

WARSZAWSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY

WYDZIAŁ LEKARSKO-DENTYSTYCZNY

ZAKŁAD ORTODONCJI

Lek. dent. Karolina Elżbieta Kaczor-Urbanowicz

**IDENTYFIKACJA WYBRANYCH BIOMARKERÓW ŚLINY
W DIAGNOSTYCE RESORPCJI KORZENI ZĘBÓW U PACJENTÓW
LECZONYCH ORTODONTYCZNIE**

Praca na stopień doktora nauk medycznych

Promotor

Dr hab. n. med. Małgorzata Zadurska

WARSZAWA 2015

STRESZCZENIE

Wstęp

Resorpcja korzeni zębów jest jedną z najczęstszych jatrogennych konsekwencji leczenia ortodontycznego. Współcześnie dostępna metoda oceny klinicznej stanu korzeni zębów to głównie badanie radiologiczne. Ma ono jednak wiele ograniczeń i niedoskonałości, takich jak napromieniowanie pacjenta, rozpoznanie dopiero w określonym stadium zaawansowania choroby czy też niemożność monitorowania aktywności procesu. Zachodzi zatem konieczność poszukiwania bardziej wrażliwych, bezpieczniejszych i czulszych metod diagnostycznych wykrywania resorpcji korzeni zębów. Analiza proteomiczna śliny ludzkiej może stanowić alternatywną i nieinwazyjną metodę diagnostyczną.

Cele

Celem niniejszego projektu badawczego było wykrycie panelu potencjalnych biomarkerów białkowych obecnych w ślinie ludzkiej, za pomocą metod analizy proteomicznej, pozwalających na wczesne rozpoznanie pacjentów podatnych na zwiększone ryzyko rozwoju resorpcji korzeni zębów spowodowanej leczeniem ortodontycznym (*ang. orthodontically induced inflammatory root resorption — OIIRR*).

Material i metody

Próbki niestymulowanej śliny ludzkiej zostały pobrane od 72 osób - wolontariuszy: 48 pacjentów ze zdiagnozowaną resorpcją korzeni zębów spowodowaną leczeniem ortodontycznym (31 kobiet i 17 mężczyzn) oraz 24 osób ogólnie zdrowych (13 kobiet i 11 mężczyzn) - stanowiących grupę kontrolną. Zdrowi pacjenci byli dopasowani wiekiem i płcią do osób wchodzących w skład grup ze zdiagnozowaną OIIRR i wybrani z grona osób niepoddanych wcześniejszemu leczeniu ortodontycznemu.

Radiologicznej ocenie poddano cztery górne zęby sieczne na podstawie zdjęć okołowierzchołkowych. Zdjęcia były wykonywane bezpośrednio po założeniu górnego aparatu ortodontycznego, w celu wykluczenia resorpcji korzeni zębów istniejącej jeszcze przed rozpoczęciem leczenia ortodontycznego i po 36 tygodniach (około 9 miesięcy) po jego założeniu. Następnie wszyscy pacjenci (młodzi w wieku: 10-20 lat oraz dorośli w wieku: 21-30 lat) zostali podzieleni ze względu na stopień zaawansowania resorpcji korzeni zębów na sześć następujących grup:

- I. umiarkowana lub ciężka resorpcja korzeni zębów, młodzi,

- II. umiarkowana lub ciężka resorpcja korzeni zębów, dorośli,
- III. łagodna resorpcja korzeni zębów, młodzi,
- IV. łagodna resorpcja korzeni zębów, dorośli,
- V. grupa kontrolna (bez resorpcji), młodzi,
- VI. grupa kontrolna (bez resorpcji), dorośli.

Z próbek śliny pobranych od pacjentów usunięto frakcje białek, których stężenie w ślinie ludzkiej jest największe, wykorzystując w tym celu metodę potrójnej deplecji. Następnie zbiorcze próbki śliny dla poszczególnych grup, poddano analizie proteomicznej przeprowadzonej przy zastosowaniu dwuwymiarowej elektroforezy żelowej oraz ilościowej spektrometrii masowej (qMS). Wyniki badań poddano analizie bioinformatycznej, w celu podziału wykrytych biomarkerów dla OIIRR ze względu na pełnioną funkcję. Następnie przeprowadzono analizę zależności funkcyjnych wykrytych białek w grupie ze zdiagnozowaną OIIRR w celu wykrycia potencjalnych mechanizmów patogenetycznych OIIRR. Końcowym etapem opracowania danych było przeprowadzenie walidacji wyników uzyskanych za pomocą qMS dla wybranych 4 najważniejszych potencjalnych diagnostycznych biomarkerów z wykorzystaniem metody Western blot.

Wyniki

Zastosowanie metody potrójnej deplecji przed wykonaniem analizy proteomicznej znacznie zwiększyło zdolność identyfikacji nowych biomarkerów. Analiza przeprowadzona za pomocą ilościowej spektrometrii masowej (qMS) ujawniła 772 proteiny. Wśród nich wykryto 244 nowych potencjalnych biomarkerów białkowych u młodych pacjentów ze zdiagnozowaną umiarkowaną lub ciężką resorpcją korzeni zębów i 58 - u osób dorosłych. Z przeglądu najnowszej literatury wynika, że wykryte białka o znacząco zwiększonym profilu ekspresji w grupach osób ze zdiagnozowaną OIIRR nie zostały zidentyfikowane nigdy wcześniej. Ponadto analiza bioinformatyczna protein śliny z ich ponad 3-krotnym wzrostem wśród młodych pacjentów z umiarkowaną lub ciężką resorpcją korzeni zębów w porównaniu do odpowiadającej im grupy kontrolnej ujawniła grupy funkcyjne białek związane z ostrymi, dynamicznymi procesami, tj. ostrą odpowiedzią zapalną, reakcją obronną lub odpowiedzią na zranienie. Natomiast w grupie osób dorosłych, powyższa analiza wykryła grupy funkcyjne protein związane z procesami bardziej przewlekłymi, przebiegającymi znacznie wolniej - adhezją komórek lub regulacją apoptozy. Podobnie przeprowadzona analiza zależności funkcyjnych białek ze zwiększoną ekspresją profilu u osób ze zdiagnozowaną umiarkowaną

lub ciężką resorpcją korzeni zębów umożliwiła wykrycie potencjalnych mechanizmów patogenetycznych, odmiennych dla różnych grup wiekowych. Wśród osób młodych, wykryto dwa mechanizmy: pierwszy, związany z kompleksem regulacji cytoszkieletu aktyny i drugi – związany z fagocytozą zależną od receptorów Fc gamma. U dorosłych pacjentów ujawniono mechanizm związany z adhezją ogniskową. Walidacja za pomocą metody Western blot wykrytych wybranych 4 najważniejszych potencjalnych biomarkerów białkowych, tj. intelektualiny-1, glikoproteiny alfa-2-HS, kompleksu białkowego Arp2/3 i alfa-kolagenu typu (COL1A1) wykazała podobne trendy zmian w profilu ekspresji powyższych białek do uzyskanych w wyniku qMS, co potwierdziło wiarygodność wyników spektrometrii masowej.

Wnioski

Zastosowanie nowoczesnej metodologii i analizy proteomicznej śliny umożliwiło wykrycie panelu nowych biomarkerów diagnostycznych dla resorpcji korzeni zębów spowodowanej leczeniem ortodontycznym. Ujawniło także potencjalne mechanizmy patogenetyczne, biorące udział w rozwoju tej patologii, odmienne dla osób młodych i dorosłych. Powyższe relacje dostrzeżone po raz pierwszy, mogą stanowić bodziec do dalszych badań w dziedzinie ortodontyki. Analiza proteomiczna śliny ludzkiej, ujawniając potencjalne biomarkery diagnostyczne, staje się nowym cennym narzędziem badawczym podatności indywidualnej pacjenta na rozwój resorpcji korzeni zębów spowodowanej leczeniem ortodontycznym.