

Veterinarski fakultet

Sveučilište u Zagrebu

Klara Marić i Petra Šoštarić

Biomarkeri periodontalnih bolesti izdvojeni iz sline pasa

Zagreb, 2017.

Ovaj rad izrađen je na Zavodu za farmakologiju i toksikologiju i na Klinici za kirurgiju, ortopediju i oftalmologiju Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom mentora doc. dr. sc. Hrvoja Valpotića i dr. sc. Diane Brozić te je predan na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade Sveučilišta u Zagrebu u akademskoj godini 2016./2017. U istraživanju su korišteni uzorci i rezultati pretraga koje je prikupila dr. sc. Marija Lipar u okviru svojeg obavljanja veterinarske djelatnosti na Klinici za kirurgiju, ortopediju i oftalmologiju. Rad je izrađen u sklopu potpore Sveučilišta „Primjena bezalkoholne otopine propolisa kod periodontalnih bolesti pasa i mačaka“ pod vodstvom doc. dr. sc. Jelene Šuran.

Popis kratica

ALP - alkalna fosfataza (engl. *alkaline phosphatase*)

ALT - alanin-aminotransferaza (engl. *alanine aminotransferase*)

AST - aspartat-aminotransferaza (engl. *aspartate aminotransferase*)

Sadržaj

Uvod	1
Hipoteza	3
Opći i specifični ciljevi rada.....	3
Materijali i metode	4
Rezultati	5
Rasprava	8
Zaključci.....	11
Zahvale	12
Popis literature.....	13
Sažetak	16
Summary	17
Životopisi	18

Uvod

Razvoj periodontalnih bolesti kod pasa započinje taloženjem bakterijskog plaka kojeg čine nakupine bakterija i produkti njihovog metabolizma te ostaci epitelnih i upalnih stanica (COLMERY i FROST, 1986.). Potom, mineralizacijom supragingivalnog i subgingivalnog plaka dolazi do formiranja zubnog kamenca čiji sastav čine kristalizirane soli kalcijevog karbonata i kalcijevog fosfata u slini na površini zuba (LEGEROS i SHANNON, 1979.). Nakupljanje bakterijskog plaka i zubnog kamenca pogodovati će razvoju gingivitisa: reverzibilne upalne reakcije u kojoj ne dolazi do prekida kontinuiteta gingivalnog epitela na površini korijena zuba (HENNET i HARVEY, 1992.). Daljnjim nakupljanjem plaka ispod gingivalnog epitela i njegove mineralizacije može doći do ireverzibilne destrukcije periodontalnog ligamenta, alveolarnog koštanog tkiva i posljedično ispadanja zuba i razvoja periodontitisa (HARVEY, 1998.; HARVEY, 2005.).

Veliki je broj biološki aktivnih tvari koje nastaju tijekom procesa formiranja zubnog plaka, kamenca, gingivitisa te periodontitisa koje mogu poslužiti kao biomarkeri periopatogenog procesa. Dijagnostika periodontalnih bolesti uglavnom se oslanja na klinički pregled i vizualnu inspekciju usne šupljine što predstavlja izazov u dijagnostici rane faze periodontalnih bolesti, dok se jasna klinička slika upale uočava kada je već došlo do opsežnih, ireverzibilnih promjena u periodontalnim strukturama (BRINKMANN i sur., 2011.). Tijekom zadnja dva desetljeća u humanoj medicini slina se koristi za rano otkrivanje i kontrolu bolesti, određivanje koncentracije lijekova i drugih tvari u organizmu te dijagnostiku oralnih, autoimunih, kardiovaskularnih, zaraznih, zloćudnih i krvnih bolesti (AURER i sur., 2005.). Razlog je tomu što slina, za razliku od drugih tjelesnih tekućina, predstavlja jednostavan, jeftin i neinvazivan dijagnostički medij (MALAMUD i RODRIGUEZ-CHAVEZ, 2011.). Slina je stoga sve privlačnija u dijagnostici periodontalnih bolesti, zbog lake dostupnosti te jednostavnog i neinvazivnog prikupljanja, a ponajviše zbog važnih enzima koji se oslobađaju nakon ozljede i smrti stanica poput alkalne fosfataze (engl. *alkaline phosphatase*, ALP), alanin-aminotransferaze (engl. *alanine aminotransferase*, ALT) i aspartat-aminotransferaze (engl. *aspartate aminotransferase*, AST) (PAKNJAD i REZAEI, 2013.). Produkcija enzima javlja se kao obrambeni odgovor na periodontalne bolesti te stoga može ukazivati na oštećenje stanica u ranoj fazi bolesti kada se ona klinički još nije manifestirala (LUKE i sur., 2015.). U dijagnostičke svrhe najviše se koristi nestimulirana slina koja je sastavljena od mješavine serozne i mukozne sline, tekućine iz gingivnog sulkusa i transudata seruma koji uz stanice epitela sluznice sadrži i krvne stanice, mikroorganizme te čestice hrane sa sluznice. Sastavni dijelovi sline potječu prvenstveno iz okolnog

krvožilnog sustava, stoga su mnogi spojevi koji se nalaze u krvi prisutni i u slini i na taj način odražavaju patološka stanja organizma (FARNAUD i sur., 2010.). To svojstvo joj daje izuzetan potencijal za dijagnozu različitih bolesti (MILLER i sur., 2010.). No slina kao dijagnostički medij ima i određene nedostatke poput kontaminacije oralnim bakterijama, koje će se prilikom prikupljanja sline naći u uzorku i na taj način utjecati na pojedine promatrane parametre. Nadalje, slina nije jednostavan ultrafiltrat plazme već se proizvodi u sloju epitelnih stanica u acinusima žlijezda te se inicijalna sekrecija dalje modificira u duktusima, stoga će izlučena slina odražavati i njihov integritet (MILLER, 1994.).

Klinički značajni markeri periodontitisa koji bi imali ulogu u dijagnozi, terapiji i prognozi bolesti moraju imati karakteristike kao što su sposobnost klasifikacije periodontitisa te praćenje učinka liječenja (BRINKMANN i sur., 2011.). Do danas nije provedeno istraživanje kojim bi se utvrdilo mogu li biomarkeri u slini pasa poslužiti kao dijagnostički medij kod periodontalnih bolesti i na taj način preuzeti ulogu modela za periodontalne bolesti kod ljudi. Naime, patofiziologija nastanka bolesti u pasa odgovara onoj u ljudi. Također, histološke osobine zdravog i bolesnog periodonta su vrlo slične kod pasa i ljudi, a uz sve to se veže i visoka prevalencija bolesti u obje vrste (LINDHE i sur., 1975.; ALBUQUERQUE i sur., 2012.).

Hipoteza

U slini pasa sa periodontalnim bolestima biti će povišena razina biokemijskih pokazatelja patoloških procesa: ALT, AST, ALP i uree.

Opći i specifični ciljevi rada

Opći cilj ovog istraživanja bio je usporediti koncentracije praćenih biokemijskih markera u slini (ALT, AST, ALP i uree) unutar skupina utemeljenih na klasifikaciji periodontalnih promjena (stupnju nastanka kamenca i prisutnosti gingivitisa) kako bi se utvrdila opravdanost njihovog korištenja u svrhu pouzdanih biomarkera periodontalnih bolesti kod pasa.

Specifični cilj ovog rada bio je utvrditi koncentracije enzima AST, ALT i ALP te uree u slini pasa s različitim stupnjem promjena periodontalnih struktura unutar skupina čija je podjela temeljena na stupnjevanju indeksa zubnog kamenca (0-3) i upalnim promjenama na gingivi.

Materijali i metode

Životinje

U istraživanje je uključeno 20 zdravih pasa u dobi od 10 mjeseci do 13 godina, različitih pasmina i oba spola, nasumičnim odabirom. Nakon općeg kliničkog pregleda utvrđeno je kako u trenutku pregleda psi nisu pokazivali znakove bolesti s izuzetkom periodontalnih bolesti. U trenutku uzimanja uzoraka psi nisu primali terapiju. Psima je potom učinjen pregled usne šupljine i procjena plaka, kamenca i gingive po Loe i Silness skali (LOE, 1967.) na osnovu čega su podijeljeni u četiri skupine prema razini kamenca: kamenac nije prisutan (K0); supragingivalni kamenac prekriva manje od 1/3 krune (K1); supragingivalni kamenac prekriva više od 1/3 krune, ali manje od 2/3 krune, također prekriva cervikalni dio zuba (K2); kamenac prekriva više od 2/3 krune, cervikalni dio zuba i dio korijena (K3). S obzirom na pregled gingive psi su podijeljeni u dvije skupine: gingiva bez promjena (G0) i klinički promijenjena gingiva (Gprom) gdje su promjene varirale od blage upale s promjenom u boji, blagim edemom i bez krvarenja, do umjerene upale sa zacrvenjenom i edematoznom gingivom koja krvari na dodir i izrazito upaljenom gingivom s prisutnim edemom, ulceracijama koja spontano krvari.

Prikupljanje uzoraka sline i analiza

Spontano izlučena slina sakupljala se u sterilne zubarske tampone koji su stavljeni u usnu šuplinu u područje četvrtog maksilarnog premolara obostrano s bukalne strane. Prilikom uzorkovanja čeljusti su morale biti zatvorene da se onemogući gutanje tampona. Tampon se stavlja u epruvete SALIVETTE[®] (Sarstedt, Njemačka) sa citratom. Neposredno nakon uzorkovanja epruvete su centrifugirane u centrifugi Centric 400r u trajanju od 30 minuta na 5000 rpm (Tehtnica, Slovenija). Uzorci sline su potom razrijeđeni s destiliranom vodom u omjeru 1:1 i analizirani metodom apsorpcijske spektrofotometrije na aparatu VetTest (Idexx, SAD) pri čemu su mjereni slijedeći parametri: ALT, AST, ALP i urea.

Statistička analiza

Rezultati su obrađeni statistički korištenjem računalnog programa Statistica 2010 (Statistica, Tulsa, OK, USA) i prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija ($SV \pm SD$) te grafičkim prikazom. Normalnost distribucije provjerena je Shapiro-Wilks testom. Značajnost razlika između skupina K0, K1, K2 i K3 čije vrijednosti nisu slijedile normalnu raspodjelu, utvrđena je Kruskal-Wallisovom analizom varijance i potom je Dunnovim testom utvrđena značajnost razlika između

pojedinih skupina. Značajnost razlika između skupina G0 i Gprom utvrđena je Mann-Whitneyim U testom. Razlike su se smatrale statistički značajnim ako je $p < 0,05$.

Rezultati

Vrijednosti enzima u slini: ALT, AST, ALP te uree prikazane su u tablici 1. kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija. Na slici 1. grafički su prikazani rezultati usporedbe koncentracije biokemijskih parametra u slini pasa: urea, ALT, AST, ALP, na temelju klasifikacije prema utvrđenom indeksu kamenca (K0 - indeks kamenca 0, K1 - indeks kamenca 1, K2 - indeks kamenca 2, K3 - indeks kamenca 3). Za koncentraciju uree u slini utvrđena je statistički značajno viša vrijednost u skupini K0 u usporedbi sa K1 ($p < 0,05$) dok između preostalih skupina nije utvrđena statistički značajna razlika. Razina enzima ALT u slini nije se razlikovala između skupina dok je kod koncentracija enzima AST u slini utvrđena statistički značajna razlika između skupina K0 i K3 te K2 i K3 gdje je utvrđena značajno viša koncentracija enzima AST u skupini K3 ($p < 0,05$). Koncentracija enzima ALP utvrđena je u znatno višoj koncentraciji u skupini K2 u usporedbi sa skupinama K0 i K1 te u skupini K3 ako ih usporedimo sa skupinama K0 i K1. Nadalje, utvrđene vrijednosti praćenih biokemijskih pokazatelje: uree, ALT, AST i ALP prikazane su u dvije skupine prema kliničkom statusu gingive (G0 i Gprom) kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija u tablici 2. i grafičkim prikazom na slici 2. gdje su uspoređene skupine pasa kod kojih nije bilo promjene na gingivi (G0) i psi kod kojih je utvrđen gingivitis (Gprom) te su utvrđene statistički značajno više vrijednosti za enzime ALT ($p < 0,01$), AST ($p < 0,001$) i ALP ($p < 0,05$) kod pasa sa gingivitisom dok za razinu uree u slini nije utvrđena statistički značajna razlika između skupina.

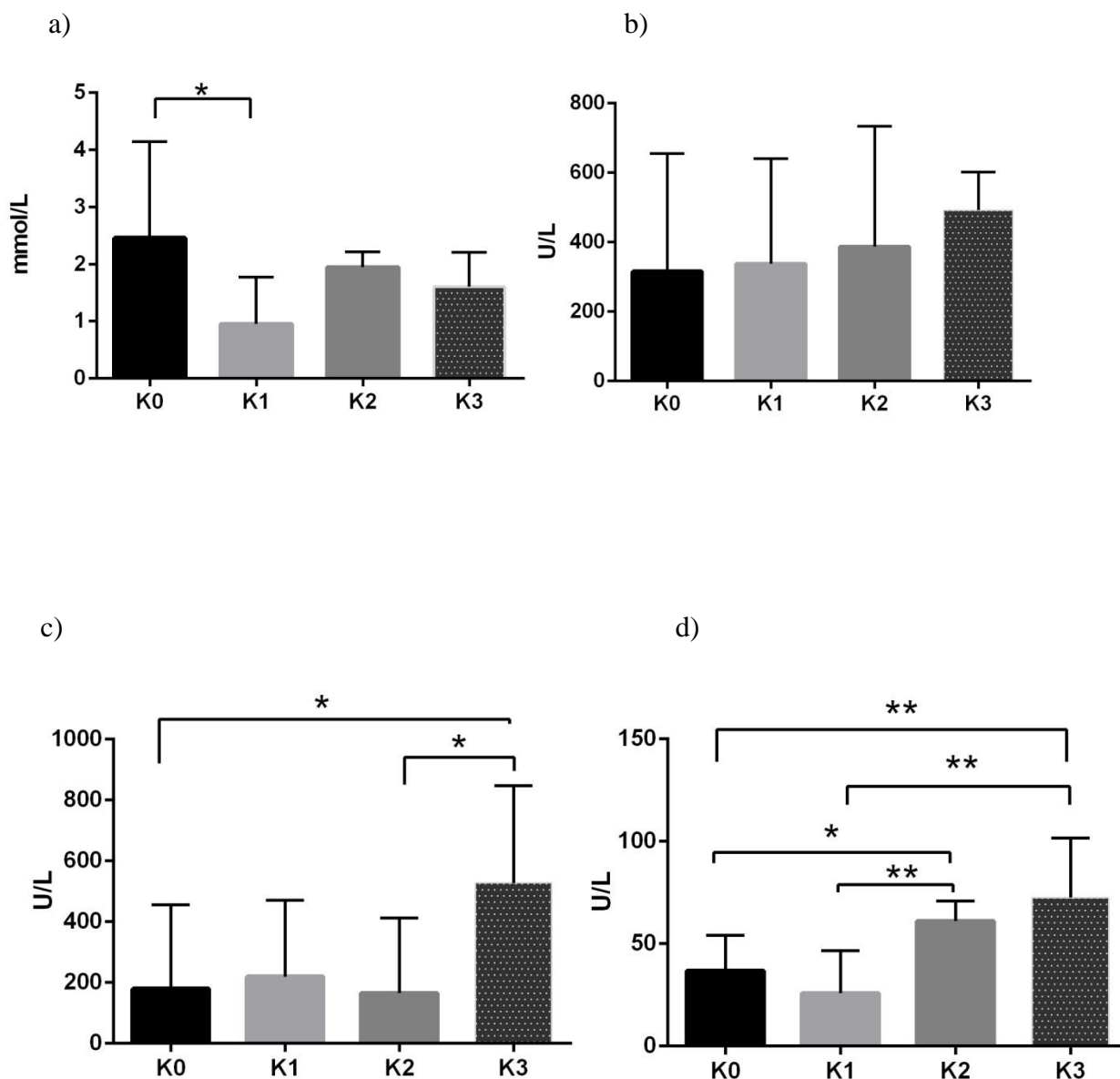
Tablica 1. Biokemijski parametri u slini pasa: usporedba prema utvrđenom indeksu kamenca (K0 - indeks kamenca 0, K1 - indeks kamenca 1, K2 - indeks kamenca 2, K3 - indeks kamenca 3)

	K0	K1	K2	K3 ¹
Urea (mmol/L)	2,46 \pm 1,68 ^a	0,85 \pm 0,65 ^a	1,94 \pm 0,27	1,6 \pm 0,61
ALT (U/L)	315,8 \pm 339,9	338 \pm 302,8	386,9 \pm 347,6	492,7 \pm 109,3
AST (U/L)	179,2 \pm 276,6 ^a	219,3 \pm 252,3	165,3 \pm 248 ^b	528 \pm 319,1 ^{ab}
ALP (U/L)	36,8 \pm 17,35 ^{aA}	25,75 \pm 21 ^{BC}	61 \pm 9,99 ^{aB}	72,5 \pm 29,11 ^{AC}

¹SV, srednja vrijednost \pm SD, standardna devijacija

^{abc}Jednako slovo označava značajne razlike ($p < 0,05$) između vrijednosti unutar istog retka.

^{ABC}Jednako slovo označava značajne razlike ($p < 0,01$) između vrijednosti unutar istog retka.



Slika 1. Grafički prikaz biokemijskih parametra u slini pasa na temelju usporedbe prema utvrđenom indeksu kamenca (K0 - indeks kamenca 0, K1 - indeks kamenca 1, K2 - indeks kamenca 2, K3 - indeks kamenca 3): a) koncentracija uree; b) koncentracija ALT-a c) koncentracija AST-a d) koncentracija ALP-a. * Statistička značajnost na razini $p < 0,05$.; ** statistička značajnost na razini $p < 0,01$.; *** statistička značajnost na razini $p < 0,001$.

Tablica 2. Biokemijski parametri u slini pasa: usporedba prema promjenama na gingivi (G0 - gingiva bez promjena; Gprom - gingivitis)

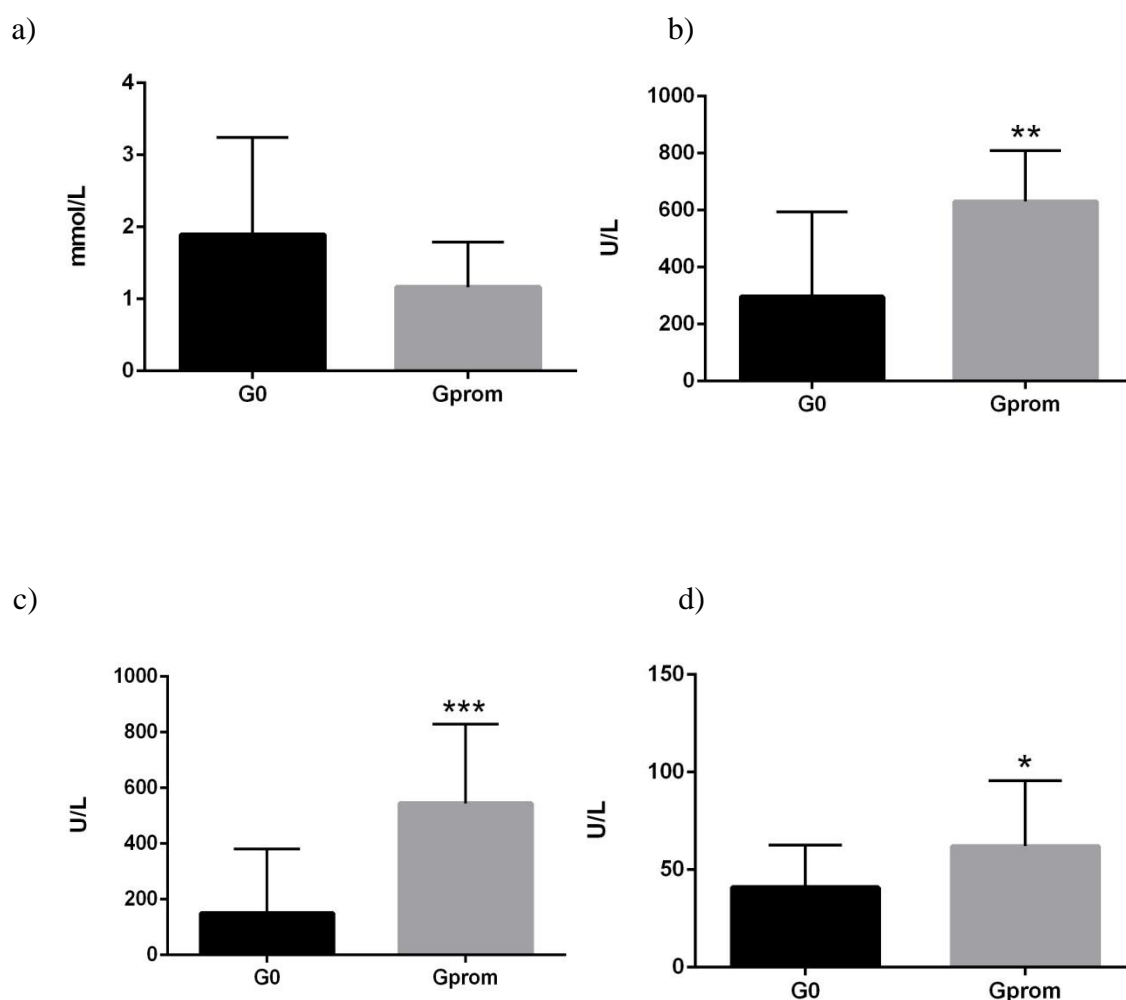
	G0	Gprom ¹
Urea (mmol/L)	1,89 ± 1,35	1,167 ± 0,63
ALT (U/L)	296,2 ± 297,3 ^A	630,3 ± 178,9 ^A
AST (U/L)	150,6 ± 230,2 ^a	544,8 ± 285 ^a
ALP (U/L)	40,91 ± 21,79 ^a	62 ± 33,74 ^a

¹SV, srednja vrijednost ± SD, standardna devijacija

^aJednako slovo označava značajne razlike (p<0,05) između vrijednosti unutar istog retka.

^AJednako slovo označava značajne razlike (p<0,01) između vrijednosti unutar istog retka.

^aJednako slovo označava značajne razlike (p<0,001) između vrijednosti unutar istog retka.



Slika 2. Grafički prikaz biokemijskih parametra u slini pasa na temelju usporedbe prema promjenama na gingivi (G0 - gingiva bez promjena; Gprom - gingivitis): a) koncentracija uree; b) koncentracija ALT-a c) koncentracija AST-a d) koncentracija ALP-a. * Statistička značajnost na razini p<0,05.; ** statistička značajnost na razini p<0,01.; *** statistička značajnost na razini p<0,001.

Rasprava

Poput krvi i slina je složena tekućina koja sadrži proteine, enzime, ione i druge molekule koje odražavaju fiziološki status organizma, stoga je u slini moguće odrediti i pratiti biomarkere poput enzima koji odražavaju upalni odgovor organizma (AURER i sur., 2005.).

Enzim ALT ima vrlo važnu ulogu u metabolizmu aminokiselina, bjelančevina i ugljikohidrata. Lokaliziran je u citoplazmi stanica, a nalazi se u gotovo svim organima, osim u kostima i zubima. ALT je tipičan citoplazmatski enzim, a aktivnost mu se mijenja već pri promjeni propusnosti stanične membrane (ŠTRAUS, 2009.). Razina ALT-a nije odražavala opseg periodontitisa kod ljudi no pri praćenju razine ALT-a u slini kod gingivitisa utvrđena je korelacija (TOTAN i sur., 2006.; DABRA i sur., 2012.). Sukladno tome kod pasa u skupini kod koje je utvrđen gingivitis (Gprom) pronađena je viša razina ALT-a, no kada su psi uspoređeni s obzirom na razinu zubnog kamenca nije utvrđena značajna razlika među skupinama. Razlog tomu je što indeks kamenca ne podrazumjeva visoki stupanj oštećenja periodontalnih struktura i odvijanje upalnog procesa no predstavlja predisponirajući faktor koji može dovesti do razvoja gingivitisa i periodontitisa. Razina ALT-a u slini može biti značajan pokazatelj uspješnosti liječenja gingivitisa jer odražava stupanj staničnog oštećenja i upale tkiva (NOMURA i sur., 2012.).

Enzim AST se nalazi u mnogim tkivima uključujući srce, mozak, pluća, mišiće i bubrege. Što se tiče lokalizacije unutar same stanice 40% enzima se nalazi u citoplazmi, a 60% u mitohondrijima te su to ujedno i njegova dva izoenzima (ŠTRAUS, 2009.). Razina AST-a povezana je s aktivnom destrukcijom tkiva pa tako i periodontalnog tkiva jer se nalazi u citoplazmi te se oslobađa prilikom smrti stanica (TODOROVIĆ i sur., 2006.). Varijacija koncentracije AST-a u slini, kada uspoređujemo različite stupnjeve razvoja periodontalnih bolesti kod ljudi, ne pokazuje značajnu povezanost s kliničkim parametrima kao što su stvaranje plaka i stupanj promjena na gingivi te krvarenja, no kod opsežnije kliničke slike gingivitisa i periodontitisa utvrđene su značajno više koncentracije AST-a u slini (CESCO RDE i sur., 2003.). Tijekom našeg istraživanja utvrđena je značajno viša razina AST-a kod pasa s gingivitisom u usporedbi sa psima čija gingiva nije bila klinički promjenjena, dok se razina AST-a u slini prilikom usporedbe pasa na temelju indeksa kamenca razlikovala između onih s najvišim indeksom (K3) i skupina K0 i K2. Taj podatak je sukladan pretpostavci da je korelacija razine AST-a u slini između opsežnih periodontalnih promjena i zdravih jedinki veća od one zabilježene kod blažih promjena (DEWAN i BHATIA, 2011.) Razina AST-a kod periodontitisa povezana je sa promjenama tkiva zahvaćenih nekrozom. Naime, fibroblasti porijeklom iz periodontalnog ligamenta stvaraju značajno manju količinu AST-a nego gingivalni epitel, rezultat čega je povećanje razine AST-a u slini kao posljedica citolize periodontalnih stanica

i/ili krvarenja zubnog mesa (TOTAN i sur., 2006.). To je sukladno istraživanjima koja dokazuju pozitivnu korelaciju inteziteta i opsega upale periodontalnih struktura i koncentracije AST-a u slini (CHAMBERS i sur., 1991.; TOTAN i sur., 2006.; PODZIMEK i sur., 2016). Nakon provedbe terapije koja je rezultirala smanjenjem upale zahvaćenih struktura dolazi do pada razine AST-a u slini što ga čini pogodnim biomarkerom za praćenje uspješnosti terapije periodontalnih bolesti (NOMURA i sur., 2012.).

Enzim ALP se u organizmu nalazi u multimolekularnim oblicima od kojih su neki izoenzimi, a drugi izoforme nastale nakon sinteze enzima, te se govori o jetrenoj, koštanoj, crijevnoj, bubrežnoj i placentarnoj ALP (ŠTRAUS, 2009.). ALP je enzim membrana stanica koji hidrolizira veze monofosfatnih estera pri lužnatom pH, povećavajući koncentraciju fosfatnih iona lokalno te ima bitna ulogu u građi periodonta jer je fiziološki dio periodontalnog ligamenta, gradi korijen i održava čvrstoću zuba te sudjeluje u homeostazi kosti (LOOS i TJOA, 2005.). Povećanje koncentracije ALP-a u slini upućuje ne samo na prisutnost patološkog procesa već i na destruktivne procese kojima je zahvaćena i alveolarna kost ukazujući na znatno uznapredovalu periodontalnu bolest sa lošijom prognozom (TODOROVIĆ i sur., 2006.; YOSHIE i sur., 2007.). ALP u slini može biti podrijetlom i iz leukocitnih granula i iz mikroorganizama u usnoj šupljini, uključujući Gram negativne uzročnike u subgingivalnom plaku. Posljedično tomu, kod gingivitisa i periodontitisa ljudi utvrđene su značajno više razine ovog enzima u slini nego kod zdravih kontrola (DABRA i SINGH, 2012.). Naime, ALP otpuštaju sekundarne granule neutrofila, a koncentracija mu značajno raste s taloženjem plaka i pojačanjem upale (KUMAR i SHARMA, 2011.). Značaj ALP-a kao upalnog biomarkera periodontalnih bolesti dokazali su Ishikawa i Cimasoni (1970.) utvrdivši značajnu korelaciju ($r = 0.49$; $p < 0.05$) razine ALP u tekućini iz gingivnog sulkusa i dubinu gingivalnog sulkusa. U skladu s navedenim, nakon liječenja periodontitisa primijećeno je da dolazi do smanjenja koncentracije ALP-a u slini kod ljudi te su zabilježene vrijednosti na razini onih utvrđenih kod zdravih ljudi što ga čini prikladnim biomarkerom za praćenje uspješnosti terapije periodontalnih bolesti (ZAMBON i sur., 1985.; YAN, 1995.; NUMABE i sur., 2004.). Navedeni rezultati sukladni su našem istraživanju gdje su utvrđene značajno više koncentracije ALP-a u slini kod pasa sa višim indeksom kamenca (K2 i K3) u usporedbi sa psima bez zubnog kamenca (K0) i kod pasa gdje je indeks kamenca bio 1 (K1). Također, razina ALP-a kod gingivitisa bila je značajno viša nego kod pasa čija gingiva nije pokazivala znakove upale.

Mjerenjem razine uree u slini kod ljudi utvrđeno je kako ima visoku osjetljivost i specifičnost u korelaciji sa periodontalnim bolestima kod ljudi (0,62 i 0,63) te su utvrđene značajno više koncentracije u bolesnika sa gingivitisom i periodontitisom (NOMURA i sur., 2012.; LUKE i sur., 2015.). No u našem istraživanju urea u slini nije pokazala karakteristike biomarkera periodontalnih

bolesti kod pasa. Naime, u skupini pasa K0 utvrđena je značajno viša koncentracija uree u slini u usporedbi sa skupinom K1 dok kod preostalih skupina nije zabilježena značajnost razlike u koncentracijama. Također, između skupina pasa sa gingivom bez promjena (G0) i skupine kod koje je utvrđen gingivitis (Gprom) nisu zabilježene statistički značajne razlike. Razlike u rezultatu utvrđenom kod ljudi i onih kod pasa, mogu se objasniti kroz razliku u sastavu i pH vrijednosti sline čovjeka i psa, što ukazuje na različit metabolizam žlijezda slinovnica između vrsta (LAVY i sur., 2012.). Također, na izlučivanje uree putem slinskih žlijezda kod pasa utječe razina salivacije i mjesto prikupljanja sline jer je koncentracija uree različita u parotidnoj i mandibularno-sublingvalnoj slini stoga sam postupak uzorkovanja kod subjekata uključenih u istraživanje može pridonijeti varijabilnosti rezultata (ZAMBON i sur., 1985.).

Enzimatski biomarkeri iz sline se određuju u humanoj medicini kako bi se utvrdilo postoji li povezanost njihove razine i periodontalnih bolesti no kod pasa slina se još uvijek premalo koristi kao dijagnostički medij. Također, do danas nije provedeno istraživanje koje bi dokazalo opravdanost korištenja upalnih biomarkera (ALT, AST, ALP i uree) u slini. Rezultati provedenog istraživanja ukazuju na značajne razlike u koncentraciji enzima između promatranih skupina, dok kod uree nisu zabilježeni rezultati na osnovu kojih je moguće ustanoviti povezanost opsega periodontalne bolesti kod pasa i koncentracije uree u slini.

Zaključci

1. Koncentracija enzimatskih upalnih biomarkera, AST i ALP kod pasa odražava indeks zubnog kamenca i opravdava njihovo korištenje kao pouzdanih biomarkera u praćenju periodontalnih bolesti.
2. Razina ALT u slini kod pasa nije se razlikovala prema opsežnosti prisutnog zubnog kamenca stoga nije dovoljno osjetljiv biomarker u praćenju periodontalnih bolesti u početnom stadiju njihova nastajanja.
3. Razine enzimatskih biomarkera (ALT, AST i ALP) u slini pasa predstavljaju pouzdan biomarker usljed upalnih promjena gingive stoga potvrđuju mogućnost korištenja psa kao modela gingivitisa kod ljudi.
4. Koncentracija uree u slini pasa nije slijedila korelaciju dokazanu kod ljudi u svrhu praćenja periodontalnih bolesti stoga se ne može smatrati prikladnim biomarkerom.
5. Jednostavni i robustni enzimatski biomarkeri ALT, AST i ALP iz sline pasa pogodni su biomarkeri periodontalnih bolesti koji se mogu koristiti u svrhu praćenju uspjeha terapije te u istraživanju i razvoju novih pripravaka za lokalnu primjenu.

Zahvale

Ovom prilikom zahvalile bi se mentorima doc. dr. sc. Hrvoju Valpotiću i dr. sc. Diani Brozić koji su pomogli kako u samom dizajnu pokusa tako i u njegovom izvođenju te interpretaciji podataka. Također zahvaljujem svim članovima istraživačkog tima „Primjena bezalkoholne otopine propolisa kod periodontalnih bolesti pasa i mačaka“, a posebno doc. dr. sc. Jeleni Šuran kao voditeljici istraživačkog tima koja je zaslužna za provedbu istraživanja. Naposljetku velika zahvala dr. sc. Mariji Lipar na prikupljenim uzorcima i pomoći pri analizi.

Popis literature

- ALBUQUERQUE, C., F. MORINHA, J. REQUICHA, T. MARTINS, I. DIAS, H. GUEDES-PINTO, E. BASTOS, C. VIEGAS (2012): Canine periodontitis: The dog as an important model for periodontal studies. *Vet. J.* 191, 299-305.
- AURER, A., K. JORGIC-SRDJAK, D. PLANCAK, A. STAVLJENIC-RUKAVINA, J. AURER-KOZELJ (2005): Proinflammatory factors in saliva as possible markers for periodontal disease. *Coll. Antropol.* 29, 435-439.
- BRINKMANN, O., L. ZHANG, W. V. GIANNOBILE, D. T. WONG (2011): Salivary biomarkers for periodontal disease diagnostics. *Exp. Opin. Med. Diagnost.* 5, 25-35.
- CESCO RDE, T., I. Y. ITO, R. F. DE ALBUQUERQUE (2003): Levels of aspartate aminotransferase (AST) in saliva of patients with different periodontal conditions. *J. Clin. Periodontol.* 30, 752-755.
- CHAMBERS, D. A., P. B. IMREY, R. L. COHEN, J. M. CRAWFORD, M. E. ALVES, T. A. MCSWIGGIN (1991): A longitudinal study of aspartate aminotransferase in human gingival crevicular fluid. *J. Periodontal. Res.* 26, 65-74.
- COLMERY, B., 3rd, P. FROST (1986): Periodontal disease. Etiology and pathogenesis. *Vet. Clin. North. Am. Small. Anim. Pract.* 16, 817-833.
- DABRA, S., K. CHINA, A. KAUSHIK (2012): Salivary enzymes as diagnostic markers for detection of gingival/periodontal disease and their correlation with the severity of the disease. *J. Indian Soc. Periodontol.* 16, 358-364.
- DABRA, S., P. SINGH (2012): Evaluating the levels of salivary alkaline and acid phosphatase activities as biochemical markers for periodontal disease: A case series. *Dent. Res. J.* 9, 41-45.
- DEWAN, A., P. BHATIA (2011): Evaluation of aspartate aminotransferase enzyme levels in saliva and gingival crevicular fluid with periodontal disease progression - a pilot study. *J. Int.Oral. Health* 3, 19-24.
- FARNAUD, S. J., O. KOSTI, S. J. GETTING, D. RENSHAW (2010): Saliva: physiology and diagnostic potential in health and disease. *Sci. World J.* 10, 434-456.

- HARVEY, C. E. (1998) : Periodontal disease in dogs. Etiopathogenesis, prevalence, and significance. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 28, 1111-1128.
- HARVEY, C. E. (2005) : Management of periodontal disease: understanding the options. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 35, 819-836.
- HENNET, P.R., C.E. HARVEY (1992): Natural development of periodontal disease in the dog: a review of clinical, anatomical and histological features. *J. Vet. Dent.* 9, 13-19.
- ISHIKAWA, I., G.CIMASONI (1970): Alkaline phosphatase in human gingival fluid and its relation to periodontitis. *Arch. Oral Biol.* 15, 1401-1404.
- KUMAR, R., G. SHARMA (2011): Salivary Alkaline Phosphatase level as Diagnostic marker for periodontal disease. *J. Int.Oral. Health* 3, 81.
- LAVY, E., D. GOLDBERGER, M. FRIEDMAN, D. STEINBERG (2012): pH values and mineral content of saliva in different breeds of dogs. *Isr. J. Vet. Med. Journal* 67, 244-248.
- LEGEROS, R. Z., I. L. SHANNON (1979): The crystalline components of dental calculi: human vs. dog. *J. Dent. Res.* 58, 2371-2377.
- LINDHE, J., S.-E. HAMP, H. LÖE (1975): Plaque induced periodontal disease in beagle dogs. *J. Periodontal Res.* 10, 243-255.
- LOE, H. (1967): The Gingival Index, the Plaque Index and the Retention Index Systems. *J. Periodontol.* 38, 610-616.
- LOOS, B. G., S. TJOA (2005): Host-derived diagnostic markers for periodontitis: do they exist in gingival crevice fluid? *Periodontol.* 2000 39, 53-72.
- LUKE, R., S. N. KHAN, P. S. IQBAL, R. R. SOMAN, J. CHAKKARAYAN, V. KRISHNAN (2015): Estimation of Specific Salivary Enzymatic Biomarkers in Individuals with Gingivitis and Chronic Periodontitis: A Clinical and Biochemical Study. *J. Int. Oral. Health.* 7, 54-57.
- MALAMUD, D., I. R. RODRIGUEZ-CHAVEZ (2011): Saliva as a Diagnostic Fluid. *Dent. Clin. North. Am.* 55, 159-178.
- MILLER, C. S., J. D. FOLEY, A. L. BAILEY, C. L. CAMPELL, R. L. HUMPHRIES, N. CHRISTODOULIDES, P. N. FLORIANO, G. SIMMONS, B. BHAGWANDIN, J. W. JACOBSON,

- S. W. REDDING, J. L. EBERSOLE, J. T. MCDEVITT (2010): Current developments in salivary diagnostics. *Biomark. Med.* 4, 171-189.
- MILLER, S. M. (1994): Saliva testing-a nontraditional diagnostic tool. *Clin. Lab. Sci.* 7, 39-44.
- NOMURA, Y., Y. SHIMADA, N. HANADA, Y. NUMABE, K. KAMOI, T. SATO, K. GOMI, T. ARAI, K. INAGAKI, M. FUKUDA, T. NOGUCHI, H. YOSHIE (2012): Salivary biomarkers for predicting the progression of chronic periodontitis. *Arch. Oral Biol.* 57, 413-420.
- NUMABE Y., A. HISANO, K. KAMOI, H. YOSHIE, K. ITO, H. KURIHARA (2004): Analysis of saliva for periodontal diagnosis and monitoring. *Periodontology* 40, 115–119.
- PAKNJAD M, A. REZAEI (2013): Salivary biochemical markers of periodontitis. *Rom. J. Biochem.* 50, 29–46.
- PODZIMEK, S., L. VONDRACKOVA, J. DUSKOVA, T. JANATOVA, Z. BROUKAL (2016): Salivary Markers for Periodontal and General Diseases. *Dis. Markers* ID 9179632.
- ŠTRAUS B. (2009): Enzimi. U: Štrausova Medicinska biokemija. (Čvorišćec D., I. Čepelak, Urednici), Medicinska naklada, Zagreb, str. 273-295.
- TODOROVIĆ, T., I. DOZIĆ, M. VICENTE-BARRERO, B. LJUSKOVIĆ, J. PEJOVIĆ, M. MARJANOVIĆ, M. KNEŽEVIĆ (2006): Salivary enzymes and periodontal disease. *Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal.* 11, 115-119.
- TOTAN, A., M. GREABU, C. TOTAN, T. SPINU (2006): Salivary aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase and alkaline phosphatase: possible markers in periodontal diseases? *Clin. Chem. Lab. Med.* 44, 612-615.
- YAN, F. (1995): Alkaline phosphatase level in gingival crevical fluid of peri-odontitis before and after periodontal treatment. *Chin. J. Stom.* 30, 255–266.
- YOSHIE, H., H. TAI, T. KOBAYASHI, E. ODA-GOU, Y. NOMURA, Y. NUMABE, K. ITO, H. KURIHARA, K. KAMOI (2007): Salivary enzyme levels after scaling and interleukin-1 genotypes in Japanese patients with chronic periodontitis. *J. Periodontol.* 78, 498-503.
- ZAMBON, J. J., M. NAKAMURA, J. SLOTS (1985): Effect of periodontal therapy on salivary enzymatic activity. *J. Periodontal Res.* 20, 652-659.

Sažetak

Klara Marić i Petra Šošarić

Studentice 5. i 4. godine Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Biomarkeri periodontalnih bolesti izdvojeni iz sline pasa

Klinički značajni biomarkeri periodontalnih bolesti koji imaju ulogu u dijagnostici, terapiji i prognozi bolesti moraju imati karakteristike sposobnosti klasifikacije periodontalnih promjena i praćenje učinka liječenja. Do danas nije provedeno istraživanje kojim bi se utvrdilo mogu li enzimatski biomarkeri i razina uree u slini pasa poslužiti kao dijagnostički medij kod periodontalnih bolesti. Stoga je cilj ovog istraživanja bio odrediti koncentracije enzimatskih biomarkera u slini pasa (ALT, AST i ALP) te uree i utvrditi njihove koncentracije unutar skupina pasa različitog stupnja zubnog kamenca i promjena na gingivi. U istraživanje je uključeno 20 zdravih pasa koji su podijeljeni u četiri skupine prema razini kamenca: K0, K1, K2, K3 i s obzirom na pregled gingive u dvije skupine: gingiva bez promjena (G0) i klinički promijenjena gingiva (Gprom). Razina enzima ALT u slini nije se razlikovala između skupina dok je koncentracija enzima AST u slini bila statistički značajno različita između skupina K0 i K3 te K2 i K3. Koncentracija enzima ALP utvrđena je u znatno višoj koncentraciji u skupini K2 u usporedbi sa skupinama K0 i K1 te u skupini K3 ako ih usporedimo sa skupinama K0 i K1. Kod pasa kod kojih je utvrđen gingivitis utvrđene su statistički značajno više vrijednosti za enzime ALT, AST, ALP. Koncentracija uree u slini nije pokazala korelaciju sa praćenim periodontalnim promjenama stoga se ne može smatrati pouzdanim biomarkerom periodontalnih bolesti. Nasuprot tomu enzimi ALT, AST i ALP pokazali su već utvrđene korelacije dokazane u slini kod ljudi stoga ih možemo smatrati potencijalnim biomarkerima u dijagnostici i praćenju terapijskog učinka u liječenju periodontalnih bolesti kod pasa kao i potencijalni dijagnostički model periodontalnih bolesti kod ljudi.

Ključne riječi: periodontalne bolesti, slina, enzimatski biomarkeri, urea, pas

Summary

Klara Marić and Petra Šoštarić

Salivary biomarkers for periodontal disease in dogs

Faculty of Veterinary Medicine, University of Zagreb, 5th and 4th year students

Clinically relevant biomarkers of periodontal disease that have a role in diagnostics, therapy and prognosis must have the ability of classification of the disease and follow-up treatment. To this date, no research has been conducted that could determine if enzymatic biomarkers and urea concentration in saliva of dogs can serve as a diagnostic tool for periodontal disease. The aim of this research was to measure salivary enzymes: ALT, AST and ALP as well as urea and to determine their concentration between groups of dogs assigned according to calculus index and gingival inflammation. Study included 20 healthy dogs that were divided into groups according to calculus index (K0, K1, K2, K3) and according to the presence of gingivitis (G0 and Gprom) in which saliva enzymes (ALT, AST, and ALP) and urea were determined. The level of ALT in saliva did not differ between groups, whereas AST concentration differed significantly between groups K0 and K3, and also between groups K2 and K3. We determined significantly higher concentration of ALP in K2 group compared to K0 and K1 and also in K3 group compared to K0 and K1. In a group of dogs with gingivitis (Gprom) we determined significantly higher concentrations of enzymes ALT, AST, and ALP. On the other hand the concentration of urea in saliva hasn't shown correlation with observed periodontal pathologies so it can't be classified as a biomarker. On the contrary, enzymes ALT, AST and ALP have shown a previously established correlation in human saliva with periodontal disease occurrence and severity so they can be classified as potential biomarkers in periodontal diseases diagnostics in dogs as well as a potential diagnostic model for human periodontal pathologies.

Key words: periodontal disease, saliva, enzymatic biomarkers, urea, dog

Životopisi

Klara Marić

Rođena 04.09.1993. u Zadru, Republika Hrvatska. Osnovnu školu sam završila u Zadru, kao i dvije srednje škole – opću gimnaziju Jurja Barakovića i glazbenu školu Blagoje Bersa, čime sam stekla zvanje glazbenika teoretičara. 2012. godine upisujem Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Od osnovne škole sudjelujem na atletskim natjecanjima čime sam se nastavila baviti do danas. 2015.g. sam ostvarila kategorizaciju Hrvatskog olimpijskog odbora kao vrstan sportaš. Kroz cijelokupno školovanje sam stekla znanje engleskog i talijanskog jezika te prvi stupanj znanja španjolskog i ruskog jezika.

Petra Šoštarić

Rođena 18.06.1994. u Koprivnici, Republika Hrvatska. Osnovnu školu sam završila u Novigradu Podravskom, a srednju školu-smjer farmaceutski tehničar u Koprivnici. 2013. godine upisujem Veterinarski fakultet u Zagrebu. Kroz školovanje sam stekla znanje engleskog jezika. Bavila sam se različitim izvanškolskim aktivnostima, uključujući likovne radionice i dramsku grupu.