

(12) **PARAIŠKOS APRAŠYMAS**

(21) Paraiškos numeris: **2021 004**  
(22) Paraiškos padavimo data: **2021-02-11**  
(41) Paraiškos paskelbimo data: **2022-08-25**

(71) Pareiškėjas:  
**VšĮ Vilniaus Universiteto ligoninės Žalgirio klinika,  
Žalgirio g. 117, Vilnius, LT**

(72) Išradėjas:  
**Alina RŪPIENĖ, LT  
Sonata JARMALAITĖ, LT  
Irena BUTRIMIENĖ, LT  
Eglė PUNCEVIČIENĖ, LT  
Kristina ŠNIPAITIENĖ, LT  
Adomas ROVAS, LT**

(74) Patentinis patikėtinis/atstovas:  
**Jurga PETNIŪNAITĖ, 51, AAA Law, A. Goštauto g.  
40B, Verslo centras „Dvyniai“, LT-03163 Vilnius, LT**

(54) Pavadinimas:

**Diagnosticinis miRNR rinkinys skirtas periodontito uždegiminio aktyvumo vertinimui  
pacientuose su reumatoidiniu artritu**

(57) Referatas:

Šis išradimas susijęs su mikro-RNR (miRNR), konkrečiai miR-140-3p, -145-5p, -146a-5p ir -195-5p, pritaikymu periodontito (PD) diagnostikai. Išradimas apima metodą ir rinkinį, skirtus PD uždegimo aktyvumui nustatyti organizmo skysčių mėginiuose, įskaitant dantenų vagelės skystį, seiles ir kraujo plazmą, tiek reumatoidiniu artritu sergantiems, tiek nesergantiems asmenims. Išradimas įvardina metodologinius žingsnius ir medžiagas, reikalingas mėginių surinkimui, RNR skyrimui, kDNR sintezei, kiekybinei atvirkštinės transkriptazės PGR ir duomenų analizei, siekiant nustatyti santykinį PD specifinių miRNR, konkrečiai miR-140-3p, -145-5p, -146a-5p ir -195-5p, kiekį. Rezultatai rodo, kad išanalizavus anksčiau minėtas miRNR galima jautriai ir specifiskai nustatyti PD.

## DIAGNOSTINIS miRNR RINKINYS SKIRTAS PERIODONTITO UŽDEGIMINIO AKTYVUMO VERTINIMUI PACIENTUOSE SU REUMATOIDINIŲ ARTRITU

### TECHNIKOS SRITIS

Išradimas priskiriamas medicinos technologijų sričiai, žinomos medžiagos mikro-RNR (miRNR) medicininis panaudojimas skirtas periodontito uždegiminio aktyvumo diagnostikai sergantiems ir nesergantiems reumatoidiniu artritu ir kitomis sisteminėmis ligomis, remiantis modifikuota organizmo skysčiuose (dantenu vagelės skystyje, seilėse ir plazmoje) aptinkamų miRNR surinkimo, išskyrimo bei identifikavimo metodika.

### TECHNIKOS LYGIS

Periodontitas (PD) yra lėtinė infekcinė liga, apibūdinama jungiamojo audinio uždegimine destrukcija, dėl kurios netenkama periodonto jungties ir rezorbuojasi alveolinis kaulas. PD yra labiausiai paplitusi lėtinė uždegiminė liga, kurios dažnis siekia nuo 10 proc. iki 70 proc. suaugusiųjų populiacijoje, priklausomai nuo amžiaus ir tyrimuose naudojamų diagnostinių kriterijų (1). Ligos paplitimas didėja proporcingai gyventojų amžiui – nustatyta, kad 70 proc. vyresnių nei 65 metų gyventojų serga PD (2). Atsižvelgiant į populiacijos senėjimo tendenciją bei didėjančią rizikos veiksnių sirgti PD pasireiškimą (nutukimas, cukrinis diabetas ir kt.), ateityje prognozuojamas didesnis PD paplitimas (3). Itin didelis PD paplitimas yra susijęs su ligos besimptomė eiga, dėl kurios asmenys kreipiasi gydymui tik pasireiškus vėlyviesiems ligos požymiams – pūliavimui iš dantenu, dantų paslankumui, dantų netekimui ir t.t. Nepaisant to, kad PD yra pagrindinė dantų netekimo priežastis, neigiama periodonto patologijos įtaka neapsiriboja vien pakitimais burnoje. Ilgai trunkantis, lėtinis anaerobinių bakterijų kiekio padidėjimas burnoje yra siejamas su didesne rizika sirgti bakterinės kilmės pneumonija, lėtine obstrukcine plaučių liga bei kitomis kvėpavimo sistemos ligomis bei vėžiniais susirgimais (4). Periodonto patogeninių bakterijų patekimas į kraujotaką kasdienių procedūrų metu (dantų valymo, kramtymo ir kt.) prisideda prie aterosklerozinių pakitimų formavimosi, didina infekcinio endokardito bei infarkto išsivystymo riziką (5, 6). Visgi didžiausią neigiamą poveikį organizmui PD sukelia dėl mažo intensyvumo lėtinio uždegimo, kuris aktyvuoja imuninę sistemą ir lemia padidėjusią uždegiminių mediatorių produkciją (7). Padidėjusi navikų nekrozės veiksnio (angl. *tumor necrosis factor α*, TNF-α), interleukino-6 (IL-6) ir kitų uždegiminių citokinų produkcija yra pagrindinis PD ir autoimunines ligas siejantis patogenezės mechanizmas (8). Labiausiai su PD siejama autoimuninė uždegiminė liga – reumatoidinis artritas (RA). PD dažnis pacientams, sergantiems RA, yra iki dviejų kartų didesnis lyginant su bendrąja populiacija bei gali paveikti net 97 proc. pacientų sergančių RA (9). Taip pat periodonto patologijos klinikinė eiga koreliuoja



su RA ligos aktyvumu, o po sėkmingo periodontologinio gydymo stebimas RA klinikinio aktyvumo sumažėjimas (10). PD ir RA ligų metu nustatoma padidėjusi uždegiminių citokinų produkcija, kuri paskatina jungiamojo ir kaulinio audinio rezorbciją (8). Taip pat ligas sieja panaši epigenetinė reguliacija: IL-6 geno promotoriaus metilinimas yra mažesnis tarp pacientų sergančių RA bei PD, lyginant su sveikais asmenimis, dėl ko nustatomas padidėjęs IL-6 kiekis kraujo serume (11).

Yra žinoma, kad uždegimą periodonto audiniuose inicijuoja mikroorganizmų sankaupos ant danties paviršiaus. Šių mikroorganizmų veiklos produktai aktyvuoja žmogaus imuninę sistemą, paskatindami limfocitų, makrofagų bei polimorfonuklearų infiltraciją į uždegimo židinį. Bakterijų lipopolisacharidų paskatinti makrofagai išskiria didelius kiekius uždegiminių citokinų: interleukiną-1 (IL-1), TNF- $\alpha$ , prostaglandiną E2 (PGE2) ir t.t. Tuo tarpu T limfocitai, aktyvuoti patogeninių bakterijų, produkuoja IL-1 bei limfotoksiną. Uždegiminiai citokinai lemia katabolinius procesus periodonto pažeidimo židinyje – paskatinama metaloproteinazių ir kitų fermentų, gebančių ardyti kolageną, veikla (12). Tiek bakterijų tiesioginė veikla, tiek imuninės sistemos ląstelių atsakas prisideda prie periodonto audinių ardymo ir ligos progresavimo (13). Nepaisant reikšmingos mikroorganizmų įtakos PD pradinėse stadijose, yra manoma, kad mikroorganizmų akumuliacija periodonto audiniuose tik 20 proc. padidina riziką sirgti pažengusia periodonto liga (14). Nuo uždegiminio atsako intensyvumo priklauso tolesnis ligos progresavimo greitis bei bendras neigiamas poveikis organizmui.

Uždegimas yra sudėtingas patofiziologinis mechanizmas, reguliuojamas įvairių mediatorių tarpusavio sąveikos. Įprastai uždegimo metu aktyvuoti imuninių ląstelių membranose esantys patogenų atpažinimo receptoriai paskatina branduolio veiksnio kapa B (angl. *nuclear factor kappa B*, NF- $\kappa$ B) aktyvaciją (15). NF- $\kappa$ B ląstelės branduolyje prisijungdamas prie specifinių DNR sekų inicijuoja taikininų genų transkripciją (16). Dėl to ląstelėje paskatinama uždegiminių citokinų, chemokinų, anti-apoptozinių veiksnių, adhezijos molekulių produkcija (16). Pagrindinių uždegiminių citokinų (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6) koncentracijos padidėjimas lemia imuninių ląstelių diferenciaciją ir migraciją į uždegimo vietą bei tolesnį uždegimo progresavimą. Kiekvienas uždegiminės kaskados etapas yra reguliuojamas neigiamais ir teigiamais grįžtamaisiais ryšiais. Ypač dideliu reguliaciniu potencialu pasižymi molekulės, veikiančios uždegimo mediatorius koduojančių genų transkripciją branduolyje ar transliaciją citoplazmoje. Pavyzdžiui, acetilkofermento A (Acetyl-CoA) paskatintas histonų acetilinimas lemia suaktyvėjusią interferono gama (IFN- $\gamma$ ) geno transkripciją branduolyje, o IFN- $\gamma$  skatina imuninių T ląstelių diferenciaciją (17). Tuo tarpu branduolyje transkribuotų genų raiška gali būti reguliuojama kito epigenetinio veiksnio – miRNR (20). Tai nedidelės (vidutiniškai 22 nukleotidų

ilgio), viengrandės, nekoduojančios RNR molekulės, kurios daugiausia neigiamai veikia genų raišką, prisijungdamos prie informacinės RNR (iRNR) ir, priklausomai nuo sekos atitikimo lygio, inicijuodamos transkripto degradaciją ar slopindamos transliaciją ribosomose ir tokiu būdu inhibuodamos specifinių baltymų sintezę (20). Uždegiminio atsako reguliavime dalyvauja įvairios miRNR. Remiantis 2018 metais atliktu Fushimi tyrėjų grupės tyrimu, miR-140-3p dalyvauja osteoblastų diferenciacijos procesuose, tarpininkaudama tarp Wnt3 ir TGF- $\beta$ 3 signalinių kelių, tačiau detalesnis mechanizmas kol kas dar nėra žinomas (19). Be to, Taguchi su bendraautoriais savo darbe išskiria šią miRNR kaip vieną iš potencialiausių biožymenų PD diagnostikai (20). Tuo tarpu miR-145 slopina IL-6 ir IL-8 raišką bei mažina IL-1 $\beta$  paskatintą membranų degradaciją (21, 22). Eksperimentiniame tyrime su pelėmis miR-145 inhibicija lėmė didesnę makrofagų infiltraciją bei uždegimą kepenyse, ir priešingai – eksperimentinis miR-145 raiškos padidinimas slopino makrofagų diferenciaciją, infiltraciją ir bendrą uždegimo intensyvumą (23). Taip pat uždegimo reguliacijoje reikšmingai dalyvauja ir miR-146a (24). Nepakankama miR-146a raiška yra siejama su uždegiminėmis bei autoimuninėmis ligomis – RA, sistetine raudonąja vilklige bei psoriaze (25). NF- $\kappa$ B skatina miR-146a raiškos padidėjimą, kuri, savo ruožtu, jungiasi prie patogeną atpažįstančių membranų receptorių ir slopina tolesnę NF- $\kappa$ B aktyvaciją (26). Tokiu neigiamu grįžtamuoju ryšiu miR-146a slopina tolimesnį uždegiminio atsako progresavimą. Be to, miR-146a mažina IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 bei TNF- $\alpha$  produkciją, aktyviųjų deguonies formų susidarymą, makrofagų chemotaksį ir tokiu būdu prisideda prie hipererginio uždegiminio atsako slopinimo (27, 28). Dėl šių savybių miR-146a yra laikoma viena daugiausiai žadančių molekulių įvairių uždegiminių ligų diagnostikai bei gydymui.

Akivaizdu, kad uždegiminio atsako intensyvumas yra pagrindinis diagnostinis ir prognostinis rodiklis vertinant PD eigą, tolesnio progresavimo riziką bei neigiamą sisteminį poveikį viso organizmo sveikatai. Visgi šiuo metu periodontologinėje praktikoje plačiai naudojami klinikiniai metodai – pilnas periodontologinis ištyrimas ir radiologinis ištyrimas – yra paremti dėl periodonto ligos jau įvykusios audinių destruktijos sunkumo įvertinimu, o ne uždegiminio aktyvumo nustatymu. Vienintelis ligos intensyvumo vertinimui naudojamas klinikinis parametras yra kraujavimo po zondavimo indeksas. Šis indeksas ne visada objektyviai atspindi ligos eigą, nes indekso tikslumas priklauso nuo daugelio veiksnių: klinicisto zondavimo įgūdžių, zondavimui naudojamos jėgos, paciento vartojamų vaistų ir kt. Verta išskirti, kad rūkančiam pacientui šio indekso taikymas nėra racionalus dėl dantenų kraujagyslių pokyčių. Akivaizdus naujų diagnostinių žymenų bei naujų diagnostinių metodų poreikis PD vertinti yra akcentuojamas 2018 m. Europos periodontologų draugijos (angl. *European Federation of*

*Periodontology*, EFP) ir Amerikos periodontologų akademijos (angl. *American Academy of Periodontology*, AAP) pasaulinio kongreso pranešime (29).

Seilės yra vienas iš organizmo skysčių ir laikomos tinkamiausia biologine terpe neinvazinei PD ir kitų ligų diagnostikai dėl kelių priežasčių (30). Pirmiausia, seilių surinkimas pacientui nesukelia diskomforto bei gali būti atliekamas ne tik specializuotoje gydymo įstaigoje, bet ir pirminės sveikatos priežiūros įstaigose, dėl ko didėja tikimybė nustatyti ligą ankstyvoje stadijoje – iki vėlyvų ligos simptomų pasireiškimo. Be to, seilėse aptinkamos įvairios lokaliai išskiriamos organinės kilmės medžiagos, įskaitant baltymus, metabolitus bei genetinę medžiagą. Kooijman vadovaujama tyrėjų grupė taiko baltymų kombinacijų identifikavimą seilėse, siekiant nustatyti lengvą ir pažengusį periodontitą (EP3553525). Kiekybiškai ir kokybiškai nustatoma baltymų piruvatkinazės (PK), matrikso metaloproteinazės-9 (MMP-9), S100 kalcij surišančio baltymo A9 (S100A9), S100 kalcij surišančio baltymo A8 (S100A8), hemoglobina sudarančių grandinių  $\beta$  (Hb-beta) kombinacija. Taip pat, siekiant atskirti lengvą PD nuo pažengusio, Chatterjea rekomenduoja seilėse aptinkamų IL-1 $\beta$ , IL-6, MMP-9, MMP-3 baltymų kombinacijos kokybinį ir kiekybinį identifikavimą (EP3407068). Siekiant pagerinti diagnostinio rinkinio tikslumą, Bakker ir kt. rekomenduoja MMP-8 bei hepatocitų augimo veiksnio (HGF) koncentracijos įvertinimą derinti su demografiniais rodikliais (lytis, kūno masės indeksas) (EP3407070).

Jau minėtas miRNR potencialas reguliuoti įvairių organizmo procesų homeostazę bei itin palankios diagnostinės savybės (nedidelis molekulės dydis, nesudėtingas ir tikslus identifikavimas ir kt.) lėmė tai, jog miRNR yra vienos plačiausiai tiriamų ir diagnostikai taikomų genetinių medžiagų. Šiuo metu yra 5 komerciniai diagnostiniai rinkiniai, kurie sėkmingai praėjo klinikinių tyrimų etapus (31). „ThyraMIR“ (*Interpace Diagnostics*) yra 10 miRNR identifikavimu paremtas diagnostinis rinkinys, skirtas nustatyti skydliaukės cistų piktybiškumą ir įvertinti chirurginės intervencijos poreikį. Nuo 2018 m. „ThyraMIR“ testavimas JAV yra finansuojamas valstybės ir rekomenduojamas atlikti prieš skydliaukės cistų chirurginį šalinimą. Tuo tarpu „miRview mets“ (*Oncotest*) yra skirtas piktybinių navikų metastazių miRNR identifikavimui, siekiant nustatyti naviko kilmę. Europos miRNR diagnostikos lyderis *TAmiRNA* siūlo kraujyje cirkuliuojančių miRNR kombinacijų identifikavimą osteoporozės („OsteomiR“), trombocitų funkcijos („ThrombomiR“) bei audinių toksinių pažeidimų („ToxomiR“) įvertinimui. Kiti diagnostiniai rinkiniai, skirti vėžinių susirgimų, Alzheimerio ligos, kepenų pažeidimo toksinais vertinimui, yra klinikinių tyrimų fazėse (31). Nors miRNR identifikavimu paremtų diagnostinių rinkinių PD nustatymui patentuota kol kas nėra, tyrimai rodo kai kurių miRNR potencialą būti panaudotoms, kaip biologiniams PD žymenims. Pavyzdžiui, remiantis 2019 m. Fujimori ir bendraautorų straipsniu, miR-381-3p koncentracija seilėse galimai koreliuoja su



periodontologinių kišenių zondavimo gyliu ir gali būti naudojama neinvazinei PD diagnostikai (32).

Minėtos PD diagnostinių rinkinių patentų paraiškos (EP3553525; EP3407068; EP3407070) buvo pateiktos patentavimui iki 2018 metų liepos mėnesio, kai buvo paskelbta EFP ir AAP patvirtinta naujoji periodonto ligų klasifikacija (29). Nuo 2018 m. galiojančioje periodonto ligų klasifikacijoje pateikiami esminiai pokyčiai, kuriais remiantis ligos diagnozė yra nustatoma ne pagal prarastų periodonto audinių kiekį (kaulo, dantenu, periodonto jungties), bet pagal esamu laiku nustatomą periodonto audinių sveikatą. Įvesta diagnozė – atitinkama periodonto būklė su ankstesniu periodonto jungties netekimu (29). Remiantis 1999 m. sudaryta ir iki 2018 m. galiojusia klasifikacija ši diagnozė atitiktų vidutinį ar sunkų periodontitą (33). Pagal anksčiau galiojusią periodonto ligų klasifikaciją sudaryti diagnostiniai metodai nėra suderinami su šiuo metu naudojamais ligos klasifikavimo kriterijais bei neatspindi ligos aktyvumo, dėl to galimai yra ne visiškai tikslūs. Taip pat, nepaisant to, kad parinktos baltymų ar miRNR kombinacijos yra siejamos su uždegiminiais procesais, patys diagnostiniai rinkiniai yra pagrįsti ne uždegimo aktyvumo, o labiau PD stadijos vertinimu. Itin svarbu, kad vertinant minėtų diagnostinių rinkinių tikslumą nebuvo dokumentuojamas sisteminių priešuždegiminių bei imunitetą slopinančių vaistų poveikis. Yra žinoma, kad šie vaistai, mažindami uždegiminių mediatorių kiekį organizme, gali maskuoti PD sunkumą (9). Dėl šios priežasties nurodyti diagnostiniai rinkiniai negali būti naudojami pacientų, vartojančių sisteminių priešuždegiminių bei imunitetą slopinančių vaistų (pvz., vartojamų sergant RA ar kitomis autoimuninėmis ligomis), PD diagnostikai.

## **IŠRADIMO ESMĖ**

Mūsų sukurtas diagnostinis rinkinys yra paremtas su uždegimu susijusių miRNR identifikavimu organizmo skysčiuose, todėl yra mažai invazinis. Šis metodas yra unikalus tuo, kad jis leidžia identifikuoti PD uždegimo aktyvumą tiek reumatologiškai sveikiems, tiek asmenims, sergantiems su periodontitu patogenetiškai glaudžiai susijusia liga – RA. Mūsų sukurta su PD susijusio uždegiminio aktyvumo nustatymo metodika ir rinkinys susideda iš kelių pagrindinių etapų: mėginių surinkimo, RNR skyrimo ir miRNR analizės kiekybinės atvirkštinės transkriptazės polimerazinės grandininės reakcijos (AT-kPGR) metodu. Šiuo išradimu siekiama sukurti mažai invazinį miRNR identifikavimu paremtą diagnostinį metodą ir rinkinį, skirtą įvertinti PD uždegiminį aktyvumą asmenims, sergantiems PD ir/ar reumatoidiniu artritu. Išradimas įgalins mažai invazinę PD diagnostiką, taip pat bus naudojamas identifikuoti PD aktyvumą, kuris aktualus renkantis tolimesnę periodontologinio gydymo taktiką. Išradimas pritaikytas RA sergantiems pacientams, siekiant greitai ir tiksliai įvertinti PD sukkelto uždegimo intensyvumą. Šio tikslinei pacientų grupei skirtu diagnostinio metodo ir rinkinio poreikis

grindžiamas tuo, kad RA sergantiems pacientams bet kokios kilmės aktyvus uždegimas organizme neigiamai veikia RA ligos klinikinę eigą bei gali riboti RA ligos eigai modifikuoti skirtų medikamentų skyrimą (pvz., metotreksato, biologinės terapijos ir kt.).

### TRUMPAS PAVEIKSLŲ APRAŠYMAS

**1 pav.** Tiriamųjų grupės pagal periodontito (PD) ir reumatoidinio artrito (RA) statusą. KT – sveiki asmenys (PD–RA–), PD+RA– – tik PD sergantys asmenys, PD+ – asmenys, sergantys PD, nepriklausomai nuo RA statuso, RA+PD– – tik RA sergantys asmenys, RA+ – asmenys, sergantys RA, nepriklausomai nuo PD statuso, ir PD+RA+ – asmenys, sergantys ir PD, ir RA.

**2 pav.** miRNR raiškos profilis periodontitu (PD) ir reumatoidiniu artritu sergančių tiriamųjų audiniuose:  $\geq 25\%$  mėginių aptiktų miRNR raiškos profilis (N=760) (A), miRNR raiškos profilis, gautas palyginus PD+ vs. PD– atvejus (N=177,  $FC \geq 1,5$ ,  $P \leq 0,050$ ) (B).

**3 pav.** Santykinė miR-140-3p, -145-5p, -146a-5p ir -195-5p raiška tik periodontitu (PD) (PD+RA–), PD ir reumatoidiniu artritu (RA) (PD+RA+) sergančių, ir sveikų asmenų (KT) dantenų audiniuose. Juodi brūkšniai žymi medianą, \*  $P < 0,050$ , \*\*  $P < 0,010$ .

**4 pav.** Santykinė miR-140-3p, -145-5p, -146a-5p ir -195-5p raiška sunkia periodontito (PD) forma (III ir IV stadijos) sergančių ir sveikų asmenų (KT) dantenų audiniuose. Juodi brūkšniai žymi medianą, \*  $P < 0,050$ , \*\*\*  $P < 0,001$ .

**5 pav.** Santykinė miR-140-3p, -145-5p, -146a-5p ir -195-5p raiška periodontitu sergančių ir sveikų asmenų dantenų audiniuose pagal periodontito jungties netekimo lygio (CAL) (A), kišenių zondavimo gylio (PPD) (B), kraujavimo po zondavimo indekso (BOP) (C) ir rentgenologinio kaulo netekimo (BL) (D) rodiklius. Juodi brūkšniai žymi medianą, \*  $P < 0,050$ , \*\*  $P < 0,010$  ir \*\*\*  $P < 0,001$ .

**6 pav.** MiR-140-3p, -145-5p, -146a-5p ir -195-5p kiekio palyginimas tarp tik PD sergančių (PD+RA–) ir sveikų asmenų (KT) (A) ir tarp PD sergančių, nepriklausomai nuo RA statuso (PD+) ir periodontologiškai sveikų asmenų (PD–) (B) dantenų vagelės skysčio mėginių. Juodi brūkšniai žymi medianą, \*  $P < 0,050$  ir \*\*  $P < 0,010$ .

**7 pav.** MiR-140-3p, -145-5p, -146a-5p ir -195-5p kiekio palyginimas tarp sunkia periodontito (PD) forma (III ir IV stadijos) sergančių ir sveikų asmenų (KT) dantenų vagelės skysčio mėginių. Juodi brūkšniai žymi medianą, \*  $P < 0,050$ , \*\*  $P < 0,010$  ir \*\*\*  $P < 0,001$ .

**8 pav.** MiR-140-3p, -145-5p, -146a-5p ir -195-5p kiekio palyginimas tarp skirtingomis periodontito (PD) formomis (I, II, III ir IV stadijos) sergančių ir sveikų asmenų (KT) dantenų vagelės skysčio mėginių. Juodi brūkšniai žymi medianą, \*  $P < 0,050$ , \*\*  $P < 0,010$  ir \*\*\*  $P < 0,001$ .

**9 pav.** MiR-140-3p, -145-5p, -146a-5p ir -195-5p kiekio palyginimas periodontitu sergančių ir sveikų asmenų dantenų vagelės skysčio mėginiuose pagal periodontito jungties netekimo lygio (CAL) (A), kišenių zondavimo gylio (PPD) (B), kraujavimo po zondavimo indekso (BOP) (C) ir rentgenologinio kaulo netekimo (BL) (D) rodiklius. Juodi brūkšniai žymi medianą, \*  $P < 0,050$ , \*\*  $P < 0,010$  ir \*\*\*  $P < 0,001$ .

**10 pav.** Svarbiausios asociacijos tarp miRNR kiekio tiriamųjų seilių mėginiuose ir klinikinių-patologinių periodontito (PD) rodiklių: miR-140-3p kiekio skirtumai tarp asmenų, sergančių skirtingomis PD formomis (I ir IV stadijos) (A), miR-145-5p kiekio skirtumai tarp asmenų grupių su skirtingais kišenių zondavimo gylio (PPD) (B) ir rentgenologinio kaulų netekimo (BL) (C) rodikliais. Juodi brūkšniai žymi medianą, \*  $P < 0,050$ .

**11 pav.** MiR-145-5p ir -195-5p kiekio kraujo plazmoje palyginimas tarp tik periodontitu (PD) sergančių (PD+RA–) ir sveikų asmenų (KT) (A), sergančių PD, nepriklausomai nuo RA statuso (PD+) ir periodontologiškai sveikų asmenų (PD–) (B). Juodi brūkšniai žymi medianą, \*  $P < 0,050$  ir \*\*  $P < 0,010$ .

**12 pav.** MiR-145-5p (A), -195-5p (B) ir 146a-5p (C) kiekio palyginimas tarp skirtingomis periodontito (PD) formomis sergančių (I, II, III ir IV PD stadijos) ir sveikų (KT) asmenų kraujo plazmos mėginių. Juodi brūkšniai dėžučių viduje žymi vidurkį, „ūsai“ – mažiausią ir didžiausią reikšmes, taškai – išskirtys, \*  $P < 0,050$ , \*\*  $P < 0,010$  ir \*\*\*  $P < 0,001$ .

**13 pav.** MiR-145-5p, -146a-5p ir -195-5p kiekio palyginimas periodontitu sergančių ir sveikų asmenų kraujo plazmos mėginiuose pagal periodontito jungties netekimo lygio (CAL) (A), kišenių zondavimo gylio (PPD) (B) ir rentgenologinio kaulo netekimo (BL) (C) rodiklius. Juodi brūkšniai žymi medianą, \*  $P < 0,050$  ir \*\*  $P < 0,010$ .

**14 pav.** Dantenų vagelės skystyje (DVS) cirkuliuojančių miRNR ROC kreivių analizė: miR-140-3p (A), miR-145-5p (B), miR-146a-5p (C) ir miR-195-5p (D), miR-145-5p/-146a-5p (E) ir visų miRNR (F) derinys. AUC – plotas po ROC kreive.

**15 pav.** Kraujo plazmoje cirkuliuojančių miRNR ROC kreivių analizė: miR-140-3p (A), miR-145-5p (B), miR-146a-5p (C) ir miR-195-5p (D), miR-145-5p/-195-5p (E) ir visų miRNR (F) derinys. AUC – plotas po ROC kreive.

## IŠSAMUS IŠRADIMO APRAŠYMAS

Šio tyrimo tikslas buvo ištirti miRNR raiškos profilį PD paveiktuose ir sveikuose dantenų audiniuose, įvertinant autoimuninės ligos – RA poveikį. Tiriamųjų miRNR diagnostinis potencialas buvo vertinamas dantenų vagelės skysčio (DVS), seilių ir kraujo plazmos mėginių atveju.



## 1. Tiriamieji

Iš viso į tyrimą buvo įtraukta 240 Vilniaus universiteto Santaros ir Žalgirio klinikų pacientų. Dalyviai buvo suskirstyti į dvi grupes pagal periodonto būklę:

1) PD+ (tiriamoji) grupė – 148 asmenys, kuriems PD diagnozuotas pagal 2018 m. Amerikos periodontologijos akademijos (AAP) ir Europos periodontologijos federacijos (EFP) periodonto ligų klasifikaciją [17].

2) PD– (kontrolinė) grupė - 92 periodontologiškai sveiki asmenys.

Įvertinus tiriamuosius pagal 2010 m. ACR / EULAR reumatoidinio artrito klasifikavimo kriterijus [16], iš viso RA buvo diagnozuotas 64 asmenims PD+ grupėje ir 30 – PD– grupėje. Visos tyrimo grupės parodytos 1 pav.

Į tyrimą nebuvo įtraukti asmenys turintys mažiau nei 8 dantis, sergantieji cukriniu diabetu, asmenys, vartojantys periodonto audinius galinčius paveikti vaistus (kalcio kanalų blokatoriai, anti-epileptiniai vaistai) bei nėščios moterys.

Tyrimą patvirtino Vilniaus regioninis biomedicinos tyrimų etikos komitetas (patvirtinimo Nr. 158200-18-922-500). Prieš tyrimo pradžią buvo gautas rašytinis visų tyrimo dalyvių sutikimas. Tyrimas buvo atliktas vadovaujantis 1975 m. Helsinkio deklaracijos, patikslintos 2013 m., principais.

## 2. Periodontologinis vertinimas

Klinikinį periodontologinį vertinimą atliko tyrėjas periodontologas, atlikdamas viso burnos zondavimą šešiuose taškuose bei rentgenologinį ištirimą. Apskaičiuotas klinikinio ištirimą vidinio suderinamumo Kappa koeficientas siekė 0,86 remiantis periodonto jungties netekimo (angl. *clinical attachment loss*, CAL) pakartotiniu vertinimu.

Apžiūros metu buvo vertinami šie rodikliai: 1) CAL, 2) kišenių zondavimo gylis (angl. *pocket probing depth*, PPD), 3) kraujavimas po zondavimo (angl. *bleeding on probing*, BOP), 4) rentgenologinis kaulo netekimas (angl. *bone loss*, BL), 5) netektų dantų skaičius. Tretieji krūminiai dantys ir implantai nebuvo vertinami. Remiantis klinikinio ištirimą parametrais, tiriamieji buvo grupuojami atsižvelgiant į 2018 m. AAP/EFP gaires. Asmeniui buvo diagnozuojamas PD, nustatius su periodontitu susijusį CAL dviejuose ar daugiau ne šalia esančiuose tarpdančiuose arba nustatius CAL  $\geq 3$  mm bei zonduojant  $>3$  mm gylio kišenes bukaliniuose paviršiuose prie daugiau nei dviejų dantų. Pacientai buvo suskirstyti į keturias grupes pagal PD išsivystymo lygį: I stadija – pradinė, II stadija – vidutinė, III stadija – sunki, IV

stadija – pažengusi sunki PD. Uždegimo aktyvumas periodonto audiniuose buvo nustatytas įvertinus PPD ir BOP rodiklius periodontologinio ištyrimo metu.

Vidutinės BL vertės gautos remiantis standartizuotu Rydeno ir jo kolegų pateiktu protokolu [19]. Buvo vertinami pirmųjų ir antrųjų krūminių dantų distaliniai ir mezialiniai paviršiai. Prieš ištyrimą, atliktų dantų nuotraukų vaizdo kokybė buvo suskirstyta į tris grupes (puiki, priimtina ir nepriimtina), remiantis pakeistomis 1997 m. Kalifornijos odontologų asociacijos gairėmis [20]. Į periodontologinio ištyrimo vertinimą buvo įtrauktos tik dantų vietos, kurių nuotraukų vaizdo kokybė buvo priimtina ar puiki bei dantys su aiškiai matomais vainikėliais. Alveolinio kaulo rezorbcija buvo įvertinta sudarant proporciją ir vertinant atstumą nuo cemento emalio jungties iki alveolinio kaulo ketros ir lyginant šį atstumą su visu šaknies ilgiu.

Anketa buvo naudojama užregistruoti antropometrinius ir sociodemografinius rodiklius (amžių, lytį, kūno masės indeksą, išsilavinimą, rūkymo statusą, alkoholio vartojimo ir burnos sveikatos priežiūros įpročius (dantų valymo dažnumą ir metinę dantų priežiūros profilaktiką).

### 3. Reumatologinis įvertinimas

Tiriamųjų klinikinę RA būklę vertino gydytojas reumatologas, nustatant ligos aktyvumo indeksą (angl. *disease activity score*, DAS28), vizualinę analogų skalę (VAS, 100 mm) bei C-reaktyvinio baltymo koncentraciją (CRB, mg/l) [21]. Taip pat buvo registruojama RA ligos trukmė, ar taikomas RA gydymas gliukokortikoidais (prednizolonas, metilprednizolonas), sintetiniais ligą modifikuojančiais antireumatiniais vaistais (angl. *synthetic disease-modifying antirheumatic drugs*, sDMARD) (metotreksatas, sulfasalazinas ir kt.), ir/ar biologiniais ligą modifikuojančiais antireumatiniais vaistais (angl. *biologic disease-modifying antirheumatic drugs*, bDMARD) (TNF- $\alpha$  inhibitoriai, IL-6 receptorių antagonistai, anti-CD20 monokloniniai antikūnai). Be to, siekiant įvertinti RA įtaką sergančiųjų gyvenimo kokybei ir pačiai ligai, buvo naudojami RA ligos poveikio (angl. *RA impact of disease*, RAID) ir sveikatos vertinimo (angl. *health assessment questionnaire*, HAQ) klausimynai [22, 23]. Informacija apie RA ligos seropozityvumą (teigiamą reumatoidinį faktorių (RF) ir/ar antikūnus prieš ciklinį citrulininį peptidą (anti-CCP)) ir CRB koncentraciją buvo surinkta iš sergančiųjų medicininių duomenų.

### 4. Mėginių surinkimas

Dantenų mėginiai buvo surinkti iš visų tyrimo dalyvių. Audinių biopsijos mėginiai iš PD sergančių asmenų buvo renkami iš giliausios periodonto kišenės periodontologinės apžiūros metu. Dantenų audiniai iš periodontaliai sveikų asmenų buvo paimti chirurginio vainiko prailginimo ar kitų intervencinių su tyrimu nesusijusių procedūrų metu. Surinkti dantenų audinių

biopsijos mėginiai buvo talpinami ir iki naudojimo laikomi RNR stabilizavimo tirpale *RNAlater*<sup>™</sup> (Thermo Fisher Scientific (TFS), JAV).

DVS mėginiai buvo renkami pašalinus supragingivalines apnašas, seiles ir izoliavus dantis medvilniniais kaiščiais. Šio organizmo skysčio surinkimui iš PD sergančių asmenų į periodonto kišenę buvo patalpinami sterilūs skystį absorbuojantys popieriniai kaiščiai ir laikomi 30 sekundžių. PD nepaveiktiems asmenims DVS buvo rinktas žandikaulio kaplių gomurinėje pusėje. Vienam tiriamojo DVS surinkimui buvo naudojami bent 5 popieriniai kaiščiai. Visi krauju užteršti kaiščiai buvo išmesti. Tyrimui tinkami kaiščiai buvo sudėti į 2 ml mėgintuvėlį su 20 µL *RNAlater*<sup>™</sup> tirpalo.

Seilių mėginiai buvo surinkti iš visų į tyrimą įtrauktų asmenų. Dalyvių buvo paprašyta mažiausiai 2 valandas prieš seilių surinkimą susilaikyti nuo valgymo ir gėrimo. Pirmiausia, tiriamieji 1 minutę skalavo burną distiliuotu vandeniu, kurį po to išspjovė. Tuomet dalyvių buvo paprašyta į sterilų mėgintuvėlį išspjauti mažiausiai 2 mL seilių. Po surinkimo, seilių mėginiai buvo 15 min. centrifuguojami  $2600 \times g$  greičiu. Nuo ląstelinės fazės atskirtas supernatantas buvo perkeltas į sterilių 2 mL mėgintuvėlį, pridėjus RNazių slopiklio *SUPERase*<sup>™</sup> (TFS, JAV).

Plazmos mėginiai taip pat buvo surinkti iš visų į tyrimą įtrauktų asmenų. Kraujo mėginiai buvo renkami į sterilius BD Vacutainer® mėgintuvėlius su etilendiamintetraacto rūgšties dikalio druskos (K2-EDTA) antikoagulantu (Becton-Dickinson, Barricor<sup>™</sup>, JAV), naudojant 21 G adatą. Surinkti kraujo mėginiai buvo 15 min. centrifuguojami  $2000 \times g$  greičiu. Po centrifugavimo plazma buvo perkelta į sterilius 2 mL mėgintuvėlius.

Visi paruošti mėginiai buvo užkoduoti, paženklinėti ir iki panaudojimo saugomi  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  temperatūroje.

## 5. Visuminės RNR skyrimas

Užšaldyti dantenų mėginiai pirmiausia buvo mechaniškai homogenizuojami iki smulkių miltelių, panaudojant grūstuvėlę ir pestelę. Visuminės RNR skyrimui buvo naudojamas *TRIzol*<sup>™</sup> (Invitrogen, TFS, JAV) reagentas, remiantis gamintojo rekomendacijomis.

RNR gryninimui iš DVS, seilių ir kraujo plazmos mėginių buvo naudojamas *miRNeasy Mini Kit* (Qiagen) rinkinys, remiantis gamintojo protokolu. Trumpai, DVS, seilių ir plazmos mėginiai buvo užpilami *QIAzol*® lizės reagentu (Qiagen) ir 5 min. inkubuojama. Tuomet, įpylus 200 µL chloroformo inkubuota dar 2-3 min. ir įnešta 25 fmol cel-miR-39 (*TaqMan*<sup>™</sup> *MicroRNA Assay*, Applied Biosystems (ABI), TFS; gamintojo kodas 000200), kuri buvo naudojama kaip RNR gryninimo efektyvumo kontrolė. Išskirta RNR iki panaudojimo buvo saugoma  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$



temperatūroje. Visuminės RNR kokybė ir kiekis buvo vertinami naudojant *NanoDrop 2000* (Thermo Scientific, JAV) spektrofotometrą ir Qubit 4 (Invitrogen, TFS) fluorometrą.

## 6. Visuminė miRNR raiškos analizė miRNR mikrogardelėmis

Visuminei miRNR raiškos profilio analizei iš viso buvo pasirinkta ir ištirta 16 mėginių. Trumpai, 100 ng visuminės RNR buvo maišoma su sintetine kontroline miRNR Spike-In tirpalo (Agilent Technologies (AT), JAV), defosforilinta, denatūruota ir žymėta 3-pCp cianino dažais, laikantis *miRNA Microarray System with miRNA Complete Labeling and Hyb Kit* (AT) protokolo. Žymėti mėginiai išdžiovinami koncentratoriuje, resuspenduojami ir hibridizuojami ant *Human microRNA Microarray 8 x 60K* formato mikrogardelių (AT). Po 20 val. 55 °C hibridizavimo krosnyje, mikrogardelės plaunamos genų raiškos gardelių plovimo rinkinio buferiais (AT) ir skenuojamos naudojant *Agilent SureScan* skenerį ir *Agilent Microarray Scan Control* programinę įrangą.

## 7. Kopijinės DNR (kDNR) sintezė

Pasirinktų miRNR raiškos analizei dantenų audinių biopsijos mėginiuose reikalinga kDNR buvo sintetinama atvirkštinės transkripcijos (AT) (angl. *reverse transcription*, RT) reakcijos metu, naudojant *TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit* rinkinį ir specifinį *RT Primer Pool* pradmenų mišinį (ABI, TFS), remiantis gamintojo protokolu. Į paruoštą, sumaišytą ir nucentrifuguotą reakcijos mišinį (12 µL/1 reakcijai) įnešama 3 µL (350 ng) visuminės RNR ir 5 min. inkubuojama ant ledo. AT atlikta termocikleryje gamintojo rekomenduojamu temperatūriniu režimu: 30 min. 16 °C, 30 min. 42 °C, 5 min. 85 °C ir pasibaigus reakcijai laikoma 4 °C temperatūroje.

kDNR sintezei skysčių biopsijos mėginiuose taip pat buvo naudojamas *TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit* rinkinys kiekvienam genui ir mėginiui renkant atskiras reakcijas. Reakcijoje buvo naudojami specifiniai atrinktų miRNR (miR-140-3p, -145, -146a ir -195) smeigtuko formos pradmenys *TaqMan® MicroRNA Assay* (gamintojo kodai: 002234, 002278, 000468 ir 000494, atitinkamai), remiantis gamintojo protokolu (viskas iš ABI, TFS) (1 lentelė). Į paruoštą reakcijos mišinį (3,5 µL/1 reakcijai) įnešama 1,5 µL kiekvienai tiriamajai miRNR specifinių AT reakcijos pradmenų ir 2,5 µL (1–10 ng) visuminės RNR. Nucentrifugavus inkubuojama termocikleryje anksčiau minėtomis sąlygomis. Susintetinta kDNR buvo iškart naudojama tolimesniuose tyrimo etapuose arba iki panaudojimo saugoma –20 °C temperatūroje.

1 lentelė. Atvirkštinės transkripcijos reakcijos metu naudojamų *TaqMan® Assays* pradmenų (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, JAV) gamintojo kodai ir subrendusios miRNR sekos.

| miRNR pavadinimas | Kodas  | Subrendusios miRNR nukleotidų seka |
|-------------------|--------|------------------------------------|
| miR-140-3p        | 002234 | UACCACAGGGUAGAACCACGG              |
| miR-145-5p        | 002278 | GUCCAGUUUUCCCAGGAAUCCCU            |
| miR-146a-5p       | 000468 | UGAGAACUGAAUCCAUGGGUU              |
| miR-195-5p        | 000494 | UAGCAGCACAGAAAUAUUGGC              |

### 8. Kiekybinė atvirkštinės transkriptazės polimerazinė grandininė reakcija (AT-kPGR)

Atrinktų miRNR raiška **dantenu audinių** mėginiuose buvo vertinama naudojant *TaqMan®* mažo tankio gardeles (angl. *Customized TaqMan® Low Density Arrays*), remiantis gamintojo protokolu (ABI, TFS). Kiekvienam mėginiui buvo ruošiamas atskiras reakcijos mišinys, sudarytas iš *2x TaqMan Universal Master Mix II, No AmpErase UNG*, vandens be nukleazų ir kDNR. Į paruoštos gardelės užpildymo rezervuarą suleidžiama 100 µL reakcijos mišinio ir centrifuguojama 2 min. 2000 rpm greičiu. Užsandarintos gardelės patalpinamos į *ViiA7™ Real-Time PCR* sistemą, ir naudojant *ViiA 7 Software v1.2* programinę įrangą (ABI, TFS) paleidžiama reakcijos vykdymo programa gamintojo rekomenduojamu temperatūriniu režimu: 2 min. 50 °C, 10 min. 95 °C, 40 ciklų po 15 s 95 °C, ir 1 min. 60 °C temperatūroje.

miRNR kiekis skysčių biopsijos mėginiuose buvo nustatytas atliekant AT-kPGR, naudojant pradmenų ir zondų mišinius *TaqMan™ MicroRNA Assays*, remiantis gamintojo protokolu. Kiekviena miRNR buvo tiriama atliekant tris pakartojimus. Taršos nustatymui buvo naudojama kontrolė, kai vietoj mėginio įnešamas vanduo (angl. *no-template control, NTC*). 20 µL/1 reakcijai paruošto reakcijos mišinio, kurį sudarė  $2 \times \text{TaqMan}^{\text{TM}} \text{Universal Master Mix II, No AmpErase UNG}$ ,  $20 \times \text{TaqMan}^{\text{TM}} \text{MicroRNA Assay}$  (abu iš ABI, TFS), vanduo be nukleazų ir 1,33 µL kDNR buvo įnešama į atitinkamus plokštelės šulinėlius. Reakcijos sąlygos ir naudojama įranga atitinka anksčiau aprašytas, vietoj 40 ciklų, naudojant 50.

### 9. Statistinė analizė

Visi duomenys buvo analizuojami naudojant *SPSS v20.0* (IBM, Armonk, NY), *GeneSpring GX v14.9 (AT)*, *GenEx v7.0* (MultiD Analyses AB, Švedija). Siekiant patikrinti dispersijos homogeniškumą buvo atliktas Shapiro-Wilk'o testas. 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  $\Delta\Delta\text{Ct}$  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  $FC \geq 1,5$ .

Diagnosticinis 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. Logistinė regresinė analizė biožymenų deriniams buvo atlikta *MedCalc* (MedCalc Software bv, Ostend, Belgium) programa.

## PAVYZDŽIAI

### 1 pavyzdys. miRNR derinio pasirinkimas ir validavimas minimaliai ir neinvazinei PD diagnostikai

#### Visuminė miRNR raiškos analizė dantenų audiniuose

MiRNA raiška buvo analizuota 16 dantenų audinių mėginių, surinktų iš PD sergančiųjų (PD+) (N=8) ir periodontologiškai sveikų asmenų (PD-) (N=8). Iš 2569 tirtų miRNR, atrinkus tik tas, kurių raiška vyko  $\geq 25$  % mėginių, toliau buvo analizuojamos 760 miRNR (2A pav.). miRNR raiškos analizė dantenų mėginiuose atskleidė 177 statistiškai reikšmingai pakitusios raiškos miRNR PD paveiktus audinius palyginus su periodontologiškai sveikais dantenų audiniais (PD+ vs. PD-) (2B pav.). Didžiosios dalies miRNR (N=140, 79,1%), pavyzdžiui miR-30a-5p, -125a-3p, -126-5p, -1273g-3p, -140-3p, -145-5p, -146a-5p, -155-5p, -195-5p, -575, -630, -3917 ir kt., raiška buvo padidėjusi  $>2$  kartus. Specifiškumas PD buvo įvertintas palyginus tik PD sergančių asmenų grupę (PD+RA-, N=4) su kontroline sveikų asmenų grupe (KT, N=4). Iš viso buvo nustatyta 118 pakitusios raiškos miRNR, iš kurių 77 (65,3%) buvo padidėjusios (miR-140-3p, -550a-3-5p, -765, -1273g-3p, -3917 ir kt.), o 41 (34,7%) (miR-1246, -210-3p, -375 ir kt.) – sumažėjusios raiškos. Siekiant nustatyti miRNR sąsajas su uždegiminėmis ligomis buvo lyginami abiejomis ligomis sergančių pacientų (PD+RA+, N=4) ir KT grupės dantenų mėginiai. Nustatyta, kad 22 (miR-550a-3-5p, -140-3p, -765 ir kt.) iš 29 pakitusios raiškos miRNR buvo padidėjusios raiškos. Palyginus asmenis, sergančius tik RA (N=4) su KT grupe, nustatytos 56 reikšmingai pakitusios raiškos miRNR, iš kurių 50 (89,3%) buvo sumažėjusios (miR-34c-5p, -3620-5p, -330-5p ir kt.), o 6 (10,7%) – išaugusios raiškos miRNR (miR-339-3p, -711, -4701-5p ir kt.).

MiRNR mikrodalelių analize taip pat buvo siekta nustatyti su PD susijusias miRNR RA sergančių ir reumatologiškai sveikų asmenų dantenų audiniuose, remiantis raiškos pokyčiu kartais (angl. *fold change*), *P* reikšmingumo rodikliu bei potencialiu miRNR vaidmeniu uždegiminiuose ar autoimuniniuose procesuose. Atlikus PD+ vs. PD-, PD+RA- vs. KT ir



PD+RA+ vs. KT palyginimus buvo atrinktos labiausiai išaugusios raiškos miRNR, iš kurių 9 (miR-30a-5p, -125a-3p, -145-5p, -146a-5p, -155-5p, -195-5p, -423-5p, -575 ir -630) buvo padidėjusios raiškos PD+ vs. PD– ir PD+RA+ vs. KT, o 4 (miR-126-5p, -195-5p, -1273g-3p ir -3917) – PD+ vs. PD–, PD+RA– vs. KT palyginimuose. Reikšmingai išaugusi miR-140-3p ir -765 raiška buvo nustatyta atitinkamai visose trijose aukščiau paminėtose grupėse ir PD+RA– vs. KT. Be to, abiejų šių miRNR raiška buvo padidėjusi PD+RA+ vs. KT atveju. Sumažėjusi visų 15 atrinktų miRNR raiška buvo nustatyta abiejose su RA susijusiose lyginamosiose grupėse (PD–RA+ vs. KT ir RA+ vs. RA–). Vis dėlto tik miR-140-3p atveju nustatyti raiškos pokyčiai ( $FC=-1,8$ ,  $P=0,033$ ), palyginus tik RA sergančiųjų asmenų grupę su KT grupe (PD–RA+ vs. KT), buvo statistiškai reikšmingi.

Atsižvelgiant į visuminės miRNR raiškos analizės rezultatus, tolesniam tyrimo etapui buvo pasirinktos 15 miRNR: miR-30a-5p, -125a-3p, -126-5p, -140-3p, -145-5p, -146a-5p, -155-5p, -195-5p, -423-5p, -550a-3-5p, -575, -630, -765, -1273g-3p ir -3917. Toliau, nustatyti pokyčiai buvo validuojami didesnėje dantenų audinių mėginių imtyje ( $N=80$ ) AT-kPGR metodu.

#### **miRNR raiškos validavimas dantenų audiniuose ir miRNR atranka**

AT-kPGR metodu ištyrus 80 dantenų audinių mėginių nustatyta, kad dalis tirtų miRNR buvo reikšmingai susijusios su PD. Šiame etape, kaip ir visuminės miRNR raiškos analizės atveju, tik PD sergančių asmenų audiniuose ( $N=25$ ), nustatyta padidėjusi miR-145-5p ir miR-140-3p raiška (atitinkamai  $FC=2,1$ ,  $P<0,0001$  ir  $FC=1,4$ ,  $P=0,019$ ), palyginus su KT ( $N=25$ ) grupe (3 pav.). Mikrogardelių analizėje gautus rezultatus atitiko ir išaugusi miR-140-3p raiška ( $FC=1,5$ ,  $P=0,017$ ), kuri buvo nustatyta palyginus PD+RA+ tiriamosios grupės audinius ( $N=23$ ) su KT dantenų audinių mėginiais (3 pav.). Vis dėlto, miR-125a-3p ir miR-1273g-3p raiška buvo sumažėjusi ( $FC<-1,5$ ;  $P<0,05$ ) PD+RA+ vs. KT ir PD+ vs. PD– ( $N=32$  vs. 48) lyginamosiose grupėse. Statistiškai reikšmingų miR-146a-5p raiškos pokyčių dantenų audinių mėginiuose nustatyta nebuvo.

miR-145-5p ir miR-140-3p raiška dantenų audiniuose buvo reikšmingai išaugusi sunkia PD forma (III ir IV stadijos) sergančių asmenų grupėje. Palyginus su KT grupe, sunkia PD forma sergančių asmenų grupėje nustatyta reikšmingai padidėjusi miR-145-5p ir miR-140-3p raiška (atitinkamai  $FC=2,2$ ,  $P<0,001$  ir  $FC=1,3$ ,  $P=0,026$ ) (4 pav.), ir sumažėjusi miR-125a-3p raiška ( $FC=2,2$ ,  $P<0,001$ ). Reikšmingai pakitusi miR-145-5p raiška buvo nustatyta sunkia PD forma sergančiųjų dantenų audiniuose, palyginus su vidutinio sunkumo PD (II stadija) sergančiųjų asmenų audiniais ( $FC=2,0$ ,  $P=0,007$ ). Atlikus vidutinio sunkumo PD ir KT atvejų palyginimą nustatyta statistiškai reikšmingai išaugusi miR-195-5p ( $FC=1,7$ ,  $P=0,038$ ) ir sumažėjusi miR-125a-3p ( $FC=-3,5$ ,  $P=0,013$ ) raiška.

Taip pat, nustatytos reikšmingos pasirinktų miRNR asociacijos su klinikiniais-patologiniais PD rodikliais, tokiais kaip CAL, PPD, BOP ir BL. Daugiau nei 2,2 karto padidėjusi miR-145-5p raiška ( $P<0,001$ ) ir 1,6 karto sumažėjusi miR-3917 ( $P=0,022$ ) raiška buvo nustatyta tiriamųjų, kurių CAL buvo  $\geq 2,5$  mm, atveju, palyginus su asmenimis, kurių CAL –  $<2,5$  mm (5A pav.). MiR-145-5p raiškos padidėjimas ( $FC=2,1$ ,  $P<0,001$ ) dantenų audinyje taip pat buvo nustatytas asmenims, kurių PPD buvo  $\geq 3$  mm, palyginus su tiriamaisiais, kurių PPD buvo  $<3$  mm (5B pav.). Daugiau negu 2 kartus padidėjusi miR-145-5p ( $P<0,001$ ) ir miR-140-3p ( $P=0,009$ ) bei tiek pat kartų sumažėjusi miR-125a-3p ( $P=0,001$ ) raiška nustatyta grupėje, kurią sudarančių tiriamųjų BOP buvo  $\geq 33$  %, palyginus su atvejais, kurių BOP yra  $<33$  % (5C pav.). MiR-145-5p ( $P<0,001$ ) ir miR-140-3p ( $P=0,007$ ) raiškos padidėjimas (5D pav.) bei miR-125a-3p sumažėjimas ( $P=0,001$ ) buvo nustatytas palyginus tiriamųjų, kurių BL rodikliai buvo  $\geq 20$  % ir  $<20$  %, grupes.

Palyginus tik RA sergančių asmenų grupę (PD–RA+) su KT grupe, statistiškai reikšmingai pakitusios raiškos miRNR nustatyta nebuvo. Atlikus RA+ vs. RA– palyginimą nustatytas miR-1273g-3p raiškos padidėjimas ( $FC=-1,6$ ,  $P<0,001$ ) RA sergančiųjų grupėje. Be to, buvo pastebėtos kai kurių miRNR raiškos pokyčių sąsajos su RA klinikiniais rodikliais. Tiriamųjų, kuriems buvo nustatytas didelis RA aktyvumas ( $DAS28 \geq 5,1$ ), ir tų, kuriems nustatyta DAS28 remisija ( $DAS28 < 2,6$ ) audiniuose miR-145-5p raiška buvo sumažėjusi ( $FC=-3,1$ ,  $P=0,026$ ). Taip pat buvo pastebėta, jog RA sergančių bDMARD vaistais negydytų asmenų audiniuose miR-140-3p raiška buvo 1,6 karto didesnė ( $P=0,004$ ), palyginus su bDMARD vartojusiais tiriamaisiais.

Keturios miRNR – miR-140-3p, -145-5p, -146a-5p ir -195, kurių raiška dantenų audiniuose buvo išaugusi labiausiai, buvo pasirinktos tolimesnei analizei organizmo skysčių biopsijos mėginiuose: DVS ( $N=120$ ), seilėse ( $N=173$ ) ir kraujo plazmoje ( $N=151$ ). Minėtos miRNR atrinktos remiantis raiškos pokyčiu kartais lyginamosiose grupėse, reikšmingumo rodikliu P, sąsajų su PD klinikiniais-patologiniais rodikliais bei potencialia jų funkcija uždegiminiuose ar autoimuniniuose procesuose.

## **Cirkuliuojančių miRNR analizė organizmo skysčiuose**

### **1. miRNR analizė dantenų vagelės skystyje (DVS)**

Ištyrus tik PD (PD+RA–) sergančiųjų asmenų DVS mėginius nustatyta reikšmingai mažiau miR-146a-5p ( $P=0,044$ ), palyginus su KT grupe (6A pav.). Taip pat, sumažėjęs miR-146a-5p ( $P<0,001$ ) ir padidėjęs miR-145-5p ( $P=0,027$ ) kiekis buvo pastebėtas PD+ vs. PD– lyginamosios grupės atveju (6B pav.). Abiejose minėtose PD paveiktose tiriamųjų grupėse nustatyta daugiau miR-140-3p ir mažiau miR-195-5p, tačiau skirtumai nebuvo statistiškai reikšmingi.

Nustatyta koreliacija tarp DVS miRNR kiekio ir PD ligos sunkumo: padidėjęs miR-140-3p ( $P=0,001$ ), miR-145-5p ( $P=0,001$ ) ir sumažėjęs miR-146a-5p ( $P<0,001$ ) ir miR-195-5p ( $P=0,042$ ) kiekis buvo užfiksuotas sunkia PD forma sergančiųjų DVS mėginiuose, palyginus su KT grupės mėginiais (7 pav.).

Statistiškai reikšmingos asociacijos taip pat buvo nustatytos tarp DVS miRNR ir skirtingų PD ligos sunkumo stadijų. Tarpusavyje palyginus asmenis, sergančius II ir I stadijos PD, nustatytas reikšmingai didesnis kiekis miR-140-3p ( $P=0,002$ ). Be to, III stadijos PD sergančiųjų asmenų grupės DVS mėginiuose buvo nustatytas reikšmingas miR-140-3p lygio padidėjimas ( $FC=1,5$ ,  $P=0,001$ ) ir miR-146a-5p kiekio sumažėjimas ( $FC=1,7$ ,  $P=0,010$ ). Daugiau miR-140-3p ( $FC=1,6$ ,  $P<0,001$ ) ir miR-145-5p ( $FC=1,6$ ,  $P=0,030$ ) bei mažiau miR-195-5p ( $FC=-1,5$ ,  $P=0,002$ ) ir miR-146a-5p ( $FC=-1,7$ ,  $P=0,004$ ) nustatyta pažengusia sunkia PD forma (IV stadija) sergančiųjų asmenų DVS mėginiuose, palyginus su pradine (I) PD stadija sergančiųjų tiriamųjų grupe. 8 pav. iliustruoja miR-140-3p (A), -145-5p (B), -146a-5p (C) ir -195-5p (D) kiekio pokyčius DVS skirtingų PD stadijų atveju.

Reikšmingos asociacijos taip pat buvo nustatytos tarp DVS miRNR ir PD klinikinių rodiklių – CAL, PPD, BOP ir BL, grupuojant tiriamuosius pagal kiekvieno rodiklio ribines reikšmes. Asmenys, kurių CAL buvo  $\geq 2,5$  mm, turėjo didesnę DVS miR-140-3p ( $P<0,001$ ) ir miR-145-5p ( $P=0,025$ ) bei mažesnę miR-146a-5p ( $P=0,002$ ) ir miR-195-5p ( $P=0,042$ ) kiekį, palyginus su asmenimis, kurių CAL buvo  $< 2,5$  mm (9A pav.). Analogiškai skirtumai pastebėti tiriamųjų, kurių PPD rodiklis buvo  $\geq 3$  mm, atveju: padidėjęs miR-140-3p ( $FC=1,4$ ,  $P<0,001$ ) ir miR-145-5p ( $FC=1,8$ ,  $P<0,001$ ) bei sumažėjęs miR-195-5p ( $FC=-1,5$ ,  $P<0,001$ ) ir miR-146a-5p ( $FC=-1,7$ ,  $P<0,001$ ) kiekis (9B pav.). miR-140-3p ( $P=0,012$ ) ir miR-145-5p ( $P=0,026$ ) kiekio padidėjimas ir miR-146a-5p – sumažėjimas ( $P=0,002$ ) buvo nustatytas asmenų, kurių BOP rodiklis buvo  $\geq 33$  %, atveju (9C pav.). Išanalizavus miRNR kiekio skirtumus tarp tiriamųjų pagal BL rodiklį, daugiau miR-140-3p ( $P<0,001$ ) ir miR-145-5p ( $P=0,001$ ) bei mažiau miR-195-5p ( $P=0,012$ ) ir miR-146a-5p ( $P<0,001$ ) nustatyta tiriamųjų, kurių BL buvo  $\geq 20$  %, DVS mėginiuose (9D pav.).

Reikšmingas miR-140-3p kiekio sumažėjimas ( $P=0,018$ ) nustatytas tik RA sergančiųjų asmenų DVS mėginiuose, palyginus KT grupe. Panašios asociacijos pastebėtos ir palyginus tiriamųjų grupes pagal RA klinikinius rodiklius. Šios miRNR kiekio sumažėjimas ( $P=0,013$ ) užfiksuotas aukštesniu HAQ indeksu įvertintų tiriamųjų grupėje, palyginus su KT grupe. Be to, pastebėta, jog bDMARD vaistais gydyti asmenys turėjo reikšmingai daugiau DVS miR-146a-5p ( $FC=1,7$ ,  $P=0,023$ ), nei minėtais vaistais negydyti RA sergantieji.

## 2. miRNR analizė seilėse



Atrinktų miRNR analizė seilių mėginiuose parodė, kad tik PD (PD+RA–) arba abejomis ligomis sergančių (PD+RA+) tiriamųjų grupėse buvo nustatyta daugiau miR-145-5p, -195-5p ir mažiau miR-146a-5p, palyginus su KT grupe. Analogiški skirtumai buvo nustatyti atlikus PD+ vs. PD– palyginimą, tačiau rezultatai nebuvo statistiškai reikšmingi ( $P>0,050$ ). Taip pat, pastebėtos sąsajos tarp miRNR kiekio seilėse ir skirtingų PD ligos sunkumo stadijų: palyginus IV PD stadiją su I stadija, nustatyta 1,5 karto daugiau seilių miR-140-3p ( $P=0,016$ ) (10A pav.).

Atlikta analizė taip pat atskleidė reikšmingas seilių miRNR sąsajas su PD klinikiniais-patologiniais rodikliais, tokiais kaip PPD ir BL. Seilėse cirkuliuojančios miR-145-5p kiekis buvo 1,5 karto didesnis asmenų su didesniais PPD ( $\geq 3$  mm) ir BL ( $\geq 20$  %) rodikliais atveju (atitinkamai 10B ir 10C pav.; abiejuose palyginimuose  $P=0,034$ ).

Reikšmingos asociacijos buvo nustatytos tarp RA sergančiųjų seilių miRNR ir HAQ indekso. Asmenų, kurių HAQ indeksas buvo vidutinis arba aukštas, seilėse buvo aptikta daugiau miR-140-3p ( $FC=1,7$ ,  $P=0,013$ ). Be to, palyginus su visiškai sveikų (KT) asmenų grupe, tiriamųjų, kurių HAQ įverčiai buvo žemi, vidutiniai ir aukšti, seilėse buvo nustatytas reikšmingas miR-195-5p kiekio padidėjimas ( $FC=1,8$ ,  $P=0,017$ ).

### 3. miRNR analizė kraujo plazmoje

AT-kPGR analizė kraujo plazmoje atskleidė miR-145-5p kiekio padidėjimą ( $FC=2,3$ ,  $P=0,002$ ) ir miR-195-5p sumažėjimą ( $FC=-2,6$ ,  $P=0,001$ ) tik PD sergančių asmenų kraujo plazmos mėginius palyginus su KT grupe (11A pav.). Analogiški skirtumai buvo pastebėti ir PD+ vs. PD– lyginamojoje grupėje (11B pav.).

Taip pat buvo nustatyta, kad I ir II PD stadijos siejosi su reikšmingu miR-195-5p kiekio sumažėjimu (atitinkamai  $FC=-4,8$ ,  $P<0,001$  ir  $FC=2,3$ ,  $P=0,013$ ) ir miR-145-5p padidėjimu (atitinkamai  $FC=4,8$ ,  $P<0,001$  ir  $FC=1,8$ ,  $P=0,037$ ), palyginus su KT grupe. IV PD stadija sergančių asmenų kraujo plazmoje nustatyti didesni miR-195-5p ( $FC=4,2$ ,  $P<0,001$ ), -146a-5p ( $FC=1,6$ ,  $P=0,003$ ) ir mažesni miR-145-5p ( $FC=-5,6$ ,  $P<0,001$ ) kiekiai palyginus su I PD stadija sergančiais. Analogiški miR-195-5p ( $FC=4,7$ ,  $P<0,001$ ) ir -145-5p ( $FC=-4,7$ ,  $P<0,001$ ) kiekių skirtumai nustatyti palyginus III PD stadijos atvejus su I stadijos PD. Asmenų, sergančių IV PD stadija kraujo plazmoje nustatyta patikimai daugiau miR-146a-5p ( $P=0,016$ ), palyginus III PD stadijos atvejais. 12 pav. iliustruoja miR-145-5p (A), -195-5p (B) ir -146a-5p (C) kiekio pokyčius plazmos mėginiuose skirtingų PD stadijų atveju.

Analizė atskleidė ir atrinktų miRNR sąsajas su PD klinikiniais rodikliais. Tiriamųjų, kurių CAL buvo  $\geq 2,5$  mm, kraujo plazmoje buvo nustatytas reikšmingas miR-146a-5p kiekio padidėjimas ( $P=0,011$ ) ir miR-145-5p sumažėjimas ( $P=0,014$ ) (13A pav.). Daugiau miR-195-5p ( $FC=1,8$ ,

$P=0,039$ ) ir-146a-5p ( $FC=1,3$ ,  $P=0,024$ ) ir mažiau miR-145-5p ( $FC=-2,2$ ,  $P=0,002$ ) nustatyta tiriamųjų, kurių PPD buvo  $\geq 3$  mm, grupėje (13B pav.). Analogiškai skirtumai buvo nustatyti analizuojant sąsajas su BL rodikliais (13C pav.).

Taip pat RA sergančiųjų kraujo plazmoje buvo nustatytas dvigubai didesnis miR-145-5p kiekis nei KT grupėje ( $P=0,036$ ). Reikšmingų asociacijų tarp atrinktų miRNR ir RA klinikinių rodiklių užfiksuota nebuvo.

### **Cirkuliuojančių miRNR diagnostinio potencialo vertinimas**

Siekiant įvertinti diagnostinį atrinktų miRNR potencialą buvo atlikta ROC analizė, apskaičiuojant plotą po kreive (angl. *area under the curve*, AUC) bei įvertinant jautrumo ir specifiškumo rodiklius kiekvienai miRNR ir jų deriniams DVS, seilių ir kraujo plazmos mėginiuose.

DVS atveju, įvertinus kiekvieną miRNR atskirai, didžiausiu diagnostiniu potencialu pasižymėjo miR-146a-5p, kurios AUC vertė siekė 0,640 ( $P=0,016$ ). Aukšta diagnostinė vertė buvo nustatyta ir DVS miR-145-5p ( $AUC=0,616$ ,  $P=0,044$ ). Vis dėlto, didesniais jautrumo ir specifiškumo pasižymėjo miR-146a-5p, palyginus su miR-145-5p (atitinkamai 61,90 % vs. 58,33 % ir 61,11 % vs. 58,33 %). Įvertinus miR-145-5p/-146a-5p derinio diagnostinį potencialą, nustatyta AUC vertė buvo 0,645 ( $P=0,012$ ), o jautrumo ir specifiškumo rodikliai, atitinkamai 61,90 % ir 61,11 %. Apjungus visas keturias tirtas miRNR, nustatyta didžiausia AUC vertė – 0,666 ( $P=0,007$ ), o jautrumo ir specifiškumo įverčiai panašūs į aukščiau minėtų miR-146a-5p ir miR-145-5p/-146a-5p derinio atveju (14 pav.)).

Iš visų keturių atskirai kraujo plazmoje tirtų miRNR didžiausia AUC vertė – 0,617 ( $P=0,020$ ) buvo nustatyta miR-195-5p atveju, su 57,84% jautrumo ir 57,14% specifiškumo rodikliais. Panašios jautrumo ir specifiškumo vertės, tačiau šiek tiek aukštesnė AUC (0,622,  $P=0,015$ ) reikšmė buvo gauta miR-145-5p/-195-5p deriniui. Įvertinus visų keturių miRNR derinio diagnostinį potencialą nustatyta šiek tiek mažesnė AUC vertė – 0,619 ( $P=0,018$ ), tačiau didesni jautrumo (61,76%) ir specifiškumo (61,22%) rodikliai (15 pav.).

Statistiškai reikšmingų rezultatų seilių miRNR atveju nustatyta nebuvo.

### **2 pavyzdys. Diagnostikos rinkinys uždegimui PD aktyvumui nustatyti**

Rinkinį PD uždegimui aktyvumui nustatyti sudaro:

a) sterilūs mėgintuvėliai, popieriaus kaiščiai DVS mėginių surinkimui ir RNR stabilizavimo tirpalas; sterilūs mėgintuvėliai su antikoagulantu kraujo mėginių surinkimui; sterilūs mėgintuvėliai su RNazių slopikliu seilių mėginių surinkimui ir RNR stabilizavimui;

- b) silikagelio kolonėlės RNR skyrimui iš organizmo skysčių mėginių;
- c) pradmenys, fermentai ir buferiai kDNR sintezei;
- d) pradmenų ir hidrolizės zondų bei PGR mišiniai kiekybiniam su PD susijusių miRNR nustatymui.

## IŠVADA

Mes ištyrėme miRNR raiškos profilį PD paveiktuose ir sveikuose dantenų audiniuose, neatsižvelgiant į RA statusą. Atlikus visuminės miRNR analizės metu gautų raiškos pokyčių validavimą buvo atrinktos keturios miRNR (miR-140-3p, -145-5p, -146a-5p ir -195-5p), kurių raiška PD paveiktuose audiniuose buvo reikšmingai pakitusi, palyginus su sveikais dantenų audiniais. Minėtos miRNR dalyvauja imuninės sistemos ir uždegiminių procesų reguliacijoje ir atlieka svarbų vaidmenį kituose su PD susijusiuose procesuose, tokiuose kaip periodonto audinių nykimas ir osteoklastogenezė. Atrinktų miRNR analizė organizmo skysčių biopsijos (DVS, seilių ir plazmos) mėginiuose parodė, kad tirtų miRNR kiekiai reikšmingai skiriasi tarp PD sergančių ir sveikų asmenų, o didesni jų kiekiai koreliuoja su prastesnę PD ligos eigą indikuojančiais klinikiniais-patologiniais rodikliais. Įvertinus miR-140-3p, -145-5p, -146a-5p ir -195-5p diagnostinį potencialą, nustatyta, kad šios keturios miRNR derinyje gali būti naudojamos kaip biologiniai žymenys mažai invazinei PD diagnostikai asmenims sergantiems ir nesergantiems RA. Optimalios atrinktų miRNR derinio santykinės raiškos ribinės reikšmės DVS ir kraujo plazmos mėginiuose yra atitinkamai – 0,290 (14F pav.) ir 0,380 (15F pav.). Be to, tai įgalina įvertinti PD aktyvumą, kuris yra svarbus tolesnės periodonto gydymo taktikos pasirinkime. Pažymėtina, kad šios srities specialistams galima atlikti kai kurias modifikacijas nenukrypstant nuo šio išradimo taikymo srities, todėl išradimo apsaugos aprėptis atsispindi pridedamoje apibrėžtyje.



**Literatūra:**

1. R. C. Page, P. I. Eke. Case definitions for use in population-based surveillance of periodontitis. *J Periodontol*. 2007;78:1387–99.
2. P. I. Eke, B.A. Dye, L. Wei, G. O. Thornton-Evans, and R.J. Genco. Prevalence of Periodontitis in Adults in the United States: 2009 and 2010. *J DENT RES* 2012 Oct;91(10):914-20
3. Tonetti MS, Jepsen S, Jin L, Otomo-Corgel J. Impact of the global burden of periodontal diseases on health, nutrition and wellbeing of mankind: A call for global action. *J Clin Periodontol*. 2017;44(5):456-462. doi:10.1111/jcpe.12732
4. Bansal M, Khatri M, Taneja V. Potential role of periodontal infection in respiratory diseases - a review. *J Med Life*. 2013;6(3):244-248.
5. Sanz M, Marco Del Castillo A, Jepsen S, et al. Periodontitis and cardiovascular diseases: Consensus report. *J Clin Periodontol*. 2020;47(3):268-288. doi:10.1111/jcpe.13189
6. Dhotre S V, Davane M S, Nagoba B S. Periodontitis, Bacteremia and Infective Endocarditis: A Review Study, *Arch Pediatr Infect Dis*. 2017 ; 5(3):e41067. doi: 10.5812/pedinfect.41067.
7. Chapple IL. Time to take periodontitis seriously. *BMJ* 2014;348:g2645.
8. C. Xiu-Min, H. Qing-Chun, Y. Sheng-Li, C. Yong-Liang, Y. Yu-Hong, H. Ling, H. Yu, H. Run-Yue, PhD. Role of Micro RNAs in the Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis Medicine (Baltimore). 2015 Aug; 94(31): 1326
9. Hussain SB, Botelho J, Machado V, et al. Is there a bidirectional association between rheumatoid arthritis and periodontitis? A systematic review and meta-analysis. *Semin Arthritis Rheum*. 2020;50(3):414-422. doi:10.1016/j.semarthrit.2020.01.009
10. Cosgarea R, Tristiu R, Dumitru RB, et al. Effects of non-surgical periodontal therapy on periodontal laboratory and clinical data as well as on disease activity in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Oral Investig*. 2019;23(1):141-151. doi:10.1007/s00784-018-2420-3
11. K. Ishida, T. Kobayashi, S. Ito, Y. Komatsu, T. Yokoyama, M. Okada, et al. Interleukin-6 gene promoter methylation in rheumatoid arthritis and chronic periodontitis. *J Periodontol*. 2012;83(7):917–25.
12. I. Silosi, M. Cojocaru, L. Foia, M. V. Boldeanu, F. Petrescu, P. Surlin, V. Biciusca. Significance of Circulating and Crevicular Matrix Metalloproteinase-9 in Rheumatoid Arthritis-Chronic Periodontitis Association. *Journal of Immunology Research*. 2015; 218060 - 6.
13. S. O. Geerts, V. Legrand, J. Charpentier, A. Albert, E. H. Rompen. Further evidence of the association between periodontal conditions and coronary artery disease. *J Periodontol* 2004;75:1274–80.
14. Lang NP, Bartold PM. Periodontal health. *J Clin Periodontol*. 2018;45 Suppl 20:S9-S16. doi:10.1111/jcpe.12936
15. Saresella M, La Rosa F, Piancone F, et al. The NLRP3 and NLRP1 inflammasomes are activated in Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener*. 2016;11:23. Published 2016 Mar 3. doi:10.1186/s13024-016-0088-1
16. Liu T, Zhang L, Joo D, Sun SC. NF-κB signaling in inflammation. *Signal Transduct Target Ther*. 2017;2:17023-. doi:10.1038/sigtrans.2017.23
17. Gaber T, Strehl C, Buttgerit F. Metabolic regulation of inflammation. *Nat Rev Rheumatol*. 2017;13(5):267-279. doi:10.1038/nrrheum.2017.37
18. R. Dai, S. A. Ahmed. MicroRNA, a new paradigm for understanding immunoregulation, inflammation, and autoimmune diseases. *Transl Res* 2011; 157:163-179.
19. Fushimi S, Nohno T, Nagatsuka H, Katsuyama H. Involvement of miR-140-3p in Wnt3a and TGFβ3 signaling pathways during osteoblast differentiation in MC3T3-E1 cells. *Genes Cells*. 2018;23:517-27
20. Taguchi YH, Murakami Y. Principal component analysis based feature extraction approach to identify circulating microRNA biomarkers. *PLoS One*. 2013;8(6):e66714
21. O'Leary L, Sevinç K, Papazoglou IM, Tildy B, Detillieux K, Halayko AJ, et al. Airway smooth muscle inflammation is regulated by microRNA-145 in COPD. *FEBS Lett* (2016) 590:1324–34. doi:10.1002/1873-3468.12168
22. Yang B, Kang X, Xing Y, Dou C, Kang F, Li J, et al. Effect of microRNA-145 on IL-1β-induced cartilage degradation in human chondrocytes. *FEBS Lett* (2014) 588:2344–52. doi:10.1016/j.febslet.2014.05.033

23. He M, Wu N, Leong MC, et al. miR-145 improves metabolic inflammatory disease through multiple pathways. *J Mol Cell Biol.* 2020;12(2):152-162. doi:10.1093/jmcb/mjz015
24. Kutty RK, Nagineni CN, Samuel W, Vijayasarathy C, Jaworski C, Duncan T, et al. Differential regulation of microRNA-146a and microRNA-146b-5p in human retinal pigment epithelial cells by interleukin-1 $\beta$ , tumor necrosis factor- $\alpha$ , and interferon- $\gamma$ . *Mol Vis* (2013) 19:737–50.
25. Xu W-D, Lu M-M, Pan H-F, Ye D-Q. Association of MicroRNA-146a with autoimmune diseases. *Inflammation* (2012) 35(4):1525–9. doi:10.1007/s10753-012-9467-0
26. Haumik D, Scott G, Schokrpur S, Patil C, Campisi J, Benz C. Expression of microRNA-146 suppresses NF- $\kappa$ B activity with reduction of metastatic potential in breast cancer cells. *Oncogene* (2008) 27:5643–7. doi:10.1038/onc.2008.171
27. Zheng C, Shu Y, Luo Y, Luo J. The role of miR-146a in modulating TRAF6-induced inflammation during lupus nephritis. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* (2017) 21:1041–8.
28. Li M, Wang J, Fang Y, Gong S, Li M, Wu M, et al. MicroRNA-146a promotes mycobacterial survival in macrophages through suppressing nitric oxide production. *Sci Rep* (2016) 6:23351. doi:10.1038/srep23351
29. Caton J.G., Armitage G., Berglundh T., Chapple I.L.C., Jepsen S., Kornman K.S., Mealey B.L., Papapanou P.N., Sanz M., Tonetti M.S. A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions —Introduction and key changes from the 1999 classification. *J. Clin. Periodontol.* 2018;45:S1–S8. doi: 10.1111/jcpe.12935
30. Ji S, Choi Y. Point-of-care diagnosis of periodontitis using saliva: technically feasible but still a challenge. *Front Cell Infect Microbiol.* 2015;5:65. Published 2015 Sep 3. doi:10.3389/fcimb.2015.00065
31. Bonneau E, Neveu B, Kostantin E, Tsongalis GJ, De Guire V. How close are miRNAs from clinical practice? A perspective on the diagnostic and therapeutic market. *EJIFCC.* 2019;30(2):114-127. Published 2019 Jun 24.
32. Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol.* 1999; 4: 1– 6.

### Išradimo apibrėžtis

1. Būdas, skirtas diagnozuoti uždegiminį periodontito aktyvumą reumatoidiniu artritu sergančių ir nesergančių asmenų organizmo skysčių mėginiuose, apimantis šiuos žingsnius:

- a. RNR skyrimą iš dantenų vagelės skysčio, seilių ar veninio kraujo mėginių, naudojant mažiausiai penkis sterilius popierinius kaiščius, vandeninį RNR stabilizavimo tirpalą, RNazių slopiklį ir antikoaguliantą, naudojant RNR skyrimo procedūrą;
- b. kDNR sintezės atlikimą atvirkštinės transkripcijos metodu;
- c. AT-kPGR atlikimą, siekiant aptikti su periodontitu susijusias miRNR minėtuose mėginiuose;
- d. duomenų analizę, siekiant nustatyti periodontitui-specifinių miRNR kieki.

2. Būdas pagal 1 punktą, kur naudojamas antikoaguliantas yra etilendiamintetraacto rūgšties dikalto druska.

3. Būdas pagal 1 punktą, kur naudojamas RNR stabilizavimo tirpalas stabilizuoja RNR nepažeistuose mėginiuose ir yra suderinamas su atliekamomis RNR skyrimo procedūromis.

4. Būdas pagal 1 punktą, kur minėta RNR skyrimo procedūra apima mėginių lizavimą fenolio/guanidino tirpalu gryninimui naudojant silikagelio kolonėles, kuriomis išskiriama visuminė RNR, įskaitant <200 nt ilgio RNR.

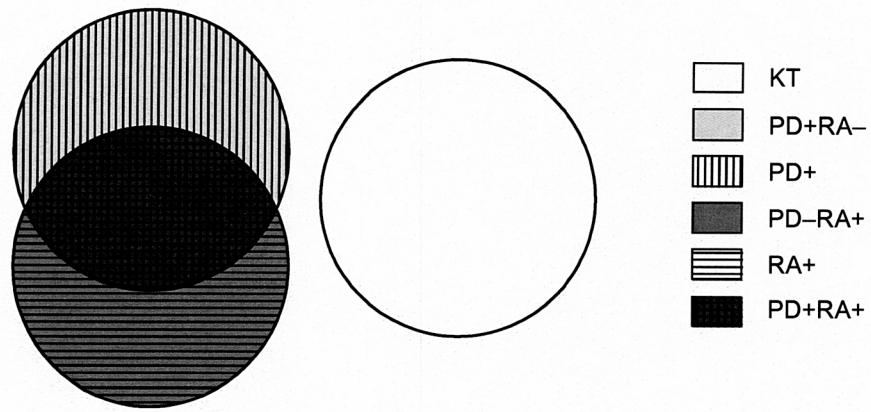
5. Rinkinys, skirtas periodontito uždegiminio aktyvumo nustatymui, apimantis:

- a. sterilius mėgintuvėlius ir popierinius kaiščius dantenų vagelės skysčio mėginiams surinkti ir tirpalą RNR stabilizavimui; sterilius mėgintuvėlius su antikoaguliantu veninio kraujo mėginiams surinkti; sterilius mėgintuvėlius seilių mėginiams surinkti ir RNazių slopiklį seilių RNR stabilizavimui;
- b. silikagelio kolonėles RNR gryninimui iš organizmo skysčių mėginių;
- c. pradmenis, fermentus ir buferius kDNR sintezei;
- d. pradmenų ir hidrolizės zondų bei PGR mišinius kiekybiniam periodontitui-specifinių miRNR nustatymui.



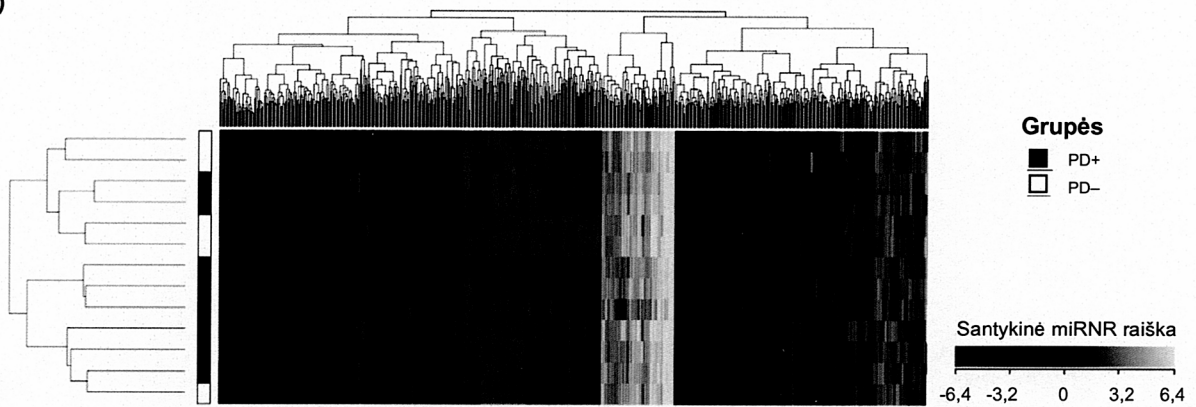
6. Būdas pagal 1 punkta ir rinkinys pagal 6 punkta, kur organizmo skysčiai yra dantenų vagelės skystis, seilės ir kraujo plazma.

7. Būdas pagal 1 punkta ir rinkinys pagal 6 punkta, kur periodontitui-specifinės miRNR yra: miR-140-3p, miR-145-5p, miR-146a-5p ir miR-195-5p.

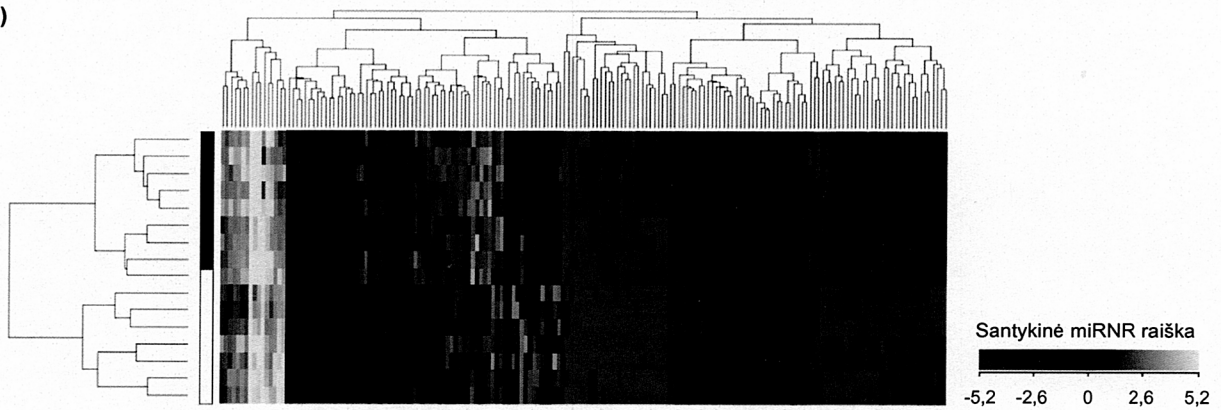


1 pav.

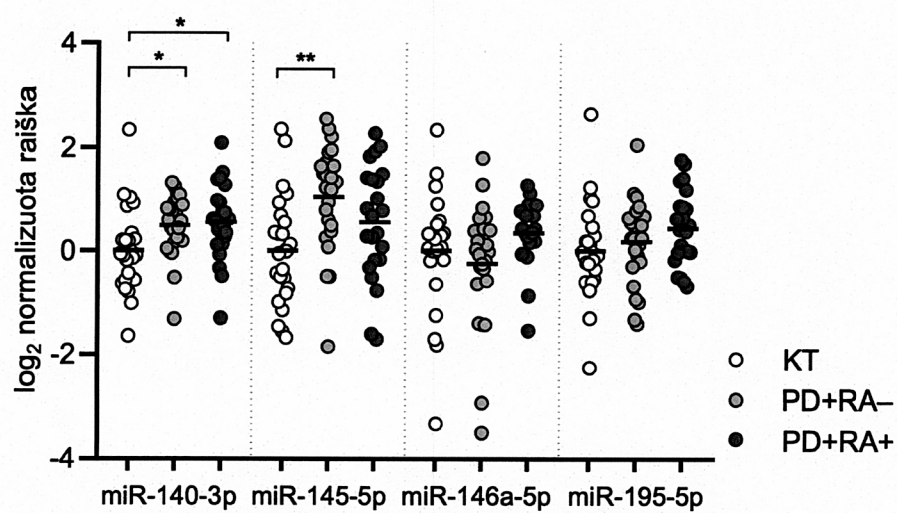
A)



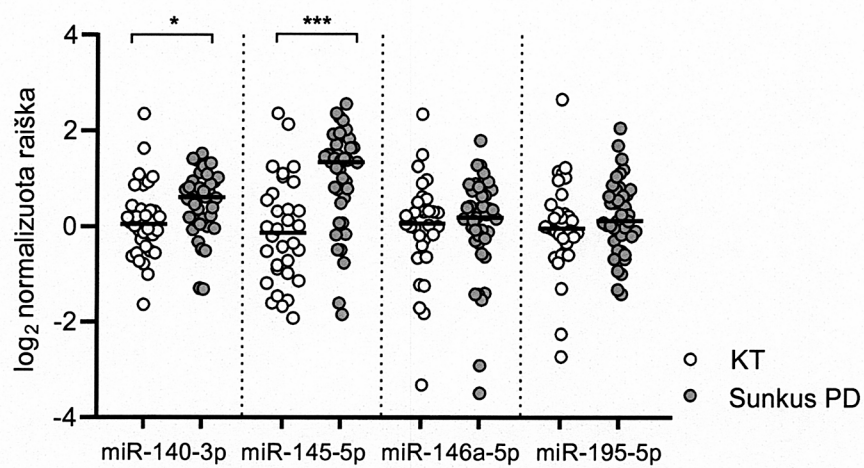
B)



2 pav.

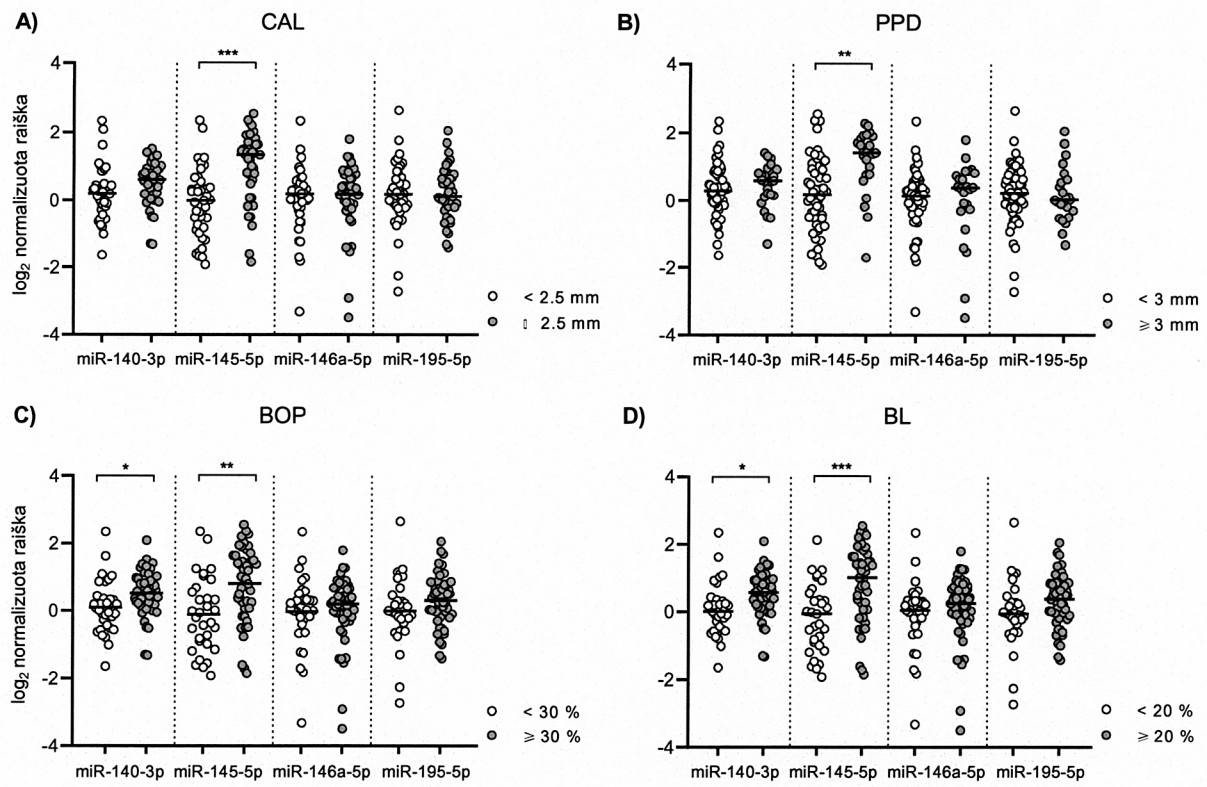


3 pav.

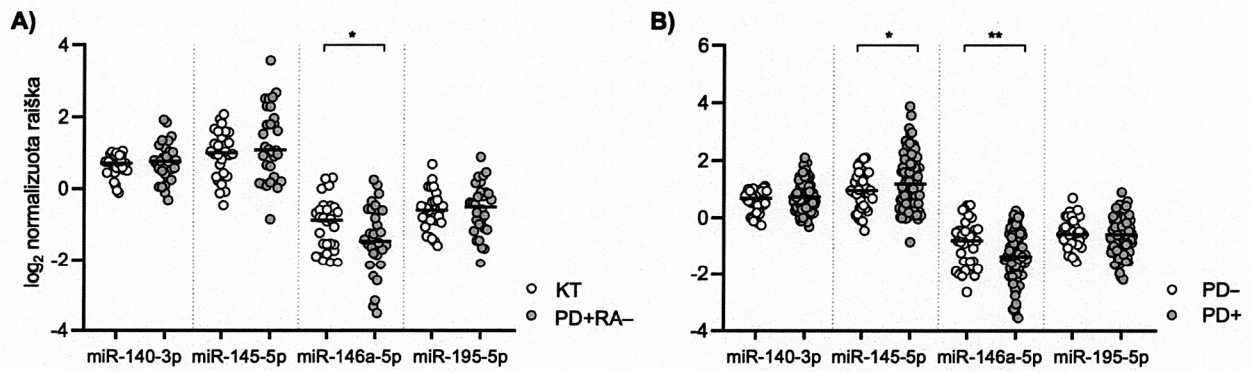


4 pav.

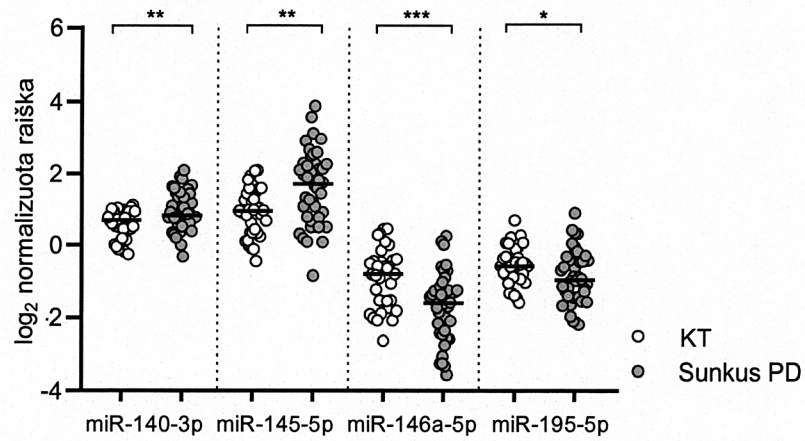




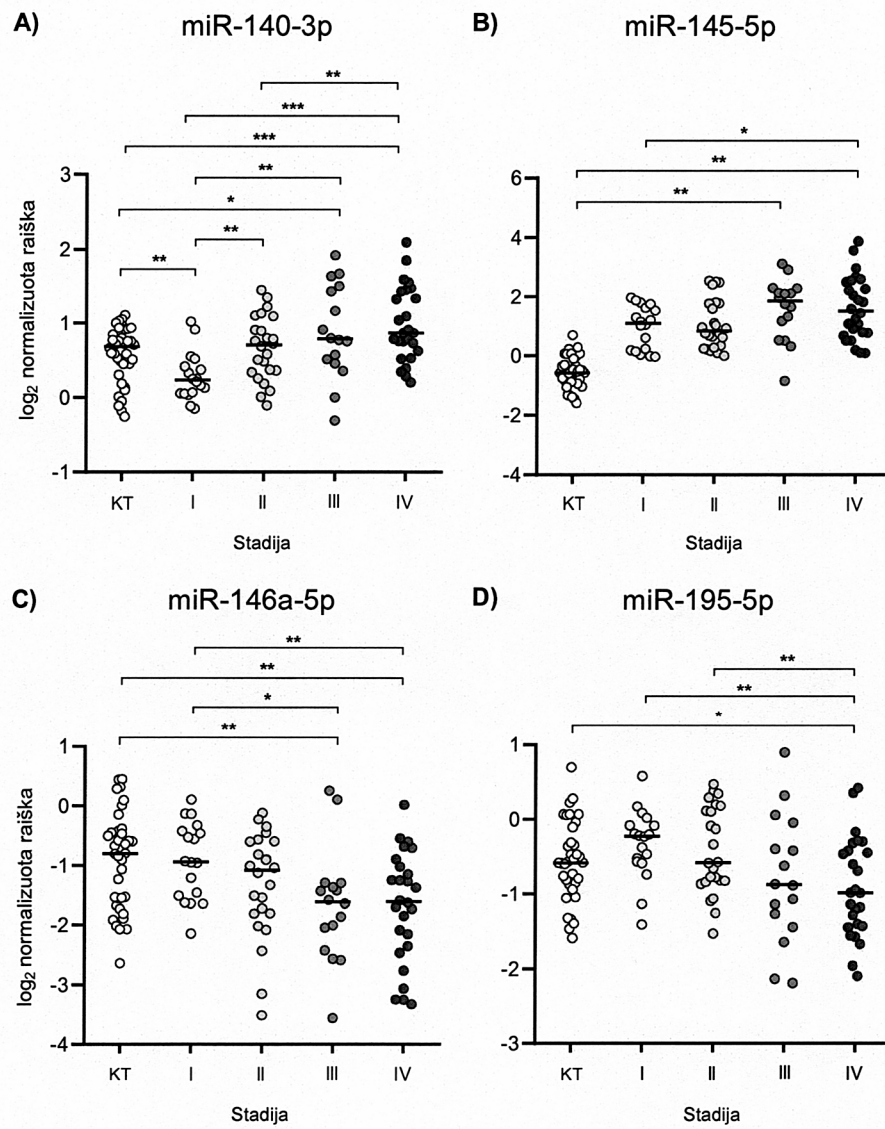
5 pav.



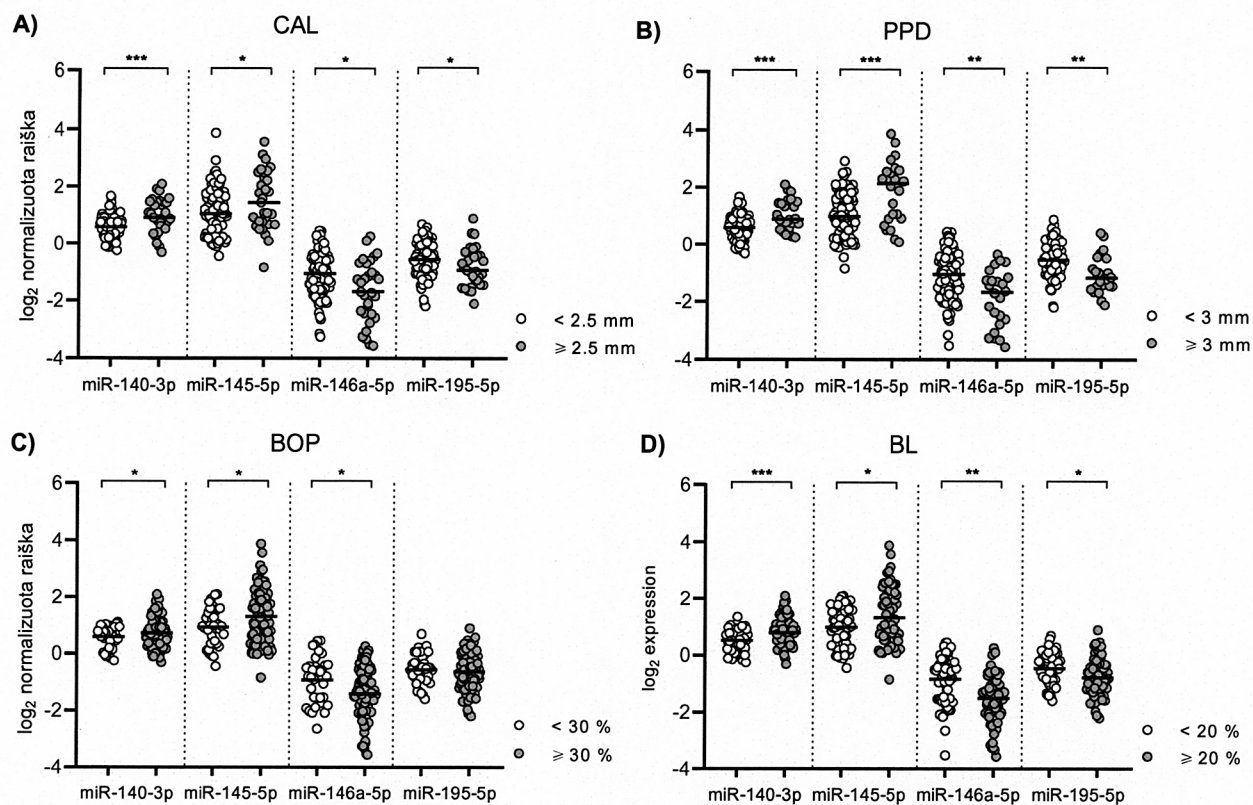
6 pav.



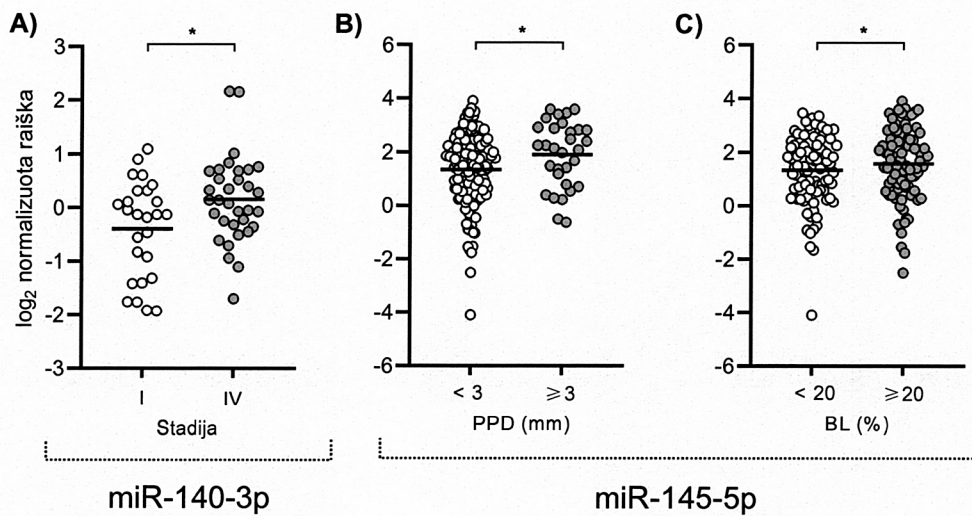
7 pav.



8 pav.

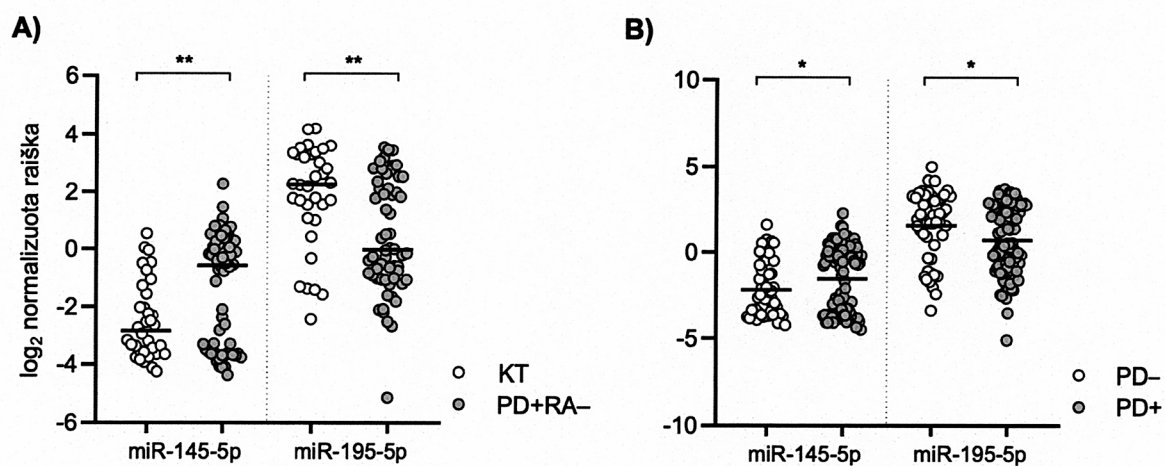


9 pav.

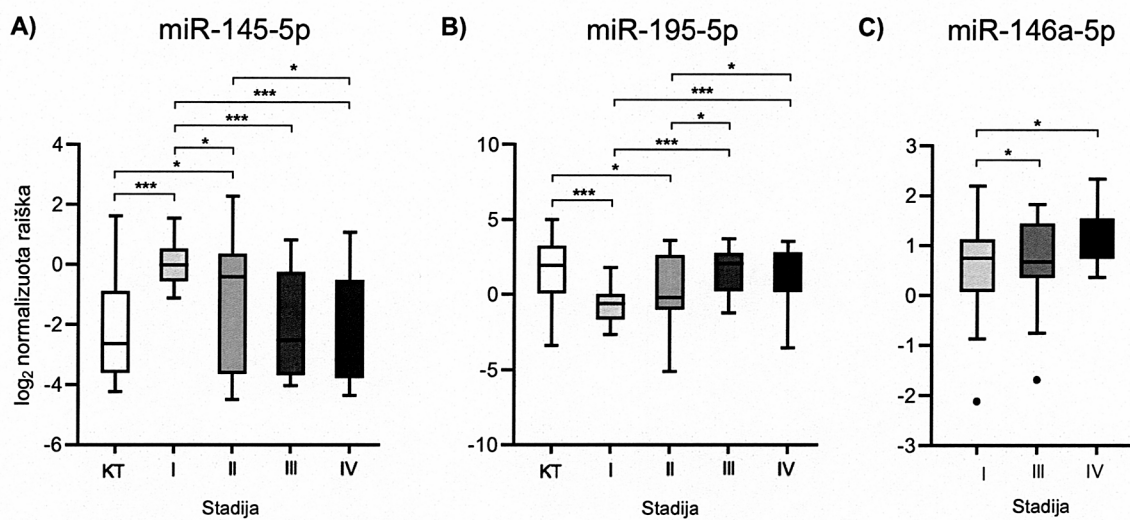


10 pav.

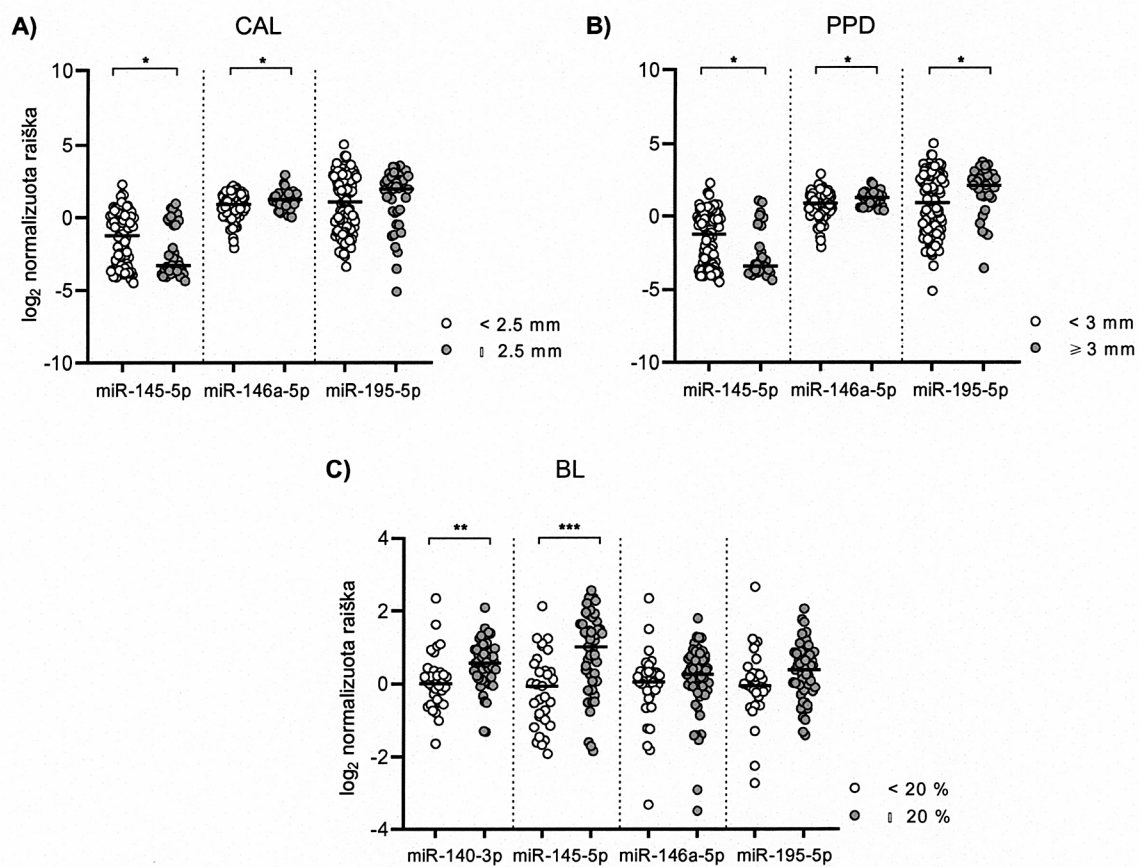




11 pav.



12 pav.



13 pav.

