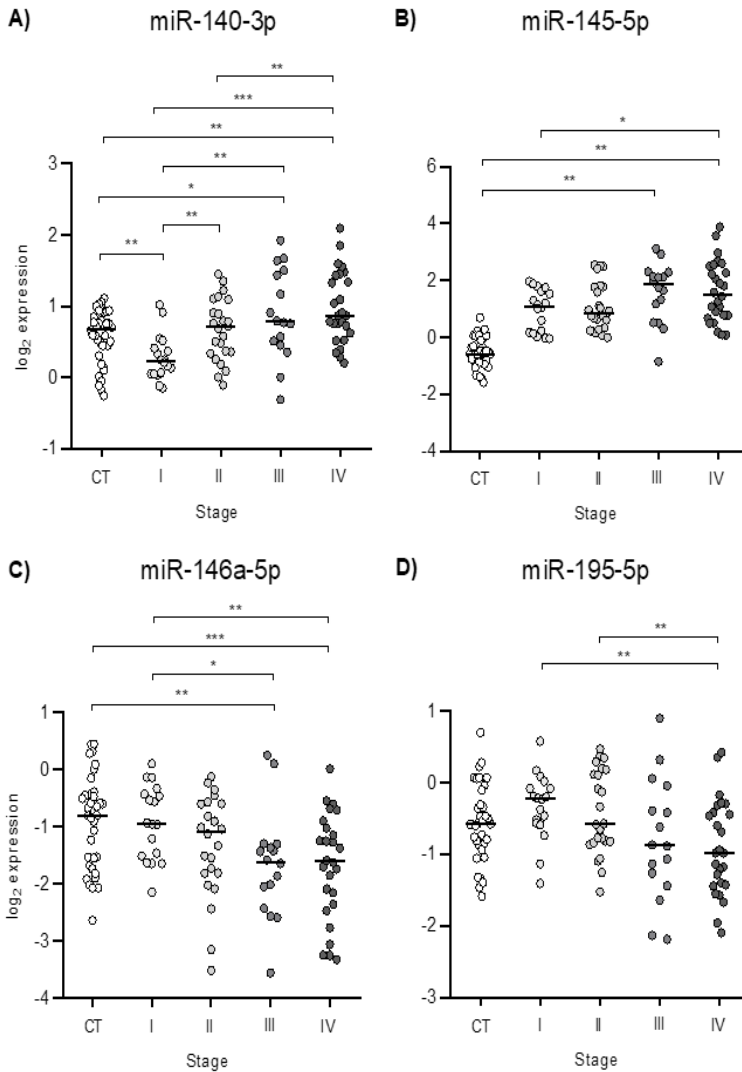


Fig. 10. Comparison of miR-140-3p, -145-5p, -146a-5p, and -195-5p levels in gingival crevicular fluid with regard to periodontitis severity defined by stages. CT indicates periodontally healthy participants. The black lines denote median values, * $P < 0.050$, ** $P < 0.010$ and *** $P < 0.001$.

miRNA analysis in saliva

Salivary miRNA associations with PD were assessed in 173 samples. Salivary samples collected from participants with PD (N = 115) revealed no significant differences in the levels of miR-140-3p, -145-5p, -146a-5p and -195-5p as compared to salivary samples collected from periodontally healthy participants (N = 58).

Salivary miRNA levels associations with clinical variables. A more detailed analysis revealed that miR-145-5p levels were significantly associated with BOP and PPD in saliva samples. Patients with a higher BOP index ($\geq 33\%$) had a 1.3-fold increase in miR-145-5p ($P = 0.042$) as compared to participants with lower BOP. Additionally, mean PPD greater than 3 mm was associated with a 1.5-fold increase in miR-145-5p ($P = 0.034$) as compared with a lower mean PPD. It should be noted that salivary miR-145-5p associations BOP and PPD were in line with findings revealed in gingival tissue (Fig. 11).

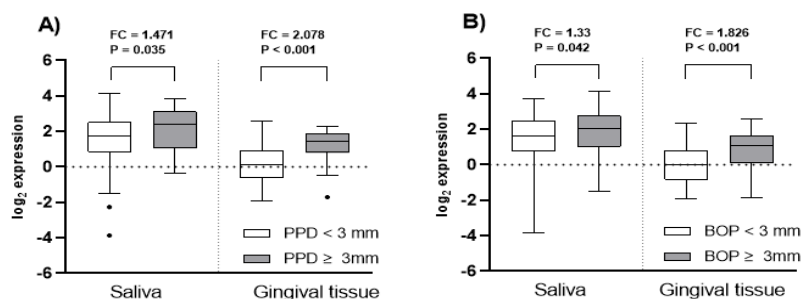


Fig. 11. Comparison of miR-145-5p levels in saliva and expression in gingival tissue based on (A) mean periodontal probing depth (PPD) and (B) bleeding on probing index (BOP). The black lines denote median values.

miRNA analysis in blood plasma

Plasma miRNAs were assessed in 221 samples, of which 138 were collected from patients with PD and 83 – from periodontally healthy participants.

Comparison of miRNA levels between study groups. The levels of miR-140-3p were higher in plasma samples collected from patients with PD (FC = 1.2, $P = 0.030$) as compared to periodontally healthy participants. Notably, an increase in miR-140-3p plasma levels was in line with miR-140-3p increased expression in PD affected tissues.

Plasma miRNA levels associations with clinical variables. Assessing the severity of PD according to periodontal outcome variables, it was observed that worse clinical status of PD was associated with increased plasma levels of miR-145-5p and decreased levels of miR-146a-5p (Fig. 12).

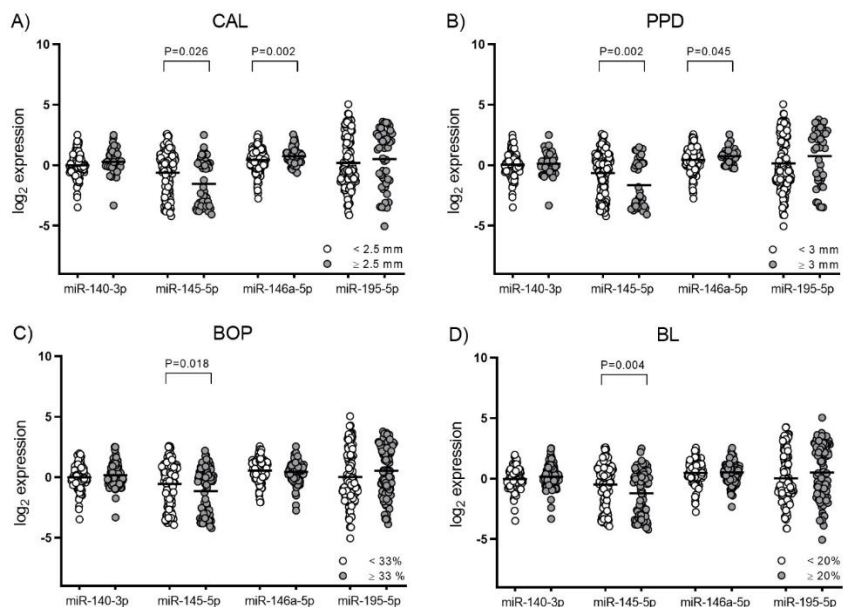


Fig. 12. Comparison of blood plasma miR-140-3p, miR-145-5p, -146a-5p, and -195-5p levels with regard to cut-off points of (A) mean clinical attachment loss (CAL); (B) periodontal probing depth (PPD); (C) bleeding on probing (BOP); (D) bone loss (BL). The black lines denote median values.

Diagnostic performance of circulating miRNAs

The diagnostic potential of miR-140-3p, -145-5p, -146a-5p, and -195-5p was assessed by performing ROC analysis with AUC value calculation.

In GCF, miR-146a-5p had significant diagnostic performance analyzing PD+ versus PD- groups (AUC = 0.63, sensitivity 61.2%, specificity 60.5%, $P = 0.002$). Additional analysis was performed evaluating miRNA diagnostic performance for mild to moderate (stage I–II) and severe (stage III–IV) PD separately. While none of the assessed miRNAs revealed significant diagnostic value for the assessment of mild to moderate disease, 3 out of 4 miRNAs had significant AUC values for severe PD diagnostics: miR-140-3p (AUC = 0.614, sensitivity = 58.3%, specificity = 57.9%, $P = 0.022$) (Fig.

13A), miR-145-5p (AUC = 0.621, sensitivity = 56.7%, specificity = 56.6%, $P = 0.016$) (Fig. 13B) and miR-146a-5p (AUC = 0.702, sensitivity = 66.7%, specificity = 65.8%, $P < 0.001$) (Fig. 13C). An increase in diagnostic performance was observed when the combination of these miRNAs was assessed and reached significant levels for diagnostics of PD presence (AUC = 0.655, sensitivity = 62.7%, specificity = 61.8%, $P < 0.001$) and mild to moderate (AUC = 0.612, sensitivity = 60.8%, specificity = 60.5%, $P = 0.018$) or severe PD (AUC = 0.709, sensitivity = 66.7%, specificity = 65.8%, $P < 0.001$) separately (Fig. 13E).

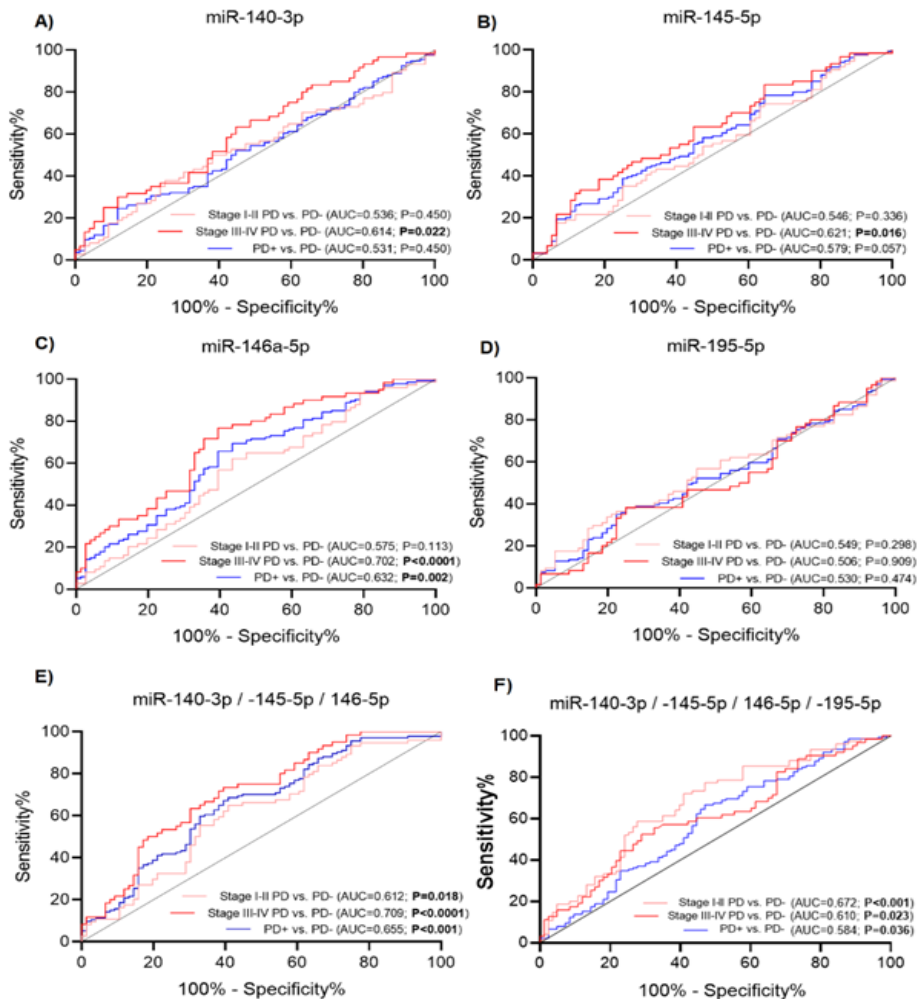


Fig. 13. ROC curve analysis of GCF miRNA diagnostic performance with regard to periodontitis (PD) severity defined by stages in GCF: (A) miR-140-3p, (B) miR-145-5p, (C) miR-146a-5p, (D) miR-195-5p and (E) a

combination of miR-140-3p, miR-145-5p and miR-146a-5p; **(F)** a combination of miR-140-3p / -145-5p / -146a-5p / -195-5p in plasma.

In saliva, neither individual miRNAs nor their combinations had statistically significant diagnostic value. Meanwhile, in plasma the combination of all miRNAs revealed significant diagnostic performance (Fig. 13F).

DISCUSSION

Prevalence of periodontitis, associations between clinical status of RA and PD

Periodontitis is a common chronic inflammatory disease with the incidence of the PD varying from 10% to 70%. In the present study, according to 2018 AAP/EFP classification of periodontal diseases guidelines, PD was diagnosed for 61.7% of participants. PD is considered an age-related disease, which was also evident in the current study, since the mean age of individuals with PD was higher than the mean age of periodontally healthy participants (53.92 years and 47.53 years, respectively). In our study, 45.9% of the 148 individuals diagnosed with PD had a severe form of the disease. Meanwhile, participants with PD had twice as many teeth lost as compared to periodontally healthy individuals. Tooth loss is associated with masticatory, aesthetic and phonetic difficulties, as well as a general deterioration in the quality of life [214]. However, damage caused by PD is not limited to changes in the mouth. There is growing evidence in the scientific literature that PD is associated with an increased risk and a more severe clinical course of RA, atherosclerosis, diabetes, and other diseases [6]. Given the high prevalence of PD and the damage caused by the disease, the guidelines issued in 2018 emphasized the need to improve early PD diagnostics by identifying molecular markers [26]. The main objective of this study was to identify PD-related miRNAs and to evaluate their diagnostic potential in body fluids.

Given the importance of miRNA molecules in modulating inflammatory and immune responses, patients with RA were included in this study. Of the 94 patients with RA enrolled in the study, 68.1% had PD. A high prevalence of PD among RA patients was also found in other studies and ranged from 68 to 97% [11, 215, 216]. In a 2020 systematic review and a meta-analysis, it was concluded that subjects with PD were at higher risk of developing RA (SD 1.7, $P < 0.001$) [9]. Also, studies have shown that a more severe form of PD is associated with a higher RA activity, whereas periodontal treatment decreases RA activity and concentration of inflammatory cytokines [10, 11]. In our study sample, there was also a significant association between the clinical course of these diseases, with moderate to severe PD being twice as common in patients with high-activity RA as in patients in RA remission (88.9% vs. 42.9%, $P = 0.042$). Also, patients in RA remission were characterized by lower CAL mean values. Previous studies claim that PD adversely affects the course of RA, and this assumption is supported by the associations observed in our sample.

Meanwhile, studies evaluating the effect of RA on periodontal tissues provide conflicting results [12]. In our study, the severity of PD was compared in patients with and without RA. Describing the severity of PD according to 2018 AAP/EFP criteria, no significant association with rheumatological status was observed. However, comparing PD outcome parameters instead of PD stages, it was revealed that participants with PD and RA had higher mean PPD and number of missing teeth as compared to participant with PD only. A systematic review and meta-analysis published by Hussain and colleagues concluded that RA was not associated with a more severe periodontal condition in a sample of PD patients [12]. The authors of the review acknowledge that this outcome may have been influenced by the use of biological disease-modifying drugs in RA patients. bDMARDs have been shown to significantly reduce concentration of inflammatory mediators in the blood, and also a decrease in cytokine levels has been found in GCF [177, 220]. Also, patients treated with anti-TNF- α have lower BOP and PPD values [177, 220]. This study also revealed associations between bDMARDs and periodontal status, as bDMARDs were associated with significantly lower PPD. This data supports the hypothesis proposed by Hussain and colleagues that RA may adversely affect periodontal status, but antirheumatic drugs may have a positive effect on periodontal tissues, therefore the effect of RA on PD is not always revealed.

miRNA expression analysis in gingival tissue

The initial step of the study was the use of high-throughput analysis to assess genome-wide miRNA expression profiles in gingival tissues. Largely differential miRNA expression profiles were observed in PD-affected tissues as compared to healthy gingiva. Out of the total of 177 significantly deregulated miRNAs, the majority were upregulated in inflamed gingival tissues, implying that inflammatory modulation through miRNAs is actively involved in the pathogenesis of PD. Previously, a number of studies employed microarray-based miRNA profiling comparing healthy and inflamed gingival tissues varying largely in sample sizes and the number of deregulated miRNAs [19]. Moreover, a recent systematic review assessing miRNA associations with PD, concluded that heterogenous results between studies may be associated with PD case definition since a sizeable number of studies were conducted before the implementation of the current AAP-EFP classification [251]. In the present study, aiming to improve the precision of PD-associated miRNA identification, we utilized a credible sample of 16 tissues, while statistical analysis involved subgroup assessment with regard to RA status

which resulted in the selection of 15 potentially PD-associated miRNAs: miR-30a-5p, -125a-3p, -126-5p, -140-3p, -145-5p, -146a-5p, -155-5p, -195-5p, -423-5p, -550a-3-5p, -575, -630, -765, -1273g-3p, and -3917.

Gingival tissue analysis by means of RT-qPCR confirmed that miR-140-3p and miR-145-5p were significantly overexpressed in PD-affected tissues. The upregulation of miR-140-3p and miR-145-5p was associated both with PD presence and PD clinical status. It was observed that higher values of mean CAL, PPD, BL and BOP were associated with an increase in miR-140-3p and miR-145-5p levels. In accordance to our findings, previously miR-140-3p has been shown to be upregulated in PD-affected tissues as compared to healthy gingiva [221]. A proposed role of miR-140-3p is associated with osteogenic differentiation and bone remodeling [228]. Similarly, miR-145-5p negatively affects bone formation, as inhibition of miR-145-5p was associated with promotion of osteogenic differentiation [227]. Moreover, increase in tumor necrosis factor- α (TNF- α) levels is associated with higher expression of miR-145-5p [226]. Following careful consideration of miRNA involvement in inflammation and immunity, as well as data validated by RT-qPCR analysis, 4 miRNAs (miR-140-3p, miR-145-5p, miR-146a-5p, miR-195-5p) were selected for further assessment in GCF, saliva, and blood plasma.

miRNA analysis in body fluids

Comparing diagnostic properties of target miRNAs in GCF, saliva, and blood plasma, it was observed that GCF derived miRNAs had a higher diagnostic value as compared to saliva or blood plasma derived miRNAs. The levels of miR-140-3p and miR-145-5p in GCF correlated with many periodontal outcome parameters indicating more severe PD. The study of Saito and colleagues also revealed elevated miR-145-5p levels in GCF of PD patients [242]. In our study, when evaluating the diagnostic properties of selected miRNAs in GCF, only miR-146a-5p had a significant AUC, with sensitivity and specificity of 61.2% and 60.5%, respectively. As compared to single molecules, combinations of molecules have been shown to have better diagnostic properties. Jin and colleagues evaluated the combination of 17 miRNAs in gingival tissue which had an AUC value of 0.996 [246]. In this study, the miR-140-3p / -145-5p / -146a-5p combination in GCF had the highest AUC value of 0.665.

In the present study, salivary levels of miR-145-5p were associated with PPD and BOP; however, no significant AUC values for salivary miRNAs were revealed. A pilot study by Han and colleagues demonstrated that the salivary miRNA extracted from extracellular vesicles (EV) showed improved

diagnostic properties as compared to miRNA extracted from whole saliva [250]. In the mentioned study, salivary levels of miR-140-3p and miR-146a-5p were not associated with PD presence based on whole saliva miRNA assessment; however, both miR-140-3p and miR-146a-5p were significantly upregulated in EV-based miRNA analysis. Similarly, another study assessed the presence of 84 miRNAs in saliva and revealed that only the levels of miR-381-3p were significantly higher amongst participants with severe PD [239]. Despite the fact that the current study revealed associations between salivary miRNA levels and PD variables, the reference points utilized were indicative of advanced stages of PD. Preferably, salivary miRNA-based diagnostics should enable the detection of early PD or susceptibility to PD. For that purpose, it is likely that salivary PD assessment may benefit from alternative methods of miRNA assessment as compared to whole saliva miRNA analysis.

The current study revealed that alterations in plasma levels of target miRNA were associated with both PD presence and PD severity based on stages and periodontal outcome variables. The upregulation of miR-140-3p in plasma among participants with PD was in line with the observed miR-140-3p increased expression in gingival tissues. Meanwhile, lower plasma levels of miR-145-5p were in contrast to detected higher miR-145-5p expression in gingival tissues. Similarly, a recent study assessing saliva and plasma EV miRNA levels also observed a variation of miRNA expression collected from different samples [237]. Previously a number of studies revealed blood plasma miRNA associations with periodontal status [19]. While the utilization of plasma derived miRNA-based PD diagnostics remains questionable, the consistently observable alterations in plasma miRNA levels with regard to PD revealed in the present study and others, adds to the current understanding of PD associations with systemic health.

Despite the large sample size and thorough approach utilized to select PD associated miRNAs, the study has several drawbacks. There were significant differences in participant age and sex among patients with PD and periodontally healthy participants. Another limitation of the study is the difference in GCF, saliva, and plasma sample sizes. Moreover, based on the findings of this study, causal relationships could not be assessed as this study aimed at presenting an overview which may highlight areas for further research.

CONCLUSIONS

1. Genome-wide miRNA expression analysis identified 177 significantly deregulated miRNAs comparing PD-affected and healthy gingival tissues. The expression of most miRNAs (N = 140) was increased in periodontitis-affected gingival tissue. The associations between PD and RA clinical course observed in the study sample were also revealed through alterations in miRNA expression profile in gingival tissue.
2. RT-qPCR method revealed increased expression of miR-145-5p ($P < 0.001$) and miR-140-3p ($P = 0.013$) in PD-affected gingival tissues. For participants with severe and / or moderate PD, upregulation of miR-145-5p, miR-140-3p, miR-195-5p was observed. In this cross-sectional study, the use of bDMARDs was associated with lower miR-140-3p, miR-195-5p, and higher miR-125a-3p expression in gingival tissue.
3. Higher GCF levels of miR-140-3p, miR-145-5p, and lower levels of miR-146a-5p were associated with severe PD. In saliva samples, miR-145-5p levels were associated with a higher BOP and PPD. Increased plasma derived miR-140-3p, miR-146a-5p and decreased miR-145-5p levels were associated with PD and / or periodontal outcome parameters.
4. In the study sample, miRNAs detected in GCF had better diagnostic value for PD diagnostics as compared to miRNAs detected in saliva or blood plasma. miR-140-3p / miR-145-5p / miR-146a-5p combination in GCF presented with better diagnostic properties (AUC = 0.655, sensitivity 62.69%, specificity 61.84%, $P < 0.001$) as compared to individual miRNAs.

PADĖKA

Nuoširdžiai dėkoju savo mokslinei vadovei prof. dr. Alinai Pūrienei už tai, kad man suteikė galimybę dalyvauti mokslinėje veikloje, manimi pasitikėjo, nuolatos skatino bei palaikė einant šiuo keliu. Taip pat dėkoju prof. dr. Sonatai Jarmalaitei už mokslines konsultacijas, vertingus patarimus bei visapusišką paramą.

Norėčiau padėkoti dr. Kristinai Šnipaitienei, Benitai Buragaitei-Staponkienei, dr. Eglei Pucevičienei ir prof. dr. Irenai Butrimienei už tai, kad noriai dalinosi su manimi savo sukauptomis žiniomis.

Dėkoju disertacijos recenzentams ir gynimo tarybos nariams: doc. dr. Sauliui Drukteiniiui, prof. dr. Jolantai Dadonienei, prof. dr. Nomedai Basevičienei, prof. dr. Agnieszka Drożdżik, prof. dr. Laurai Linkevičienei ir prof. dr. Vygandui Rutkūnui už konstruktyvią kritiką, padėjusią tobulėti.

Galiausiai noriu padėkoti ir skirti šį darbą svarbiausiems žmonėms mano gyvenime: žmonai Agnei, sesei Justinai, tėvams Daivai ir Linui.

PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS

Straipsniai, publikuoti tarptautinės duomenų bazės *Clarivate Analytics Web of Science (CA WoS)* referuojamuose leidiniuose su citavimo indeksu:

1. **Rovas A**, Puriene A, Punceviciene E, Butrimiene I, Stuopelyte K, Jarmalaite S. Associations of periodontal status in periodontitis and rheumatoid arthritis patients. *J Periodontal Implant Sci.* 2021 Apr;51(2):124-134. doi: 10.5051/jpis.2006060303.
2. **Rovas A**, Puriene A, Snipaitiene K, Punceviciene E, Buragaitė-Staponkiene B, Matuleviciute R, Butrimiene I, Jarmalaite S. Analysis of periodontitis-associated miRNAs in gingival tissue, gingival crevicular fluid, saliva and blood plasma. *Arch Oral Biol.* 2021 Jun;126:105125. doi: 10.1016/j.archoralbio.2021.105125.
3. **Rovas A**, Puriene A, Snipaitiene K, Punceviciene E, Buragaitė-Staponkiene B, Matuleviciute R, Butrimiene I, Jarmalaite S. Gingival crevicular fluid microRNA associations with periodontitis. *J Oral Sci.* 2022 Jan 19;64(1):11-16. doi: 10.2334/josnusd.21-0282. Epub 2021 Oct 25. PMID: 34690249.

Kiti straipsniai, susiję su disertacijoje nagrinėjama tema, tačiau netiesiogiai, su disertacijoje keliamais uždaviniais, publikuoti doktorantūros studijų metu tarptautinės duomenų bazės *Clarivate Analytics Web of Science (CA WoS)* referuojamuose leidiniuose su citavimo indeksu:

1. Punceviciene E, **Rovas A**, Puriene A, Stuopelyte K, Vitkus D, Jarmalaite S, Butrimiene I. Investigating the relationship between the severity of periodontitis and rheumatoid arthritis: a cross-sectional study. *Clin Rheumatol.* 2021 Aug;40(8):3153-3160. doi: 10.1007/s10067-021-05661-3.

Pranešimai mokslinėse konferencijose

1. **Adomas Rovas**, Eglė Puncevičienė, Irena Butrimienė, Kristina Stuopelytė, Sonata Jarmalaitė, Benita Burgaitė-Staponkienė, Alina Pūrienė “Circulating MiRNAs as Biomarkers for Non-invasive Diagnostics of Chronic Periodontitis”. Pristatytas žodinis pranešimas „CED-IADR/NOF Oral Health Research“ kongrese, 2019m. rugsėjo 19-21, Madridas, Ispanija.

2. **Adomas Rovas**, Eglė Puncevičienė, Irena Butrimienė, Dalius Vitkus, Alina Pūrienė. „Aetiopathogenic factors associated with clinical status of chronic periodontitis and rheumatoid arthritis“. Pristatytas žodinis pranešimas „The European Association of Dental Public Health - EADPH“ kongrese, 2018m. spalio 18-20 Palma, Ispanija
3. **Adomas Rovas**, Eglė Puncevičienė, Irena Butrimienė, Dalius Vitkus, Alina Pūrienė. „Vitamin D serum levels and clinical status of chronic periodontitis and rheumatoid arthritis“. Pristatytas stendinis pranešimas „EuroPerio 9“, 2018m. birželio 20-23, Amsterdamas, Nyderlandai.

Stendinis pranešimas, susijęs su disertacijoje nagrinėjama tema, tačiau netiesiogiai, su disertacijoje keliamais uždaviniais:

1. Benita Buragaite-Staponkiene, Kristina Snipaitiene, **Adomas Rovas**, Alina Puriene, Egle Punceviciene, Irena Butrimiene, Sonata Jarmalaite. „Gingival crevicular fluid microRNAs as diagnostic biomarkers for periodontitis“. „CED-IADR/NOF Oral Health Researh“ kongresas, 2021m. rugsėjo 15-18, Briuselis, Belgija.

Moksliniai projektai vykdyti doktorantūros studijų laikotarpiu

2017-2021 m. vykdytas mokslinis projektas Nr. 01.2.2-LMT-K-718-01-0023 „Lėtinio periodontito uždegiminio aktyvumo diagnostikos ir gydymo gerinimo tyrimas“, finansuotas Europos regioninės plėtros fondo lėšomis pagal priemonės Nr. 01.2.2- LMT-K-718 veiklą „Aukšto lygio tyrėjų grupių vykdomi moksliniai tyrimai“. Projekto vadovė prof. dr. A. Pūrienė. Vykdančioji institucija: VUL Žalgirio klinikos. Doktorantas A. Rovas – projekto vykdytojas.

PRIEDAI

Leidimai atlikti biomedicininį tyrimą



VILNIAUS UNIVERSITETO MEDICINOS FAKULTETAS

Viešoji įstaiga, Universiteto g. 3, LT-01513 Vilnius, tel. (8 5) 268 7001, faks. (8 5) 272 8646, el. p. infor@cr.vu.lt.

Duomenys kaupiami ir saugomi Juridinių asmenų registre, kodas 211950810.

Fakulteto duomenys: M.K. Čiurlionio g. 21/27, LT-03101 Vilnius, tel. (8 5) 239 8701, (8 5) 239 7800, faks. (8 5) 239 8705, el. p. mf@mf.vu.lt

VILNIAUS REGIONINIS BIOMEDICININIŲ TYRIMŲ ETIKOS KOMITETAS

M.K. Čiurlionio g. 21/27, LT-03101 Vilnius, tel. (8 5) 268 6998, el. p. rbtek@mf.vu.lt

LEIDIMAS ATLIKTI BIOMEDICININIŲ TYRIMŲ

2018-02-06 Nr.158200-18-992-500

Tyrimo pavadinimas:

Periodonto ligų ir reumatoidinio artrito etiopatogenezės ir klinikinės eigos sąsajos su epigenetiniais veiksniais

| | |
|-----------------------------------|--|
| Protokolo Nr.: | 1 |
| Versija: | 1 |
| Data: | 2018 01 15 |
| Informuoto asmens sutikimo forma: | 2 2018 01 30 3 2018 01 30 |
| Pagrindinis tyrėjas: | Alina Pūrienė |
| Įstaigos pavadinimas: Adresas: | VŠI Vilniaus universiteto ligoninės Žalgirio klinika Žalgirio g. 115, Vilnius |
| Leidimas galioja iki: | 2021 09 |

Leidimas išduotas Vilniaus regioninio biomedicininų tyrimų etikos komiteto posėdžio (protokolas Nr. 158200-2018/2), vykusio 2018 m. vasario 6 d. sprendimu.

Pirmininkas



prof. Saulius Vosylius

LR Asmens duomenų teisinės apsaugos įstatymo 10 str. 3 punktą numato, jog asmens duomenys apie asmens sveikatą automatiškai būdu, taip pat mokslinio **medicininio tyrimo tikslais** gali būti tvarkomi tik pranešus Valstybinei duomenų apsaugos inspekcijai. Šiuo atveju Valstybinė duomenų apsaugos inspekcija privalo atlikti išankstinę patikrą.

Pasibaigus tyrimui, tyrėjas ar tyrimo užsakovas privalo informuoti VRBTEK raštu apie tyrimo pabaigą bei pateikti tyrimo ataskaitos santrauką.

Reikalavimas pateikti pranešimą apie tyrimo pabaigą bei ataskaitos santrauką įsigaliojo nuo 2010 m. gegužės 6 d. Šį reikalavimą rasite Lietuvos Respublikos sveikatos apsaugos ministro įsakymo "Dėl leidimų atlikti biomedicininį tyrimą išdavimo tvarkos aprašo patvirtinimo" (Žin., 2008, Nr. 6-225; 2010, Nr. 55-2706; 2011, Nr. 233-1570; Nr. 67-3184) 18^l punkte „*Leidimas atlikti biomedicininį tyrimą galioja iki biomedicininio tyrimo paraiškoje nurodytos tyrimo pabaigos datos. Biomedicininių tyrimų užsakovas, jo įgaliotas atstovas ir (ar) pagrindinis tyrėjas per 30 kalendorinių dienų privalo raštu pranešti leidimą atlikti biomedicininį tyrimą išdavusiai institucijai (Lietuvos bioetikos komitetui ar regioniniam biomedicininių tyrimų etikos komitetui) apie tyrimo pabaigą ir per 90 kalendorinių dienų pateikti tyrimo vykdymo ataskaitos santrauką*“.

Įsakymo nuostata taikoma visiems biomedicininiams tyrimams.

Priedų lentelės

S1 lentelė. Bendrųjų charakteristikų palyginimas tarp periodontitu ir reumatoidiniu artritu sergančių tiriamųjų (PD+RA+) bei PD sergančių reumatologiškai sveikų tiriamųjų (PD+RA-).

| Kintamasis | PD+RA+ (N = 64) | PD+RA- (N =84) | P reikšmė |
|---|------------------------|-----------------------|-------------------|
| Amžius (metai) | 55,52 ± 9,57 | 52,70 ± 10,95 | 0,104 |
| Lytis (moterys / vyrai) | 55/9 | 63/21 | 0,148 |
| <u>Apsilankymų pas odontologą dažnis (N):</u> | | | |
| Kartą per metus ar rečiau | 51 | 50 | 0,012 |
| Du ar daugiau kartų per metus | 13 | 34 | |
| <u>Dantų valymo dažnis (N):</u> | | | |
| Kartą per dieną arba rečiau | 20 | 19 | 0,262 |
| Du ar daugiau kartų per dieną | 44 | 65 | |
| <u>Tarpdančių valymas (N):</u> | | | |
| Taip | 43 | 60 | 0,593 |
| Ne | 21 | 24 | |
| <u>Rūkymas (N):</u> | | | |
| Taip | 15 | 13 | 0,087 |
| Ne | 37 | 42 | |
| Anksčiau rūkė | 12 | 29 | |
| <u>Alkoholio vartojimas (N):</u> | | | |
| Kartą per savaitę | 3 | 20 | < 0,001 |
| Kartą per mėnesį | 29 | 53 | |
| Niekada | 32 | 11 | |
| <u>Išsilavinimas (N):</u> | | | |
| Vidurinis | 16 | 12 | 0,098 |
| Aukštasis neuniversitetinis | 17 | 17 | |
| Aukštasis universitetinis | 31 | 55 | |
| KMI (kg/m ²) | 25,29 ± 4,37 | 25,59 ± 3,85 | 0,651 |

Duomenys pateikti nurodant vidurkį ± standartinę nuokrypį arba N, proc. Statistiškai reikšmingi skirtumai pateikti nurodant P reikšmę, statistiškai

reikšmingi skirtumai paryškinti. Santrumpos: KMI – kūno masės indeksas, N – tiriamųjų skaičius; PD – periodontitas; RA – reumatoidinis artritas.

S2 lentelė. Statistiškai reikšmingai pakitusios raiškos miRNR lyginant periodontito pažeistus audinius su sveikais dantenų audiniais, gautos vertinant visuminę miRNR raišką.

| Padidėjusios miRNR raiškos | | | | | |
|----------------------------|------|-----------|--------------|-----|-----------|
| Padidėjusi | FC | P reikšmė | Padidėjusi | FC | P reikšmė |
| miR-3609 | 21,1 | < 0,001 | miR-4299 | 2,3 | 0,031 |
| miR-4539 | 13,9 | 0,003 | miR-6509-5p | 2,3 | 0,006 |
| miR-378c | 13,4 | < 0,001 | miR-195-5p | 2,3 | 0,038 |
| miR-4441 | 12,4 | 0,003 | miR-1273e | 2,3 | 0,009 |
| miR-30c-2-3p | 11,0 | < 0,001 | miR-4417 | 2,3 | 0,012 |
| miR-30a-3p | 10,6 | 0,002 | miR-4673 | 2,3 | 0,023 |
| miR-5008-5p | 10,3 | 0,003 | miR-6769b-5p | 2,3 | 0,001 |
| miR-4697-5p | 10,0 | 0,005 | miR-6800-5p | 1,6 | 0,042 |
| miR-3192-3p | 9,7 | 0,021 | miR-7150 | 1,6 | 0,041 |
| miR-424-3p | 9,6 | 0,007 | miR-151a-5p | 1,6 | 0,025 |
| miR-4470 | 8,7 | 0,005 | miR-3679-5p | 1,6 | 0,004 |
| miR-3622b-5p | 8,4 | < 0,001 | miR-7110-5p | 1,6 | 0,044 |
| miR-378e | 8,4 | 0,002 | miR-6086 | 1,6 | < 0,001 |
| miR-3064-5p | 8,2 | 0,015 | miR-6807-5p | 1,6 | 0,019 |
| miR-4633-5p | 7,9 | 0,001 | miR-652-3p | 1,6 | 0,002 |
| miR-4418 | 7,7 | 0,023 | miR-185-5p | 1,6 | 0,043 |
| miR-4513 | 6,8 | 0,007 | miR-4646-5p | 1,6 | 0,005 |
| miR-6894-5p | 6,8 | 0,007 | let-7i-5p | 1,6 | 0,026 |
| miR-7515 | 6,5 | 0,012 | miR-6124 | 1,6 | 0,003 |
| miR-6861-5p | 6,5 | 0,009 | miR-1273g-3p | 2,3 | 0,027 |
| miR-4685-5p | 6,4 | 0,001 | miR-140-3p | 2,3 | < 0,001 |
| miR-3202 | 6,4 | 0,005 | miR-155-5p | 2,2 | 0,019 |
| miR-4690-5p | 6,3 | 0,014 | miR-3917 | 2,2 | 0,008 |
| miR-4436b-3p | 6,2 | 0,025 | miR-29c-5p | 2,2 | 0,007 |
| miR-4419b | 6,1 | 0,006 | miR-6779-5p | 2,1 | 0,002 |
| miR-4769-5p | 6,1 | 0,012 | miR-126-5p | 2,1 | 0,023 |

| | | | | | |
|-------------|-----|---------|---------------|-----|---------|
| miR-4496 | 6,0 | 0,009 | miR-4800-5p | 2,1 | < 0,001 |
| miR-4429 | 5,9 | 0,005 | miR-8071 | 2,1 | 0,002 |
| miR-4502 | 5,8 | 0,048 | miR-30a-5p | 2,1 | 0,013 |
| miR-4468 | 5,8 | 0,013 | miR-3135b | 2,1 | 0,002 |
| miR-6837-5p | 5,7 | 0,007 | miR-146a-5p | 2,1 | 0,016 |
| miR-4538 | 5,6 | 0,018 | miR-3653-3p | 2,0 | 0,045 |
| miR-6857-5p | 5,5 | 0,019 | miR-6845-5p | 2,0 | 0,001 |
| miR-6856-5p | 4,9 | 0,015 | miR-6789-5p | 2,0 | 0,048 |
| miR-3620-5p | 4,9 | 0,047 | miR-3198 | 1,9 | 0,017 |
| miR-4776-5p | 4,6 | 0,020 | miR-126-3p | 1,9 | 0,042 |
| miR-195-3p | 4,5 | 0,012 | miR-4726-5p | 1,9 | 0,039 |
| miR-4303 | 4,3 | 0,028 | miR-7846-3p | 1,9 | 0,001 |
| miR-450a-5p | 4,3 | 0,011 | miR-6869-5p | 1,9 | 0,039 |
| miR-4746-5p | 4,2 | 0,037 | miR-1587 | 1,9 | 0,002 |
| miR-330-3p | 4,2 | 0,006 | miR-6785-5p | 1,9 | 0,028 |
| miR-206 | 4,1 | 0,043 | miR-1236-5p | 1,9 | < 0,001 |
| miR-4436a | 4,1 | 0,028 | miR-5787 | 1,9 | 0,034 |
| miR-23a-5p | 3,9 | 0,015 | miR-619-5p | 1,8 | 0,019 |
| miR-3605-5p | 3,8 | 0,030 | miR-6089 | 1,8 | 0,010 |
| miR-6809-5p | 3,7 | < 0,001 | miR-4688 | 1,8 | 0,011 |
| miR-3934-5p | 3,6 | 0,024 | miR-1273f | 1,7 | 0,002 |
| miR-500a-5p | 3,5 | 0,015 | miR-151b | 1,7 | 0,010 |
| miR-6848-5p | 3,5 | 0,015 | miR-663a | 1,7 | 0,027 |
| miR-575 | 3,5 | 0,001 | miR-6880-5p | 1,7 | 0,016 |
| miR-4260 | 3,3 | 0,048 | miR-939-5p | 1,7 | 0,012 |
| miR-145-5p | 3,2 | 0,022 | miR-146b-5p | 1,7 | 0,026 |
| miR-342-5p | 3,2 | 0,048 | miR-4306 | 1,7 | 0,041 |
| miR-298 | 3,1 | 0,03 | miR-6727-5p | 1,7 | 0,022 |
| miR-630 | 3,0 | 0,009 | miR-4505 | 1,7 | 0,005 |
| miR-6860 | 3,0 | 0,013 | miR-454-3p | 1,7 | 0,006 |
| miR-4741 | 3,0 | 0,001 | miR-6757-5p | 1,7 | 0,001 |
| miR-664b-3p | 3,0 | 0,006 | miR-4743-5p | 1,7 | 0,004 |
| miR-5703 | 2,8 | 0,011 | miR-6088 | 1,6 | 0,018 |
| miR-6797-5p | 2,7 | 0,048 | miR-550a-3-5p | 1,6 | 0,031 |

| | | | | | |
|-----------------------------------|-----------|------------------|--------------|-----------|------------------|
| miR-4778-5p | 2,7 | < 0,001 | miR-423-5p | 1,6 | 0,007 |
| miR-378f | 2,6 | 0,011 | miR-6512-5p | 1,6 | 0,009 |
| miR-4667-5p | 2,6 | < 0,001 | miR-4656 | 1,6 | 0,015 |
| miR-4449 | 2,5 | 0,002 | miR-6819-5p | 1,5 | 0,006 |
| miR-4485-5p | 2,5 | 0,018 | miR-186-5p | 1,5 | 0,001 |
| miR-6740-5p | 2,4 | 0,002 | miR-6831-5p | 1,5 | 0,012 |
| miR-125a-3p | 2,4 | 0,022 | miR-6778-5p | 1,5 | 0,009 |
| miR-6867-5p | 2,4 | < 0,001 | miR-6510-5p | 1,5 | 0,023 |
| miR-4530 | 2,4 | 0,006 | miR-6780b-5p | 1,5 | 0,013 |
| miR-6833-5p | 2,3 | < 0,001 | miR-4793-5p | 1,5 | 0,003 |
| Sumažėjusios miRNR raiškos | | | | | |
| miRNR | FC | P reikšmė | miRNR | FC | P reikšmė |
| miR-3065-3p | -19,0 | < 0,001 | miR-937-5p | -2,0 | 0,022 |
| miR-4310 | -7,9 | 0,019 | miR-6800-3p | -1,9 | 0,004 |
| miR-4664-3p | -5,7 | 0,026 | miR-1304-3p | -1,9 | 0,034 |
| miR-203a-3p | -5,2 | 0,033 | miR-1234-3p | -1,9 | 0,024 |
| miR-1246 | -3,8 | < 0,001 | miR-425-3p | -1,9 | 0,023 |
| miR-4644 | -3,5 | 0,034 | miR-1238-3p | -1,9 | 0,029 |
| miR-933 | -3,3 | 0,002 | miR-191-3p | -1,8 | 0,041 |
| miR-197-5p | -3,3 | 0,001 | miR-1825 | -1,8 | 0,039 |
| miR-1290 | -3,1 | 0,004 | miR-6765-3p | -1,7 | 0,031 |
| miR-6824-3p | -2,8 | 0,035 | miR-6126 | -1,7 | 0,005 |
| miR-210-3p | -2,7 | 0,023 | miR-1228-3p | -1,7 | 0,021 |
| miR-4788 | -2,4 | < 0,001 | miR-6069 | -1,7 | 0,043 |
| miR-636 | -2,4 | 0,035 | miR-4665-3p | -1,7 | 0,011 |
| miR-6848-3p | -2,4 | 0,008 | miR-4497 | -1,7 | 0,029 |
| miR-6076 | -2,2 | 0,038 | miR-6127 | -1,6 | 0,026 |
| miR-6777-3p | -2,1 | 0,019 | miR-6165 | -1,5 | 0,035 |
| miR-1908-3p | -2,1 | 0,008 | miR-6756-5p | -1,5 | 0,038 |
| miR-4271 | -2,1 | 0,046 | miR-4261 | -1,5 | 0,043 |
| miR-1224-5p | -2,0 | 0,029 | | | |

Santrumpos: FC – raiškos skirtumas kartais.

S3 lentelė. Statistiškai reikšmingai pakitusios miRNR raiškos lyginant periodontito pažeistus audinius su sveikais dantenų audiniais tarp pacientų nesergančių reumatoidiniu artritu, gautos vertinant visuminę miRNR raišką.

| Padidėjusios miRNR raiškos | | | | | |
|-----------------------------------|-----------|------------------|-------------------|-----------|------------------|
| Padidėjusi | FC | P reikšmė | Padidėjusi | FC | P reikšmė |
| miR-3192-3p | 38,4 | 0,005 | miR-765 | 2,2 | 0,009 |
| miR-4418 | 27,3 | 0,006 | miR-6785-5p | 2,2 | 0,019 |
| miR-4441 | 25,2 | 0,013 | miR-6758-5p | 2,1 | 0,017 |
| miR-3609 | 23,5 | 0,009 | miR-6867-5p | 2,1 | 0,018 |
| miR-4446-3p | 22,3 | 0,004 | miR-6833-5p | 2,1 | 0,008 |
| miR-378c | 15,4 | < 0,001 | miR-6812-5p | 2,1 | 0,014 |
| miR-3064-5p | 13,9 | 0,042 | miR-378f | 2,1 | 0,001 |
| miR-3614-5p | 11,7 | 0,046 | miR-6845-5p | 2,0 | 0,018 |
| miR-3622b-5p | 11,4 | 0,011 | miR-1273g-3p | 2,0 | 0,045 |
| miR-450a-5p | 11,2 | < 0,001 | miR-1236-5p | 2,0 | 0,004 |
| miR-4436b-3p | 11,1 | 0,031 | miR-6772-5p | 2,0 | 0,038 |
| miR-4769-5p | 10,6 | 0,025 | miR-4800-5p | 2,0 | 0,029 |
| miR-4303 | 10,3 | 0,029 | miR-6846-5p | 1,9 | 0,007 |
| miR-6837-5p | 9,9 | 0,021 | miR-6740-5p | 1,9 | 0,035 |
| miR-4269 | 9,7 | 0,036 | miR-6849-5p | 1,9 | 0,017 |
| miR-30c-2-3p | 9,6 | 0,018 | miR-483-5p | 1,9 | 0,012 |
| miR-378e | 9,3 | 0,021 | miR-7846-3p | 1,9 | 0,008 |
| miR-4746-5p | 9,3 | 0,019 | miR-6796-5p | 1,8 | 0,03 |
| miR-4436a | 9,2 | 0,029 | miR-6779-5p | 1,8 | 0,026 |
| miR-4468 | 8,8 | 0,021 | miR-424-5p | 1,8 | 0,04 |
| miR-758-5p | 8,2 | 0,034 | miR-6831-5p | 1,8 | 0,024 |
| miR-4753-5p | 7,4 | 0,049 | miR-3667-5p | 1,7 | 0,021 |
| miR-6857-5p | 6,9 | 0,035 | miR-4673 | 1,7 | 0,002 |
| miR-195-3p | 6,8 | 0,03 | miR-6757-5p | 1,7 | 0,01 |
| miR-298 | 6,6 | 0,029 | miR-6510-5p | 1,7 | 0,025 |
| miR-4697-5p | 5,5 | 0,006 | miR-140-3p | 1,7 | 0,04 |
| miR-550a-5p | 4,0 | 0,023 | miR-6086 | 1,7 | 0,006 |
| miR-4539 | 3,4 | 0,01 | miR-6765-5p | 1,7 | 0,006 |
| miR-3917 | 3,2 | < 0,001 | miR-6778-5p | 1,6 | 0,024 |

| | | | | | |
|-----------------------------------|-----------|------------------|---------------|-----------|------------------|
| miR-6509-5p | 3,1 | 0,022 | miR-4646-5p | 1,6 | 0,018 |
| miR-6809-5p | 3,1 | 0,018 | miR-550a-3-5p | 1,6 | 0,02 |
| miR-4538 | 3,1 | < 0,001 | miR-1587 | 1,6 | 0,01 |
| miR-4690-5p | 2,8 | 0,002 | miR-7107-5p | 1,6 | 0,022 |
| miR-6769b-5p | 2,6 | 0,005 | miR-3679-5p | 1,6 | 0,026 |
| miR-8071 | 2,5 | 0,009 | miR-8089 | 1,6 | 0,004 |
| miR-6860 | 2,5 | 0,009 | miR-4419a | 1,5 | 0,019 |
| miR-4778-5p | 2,5 | 0,013 | miR-5190 | 1,5 | 0,006 |
| miR-4667-5p | 2,3 | 0,018 | miR-3194-5p | 1,5 | 0,044 |
| miR-126-5p | 2,3 | 0,039 | | | |
| Sumažėjusios miRNR raiškos | | | | | |
| miRNR | FC | P reikšmė | miRNR | FC | P reikšmė |
| miR-375 | -33,1 | 0,009 | miR-31-5p | -2,3 | 0,005 |
| miR-203a-3p | -7,6 | 0,008 | miR-205-5p | -2,2 | 0,001 |
| miR-1246 | -5,7 | 0,001 | miR-4788 | -2,2 | 0,049 |
| miR-210-3p | -4,8 | 0,001 | miR-200a-3p | -2,2 | 0,028 |
| miR-197-5p | -3,7 | 0,025 | miR-378i | -2,1 | 0,003 |
| miR-6746-5p | -3,6 | 0,02 | miR-149-5p | -2,1 | 0,026 |
| miR-1224-5p | -3,0 | 0,022 | miR-378a-3p | -2,1 | 0,003 |
| miR-22-5p | -2,9 | 0,035 | miR-193b-3p | -2,0 | 0,015 |
| miR-378a-5p | -2,8 | 0,004 | miR-24-1-5p | -2,0 | 0,009 |
| miR-1260b | -2,8 | 0,026 | miR-224-5p | -2,0 | 0,034 |
| miR-1260a | -2,7 | 0,042 | miR-183-5p | -2,0 | 0,024 |
| miR-200c-3p | -2,6 | 0,001 | miR-222-3p | -2,0 | 0,004 |
| miR-200b-3p | -2,6 | 0,013 | miR-221-3p | -2,0 | 0,012 |
| miR-7977 | -2,5 | 0,014 | miR-221-5p | -1,9 | 0,02 |
| miR-141-3p | -2,5 | 0,003 | miR-365a-3p | -1,9 | 0,034 |
| miR-33a-5p | -2,5 | 0,034 | miR-27b-3p | -1,8 | 0,012 |
| miR-429 | -2,4 | 0,026 | miR-27a-3p | -1,8 | 0,017 |
| miR-23b-5p | -2,4 | 0,005 | miR-96-5p | -1,8 | 0,021 |
| miR-31-3p | -2,4 | 0,01 | miR-24-3p | -1,6 | 0,037 |
| miR-99a-5p | -2,4 | 0,008 | miR-362-3p | -1,5 | 0,027 |
| miR-200b-5p | -2,3 | 0,007 | | | |

Santrumpos: FC – raiškos skirtumas kartais.

S4 lentelė. Statistiškai reikšmingai pakitusios raiškos miRNR lyginant reumatoidiniu artritu sergančių asmenų periodontito pažeistus audinius su reumatologiškai sveikų tiriamųjų sveikomis dantenomis, gautos vertinant visuminę miRNR raišką.

| Padidėjusios miRNR raiškos | | | | | |
|-----------------------------------|-----------|------------------|-------------------|-----------|------------------|
| Padidėjusi | FC | P reikšmė | Padidėjusi | FC | P reikšmė |
| miR-378c | < 0,001 | 17,4 | miR-6833-5p | 0,032 | 1,9 |
| miR-3609 | 0,026 | 12,7 | miR-550a-3-5p | 0,008 | 1,8 |
| miR-4436b-3p | 0,025 | 12,7 | miR-652-3p | 0,008 | 1,8 |
| miR-30c-2-3p | 0,02 | 9,6 | miR-6849-5p | 0,031 | 1,8 |
| miR-4668-5p | 0,038 | 9,4 | miR-15b-5p | 0,04 | 1,7 |
| miR-6809-5p | 0,014 | 3,3 | miR-1236-5p | 0,045 | 1,7 |
| miR-4449 | 0,046 | 2,5 | miR-140-3p | 0,021 | 1,7 |
| miR-6860 | 0,008 | 2,5 | miR-378f | 0,017 | 1,7 |
| miR-4306 | 0,039 | 2,3 | miR-6807-5p | 0,008 | 1,7 |
| miR-4726-5p | 0,043 | 2,2 | miR-25-3p | 0,026 | 1,6 |
| miR-765 | 0,035 | 2,0 | miR-3127-5p | 0,007 | 1,6 |
| Sumažėjusios miRNR raiškos | | | | | |
| miRNR | FC | P reikšmė | miRNR | FC | P reikšmė |
| miR-3065-3p | 0,034 | -11,2648 | miR-29b-3p | 0,008 | -2,28026 |
| miR-1246 | < 0,001 | -3,78254 | miR-4497 | 0,039 | -2,00835 |
| miR-197-5p | 0,008 | -3,4358 | miR-6126 | 0,042 | -1,62943 |
| miR-4788 | 0,023 | -2,28212 | | | |

Santrumpos: FC – raiškos skirtumas kartais.

S5 lentelė. Statistiškai reikšmingai pakitusios raiškos miRNR lyginant reumatoidiniu artritu sergančių asmenų sveikas dantenas su reumatologiškai sveikų asmenų sveikomis dantenomis, gautos vertinant visuminę miRNR raišką.

| Padidėjusios miRNR raiškos | | | | | |
|-----------------------------------|-----------|------------------|-------------------|-----------|------------------|
| Padidėjusi | FC | P reikšmė | Padidėjusi | FC | P reikšmė |
| miR-4701-5p | 34,4 | 0,041 | miR-933 | 2,9 | 0,048 |
| miR-6836-3p | 10,9 | 0,042 | miR-7106-5p | 2,9 | 0,007 |
| miR-711 | 4,7 | 0,047 | miR-339-3p | 2,0 | 0,044 |
| Sumažėjusios miRNR raiškos | | | | | |

| miRNR | FC | P reikšmė | miRNR | FC | P reikšmė |
|--------------|-----------|------------------|--------------|-----------|------------------|
| miR-4539 | -37,8 | < 0,001 | miR-8069 | -2,7 | 0,030 |
| miR-3620-5p | -20,5 | 0,017 | miR-4763-3p | -2,7 | 0,049 |
| miR-34c-5p | -20,0 | < 0,001 | miR-6869-5p | -2,6 | 0,021 |
| miR-7515 | -14,1 | 0,022 | miR-152-3p | -2,6 | 0,046 |
| miR-5008-5p | -14,0 | 0,021 | miR-29c-5p | -2,6 | 0,005 |
| miR-4476 | -13,6 | 0,025 | miR-29b-3p | -2,6 | 0,004 |
| miR-4496 | -12,8 | 0,012 | miR-4687-3p | -2,4 | 0,039 |
| miR-424-3p | -12,2 | 0,023 | miR-5585-3p | -2,3 | 0,012 |
| miR-551b-3p | -12,0 | 0,006 | miR-21-3p | -2,3 | 0,022 |
| miR-3607-5p | -11,1 | 0,023 | miR-34b-5p | -2,2 | 0,032 |
| miR-4487 | -10,7 | 0,027 | miR-7704 | -2,2 | 0,025 |
| miR-3065-5p | -10,3 | 0,048 | miR-29a-3p | -2,1 | 0,047 |
| miR-374c-5p | -9,6 | < 0,001 | miR-141-3p | -2,1 | 0,030 |
| miR-34a-3p | -8,4 | 0,018 | miR-1207-5p | -2,0 | 0,035 |
| miR-4633-5p | -7,4 | 0,021 | miR-21-5p | -1,9 | 0,019 |
| miR-3607-3p | -7,4 | 0,047 | miR-4466 | -1,9 | 0,042 |
| miR-23a-5p | -6,5 | 0,033 | miR-6089 | -1,9 | 0,032 |
| miR-340-3p | -6,3 | 0,034 | miR-29c-3p | -1,9 | 0,040 |
| miR-5096 | -6,2 | 0,044 | miR-8063 | -1,8 | 0,049 |
| miR-330-3p | -6,2 | 0,022 | miR-134-5p | -1,8 | 0,036 |
| miR-500a-5p | -5,6 | 0,042 | miR-17-3p | -1,8 | 0,029 |
| miR-1972 | -3,3 | 0,022 | miR-140-3p | -1,8 | 0,034 |
| miR-4417 | -3,2 | 0,016 | miR-4656 | -1,7 | P < 0,001 |
| miR-3960 | -2,8 | 0,030 | miR-22-3p | -1,7 | 0,032 |
| miR-1273e | -2,7 | 0,040 | miR-6125 | -1,6 | 0,034 |

Santrumpos: FC – raiškos skirtumas kartais.

UŽRAŠAMS

UŽRAŠAMS

UŽRAŠAMS

Vilniaus universiteto leidykla
Saulėtekio al. 9, III rūmai, LT-10222 Vilnius
El. p. info@leidykla.vu.lt, www.leidykla.vu.lt
bookshop.vu.lt, journals.vu.lt
Tiražas 20 egz.