



VILNIAUS UNIVERSITETAS

Gyvybės mokslų centras

Biomokslų institutas

**BENITA BURAGAITĖ-STAPONKIENĖ**

**Su uždegimu susijusių miRNR tyrimai lėtinio periodontito diagnostikai**

Genetikos magistrinių studijų baigiamasis darbas

Darbas atliktas VU GMC

Biomokslų institute

Žmogaus genomo tyrimų centre

Darbo vadovė

Dr. Kristina Stuopelytė

Vilnius 2020

## TURINYS

SANTRUMPŲ SAŖAŠAS .....	3
ĮVADAS .....	5
1. LITERATŪROS APŽVALGA .....	7
1.1 Lėtinis periodontitas .....	7
1.1.1 Anatomicinė periodonto sandara .....	7
1.1.2 Lėtinio periodontito etiopatogenezė .....	9
1.1.3 Lėtinio periodontito epidemiologija .....	16
1.1.4 Lėtinio periodontito rizikos veiksniai .....	16
1.1.5 Lėtinio periodontito diagnozavimas ir gydymas .....	19
1.2 miRNR .....	22
1.2.1 miRNR biogenezė .....	22
1.2.2 miRNR veikimo mechanizmai .....	24
1.2.3 miRNR vaidmuo imuninėje sistemoje .....	26
1.2.4 miRNR ir uždegiminės ligos .....	28
1.2.5 Cirkuliuojančios miRNR – ligų biožymenys .....	31
2. MĖGINIAI IR METODAI .....	33
2.1 Tiriamieji ir mėginiai .....	33
2.2 Metodai .....	35
2.2.1 Visuminės RNR skyrimas .....	35
2.2.2 Išskirtos RNR kokybės vertinimas .....	36
2.2.3 Visuminė miRNR raiškos analizė miRNR mikrogardelėmis .....	37
2.2.4 Kopijinės DNR (kDNR) sintezė .....	38
2.2.5 Kiekybinė atvirkštinės transkriptazės polimerazinė grandininė reakcija .....	40
2.2.6 Statistinė analizė .....	41
3. REZULTATAI .....	43
3.1 Visuminis miRNR raiškos tyrimas periodonto audiniuose .....	43
3.2 miRNR raiškos validavimas audiniuose ir miRNR atranka .....	48
3.3 Atrinktų miRNR analizė organizmo skysčiuose .....	52
3.4 Diagnostinio miRNR potencialo vertinimas .....	56
4. REZULTATŲ APTARIMAS .....	59
IŠVADOS .....	63
SANTRAUKA .....	64
SUMMARY .....	65
LITERATŪROS SAŖAŠAS .....	66

## SANTRUMPŲ SĄRAŠAS

AAP – Amerikos periodontologijos akademija (angl. *American Academy of Periodontology*)  
ABI – *Applied Biosystems*  
ACPA – anti-citrulinintų baltymų antikūnai (angl. *anti-citrullinated protein antibodies*)  
ACR – Amerikos reumatologų kolegija (angl. *American College of Rheumatology*)  
Ago – Argonautų šeimos baltymai (angl. *Argonaute family of proteins*)  
AP-1 – baltymo aktyvatorius 1 (angl. *activator protein 1*)  
AT – atvirkštinė transkripcija  
AT-kPGR – kiekybinė atvirkštinės transkriptazės PGR (angl. *quantitative reverse transcription PCR, RT-qPCR*)  
AUC – plotas po ROC kreive (angl. *area under the ROC curve*)  
BOP – kraujavimo indeksas (angl. *bleeding on probing*)  
bp – bazių pora  
CAL – periodonto jungties netekimo lygis (angl. *clinical attachment loss*)  
CDC – JAV ligų kontrolės ir prevencijos centras (angl. *Center for Disease Control*)  
CRB – C-reaktyvusis baltymas  
DAS28 – ligos aktyvumo indeksas (angl. *disease activity score 28*)  
DNMT – DNR metiltransferazės  
dsRBD – dvigrandę RNR surišantį domeną turintis (angl. *double-stranded RNA-binding domain*) baltymas  
EFP – Europos periodontologų federacija (angl. *European Federation of Periodontology*)  
FC – pokytis kartais (angl. *fold change*)  
FDI – pasaulio odontologų federacija (angl. *FDI World Dental Federation*)  
GWAS – viso genomo sąsajų tyrimai (angl. *genome-wide association studies*)  
HAQ – sveikatos vertinimo klausimynas (angl. *health assessment questionnaire*)  
HDAC – histonų deacetilazės  
HDL – didelio tankio lipoproteinas (angl. *high density lipoprotein, HDL*)  
IBD – uždegiminės žarnyno ligos (angl. *inflammatory bowel diseases*)  
IFN – interferonas  
IKK- $\alpha$  – NF- $\kappa$ B kinazės subvieneto alfa inhibitorius (angl. *inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit alpha*)  
IL – interleukinas  
iRNR – informacine RNR (iRNR)  
kDNR – kopijinė DNR  
KMI – kūno masės indeksas  
LP – lėtinis periodontitas  
LPS – lipopolisacharidai  
MBD – metilintą DNR rišantį domeną turintis (angl. *methyl-binding domain*) baltymas  
miRNR – mikroRNR  
MMP – matrikso metaloproteinazė (angl. *matrix metalloproteinase*)  
NF- $\kappa$ B – branduolio veiksnys kappa B (angl. *nuclear factors kappa B*)  
nkRNR – nekoduojančios RNR (angl. *non-coding RNA, ncRNA*)  
nt – nukleotidas  
OPG – osteoprotegrinas

PDLSC – periodonto raiščio kamieninės ląstelės (angl. *periodontal ligament stem cells*)  
PGE2 – prostaglandinas E2  
piRNR – su Piwi baltymu sąveikaujanti RNR  
PPAD – peptidilarginino deiminazė  
PPD – zondavimo gylis (angl. *probing pocket depth*)  
PSO – Pasaulio sveikatos organizacija (angl. *World Health Organisation, WHO*)  
RA – reumatoidinis artritas  
RANK – branduolio veiksnio- $\kappa$ B receptoriaus aktyvatorius (angl. *receptor activator of NF- $\kappa$ B*)  
RANKL – branduolio veiksnio- $\kappa$ B receptoriaus ligandas (angl. *receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand*)  
RF – reumatoidinis veiksnys (angl. *rheumatoid factors*)  
RISC – genų raišką slopinantis nukleoproteininis kompleksas (angl. *RNR-induced silencing complex*)  
Pol – polimerazė  
ROC kreivė – sprendimus priimančiojo ypatybių kreivė (angl. *receiver operating characteristic curve*)  
ROS – reaktyvios deguonies formos (angl. *reactive oxygen species*)  
rRNR – ribosominė RNR  
siRNR – mažosios interferentinės RNR  
snoRNR – mažosios branduolėlio RNR  
snRNR – mažosios branduolio RNR  
TFS – *Thermo Fisher Scientific*  
TGF – transformuojantis augimo veiksnys (angl. *transforming growth factor*)  
TLDA – mažo tankio TaqMan gardelė (angl. *TaqMan Low Density Array*)  
TNF – naviko nekrozės veiksnio (angl. *tumour necrosis factor*)  
tRNR – transportinė RNR  
UTR – netransliuojama sritis (angl. *untranslated region*)  
VDR – vitamino D receptoriaus (angl. *vitamin D receptor*)  
VNP – vieno nukleotido polimorfizmas (angl. *single nucleotide polymorphism, SNP*)

## ĮVADAS

Lėtinis periodontitas (LP) yra atraminius danties audinius paveikianti uždegiminė liga, pasireiškianti periodonto jungties netekimu ir alveolinio kaulo nykimu. Tai vienas labiausiai paplitusių lėtinių infekcinių sutrikimų, kuris taip pat siejamas su padidėjusia rizika sirgti kitomis sisteminėmis ligomis, tokiomis kaip reumatoidinis artritas, diabetas, kvėpavimo takų, širdies ligos ir net vėžys. Dėl besimptomės ligos pradžios ir tik klinicine apžiūra paremtų diagnostinių metodų taikymo, LP dažnai nustatomas per vėlai, kai audiniai jau būna negrįžtamai pažeisti. Žinoma, kad LP atsiradimą nulemia burnos mikrobiotos disbiozė ir imuninės sistemos sutrikimai, pasireiškiantys įvairių uždegiminiame atsake dalyvaujančių molekulių kiekybiniais ir/ar funkciniais pokyčiais. Būtent į juos nukreipti tyrimai gali padėti sukurti metodus, įgalinančius ankstyvą LP diagnostiką ir tolesnę ligos eigos prognozavimą.

Įvairių ligų, įskaitant ir LP, vystymuisi yra svarbūs ne tik genetiniai ir aplinkos veiksniai, tačiau ir epigenetinė reguliacija. Pastaraisiais dešimtmečiais ypač didelio dėmesio susilaukė mikroRNR (miRNR). Tai – trumpos, ~19-22 nt ilgio nekoduojančios RNR molekulės, kurios reguliuodamos genų raišką atlieka svarbų vaidmenį daugelyje organizmo vystymesi svarbių procesų, įskaitant ląstelių proliferaciją, diferenciaciją, metabolizmą, apoptozę ir kt. Pakitusi miRNR raiška dažnai siejama su įvairiomis uždegiminėmis ligomis. Ne išimtis ir LP, kurio atveju miRNR raiškos profilio pokyčiai stebimi dantenuų ar periodonto audiniuose. Diagnostine miRNR verte labiausiai susidomėta atradus organizmo skysčiuose, pavyzdžiui, kraujyje ar seilėse, cirkuliuojančias miRNR, kurios potencialiai galėtų tapti neinvaziniais LP žymenimis. Vis dėlto, nors tyrimų, analizuojančių su LP patogenezė susijusių miRNR pokyčius, sparčiai daugėja, dėl skirtingų kriterijų taikymo diagnozuojant ligą bei skirtingų tyrimo metodologijų ar duomenų analizės būdų atsirandantys kontroversiški rezultatai riboja organizmo skysčiuose cirkuliuojančių uždegiminių miRNR, kaip biožymenų panaudojimą LP ligos diagnostikai.

Šiame tyrime miRNR raiškos profilis ištirtas 16 periodonto mėginių miRNR mikrogardelių metodu, o nustatyti raiškos pokyčiai validuoti 80 periodonto audinių naudojant kiekybinę PGR. Keturios reikšmingai pakitusios raiškos miRNR išanalizuotos 71 seilių ir 77 kraujo plazmos mėginiuose ir įvertintos sąsajos su LP klinikiniais-patologiniais, LP ligą moduluojančiais veiksniais bei demografiniais rodikliais.

**Darbo tikslas** – atrinkti su lėtiniu periodontitu (LP) susijusias miRNR tyrimui seilėse ir kraujo plazmoje bei įvertinti jų diagnostinį potencialą.

**Darbo uždaviniai:**

1. Ištirti miRNR raiškos profilį lėtiniu periodontitu (LP) sergančių ir nesergančių asmenų periodonto audiniuose.
2. Nustatytus pasirinktų miRNR raiškos pokyčius validuoti didesnėje mėginių imtyje bei įvertinti sąsajas su LP klinikiniais-patologiniais rodikliais.
3. Ištirti miRNR LP sergančių asmenų organizmo skysčiuose, įvertinti sąsajas su klinikiniais-patologiniais rodikliais bei jų diagnostinį potencialą.

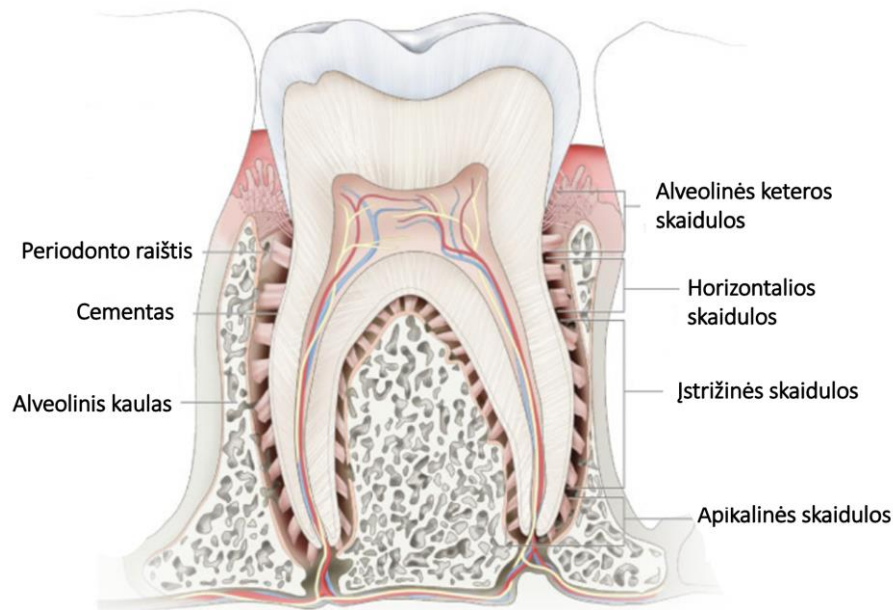
# 1. LITERATŪROS APŽVALGA

## 1.1 Lėtinis periodontitas

Lėtinis periodontitas (LP) – tai infekcinė liga, pasireiškianti danties atraminių audinių uždegimu, progresuojančiu periodonto jungties netekimu ir alveolinio kaulo nykimu. Vystantis LP formuojasi periodonto kišenės, pasireiškia dantenuų recesija (Lindhe ir kt., 1999).

### 1.1.1 Anatominė periodonto sandara

LP, kaip ir kitos periodonto ligos, paveikia dantį supantį audinių kompleksą, vadinamą periodontu. Tai sudėtinga struktūra, užtikrinanti danties įsitvirtinimą žandikaulio kaule ir funkcionuojanti kaip natūralus barjeras, ribojantis vidines danties struktūras nuo išorinių veiksnių, pavyzdžiui, burnos mikrofloros veiklos. Periodontas susideda iš kelių esminių dalių: dantenuų, periodonto raiščio, danties šaknies cemento ir alveolinio kaulo (Goudouri ir kt., 2017) (1.1 pav.).



**1.1 pav.** Danties anatominė struktūra (Šaltinis: dentalcare.com [internetinė sveitainė])

**Dantenos** sudaro didžiąją dalį alveolinį kaulą dengiančios ir dantis supančios burnos gleivinės. Tai yra labai vaskuliarizuotas audinys, kuriam būdingos specifinės, unikalios biocheminės savybės. Burnos gleivinę sudaro išorinis daugiasluoksnis plokščiojo epitelio sluoksnis bei po juo glūdinčio jungiamojo audinio skaidulos, vadinamos *lamina propria* (lot.). Epitelio sluoksnis apsaugo po juo glūdinčius audinius nuo galimų mechaninių, cheminių ir mikrofloros sukeltų pažeidimų, atsirandančių dėl kasdienės burnos funkcijos. Dinamiškas,

apsauginę ir regeneracinę funkciją atliekantis jungties epitelis ribojasi su dantenu *lamina propria* ir danties paviršiumi. *Lamina propria* sudaro kolageno skaidulos, fibroblastai, tarpląstelinė medžiaga, jame taip pat išsidėsčiusios kraujagyslės ir nervai. Įvairių rūšių skaidulos suteikia didelį tamprumą, be to garantuoja dantenu audinio mechaninį vientisumą veikiant kramtymo jėgoms (Chen ir kt., 2015).

**Periodonto raištis** yra sudėtinga struktūra, kurią sudaro iš polisacharidų sudarytoje tarpląstelinėje medžiagoje išsidėsčiusios kolageno skaidulos, fibroblastai, cementoblastai, osteoblastai, įsiterpusios kraujagyslės ir nervai. Esant apkrovai dantų sukandimo – okliuzijos, metu, tokia struktūra suteikia periodonto raiščiui netipiškų viskoelastinių savybių. Periodonto raiščio fibrilės sudarytos iš I tipo kolageno skaidulų, kurios savo ruožtu sudaro skirtingus skaidulų pluoštus. Nevienodas jų išsidėstymas skirtingose danties šaknies srityse yra svarbus periodonto raiščio funkcijai. Dėl specifinės struktūros periodonto raištis absorbuoja dalį kramtymo metu dančiui tenkančios jėgos bei fiksuoja ją žandikaulyje (Nanci ir Bosshardt, 2006).

**Danties šaknies cementas** yra tvirtas, mineralizuotas audinys, plonu sluoksniu dengiantis šaknies paviršių. Histologiškai danties šaknies cementas yra klasifikuojamas į pirminį (neląstelinį) ir antrinį (ląstelinį). Pirminis cementas susiformuoja iki dantų prasikalimo ir dengia du trečdalius danties kaklelio, antrinis – jau dantims prasikalus ir dengia trečdalį apikalinio šaknies paviršiaus bei krūminių dantų šakojimosi sritį. Esminė danties cemento funkcija yra pritvirtinti periodonto raištį prieš danties šaknies, o tai suteikia būtiną danties stabilumą žandikaulio kaule (Matthews ir kt., 2016).

**Alveolinis kaulas** yra dantį įtvirtinanti žandikaulio dalis. Jis sudarytas iš akytojo ir tankiojo kaulinių audinių, kurių pasiskirstymas atitinkamose danties vietose skiriasi. Plonas tankiojo kaulinio audinio sluoksnis per periodonto raištį susijungęs su šaknies cementu, vadinamas *lamina dura* (lot.). Šis sluoksnis yra išvarstytas įvairių kanalėlių, per kuriuos kraujagyslės ir nervinės skaidulos sujungia periodonto raištį su kaulų čiulpų ertmėmis. Apie 70 % alveolinio kaulo svorio sudaro organinis tarpląstelinis užpildas, sudarytas iš I tipo kolageno skaidulų ir įvairių nekolageninių baltymų, kaip jau anksčiau minėti osteopontinai, osteonektinai, kaulų sialoproteinai ir kt. Ląstelinė osteoblastų, osteocitų, osteoklastų ir kitų ląstelių frakcija apima tik 2-5% organinės dalies. Likusį svorį sudaro mineralinė dalis, kurios pagrindas – kristalinis hidroksiapatitas su anglies, natrio, cinko ir magnio jonų priemaišomis bei vanduo (Jiang ir kt., 2016).



### 1.1.2 Lėtinio periodontito etiopatogenezė

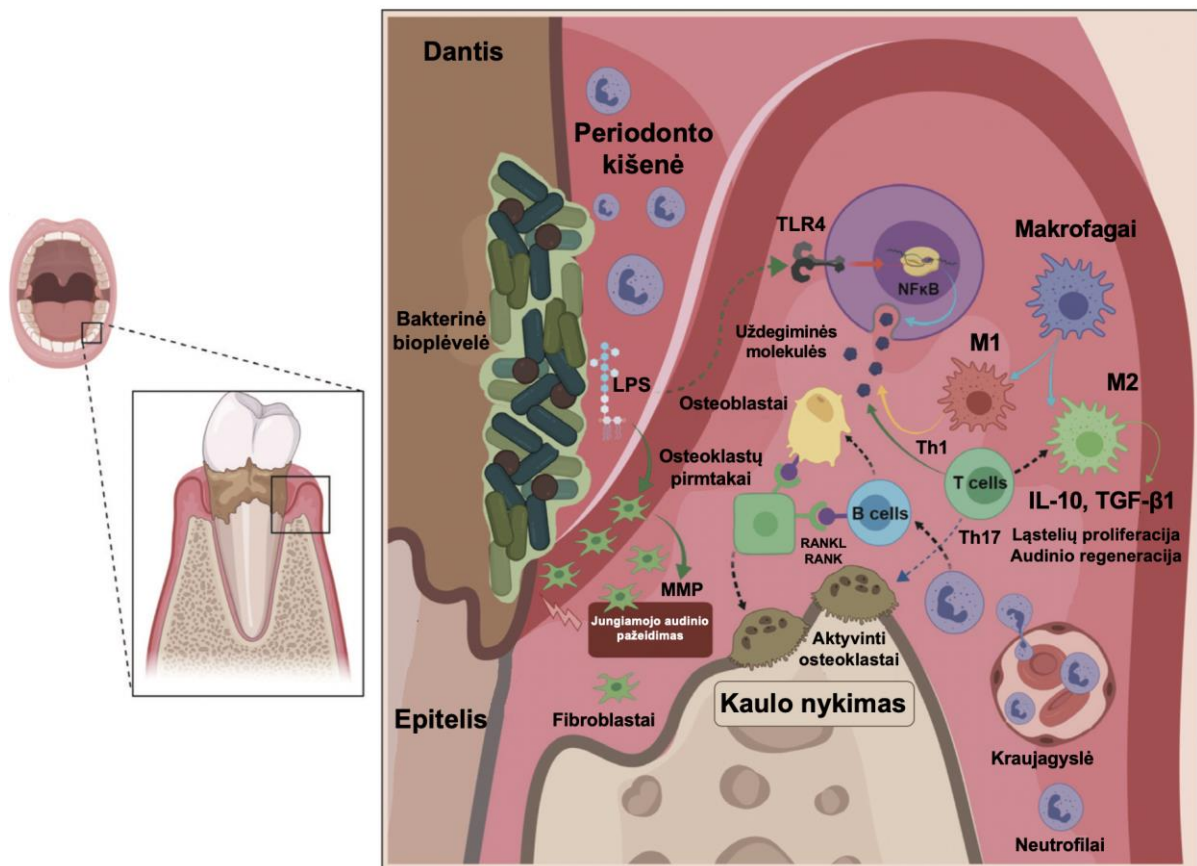
Susidomėjimas periodonto ligų etiopatogeneze ėmė didėti praėjusio amžiaus septinto amžiaus viduryje, nustatius bakterijų svarbą tokių periodonto ligų, kaip gingivitas ir LP, vystymesi (Kornman, 2008). Nustatyta, kad būtent burnos ertmėje tarpstančių mikroorganizmų pusiausvyros sutrikimai, vadinami disbioze, lemia uždegimo, taigi ir pačios ligos atsiradimą (Kinane ir kt., 2017).

Žmogaus organizme „gyvenančių“ mikroorganizmų visuma vadinama mikrobiota, mikroflora arba mikrobiomu. Iš viso burnos ertmėje nustatyta beveik 800 skirtingų mikroorganizmų rūšių, ant minkštųjų burnos gleivinės bei kietųjų dantų paviršiaus audinių formuojančių dantų apnašų plėvelę, vadinamą bioplėvele. Nors burnos ertmėje egzistuoja didelė mikroorganizmų įvairovė, kol kas nėra išskiriama viena ar kelios išskirtinai pavojingos rūšys periodonto ligų atsiradimui (Deo ir Deshmukh, 2019). Vis dėlto pastebėta, kad aukštesniu patogeniškumo lygiu pasižymi gram-neigiamos anaerobinės bakterijos, spirochetos ir virusai, tačiau manoma, kad ligą sukelia ne kiekvienas patogenas atskirai, o veikia bendras burnos mikrobiotos disbalansas (Perez-Chaparro ir kt., 2014).

Didžioji dalis burnos mikrobiotos yra bakterijos, kurių 94 % sudaro Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria, Actinobacteria, Spirochaetes, Fuscobacteria, o likusius 6 % – Saccharibacteria, Synergistetes, Absconditabacteria, Gracilibacteria, Chloroflexi, Tenericutes ir Chlorobi tipų atstovai (Wade, 2013). Vis dėlto su periodontito atsiradimu labiausiai siejamos *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) ir *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A. actinomycetemcomitans*) bakterijų rūšys (Amaliya ir kt., 2015). Dar viena burnos ertmėje gausiai paplitusi organizmų grupė – grybai. Nors jie neretai siejami su žalinga veikla žmogaus organizmui, iš tiesų tai svarbūs sveikos burnos mikrobiotos indikatoriai (Krom ir kt., 2014). Iš viso nustatyta apie 100 sveikų asmenų burnos gleivinėje tarpstančių grybų rūšių, tačiau dažniausiai sutinkamos *Candida*, kiek rečiau *Cladosporium*, *Aureobasidium*, *Saccharomyces*, *Aspergillus*, *Fusarium* ir *Cryptococcus* rūšys (Ghannoum ir kt., 2010). Burnos mikrofloroje randama ir keletas archėjų rūšių, tarp jų metanogeninės *Thermoplasmatales*, *Methanobrevibacter*, *Methanobacterium* ir kt. (Lepp ir kt., 2004). Nepaisant to, kad archėjos yra aptinkamos ir sveikuose individuose, nustatyta, jog didesnis jų kiekis būdingas LP sergantiesiems asmenims (He ir kt., 2015). Daugelis burnos ertmėje aptinkamų virusų yra susiję su tam tikrais sutrikimais. Pavyzdžiui, *Herpes simplex* virusas sukelia herpetinį gingivostomatitą, orofacialinius odos ir gleivinės pažeidimus, žmogaus papildomos virusas – gerybinės burnos papilomas, burnos kondilomas, tuo tarpu žmogaus imunodeficito virusas daro įtaką tokių sutrikimų, kaip burnos kandidozė ar opinis nekrozinis

periodontitas atsiradimui (Neville ir kt., 2019). Kadangi pasireiškus ūmiai infekcijai organizmo audiniuose latentinėje būsenoje esantis virusas gali vėl tapti aktyviu, yra sudėtinga įvertinti tiesioginį virusų vaidmenį periodonto ligų etiopatogenezėje. Vis dėlto pastebėta, jog papildomas antivirusinės terapijos įtraukimas į gydymą mažina periodonto kišenių gylį ir uždegimo intensyvumą, todėl neretai yra rekomenduojamas (Kinane ir kt., 2017).

Uždegiminis imuninės sistemos atsakas yra sukeliamas šeimininko ląstelėms sąveikaujant su dantį dengiančiu bakteriniu biofilmu (1.2 pav.). Su juo tiesiogiai kontaktuoja jungiamasis epitelis, kurį praėjusios ir jungiamajame audinyje atsidūrusios bakterijos stimuliuoja dantenų epitelio ląsteles ir fibroblastus (Noguchi ir kt., 2017). Periodonto ląstelės atpažįsta tokias su patogenais susijusias molekulinės struktūras, kaip bakterijų lipopolisacharidai (LPS), kurios jungiasi prie ląstelių TLR4/2 receptorių (angl. *toll-like receptors, TLR*), taip aktyvindamos kai kuriuos uždegiminius transkripcijos veiksnius, pavyzdžiui, branduolio veiksnį kappą B (angl. *nuclear factors kappa B, NF-κB*) bei baltymo aktyvatorių 1 (angl. *activator protein 1, AP-1*). Šie, savo ruožtu, skatina imuninį atsaką sukeliančių molekulių, pavyzdžiui naviko nekrozės veiksnio (angl. *tumour necrosis factor, TNF*) - $\alpha$ , interleukino (IL) - $1\beta$ ) sintezę ir atpalaidavimą. Jų stimuliuojamos periodonto raiščio ląstelės ir dantenų fibroblastai, atpalaiduodami reaktyvias deguonies formas (angl. *reactive oxygen species, ROS*), aktyvina ir gausina užląstelinio užpildo metaloproteinazes (angl. *matrix metalloproteinases, MMPs*), dalyvaujančias periodonto audinių užląstelinio užpildo skaidulinės dalies organizacijos sutrikdytame ir ardyme (Muñoz-Carillo ir kt., 2019).



**1.2 pav.** Imuninio atsako schema lėtinio periodontito ligos atveju (pagal Muñoz-Carillo ir kt., 2019)

Pirminiai periodonto pažeidimai atsiranda dėl ūminio uždegimo, pasireiškiančio masine neutrofilų migracija per jungiamąjį epitelį į dantenuų vagelės audinius. Atpalaiduodami chemokinus, neutrofilai nukreipia IL-17 produkuojančias Th17 (angl. *T-helper*), ląsteles į uždegimo vietą, kur jos dalyvauja B ląstelių proliferacijos ir vystymosi į antikūnus sekretuojančias plazmos ląsteles procesuose. Makrofagai yra svarbus tokių uždegiminių molekulių, kaip IL-1, TNF- $\alpha$ , MMP ir prostaglandino E2 (PGE2), šaltinis. Jų infiltracija uždegimo vietose skatina kolageno skaidulų ardymą jungiamajame periodonto audinyje (Bodet ir kt., 2006). Šiuose procesuose dalyvaujantys makrofagai skirstomi į aktyvinamus klasikiniu M1, ir alternatyviu, M2, būdu. M1 tipo makrofagus aktyvina Th1 tipo citokinai bei tokios su patogenais susijusios molekulės, kaip LPS, o M2 – Th2 tipo citokinai. Dėl išskiriamo didelio IL-10 ir transformuojančio augimo veiksnio beta-1 (angl. *transforming growth factor beta 1*, *TGF- $\beta$ 1*) kiekio, M2 tipo makrofagams būdingos ląstelių proliferaciją bei audinių regeneraciją skatinančios savybės (Hajishengallis ir Korostoff, 2017). Nors periodonto audiniuose vykstančiuose uždegimo procesuose dalyvauja abiejų tipų makrofagai, M1 tipo dominavimas rodo jų glaudžias sąsajas su LP ligos atsiradimu ir vystymusi (Yu ir kt., 2016).

Kai uždegiminis atsakas tampa lėtiniu, periodonto audinius užplūsta įgytos imuninės sistemos ląstelės – daugiausia T ir B limfocitai, kurios, atpalaiduodamos uždegimines ir imuninio atsako molekules, dalyvauja kaulo metabolizmo procesų reguliavime per RANKL/OPG/RANK signalinį kelią (Hajishengallis ir Korostoff, 2017). T ir B limfocitų išskiriamas NF- $\kappa$ B receptoriaus aktyvatoriaus ligandas (angl. *receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand*, RANKL) sąveikauja su osteoklastų ar jų pirmtakų paviršiuje esančiu NF- $\kappa$ B receptoriaus aktyvatoriumi (angl. *receptor activator of NF- $\kappa$ B*, RANK), taip aktyvindamas jų veikimą kaulo paviršiuje (Lee ir kt., 2010). Šiame signaliniame kelyje dalyvaujantis baltymas osteoprotegrinas (OPG) konkurencinio slopinimo būdu blokuoja biologines RANKL funkcijas. LP atveju stebimas RANKL/OPG santykio padidėjimas skatina osteoklastų pirmtakų aktyvinimą, jų susiliejimą ir tolesnę aktyvaciją, nulemiančią kaulo nykimą (Belibasakis ir Bostanci, 2012). Prie LP vystymosi prisideda Th1 tipo limfocitai, aktyviai gausinantys citokino – interferono (angl. *interferon gamma*, IFN) - $\gamma$  kiekį (Cavalla ir kt., 2018). *In vivo* tyrimais nustatyta, kad pelės su nutildytu IFN- $\gamma$  koduojančiu genu pasižymėjo mažesniais sekretuojamų uždegiminių citokinių ir chemokinių kiekiais, o makrofagų skatinami kaulo tirpimo procesai buvo mažiau intensyvūs (Garlet ir kt., 2008). Be to, jų sekretuojami IL-1 $\beta$  ir TNF- $\alpha$  skatina MMP sekreciją ir dalyvauja neutrofilų aktyvinime. Th2 tipo limfocitai sekretuoja citokinus IL-4, IL-5, IL-13, skatinančius B limfocitų proliferaciją ir diferenciaciją. Nustatyta, kad Th1 ląstelės yra svarbios pradinėse, o Th2 – vėlesnėse LP vystymosi stadijose. Naujausi tyrimai rodo, kad kitos Th ląstelių grupės, pavyzdžiui Th9, Th17 ir Th22, reguliatorinės T (Treg) ląstelės taip pat svarbios LP patogenezėje, tačiau tiksli jų funkcinė reikšmė šios ligos atveju vis dar tiriama (Kinane ir kt., 2017).

**Genetiniai veiksniai.** Burnos mikrobiotos disbiozė yra svarbus, tačiau tikrai ne vienintelis veiksnys, darantis įtaką periodonto ligų patogenezei (Kinane ir kt., 2017). Nustatyta apie dvi dešimtis uždegiminėse reakcijose dalyvaujančių baltymus koduojančių genų, kurie gali būti susiję su padidėjusia rizika sirgti LP (Heidari ir kt., 2019).

Vienas iš pavyzdžių jau minėtas uždegiminis citokinas IL-1, apimantis viduląstelinis procesus reguliuojantį IL-1 $\alpha$  ir užląstelinį baltymą IL-1 $\beta$ . Keletas tyrimų parodė, kad periodonto ligomis sergančių asmenų audiniuose, šiuos citokinus bei IL-1 receptoriaus antagonistą koduojančių genų raiška yra padidėjusi (Ishihara ir kt., 1997). Taip pat pastebėta, kad IL-1 klasterio genų vieno nukleotido polimorfizmai (VNP) yra susiję su didesne periodonto ligų atsiradimo rizika. Nustatyta, kad IL-1 $\alpha$  -889 C/T ir IL-1 $\beta$  +3954 C/T polimorfizmai gali sąlygoti didesnius IL-1 $\alpha$  ir IL-1 $\beta$  kiekius LP sergančių asmenų dantenu

vagelės skystyje (Shiroddria ir kt., 2000). Tai rodo, kad dėl VNP atsiradę genų transkripcijos ir baltymų sintezės lygio pakitimai gali nulemti LP uždegiminio atsako pokyčius (Heidari ir kt., 2019).

Jau minėto priešūždegiminio citokino IL-10 geno promotoriaus regione įvykę polimorfizmai gali paveikti šio citokino raišką, dėl ko pakinta organizme vykstantys uždegiminiai procesai. *In vitro* ir *in vivo* tyrimais nustatyta, kad *IL-10-592 C/A* polimorfizmas buvo susijęs su mažesniu išskiriamo IL-10 kiekiu (Claudino ir kt., 2008).

Uždegiminis citokinas TNF- $\alpha$  stimuliuoja osteoklastų diferenciaciją ir veikdamas kartu su IL-1 gali sukelti MMP atpalaidavimą, užląstelinio matrikso ardymą bei kaulo irimą (Nikolopoulos ir kt., 2008). Šį citokiną koduojančio geno polimorfizmai, pavyzdžiui, *TNF- $\alpha$ -308 G/A*, siejami su didesne LP išsivystymo rizika (Heidari ir kt., 2019).

Daugiafunkcinis pleotropinis citokinas TGF- $\beta$  kontroliuoja ląstelių proliferaciją, apoptozę, dalyvauja imuniniame organizmo atsake, be to gali indukuoti fibroblastų diferenciacijos procesus, taip prisidėdamas prie padarytos žalos audiniui atstatymo (Heidari ir kt., 2015). Nustatyta, kad šio citokino izoforma TGF- $\beta$ 1 gali padidinti OPG kiekį kaulų čiulpų stromos ląstelėse, dėl to manoma, kad šis citokinas kaulo ardymo procesus veikia slopinančiai (Vikram ir kt., 2015). Vieno dažniausiai nagrinėjamų *TGF- $\beta$ 1 -509 C/T* polimorfizmo paplitimo dažnis tarp pažengusių LP sergančių asmenų ir kontrolinių grupių reikšmingai skiriasi (de Souza ir kt., 2003).

Vitaminas D ir jo receptorių (angl. *vitamin D receptor, VDR*) yra svarbūs imuninės sistemos funkcijų palaikyme ir kaule vykstančių metabolizmo procesų reguliavime. Juos koduojančių genų polimorfizmai skatina dažniausios periodonto ligų komplikacijos – kaulo nykimo – pasireiškimą (Heidari ir kt., 2019). Keliais tyrimais nustatyta, kad *VDR Taq1, Bsm1, Fok1* ir *Apal* polimorfizmai yra susiję su LP (Brett ir kt., 2005; de Brito ir kt., 2004; El Jilani ir kt., 2015; Karasneh ir kt., 2013).

Jau minėtos MMP yra vienos svarbiausių periodonto patogenezėje dalyvaujančių proteazių, vykdančių užląstelinio matrikso komponentų degradaciją uždegiminėse audinių srityse. *MMP* raiška ir aktyvumas didėja stiprėjant uždegiminėms reakcijoms (Desarda ir Gaikwad, 2013). Weng ir kolegų atlikta publikuotų duomenų metaanalizė parodė, kad *MMP-3 -1171 A5/A6, MMP-9 -1562 C/T* ir *MMP-2 -753 C/T* polimorfizmai yra susiję su didesne LP išsivystymo rizika (Weng ir kt., 2016).

Genetinių veiksnių įtakos periodonto ligos patogenezei aiškinimąsi papildoma duomenys, gauti naudojant viso genomo sąsajų tyrimus (angl. *genome-wide association studies, GWAS*), įgalinančius nustatyti su analizuojama patologija susijusias genetines sritis ir konkrečius genus. Rhodin su kolegomis atliktoje GWAS duomenų analizėje išskyrė keletą su LP

statistiškai reikšmingai susijusių genų (Rhodin ir kt., 2014). Vienas jų – *NIN*, koduojantis inkarinį baltymą nineiną, kuris yra svarbus centrosomą formuojančių mikrovamzdelių organizacijai. Centrosomos vaidmuo tiek poliarizacijoje, tiek citotoksinių T limfocitų funkcijos palaikyme rodo šios struktūros, taid ir su ja funkciškai susijusių baltymų, svarbą LP patogenezėje (Jenkins ir kt., 2009). Statistiškai reikšmingos sąsajos su LP pastebėtos ir osteoklastų diferenciacijoje dalyvaujantį baltymą koduojančio *ZNF675*, su aktyvesne periodonto patogenų veikla siejamų *KCNK1* ir *DAB2IP* bei daugelio kitų genų atveju (Rhodin ir kt., 2014). Funkcinė šių genų reikšmė periodonto ligų patogenezėje vis dar tirama.

**Epigenetinė reguliacija.** Pastaruosius kelis dešimtmečius didelis dėmesys analizuojant periodonto ligų patogenezės mechanizmus skiriamas epigenetiniams veiksniams. Išskiriami trys pagrindiniai epigenetinės reguliacijos mechanizmai: DNR metilinimas, potransliacinės histonų modifikacijos ir RNR indukuojamas genų nutildymas (angl. *RNA-associated silencing*).

Iš jų plačiausiai tyrinėtas **DNR metilinimas**, kurio metu prie daug CpG dinukleotidų turinčio regiono citozino 5-oje padėtyje esančio anglies atomo prijungiama metilo grupė. Kadangi kai kurie transkripcijos veiksniai gali funkcionuoti sąveikaudami tik su nemetilintomis DNR sritimis, tokių regionų hipermetilinimas gali slopinti transkripciją ir lemti kai kurių genų nutildymą (angl. *gene silencing*), o hipometilinimas, atvirkščiai – skatinti transkripcijos aktyvaciją (Almiñana-Pastor ir kt., 2019). DNR metilinimo sutrikimas yra susijęs su genominiu nestabilumu, chromatino konformacijos pasikeitimais, chromosomų lūžiais ir yra svarbus įvairias uždegimines reakcijas bei vėžinių susirgimų išsivystymą skatinantis veiksnys (Planello ir kt., 2015). Keletas tyrimų parodė, kad kai kurių citokinus (*IL-8*, *IL-6*, *IL-10*, *IL-17*, *IFN- $\gamma$* , *CCL25* ir kt.) koduojančių genų promotorių sritys buvo hipometilintos. Dėl tokio metilinimo lygio sumažėjimo atsiradę genų raiškos pokyčiai nulemia nenormalų imuninės sistemos atsaką į infekciją periodonto audiniuose. Tuo tarpu E-kadheriną koduojančio *CDH1* ir uždegiminio citokino *TNF- $\alpha$*  geno atveju buvo nustatytas hipermetilinimas (Loo ir kt., 2010). Periodonto ligų atveju dėl hipermetilinimo sumažėjusi *TNF- $\alpha$*  koduojančio geno raiška nulemia kaulo nykimo procesų slopinimą (Zhang ir kt., 2010). E-kadherinai yra nuo kalcio jonų priklausomos ląstelių adhezijos molekulės, atliekančios esminį vaidmenį epitelinių ląstelių tarpusavio ryšių palaikyme. Laikoma, kad E-kadherino raiška dantenų epiteliniame audinyje atspindi bendrą šio audinio barjerinę funkciją. Dėl *CDH1* hipermetilinimo gali sumažėti jo koduojamo E-kadherino raiška ir atsirasti su šio baltymo nepakankamumu susijusių organizmo funkcijų sutrikimai (Arun ir kt., 2010).

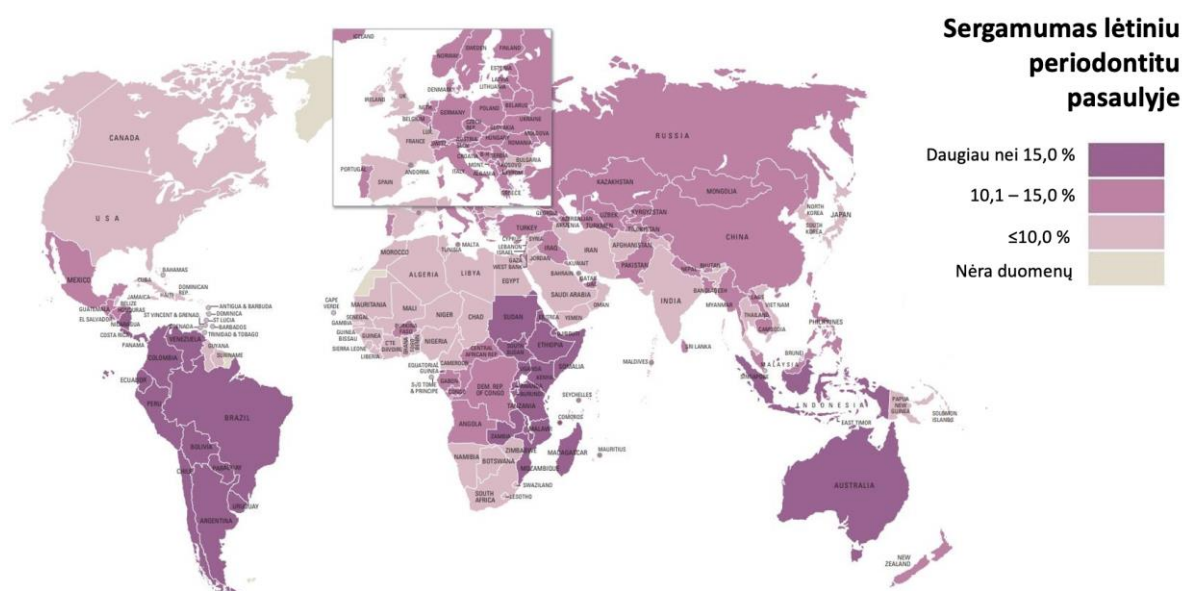
**Potransliacinės histonų modifikacijos** lemia chromatino struktūros pakitimus, jį dar labiau kondensuodamos arba atpalaiduodamos. Jų metu prie specifinių histonų aminorūgščių liekanų kovalentiškai prijungiamos arba nuo jų pašalinamos tam tikros grupės, keičiasi aminorūgščių krūviai, dėl ko pakinta sąveikų tarp histonų ir DNR stiprumas. Periodonto ligų atveju svarbiausia modifikacija yra acetilinimas. Ji lemia chromatino dekompaktizaciją, sąlygojančią išaugusią su uždegimu susijusių genų raišką. Perodontito atveju histonų acetilinimas yra glaudžiai susijęs su DNR metilinimu. DNR metiltransferazių (DNMT) vykdomo promotoriaus CpG salų metilinimo metu prie modifikuotų CpG vietų prisijungia metilintą DNR rišantį domeną turintys (angl. *methyl-binding domain, MBD*) baltymai, aktyvindami histonų deacetilazių (HDAC) veikimą. Tarp teigiamai įkrautų acetilintų histonų lizino liekanų ir neigiamą krūvį turinčios DNR atsiranda stipri elektrostatinė sąveika, nulemianti histoninių baltymų deacetilinimą. Dėl šios modifikacijos įvyksta nukleosomų nulemta DNR kondensacija ir genų raiška slopinama (Baker ir kt., 2011).

90 % žmogaus transkriptomo sudaro **nekoduojančios RNR** (nkRNR) (angl. *non-coding RNA, ncRNA*). Tai RNR molekulės, kurių seka nėra tiesiogiai transliuojama į baltymo seką. Reguluodamos genų raišką potranskripciniame ir potransliaciniame lygmenyse, jos atlieka svarbų vaidmenį įvairiuose organizmo biologiniuose procesuose, o sutrikusi jų funkcija dažnai siejama su įvairių ligų atsiradimu. nkRNR skirstomos į dvi pagrindines grupes: ilgąsias (angl. *long non-coding RNAs, lncRNAs*) ir mažąsias (angl. *short non-coding RNAs, sncRNAs*) (Chan ir Tay, 2018). Ilgosios nkRNR yra > 200 nukleotidų (nt) ilgio molekulės, svarbios tokiose potranskripcinėse modifikacijose kaip kepurės sintezė 5' gale, 3' galo poliadenilimas ir splaisingas (Quinn ir Chang, 2018). Trumpesni nei 200 nt ilgio RNR transkriptai, potranskripciniame lygmenyje reguliuojantys genų raišką, vadinami mažomis nekoduojančiomis RNR. Jų grupei priskiriamos mikro-RNR (miRNR), mažosios interferentinės RNR (siRNR), su Piwi baltymu sąveikaujanti RNR (piRNR), taip pat mažosios branduolio RNR (snRNR), mažosios branduolėlio RNR (snoRNR), ribosominės RNR (rRNR), transportinė RNR (tRNR) ir kitos (Chan ir Tay, 2018). Ilgųjų ir mažųjų nkRNR vaidmuo LP patogenezėje svarbus joms veikiant tiek atskirai, tiek kartu. Nustatyta, kad sumažėjusi ilgąsias nkRNR koduojančių genų raiška skatina periodonto raiščio kamieninių ląstelių (PDLSC) osteogeninę diferenciaciją (Qu ir kt., 2016). Taip pat pastebėta, kad nemaža dalis ilgųjų nkRNR ir miRNR yra tarpusavyje konkuruojančios endogeninės RNR (angl. *competing endogenous RNA, ceRNA*), todėl, viena kitą veikdamos slopinančiai, jos reguliuoja miRNR genų taikinių raišką. Daugėja tyrimų, įrodančių, kad tokio pobūdžio reguliacija yra svarbi ląstelių diferenciacijos procesuose.

Bene didžiausias dėmesys tyrinėjat epigenetinių veiksnių įtaką periodonto ligų vystymuisi tenka miRNR, kurių bendrosios ypatybės ir jų vaidmuo LP vystymesi plačiau aptarti 1.2 skyriuje.

### 1.1.3 Lėtinio periodontito epidemiologija

Remiantis pasaulio odontologų federacijos (angl. *FDI World Dental Federation*) duomenimis, 2010 m. LP sirgo apie 10,8 % (~ 743 milijonai) pasaulio žmonių populiacijos (Kassebaum ir kt., 2014) (1.4 pav.). Pateiktas žemėlapis sudarytas remiantis Kassebaum ir kolegų atlikta sistematine literatūros apžvalga, į kurią buvo įtraukti 72 moksliniai straipsniai, iš viso 291170 vyresnių nei 15 metų amžiaus asmenų duomenys iš 37 šalių. Remiantis šio tyrimo duomenis, 2010 m. Lietuvoje LP sirgo 10,1-15,0 % žmonių.



**1.3 pav.** Sergamumas pažengusia lėtinio periodontito forma pasaulyje (pagal Kassebaum ir kt., 2014; šaltinis: FDI World Dental Federation)

### 1.1.4 Lėtinio periodontito rizikos veiksniai

Nustatyta, kad periodonto ligų, įskaitant ir LP, atsiradimui svarbūs kai kurie rizikos veiksniai. Su aplinka ar asmeniniais žmogaus įpročiais susiję veiksniai, pvz., burnos mikrofloros sudėtis, rūkymas, kai kurios sisteminės ligos, nutukimas, stresas, yra vadinami modifikuojamais rizikos veiksniais. Tuo tarpu kiekvieno asmens individualią sveikatos būklę apibūdinantys veiksniai vadinami nemodifikuojamais. LP atveju šiai rizikos veiksnių grupei priskiriama osteoporozė, moterų hormoniniai svyravimai, nėštumas ir kt. (Kinane ir kt., 2017).



**Modifikuojami rizikos veiksniai.** Bene reikšmingiausias ir plačiausiai ištirtas rizikos veiksnys – rūkymas. Nustatyta, kad rūkantys asmenys LP serga kur kas dažniau, nei nerūkantys. Tabake esantis nikotinas skatina dantenu kraujagysliu susitraukima, del ko sutrinka kraujotaka ir yra prislopinamas dantenu kraujavimas, kuris LP atveju yra vienas esminių diagnostiniu, apie uzdegima perspėjančiu bruožu. Tyrimai parode, kad LP atsiradimui bei ligos eigai itaka daro ir tam tikri mitybos ipročiai. Nustatyta, kad maži su maistu įsisavinamu kalcio ir vitamino C kiekiai, kurie būdingi viršsvorį turintiems žmonėms, taip pat siejami su didesne LP rizika. Nemažiau svarbus veiksnys analizuojamo sutrikimo pasireiškinge – stresas. Manoma, kad del to suprastėjusi burnos higiena, padidėjęs atsparumas insulinui ir del suintensyvėjusios hormonu gliukokortikoidu sekrecijos sutrikę imuninis atsakas siejasi su didesne stresą patiriančiu asmenų rizika sirgti LP. Ši liga taip pat siejama su tokiomis sisteminėmis ligomis kaip diabetas. Nustatyta, kad asmenims, kuriems diagnozuotas cukrinis diabetas, neretai pasireiskia ir LP. Tačiau pastebėta, jog su padidėjusia LP rizika susiję negydomi diabeto atvejai, kai tuo tarpu asmenys, kurių ligos eiga yra kontroliuojama, pasižymi geresne periodontologine sveikata ir teigiamu atsaku į periodontologinį gydymą (Van Dyke ir Sheilesh, 2005)

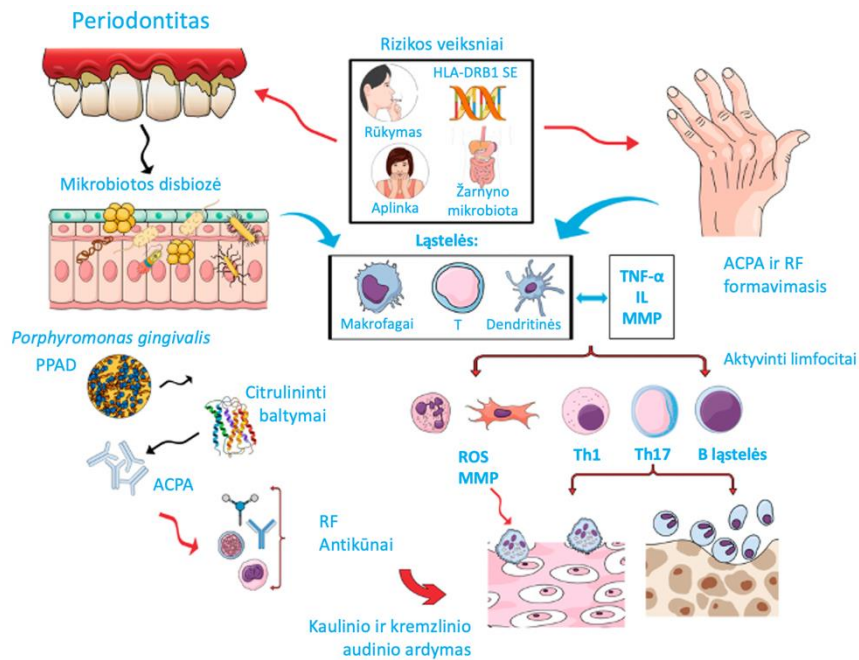
**Nemodifikuojami rizikos veiksniai.** Daugelyje tyrimu, kaip vienas esminių nemodifikuojamų LP rizikos veiksniu, išskiriama su kaulu tankio sumažėjimu ir padidėjusiu jų trapumu susijusi liga – osteoporozė. Pomenopauzinio amžiaus moterų grupės tyrimas parode, kad šia liga sergančiosioms būdingas vieno svarbiausių periodonto audiniu – alveolinio kaulo – tankumo sumažėjimas. Ši sąsaja rodo, jog hormonu lygio svyravimai moterų organizme gali būti viena iš pakitusios periodonto būklės priežasčiu. Nustatyta, kad pomenopauzinio amžiaus moterims, kaip ir nėščiosioms, dažniau pasireiskia stiprus dantenu uždegimas. Del organizmo hormoniniu pokyčiu suaktyvėjusi kraujotaka dantenose sukelia jų patinimą ir didina jautrumą. Be to pastebėta, jog periodonto ligomis sergančios nėščiosios turi didesnę priešlaikinio gimdymo riziką (Kinane ir kt., 2017).

Genetiniu veiksniu nulemtas polinkis sirgti LP yra labai svarbus tiek ligos atsiradimui, tiek jos eigai. Įvertinta, kad paveldimumo nulemta šio sutrikimo pasireiškingo tikimybė yra 50 % (Michalowicz ir kt., 2000). Kai kurie genetiniai pokyčiai nulemia ne tik LP išsivystymą, bet taip pat jo ryšį su kitomis sisteminėmis ligomis. Nustatyta, kad LP sergantiems asmenims būdingi padidėję kraujo serumo IL-6 ir C-reaktyviojo baltymo (CRB) kiekiai, kurie mažėjo pradėjus taikyti periodontologinį gydymą (Nakajima ir kt., 2010). Padidėję CRB kiekiai sergančiųjų kraujo serume rodo, kad jų organizme gali atsirasti ir tam tikri su LP susijusiu citokinu kiekiu pokyčiai, kurie aktyvina/skatina aterosklerozės vystymosi procesus. Tai

paaiškina LP, kaip rizikos veiksnio, svarbą širdies ir kraujagyslių ligų vystymuisi? (AlJehani, 2014).

LP vystymuisi reikšmingi ir demografiniai rizikos veiksniai, iš kurių plačiausiai nagrinėjami amžius, lytis, socioekonominė padėtis, išsilavinimas. Tyrimai parodė, jog LP atsiradimo rizika didėja ir ligos eiga sunkėja organizmui senstant. Manoma, kad daugeliu atvejų ligos pasireiškimas vyresniame amžiuje yra susijęs su ilgesne ligos pradžia inicijuojančių mikroorganizmų veiklos trukme (AlJehani, 2014). Didelė dalis atliktų tyrimų rodo, kad dėl prastesnės burnos higienos vyrai periodonto ligomis linkę sirgti dažniau nei moterys (Meisel ir kt., 2008). Taip pat pastebėta, kad sergamumas LP siejasi ir su žemesniu išsilavinimu ir socioekonominė padėtimi (Kassebaum *ir kt.*, 2014).

LP etiologiškai glaudžiai susijęs su jo eigą moduluojančia autoimunine liga – **reumatoidiniu artritu (RA)** (de Smit ir kt., 2012) (1.4 pav.). Nustatyta, kad tokie rizikos veiksniai kaip rūkymas, tam tikros genetinės ypatybės, pavyzdžiui, *HLA-DRB1* alelio koduojamas bendras epitopas, mikrobiotos disbiozė skatina potransliacines modifikacijas, nulemiančias LP ir RA vystymosi procesuose reikšmingus baltymų funkcinis pokyčius. Pastebėta, jog daugelio žmogaus baltymų paviršiuje aptinkamos aminorūgštis arginino citrulininimą katalizuoja peptidilarginino deiminazė (PPAD), kurią išskiria LP vystymesi svarbi jau minėta burnos mikrofloros bakterijų rūšis – *P. gingivalis*. Būtent prieš taip modifikuotus baltymų epitopus susidaro RA specifiški anti-citrulinintų baltymų antikūnai (angl. *anti-citrullinated protein antibodies, ACPAs*). Nustatyta, kad padidėjęs citrulinintų baltymų kiekis skatina autoimuninį atsaką ir dar aktyvesnę ACPA ir reumatoidinių veiksnių (angl. *rheumatoid factors, RFs*) sintezę (de Molon ir kt., 2019). Citrulinintų baltymų išsidėstymas osteoklastų paviršiuje įgalina lengvą ACPA prisijungimą, kurio atpalaiduoti chemokinai IL-8 autokriniškai reguliuoja tolesnį osteoklastų formavimąsi. Be to, sudarydami imuninius kompleksus su RF, ACPA autoantikūnai gali jungtis prie osteoklastų Fc receptorių, aktyvindami juos kaulinio audinio ardymo procesams (Catrina ir kt., 2017).



**1.4 pav.** Reumatoidinio artrito ir lėtinio periodontito vystymosi panašumai (pagal de Molon ir kt., 2019)

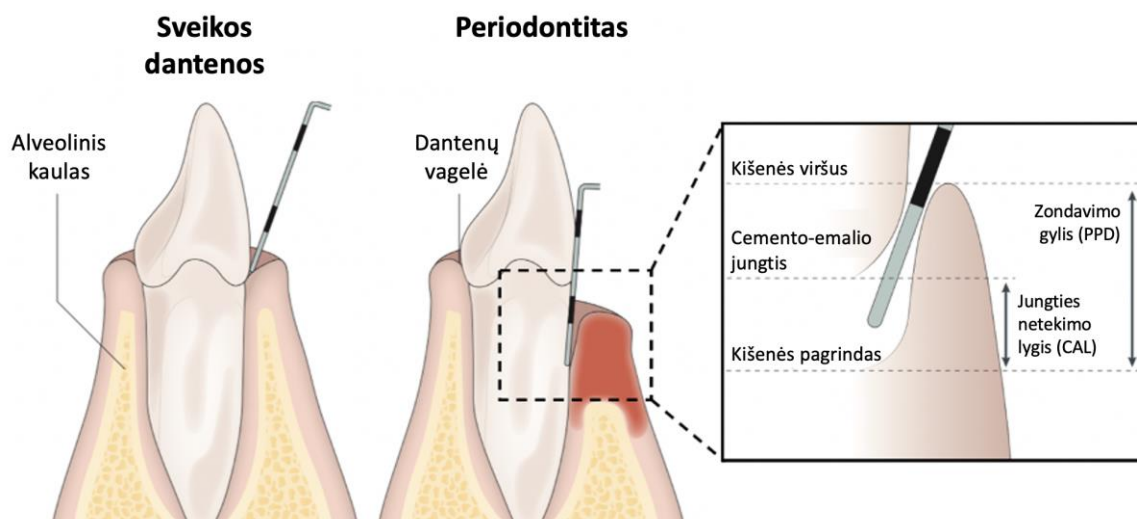
Remiantis literatūros duomenimis, LP sergantiems asmenims RA pasireiškia kur kas dažniau nei periodontologiškai sveikiems asmenims ir atvirkščiai (de Smit ir kt., 2012). Pastebėta, jog RA sergantiems žmonėms būdingas statistiškai reikšmingai didesni LP ligą apibūdinantys rodikliai ir netektų dantų skaičius (Mercado ir kt., 2001). Akivaizdus ryšys tarp šių dviejų ligų rodo, jog siekiant geriau suprasti LP patogenezės mechanizmus yra būtina atsižvelgti ir į šią ligą modifikuojančius susirgimus, tokius kaip aptartasis RA.

### 1.1.5 Lėtinio periodontito diagnozavimas ir gydymas

Skirtingų diagnostinių kriterijų taikymas apsunkina periodonto ligų epidemiologinį vertinimą. Siekiant tai suvienodinti, per pastaruosius kelis dešimtmečius buvo sukurta ne viena periodonto ligų klasifikacinė sistema. Visos jos iš esmės skyrėsi siūlomomis diagnostikoje naudojamų kriterijų, tokių kaip periodonto jungties netekimo lygis (angl. *clinical attachment loss*, *CAL*), zondavimo gylis (angl. *probing pocket depth*, *PPD*), kraujavimo indeksas (angl. *bleeding on probing*, *BOP*), reikšmėmis. Viena plačiausiai naudotų buvo 1989 m. Pasaulio sveikatos organizacijos (PSO) pasiūlyta klasifikacija taikant CPI/CPITN (angl. *Community Periodontal Index/Community Periodontal Index of Treatment Needs*) indeksą. Šios sistemos populiarumą lėmė patogumas ir galimybė per sąlyginai trumpą laiką ištirti didelę dalį tiriamųjų. Klasifikacija diagnozuojant vieną ar kitą periodontito tipą rėmėsi vieninteliu esminiu kriterijumi – PPD. Nors ši sistema įgalino greitą ir patogų ligos diagnozavimą, nebuvo atsižvelgiama į tokius negrįžtamus pakitimus, kaip dantenu recesija ar periodonto

jungties netekimas, taigi ja paremti vertinimai buvo netikslūs (Natto ir kt., 2018). Pastebėjus, kad pastaroji klasifikacija turi nemažai trūkumų, 1999 m. Amerikos periodontologijos akademija (angl. *American Academy of Periodontology, AAP*) pateikė patobulintą jos versiją, žinomą ir *Armitage* klasifikacijos pavadinimu, kurioje esminių ligos pažangumo įvertinimo kriterijumi tapo CAL. Šioje kelis dešimtmečius naudotoje sistemoje periodonto ligos buvo suskirstytos į naujas grupes, kai kurias jų apjungiant, pašalinant ar pakeičiant pavadinimą į tinkamesnę. *Armitage* klasifikacijoje periodontitas buvo skirstomas į lėtinį, agresyvių ir nekrozinį tipus, pateikiant esminius skirtumus tarp jų (Papapanou ir kt., 2017). 2007 m. JAV ligų kontrolės ir prevencijos centras (angl. *Center for Disease Control, CDC*) kartu su AAP pasiūlė naują CDC/AAP klasifikaciją. Joje ligos pažangumui vertinti buvo siūloma naudoti du kriterijus – CAL ir PPD, kurių ribinės reikšmės lengvo, vidutinio ir sunkaus periodontito atveju skyrėsi. Nors minėtos klasifikacijos buvo plačiai taikomos tiek diagnostikai rutininių apžiūrų metu, tiek moksliniuose tyrimuose, laikui bėgant išryškėjo kai kurie jų trūkumai. Todėl 2017 m. AAP kartu su Europos periodontologų federacija (angl. *European Federation of Periodontology, EFP*) pasiūlė naują, patobulintą *Armitage* klasifikacijos versiją. Joje siūlyta patogenetinėmis savybėmis susijusius lėtinio ir agresyvaus periodontito tipus apjungti į vieną ir vadinti bendru „periodontito“ pavadinimu. Be to, pasiūlyta ligą detaliau charakterizuoti, remiantis *staging-grading* sistema, kur *staging* atspindi periodontito sunkumą ir sudėtingumą, o *grading* – biologinės ligos pasireiškimo ypatybes, numatant galimą staigų ligos progresavimą, atsaką į gydymą ir jo įtaką bendrai sergančiojo sveikatos būklei. Atliekant periodontito vertinimą *staging-grading* sistema, nurodoma vertinti ne tik CAL ar PPD lygį, bet taip pat radiografiškai nustatytą kaulo tirpimo (angl. *radiographic bone loss*) laipsnį, bendrą netektų dantų skaičių bei tam tikrus rizikos veiksnius, tokius kaip rūkymas, diabetas ir kt. (Tonetti ir kt., 2019). Vieninga periodonto ligas apibūdinanti ir diferencijuojanti sistema išspręstų epidemiologinio vertinimo problemas ir leistų surinkti statistinius duomenis, atitinkančius realią sergamumo periodontitu situaciją.

**Diagnozavimas.** LP atveju ankstyvas ir tikslus ligos diagnozavimas yra ypač svarbus. Vis dėlto dažnai dėl besimptomės ligos eigos pradžios LP diagnozuojamas jau gerokai pažengęs, kai kaulinis ir minkštieji audiniai jau būna negrįžtamai suardyti. Pagrindiniai LP vystymosi požymiai yra kraštinių dantų paraudimas, patinimas, kraujavimas iš dantų kišenės zondavimo metu, padidėjęs periodonto kišenės gylis, dantų recesija, padidėjęs dantų paslankumas ir galiausiai – dantų netekimas (Kinane ir kt., 2017). Ligos diagnostika remiasi keletu klinikinių matavimų matrica (1.5 pav.), įskaitant CAL, PPD, BOP ir rentgenologinį vertinimą (AAP, 2015).



**1.5 pav.** Sveikas ir pažeistas periodonto audinys bei periodonto kišenės gylio matavimo zonduojant principas.

Nors toks, keletu klinikinių parametru vertinimu paremtas, diagnostinis metodas šiuo metu yra laikomas tiksliausiu ir tinkamiausiu naudoti, ši sistema leidžia nustatyti tik jau pažengusios ligos stadiją, tačiau nesuteikia informacijos apie galimą tolesnę jos eigą.

**Gydymas.** LP gydymas paremtas susikaupusių dantų apnašų ar akmenų, vadinamų konkrementais, pašalinimu, taikant nechirurginį ar chirurginį gydymą (Kinane ir kt., 2017). Nechirurginio (konservatyvaus) gydymo metu, siekiant visiškai eliminuoti ligą sukeliančius patogenus, reguliarių vizitų metu šalinamos minkštosios dantų apnašos ir dantų akmenys, lyginamas dantų šaknų paviršius. Sėkmingo gydymo atveju, po mėnesio stebimi periodonto audinių gijimo požymiai: periodonto jungties atsistatymas, sumažėję PPD ir BOP. Pasireiškiant tolimesniam audinių irimui, kartu su konservatyviuoju gydymu papildomai taikoma antibakterinė terapija antibiotikais, siekiant pašalinti periodonto kišenėse likusius patogeninius organizmus. Tokio tipo kombinuotas gydymas nulemia reikšmingai geresnius gydymo rezultatus (Apatzidou ir Kinane, 2010). Kraštutiniais atvejais pasitelkiamas chirurginis gydymas, kurio metu taikant vietinę nejautrą yra atkeliamas dantenu sluoksniš ir nuo taip apnuogintų dantų šaknų paviršiaus pašalinamos buvusios sunkiai prieinamos apnašos. Operacijos metu, naudojant audinių pakaitalus ir barjerines membranas, gali būti atliekamos kietųjų ir minkštųjų audinių atstatymo procedūros (Larsson ir kt., 2016). Nors teigiami pokyčiai pasireiškia taikant abiejų rūšių gydymo strategijas, nustatyta, kad atlikus chirurginį gydymą liga progresuoja kur kas rečiau. Vis dėlto, nepriklausomai nuo gydymo, bene svarbiausiu ligos stabilumo palaikymo veiksmu išlieka nuolatinė periodontologinės

sveikatos priežiūra, tinkamai rūpinantis kasdiene asmenine burnos higiena bei periodiškai lankantis pas odontologą (Kinane ir kt., 2017).

Akivaizdu, kad šiuolaikiniai klinikinėje praktikoje taikomi LP diagnozavimo metodai leidžia nustatyti ligą tik jau pažengusiose jos stadijose. Dėl šios priežasties aktyviai ieškoma molekulinį biožymenų, kurie įgalintų ankstyvą LP diagnostiką.

## 1.2 miRNR

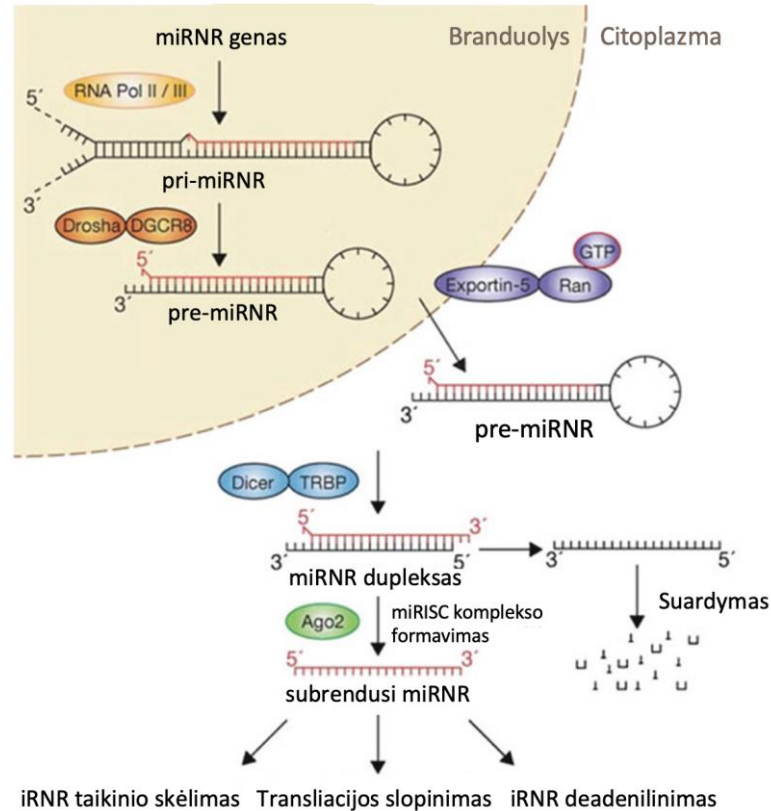
Pirmosios miRNR apvaliojoje kirmėlėje *Caenorhabditis elegans* (*C.elegans*) – lin-4 – atradimas 1993 m. tapo itin reikšmingu pasiekimu molekulinės biologijos srityje. Šios trumpos, ~ 19-22 nt ilgio baltymo nekoduojančios RNR molekulės potranskripciniame lygmenyje reguliuoja genų raišką. Šiuo metu nustatyta apie 2600 žmogaus subrendusių miRNR (*miRBase* duomenų bazė, pagal internetinę nuorodą <http://www.mirbase.org/cgi-bin/browse.pl?org=hsa>), kurios dalyvaudamos daugelio biologinių procesų reguliavime yra svarbios normalių organizmo funkcijų palaikymui. Nors palyginus su informacine RNR (iRNR) ir baltymais, miRNR ląstelėje yra nedaug, kiekviena iš jų gali turėti šimtus taikinių, kas ir nulemia didelį jų reguliacinį potencialą.

### 1.2.1 miRNR biogenezė

Atsižvelgiant į miRNR koduojančių genų struktūrą ir lokalizaciją genomo mastu, miRNR yra skirstomos į tarpgenines, intronines ir egzonines (Okamura ir kt., 2007). Beveik pusė identifikuotų miRNR genų, vadinamų *MIR*, pavieniui ar klasteriais yra išsidėstę tarpgeniniuose regionuose ir turi savo promotorius. Introninėms miRNR yra būdingas išsidėstymas žinomų genų nekoduojančiose srityse. Tokios miRNR gali būti transkribuojamos kartu su genu, į kurio seką jos yra įsiterpusios, bet gali turėti ir joms specifinius promotorius. Rečiausiai sutinkamos egzoninės miRNR paprastai persidengia su nekoduojančių genų egzonais ir/ar intronais (Rodriguez ir kt., 2004). Išskiriami du miRNR biogenezės tipai: kanoninis ir nekanoninis.

**Kanoninis miRNR biogenezės kelias.** Tai pagrindinis miRNR sintezės būdas (1.6 pav.). Branduolyje veikiant RNR polimerazei II (RNR Pol II) vyksta miRNR genų transkripcija, kurios metu susidaro pirminis miRNR transkriptas (pri-miRNR). Tai plaukų smeigtuko (angl. *hairpin*) formos struktūra, sudaryta iš ilgo stiebelio su viengrandės RNR atšakojimu ties pamatu ir kilpute viršūnėje (Kim ir kt., 2009). Tokią struktūrą atpažįsta mikroprocesoriaus kompleksas, kurio pagrindiniai elementai yra RNazė III *Drosha* ir

dvigrandę RNR surišantį domeną turintis baltymas (angl. *double-stranded RNA-binding domain, dsRBD*) DGCR8 (*Pasha*). DGCR8 pritraukia *Drosha*, kuris kerpa ties pri-miRNR segtuko pamatu, taip susiformuojant ~60-70 nt ilgio miRNR pirmtakui (pre-miRNR) (Denli ir kt., 2004). Šios struktūros 2 nt ilgio iškyšą 3' gale atpažįsta baltymas Eksportinas-5, kuris, veikdamas kartu su baltymu RanGTP (angl. *Ras-related nuclear protein – guanosine-5'-triphosphate*), perneša pre-miRNR į ląstelės citoplazmą (Kim ir kt., 2009). Ten prie miRNR pirmtako prisijungia RNazė III *Dicer*, kuri, veikdama su kitu dsRBD baltymu TRBP, pašalina pre-miRNR segtuko kilpą, taip susidarant ~22 nt ilgio miRNR dupleksui. Tuomet, viena iš duplekso grandinių jungiasi su *Argonaute* (žmoguje Ago1-4) šeimos baltymais, susidarant miRISC (angl. *RNR-induced silencing complex*) kompleksui (Lee ir kt., 2006). Kuri iš duplekso grandinių bus įjungta priklauso nuo jų stabilumo 5' gale. Nustatyta, kad paprastai įjungtą mažesniu stabilumu pasižyminti grandinė, kuri, būdama miRISC komplekse, dalyvauja transliacijos slopinime arba iRNR degradacijoje. Tuo tarpu neįjungta, lydinčioji, grandinė dažniausiai suardoma. Vis dėlto, naujos kartos sekoskaitos rezultatai rodo, kad daugelio miRNR atveju į miRISC gali jungtis ir dalis lydinčiųjų duplekso grandinių. Be to, grandinės pasirinkimas kai kurių miRNR atveju gali skirtis priklausomai ir nuo ląstelių tipo (Hammond ir kt. 2015).



**1.6 pav.** miRNR biogenezės schema (pagal Winter ir kt., 2009)

**Nekanoniniai miRNR biogenezės keliai.** Nekanoniniai miRNR biogenezės keliai nuo jau aptarto kanoninio skiriasi juose dalyvaujančių baltymų kombinacijomis. Galima išskirti du pagrindinius – nuo mikroprocesoriaus (*Drosha/DGCR8*) nepriklausomą ir nuo *Dicer* nepriklausomą kelią. Mikroprocesoriaus kompleksui nedalyvaujant bręsta splaisingo metu iš iRNR intronų susidaranti miRNR, vadinamos mirtronais. Jų struktūra labai primena pre-miRNR, todėl, kaip ir kanoninio kelio metu, branduolyje prie jų prisijungia baltymas Eksportinas-5, o vėliau citoplazmoje kerpa *Dicer*. Be to, nustatyta, kad nuo *Drosha/DGCR8* nepriklausomu keliu iš kitų nekoduojančių RNR, pavyzdžiui tRNR ar snoRNR, gali susidaryti ir kai kurios trumposios RNR (Ruby ir kt., 2007). Tuo tarpu nuo *Dicer* nepriklausomame miRNR brendimo procese mikroprocesoriaus kompleksas yra būtinas. Veikiant jam susidaro endogeniniai plaukų smeigtuko formos transkriptai, kurie yra per trumpi, kad būtų kerpami *Dicer*, todėl galutiniame tokių miRNR brendimo etape prie Ago baltymų prisijungia visa segtuko formos struktūra. Ago kerpa jos stiebo dalį, kuri galutinai sukarpoma ribonukleazės PARN (Yang ir kt., 2010).

miRNR savybė bręsti alternatyviais keliais atspindi didelį jų evoliucinį lankstumą. Vis dėlto didžioji dalis miRNR susiformuoja kanoniniu keliu ir tik apie 1 % jų būdingi alternatyvūs, nuo mikroprocesoriaus komplekso ar *Dicer* nukleazės nepriklausomi biogenezės būdai. Daugelis nekanoniniais būdais susiformuojančių miRNR yra negausiai aptinkamos ir nekonservatyvios, todėl funkcinė tokių miRNR reikšmė turėtų būti vertinama itin atsargiai (Ha ir kt., 2014).

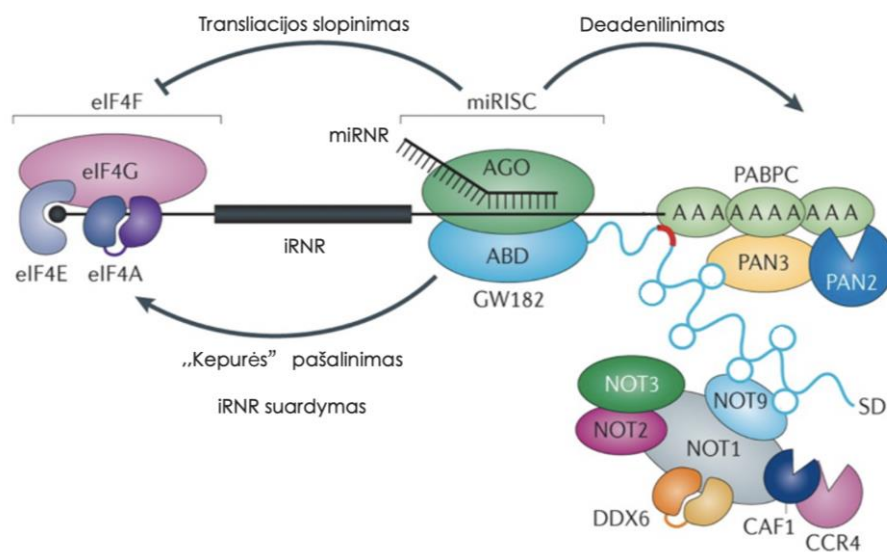
### 1.2.2 miRNR veikimo mechanizmai

Daugelis tyrimų parodė, kad miRNR, būdama miRISC komplekse, transliacijos slopinimą ir iRNR deadenilinimą bei 7 metilintų guanino nukleotidų (5' m<sup>7</sup>G) „kepurės“, apsaugančios transkriptą nuo degradacijos, nuėmimą vykdo prisijungdama prie 3' galo netransliuojamų iRNR sričių (angl. *untranslated region UTR*). Tačiau pastebėta, kad miRNR gali jungtis ir kitose iRNR vietose (Lytle ir kt., 2007). Pavyzdžiui, prisijungimas 5' UTR regione ar baltymą koduojamoje srityje susijęs su genų raiškos slopinimu (Zhang ir kt., 2018) o promotoriuje – transkripcijos aktyvinimu (Dharap ir kt., 2013), tačiau šis mechanizmas dar nėra pilnai išaiškintas.

miRNR prisijungus prie iRNR 3'UTR regionų, jos veikimo pobūdį nulemia taikinio ir konservatyvios 2-8 nt ilgio sekos miRNR molekulėje, vadinamos *seed* regionu, komplementarumas bei specifinės Ago baltymų savybės. Šios šeimos baltymus sudaro keli pagrindiniai domenai: miRNR 3' galo prisijungimui reikalingas PAZ, 5' galą įvirtina MID, o



PIWI būdingas endonukleolitinis aktyvumas. Tiesa, tik Ago2 turi skaldymui reikalingų savybių, dėl kurių jis dažnai vadinamas „pjaustykle“ (angl. *Slicer*). (Jinek ir Doudna, 2009). Esant dideliame atitikimo laipsniui, nulemiama iRNR degradacija (Wilczynska ir kt., 2015). Vis dėlto gyvūnų ląstelėse dauguma sąveikų yra nepilnai komplementarios, dėl ko iRNR apsaugoma nuo Ago2 endonukleazinio poveikio ir vyksta translacijos slopinimas. Genų tildymo pradžioje Ago jungiasi su GW182 baltymu, turinčiu ABD (angl. *amino-terminal AGO-binding domain*) ir SD (angl. *silencing domain*). GW182 sąveikauja su citoplazminiu prie poliadenilintų sričių prisijungiančiu baltymu PABC bei citoplazminiais iRNR taikinio deadenilinimą katalizuojančiais deadenilazių kompleksais – PAN2-PAN3 ir CCR4-NOT. Prisijungiant baltymui DCP2 (angl. *decapping protein 2*), nuo deadenilintų iRNR molekulių yra pašalinama 5' m<sup>7</sup>G kepurė. DCP2 aktyvumui yra svarbūs kofaktoriai DDX6 (angl. *DEAD box protein 6*), DCP1, PATL1 ir kt. Galiausiai tokia deadenilinta ir monofosforilinta iRNR degraduojama veikiant 5'-3' egzoribonukleazei 1 (XRN1). Manoma, kad translacijos slopinimui svarbi miRNR sąveika su eukariotų iniciacijos veiksnių 4F (angl. *eukaryotic initiation factor 4F, eIF4F*) kompleksu, kuris svarbus 43S preiniciacijos komplekso, dalyvaujančio eukariotų translacijos iniciacijoje, aktyvinimui. eIF4F sudaro kepurę atpažįstantis ir prie jos prisijungęs baltymas eIF4E, adapterinis baltymas eIF4G bei transkripto išvyniojimą 5' gale vykdanči *DEAD box* RNR helikazė – eIF4A (Jonas ir kt., 2015). Manoma, kad miRNR blokuoja vieną iš šių sąveikų, taip slopindama translacijos iniciaciją, tačiau konkretus mechanizmus vis dar lieka neaiškus (Fukaya ir kt., 2014) (1.7 pav.)



**1.7 pav.** miRNR reguliuojamas genų nutildymas gyvūnuose (pagal Jonas ir kt., 2015)

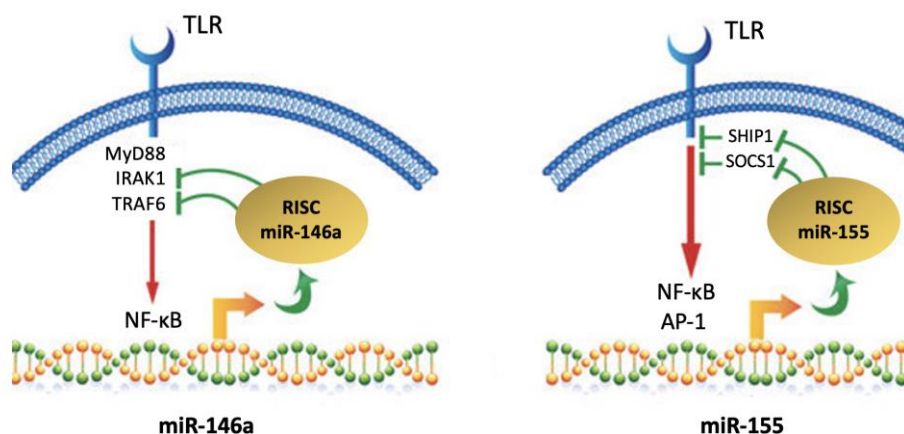
Nors miRNR reguliuojamas genų raiškos slopinimas ištyrinėtas geriausiai, yra pastebėta, kad miRNR gali ir skatinti genų raišką. *In vitro* tyrimai rodo, kad ląstelėse, auginamose be serumo, Ago2 ir FXR1 (angl. *fragile-x-mental retardation related protein 1*) baltymai jungėsi prie ARE (angl. *AU-rich elements*) regionų 3' UTR srityse, taip aktyvindami transliaciją. Pastebėta, kad kai kurios miRNR, pavyzdžiui, let-7, sąveikaudamos su minėtais baltymais aktyvina transliaciją ląstelės ciklo sustabdymo metu, tačiau ją slopina proliferuojančiose ląstelėse (Vasudevan ir Steitz, 2007). Taip pat nustatyta, kad miRNR aktyvina genus, prisijungdamos prie ribosominius baltymus koduojančių iRNR 5' UTR regionų, esant aminorūgščių trūkumui. Tai rodo, kad miRNR, esant specifinėms sąlygoms, gali aktyvinti transliaciją (Orom ir kt., 2008).

### 1.2.3 miRNR vaidmuo imuninėje sistemoje

Reguluodama imuninės sistemos ląstelių brendimą, proliferaciją, diferenciaciją, aktyvaciją, antikūnų produkciją ir uždegiminių veiksnių atpalaidavimą, miRNR svariai prisideda prie imuninės sistemos funkcijų palaikymo (Baulina ir kt., 2016).

Organizmą paveikus infekcijai, mikrobiniai komponentai yra atpažįstami per įgimto imuniteto atsake dalyvaujančių monocitų ir dendritinių ląstelių paviršiuje išsidėsčiusius TLR receptorių. TLR ir patogenų konservatyvių struktūrų sąveika inicijuoja signalo perdavimą į ląstelę per IRAK (angl. *interleukin-1 (IL-1) associated kinases*) -1, -2 ir -4 kinazių ir TRAF6 (angl. *tumor necrosis factor receptor-associated factor 6*) kaskadą, taip aktyvinant uždegiminių citokinių, tokių kaip IFN ir TNF, atpalaidavimą. Visi šio proceso etapai yra reguliuojami miRNR (Jia *et al.*, 2014). Pavyzdžiui, dendritinių ląstelių tipui priskiriamų antigenų atpažįstančių Langerhanso ląstelių aktyvumas priklauso nuo miRNR biogenezėje dalyvaujančio *Dicer* baltymo. Nesant jo, išauga Langerhanso ląstelių apoptozės lygis, nulemiantis jų kiekio sumažėjimą. Taip pat žinoma, kad apsauginę funkciją atliekančios NK (angl. *natural killer*) ląstelės, sintetindamos įvairius citokinus, veikia daugelio imuninės sistemos ląstelių vystymąsi. NK ląstelėms, kuriose nevyksta miRNR brendimo baltymų *Dicer* ar DGCR8 raiška, būdinga sutrikusi NK receptorių aktyvinimo funkcija (Bezman ir kt., 2010). Geriausiai ištyrinėtos imuninės sistemos funkcijas reguliuojančios miRNR yra miR-146a ir -155. Bakterijų LPS aktyvina miR-146a koduojančio geno *MIR146A* raišką. Ši miRNR slopina signalinių baltymų IRAK-1 ir TRAF6 produkciją taip slopindama NF-κB signalinį kelią ir uždegiminių citokinių sintezę (Taganov ir kt., 2006) (1.8 pav. A). Tuo tarpu miR-155, prisijungdama prie neigiamų imuninio atsako reguliatorių, pavyzdžiui, SHIP1 (angl. *Src homology-2 domain-containing inositol 5-phosphatase 1*) ir SOCS1 (angl. *suppressor of*

*cytokine signaling 1*), transkriptų, reguliuoja imuninių ląstelių išlikimą ir aktyvinimą (O'Connell ir kt., 2009) (1.8 pav. B).



**1.8 pav.** miR-146a (A) ir -155 (B) veikimo mechanizmai imuninėje sistemoje (pagal Alexander ir O'Connell, 2015)

MyD88 – mieloidinės diferenciacijos veiksnys 88 (angl. *myeloid differentiation factor 88*); AP-1 – baltymo aktyvatorius 1 (angl. *activator protein 1*)

miRNR svarbų vaidmenį atlieka ir įgytos imuninės sistemos pagrindinių T ir B ląstelių vystymosi ir diferenciacijos procesų reguliavime. Pavyzdžiui, miRNR brendimo sutrikimas, atsiradęs dėl delecijos *Dicer* baltymą koduojančiame gene, aktyvina ankstyvą T ląstelių apoptozę, dėl ko sumažėja šių ląstelių kiekis. Taip pat pastebėta, kad sumažėjusi miRNR genų raiška ir Ago2 baltymų produkcija naiviosiose T ląstelėse skatina jų diferenciaciją į efektorines T ląsteles. Dėl *Dicer* ir Ago2 baltymų trūkumo yra sutrikdoma B ląstelių diferenciacija, dėl to pasikeičiant sekretuojamų antikūnų įvairovei. Pastebėta, kad miR-181a raiškos sumažėjimas nesubrendusiose T ląstelėse yra susijęs su teigiamos ir neigiamos T ląstelių atrankos sutrikdymu. Įdomu tai, kad padidėjusi šios miRNR raiška subrendusiose T ląstelėse skatina jų atsako į antigenų poveikį jautrumą (Li ir kt., 2007). Taip pat pastebėta, kad miR-155 yra reikalinga naivių T ląstelių diferenciacijai į efektorines – Treg, Th1/2 ir Th17 ląsteles. *Dicer* ir *Drosha* baltymų kiekio sumažėjimas Treg ląstelėse nulemia ankstyvą autoimuninių ligų vystymąsi (O'Connell ir kt., 2010).

Akivaizdu, kad miRNR yra daugialypis ir labai svarbus imuninės sistemos reguliacijoje dalyvaujantis veikėjas, todėl miRNR raiškos sutrikdymas dažnai lemia įvairių lėtinių infekcijų, autoimuninių ligų ar net imunodeficito išsivystymą.

#### 1.2.4 miRNR ir uždegiminės ligos

miRNR reikšmė uždegiminėse ligose ypač didelė ir plačiai nagrinėjama tokiose etiopatogenetiškai susijusiose ligose, kaip uždegiminės žarnyno ligos (angl. *inflammatory bowel diseases, IBD*), RA ir LP.

Lėtinis uždegimas **IBD** sergančių asmenų žarnyne didžiaja dalimi yra nulemtas genetiškai ir glaudžiai siejasi su žarnyno mikrobiotos pusiausvyros sutrikimais. Pakitusios raiškos miRNR keičia IBD patogenezėje svarbių T ląstelių funkciją. IBD sergančių asmenų audiniuose nustatyta padidėjusi miR-155 raiška. Tyrimai su pelėmis parodė, kad *MIR155* geno išjungimas apsaugo peles nuo ūminio, eksperimentiškai sukulto kolito išsivystymo (Singh ir kt., 2014). Panašus veikimas nustatytas ir miR-21 atveju. Jos raiška opiniu kolitu ir Krono liga sergančiųjų žarnyno audiniuose reikšmingai išaugusi. Be to, pastebėta, kad miR-21 nuslopinimas gali apsaugoti nuo šių ligų išsivystymo bei ligos progresavimo (Wu ir kt., 2010). Su IBD taip pat susijusi miR-200b. Nustatyta, kad, slopindama TGF- $\beta$  skatinamą epitelinę-mezenchiminę tranziciją (EMT) miR-200b padeda išlaikyti žarnyno epitelio barjerinę funkciją, svarbią normaliai žarnyno veiklai (Chen ir kt., 2012).

Su LP glaudžiai susijusi ir bene plačiausiai tyrinėjama autoimuninė liga – **reumatooidinis artritas (RA)**. Ji pasireiškia negrįžtamais sąnarių pakitimais, atsiradusiais dėl lėtinio uždegimo sinovijoje. Sinovijos membranoje ir skystyje nustatytas didelis skaičius pakitusios raiškos miRNR. Kaip ir daugelio uždegiminių ligų, taip ir RA atveju labiausiai ištyrinėtos – miR-146a ir -155 (žr. 1.2.3 sk.). RA sergančių asmenų audiniuose nustatyta padidėjusi šių miRNR raiška. Uždegimą skatinančiomis savybėmis pasižyminčios miR-155 raiškos padidėjimas sinovijos membranos ir sinovijos skysčio makrofaguose susijęs su didesniu išskiriamų uždegiminių citokinų kiekiu (Kurowska-Stolarska ir kt. 2011). Tuo tarpu miR-146a veikia kaip svarbus neigiamas uždegiminio ir imuninio atsako reguliatorius (Pauley ir kt., 2008). RA sergančių asmenų periferinio kraujo monocituose nustatyta išaugusi miR-182 raiška. Ši miRNR veikia baltymo kinazę R, kuri slopina osteoklastogenezės procesus. Sumažėjusi kai kurių miRNR raiška RA atveju yra susijusi su sinovijos hiperplazija, skatinančia lėtinio uždegimo RA paveiktuose sąnariuose atsiradimą (Inoue ir kt., 2018). Vienas iš pavyzdžių – miR-23b. Šios miRNR raiškos sumažėjimas skatina uždegiminių citokinų raišką, veikiant TAB (angl. *TGF- $\beta$ -activated kinase 1/ MAP3K7 binding protein*)-2, -3 ir NF- $\kappa$ B kinazės subvieneto alfa inhibitorių (IKK- $\alpha$ ). Tuo tarpu sumažėjusios raiškos miR-708-5p per Wnt3/ $\beta$ -katenino kelio slopinimą stimuliuoja sinoviocitų apoptozę, taip skatindama sąnario audinių irimą (Wu ir kt., 2018).

**Periodonto ligos.** Kaip jau aptartų kitų uždegiminių ligų atveju, periodonto ligų vystymesi taip pat svarbus NF- $\kappa$ B signalinis kelias. miR-146a susijusi su NF- $\kappa$ B aktyvinimu (žr. 1.2.3 sk.). Šios miRNR raiškos padidėjimas uždegiminiame dantenų audinyje rodo, kad miR-146a atlieka svarbias funkcijas imuninio atsako reguliavime LP atveju (Jiang *ir kt.*, 2015). miR-155 taip pat veikia per NF- $\kappa$ B signalinį kelią (žr. 1.2.3 sk.). Nustatyta, kad periodonto raiščio ląstelėse miR-155 indukcija nulemia NF- $\kappa$ B signalinio kelio slopinimą ir raiščio ląstelių diferenciacijos aktyvinimą (Trotta *ir kt.*, 2013). Esant hipoksinėms sąlygoms, pavyzdžiui, giliose pažeisto periodonto kišenėse, miR-155 veikdama mTOR kelią dalyvauja ląstelės ciklo stabdyme, silpnina ląstelių proliferaciją ir skatina autofagiją (Wan *ir kt.*, 2014). Autofagija, kaip atsakas į hipoksinės sąlygas, nustatyta periodonto raiščio ir dantenų epitelio ląstelėse ir yra laikoma kritiniu ląstelių išgyvenimo streso sąlygomis veiksniumi. Kai kurios miRNR, pavyzdžiui, miR-30e, slopina NK ląstelių citotoksines savybes. Tokių miRNR raiškos sumažėjimas nulemia aktyvesnę IFN- $\gamma$  sintezę, padidėjusį NK ląstelių aktyvumą, dėl kurio intensyviai ardomi periodonto audiniai (Wang *ir kt.*, 2012). Keletas miRNR, kurių raiška sveikame ir pažeistame dantenų audinyje skyrėsi, atlieka specifines funkcijas kaulo homeostazės palaikyme. miR-29a, reguliuodama Wnt signalinį kelią per teigiamo grįžtamojo ryšio kilpą, tiesiogiai veikia neigiamus Wnt signalinio kelio reguliatorius, dėl ko yra skatinama osteoblastų diferenciacija (Kapinas *ir kt.*, 2010). Tuo tarpu LP paveiktose dantenose sumažėjusios raiškos miR-200c, reguliuodama Notch signalinį kelią, skatina osteoklastogenezę periodonto uždegimo vietose (Vallejo *ir kt.*, 2011).

Šiame darbe analizuotos 4 miRNR - **miR-140-3p**, **-145-5p**, **-146a-5p** ir **-195-5p**. Vienos iš jų – **miR-146a-5p** veikimo principas imuninėje sistemoje ir kai kuriose uždegiminėse ligose jau aptartas anksčiau (žr. 1.2.3 ir 1.2.4 sk.). Šios miRNR svarba analizuota ir ūminio koronarinio sindromo tyrimuose, ieškant sąsajų su LP. Bagavad Gita *ir kt.* pastebėjo, kad palyginus palyginus tik šiuo sindromu, tik LP ir abejomis ligomis sirgusiųjų grupes, sergamumas LP nulėmė išaugusią miR-146a-5p raišką (Bagavad Gita *ir kt.*, 2019). Šios miRNR svarba vėžinėse ligose taip pat didelė, tačiau nustatyti pokyčiai skirtingus organus apimančių onkologinių susirgimų atveju – nevienodi. Pavyzdžiui su prostatos (Liu *ir kt.*, 2019), krūties (Liang *ir kt.*, 2019), nesmulkiaūstelinio plaučių (Yuwen *ir kt.*, 2017), kiaušidžių (Wilezyński *ir kt.*, 2017), gimdos kaklelio (Hu *ir kt.*, 2018) onkologiniais susirgimais siejama padidėjusi miR-146a-5p raiška, tuo tarpu su storosios žarnos (Liu *ir kt.*, 2018) vėžiu – sumažėjusi. Įdomu tai, kad piktybiniuose skrandžio navikuose buvo nustatytas tiek šios miRNR padidėjimas, tiek sumažėjimas. 2019 m. Shomali atliktas tyrimas parodė, kad miR-146a-5p raiškos lygis priklauso nuo su skrandžio patologine glaudžiai susijusios ir

lėtinį uždegimą sukeliančios *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) bakterijos veiklos skrandyje. Nustatyta, kad navikuose, kurių atsiradimas nebuvo paskatintas *H. pylori* infekcijos, šios miRNR raiška buvo sumažėjusi (Shomali *ir kt.*, 2019). Tai rodo, kad miR-146a-5p raiška priklauso nuo daugelio veiksnių, kurie gali būti esminiai ir periodonto ligų atveju.

**miR-140-3p** prie imuninės sistemos funkcijų palaikymo prisideda slopindama IL-1 $\beta$  ir TNF- $\alpha$  indukuojamą uždegimą, skatindama autofagiją ir reguliuodama keletą ROS produkcijoje bei metabolizmo procesuose dalyvaujančių baltymų veiklą (Al-Modawi *ir kt.*, 2019). Nustatyta, kad ši miRNR taip pat dalyvauja chondrogenezės procesų reguliavime – sveikame kremzliniame audinyje miR-140-3p raiška yra padidėjusi (Yin *ir kt.*, 2017; Ntoumou *ir kt.*, 2017). miR-140-3p raiškos sumažėjimas stebimas ir storosios žarnos (Jiang *ir kt.*, 2019), krūties (Zhou *ir kt.*, 2019), smulkialąstelinio plaučių (Huang *ir kt.*, 2019), kiaušidžių (Miles *ir kt.*, 2012) ir kitų vėžinių susirgimų atveju. Keletas tyrimų pateikė miR-140-3p, kaip potencialų osteoporozės (Ramírez-Salazar *ir kt.*, 2018) ar autizmo spektro sutrikimų (angl. *autism spectrum disorders, ASD*) bioženy (Cirnigliaro *ir kt.*, 2017).

Nemažiau svarbi svarbi uždegiminių ligų vystymesi – **miR-145-5p**. Nustatyta, kad LP atveju dantenų epitelio ląstelėse TNF- $\alpha$  veiksnio indukuojama miR-145-5p, reguliuodama transkripcijos regulatoriaus BACH2 geno raišką, kontroliuoja ląstelių apoptotinius procesus (Liu *ir kt.*, 2020). Keletas tyrėjų grupių nustatė, kad padidėjusios raiškos miR-145-5p susijusi su osteogeninės diferenciacijos slopinimu (Yu *ir kt.*, 2018; Liu *ir kt.*, 2019; Wang *ir kt.*, 2019). Be to, Zhang su kolegomis ištyrė idiopatinę skoliozę sergančių asmenų kaulų biopsijos mėginius, nustatė miR-145-5p raiškos padidėjimą, kuris galėjo sukelti osteocitų funkcijos sutrikimus, nulemiančius kaulų masės mažėjimą (Zhang *ir kt.*, 2018). Tuo tarpu, kitus sutrikimus nagrinėjančiuose tyrimuose šiai miRNR priskiriamas apsauginis, priešuždegiminis vaidmuo. Pavyzdžiui Dinesh *ir kt.* tyrė miR-145-5p reikšmę RA patogenezėje. Jie nustatė, kad miR-145-5p slopindama Wnt1/ $\beta$ -katenino signalinį kelią, inhibuoja sąnario audinių irimą skatinančių sinoviocitų proliferaciją, taip stabdydama RA vystymąsi (Dinesh *et al.*, 2020). Priešuždegiminis šios miRNR poveikis nustatytas koronarinių širdies ligų (Li *ir kt.*, 2020), taip pat tokių onkologinių susirgimų, kaip nesmulkialąstelinio plaučių (Li *ir kt.*, 2020), krūties (Bellissimo *ir kt.*, 2019), šlapimo pūslės (Zhang *ir kt.*, 2018), skrandžio (Zhang *ir kt.*, 2016) ir kitų vėžinių susirgimų atveju.

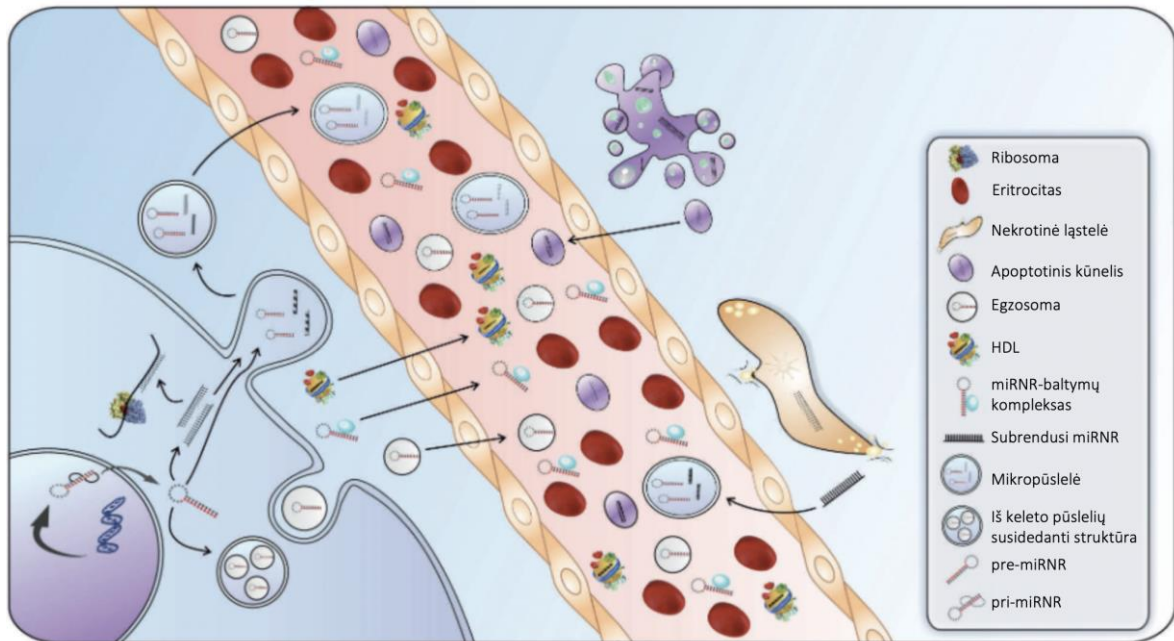
**miR-195-5p** funkcija uždegiminėse reakcijose dvilypė. Pastebėta, jog padidėjusi šios miRNR raiška ankstyvame amžiuje yra susijusi su ląstelių diferenciacijos ir mineralizacijos procesų slopinimu (Grünhagen *ir kt.*, 2015). Pakitusi miR-195-5p raiška stebima ir onkologinių susirgimų atveju. Storosios žarnos vėžio tyrimai parodė, kad navikinėms ląstelėms yra būdingas miR-195-5p raiškos sumažėjimas, tuo tarpu jos padidėjimas siejamas

su vėžinių ląstelių proliferacijos ir invazyvumo slopinimu, reguliuojant TNF signalinį kelią (Li ir kt., 2018). Nustatyta, kad padidėjusios raiškos miR-195-5p slopina ląstelių proliferaciją bei skatina apoptotinius procesus nesmulkialąstelinio plaučių vėžio navikuose (Luo ir kt., 2019). Panašius pokyčius padidėjusios raiškos miR-195-5p sukelia ir melanomos atveju. *In vitro* tyrimai parodė, kad ši miRNR slopindama žmogaus telomerazės baltymo katalizinį subvienetą koduojantį geną hTERT, slopina naviko vystymąsi (Chai ir kt., 2018). Didelė dalis miR-195-5p tyrimų organizmo skysčiuose orientuoti į vėžinius susirgimus, tačiau gauti rezultatai, priklausomai nuo vėžio tipo, skiriasi. Pavyzdžiui, osteosarkoma sergančių asmenų plazmoje buvo nustatytas padidėjęs miR-195-5p kiekis, palyginus su sveikais asmenimis (Lian ir kt., 2015). Tuo tarpu skrandžio vėžio atveju, sergančiųjų plazmoje užfiksuoti keliolika kartų mažesni šios miRNR kiekiai (Gorur ir kt., 2013).

Taigi miRNR vaidmuo uždegiminių ligų, įskaitant LP, atveju yra iš tiesų reikšmingas. Kadangi miRNR reguliuoja daug genų, tai nulemia ir daug funkcinių pokyčių ląstelėse. Tokių mechanizmų išsiaiškinimas labai svarbus, nes gali padėti geriau suprasti ne tik ligų patogenezę, tačiau taip pat pasitarnauti ligų diagnostikos tobulinime bei tapti naujais terapiniais taikiniais.

### **1.2.5 Cirkuliuojančios miRNR – ligų biožymenys**

Unikali miRNR savybė – jų trumpos ir išskirtinai stabilios sekos. Visiškai nepažeistos ir nepriklausomos nuo ląstelių, jos aptinkamos kraujo serume ir plazmoje, šlapime, seilėse, nes yra atsparios nukleazių poveikiui (Szafranska ir kt., 2008). Tyrimai rodo, kad cirkuliuojančios miRNR neveikia pavieniui, o yra supakuojamos į tam tikras struktūras ar funkcionuoja kompleksuose su tam tikrais baltymais. Nustatyta, kad tokios užląstelinėje aplinkoje cirkuliuojančios miRNR gali būti supakuojamos į dviejų tipų mažas membranines pūsleles, mikropūsleles arba egzosomas, kurios tarpusavyje skiriasi dydžiu ir susiformavimo principu. Mikropūslelės yra 50-1000 nm dydžio lipidinės pūslelės, susidarančios atsiskiriant ląstelės membranai, tuo tarpu egzosomos yra mažesnės – 30-100 nm dydžio dalelės, atpalaiduojamos iš keleto pūslelių susidedančioms struktūroms (angl. *multivesicular bodies*) susijungus su plazmine ląstelės membrana (Mi ir kt., 2013). miRNR taip pat gali būti supakuotos į apoptotinius kūnelius (Zernecke ir kt., 2009), didelio tankio lipoproteino (angl. *high density lipoprotein, HDL*) daleles (Vickers ir kt., 2011) arba cirkuliuoti susijungusios su Ago šeimos baltymais (Arroyo ir kt., 2011) (1.9 pav.).



**1.9 pav.** Cirkuliuojančių miRNR supakavimas ir transportavimas (pagal Kichukova ir kt., 2015)

Dėl reguliacinių funkcijų imuninio atsako formavimosi ir imuninių ląstelių vystymosi metu miRNR tampa ypač reikšmingomis įvairių uždegiminių ligų patogenezėje. Atrandama vis daugiau miRNR, kurių kiekio pokyčiai organizmo skysčiuose nustatomi įvairių uždegiminių ligų atveju (Mi ir kt., 2013). Kraujo serumas ir plazma, kuriems būdingas didelis stabilų miRNR kiekis ir yra itin populiarūs transplanto atmetimo, širdies ligų, vėžio ir įvairių infekcinių ligų tyrimuose (Chen ir kt., 2008). Vis dėlto kraujo paėmimas neretai gali palikti žymes, sukelti diskomfortą, o kartais netgi infekcijas. Todėl vis didesnio dėmesio susilaukia seilės. Nustatyta, kad seilių transkriptomas susideda iš daugiau nei 3000 RNR rūšių, įskaitant ir miRNR (Kim ir kt., 2015). Seilės tampa vis populiareniu tyrimų objektu įvairių burnos onkologinių susirgimų bei sisteminių ligų tyrimuose dėl patogaus, neinvazinio ir pigaus mėginių surinkimo (Williamson ir kt., 2012).

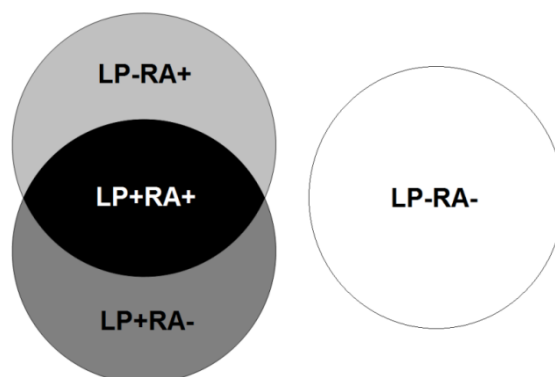
LP tyrimai, analizuojantys miRNR pokyčius ligos pažeistuose audiniuose, vis populiarėja. Didelio dėmesio susilaukė miRNR tyrimai LP sergančių asmenų organizmo skysčiuose, įskaitant ir kraujo plazmą bei seiles. Nustatyta, kad periodonto audiniuose dėl LP sukeltų pažeidimų atsiradę miRNR pokyčiai gali keisti miRNR raiškos profilį ir organizmo skysčiuose (Kim ir kt., 2015). Vis dėlto tikslus ryšys tarp organizmo skysčiuose cirkuliuojančių miRNR ir periodonto būklės išlieka neaiškus, todėl reikalingi tolimesni tyrimai tam, kad būtų išnaudotas jų, kaip diagnostinio įrankio, potencialas.



## 2. MĖGINIAI IR METODAI

### 2.1 Tiriamieji ir mėginiai

**Tiriamieji.** Iš viso į tyrimą įtraukta 80 asmenų, kurie, atsižvelgiant į atliktų diagnostinių tyrimų rezultatus, buvo suskirstyti į keturias pagrindines tiriamąsias grupes: sergantys ir LP ir RA [LP+RA+], sergantys tik LP [LP+RA-], sergantys tik RA [LP-RA+] ir sveiki asmenys [LP-RA-] (2.1 pav.).



**2.1 pav.** Tiriamosios grupės. Juoda zona vaizduoja abiejomis ligomis – lėtiniu periodontitu (LP) ir reumatoidiniu artritu (RA) – sergančių asmenų grupę, tamsiai pilkas apskritimas – tik LP, šviesiai pilkas – tik RA, baltas – sveikų – nei LP, nei RA nesergančių, asmenų grupę.

LP sergantys ir sveiki asmenys tyrimui atrinkti remiantis periodontologinio ištyrimo rezultatais, įvertinus PPD, BOP, CAL, dantų paslankumą, pūliavimą iš periodonto kišenių, furkacijų defektus, apnašų indeksą, periapikalinių kaulinės destruktijos židinių buvimą, netektų dantų ir implantų skaičių. RA sergantys asmenys buvo atrinkti atsižvelgiant į diagnozę, patvirtintą remiantis Amerikos reumatologų kolegijos (angl. *American College of Rheumatology, ACR*) 2010 m. kriterijais. Visiems į tyrimą įtrauktiems RA sergantiems asmenims buvo atliktas reumatologinės būklės įvertinimas: vertintas ligos aktyvumo indeksas (DAS 28), užpildytas sveikatos vertinimo klausimynas (HAQ), atsižvelgta, ar taikomas gydymas nuo RA, vartojami vitamino D papildai. Tiriamųjų įtraukimo į tyrimą metu vertinti ir registruoti demografiniai rodikliai (lytis, amžius) bei kiti parametrai, tokie kaip kūno masės indeksas (KMI), rūkymas, alkoholio vartojimas, asmeninė burnos higiena, apsilankymų pas odontologą dažnis (2.1 lentelė).

Šis tyrimas yra didesnės apimties projekto dalis, kuriam vykdyti leidimas išduotas 2018-06-05 (Nr. 158200-18/6-1042-542).

**2.1 lentelė.** Tiriamųjų pasiskirstymas pagal demografinius, lėtinio periodontito (LP) klinikiškus-patologinius ir LP modifikuojančių veiksnių rodiklius.

Parametrai	Grupės				
	LP+		LP-		
LP statusas, N (%)	49 (61,3)		31 (38,8)		
RA statusas, N (%)	RA+	RA-	RA+	RA-	
	24 (30,0)	25 (31,3)	6 (7,5)	25 (31,3)	
<b>Demografiniai rodikliai</b>					
Amžius					
Vidurkis ± SN, metai	58,29 ± 6,93	57,36 ± 8,07	51,27 ± 11,03	47,04 ± 13,41	
Lytis					
Moterys, N (%)	23 (95,8)	18 (72,0)	6 (100)	22 (88,0)	
Vyrai, N (%)	1 (4,2)	7 (28,0)	0	3 (12,0)	
<b>LP klinikiniai-patologiniai rodikliai</b>					
Periapikaliniai kaulinės destrukcijos židiniai					
Nėra, N (%)	2 (8,3)	4 (16,0)	4 (66,7)	3 (12,0)	
Yra, N (%)	4 (16,7)	2 (8,0)	1 (16,7)	2 (8,0)	
Nežinoma, N (%)	18 (75,0)	19 (76,0)	1 (16,7)	20 (80,0)	
Netektų dantų skaičius					
Vidurkis ± SN, vienetai	9 ± 6,35	7,17 ± 4,26	2,8 ± 2,16	2,2 ± 2,86	
Nežinoma, N (%)	18 (75,0)	19 (76,0)	1 (16,7)	20 (80,0)	
Periodontito sunkumas					
Sunkus, N (%)	15 (62,5)	25 (100)	-	-	
Vidutinis, N (%)	8 (33,3)	-	-	-	
Lengvas, N (%)	1 (4,2)	-	-	-	
Kontrolė, N (%)	-	-	6 (100)	25 (100)	
<b>LP modifikujantys veiksniai</b>					
RA rodikliai	Biologinė terapija nuo RA				
	Taikyta, N (%)	10 (41,7)	-	5 (83,3)	-
	Netaikyta, N (%)	14 (58,3)	-	1 (16,7)	-
	DAS28 <sup>a</sup>				
	Vidurkis ± SN, įvertis	4,40 ± 1,14	-	4,11 ± 2,21	-
	HAQ <sup>b</sup>				
	Vidurkis ± SN, įvertis	0,81 ± 0,64	-	1,25 ± 0,22	-
	KMI <sup>c</sup>				
	Vidurkis ± SN, įvertis	26,75 ± 4,75	25,05 ± 3,98	26,36 ± 5,53	25,26 ± 4,88
	Vitamino D koncentracija <sup>d</sup>				
	Vidurkis ± SN, nmol/l	40,97 ± 16,45	53,40 ± 21,55	45,13 ± 28,56	56,68 ± 22,01
	Nežinoma, N (%)	-	11 (44,0)	-	8 (32,0)
	Vitamino D papildų vartojimas				
Vartoja, N (%)	11 (45,8)	6 (24,0)	1 (16,7)	6 (24,0)	
Nevartoja, N (%)	13 (54,2)	8 (32,0)	5 (83,3)	11 (44,0)	
Nežinoma, N (%)	-	11 (44,0)	-	8 (32,0)	
Kiti rodikliai	Rūkymas				
	Rūkantys, N (%)	4 (16,7)	3 (12,0)	-	2 (8,0)
	Metę rūkyti, N (%)	7 (29,2)	10 (40,0)	1 (16,7)	5 (20,0)
	Nerūkantys, N (%)	13 (54,2)	12 (48,0)	5 (83,3)	18 (72,0)
	Alkoholis				
	Kartą per savaitę, N (%)	-	6 (24,0)	-	6 (24,0)
	Kartą per mėnesį, N (%)	11 (45,8)	16 (64,0)	2 (33,3)	15 (60,0)
	Niekada, N (%)	13 (54,2)	3 (12,0)	4 (66,7)	4 (16,0)
	Dantų valymas				
	≥ 2 kartus per dieną, N (%)	18 (75,0)	19 (76,0)	5 (83,3)	18 (72,0)
	< 2 kartus per dieną, N (%)	6 (25,0)	6 (24,0)	1 (16,7)	7 (28,0)
	Dantų siūlo naudojimas				
	Naudoja, N (%)	16 (66,7)	13 (52,0)	5 (83,3)	22 (88,0)
Nenaudoja, N (%)	8 (33,3)	12 (48,0)	1 (16,7)	3 (12,0)	
Apsilankymų pas odontologą dažnis					
≥ 2 kartus per metus, N (%)	7 (29,2)	6 (24,0)	2 (33,3)	9 (36,0)	
< 2 kartus per metus, N (%)	17 (70,8)	19 (76,0)	4 (66,7)	16 (64,0)	

## 2.1 lentelė. Tęsinys

*Santrumpos:* RA – reumatoidinis artritas, SN – standartinis nuokrypis; DAS28 - ligos aktyvumo indeksas (angl. *disease activity score 28*); HAQ – sveikatos vertinimo klausimynas (angl. *health assessment questionnaire*); KMI – kūno masės indeksas.

<sup>a</sup> DAS 28 (< 2,6 – neaktyvus, > 2,6 – aktyvus)

<sup>b</sup> HAQ (0,3 – normali funkcija, 0,3-1,3 – nežymus nepakankamumas, 1,3-1,8 – vidutinis, > 1,8 sunkus)

<sup>c</sup> KMI ( $\leq 18,5$  – nepakankamas svoris, 18,5-24,99 – optimalus svoris, 25-29,99 – antsvoris, > 30 – nutukimas)

<sup>d</sup> Vitamino D koncentracija (nmol/L) (> 75 – norma, 50-74,99 – nepakankamumas, < 50 trūkumas)

**Mėginiai.** miRNR raiškos analizei periodonto audiniai (~ 2 mm<sup>3</sup>) paimti sterilia kiurete ties giliausia periodonto kišene. Paimta medžiaga iškart perkelta į sterilius 2 mL talpos mėgintuvėlius su stabilizuojančiuoju *RNAlater*<sup>TM</sup> (*Thermo Fisher Scientific, TFS*) tirpalu. miRNR tyrimams kūno skysčiuose reikalingi seilių mėginiai rinkti iš bent 2 val. nevalgusių, negėrusių, nerūkiusių, nevaliusių dantų tiriamųjų, kurie pirmiausia skalavo burną distiliuotu vandeniu ir palaukę 5 min į sterilų indą išspjovė naujai susidariusias seiles. Jos centrifuguotos 15 min 2600 × g greičiu, o tolimesniems tyrimo etapams reikalingas supernatantas perkeltas į sterilų 2 mL mėgintuvėlį, pridėjus *SUPERase-In*<sup>TM</sup> (*Invitrogen, TFS*) RNazių slopiklio. Kraujo mėginiai buvo renkami iš periferinės venos į 10 mL talpos *BD Vacutainer*<sup>®</sup> mėgintuvėlius su etilendiamintetraacto rūgšties dikalio druskos (K2-EDTA) antikoagulantu (*Becton, Dickinson and Company*). Po 15 min centrifugavimo 2000 × g greičiu, atsiskyrusi kraujo plazma perkelta į sterilius 2 mL mėgintuvėlius. Visa surinkta biologinė medžiaga iki panaudojimo buvo saugoma -80 °C temperatūroje.

## 2.2 Metodai

### 2.2.1 Visuminės RNR skyrimas

**RNR skyrimas iš periodonto audinių.** Periodonto audinys homogenizuojamas mechaniškai, panaudojant grūstuvėlę ir piestelę. Homogenizuoto audinio miltelius užpylus 1 mL lizuojančio *TRIzol* reagento (*TFS*), gautas lizatas iš grūstuvėlės perkeliamas į mėgintuvėlį. Tuomet įpylus 200 μL chloroformo (*Sigma-Aldrich, Merck KGaA*) ir labai gerai supurčius centrifuguojama 15 min 12000 × g greičiu 4° C temperatūroje. Viršutinėje vandeninėje fazėje esanti RNR precipituojama izopropanoliu (*Sigma-Aldrich, Merck KGaA*) ir po 10 min inkubacijos centrifuguojama 10 min 12 000 × g greičiu 4 °C temperatūroje. Pašalinus supernatantą, ta pati plovimo procedūra kartojama 2 kartus, naudojant 75 % etanolį ir ≥ 96 % etanolį („*Vilniaus degtinė*“). Po centrifugavimo susidaręs supernatantas pašalinamas, o susidariusios RNR nuosėdos džiovinamos kambario temperatūroje ir tirpinamos 10 μL vandens be RNazių. Išgryninta RNR laikoma -80 °C temperatūroje.

**RNR skyrimas iš seilių ir kraujo plazmos mėginių.** Visuminė RNR iš organizmo skysčių skirta dviem skirtingais būdais: naudojant *TRIzol (TFS)* reagentą ir *miRNeasy Mini Kit (Qiagen)* rinkinį. Įvertinus gautos RNR kokybę ir išeią, tolimesniems tyrimams pasirinktas gryninimo silikagelio kolonėlėmis būdas, naudojant *miRNeasy Mini Kit* rinkinį. Pirmiausia, 1 mL seilių ar kraujo plazmos ėminio užpilama *QIAzol Lysis* reagentu santykiu 1:1 ir inkubuojama 5 min kambario temperatūroje. Įpylus 200 µL chloroformo mėginys gerai supurtomas ir po kelių minučių inkubacijos įnešama 25 fmol cel-miR-39 (*TaqMan™ MicroRNA Assay, ABI, TFS*; gamintojo kodas 000200) – sintetinės miRNR, kuri naudojama kaip kontrolė RNR gryninimo, kopijinės DNR sintezės ir kiekybinės PGR efektyvumui įvertinti. Mėginys centrifuguojamas 15 min 12000 × g greičiu 4 °C temperatūroje. Viršutinę vandeninę fazę perkėlus į 1,5 mL mėgintuvėlį, pilama 1,5 vandeninės fazės tūrio ≥ 96 % etanolio. Supurčius, 700 µL mišinio perkeliama ant silikagelio kolonėlės ir centrifuguojama 15 s ≥8000 × g greičiu; centrifugatas pašalinamas. Šis žingsnis kartojamas iki kol sunaudojamas visas mėginys. Kolonėlė plaunama 4 kartus, , dukart naudojant 700 µL *RWT* ir dukart po 500 µL *RPE* buferių. Paskutinysis plovimo etapas atliekamas centrifuguojant 2 min ≥8000 × g greičiu. Siekiant, kad membrana gerai išdžiūtų, kolonėlė patalpinama į švarų surinkimo mėgintuvėlį ir centrifuguojama 1 min didžiausiu greičiu. Perkėlus kolonėlę į 1,5 mL surinkimo mėgintuvėlį ant membranos užnešama 30 µL vandens be RNazių, centrifuguojama 1 min ≥8000 × g greičiu, po to užnešama dar 20 µL ir centrifuguojama tomis pačiomis sąlygomis. Išgryninta RNR iš karto naudojama tolimesniems tyrimams arba saugoma -80 °C temperatūroje.

### **2.2.2. Išskirtos RNR kokybės vertinimas**

Iš audinio ir kūno skysčių išskirtos RNR koncentracija ir kokybiniai parametrai buvo vertinami *NanoDrop 2000 (Thermo Scientific)* spektrofotometru bei *Qubit 4 (Invitrogen, TFS)* fluorometru.

UV spektrofotometru matuojama mėginių šviesos sugertis, kuri RNR atveju yra didžiausia esant 260 nm ilgio bangoms. Ties šiuo bangos ilgiu nustatytos absorbcijos reikšmės bei ekstinkcijos koeficientas (40 µg/mL) yra naudojami automatiškai apskaičiuojant RNR koncentraciją tiriamuosiuose mėginiuose. Absorbcijos reikšmių ties 260 ir 280 nm ilgio bangomis santykis (A260/280) rodo RNR grynumą. Geros kokybės RNR mėginio A260/280 vertė svyruoja nuo 1,8 iki 2,0, priklausomai nuo pasirinktos gryninimo metodikos. Nukrypimai nuo šios normos dažnai indikuoja baltyminę taršą. Tarša, galėjusi atsirasti dėl RNR skyrimui naudojamų fenolinių mišinių, pavyzdžiui, *TRIzol* reagento, automatiškai

nustatoma įvertinus sugerties reikšmių ties 230 ir 260 nm ilgio bangomis santykį (A230/260), kuris geros kokybės RNR atveju turėtų būti 2,0-2,2 intervalo ribose.

RNR koncentracijos vertinimas *Qubit 4* fluorometru yra paremtas specifinių dažų, fluorescuojančių tik prisijungus prie RNR, panaudojimu. Esminis šios technologijos privalumas yra tas, jog galima tarša neiškreipia rezultatų. Tyrimo metu kiekybiniam įvertinimui buvo naudojamas *Qubit RNA High Sensitivity Assay Kit (Invitrogen, TFS)* rinkinys, įgalinantis nustatyti itin mažos koncentracijos (iki 250 pg/μL) RNR. Išskirtos RNR kokybė buvo vertinama atsižvelgiant į fluorometro apskaičiuotą RNR integralumo balą. Tai reikšmė, rodanti santykį tarp ilgųjų (iRNR, tRNR, rRNR) ir mažųjų ir/ ar degradavusių RNR molekulių kiekio. Įvertis dešimties balų skalėje parodo tiriamojo mėginio RNR kokybę.

Atsižvelgiant į gautus rezultatus, tolimesniems tyrimo etapams buvo pasirinkti tik pakankamos koncentracijos ir geros kokybės mėginiai.

### **2.2.3. Visuminė miRNR raiškos analizė miRNR mikrogardelėmis**

Visuminio miRNR raiškos tyrimui buvo naudojamos *Human miRNA 8×60 K* formato mikrogardelės, sukurtos remiantis *miRBase* duomenų bazės 21.0 versija. Visos šiame etape naudotos priemonės, reagentai ir programinė įranga, jei nenurodyta kitaip, gamintos *Agilent Technologies*. Ši technologija įgalina vienu metu tirti 2549 žmogaus miRNR 8 mėginiuose su ~ 60 000 zondų vienam mėginiui. Metodas pagrįstas hibridizacija tarp mikrogardelės pritvirtintų zondų ir fluorescuojančia žyme žymėtų miRNR molekulių. Atsižvelgiant į fluorescencijos intensyvumą įvertinama miRNR raiška. miRNR raiškos tyrimas buvo atliekamas remiantis gamintojo protokolu *miRNA Microarray System with miRNA Complete Labeling and Hyb Kit*.

Tyrimas mikrogardelėmis susideda iš kelių pagrindinių etapų, iš kurių kiekvienas trumpai aptariamas žemiau.

**Defosforilinimas.** 100 ng iš audinių išskirtos visuminės RNR maišoma su 2 μL sintetinės kontrolinės miRNR (*Labeling Spike-In solution*), fosfatazės ir jos buferio mišiniu. Atsargiai sumaišius, inkubuojama 30 min 37 °C temperatūroje kaitinimo bloke (*Thermomixer R, Eppendorf*).

**Denatūravimas.** Kiekvienas mėginys yra veikiamas 2,8 μL dimetilsulfoksido tirpalu (DMSO) ir 7 min inkubuojamas termocikleryje („*MasterCycler® EP*“, *Eppendorf*) 100 °C temperatūroje. Pasibaigus inkubacijai, mėginiai nedelsiant perkeliama į ledo vonelę ir vykdomas kitas žingsnis.

**Žymėjimas fluorescuojančia žyme.** Į kiekvieną mėginį įnešama 4,5 µL cianino 3-pCp, T4 RNR ligazės, jos buferio mišinio ir atsargiai sumaišoma pipetuoiant. Tuomet termocikleryje 16 °C temperatūroje vykdoma 2 valandų inkubacija.

**Žymėtos miRNR valymas.** Šiame etape, naudojant gelio kolonėlės *Micro Bio-Spin P-6 Gel Column (Bio-Rad Laboratories, Inc.)*, fluorescuojančia žyme žymėta miRNR yra apvaloma nuo galimo DMSO ir/ar nepresijungusio cianino 3-pCp pertekliaus. Kiekvieną mėginį sumaišius su 38,7 µL vandens, mišinys užnešamas ant paruoštų gelio kolonėlių ir centrifuguojama 4 min 1000 × g greičiu. Kolonėles pašalinamos, o išvalyta žymėta RNR laikoma ant ledo.

**Džiovinimas.** Paruošti mėginiai bent 1 valandą džiovinami vakuuminiam koncentratoriuje 45 °C temperatūroje.

**Hibridizavimas.** Gautos nuosėdos resuspenduojamos 17 µL vandens be nukleazių. Į kiekvieną mėginį pilamas mišinys, susidedantis iš 1 µL sintetinės kontrolinės miRNR (*Hyb Spike-In solution*), 4,5 µL *Gene Expression Blocking Agent*, 22,5 µL hibridizacijos buferio ir inkubuojama 5 min 100 °C temperatūroje. Paruoštas reakcijos mišinys nedelsiant perkeliamas į ledo vonelę, kur laikomas 5 min, po to trumpai centrifuguojamas, surenkant kondensatą. Paruošti mėginiai užnešami ant mikrogardelės ir, surinkus hibridizacijos kamerą, 20 valandų inkubuojami 55 °C temperatūroje hibridizacijos krosnyje.

**Plovimas.** Šiame etape naudojami du mikrogardelių plovimo buferiai: *Gene Expression Wash Buffer 1* ir *2*. Mikrogardelė 5 min plaunama pirmajame kambario temperatūros buferyje, po to dar 5 min – antrajame 37 °C temperatūros buferyje.

**Mikrogardelių nuskaitymas skeneriu.** Skenavimui naudojamas *Agilent SureScan* mikrogardelių skeneris ir *Agilent Microarray Scan Control* programinė įranga. Pradinių miRNR raiškos duomenų išgavimui pasitelkta *Feature Extraction Software v10.7* programa.

#### 2.2.4. Kopijinės DNR (kDNR) sintezė

Atvirkštinės transkripcijos (AT) reakcijos metu sintetinama kopijinė DNR (kDNR) yra reikalinga miRNR tyrimams audiniuose ir organizmo skysčiuose (seilėse, kraujo plazmoje).

**kDNR sintezė miRNR raiškos validavimui periodonto audiniuose.** AT reakcija vykdoma naudojant *TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit* rinkinį ir specifinius *RT Primer Pool* pradmenis (viskas iš *Applied Biosystems (ABI), TFS*), remiantis gamintojo protokolu. Ruošiamas reakcijos mišinys, kurį sudarančių komponentų kiekis vienai reakcijai nurodytas 2.2 lentelėje. Kelis kartus pavarčius ir nucentrifugavus, į kiekvieną paruoštą reakcijos mėgintuvėlį pilama 12 µL mišinio, 3 µL (350 ng) visuminės RNR ir 5 min

inkubuojama ant ledo. Atvirkštinė transkripcijos reakcija vykdoma termocikleryje, gamintojo rekomenduojamu temperatūriniu režimu. (2.4 lentelė).

**2.2 lentelė.** AT reakcijos komponentai ir jų kiekis vienai reakcijai

Komponentas	Tūris (µL)
AT reakcijos pradmenų mišinys ( <i>RT Primer Pool</i> )	6,00
10× atvirkštinės transkripcijos reakcijos buferis	1,50
Deoksinukleotidų mišinys (dNTP) (100 nM)	0,30
Atvirkštinė transkriptazė <i>MultiScribe</i> <sup>TM</sup> (50 U/µL)	3,00
RNazių inhibitorius (20 U/µL)	0,19
Vanduo be nukleazių	1,01
<b>Bendras tūris</b>	<b>12,00</b>

**kDNR sintezė miRNR tyrimui seilėse ir kraujo plazmoje.** Šio etapo kDNR sintezei taip pat pasirinktas *TaqMan*<sup>®</sup> *MicroRNA Reverse Transcription Kit* rinkinys, tačiau vietoje pradmenų mišinio naudojami specifiški atrinktų miRNR (hsa-miR-140-3p, -145-5p, -146a-5p ir -195-5p smeigtuko formos pradmenys (*TaqMan*<sup>TM</sup> *MicroRNA Assay*; gamintojo kodai 002234, 002278, 000468 ir 000494, atitinkamai; viskas iš *ABI, TFS*). Remiantis gamintojo rekomendacijomis, ruošiamas 3,5 µL tūrio pradinis reakcijos mišinys, kurio komponentų kiekis vienai reakcijai pateiktas 2.3 lentelėje. Švelniai pamaišius ir trumpai nucentrifugavus, įnešama 1,5 µL kiekvienai tiriamajai miRNR specifinių AT reakcijos pradmenų ir 2,5 µL visuminės RNR (1-10 ng). Mėgintuvėlis su galutiniu reakcijos mišiniu trumpai nucentrifuguojamas ir inkubuojamas termocikleryje gamintojo rekomenduojamomis temperatūrinėmis sąlygomis (2.4 lentelė). Susintetinta kDNR iškart naudojama tolimesniuose tyrimo etapuose arba iki panaudojimo saugoma -20 °C temperatūroje.

**2.3 lentelė.** AT reakcijos pradinio mišinio komponentų kiekis vienai reakcijai

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

## 2.4 lentelė. kDNR sintezės temperatūrinis režimas

Temperatūra (°C)	Trukmė (min)
16 °C	30 min
42 °C	30 min
85 °C	5 min
4 °C	∞

### 2.2.5. Kiekybinė atvirkštinės transkriptazės polimerazinė grandininė reakcija

Kiekybinė atvirkštinės transkriptazės polimerazinė grandininė reakcija (AT-kPGR) pasirinkta miRNR tyrimui audiniuose ir organizmo skysčiuose.

#### miRNR raiškos validavimas AT-kPGR metodu periodonto audiniuose.

Validavimo etape miRNR raiškos tyrimams periodonto audiniuose naudojamos pagal vartotojo užsakymą pagamintos mažo tankio *TaqMan* gardelės (*Customized TaqMan® Low Density Arrays, ABI, TFS*). Jomis vienu metu 8 mėginiuose galima tirti 16 miRNR raišką, atliekant po tris pakartojimus. AT-kPGR reakcija atliekama naudojant *TaqMan Universal Master Mix II, No AmpErase UNG (2×)* mišinį (*ABI, TFS*) ir remiantis gamintojo protokolu. Kiekvienam tiriamajam mėginiui yra ruošiamas atskiras reakcijos mišinys, kurių komponentai ir kiekis vienam mėginiui pateikti 2.5 lentelėje. Švelniai supurčius ir trumpai nucentrifugavus, 100 µL mišinio suleidžiama į paruoštos gardelės užpildymo rezervuarą pro mėginio įnešimui skirtą angelę ir centrifuguojama 2 min 2000 rpm greičiu. Užsandarintos gardelės patalpinamos į *ViiA™ 7 Real-Time* sistemą ir, naudojant *ViiA™ 7 Software v1.2* programinę įrangą (viskas iš *ABI, TFS*), numatytomis sąlygomis paleidžiama reakcijos vykdymo programa (2.7 lentelė).

### 2.5 lentelė. AT-kPGR reakcijos mišinį sudarantys komponentai ir jų kiekis vienai reakcijai

Komponentas	Tūris (µL)
2× <i>TaqMan Universal Master Mix II, No UNG</i> reakcijos mišinys	56,25
kDNR	0,90
Vanduo be nukleazių	55,35
<b>Bendras tūris</b>	<b>112,50</b>



**miRNR tyrimas AT-kPGR metodu seilėse ir kraujo plazmoje.** miRNR-145, -140-3p, -195, -146a tyrimui kūno skysčiuose naudojami pradmenų ir zondų mišiniai *TaqMan*<sup>TM</sup> *MicroRNA Assays*, laikantis gamintojo protokolo. Kiekviena miRNR tiriama atliekant tris pakartojimus. Taršos nustatymui naudojama kontrolė, kai vietoj mėginio įnešamas vanduo (angl. *no-template control*, *NTC*). Iš 2.6 lentelėje pateiktų komponentų paruoštas mišinys gerai sumaišomas ir trumpai nucentrifuguojamas. Į kiekvieną numatytą plokštelės šulinėlį įnešama 8,67 μL reakcijos mišinio ir 1,33 μL kDNR arba, *NTC* atveju, vandens. Užsandarinatos plokštelės supurtomos ir centrifuguojamos 2 min 2000 rpm greičiu. Amplifikacijos sąlygos sutampa su aprašytais ankstesniame etape, ciklų skaičių pradmenų ir zondų prijungimo ir ilginimo žingsnyje padidinant iki 50 (2.7 lentelė).

**2.6 lentelė.** AT-kPGR reakcijos mišinį sudarantys komponentai ir jų kiekiai vienai reakcijai

Komponentas	Tūris (μL)
PGR reakcijos mišinys	5,00
Vanduo be nukleazių	3,17
20× <i>TaqMan</i> pradmenų ir zondų mišinys	0,50
<b>Bendras tūris</b>	<b>8,67</b>

**2.7 lentelė.** AT-kPGR reakcijos etapai ir temperatūrinė programa

Etapas	Temperatūra (°C)	Trukmė (min)
<i>Taq</i> polimerazės aktyvinimas	50	2
Denatūracija	95	10
Pradmenų ir zondų prijungimas ir ilginimas (40 ciklų)	95	¼
	60	1

### 2.2.6. Statistinė analizė

Visuminės miRNR raiškos analizės pradinių duomenų apdorojimas, normalizavimas, filtravimas ir tolimesnė duomenų statistinė analizė atlikta naudojantis *GeneSpring GX v14.9* (AT) programine įranga. Statistiniam palyginimui taikytas nepriklausomų imčių t-kriterijaus testas. Skirtumai laikyti statistiškai reikšmingais, kai P-reikšmė buvo  $\leq 0,050$ , o raiškos pokytis kartais (angl. *fold change*, *FC*) –  $\geq 1,5$ .

AT-kPGR duomenų analizei naudota *GenEx v7.0* (*MultiD Analysis AB, Göteborg, Sweden*) programinė įranga. Organizmo skysčių tyrime pradiniai duomenys buvo papildomai

normalizuojami pagal sintetinę kontrolę – cel-miR-39. Normalizuoti ir į logaritminę skalę ( $\log_2$ ) konvertuoti įverčiai buvo analizuojami  $\Delta\Delta Ct$  metodu. miRNR raiškos ir kiekio analizei tarp tiriamųjų grupių bei pagal klinikinius-patologinius, tiriamąją ligą modifikuojančius ir demografinius rodiklius taikytas t testas. Skirtumai laikyti statistiškai reikšmingais, kai P-reikšmė buvo  $\leq 0,050$ , o FC  $\geq 1,5$ .

Diagnostinis atrinktų miRNR potencialas buvo vertinamas atliekant ROC (angl. *receiver operating characteristic*) kreivių analizę, apskaičiuojant jautrumą, specifiškumą bei plotą po kreive AUC (angl. *area under the ROC curve*). Analizė atlikta naudojant *GraphPad Prism v8.4.2* (*GraphPad Software, Inc., San Diego, CA*) programinę įrangą.

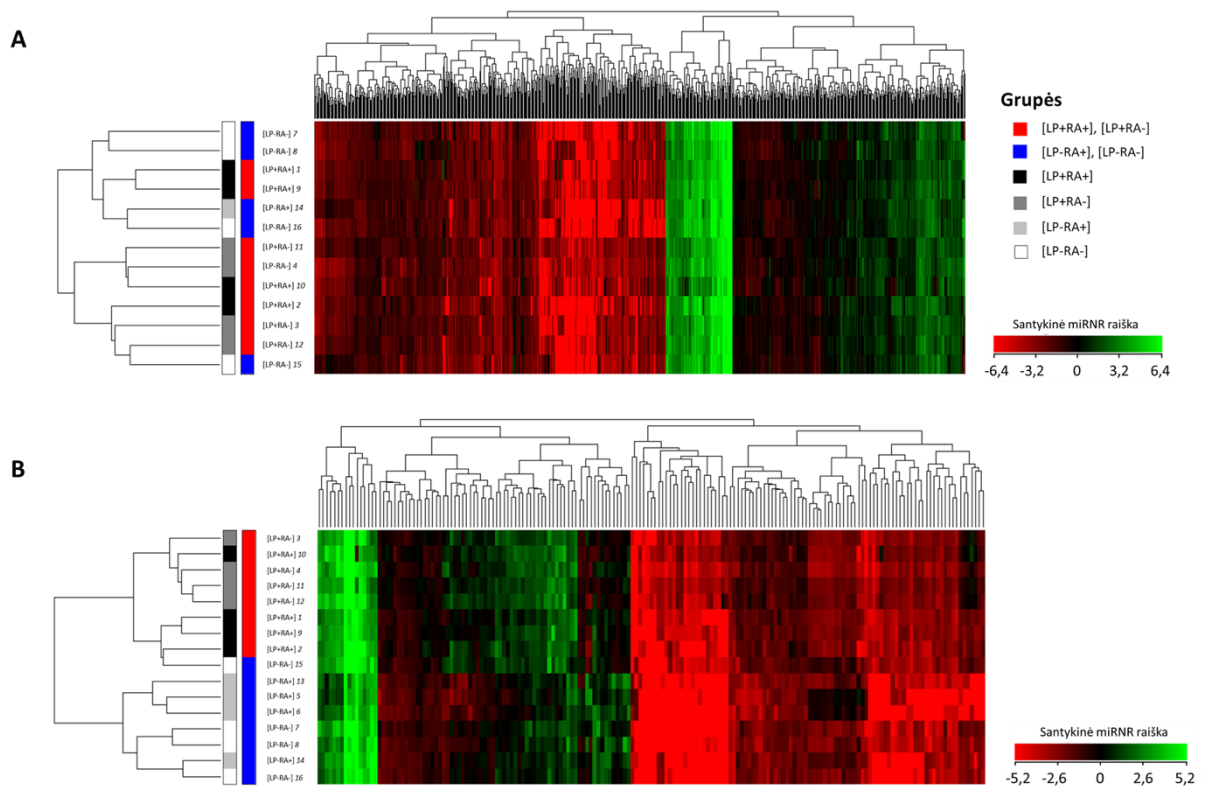
Rezultatų skyriuje pateiktos iliustracijos parengtos naudojantis *GeneSpring GX v14.9* ir *GraphPad Prism v8.4.2* programinių įrangų paketais.

### 3. REZULTATAI

#### 3.1 Visuminis miRNR raiškos tyrimas periodonto audiniuose

Visuminei miRNR raiškos profilio analizei mikrogardelėmis buvo pasirinkti 16 mėginių iš keturių tiriamųjų grupių: 4 [LP+RA+], 4 [LP+RA-], 4 [LP-RA+] ir 4 [LP-RA-] (2.1 pav. 2.1 skyrius). Pradinis duomenų apdorojimas ir filtravimas atliktas remiantis numatytaisiais *GeneSpring GX v14.9* programos parametrais. Normalizavimui pritaikius 80-o procentilio metodą ir dėl per mažos raiškos periodonto audiniuose iš analizės pašalinus dalį tirtų miRNR, iš 2570 mikrogardelėmis tirtų miRNR tolimesnei analizei buvo naudojamos 1254 (48,8 %). Iš jų 544 (43,4 %) miRNR raiška buvo užfiksuota visuose tiriamuosiuose mėginiuose. Atfiltravus tik tas, kurių raiška vyko  $\geq 25$  % mėginių, toliau buvo analizuojamos 760 (60,6 %) miRNR (3.1 pav. A). Jų raiškos pokyčiai buvo:

- i. lyginami tarp pagrindinių aukščiau nurodytų **tiriamųjų – LP ir/ar RA sergančių ir sveikų asmenų grupių**;
- ii. nagrinėjami ieškant sąsajų su **LP klinikiniais-patologiniais rodikliais** (periapikaliųjų kaulinės destruktijos židinių buvimas, netektų/pašalintų dantų skaičius);
- iii. nagrinėjami ieškant sąsajų su **LP moduluojančiais veiksniais** (RA rodikliai: sergamumas RA, DAS28, terapijos nuo RA taikymas, vitamino D koncentracija, vitamino D papildų vartojimas, KMI; kiti rodikliai: rūkymas, alkoholio vartojimas, kasdienė burnos priežiūra);
- iv. nagrinėjami pagal **demografinius rodiklius** (lytis, amžius).



**3.1 pav.** miRNR raiškos profilis lėtiniu periodontitu (LP) ir/ar reumatoidiniu artritu (RA) sergančių (+) ir nesergančių (-) ligonių periodonto audiniuose. miRNR raiškos profilis, gautas po pradinio duomenų apdorojimo, tolimesnėje analizėje naudojant tik tas miRNR, kurių raiška buvo pakankamai aukšta ir nustatyta  $\geq 25$  % mėginių ( $N = 760$ ) (A); miRNR raiškos profilis, gautas palyginus LP+ vs. LP- atvejus ( $N = 177$ ) ( $FC \geq 1,5$ ;  $P \leq 0,050$ ) (B)

### i. miRNR raiškos palyginimas tarp tiriamųjų grupių

**[LP+] vs. [LP-].** Analizuojant miRNR raiškos skirtumus tarp LP sergančių ir nesergančių asmenų periodonto audinių, nustatytos 177 statistiškai reikšmingai pakitusios raiškos miRNR: 140 – padidėjusios ir 37 – sumažėjusios raiškos (3.1 pav. B). Iš 140 reikšmingai padidėjusios raiškos miRNR, 9 (miR-378c, -30c-2-3p, -3609-3p ir kt.) raiška LP+ audiniuose buvo išaugusi  $>10$  kartų. Likusių miRNR (miR-140-3p, -6809-5p, -1236-5p, -145-5p, -195-5p, -146a-5p, -575, -1304 ir kt.) raiškos pokytis kartais LP+ audiniuose buvo apie 3,2, palyginus su LP nepaveiktais audiniais. Iš 37 sumažėjusios raiškos miRNR (miR-1246, -4788, -197-5p, -210-3p ir kt.) labiausiai išsiskyrė miR-3065-3p, kurios raiška LP sergančių asmenų audiniuose buvo sumažėjusi daugiau nei 19 kartų, lyginat su periodontologiškai sveikų pacientų audiniais.

**[LP+RA-] vs. [LP-RA-].** Palyginus tik LP sergančių ir sveikų asmenų audinius, buvo nustatytos 118 statistiškai reikšmingai pakitusios raiškos miRNR, iš kurių 77 buvo

padidėjusios ir 41 – sumažėjusios raiškos. Trylikai (miR-378c, -450a-5p, -30c-2-3p, -3192-3p ir kt.) iš 77 padidėjusios raiškos miRNR buvo būdinga apie 10 kartų išaugusi raiška pažeistuose audiniuose. Didžiosios dalies (miR-197-5p, -4788, -141-3p ir kt.) iš 41 nustatytos sumažėjusios raiškos miRNR raiška sumažėjo apie 3,5 karto ir tik 4 miRNR (miR-1246, -210-3p ir -375) daugiau nei 4 kartus. Iš jų labiausiai išsiskyrė miR-375, kurios raiška LP pažeistuose audiniuose buvo sumažėjusi > 33 kartus.

## **ii. miRNR raiškos sąsajos su LP klinikiniais-patologiniais rodikliais**

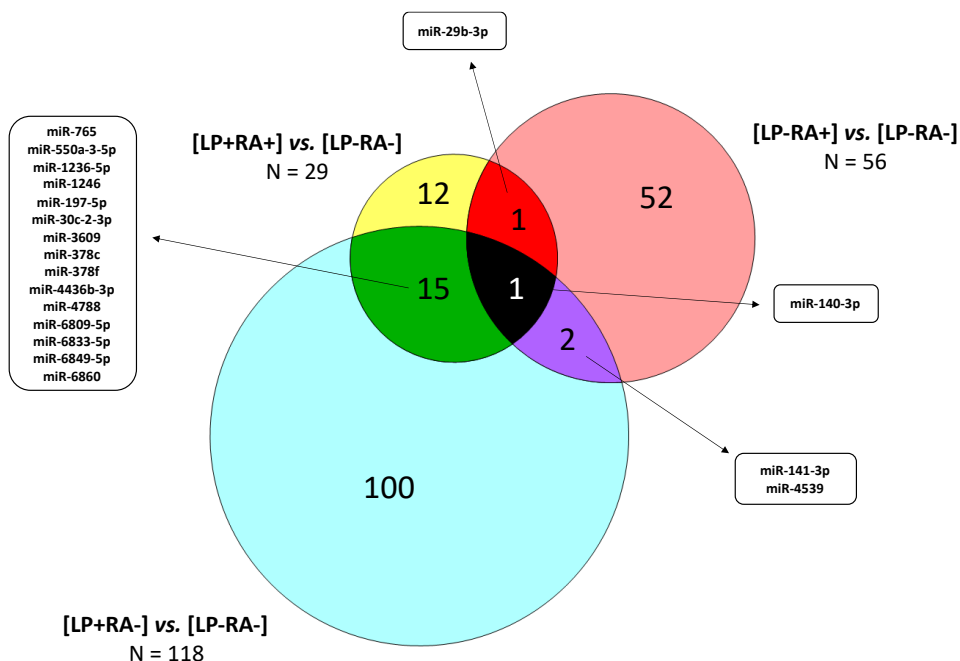
Asmenų, kuriems nustatyti periapikaliniai kaulinės destrukcijos židiniai, audiniuose buvo identifikuota 76 statistiškai reikšmingai pakitusios raiškos miRNR, iš kurių 19 (miR-3616-3p, -572, -3192-3p ir kt.) – padidėjusios ir 57 – sumažėjusios raiškos miRNR. Pastebėta, kad tų pačių 7 miRNR (miR-1228-3p, -1304-3p, -425-3p, -6069, -191-3p ir kt.) raiškos sumažėjimas nustatytas ir LP+ vs. LP- grupių palyginime. Įvertinus netektų dantų skaičiaus sąsają su miRNR raiška, nustatyta, kad asmenų, netekusių 6 ir daugiau dantų, periodonto audiniuose buvo 94 pakitusios raiškos miRNR, iš kurių 72 – padidėjusios ir 22 – sumažėjusios raiškos, palyginus su asmenimis, kurie buvo netekę iki 6 dantų. Pastebėta, kad 22 miRNR (miR-140-3p, -1273g-3p, -378c, -30c-2-3p, -6809-5p, -1236 ir kt.) raiška buvo padidėjusi ir [LP+] vs. [LP-] ir [LP+RA-] vs. [LP-RA-] lyginamosiose grupėse.

## **iii. LP moduliuojančių veiksnių įtaka miRNR raiškai**

**Sergamumo RA įtaka miRNR raiškai.** Atlikus [LP-RA+] vs. [LP-RA-] tiriamųjų grupių palyginimą, iš 56 nustatytų pakitusios raiškos miRNR, 6 buvo padidėjusios ir 50 – sumažėjusios raiškos. 2 iš 6 išaugusios raiškos miRNR (miR-4701-5p ir -6836-3p) raiška RA sergančiųjų audiniuose buvo padidėjusi daugiau negu 10 kartų. Dvylika (miR-4487, -4476, -6836-3p ir kt.) iš 50 sumažėjusios raiškos miRNR buvo  $\geq 10$  kartų sumažėjusios raiškos RA sergančiųjų mėginiuose.

[LP+RA+] vs. [LP-RA-]. Palyginus miRNR raišką tarp LP bei RA sergančių ir sveikų asmenų audinių, nustatyta 29 statistiškai reikšmingai pakitusios raiškos miRNR: 22 – padidėjusios ir 7 – sumažėjusios raiškos. Penkių iš padidėjusios raiškos miRNR (miR-378c, -3609, -30c-2-3p ir kt.) raiška buvo išaugusi > 9 kartus, o likusių (miR-765, -550a-3-5p, -4306 ir kt.) – apie 2-3 kartus. Iš nustatytų sumažėjusios raiškos miRNR, išsiskyrė miR-3065-3p, kurios raiška abejomis ligomis sergančiųjų audiniuose buvo sumažėjusi > 11 kartų.

Tarp trijų pagrindinių lyginamųjų grupių ([LP+RA-] vs. [LP-RA-], [LP-RA+] vs. [LP-RA-] ir [LP+RA+] vs. [LP-RA-]) identifikuota viena ta pati statistiškai reikšmingai pakitusios raiškos miRNR – miR-140-3p. Be to, 15 tų pačių statistiškai reikšmingai pakitusios raiškos miRNR nustatyta tarp [LP+RA-] vs. [LP-RA-] ir [LP+RA+] vs. [LP-RA-], 2 miRNR tarp [LP+RA-] vs. [LP-RA-] ir [LP-RA+] vs. [LP-RA-] bei 1 tarp [LP-RA+] vs. [LP-RA-] ir [LP+RA+] vs. [LP-RA-] lyginamųjų grupių. Tarp lyginamųjų grupių pasikartojančios miRNR nurodytos 3.2 paveiksle.



**3.2 pav.** Statistiškai reikšmingai besiskiriančios raiškos miRNR, nustatytos tarp trijų lyginamųjų grupių pagal lėtinio periodontito (LP) reumatoidinio artrito (RA) statusą, kur „+“ vaizduoja sergančius, o „-“ nesergančius asmenis.

**Sąsajos su RA rodikliais.** Remiantis palyginimu pagal DAS28 ligos aktyvumo rodiklį, aktyvia RA ligos forma sergančių asmenų grupės audiniuose nustatytos 37 pakitusios raiškos miRNR: 16 (miR-182-5p, -6855-5p, -660-5p ir kt.) padidėjusios ir 21 (miR-4425, -5006-5p, -2392 ir kt.) sumažėjusios raiškos miRNR, palyginus su neaktyvia RA forma sergančiais asmenimis. Palyginus asmenis, kuriems taikytas gydymas nuo RA su nesigydyusių tiriamųjų grupe, nustatyta 56 pakitusios raiškos miRNR, iš kurių 3 (miR-338-3p, -223-3p ir -582-5p) buvo padidėjusios ir 53 – sumažėjusios raiškos. Tų pačių 4 (miR-1972, -1207-5p, -4487, -4476) miRNR raiškos sumažėjimas nustatytas ir [LP-RA+] vs. [LP-RA-] lyginamojoje grupėje. Vitamino D trūkumu pasižyminčių asmenų audiniuose nustatyta 57 pakitusios (24 – padidėjusios ir 33 – sumažėjusios) raiškos miRNR, palyginus su tiriamaisiais, kurių vitamino D koncentracija kraujyje buvo normos ribose. Be to, pastebėta,

kad padidėjusios raiškos miR-4701-5p buvo nustatyta ir [LP-RA+] vs. [LP-RA-] lyginamojoje grupėje. Vitamino D papildus vartojančių žmonių audiniuose nustatyta 45 pakitusios raiškos miRNR, iš kurių 28 raiška buvo padidėjusi, o 17 – sumažėjusi. Šiuo palyginimu nustatytų sumažėjusios raiškos miR-933 ir -711 [LP+RA-] vs. [LP-RA-] lyginamojoje grupėje buvo išaugusios raiškos, ir atvirkščiai, padidėjusios raiškos -6869-5p, -6089, -8063, -6125, minėtoje grupėje buvo sumažėjusios raiškos.

**Sąsajos su kitais veiksniais.** Nutukusių ar viršsvorį turinčių asmenų audiniuose nustatyta 19 statistiškai reikšmingai pakitusios raiškos miRNR: 18 padidėjusios ir 1 (miR-6724-5p) sumažėjusios raiškos miRNR, palyginus su optimalų svorį turinčiais asmenimis. Pastebėta priešinga 5 (miR-34a-3p, -34c-5p, -340-3p, -374c-5p ir -17-3p) miRNR raiškos pokyčių koreliacija, palyginus su [LP-RA+] vs. [LP-RA-] lyginamąja grupe: nutukusių ar antsvorį turinčių asmenų audiniuose nustatyta padidėjusi, o minėtoje lyginamojoje grupėje – sumažėjusi šių miRNR raiška. Palyginus miRNR raiškos skirtumus anksčiau rūkusių tiriamųjų audiniuose su niekada nerūkusių asmenų grupe, nustatytos 19 statistiškai reikšmingai pakitusios raiškos miRNR, iš kurių 17 buvo padidėjusios ir 2 (miR-4488 ir -5006-5p) – sumažėjusios raiškos. Iš 17 statistiškai reikšmingai padidėjusios raiškos miRNR, miR-4306, -185-5p, -652-3p ir -454-3p raiškos padidėjimas nustatytas ir [LP+] vs. [LP-] lyginamojoje grupėje. Alkoholį vartojančių (~1 kartą per mėnesį) tiriamųjų audiniuose nustatytos 26 reikšmingai pakitusios raiškos miRNR: 17 padidėjusios ir 9 (miR-4485-3p, -494-3p, -1249-5p ir kt.) sumažėjusios raiškos. miR-550a-3-5p raiškos padidėjimas nustatytas ir [LP+] vs. [LP-], [LP+RA-] vs. [LP-RA-] ir [LP+RA+] vs. [LP-RA-] lyginamosiose grupėse.

Analizuojant kasdienės burnos priežiūros įpročių įtaką miRNR raiškos profiliui, įvertinta miRNR raiška 1 kartą per dieną dantis valančių asmenų grupės audiniuose, palyginus su dantis dažniau ( $\geq 2$  kartus per dieną) valančių tiriamųjų audiniais. Iš viso nustatyta 13 (miR-1185-2-3p, -3188 ir kt.) statistiškai reikšmingai padidėjusios raiškos miRNR. Dantų siūlo kasdienėje burnos priežiūroje nenaudojančių asmenų audiniuose nustatytos 8 reikšmingai pakitusios raiškos miRNR, iš kurių 7 buvo padidėjusios ir 1 (miR-487b-3p) sumažėjusios raiškos. Statistiškai reikšmingas miR-4306, -185-5p ir -652-3p raiškos padidėjimas taip pat užfiksuotas [LP+] vs. [LP-] lyginamojoje grupėje. Pas odontologą rečiau ( $\leq 1$  kartą per metus) apsilankančių asmenų audiniuose nustatyta 14 reikšmingai padidėjusios raiškos miRNR, palyginus su dažniau ( $\geq 2$  kartus per metus) besilankančiais tiriamaisiais. Iš jų didžiausias, ~ 7 kartų, raiškos padidėjimas nustatytas miR-370-3p ir -3610 atveju. Be to, tos pačios miR-6785-5p raiškos padidėjimas pastebėtas ir [LP+] vs. [LP-] bei [LP+RA-] vs. [LP-RA-] lyginamosiose grupėse.

#### iv. miRNR raiškos sąsajos su demografiniais rodikliais

Atlikus miRNR raiškos pokyčių palyginimą atsižvelgiant į demografinius rodiklius, įvertinti skirtumai tarp lyčių ir amžiaus grupių. Tiriamųjų vyrų periodonto audiniuose nustatyta 23 pakitusios (20 padidėjusios ir 3 sumažėjusios raiškos miRNR). Statistiškai reikšmingai padidėjusi 17 miRNR (miR-630 -3917 -575, -6789-5p -3192-3p ir kt.) raiška nustatyta ir [LP+] vs. [LP-] palyginime. Iš 3 sumažėjusios raiškos miRNR labiausiai išsiskyrė miR-6775-3p ir miR-3176, kurių raiška vyrų audiniuose buvo sumažėjusi daugiau nei 30 kartų, palyginus su moterų grupe. Palyginus miRNR raišką pensinio amžiaus tiriamųjų su ikipensinio amžiaus asmenų grupės audiniais, nustatyta 76 pakitusios raiškos miRNR, iš kurių 45 buvo padidėjusios ir 31 – sumažėjusios raiškos. Tų pačių 37 miRNR (miR-30a-5p, -3198, -146a-5p, -145-5p -155-5p ir kt.) raiškos padidėjimas ir 10 (miR-197-5p, -933 ir -937-5p) sumažėjimas nustatytas ir [LP+] vs. [LP-] lyginamojoje grupėje.

Remiantis nustatytais miRNR raiškos pokyčiais tarp skirtingų tiriamųjų grupių ir jų vertinimu pagal LP klinikinius-patologinius rodiklius, tolesniam tyrimui didesnėje mėginių imtyje atrinktos 15 miRNR (miR-30a-5p, -125a-3p, -126, -140-3p, -145, -146a, -155, -195, -423-5p, -550a-3-5p, -575, -630, -765, -1273g-3p ir -3917).

#### 3.2 miRNR raiškos validavimas audiniuose ir miRNR atranka

Penkiolikos atrinktų miRNR raiška buvo analizuojama didesnėje, 80 periodonto audinių (24 [LP+RA+], 25 [LP+RA-], 6 [LP-RA+], 25 [LP-RA-]), imtyje, naudojant metodinėje dalyje aprašytą TLDA gardelių metodiką (žr. 2.2.5 sk.). Atrinktų miRNR raiškos periodonto audiniuose analizės duomenys buvo naudojami miRNR raiškos pokyčių palyginimui tarp tiriamųjų grupių bei vertinimui pagal LP klinikinius-patologinius rodiklius.

[LP+] vs. [LP-]. Palyginus miRNR raišką LP sergančiųjų audiniuose, iš 15 mikrogardelių analizėje atrinktų miRNR, 9 (miR-145-5p, -140-3p, -195-5p, -125, -146a, -575, -155, -550a-3-5p, -765 ir -1273g-3p) raiška buvo padidėjusi. Iš jų, statistiškai reikšmingi pokyčiai nustatyti miR-145-5p (FC = 1,4; P = 0,006) ir -140-3p (FC = 2,0; P < 0,001), o panaši pokyčių tendencija – miR-146a-5p ir -575 atveju (P > 0,050). Reikšmingai sumažėjusi raiška pastebėta miR-125a-3p (FC = -2,3; P = 0,001) ir -630 (FC = -1,8; P = 0,011) atveju. Atlikus [LP+RA-] vs. [LP-RA-] lyginamosios grupės palyginimą, nustatytos 8 padidėjusios raiškos miRNR, iš kurių didžiausiais raiškos pokyčiais pasižymėjo miR-145-5p (FC = 2,1; P < 0,001) ir -140-3p (FC = 1,4; P = 0,017). Panaši pokyčių tendencija pastebėta ir -575 ir -765 atveju (P > 0,050).

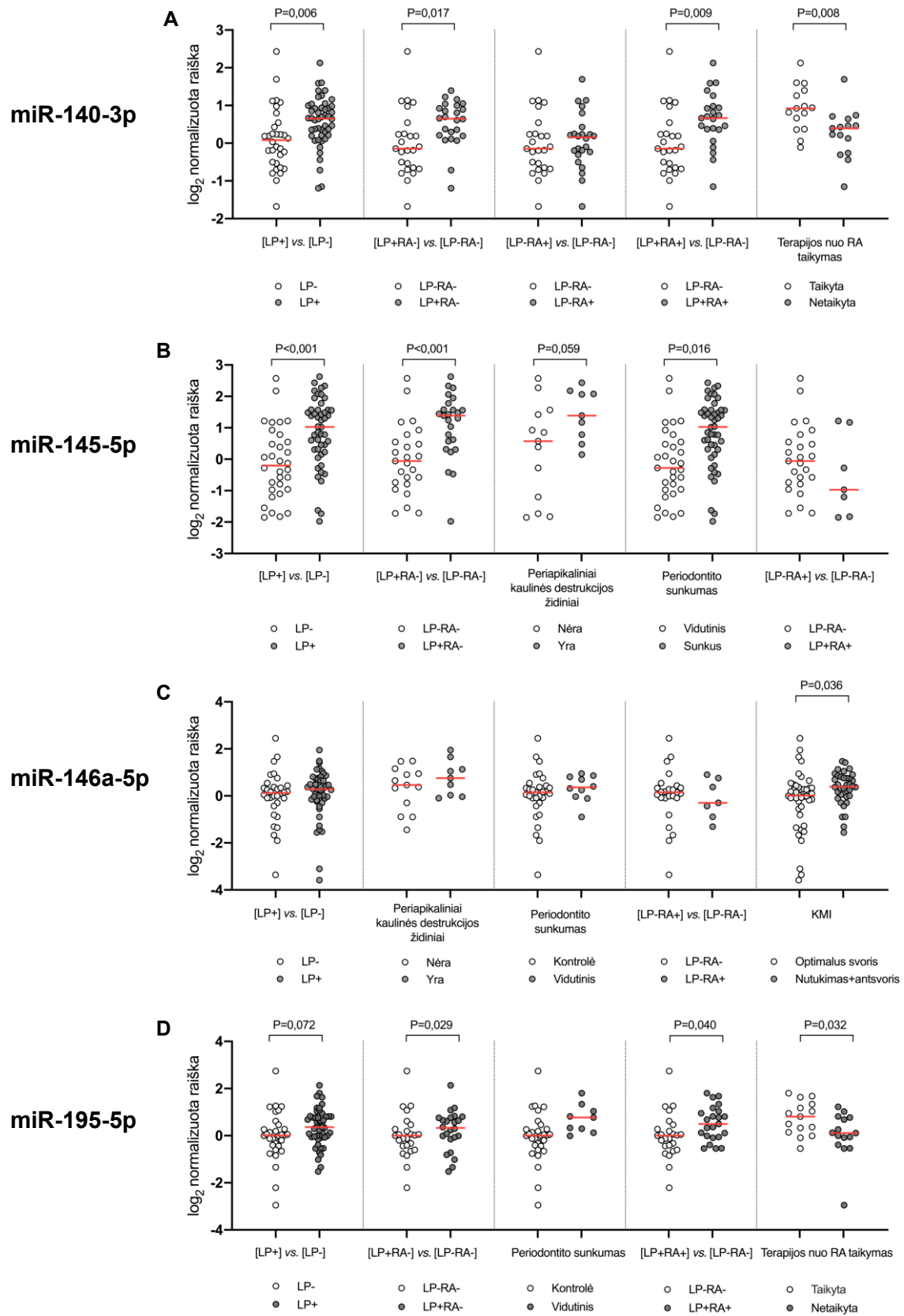


Įvertinus miRNR raiškos skirtumus pagal **LP klinikinius-patologinius rodiklius**, nustatyta, kad palyginus su vidutine, sunkia LP forma sergančių asmenų audiniams būdinga 2 kartus išaugusi miR-145-5p ( $P = 0,016$ ), -125a-3p ( $P > 0,050$ ), -765 ( $P > 0,050$ ) raiška, ir beveik tiek pat kartų sumažėjusi miR-3917 ( $P = 0,063$ ) ir miR-550a-3-5p ( $P > 0,050$ ) raiška. Palyginus miRNR raišką vidutine LP forma sergančių asmenų audiniuose su sveikų asmenų grupės audiniais, nustatyta apie 2 kartus reikšmingai išaugusi miR-195-5p ( $P = 0,029$ ) ir daugiau negu 3 kartus sumažėjusi -125a-3p ( $P = 0,015$ ) raiška. Panašus raiškos padidėjimas nustatytas ir miR-140-3p bei -550a-3-5p, o sumažėjimas -630 atveju, tačiau skirtumai nebuvo statistiškai reikšmingi. Įvertinus periapikalinių kaulinės destruktijos židinių buvimą, juos turinčių tiriamųjų grupėje nustatyta daugiau negu 2 kartus išaugusi miR-145-5p ( $P = 0,059$ ) raiška, tendencingas padidėjimas pastebėtas ir miR-126 ir -146a-5p atveju ( $P > 0,050$ ). Tuo tarpu miR-575 ( $P = 0,010$ ) ir -630 ( $P = 0,019$ ) raiška buvo maždaug tris, o miR-3917 ( $P = 0,054$ ) – du kartus sumažėjusi. Palyginus 6 ir daugiau dantų netekusių asmenų audinius su mažiau dantų netekusių asmenų audiniais, nustatytas tendencingas maždaug 2 kartų raiškos padidėjimas miR-1273g-3p, -miR-145-5p, -765 ( $P > 0,050$ ), maždaug tiek pat kartų sumažėjimas -30a-5p ( $P = 0,038$ ) ir apie 4 kartų sumažėjimas miR-125a-3p ( $P = 0,008$ ) atveju.

Šiame etape tirtų miRNR raiškos skirtumai buvo vertinami ir pagal LP ligą moduluojančius veiksnis. Pavyzdžiui, vertinant sergamumo RA įtaką miRNR raiškai, [**LP-RA+**] vs. [**LP-RA-**] lyginamojoje grupėje nustatyta apie 2 kartus išaugusi miR-550a-3-5p, -765, -140-3p ir tiek pat kartų sumažėjusi miR-155, -1273g-3p ir -575 raiška, tačiau skirtumai nebuvo statistiškai reikšmingi. [**LP+RA+**] vs. [**LP-RA-**] palyginimu nustatyta apie 2 kartus padidėjusi miR-140-3p ( $P = 0,009$ ), -195-5p ( $P = 0,040$ ), -145-5p ( $P = 0,057$ ) ir maždaug tiek pat kartų sumažėjusi miR-630 ( $P = 0,010$ ), -125-3p ( $P = 0,021$ ) ir -1273g-3p ( $P = 0,028$ ) raiška. Tiriamųjų, kuriems buvo taikyta terapija nuo RA, grupėje pastebėtas reikšmingas miR-140-3p (FC = 1,6;  $P = 0,008$ ), -550a-3-5p (FC = 2,0;  $P = 0,016$ ), -195-5p (FC = 1,6;  $P = 0,032$ ) raiškos padidėjimas ir miR-125-3p (FC = -2,5;  $P = 0,018$ ) raiškos sumažėjimas. Taip pat pastebėta, kad nutukusių ar antsvorį turinčių asmenų grupėje buvo apie 1,5 karto reikšmingai padidėjusi miR-146a-5p ( $P = 0,036$ ) ir tiek pat sumažėjusi miR-1273g-3p ( $P = 0,003$ ) raiška. Rūkančių asmenų audiniuose nustatyta daugiau negu 2 kartus statistiškai patikimai išaugusi miR-3917 ( $P = 0,024$ ) raiška. Palyginus su alkoholio nevartojančiais tiriamaisiais, vartojančių audiniuose nustatyta apie 1,5 karto reikšmingai išaugusi miR-1273g-3p ( $P = 0,044$ ) ir sumažėjusi -140-3p ( $P = 0,008$ ), -550a-3-5p ( $P = 0,010$ ) raiška. Įvertinus kasdienės burnos priežiūros įpročių įtaką miRNR raiškai, nustatyta, kad dantis mažiau kartų

per dieną valančių ir dantų siūlo nenaudojančių tiriamųjų audiniuose buvo tendencingai sumažėjusi miR-146a-5p ir -195-5p ir išaugusi miR-765 ir -145-5p raiška ( $P > 0,050$ ).

Remiantis išanalizuotais raiškos pokyčiais tarp svarbiausių tiriamųjų grupių bei įvertinus įvairių LP ligą moduluojančių veiksnių įtaką miRNR raiškai, tolimesniai tyrimai organizmo skysčiuose pasirinktos 4 miRNR: miR-140-3p (3.3 pav. A), -145-5p (3.3 pav. B), -146a-5p (3.3 pav. C), -195-5p (3.3 pav. D).



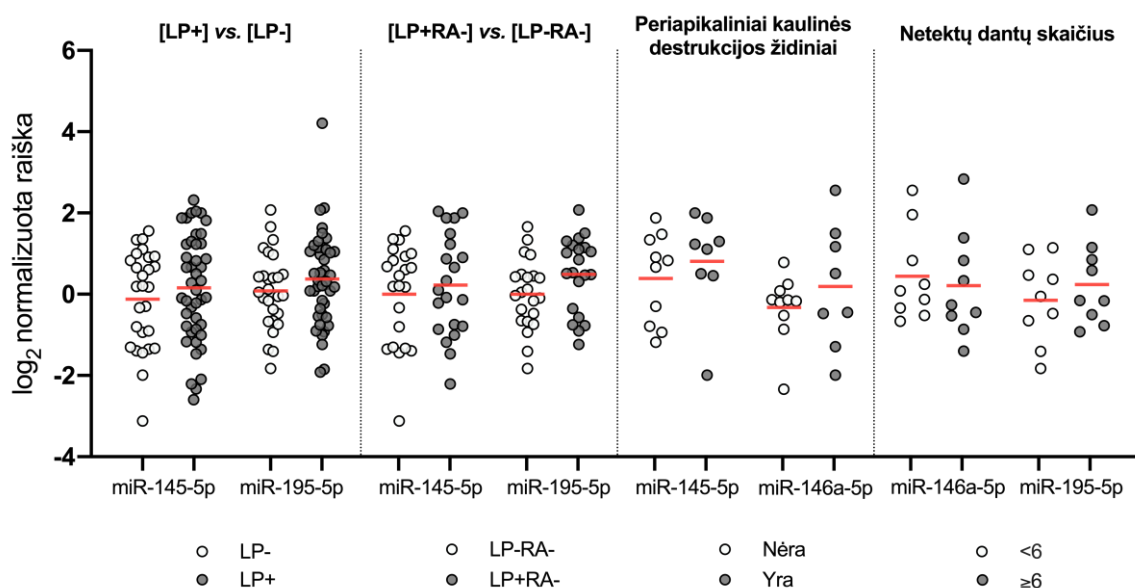
**3.3 pav.** Svarbiausi miR-140-3p (A), -145-5p (B), -146a-5p (C) ir -195-5p (D) raiškos skirtumai LP lyginamosiose grupėse ir pagal LP moduluojančius veiksnius. Raudoni brūkšniai žymi medianą.

### 3.3 Atrinktų miRNR analizė organizmo skysčiuose

Atrinktos miR-145-5p, -140-3p, -195-5p ir -146a-5p buvo tirtos keturiose grupėse – [LP+RA+], [LP+RA-], [LP-RA+], [LP-RA-]:

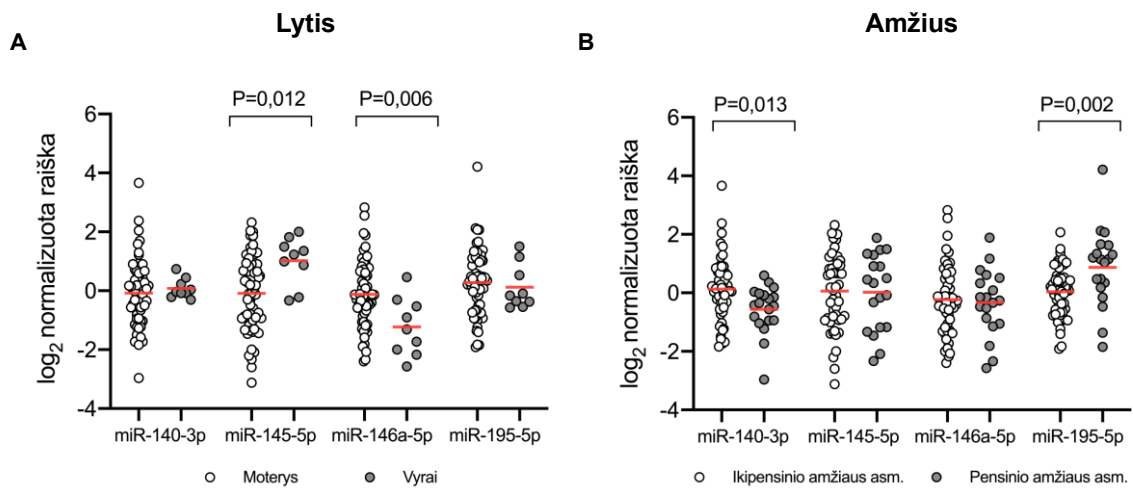
- 71 seilių (23, 21, 5, 22, atitinkamai) mėginiuose;
- 77 plazmos (24, 23, 6, 24, atitinkamai) mėginiuose.

**miRNR analizė tiriamųjų seilėse.** Atlikus tiriamųjų grupių pagal sergamumą LP ir/ar RA palyginimą, statistiškai reikšmingai pakitusių miRNR nustatyta nebuvo, tačiau daugelyje jų pastebėtas ženklus miR-195-5p ir miR-145-5p padidėjimas. Nors reikšmingų sąsajų su LP klinikiniais-patologiniais rodikliais taip pat nenustatyta, tačiau pastebėta, kad asmenų, kuriems buvo nustatyti periapikaliniai kaulinės destruktijos židiniai, audiniuose buvo didesnis kiekis miR-146a-5p ir -145-5p. Šešių ir daugiau dantų netekusių tiriamųjų grupėje nustatytas seilių miR-195-5p padidėjimas ir -146a-5p sumažėjimas, palyginus su mažiau dantų netekusiais asmenimis. (3.4 pav.).



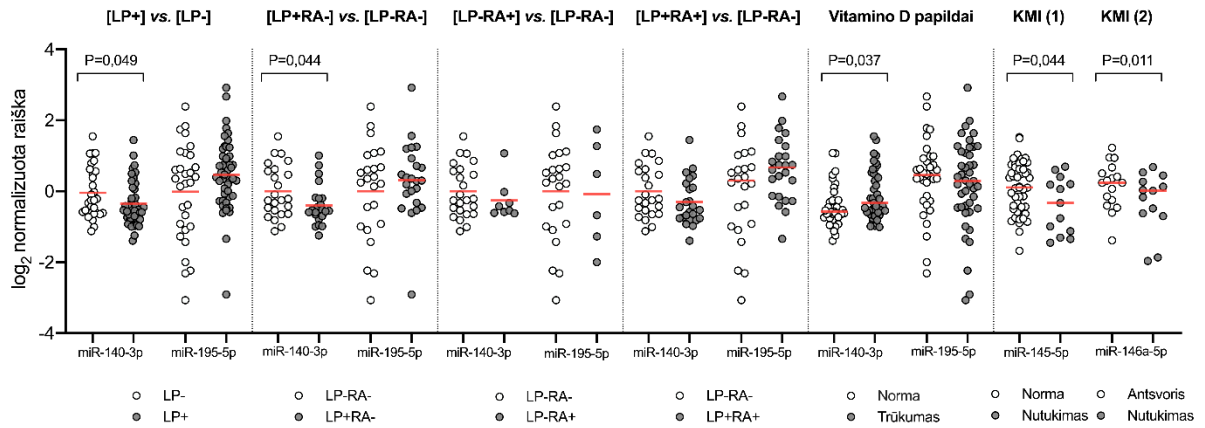
**3.4 pav.** Seilėse cirkuliuojančių miR-145-5p, -195-5p ir -146a-5p skirtumai LP lyginamosiose grupėse ir pagal klinikinius-patologinius rodiklius. Raudoni brūkšniai žymi vidurkį.

Statistiškai reikšmingi pokyčiai rasti atlikus palyginimą pagal tam tikrus demografinius rodiklius. Vyrų grupėje nustatyti sumažėjęs miR-146a-5p (FC = -2,16; P = 0,006) ir padidėjęs miR-145-5p (FC = 2,16; P = 0,012) kiekis (3.5 pav. A). Taip pat, palyginus su ikipensinio amžiaus tiriamaisiais, pensinio amžiaus vyrų (≥ 63 m.) ir moterų (≥ 62 m.) grupėje nustatyta daugiau miR-195-5p (FC = 1,78; P = 0,002), bet mažiau miR-140-3p (FC = -1,62; P = 0,013) (3.5 pav. B).



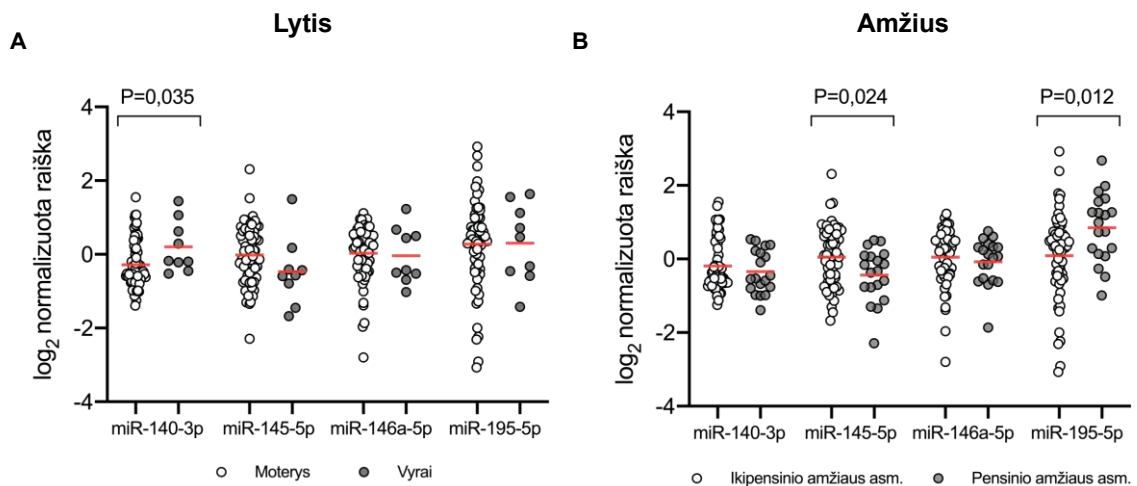
**3.5 pav.** Tirtų miRNR kiekio palyginimas seilių mėginiuose pagal tiriamųjų lytį (A) ir amžių (B). Juodas brūkšnyas dėžutėse ir raudonas brūkšnyas sklaidos diagramoje žymi medianą.

**miRNR analizė tiriamųjų plazmoje.** Tarp dviejų pagrindinių LP lyginamųjų grupių ([LP+] vs. [LP-] ir [LP+RA-] vs. [LP-RA-]) nustatytas statistiškai reikšmingas miR-140-3p kiekio sumažėjimas ( $P < 0,050$ ) bei tendencingas miR-195-5p ( $P > 0,050$ ) kiekio padidėjimas. Reikšmingų sąsajų su LP ligos klinikiniais-patologiniais rodikliais, taip pat kaip ir tiriant seiles, nustatyta nebuvo. Tendencingas miR-140-3p kiekio sumažėjimas taip pat nustatytas [LP-RA+] vs. [LP-RA-] ir [LP+RA+] vs. [LP-RA-] grupėse ( $P > 0,050$ ). Plazmos miR-195-5p kiekis [LP-RA+] vs. [LP-RA-] lyginamojoje grupėje buvo sumažėjęs, o [LP+RA+] vs. [LP-RA-] – padidėjęs ( $P > 0,050$ ). Tuo tarpu, vitamino D papildus vartojančių asmenų plazmos mėginiuose nustatytas nežymiai padidėjęs miR-140-3p ( $FC = -1,24$ ;  $P = 0,037$ ) bei sumažėjęs miR-195-5p ( $P > 0,050$ ) kiekis, palyginus su tokių papildų nevartojančiais tiriamaisiais. Nutukusių asmenų plazmos mėginiuose nustatytas ~ 1,5 karto mažesnis miR-145-5p ( $P = 0,044$ ) kiekis, palyginus su optimalaus svorio tiriamaisiais. Be to, šioje grupėje pastebėtas miR-195-5p kiekio padidėjimas ( $P > 0,050$ ). Panašūs pokyčiai nustatyti palyginus nutukusių asmenų plazmos mėginius su atsvarių turinčių asmenų grupe – m nustatytas sumažėjęs miR-146a-5p ( $FC = -1,51$ ;  $P = 0,011$ ) ir padidėjęs -195-5p ( $P > 0,050$ ) kiekis (3.6 pav.)

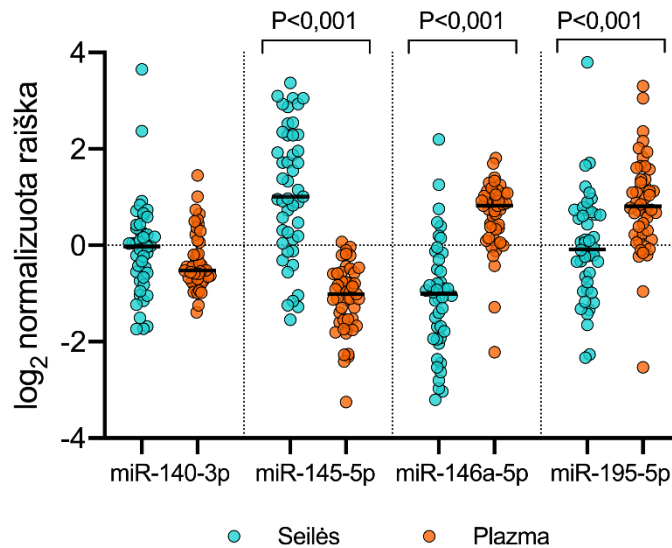


**3.6 pav.** Tirtų plazmos miRNR kiekio skirtumai LP lyginamosiose grupėse ir pagal LP ligą moduluojančius veiksnius. Raudoni brūkšniai žymi vidurkį.

Įvertinus miRNR pokyčių sąsajas su demografiniais rodikliais, vyrų plazmos mėginiuose nustatyta apie 1,5 karto daugiau miR-140-3p ( $P = 0,035$ ) (3.7 pav. A). Kaip ir seilių atveju, pensinio amžiaus tiriamųjų plazmos mėginiuose nustatytas miR-195-5p kiekio padidėjimas ( $FC = 1,69$ ;  $P = 0,012$ ) ir miR-145-5p sumažėjimas ( $FC = -1,40$ ;  $P = 0,024$ ) (3.7 pav. B). Statistiškai reikšmingas miR-140-3p kiekio padidėjimas nustatytas ir tarpdančių siūlo kasdienėje burnos higienoje nenaudojančių asmenų grupėje ( $FC = 1,25$ ;  $P = 0,043$ ).



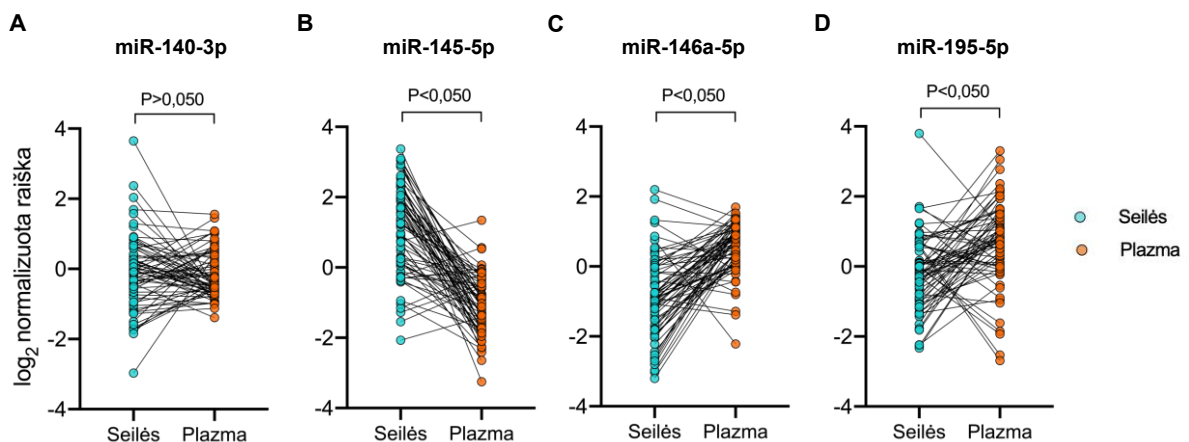
**3.7 pav.** Tirtų miRNR kiekio palyginimas plazmos mėginiuose pagal tiriamųjų lytį (A) ir amžių (B). Juodas brūkšnys dėžutėse ir raudonas brūkšnys sklaidos diagramoje žymi medianą.



**3.8 pav.** Tirtų miRNR kiekio skirtumai tarp seilių ir plazmos mėginių. Juodi brūkšniai žymi medianą.

**miRNR analizė seilėse ir kraujo plazmoje.** Palyginus su seilių mėginiais, plazmoje miR-146a-5p ( $P < 0,001$ ) ir -195-5p ( $P < 0,050$ ) buvo 2,2 kartus daugiau, o miR-145-5p – 4,4 kartus mažiau ( $P < 0,001$ ) (3.8 pav.).

Palyginus analizuojamų miRNR raišką tų pačių tiriamųjų seilių ir plazmos mėginiuose, miR-140-3p (3.9 pav. A) atveju statistškai reikšmingų skirtumų nenustatyta ( $P > 0,050$ ), tuo tarpu miR-145-5p (3.9 pav. B), -146a-5p (3.9 pav. C) ir -195-5p (3.9 pav. D) atveju skirtumai tarp tiriamųjų mėginių buvo statistškai reikšmingi ( $P < 0,050$ ).



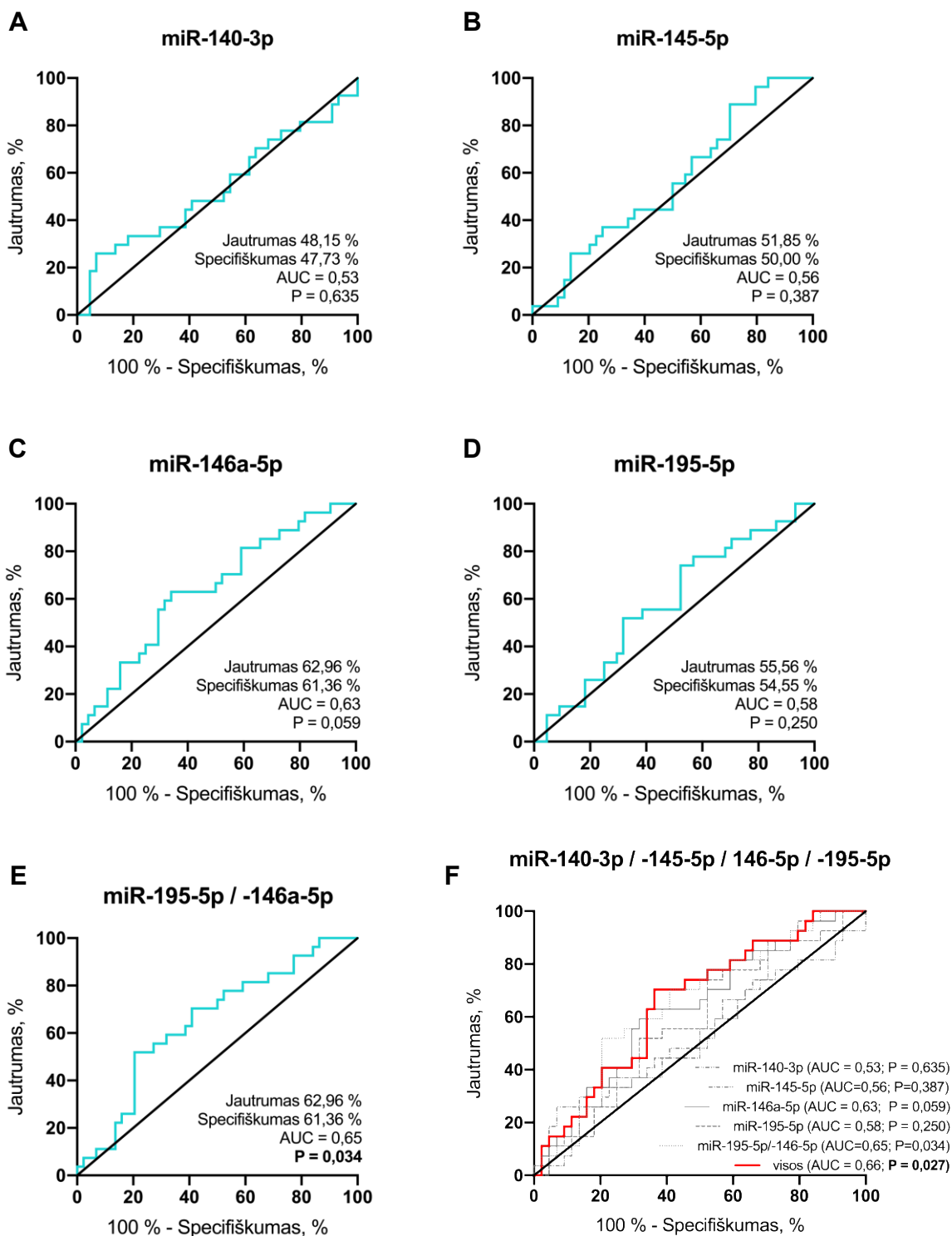
**3.9 pav.** miR-140-3p (A), -145-5p (B), -146a-5p (C) ir -195-5p (D) kiekio skirtumų palyginimas tarp tų pačių tiriamųjų seilių ir plazmos mėginių.

### 3.4 Diagnostinio miRNR potencialo vertinimas

Kiekvienos iš tirtų miRNR diagnostinis potencialas buvo vertinamas ROC analize, apskaičiuojant plotą po ROC kreive bei įvertinant miRNR jautrumą ir specifiškumą atskirai seilių ir plazmos mėginių imtyse.

Vertinant kiekvienos seilių miRNR (3.10 pav. A-D) diagnostinį potencialą atskirai, didžiausia AUC reikšmė ir jautrumo bei specifiškumo rodikliais pasižymėjo miR-146a-5p (AUC = 0,63; 62,96 % ir 61,36 %, atitinkamai) (3.10 pav. C). Diagnostinė šios miRNR vertė pagerinta prijungus miR-195-5p (kombinacijos AUC = 0,65) (3.10 pav. E). Didžiausiu diagnostiniu potencialu pasižymėjo visų 4 tiriamųjų miRNR kombinacija (AUC = 0,66; P = 0,027) (3.10 pav. F).

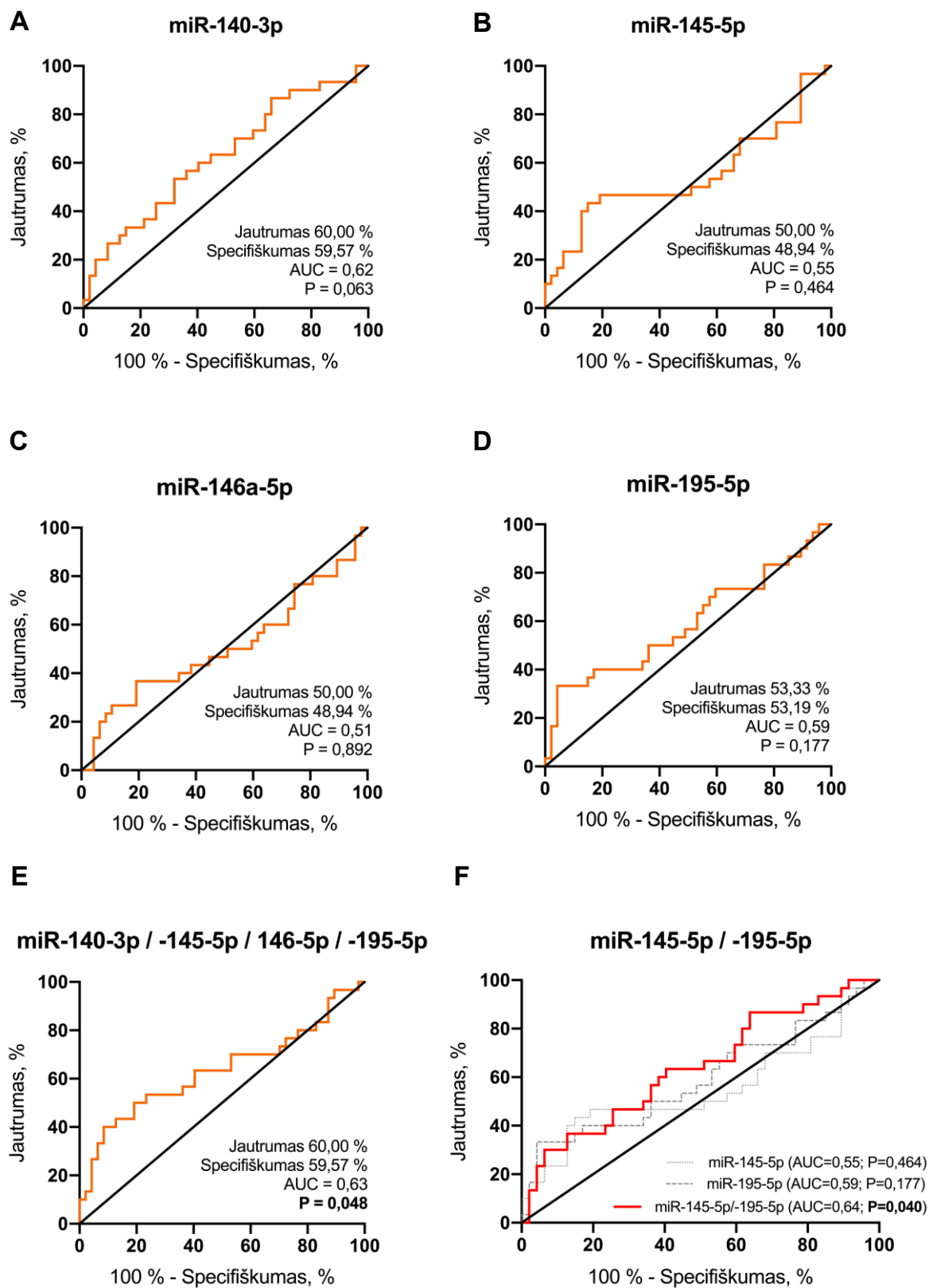




**3.10 pav.** Seilėse cirkuliuojančių miRNR ROC kreivių analizė: miR-140-3p (A), -145-3p (B), -146a-5p (C), -195-5p (D), -195-5p/-146a-5p (E), -140-3p/-145-3p/-146a-5p/-195-5p (F); AUC – plotas po kreive (angl. *area under the ROC curve*)

Iš 4 plazmos miRNR (3.11 pav. A-D) didžiausia AUC reikšmė nustatyta miR-140-3p (AUC = 0,62) atveju (3.11 pav. A), didžiausia specifiškumo vertė pasižymėjo miR-195-5p (53,19 %) (3.11 pav. D), o jautrumo – miR-140-3p (60,00 %) (3.11 pav. A). Apjungus visas 4 miRNR, nustatyta didesnė AUC reikšmė nei kiekvienos miRNR atskirai atveju (AUC = 0,63;

P = 0,048) (3.11 pav. E). Didžiausias diagnostinis potencialas nustatytas miR-145-5p ir miR-195-5p kombinacijai (AUC = 0,64; P = 0,040) (3.11 pav. F).



**3.11 pav.** Plazmoje cirkuliuojančių miRNR ROC kreivių analizė: miR-140-3p (A), -145-3p (B), -146a-5p (C), -195-5p (D), -140-3p/-145-3p/-146a-5p/-195-5p (E), -145-5p/-195-5p (F); AUC – plotas po kreive (angl. *area under the ROC curve*)

#### 4. REZULTATŲ APTARIMAS

Lėtinis periodontitas (LP) yra plačiai paplitusi danties atraminius audinius pažeidžianti uždegiminė liga, pasireiškianti periodonto jungties ir alveolinio kaulo nykimu. Nustatyta, kad šia liga serga 20-50 % pasaulio populiacijos, o negydomas LP padidina tikimybę kitų sisteminių ligų, tokių kaip kvėpavimo takų, širdies ligos, reumatoidinis artritas (RA), diabetas, vėžys, išsivystymo riziką. Šiuo metu klinikinėje praktikoje taikomi diagnostiniai metodai yra pasenę, leidžiantys nustatyti tik jau pažengusią ligą, todėl LP sergančiųjų skaičius vis didėja. Ankstesnis šios ligos diagnozavimas įgalintų sustabdyti ligos progresavimą dar neatsiradus negrįžtamiems pokyčiams periodonto audiniuose. Ypač didelis dėmesys potencialių molekulinę LP ligos biožymenų paieškoje skiriamas trumpoms, baltymų nekoduojančioms miRNR, kurių reikšmė LP ligai tirta ir šiame darbe. Išanalizavus miRNR raišką periodonto audiniuose, seilėse ir kraujo plazmoje, nustatyti statistiškai reikšmingi pokyčiai, potencialiai galėsiantys būti pritaikyti diagnostinių metodų ankstyvam LP ligos nustatymui kūrime.

**miRNR raiškos pokyčiai periodonto audiniuose.** Šiame tyrime, siekiant iširti miRNR raiškos profilį periodonto audiniuose, atlikta visuminė miRNR raiškos analizė, kuria nustatyti keturių miRNR (miR-140-3p, -145-5p, -146a-5p ir -195-5p) raiškos skirtumai buvo validuoti atvirkštinės transkriptazės PGR (AT-kPGR) metodu. Tyrimas parodė, kad **miR-140-3p** raiška buvo reikšmingai padidėjusi daugelyje pagrindinių LP lyginamųjų grupių bei vidutinio sunkumo LP sergančių asmenų audiniuose, palyginus su sveikų tiriamųjų grupe. Panašų miR-140-3p raiškos padidėjimą LP pažeistuose dantenų audiniuose nustatė ir Stoecklin-Wasmer su kolegomis (Stoecklin-Wasmer ir kt., 2012). Kitų autorių tyrimai parodė, kad ši miRNR gali skatinti osteoblastų diferenciaciją reguliuodama Wnt ir TGF- $\beta$ 3 signalinius kelius (Liu ir kt., 2019; Fushimi ir kt., 2018). Reikšmingas raiškos pokytis taip pat nustatytas **miR-145-5p** atveju. Daugiau negu du kartus išaugusi šios miRNR raiška nustatyta tarp pagrindinių LP lyginamųjų grupių, taip pat sunkia LP ligos forma sergančių tiriamųjų audiniuose, palyginus su vidutine. Padidėjusi miR-145-5p raiška pastebėta ir tiriamųjų, kuriems buvo nustatyti periapikaliniai kaulinės destruktijos židiniai bei  $\geq 6$  dantų netekusių asmenų grupėje, tačiau skirtumai nebuvo statistiškai reikšmingi. miR-145-5p raiškos padidėjimas pažeistuose dantenų epitelio audiniuose buvo užfiksuotas ir Liu ir kt. tyrime. Autoriai nustatė, kad TNF- $\alpha$  skatina šios miRNR apoptotinį veikimą bei slopinamą poveikį ląstelių proliferacijai pažeistose dantenų epitelio ląstelėse (Liu ir kt., 2020). **miR-195-5p** raiškos padidėjimas nustatytas pagrindinėse LP sergančiųjų grupėse, be to pastebėta, kad maždaug 2 kartus išaugusi šios miRNR raiška reikšmingai skiria vidutinio LP sunkumo formą nuo kontrolinės grupės. Panašius pokyčius nustatė ir keletas kitų mokslinių grupių.

Pavyzdžiui, Chang su kolegomis, tyrinėdami ortodontinės apkrovos įtaką miRNR raiškai periodonto audiniuose, nustatė, kad tempimo jėgų veikiamuose audiniuose išaugusi miR-195-5p raiška slopino osteogeninę diferenciaciją (Chang *ir kt.*, 2017). Tuo tarpu Grünhagen su bendraautoriais nustatė, kad miR-195-5p reguliuoja osteoblastų diferenciacijoje svarbių genų raišką, o padidėjusi jos raiška sutrikdo kaulų morfogeninio baltymo funkcijas (Grünhagen *ir kt.*, 2015). LP pažeistuose audiniuose padidėjusia raiška išsiskyrė ir **miR-146a-5p**. Panašius šios miRNR raiškos pokyčius LP sergančiųjų dantenu audiniuose taip pat nustatė Motedayyen tyrėjų grupė (Motedayyen *ir kt.*, 2015) – miR-146a-5p raiškos padidėjimas nustatytas ir *P. gingivalis* lipopolisacharidų (LPS) paveiktoje pelių pirminėje B ląstelių kultūroje. Nustatyta, kad miR-146a-5p, reguliuodama NF-κB signaliniame kelyje dalyvaujančios kinazės IRAK1 raišką, slopina uždegiminių citokinų gamybą B ląstelėse, taip inhibuodama uždegiminius procesus periodonto audiniuose (Jiang *ir kt.*, 2018). Šios miRNR veikimą per minėtą signalinį kelią taip pat parodė Hung atliktas tyrimas. Nustatyta, kad miR-146a-5p, slopindama NF-κB signalinį kelią, skatina periodonto raiščio ląstelių diferenciaciją (Hung *ir kt.*, 2010). Taigi labiausiai padidėjusia raiška periodonto audiniuose pagrindinėse lyginamosiose ir blogesnę prognozę rodančių LP klinikinių-patologinių rodiklių grupėse pasižymėjusios miRNR LP vystymąsi gali veikti skirtingai – vienos skatina kaulinio audinio ardymo procesus, kitos, slopindamos uždegiminių citokinų sekreciją ir pernašą, veikia priešuždegimiškai.

**miRNR analizė organizmo skysčiuose.** Siekiant įvertinti tiriamųjų miRNR diagnostinę vertę, atlikta miRNR analizė organizmo skysčiuose. miRNR analizė tiriamųjų **seilėse**, parodė tendencingai padidėjusį cirkuliuojančių miR-145-5p ir -195-5p kieki LP sergančiųjų mėginiuose ir su sunkesne ligos stadija siejamų LP klinikinių-patologinių rodiklių grupėse (periapikalinių kaulinės destruktijos židinių buvimas ir didesnis neteiktų dantų skaičius). Literatūrinių duomenų, susijusių su keturių šiame darbe tiriamų miRNR skirtumais periodonto ligomis sergančių asmenų seilių mėginiuose publikuota kol kas nėra. Vis dėlto artimiausias nagrinėjamai tematikai buvo Han ir kolegų atliktas tyrimas (Han *ir kt.*, 2020). Autoriai pastebėjo, kad šios miR-146a-5p kiekis buvo reikšmingai padidėjęs LP sergančiųjų tiriamųjų seilių ekstraląstelinėse pūslelėse, palyginus su necentrifuguotais seilių mėginiais (Han *ir kt.*, 2020). miRNR analizė LP sergančiųjų asmenų grupės **plazmos** mėginiuose parodė tendencingą miR-195-5p kiekio padidėjimą ir statistiškai reikšmingą miR-140-3p kiekio sumažėjimą. Kitų su LP susijusių tyrimų, kuriuose mūsų pasirinktos miRNR būtų tirtos LP sergančiųjų asmenų plazmos mėginiuose, kol kas nėra. Tačiau svarbu paminėti, kad seilių ir plazmos miR-146a-5p bei plazmos miR-140-3p, -145-5p, -195-5p gana plačiai analizuojamos kitų susirgimų, pavyzdžiui, įvairių vėžinių, širdies ligų, II tipo diabeto, osteoartrito ir kitų ligų

tyrimuose, dažnai siekiant iširti jų, kaip potencialių tam tikros ligos biožymenų, diagnostinį potencialą.

**miRNR sąsajos su LP liga moduluojančiais veiksniais ir demografiniais rodikliais.** Siekiant įvertinti su LP patogenezė glaudžiai susijusios autoimuninės ligos – RA – įtaką miRNR raiškai, buvo atlikta periodonto audinių, seilių ir kraujo plazmos miRNR analizė. Įvairiose RA sergančiųjų grupėse buvo nustatytas tendencingas miR-140-3p kiekio padidėjimas. Nors tyrimų, analizuojančių šios miRNR raiškos skirtumus RA pažeistuose audiniuose nėra daug, pateikiami rezultatai yra kontraversiški. Pavyzdžiui, Peng su bendraautoriais atlikta sinovijos audinio miRNR analizė parodė, kad RA sergančių asmenų audiniuose miR-140-3p raiška buvo reikšmingai sumažėjusi (Peng ir kt., 2016). Skirtingus rezultatus galėjo nulemti skirtingų tyrimuose naudotų audinių specifinės savybės. Šio tyrimo miRNR analizė RA sergančiųjų organizmo skysčiuose parodė plazmoje cirkuliuojančios miR-140-3p kiekio sumažėjimą, kurią pastebėjo ir Yin ir kt., atlikę su RA glaudžiai susijusios ligos osteoartrito paveiktų asmenų sinovijos skysčio miRNR analizę (Yin ir kt., 2017). Verta paminėti, kad RA sergančiųjų periodonto audiniuose taip pat nustatyta sumažėjusi miR-145-5p raiška, palyginus su sveikų asmenų grupe. Panašius šios miRNR raiškos skirtumus *in vitro* tyrimais nustatė Dinesh su kolegomis, kurie pastebėjo, kad sumažėjusi miR-145-5p raiška gali slopinti sinoviocitų proliferacijos procesus, reguliuodama Wnt/ $\beta$ -katenino signalinį kelią (Dinesh ir kt., 2020). Taigi sumažėjęs miR-140-3p ir -145-5p kiekis RA sergančių asmenų plazmoje gali būti siejamas su organizme slopinamais ląstelių proliferacijos ir diferenciacijos procesais, kurie taip pat svarbūs ir LP ligos vystymesi.

Tyrimo metu taip pat įvertintos organizmo skysčiuose analizuotų miRNR sąsajos su demografiniais rodikliais – lytimi ir amžiumi. Remiantis gautais rezultatais vyrų grupėje nustatytas reikšmingai sumažėjęs seilių miR-146a-5p ir padidėjęs seilių miR-145-5p bei plazmos miR-140-3p kiekis, palyginus su moterų grupe. Tokie pokyčiai gali būti siejami su didesniu jų polinkiu sirgti LP. Panaši tendencija taip pat užfiksuota Eke ir kolegų tyrime, kuriame nustatyta, kad LP vyrai serga maždaug 3 kartus dažniau nei moterys (Eke ir kt., 2012). Šio straipsnio autoriai taip pat pastebėjo, kad sergamumas LP didėja su amžiumi. Panašią priklausomybę nuo amžiaus galima išvelgti ir šiame tyrime. Palyginus su ikipensinio amžiaus tiriamaisiais, pensinio amžiaus asmenų grupėje nustatytas reikšmingai didesnis seilių ir plazmos miR-195-5p, bei mažesnis seilių miR-140-3p kiekis. Tokių pokyčių sąsajas su LP būtų galima aiškinti specifine šioms miRNR priskiriama funkcija kaulinio audinio formavimosi metu: padidėjęs miR-195-5p kiekis gali rodyti aktyvesnę šios kaulo atsinaujinimo procesus slopinančios miRNR veikimą, o sumažėjęs miR-140-3p kiekis – nuslopintą osteoblastų diferenciaciją.

**miRNR diagnostinio potencialo vertinimas.** Šio tyrimo metu įvertinus visų tirtų seilėse ir kraujo plazmoje cirkuliuojančių miRNR diagnostinę vertę, didžiausias diagnostinis potencialas buvo būdingas seilių visų miRNR (miR-140-3p, -145-5p, -146a-5p ir -195-5p) (AUC = 0,66) bei plazmos miR-145-5p ir -195-5p (AUC = 0,64) kombinacijai. Išanalizavus mokslinę literatūrą rastas tik vienas tyrimas, kuriame buvo vertinama seilių miR-146a-5p diagnostinė vertė. Jau minėto tyrimo metu nustatyta, kad su užląstelinėmis pūslelėmis asocijuotos miRNR pasižymi dideliu diagnostiniu potencialu (AUC = 0,96) ir potencialiai galėtų būti panaudotos, kaip biožymenys LP diagnostikai (Han ir kt., 2020).

Šio tyrimo metu ne visus mikrogardelėmis tirtų miRNR raiškos skirtumus pavyko validuoti AT-kPGR metodu. Tokie neatitikimai galėjo atsirasti dėl nevienodos tiriamųjų mėginių imties, technologijų veikimo ar duomenų analizės principų skirtumų. Vis dėlto, remiantis moksline literatūra, ši miRNR raiškos tyrimų metodų kombinacija yra patikrinta ir plačiai taikoma. Didelio našumo mikrogardelių technologija leidžia identifikuoti didelį skaičių su tiriamąja liga galimai susijusių miRNR, kurių raiškos pokyčiai didesnėje mėginių imtyje tikrinami jau kur kas jautresniu ir specifiškesniu kiekybinės PGR metodu (Pritchard ir kt., 2012). Tyrimo metu atliktas miRNR kiekio palyginimas tarp dviejų analizuojamųjų skysčių parodė, kad miR-146a-5p ir -195-5p kiekis plazmoje yra reikšmingai didesnis, o -145-5p – mažesnis nei seilėse. Tokie rezultatai rodo šių miRNR specifiškumą tam tikram skysčiui, į kurį turi būti atsižvelgta siekiant panaudoti jas kaip biožymenis neivazyviai LP diagnostikai.

Remiantis šiame tyrime gautais rezultatais, nustatyti reikšmingi analizuotų miRNR raiškos ir kiekio skirtumai LP sergančiųjų periodonto audiniuose, seilėse bei kraujo plazmoje. Atlikta analizė taip pat rodo, kad egzistuoja reikšmingos sąsajos su LP eiga susijusiais klinikiniais-patologiniais rodikliais bei šią ligą moduliuojančiais veiksniais. Vis dėlto, siekiant šias sąsajas patvirtinti ir tiksliau įvertinti tiriamųjų miRNR vertę LP diagnostikai, aprašytas tyrimas bus tęsiamas didesnėje mėginių imtyje (N = 240).

## IŠVADOS

1. Lėtiniu periodontitu sergančiųjų periodonto audiniuose nustatyta 177 reikšmingai pakitusios raiškos miRNR: 140 – padidėjusios ir 37 – sumažėjusios raiškos ( $P \leq 0,050$ ).
2. Lėtiniu periodontitu sergančių asmenų periodonto audiniuose nustatyta reikšmingai padidėjusi miR-145-5p ( $P < 0,001$ ), -140-3p ( $P = 0,006$ ) raiška, palyginus su periodontologiškai sveikais asmenimis. Sunkią nuo vidutinės periodontito formos skiria padidėjusi miR-145-5p ( $P = 0,016$ ) raiška, vidutinę nuo kontrolės – išaugusi miR-195-5p ( $P = 0,029$ ) raiška.
3. miR-140-3p sumažėjimas nustatytas lėtiniu periodontitu sergančių asmenų plazmoje ( $P = 0,049$ ). Daugiau miR-145-5p nustatyta lėtiniu periodontitu sergančiųjų, tiriamųjų su periapikaliniais kaulinės destruktijos židiniiais bei netekusių  $\geq 6$  dantų netekusių asmenų seilėse; daugiau miR-195-5p nustatyta lėtiniu periodontitu sergančių ir  $\geq 6$  dantų netekusių asmenų seilėse ir kraujo plazmoje, tačiau skirtumai nebuvo statistiškai reikšmingi.
4. Aukščiausias diagnostinis potencialas buvo būdingas visų keturių tiriamųjų seilėse cirkuliuojančių miRNR (AUC = 0,66;  $P = 0,027$ ) ir plazmos miR-145-5p/-195-5p (AUC = 0,64;  $P = 0,040$ ) kombinacijoms.

# VILNIAUS UNIVERSITETAS

Gyvybės mokslų centras

Biomokslų institutas

BENITA BURAGAITĖ-STAPONKIENĖ

## **Su uždegimu susijusių miRNR tyrimai lėtinio periodontito diagnostikai**

Genetikos magistrinių studijų baigiamasis darbas

### **SANTRAUKA**

Lėtinis periodontitas (LP) – viena labiausiai paplitusių uždegiminių ligų, kuria serga 20-50 % populiacijos. Negydomas LP didina riziką susirgti kitomis sisteminėmis ligomis, tokiomis kaip diabetas, reumatoidinis artritas (RA) ar vėžys. Dėl besimptomės ligos pradžios ir tik klinikiškai apžiūra paremtų diagnozavimo būdų, LP dažnai nustatomas per vėlai, kai dantis palaikantys struktūriniai audiniai jau būna negrįžtamai pažeisti. LP vystymosi metu pakinta su uždegimu susijusių miRNR raiška, kuri atspindi ligos pažeistuose burnos audiniuose. Šių miRNR kiekio pokyčiais organizmo skysčiuose paremti metodai įgalintų ankstyvą, neinvazinę LP diagnostiką.

Šiuo darbu siekta mikrogardelių ir atvirkštinės transkriptazės PGR metodu iširti periodonto audinių miRNR profilį ir remiantis gautais rezultatais atrinkti su LP susijusias miRNR tyrimams organizmo skysčiuose (seilėse ir kraujo plazmoje) bei įvertinti atrinktų miRNR diagnostinį potencialą.

Tyrimo metu LP paveiktuose audiniuose nustatyta statistiškai reikšmingai išaugusi miR-145-5p ( $P < 0,001$ ) ir -140-3p ( $P = 0,006$ ) raiška. Taip pat nustatyta, jog sunkią LP formą nuo vidutinės skiria padidėjusi miR-145-5p ( $P = 0,016$ ), o vidutinę nuo kontrolės – padidėjusi miR-195-5p ( $P = 0,029$ ) raiška. miRNR analize LP sergančių asmenų plazmoje nustatytas miR-140-3p ( $P = 0,049$ ) sumažėjimas. Taip pat įvertinta, kad didžiausiu diagnostiniu potencialu pasižymėjo visų keturių tiriamųjų seilių miRNR ( $AUC = 0,66$ ;  $P = 0,027$ ) ir plazmos miR-145-5p/-195-5p ( $AUC = 0,64$ ;  $P = 0,040$ ) kombinacija.

Tyrimas parodė, kad analizuotos miRNR yra svarbios LP patogenezėje ir siejasi su LP klinikiniais-patologiniais bei šią ligą moduluojančiais veiksniais. Vis dėlto siekiant patvirtinti nustatytas sąsajas reikalingi tolimesni, didesnės apimties tyrimai.



VILNIUS UNIVERSITY

Life Sciences Center

Institute of Biosciences

BENITA BURAGAITE-STAPONKIENE

**Analysis of Inflammatory miRNAs for Diagnosis of Chronic Periodontitis**

Master Thesis

**SUMMARY**

Chronic periodontitis (CP) is a highly prevalent inflammatory disease affecting 20-50% of the human population worldwide. When left untreated, CP increases the risk of some other systemic diseases such as diabetes, rheumatoid arthritis (RA) and cancer. Due to the asymptomatic onset of the disease and out-dated diagnostic methods, most of the cases are diagnosed at an advanced stage when the supporting tissues of the tooth are already irreversibly damaged. The development of CP is highly associated with a number of differentially expressed miRNAs that may be identified in the damaged oral epithelium and periodontal tissues. Novel methods based on the assessment of circulating miRNA level in human bodily fluids may be applied as a non-invasive tool for early CP diagnosis.

The aim of the current study was to evaluate miRNA expression profile in periodontal tissues by means of miRNA microarray technology and reverse transcription PCR technique to select CP-associated miRNAs and analyse them in bodily fluids (saliva and blood plasma) and to evaluate their diagnostic potential.

The expression of miR-145-5p ( $P < 0.001$ ) and -140-3p ( $P = 0.006$ ) was significantly upregulated in CP-affected tissues. Moreover, the expression of miR-145-5p ( $P = 0.016$ ) was associated with advanced stage CP, while upregulation of miR-195-5p ( $P = 0.029$ ) was specific for moderate stage of CP, compared with healthy controls. Decreased level of miR-140-3p ( $P = 0.049$ ) was observed in plasma samples from CP patients. The highest discriminatory power was assessed for combination of all four salivary miRNAs ( $AUC = 0.66$ ;  $P = 0.027$ ) and plasma miR-145-5p /-195-5p ( $AUC = 0.64$ ;  $P = 0.040$ ).

The current study has shown that four miRNAs play an important role in the pathogenesis of CP. Selected miRNAs were found to be associated with clinical-pathological factors of CP and other modulating factors of the disease. However, further investigations are necessary to confirm these findings.

## LITERATŪROS SĄRAŠAS

### Internetiniai šaltiniai

miRBase Release 22.1 [elektroninis išteklius]. Manšesteris, JK, 2018. Prieiga per internetą: <http://www.mirbase.org/cgi-bin/browse.pl> [Žiūrėta: 2020 m. birželio 10 d.)

dentalcare.com [internetinė svetainė] <https://www.dentalcare.com/en-us/professional-education/ce-courses/ce592/the-periodontium>)

### Knygos

FDI, World Dental Federation. The Challenge of Oral Disease – A call for global action. The Oral Health Atlas. 2nd ed. Geneva. 2015.

### Straipsniai

1. Adami B, Tabatabaeian H, Ghaedi K, Talebi A, Azadeh M, Dehdashtian E. miR-146a is deregulated in gastric cancer. *J Cancer Res Ther.* 2019;15(1):108-114.
2. Al-Modawi RN, Brinchmann JE, Karlsen TA. Multi-pathway Protective Effects of MicroRNAs on Human Chondrocytes in an In Vitro Model of Osteoarthritis. *Mol Ther Nucleic Acids.* 2019;17:776-790.
3. AlJehani YA. Risk factors of periodontal disease: review of the literature. *Int J Dent.* 2014;2014:182513.
4. Almiñana-Pastor PJ, Boronat-Catalá M, Micó-Martinez P, Bellot-Arcís C, Lopez-Roldan A, Alpiste-Illueca FM. Epigenetics and periodontics: A systematic review. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2019;24(5):e659-e672.
5. Amaliya A, Laine ML, Delanghe JR, Loos BG, Vam Wijk AJ, Van der Velden U. Java project on periodontal diseases: periodontal bone loss in relation to environmental and systemic conditions. *J. Clin. Periodontol.* 2015;42, 325-332
6. Andus T, Daig R, Vogl D. Imbalance of the interleukin 1 system in colonic mucosa—association with intestinal inflammation and interleukin 1 receptor agonist genotype 2. *Gut.* 1997;41(5):651–7.
7. Anusaksathien O, Sukboon A, Sitthiphong P, Teanpaisan R. Distribution of interleukin-1 $\beta$ +3954 and IL1 $\alpha$ –889 genetic variations in a Thai population group. *J Periodontol.* 2003;74(12):1796–802.
8. Apatzidou DA, Kinane DF. Nonsurgical mechanical treatment strategies for periodontal disease. *Dent. Clin. North Am.* 2010;54, 1–12.

9. Ari G, Cherukuri S, Namasivayam A. Epigenetics and Periodontitis: A Contemporary Review. *J Clin Diagn Res.* 2016;10(11)
10. Armitage GC Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann. Periodontol*, 1999;4, 1–6
11. Arun R, Hemalatha R, Arun KV, Kumar T. E-cadherin and CD1a expression in gingival epithelium in periodontal health, disease and post-treatment. *Indian J Dent Res.* 2010;21:396–401.
12. Krom BP, Kidwai S, ten Cate JM, Candida and other fungal species forgotten players of healthy oral microbiota, *J. Dent. Res.* 2014 93 (5)445–451.
13. 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;90(7):756-765.
14. Baker RG, Hayden MS, Ghosh S. NF- $\kappa$ B, inflammation, and metabolic disease. *Cell Metab.* 2011;13(1):11-22.
15. Belibasakis GN, Bostanci N. The RANKL-OPG system in clinical periodontology. *J of Clin Periodontol.* 2012;39(3):239-248.
16. Bellissimo T, Tito C, Ganci F, et al. Argonaute 2 drives miR-145-5p-dependent gene expression program in breast cancer cells. *Cell Death Dis.* 2019;10(1):17.
17. Bodet C, Chandad F, Grenier D. Inflammatory responses of a macrophage/epithelial cell co-culture model to mono and mixed infections with *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, and *Tannerella forsythia*. *Microb Infect.* 2006;8(1):27-35.
18. Neville BW, Damm DD, Allen CM, Chi AC, 7 - Viral Infections, Editor(s): Brad W. Neville, Douglas D. Damm, Carl M. Allen, Angela C. Chi, Color Atlas of Oral and Maxillofacial Diseases, *Elsevier.* 2019;141-168,
19. Brett PM, Zygogianni P, Griffiths GS. Functional gene polymorphisms in aggressive and chronic periodontitis. *J Dent Res.* 2005;48(12):1149–53.
20. Campellone KG, Webb NJ, Znameroski EA, Welch MD. WHAMM is an Arp2/3 complex activator that binds microtubules and functions in ER to Golgi transport. *Cell* 2008;134:148-161.
21. Cantley M.D, Bartold, PM, Marino V, Fairlie, DP, Le GT, Lucke, AJ and Haynes DR, Histone deacetylase inhibitors and periodontal bone loss. *J Periodontal Res*, 2011;46: 97-703.
22. Catrina, A., Svensson, C., Malmström, V. et al. Mechanisms leading from systemic autoimmunity to joint-specific disease in rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol* 2017;13, 79–86.

23. Cavalla F, Bigueti CC, Garlet TP, Trombone APF, Garlet GP. Inflammatory pathways of bone resorption in periodontitis. In: Bostanci N, Belibasakis G, editors. Pathogenesis of Periodontal Diseases. *Cham: Springer*. 2018;59-85.
24. Cekici A, Kantarci A, Hasturk H, Van Dyke TE. Inflammatory and immune pathways in the pathogenesis of periodontal disease. *Periodontol 2000*. 2014;64(1):57-80.
25. Chai L, Kang XJ, Sun ZZ, et al. MiR-497-5p, miR-195-5p and miR-455-3p function as tumor suppressors by targeting hTERT in melanoma A375 cells. *Cancer Manag Res*. 2018;10:989-1003.
26. 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; 232: 3762– 3774.
27. Cirnigliaro M, Barbagallo C, Gulisano M, et al. Expression and Regulatory Network Analysis of miR-140-3p, a New Potential Serum Biomarker for Autism Spectrum Disorder. *Front Mol Neurosci*. 2017;10:250.
28. Claudino M, Trombone AFP, Cardoso CR. The broad effects of the functional IL-10 promoter-592 polymorphism: modulation of IL-10, TIMP-3, and OPG expression and their association with periodontal disease outcome. *J Leukoc Biol*. 2008;48(6):1565–73.
29. Cui L, Sun YP, Li DG, Wang SH, Shao D. Transforming growth factor-beta1 rs1800469 polymorphism and periodontitis risk: a meta-analysis. *Int J Clin Exp Med*. 2015;8(9):15569–74.
30. Reznik DA Oral manifestations of HIV disease, topics in HIV medicine : a publication of the international AIDS society, USA 2005;13(5)143–148.
31. da Silva MK, de Carvalho ACG, Alves EHP, da Silva FRP, Pessoa LDS, Vasconcelos DFP. Genetic Factors and the Risk of Periodontitis Development: Findings from a Systematic Review Composed of 13 Studies of Meta-Analysis with 71,531 Participants. *Int J Dent*. 2017;1914073.
32. Daing A, Singh SV, Saimbi CS, Khan MA, Rath SK. Cyclooxygenase 2 gene polymorphisms and chronic periodontitis in a North Indian population: a pilot study. *J Periodontal Implant Sci*. 2012;42(5):151–157.
33. de Brito RB Jr, Scarel-Caminaga RM, Trevilatto PC, de Souza AP, Barros SP. Polymorphisms in the vitamin D receptor gene are associated with periodontal disease. *J Periodontol*. 2004;75(8):1090–5.
34. de Faria Amormino SA, Araújo TC, Saraiva AM, Gomez RS, Dutra WO, da Costa JE. Hypermethylation and low transcription of TLR2 gene in chronic periodontitis. *Hum Immunol*. 2013;74:1231–6.

35. de Molon RS, Rossa C Jr, Thurlings RM, Cirelli JA, Koenders MI. Linkage of Periodontitis and Rheumatoid Arthritis: Current Evidence and Potential Biological Interactions. *Int J Mol Sci.* 2019;20(18):4541.
36. de Souza AP, Trevilatto PC, Scarel-Caminaga RM, de Brito RB, Line SR. Analysis of the TGF-beta1 promoter polymorphism (C-509T) in patients with chronic periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2003;30(6):519–23.
37. Denli AM, Tops BB, Plasterk RH, Ketting RF, Hannon GJ (2004) Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature* 2004;432:231–235
38. Deo PN, Deshmukh R. Oral microbiome: Unveiling the fundamentals. *J Oral Maxillofac Pathol.* 2019;23(1):122-128.
39. Desarda H, Gaikwad S. Matrix metalloproteinases & implication in periodontitis—a short review. *J Dent Allied Sci.* 2013;2(2):66–70
40. Dinesh P, Kalaiselvan S, Sujitha S, Rasool M. MiR-145-5p mitigates dysregulated Wnt1/ $\beta$ -catenin signaling pathway in rheumatoid arthritis. *Int Immunopharmacol.* 2020;82:106328.
41. Donati M, Berglundh T, Hytonen AM, Hahn-Zoric M, Hanson LA, Padyukov L. Association of the –159 CD14 gene polymorphism and lack of association of the –308 TNFA and Q551R IL-4RA polymorphisms with severe chronic periodontitis in Swedish Caucasians. *J Clin Periodontol.* 2005;32(5):474–9.
42. Duncan HF, Smith AJ, Fleming GJ, Cooper PR. Histone deacetylase inhibitors epigenetically promote reparative events in primary dental pulp cells. *Exp Cell Res.* 2013;319:1534–43.
43. Dutzan N, Gamonal J, Silva A, Sanz M, Vernal R. Over-expression of forkhead box P3 and its association with receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand, interleukin (IL)-17, IL-10 and transforming growth factor-beta during the progression of chronic periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2009;36(5):396-403.
44. Dutzan N, Vernal R, Hernandez M, Dezerega A, Rivera O, Silva N, Aguillon JC, Puente J, Pozo P, Gamonal J. Levels of interferon-gamma and transcription factor T-bet in progressive periodontal lesions in patients with chronic periodontitis. *J Periodontol.* 2009;80(2):290–6.
45. Eke PI, Page RC, Wei L, Thornton-Evans G, Genco RJ. Update of the case definitions for population-based surveillance of periodontitis. *J. Periodontol.* 2012;83:1449–1454.
46. Eke PI, Thornton-Evans G, Dye B, Genco R. Advances in surveillance of periodontitis: the centers for disease control and prevention periodontal disease surveillance project. *J Periodontol* 2012;83:1337–1342.

47. Eke PI, Wei L, Thornton-Evans GO, et al. Risk Indicators for Periodontitis in US Adults: NHANES 2009 to 2012. *J Periodontol.* 2016;87(10):1174-1185.
48. El Jilani MM, Mohamed AA, Zeglam HB, Alhudiri IM, Ramadan AM, Saleh SS, Elkabir M, Amer IB, Ashammakhi N, Enattah NS. Association between vitamin D receptor gene polymorphisms and chronic periodontitis among Libyans. *Libyan J Med.* 2015;10:26771.
49. Engebretson SP, Lamster IB, HerreraAbreu M, Celenti RS, Timms JM, Chaudhary AG, di Giovine FS, Kornman KS. The influence of interleukin gene polymorphism on expression of interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha in periodontal tissue and gingival crevicular fluid. *J Periodontol.* 1999;70:567–73.
50. Fassmann A, Holla LI, Buckova D, Vasku A, Znojil V, Vanek J. Polymorphisms in the +252(a/G) lymphotoxinalpha and the –308(a/G) tumor necrosis factor-alpha genes and susceptibility to chronic periodontitis in a Czech population. *J Periodontal Res.* 2003;38(4):394–9.
51. Fishman D, Faulds G, Jeffery R, Mohamed-Ali V, Yudkin JS, Humphries S, Woo P. The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. *J Clin Invest.* 1998;102:1369–76.
52. Fu YW., Li XX, Gong YQ, Xu HZ. Valacyclovir as an adjunct to full-mouth scaling and root planing of advanced chronic periodontitis: a randomized clinical trial. *Shanghai Kou Qiang Yi Xue.* 2014;23:103–106
53. Gao Y, Hao CD. Shanghai Kou Qiang Yi Xue. Expression of miR-146a in Saliva of Chronic Periodontitis Patients and Its Influence on Gingival Crevicular Inflammation and MMP-8/TIMP-1 Levels. *J Stomatol* 2018;27(3):309-312.
54. Garlet GP, Cardoso CR, Campanelli AP, Garlet TP, Avila-Campos MJ, Cunha FQ, et al. The essential role of IFN-gamma in the control of lethal *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* infection in mice. *Microb Infect.* 2008;10(5):489-496.
55. Gemmell E, Seymour GJ. Cytokine profiles of cells extracted from humans with periodontal diseases. *J Den Res.* 1998;77(1):16-26.
56. Gorur A, Balci Fidanci S, Dogruer Unal N, et al. Determination of plasma microRNA for early detection of gastric cancer. *Mol Biol Rep.* 2013;40(3):2091-2096.
57. Grabner CP, Price SD, Lysakowski A, Cahill AL, Fox AP. Regulation of large dense-core vesicle volume and neurotransmitter content mediated by adaptor protein 3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:10035-10040.

58. 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;30: 796-808.
59. Guangyue Li, Yuan Yue, Ye Tian, Jin-le Li, Min Wang, Hao Liang, Peixi Liao, Wings T.Y. Loo, Mary N.B. Cheung, Louis W.C. Chow. Association of matrix metalloproteinase (MMP)-1, 3, 9, interleukin (IL)-2, 8 and cyclooxygenase (COX)-2 gene polymorphisms with chronic periodontitis in a Chinese population. *Cytokine*. 2012;60(2):552-560.
60. Ha M, Kim V. Regulation of microRNA biogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2015;15:509–524
61. Hajishengallis G, Korostoff JM. Revisiting the Page & Schroeder model: The good, the bad and the unknowns in the periodontal host response 40 years later. *Periodontol* 2000. 2017;75(1):116-151.
62. Hammond SM. An overview of microRNAs. *Adv Drug Deliv Rev*. 2015;87:3-14.
63. Han MX, Ding C, Kyung HM. Genetic polymorphisms in pattern recognition receptors and risk of periodontitis: Evidence based on 12,793 subjects. *Human Immunology*. 2015;76(7):496-504.
64. Haubek D et al. Risk of aggressive periodontitis in adolescent carriers of the JP2 clone of *Aggregatibacter* (*Actinobacillus*) *actinomycetemcomitans* in Morocco: a prospective longitudinal cohort study. *Lancet* 2008;371, 237-242 (2008).
65. Heidari Z, Mahmoudzadeh-Sagheb H, Hashemi M, Ansarimoghaddam S, Moudi B, Sheibak N. Association between IFN- $\gamma$  +874 A/T and IFN- $\gamma$ R1 (-611A/G, +189T/G and +95C/T) gene polymorphisms and chronic periodontitis in a sample of Iranian population. *Int J Dent*. 2015;2015.
66. Heidari Z, Moudi B, Mahmoudzadeh-Sagheb H. Immunomodulatory factors gene polymorphisms in chronic periodontitis: an overview. *BMC Oral Health* 2019;19(1):29
67. Hofbauer LC, Neubauer A, Heufelder AE. Receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and osteoprotegerin: Potential implications for the pathogenesis and treatment of malignant bone diseases. *Cancer*. 2001;92(3):460-470.
68. Holla LI, Fassmann A, Stejskalova A, Znojil V, Vanek J, Vacha J. Analysis of the interleukin-6 gene promoter polymorphisms in Czech patients with chronic periodontitis. *J Periodontol*. 2004;75(1):30–6.
69. Holla LI, Hrdlickova B, Linhartova P, Fassmann A. Interferon-gamma +874A/T polymorphism in relation to generalized chronic periodontitis and the presence of periodontopathic bacteria. *Arch Oral Biol*. 2011;56(2):153–8.

70. Honda T, Domon H, Okui T, Kajita K, Amanuma R, Yamazaki K. Balance of inflammatory response in stable gingivitis and progressive periodontitis lesions. *Clin Exp Immunol.* 2006;144:35–40.
71. Hu Q, Song J, Ding B, Cui Y, Liang J, Han S. miR-146a promotes cervical cancer cell viability via targeting IRAK1 and TRAF6. *Oncol Rep.* 2018;39(6):3015-3024.
72. Huang H, Wang Y, Li Q, Fei X, Ma H, Hu R. miR-140-3p functions as a tumor suppressor in squamous cell lung cancer by regulating BRD9. *Cancer Lett.* 2019;446:81-89.
73. Hung PS, Chen FC, Kuang SH, Kao SY, Lin SC, Chang KW. miR-146a induces differentiation of periodontal ligament cells. *J Dent Res.* 2010;89(3):252-257.
74. Yang JS, Maurin T, Robine N, Rasmussen KD, Jeffrey KL, Chandwani R, ir kt. Conserved vertebrate mir-451 provides a platform for Dicer-independent, Ago2-mediated microRNA biogenesis. *PNAS USA.* 2010;107:15163–8.
75. Yangheng Zhang, Xiang Wang, Houxuan Li, Can Ni, Zhibin Du, Fuhua Yan, Human oral microbiota and its modulation for oral health, *Biomed Pharmacother* 2018;99:883-893
76. Yin CM., Suen WCW, Lin S, Wu XM, Li G, Pan XH. Dysregulation of both miR-140-3p and miR-140-5p in synovial fluid correlate with osteoarthritis severity. *Bone Joint Res.* 2017;6:612–618.
77. Ishihara Y, Nishihara T, Kuroyanagi T. Gingival crevicular interleukin-1 and interleukin-1 receptor antagonist levels in periodontally healthy and diseased sites. *J Periodontal Res.* 1997;32(6):524–9.
78. Yu L, Qu H, Yu Y, Li W, Zhao Y, Qiu G. LncRNA-PCAT1 targeting miR-145-5p promotes TLR4-associated osteogenic differentiation of adipose-derived stem cells. *J Cell Mol Med.* 2018;22(12):6134-6147.
79. Yu T, Zhao L, Huang X, Ma C, Wang Y, Zhang J, ir kt. Enhanced activity of the macrophage M1/M2 phenotypes and phenotypic switch to M1 in periodontal infection. *J Periodontol.* 2016;87(9):1092-1102.
80. Yue J, Lau TCK, Griffith JF, ir kt. Circulating miR-99b-5p as a novel predictor of erosion progression on high-resolution peripheral quantitative computed tomography in early rheumatoid arthritis: A prospective cohort study. *Int J Rheum Dis.* 2019;22(9):1724-1733.
81. Yuwen DL, Sheng BB, Liu J, Wenyu W, Shu YQ. MiR-146a-5p level in serum exosomes predicts therapeutic effect of cisplatin in non-small cell lung cancer. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2017;21(11):2650-2658.
82. Albandar JM and Kingman A, “Gingival recession, gingival bleeding, and dental calculus in adults 30 years of age and older in the United States, 1988–1994,” *J Periodontol,* 1999;70(1,)30–43.



83. He J, Li Y, Cao X, Xue X Theoralmicrobiomediversityanditsrelation to human diseases, *Folia Microbiol.* 2015;60:69–80.
84. Jenkins MR, Tsun A, Stinchcombe JC, Griffiths GM. The strength of T cell receptor signal controls the polarization of cytotoxic machinery to the immunological synapse. *Immunity* 2009;31:621-631.
85. Jiang S, Hu Y, Deng S, ir kt. miR-146a regulates inflammatory cytokine production in Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide-stimulated B cells by targeting IRAK1 but not TRAF6. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2018;1864(3):925-933.
86. Jiang W, Li T, Wang J, ir kt. miR-140-3p Suppresses Cell Growth And Induces Apoptosis In Colorectal Cancer By Targeting PD-L1. *Onco Targets Ther.* 2019;12:10275-10285.
87. Jude J.A., Dileepan M., Subramanian S., Solway J., Panettieri R.A., Jr., Walseth T.F., Kannan M.S. miR-140-3p regulation of TNF- $\alpha$ -induced CD38 expression in human airway smooth muscle cells. *Am J. Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2012;303:L460–L468.
88. Kumaraswamy KL, Vidhya M. Human papilloma virus and oral infections: an update, *J Cancer Res Ther* 2011;7(2):120–127.
89. Kaldahl WB, Kalkwarf KL, Patil KD, Molvar MP, Dyer JK. Long-term evaluation of periodontal therapy: II. Incidence sites break. down. *J Periodontol.* 1996;67, 103–108
90. Karasneh JA, Ababneh KT, Taha AH, Al-Abbadi MS, Marzouka N, Jaradat SM, Thornhill MH. Association of vitamin D receptor gene polymorphisms with chronic and aggressive periodontitis in Jordanian patients. *Eur J Oral Sci.* 2013;121(6):551–8.
91. Kassebaum, N. J. ir kt. Global burden of severe periodontitis in 1990–2010: a systematic review and meta-regression. *J. Dent. Res.* 93, 1045–1053 (2014).
92. Khalaf H, Lonn J, Bengtsson T. Cytokines and chemokines are differentially expressed in patients with periodontitis: possible role for TGF-beta1 as a marker for disease progression. *Cytokine.* 2014;67(1):29–35.
93. Kiili M, Cox SW, Chen HY, Wahlgren J, Maisi P, Eley BM, ir kt. Collagenase-2 (MMP-8) and collagenase-3 (MMP-13) in adult periodontitis: Molecular forms and levels in gingival crevicular fluid and immunolocalisation in gingival tissue. *J Clin Periodontol.* 2002;29(3):224-232.
94. Kikuta J, Wada Y, Kowada T, Wang Z, Sun-Wada GH, Nishiyama I, ir kt. Dynamic visualization of RANKL and Th17-mediated osteoclast function. *J Clin Investig.* 2013;123(2):866-873.
95. Kim VN, Han J, Siomi MC (2009) Biogenesis of small RNAs in animals. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10:126–139

96. Kinane D, Stathopoulou P, Papapanou P. Periodontal diseases. *Nat Rev Dis Primers* 3, 2017;17038
97. Kobayashi T, Ito S, Kuroda T. The interleukin-1 and Fcγ receptor gene polymorphisms in Japanese patients with rheumatoid arthritis and periodontitis. *J Periodontol.* 2007;78(12):2311–8.
98. Koyuncu OO, MacGibeny MA, Hogue IB, Enquist LW. Compartmented neuronal cultures reveal two distinct mechanisms for alpha herpesvirus escape from genome silencing. *PLoS Pathog* 2017;13(10):e1006608.
99. Kojima A, Kobayashi T, Ito S, Murasawa A, Nakazono K, Yoshie H. Tumor necrosis factor-α gene promoter methylation in Japanese adults with chronic periodontitis and rheumatoid arthritis. *J Periodont Res.* 2016;51:350–358.
100. Kornman KS, Crane A, Wang HY, di Giovine FS, Newman MG, Pirk FW. The interleukin-1 genotype as a severity factor in adult periodontal disease. *J Clin Periodontol.* 1997;24:72–7.
101. Kornman KS. Mapping the Pathogenesis of Periodontitis: A New Look. *Journal of Periodontology*, 79: 2008;1560-1568.
102. Larsson L ir kt. Regenerative medicine for periodontal and peri-implant diseases. *J. Dent. Res.* 2016;95,255-266.
103. Lee Y, Hur I, Park SY, Kim YK, Suh MR, Kim VN (2006) The role of PACT in the RNA silencing pathway. *EMBO J* 25:522–532.
104. Lee JW, Kobayashi Y, Nakamichi Y, Udagawa N, Takahashi N, Im NK, ir kt. Alisol-B, a novel phyto-steroid, suppresses the RANKL-induced osteoclast formation and prevents bone loss in mice. *Biochem Pharmacol.* 2010;80(3):352-361.
105. Li LL, Mao CD, Wang GP, Wang N, Xue AG. MiR-145-5p alleviates hypoxia/reoxygenation- induced cardiac microvascular endothelial cell injury in coronary heart disease by inhibiting Smad4 expression. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2020;24(9):5008-5017.
106. Li M, Ren CX, Zhang JM, ir kt. The Effects of miR-195-5p/MMP14 on Proliferation and Invasion of Cervical Carcinoma Cells Through TNF Signaling Pathway Based on Bioinformatics Analysis of Microarray Profiling. *Cell Physiol Biochem.* 2018;50(4):1398-1413.
107. Lian F, Cui Y, Zhou C, Gao K, Wu L. Identification of a plasma four-microRNA panel as potential noninvasive biomarker for osteosarcoma. *PLoS One.* 2015;10(3):e0121499.

108. Liang H, Huang W, Wang Y, Ding L, Zeng L. Overexpression of MiR-146a-5p Upregulates lncRNA HOTAIR in Triple-Negative Breast Cancer Cells and Predicts Poor Prognosis. *Technol Cancer Res Treat*. 2019;18:1533033819882949.
109. Liu Y, Gao S, Du Q, Shao M. miR-146a and miR-152 in prostate cancer and clinicopathological parameters. *J BUON*. 2019;24(4):1692-1699.
110. Liu QP, Wu TH, Zheng H, et al. MiR-140-3p overexpression activates the Wnt signaling pathway to promote fracture healing. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2019;23(14):6011-6017.
111. 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;55(3):189-202.
112. Liu Z, Li Y, Luo Q. Relationship between CT signs and the expression of miR-146a in colon cancer. *Oncol Lett*. 2018;16(5):6598-6602.
113. Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell*. 2001;104(4):487–501.
114. Løe H, Theilade E, Jensen SB. Experimental gingivitis in man. *J Periodontol*. 1965;36:177–187.
115. Loo WTY, Fan CB, Bai LJ, Yue Y, Dou YD, Wang M. Gene polymorphism and protein of human pro- and anti-inflammatory cytokines in Chinese healthy subjects and chronic periodontitis patients. *J Transl Med*. 2012;10:S8.
116. Loo WTY, Jin L, Cheung MNB, Wang M, Chow LWC. Epigenetic change in E-cadherin and COX-2 to predict chronic periodontitis. *J Transl Med*. 2010;8:110.
117. Lu Q, Wu R, Zhao M, Garcia-Gomez A, Ballestar E. miRNAs as Therapeutic Targets in Inflammatory Disease. *Trends Pharmacol Sci*. 2019;40(11):853-865.
118. Luo J, Pan J, Jin Y, Li M, Chen M. MiR-195-5p Inhibits Proliferation and Induces Apoptosis of Non-Small Cell Lung Cancer Cells by Targeting CEP55. *Onco Targets Ther*. 2019;12.
119. Ghannoum MA, Jurevic RJ, Mukherjee PK, Cui F, Sikaroodi M, Naqvi A, Gillevet PM, Characterization of the oral fungal microbiome (mycobiome) in healthy individuals, *PLoS Pathog*. 2010;6(1):e1000713.
120. Ma L, Bajic VB, Zhang Z. On the classification of long non-coding RNAs. *RNA Biol*. 2013;10(6):925-933.
121. Mäntylä P, Stenman M, Kinane DF, Tikanoja S, Luoto H, Salo T, Sorsa T. Gingival crevicular fluid collagenase-2 (MMP-8) test stick for chair-side monitoring of periodontitis. *J Periodontal Res*. 2003;38(4):436-439.

122. Martins MD, Jia Y, Larsson L, Almeida LO, Garaicoa-Pazmino C, Le JM, ir kt. Epigenetic modifications of histones in periodontal disease. *J Dent Res.* 2016;95:215–222.
123. Menezes R, Garlet TP, Letra A, Bramante CM, Campanelli AP, Figueira Rde C, ir kt. Differential patterns of receptor activator of nuclear factor kappa B ligand/osteoprotegerin expression in human periapical granulomas: Possible association with progressive or stable nature of the lesions. *Journal of Endodontia.* 2008;34(8):932-938.
124. Mercado FB, Marshall RI, Klestov AC, Bartold PM. Relationship between rheumatoid arthritis and periodontitis. *J Periodontol.* 2001;72(6):779-787.
125. Mi S, Zhang J, Zhang W, Huang RS. Circulating microRNAs as biomarkers for inflammatory diseases. *Microna.* 2013;2(1):63-71.
126. Michalowicz BS, Diehl SR, Gunsolley JC, Sparks BS, Brooks CN, Koertge TE, Schenkein HA. Evidence of a Substantial Genetic Basis for Risk of Adult Periodontitis. *J Periodontol,* 2000;1699–1707.
127. Miles GD, Seiler M, Rodriguez L, Rajagopal G, Bhanot G. Identifying microRNA/mRNA dysregulations in ovarian cancer. *BMC Res Notes.* 2012;5:164.
128. Mombelli A, Casagni F, Madianos PN. Can presence or absence of periodontal pathogens distinguish between subjects with chronic and aggressive periodontitis? A systematic review. *J Clin Periodontol* 2002;10–21.
129. Morton RS ir Dongari-Bagtzoglou AI. Cyclooxygenase-2 Is Upregulated in Inflamed Gingival Tissues. *J Periodontol,* 2001;72:461-469.
130. 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;86(12):1380-1385.
131. Muñoz-Carrillo JL, Castro-García FP, Chávez-Rubalcaba F, Chávez- Rubalcaba I, Martínez-Rodríguez JL, Hernández-Ruiz ME. Immune system disorders: Hypersensitivity and autoimmunity. In: Athari SS, editor. *Immunoregulatory Aspects of Immunotherapy.* London: *InTechOpen.* 2018;1-30.
132. Naqvi AR, Zhong S, Dang H, Fordham JB, Nares S, Khan A. Expression Profiling of LPS Responsive miRNA in Primary Human Macrophages. *J Microb Biochem Technol.* 2016;8(2):136-143.
133. Nazir MA. Prevalence of periodontal disease, its association with systemic diseases and prevention. *Int J Health Sci (Qassim).* 2017;11(2):72-80.

134. Nikolopoulos GK, Dimou NL, Hamodrakas SJ, Bagos PG. Cytokine gene polymorphisms in periodontal disease: a meta-analysis of 53 studies including 4178 cases and 4590 controls. *J Clin Periodontol.* 2008;35(9):754–67.
135. Noguchi S, Ukai T, Kuramoto A, Yoshinaga Y, Nakamura H, Takamori Y, et al. The histopathological comparison on the destruction of the periodontal tissue between normal junctional epithelium and long junctional epithelium. *J Periodontol Res* 2017;52.
136. Ntounou E, Tzetis M, Braoudaki M, Lambrou G., Poulou M., Malizos K, Stefanou N, Anastasopoulou L, Tsezou A. Serum microRNA array analysis identifies miR-140-3p, miR-33b-3p and miR-671-3p as potential osteoarthritis biomarkers involved in metabolic processes. *Clin Epigenetics.* 2017;9:127
137. 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.
138. Meisel PJ, Reifemberger R, Haase M, Nauck C, Bandt, Kocher T. Women are periodontally healthier than men, but why don't they have more teeth than men? *Menopause,* 2008;15(2):270–275.
139. Pérez-Chaparro PJ, Duarte PM, Shibli JA, et al. The Current Weight of Evidence of the Microbiologic Profile Associated With Peri-Implantitis: A Systematic Review. *J Periodontol.* 2016;87(11):1295-1304.
140. Pérez-Chaparro PJ, Gonçalves C, Figueiredo LC. Newly identified pathogens associated with periodontitis: a systematic review. *J Dent Res.* 2014;93(9):846-858.
141. Planello AC, Singhanian R, Kron KJ, Bailey SD, Roulois D, Lupien M. Pre-neoplastic epigenetic disruption of transcriptional enhancers in chronic inflammation. *Oncotarget.* 2015;7:1–15.
142. Pöllänen MT, Laine MA, Ihalin R, Uitto VJ. Host-bacteria crosstalk at the dentogingival junction. *International Journal of Dentistry.* 2012;2012(821383):1-14.
143. Prakash G, Umar M, Ajay S. COX-2 gene polymorphisms and risk of chronic periodontitis: a case-control study and meta-analysis. *Oral Diseases.* 2015;21.
144. Preshaw PM, Taylor JJ. How has research into cytokine interactions and their role in driving immune responses impacted our understanding of periodontitis? *J Clin Periodontol.* 2011;38.
145. Pritchard CC, Cheng HH, Tewari M. MicroRNA profiling: approaches and considerations. *Nat Rev Genet.* 2012;13(5):358-369.
146. Quinn J.J, Chang H.Y. Unique features of long non-coding RNA biogenesis and function. *Nat. Rev. Genet.* 2016;17:47–62.

147. Chan JJ, Tay Y. Noncoding RNA:RNA Regulatory Networks in Cancer. *Int J Mol Sci.* 2018;19(5):1310.
148. Ramírez-Salazar EG, Carrillo-Patiño S, Hidalgo-Bravo A, et al. Serum miRNAs miR-140-3p and miR-23b-3p as potential biomarkers for osteoporosis and osteoporotic fracture in postmenopausal Mexican-Mestizo women. *Gene.* 2018;679:19-27.
149. Rhodin K, Divaris K, North KE, Barros SP, Moss K, Beck JD, Offenbacher S. Chronic periodontitis genome-wide association studies: gene-centric and gene set enrichment analyses. *J Dent Res.* 2014 Sep;93(9):882-90.
150. Rodriguez A, Griffiths-Jones S, Ashurst JL, Bradley A. Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Res.* 2004;14:1902–1910.
151. Ruby JG, Jan CH, Bartel DP. Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing. *Nature* 2007;448:83–6.
152. Saito A, Horie M, Ejiri K, et al. MicroRNA profiling in gingival crevicular fluid of periodontitis-a pilot study. *FEBS Open Bio.* 2017;7(7):981-994.
153. Sakellari D, Katsares V, Georgiadou M, Kouvatsi A, Arsenakis M, Konstantinidis A. No correlation of five gene polymorphisms with periodontal conditions in a Greek population. *J Clin Periodontol.* 2006;33(11):765–70.
154. Sánchez-Pernaute, O, Ospelt, C, Neidhart, M, Gay, S. Epigenetic clues to rheumatoid arthritis. *J Autoimmun.* 2008;30(1–2):12–20.
155. Sanz-Rubio D, Martin-Burriel I, Gil A. Stability of Circulating Exosomal miRNAs in Healthy Subjects. *Sci Rep.* 2018;8(1):10306.
156. Schaefer AS, Richter GM, Nothnagel M. COX-2 is associated with periodontitis in europeans. *Journal of Dental Research.* 2010;89(4):384–388.
157. Setti G, Pezzi ME, Viani MV, et al. Salivary MicroRNA for Diagnosis of Cancer and Systemic Diseases: A Systematic Review. *Int J Mol Sci.* 2020;21(3):907.
158. Shahrokhi SZ, Saeidi L, Sadatamini M, Jafarzadeh M, Rahimipour A, Kazerouni F. Can miR-145-5p be used as a marker in diabetic patients? *Arch Physiol Biochem.* 2020;1-6.
159. Shapira, L, Wilensky, A. & Kinane, D. F. Effect of genetic variability on the inflammatory response to periodontal infection. *J. Clin. Periodontol.* 2005;32:72–86
160. Shimizu C, Kim J, Stepanowsky P, et al. Differential expression of miR-145 in children with Kawasaki disease. *PLoS One.* 2013;8(3):e58159.
161. Shiroddria S, Smith J, McKay IJ, Kennett CN, Hughes FJ. Polymorphisms in the IL-1A gene are correlated with levels of interleukin-1 $\alpha$  protein in gingival crevicular fluid of teeth with severe periodontal disease. *J Dent Res.* 2000;79(11):1864–9.

162. Shomali N, Shirafkan N, Duijf PHG, ir kt. Downregulation of miR-146a promotes cell migration in Helicobacter pylori-negative gastric cancer. *J Cell Biochem.* 2019;120(6):9495-9505.
163. Smit MD, Westra J, Vissink A, ir kt. Periodontitis in established rheumatoid arthritis patients: A cross-sectional clinical, microbiological and serological study. *Arthritis Res Ther.* 2012;14:222.
164. Soga Y, Nishimura F, Ohyama H, Maeda H, Takashiba S, Murayama Y. Tumor necrosis factor-alpha gene (TNF $\alpha$ )-1031/-863,-857 single-nucleotide polymorphisms (SNPs) are associated with severe adult periodontitis in Japanese. *J Clin Periodontol.* 2003;30(6):524-31.
165. Solhjoo S, Mahmoudzadeh-Sagheb H, Heidari Z, Hashemi M, Rigi Ladez MA. Association between TNF- $\alpha$  (- 308 G  $\rightarrow$  a) gene polymorphism and chronic periodontitis. *Zahedan J Res Med Sci.* 2014;16(2):10-4
166. Song B, Zhang YL, Chen LJ, Zhou T, Huang WK, Zhou X, ir kt. The role of Toll-like receptors in periodontitis. *Oral Diseases.* 2017;23(2):168-180.
167. Stashenko P, Fujiyoshi P, Obernesser MS, Prostack L, Haffajee AD, Socransky SS. Levels of interleukin 1 beta in tissue from sites of active periodontal disease. *J Clin Periodontol.* 1991;18(7):548-54.
168. 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;91(10):934-940.
169. Su-Hwan Kim, Su-Yeon Lee, Yong-Moo Lee, Young-Kyoo Lee, MicroRNAs as biomarkers for dental diseases, *Singapore Dental Journal*, 2015;36:18-12
170. Sun JL, Meng HX, Cao CF. Relationship between vitamin D receptor gene polymorphism and periodontitis. *J Periodontal Res.* 2002;73(4):263-7.
171. Nakajima T, Honda T, Domon K. Periodontitis- associated up-regulation of systemic inflammatory mediator level may increase the risk of coronary heart disease *J Periodontal Res*, 2010;45(1)116-122
172. Nguyen-Hieu T, Khelaifia S, Aboudharam G, Drancourt M. Methanogenic archaea in subgingival sites: a review, *APMIS* 2013;121(6)467-477.
173. Tachi Y, Shimpuku H, Nosaka Y. Vitamin D receptor gene polymorphism is associated with chronic periodontitis. *Life Sci.* 2003;73(26):3313-21.
174. Teng L, Meng R. Long Non-Coding RNA MALAT1 Promotes Acute Cerebral Infarction Through miRNAs-Mediated hs-CRP Regulation. *J Mol Neurosci* 69, 2019;494-504.

175. Theilade E, Wright W. H, Jensen SB ir Loe H. Experimental gingivitis in man. *J. Periodontal Res.* 1996;1:1–13.
176. Trombelli, L. ir kt. Modulation of clinical expression of plaque-induced gingivitis. II. Identification of “high-responder” and “low-responder” subjects. *J. Clin. Periodontol.* 2004;31, 239–252.
177. Trombelli L, ScapoliC, Tatakis DN ir Grassi L. Modulation of clinical expression of plaque-induced gingivitis: effects of personality traits, social support and stress. *J. Clin. Periodontol.* 32, 2005;1143–1150.
178. Valinluck V, Sowers LC. Endogenous cytosine damage products alter the site selectivity of human DNA maintenance methyltransferase DNMT1. *Cancer Res.* 2007;67:946–50.
179. Vikram V, Ramakrishnan T, Anilkumar K, Ambalavanan N. Changes in transforming growth factor-beta1 in gingival Crevicular fluid of patients with chronic periodontitis following periodontal flap surgery. *J Clin Diagn Res.* 2015;9(2):1.
180. W.G. Wade, Detection and culture of novel oral bacteria, oral microbial ecology, *Curr. Res. New Perspect.* (2013) 27.
181. Wang L, Wu F, Song Y, ir kt. Long noncoding RNA related to periodontitis interacts with miR-182 to upregulate osteogenic differentiation in periodontal mesenchymal stem cells of periodontitis patients. *Cell Death Dis.* 2016;7(8):e2327. Published 2016; 11.
182. Wang XB, Li PB, Guo SF, ir kt. circRNA\_0006393 promotes osteogenesis in glucocorticoid-induced osteoporosis by sponging miR-145-5p and upregulating FOXO1. *Mol Med Rep.* 2019;20(3):2851-2858.
183. Weng H, Yan Y, Jin Y.-H, Meng X.-Y, Mo Y.-Y, Zeng X.-T. Matrix metalloproteinase gene polymorphisms and periodontitis susceptibility: a meta-analysis involving 6,162 individuals. *Scientific Reports.* 2016;6.
184. Wilczyński M, Żytko E, Szymańska B, ir kt. Expression of miR-146a in patients with ovarian cancer and its clinical significance. *Oncol Lett.* 2017;14(3):3207-3214.
185. Xiao YQ, Freire-de-Lima CG, Schiemann WP, Bratton DL, Vandivier RW, Henson PM. Transcriptional and translational regulation of TGF-beta production in response to apoptotic cells. *J Immunol.* 2008;181:3575–85.
186. Xiong T, Du Y, Fu Z, Geng G. MicroRNA-145-5p promotes asthma pathogenesis by inhibiting kinesin family member 3A expression in mouse airway epithelial cells. *J Int Med Res.* 2019;47(7):3307-3319.
187. Zandbergen, D, Slot, D. E, Niederman, R.& Van der Weijden, F. A. The concomitant administration of systemic amoxicillin and metronidazole compared to scaling and root



- planing alone in treating periodontitis: = a systematic review =. *BMC Oral Health* 16, 27 (2016).
188. Zhang H, Jiang M, Liu Q, Han Z, Zhao Y, Ji S. miR-145-5p inhibits the proliferation and migration of bladder cancer cells by targeting TAGLN2. *Oncol Lett.* 2018;16(5):6355-6360.
  189. Zhang Y, Wen X, Hu XL, Cheng LZ, Yu JY, Wei ZB. Downregulation of miR-145-5p correlates with poor prognosis in gastric cancer. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2016;20(14):3026-3030.
  190. Zhang J, Chen H, Leung RKK, ir kt. Aberrant miR-145-5p/ $\beta$ -catenin signal impairs osteocyte function in adolescent idiopathic scoliosis [published online ahead of print, 2018 Jun 15]. *FASEB J.* 2018;fj201800281.
  191. Zhang S, Barros SP, Niculescu MD, Moretti AJ, Preisser JS, Offenbacher S. Alteration of PTGS2 promoter methylation in chronic periodontitis. *J Dent Res.* 2010;89:133–7.