

СТОМАТОЛОГІЯ ДИТЯЧОГО ВІКУ

УДК 616.716.4+616-001.5-053.2/.6

DOI <https://doi.org/10.35220/2078-8916-2024-53-3.18>**I.V. Kovach,**

доктор медичних наук, професор кафедри
дитячої стоматології, Дніпровський державний
медичний університет,
вул. Володимира Вернадського, 9, м. Дніпро, Україна,
індекс 49044, doc.ilakovach@ukr.net

G.E. Zub,

аспірант кафедри дитячої стоматології,
Дніпровський державний медичний університет,
вул. Володимира Вернадського, 9, м. Дніпро, Україна,
індекс 49044

РОЛЬ БІЛКІВ-ПРОМАРКЕРІВ РОТОВОЇ РІДИНИ В ДІАГНОСТИЦІ ЗАПАЛЕННЯ В ДИНАМІЦІ ХІРУРГІЧНОГО ЛІКУВАННЯ ПЕРЕЛОМУ НИЖНЬОЇ ЩЕЛЕНИ У ДІТЕЙ

Мета даного дослідження. Вивчення ролі матричної металопротеїнази-8 та експресії klotho-білка в діагностиці та прогнозуванні перебігу запалення у дітей з переломом кута нижньої щелепи в динаміці хірургічного лікування. **Матеріал та методи дослідження.** Нами було проведено дослідження дітей з переломом кута нижньої щелепи у віці від 6 до 17 років, які були розподілені на 2 групи в залежності від віку. Групу порівняння складала здорові діти, які не мали стоматологічної патології і були клінічно здорові. Всі обстежені діти були учнями або студентами навчальних закладів та звернулись за консультацією і лікуванням до відділення щелепно-лицевої хірургії. Біохімічні дослідження проводилися в ротовій рідині пацієнтів. Статистична обробка даних виконувалася з використанням загальноприйнятих непараметричних методів за допомогою програми MS Excel і ліцензійної статистичної програми Biostat. Достовірними вважалися відмінності між групами при ймовірності помилки менше 5 % ($p < 0,05$). **Результати дослідження та їх обговорення.** Деструкція альвеолярної кістки відбувається внаслідок дезградації компонентів екстрацелюлярного матриксу і призводить до незворотної втрати кісткової тканини. За даними ряду авторів, важливу роль в даному патологічному процесі відіграють матриксні металопротеїнази (ММР). Так, в ротовій рідині дітей 6-11 років концентрація ММР-8 через тиждень після хірургічного лікування перелому кута нижньої щелепи складала $3,18 \pm 0,17$ нг/мл, а в старшій віковій групі 12-17 років – $3,93 \pm 0,23$ нг/мл і ці показники достовірно відрізнялись та залежали від віку дитини ($p < 0,05$). Через місяць після проведеного хірургічного лікування перелому нижньої щелепи у дітей в обох вікових групах цифрові значення вмісту

як klotho-білку, так і ММР-8 достовірно змінились. **Висновки.** Проведені нами дослідження показали функціональну важливість таких білків, як матриксна металопротеїназа-8 та klotho білок в патогенезі запальних процесів в щелепі і це пов'язано, на нашу думку, з локальною стимуляцією регенеративних процесів, так як аутоплазма працює в якості природного стимулятора регенераційних процесів за рахунок виділення великої кількості факторів росту, що утворюються в процесі згортання крові при руйнуванні тромбоцитів та поліпшенням мікроциркуляції. Можна припустити, що цей клас пептидів, які, як правило, секретуються у відповідь на перелом щелепи і є біомаркерами для визначення наявності запального процесу як такого, його стадії, а також контролю результатів проведеного лікування.

Ключові слова: діти, матрична металопротеїназа-8, білок klotho, ротова рідина, перелом нижньої щелепи.

I.V. Kovach,

Doctor of Medical Sciences,
Professor at the Department of Pediatric Dentistry,
Dnipro State Medical University,
9 Vernadsky street, Dnipro, Ukraine, postal code 49044,
doc.ilakovach@ukr.net

G.E. Zub,

Post-graduate student of the Department
of Pediatric Dentistry,
Dnipro State Medical University,
9 Vernadsky street, Dnipro, Ukraine, postal code 49044

The purpose of this study. Study of the role of matrix metalloproteinase-8 and klotho protein expression in the diagnosis and prognosis of inflammation in children with mandibular angle fracture in the dynamics of surgical treatment. **Material and research methods.** We conducted a study of children with a mandibular angle fracture aged 6 to 17 years, who were divided into 2 groups depending on age. The comparison group consisted of healthy children who did not have dental pathology and were clinically healthy. All the examined children were students or students of educational institutions and applied for advice and treatment in the Department of Maxillofacial Surgery. Biochemical studies were performed in the patients' oral fluid. Statistical data processing was performed using Generally Accepted nonparametric methods using MS Excel and the licensed statistical program Biostat. Differences between groups with an error probability of less than 5 % ($p < 0.05$) were considered reliable. **Research results and their discussion.** Destruction of the alveolar bone occurs due to the degradation of components of the extracellular matrix and leads to irreversible bone loss. According to a number of authors, matrix metalloproteinases (MMPs) play an important role in this pathological process. Thus, in the oral fluid of children aged 6-11 years, the concentration of MMP-8 one week after surgical treatment of a mandibular angle fracture was 3.18 ± 0.17 ng/mL, and

in the older age group of 12-17 years – 3.93 ± 0.23 ng/mL and these indicators significantly differed and depended on the age of the child ($p < 0.05$). One month after surgical treatment of the lower jaw fracture in children in both age groups, the digital values of both klotho protein and MMP-8 significantly changed. **Conclusions.** Our studies have shown the functional importance of such proteins as matrix metalloproteinase-8 and klotho protein in the pathogenesis of inflammatory processes in the jaw and this is due, in our opinion, to local stimulation of regenerative processes, since autoplasm works as a natural stimulator of regeneration processes due to the release of a large number of growth factors formed during blood clotting during platelet destruction and improvement of microcirculation. It can be assumed that this class of peptides, which are usually secreted in response to a jaw fracture and are biomarkers for determining the presence of an inflammatory process as such, its stage, and monitoring the results of treatment.

Key words: children, matrix metalloproteinase-8, klotho protein, oral fluid, mandibular fracture.

THE ROLE OF ORAL FLUID BIOMARKERS IN THE DIAGNOSIS OF INFLAMMATION IN THE DYNAMICS OF SURGICAL TREATMENT OF MANDIBULAR FRACTURE IN CHILDREN

Відомо, що у ротовій рідині містяться численні білки, які беруть участь у природженому і набутому імунітеті [1, 2]. Одні з них, такі як лізоцим, лактоферин, катіонні білки, муцин та інші дуже важливі для вродженого імунітету. Однак останнім часом особливу увагу науковців привертає вивчення експресії klotho-білка, який ідентифікували японські вчені в 1997 році [8]. Білок klotho складається з 1014 амінокислот, має сигнальну послідовність на N-кінці і трансмембранний домен з коротким цитоплазматичним доменом на C-кінці та експресується в багатьох тканинах, в тому числі і в ротовій рідині, а розчинна форма цього білка грає важливу роль в різних процесах організму, включаючи транспорт іонів, трансдукції сигналу, бере участь в регуляції метаболізму кальцію та ін. [9].

Відомо, що високий відсоток розвитку запалення кісткової тканини в щелепі при її переломі, виявляються не відразу після перелому і можуть провокувати ускладнення в післяопераційному періоді [11-13]. Встановлена виняткова роль білка klotho в реалізації ефектів чинника зростання фібробластів 23 (FGF 23) та доведено, що дисбаланс рівня білка klotho може бути ранньою ознакою й ініціатором мінерально-кісткових порушень. Тому вивчення даного білка може бути необхідним для діагностики та прогнозування процесу запалення [10].

Одним з важливих факторів, що забезпечують антимікробний захист ротової порожнини, є спільна дія ряду антимікробних пептидів системи вродженого імунітету і пролін-багатих катіонних білків слини. Тому багаточисельними дослідженнями в останні роки науковці роблять спроби пошуку нових маркерів, які б дозволили прогнозувати перебіг захворювання на етапі його діагностики, що дало б змогу займатись превентивним лікуванням перед хірургічним втручанням [3, 5-7]. В останні роки одним із таких маркерів являються матриксні металопротеїнази, які можуть гідролізувати основні білки в позаклітинному просторі [4]. Матриксна металопротеїназа-8 (MMP-8) вважається одною із ведучих маркерів запалення.

Мета даного дослідження. Вивчення ролі матриксної металопротеїнази-8 та експресії klotho-білка в діагностиці та прогнозуванні перебігу запалення у дітей з переломом кута нижньої щелепи в динаміці хірургічного лікування.

Матеріал та методи дослідження. Нами було проведено дослідження дітей з переломом кута нижньої щелепи у віці від 6 до 17 років, які були розподілені на 2 групи в залежності від віку. Групу порівняння складала здорові діти, які не мали стоматологічної патології і були клінічно здорові. Всі обстежені діти були учнями або студентами навчальних закладів та звернулись за консультацією і лікуванням до відділення щелепно-лицевої хірургії.

Біохімічні дослідження проводилися в ротовій рідині пацієнтів. Для дослідження klotho-білка та матриксної металопротеїнази-8 (MMP-8) ротову рідину збирали вранці натще, яку отримували без стимуляції, шляхом спльовування в стерильні пробірки. Потім для визначення klotho-білка ротову рідину центрифугували 15 хвилин при 8000 об/хв, а надосадову частину ротової рідини переливали в пластикові пробірки і зберігали при температурі -30°C . Кількісне визначення klotho-білка в ротовій рідині проводилося методом твердофазного імуноферментного аналізу.

Кількісне визначення людської загальної матриксної металопротеїнази-8 (MMP-8) в ротовій рідині проводили методом імуноферментного аналізу за допомогою набору Quantikine, який визначає як профермент, так і активні форми людської MMP-8. Діапазон вимірювання – 0,06-10 нг/мл. Аналітична чутливість – 0,06 нг/мл.

Статистична обробка даних виконувалася з використанням загальноприйнятих непараметричних методів за допомогою програми MS Excel і ліцензійної статистичної програми

Biostat. Достовірними вважалися відмінності між групами при ймовірності помилки менше 5 % ($p < 0,05$).

Результати дослідження та їх обговорення. Аналізуючи дані таблиці нами встановлено, що кількісне значення MMP-8 дорівнює $0,29 \pm 0,02$ нг/мл та білку klotho – $42,03 \pm 2,82$ нг/мл у здорових дітей. При цьому у дітей 6-11 років з переломом кута нижньої щелепи при підготовці до проведення операції остеосинтезу з використанням мініпластин за 3 дні було встановлено підвищення MMP-8 майже 7 разів, що може бути пов'язано з посттравматичним процесом запалення, а цифрові значення вмісту білку klotho у цих дітей були знижені у 1,6 рази. Подібні зміни були встановлені і в старшій віковій групі дітей 12-17 років, які мали постійний прикус, а цифрові значення вивчаємих показників MMP-8 та klotho-білку склали $2,89 \pm 0,15$ нг/мл та $31,09 \pm 1,58$ нг/мл відповідно.

Згідно даних таблиці 1 ще нижче цифри досліджуваного klotho-білку спостерігали в обох вікових групах пацієнтів через тиждень після проведеного хірургічного лікування перелому кута нижньої щелепи шляхом остеосинтезу за допомогою мініпластин. Так, в групі пацієнтів 6-11 років, рівень klotho-білку складав $21,25 \pm 1,12$ нг/мл, а в групі пацієнтів 12-17 років – $27,07 \pm 1,42$ нг/мл ($p < 0,05$).

Деструкція альвеолярної кістки відбувається внаслідок деградації компонентів екстрацелюлярного матриксу і призводить до незворотної втрати кісткової тканини. За даними ряду авторів, важливу роль в даному патологічному процесі відіграють матриксні металопротеїнази (MMP).

Так, в ротовій рідині дітей 6-11 років концентрація MMP-8 через тиждень після хірургічного лікування перелому кута нижньої щелепи складала $3,18 \pm 0,17$ нг/мл, а в старшій віковій групі 12-17 років – $3,93 \pm 0,23$ нг/мл (табл. 1) і ці показники достовірно відрізнялись та залежали від віку дитини ($p < 0,05$). Крім того, досліджувані показники вірогідно відрізнялись ($p < 0,05$) від значення у здорових дітей без стоматологічної патології ($0,29 \pm 0,02$ нг/мл), що можна пов'язати, на нашу думку, із запаленням в кістковій тканині, яке виникло на тлі перелому.

Однак через місяць після проведеного хірургічного лікування перелому нижньої щелепи у дітей в обох вікових групах цифрові значення вмісту як klotho-білку, так і MMP-8 достовірно змінились. Так, аналіз кількісної оцінки MMP-8 в порожнині рота у дітей 6-11 років показав її зменшення до $0,43 \pm 0,05$ нг/мл, а у дітей 12-17 років – до $0,48 \pm 0,06$ нг/мл. При аналізі цифрових значень klotho-білку було встановлено збільшення його кількості у дітей 6-11 років до $43,78 \pm 2,36$ нг/мл, а у дітей 12-17 років до $44,23 \pm 2,59$ нг/мл.

Таблиця 1

Вміст білку MMP-8 та білку Klotho (protein Klotho) у ротовій рідині в динаміці хірургічного лікування перелому кута нижньої щелепи у дітей (ng/ml), $M \pm m$ (SD)

Групи	MMP-8	білок Klotho
здорові (n = 31)	$0,29 \pm 0,02$ (0,05)	$42,03 \pm 2,21$ (13,76)
діти 6-11 років (n = 6) за 3 дні до операції	$2,02 \pm 0,11$ (0,80)	$26,06 \pm 1,33$ (4,52)
через тиждень після операції (n=6)	$3,18 \pm 0,17$ (1,43)	$21,25 \pm 1,12$ (1,55)
через місяць після операції (n=6)	$0,43 \pm 0,05$ (0,42)	$43,78 \pm 2,36$ (0,90)
p рівень порівняно зі здоровими	$p < 0,05$	$p < 0,05$
p ₁ рівень через тиждень порівняно зі здоровими	$p < 0,05$	$p < 0,05$
p ₂ рівень місяць порівняно зі здоровими	$p < 0,05$	$p < 0,05$
діти 12-17 років (9) за 3 дні до операції	$2,89 \pm 0,15$ (0,85)	$31,09 \pm 1,58$ (4,85)
через тиждень після операції (n=9)	$3,93 \pm 0,23$ (1,62)	$27,07 \pm 1,42$ (1,66)
через місяць після операції (n=9)	$0,48 \pm 0,06$ (0,56)	$44,23 \pm 2,59$ (0,95)
p рівень порівняно зі здоровими	$p < 0,05$	$p < 0,05$
p ₁ рівень через тиждень порівняно зі здоровими	$p < 0,05$	$p < 0,05$
p ₂ рівень місяць порівняно зі здоровими	$p < 0,05$	$p < 0,05$

Отримані результати кількісної оцінки MMP-8 та klotho-білку в порожнині рота переконливо свідчать про те, що у обстежених пацієнтів, які поступили у відділення щелепно-лицевої хірургії з переломом кута нижньої щелепи і були прооперовані шляхом проведення остеосинтезу мініпластинами, виникає в результаті травми запальний процес, перебіг якого можна прогнозувати за допомогою вивчаємих маркерів.

Дані проведеного рангового кореляційного аналізу показують наявність сильних ($r_s > 0,70$) статистично значущих зв'язків ($p < 0,05$) MMP-8 та білку Klotho між собою.

Таким чином, проведені нами дослідження показали функціональну важливість таких білків, як матрична металопротеїназа-8 та klotho білок в патогенезі запальних процесів в щелепі і це пов'язано, на нашу думку, з локальною стимуляцією регенеративних процесів, так як аутоплазма працює в якості природного стимулятора регенеративних процесів за рахунок виділення великої кількості факторів росту, що утворюються в процесі згортання крові при руйнуванні тромбоцитів та поліпшенням мікроциркуляції. Можна припустити, що цей клас пептидів, які, як правило, секретуються у відповідь на перелом щелепи і є біомаркерами для визначення наявності запального процесу як такого, його стадії, а також контролю результатів проведеного лікування.

Література:

1. Fábíán T.K., Fejérdy P., Csermely P. Salivary Genomics, Transcriptomics and Proteomics: The Emerging Concept of the Oral Ecosystem and their Use in the Early Diagnosis of Cancer and other Diseases. *Curr Genomics*. 2008. №9(1). P. 11-21. doi: 10.2174/138920208783884900.
2. Nazir M. A. Prevalence of periodontal disease, its association with systemic diseases and prevention. *International Journal of Health Sciences*. 2017. № 11(2). P. 72–80.
3. Tonetti M. S., 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. *Journal of Clinical Periodontology*. 2017. № 44(5). P. 456–462. doi: 10.1111/jcpe.12732.
4. Franco C., Patricia H. R., Timo S., Claudia B. Marcela, H. Matrix metalloproteinases as regulators of periodontal inflammation. *International Journal of Molecular Sciences*. 2017. № 18(2). P. E440. doi: 10.3390/ijms18020440.
5. Qian L., Xuedong, Z., Yaping F., Tengyu Y., Songtao W., Yu Y., et al. (2017). Analysis of salivary protease spectrum in chronic periodontitis. *Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi*, 35(1), 37–42. doi: 10.7518/hxkq.2017.01.005.

6. Madhwani T., McBain A.J. Compositional modification of nascent in vitro dental plaques by human host-defence peptides. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2012 Apr;64(3):374-81. doi: 10.1111/j.1574-695X.2011.00922.x.

7. Ogawa Y., Miura Y., Harazono A., Kanai-Azuma M., Akimoto Y., Kawakami H., Yamaguchi T., Toda T., Endo T., Tsubuki M., Yanoshita R. Proteomic analysis of two types of exosomes in human whole saliva. *Biol Pharm Bull*. 2011. № 34(1). P. 13-23. doi: 10.1248/bpb.34.13.

8. Boman H.G. Antibacterial peptides: basic facts and emerging concepts. *J Intern Med*. 2003. № 254(3). P. 197-215. doi: 10.1046/j.1365-2796.2003.01228.x.

9. Imura A., Tsuji Y., Murata M., Maeda R., Kubota K., Iwano A. et al. α -Klotho as a regulator of calcium homeostasis. *Science*. 2007. T. 316. №. 5831. C. 1615-1618. doi: 10.1126/science.1135901.

10. Arking D.E., Becker D.M., Yanek L.R., Fallin D., Judge D.P., Moy T. F. et al. KLOTTHO allele status and the risk of early-onset occult coronary artery disease. *The American Journal of Human Genetics*. 2003. T. 72. №.5. C. 1154-1161. doi: 10.1086/375035.

11. Chocron Y., Azzi A.J., Davison P. Management of Pediatric Mandibular Fractures Using Resorbable Plates. *Journal of Craniofacial Surgery*. 2019. № 30(7). P. 2111-4. doi: <https://doi.org/10.1097/SCS.0000000000006002>.

12. Ferrari R., Lanzer M., Wiedemeier D., Rucker M., Bredell M. Complication rate in mandibular angle fractures-one vs. two plates: a 12-year retrospective analysis. *Oral and Maxillofacial Surgery*. 2018. № 22. P. 435-41. doi: <https://doi.org/10.1007/s10006-018-0728-4>

13. Ковач І.В., Зуб Г.Е., Крячкова Л.В., Кучеренко О.М., Хотімська Ю.В., Лавренюк Я.В., Влад М.І. Оптимізація хірургічного лікування перелому нижньої щелепи в дітей у змінному прикусі. *Медицинські перспективи*. 2022. Т. 27, № 2. С. 146-152. doi: 10.26641/2307-0404.2022.2.260291

References:

1. Fábíán, T.K., Fejérdy, P., & Csermely, P. (2008). Salivary Genomics, Transcriptomics and Proteomics: The Emerging Concept of the Oral Ecosystem and their Use in the Early Diagnosis of Cancer and other Diseases. *Curr Genomics*, 9(1), 11-21. doi: 10.2174/138920208783884900.
2. Nazir, M. A. (2017). Prevalence of periodontal disease, its association with systemic diseases and prevention. *International Journal of Health Sciences*, 11(2), 72–80.
3. Tonetti, M. S., Jepsen, S., Jin L., & Otomo-Corgel, J. (2017). Impact of the global burden of periodontal diseases on health, nutrition and wellbeing of mankind: A call for global action. *Journal of Clinical Periodontology*, 44(5), 456–462. doi: 10.1111/jcpe.12732.
4. Franco, C., Patricia, H. R., Timo, S., Claudia, B., & Marcela, H. (2017). Matrix metalloproteinases as regulators of periodontal inflammation. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(2), E440. doi: 10.3390/ijms18020440.

5. Qian L., Xuedong, Z., Yaping F., Tengyu Y., Songtao W., Yu Y., & et al. (2017). Analysis of salivary protease spectrum in chronic periodontitis. *Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi*, 35(1), 37–42. doi: 10.7518/hxkq.2017.01.005.
6. Madhwani, T., & McBain, A.J. (2012). Compositional modification of nascent in vitro dental plaques by human host-defence peptides. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 64(3), 374-81. doi: 10.1111/j.1574-695X.2011.00922.x.
7. Ogawa, Y., Miura, Y., Harazono, A., Kanai-Azuma, M., Akimoto, Y., Kawakami, H., Yamaguchi, T., Toda, T., Endo, T., Tsubuki, M., & Yanoshita, R. (2011). Proteomic analysis of two types of exosomes in human whole saliva. *Biol Pharm Bull*, 34(1), 13-23. doi: 10.1248/bpb.34.13.
8. Boman, H.G. (2003). Antibacterial peptides: basic facts and emerging concepts. *J Intern Med*, 254(3), 197-215. doi: 10.1046/j.1365-2796.2003.01228.x.
9. Imura, A., Tsuji, Y., Murata, M., Maeda, R., Kubota, K., Iwano, A. & et al. (2007). α -Klotho as a regulator of calcium homeostasis. *Science*, 316, 5831, 1615-1618. doi: 10.1126/science.1135901.
10. Arking, D.E., Becker, D.M., Yanek, L.R., Fallin, D., Judge, D.P., Moy, T. F. & et al. (2003). KLOTHO allele status and the risk of early-onset occult coronary artery disease. *The American Journal of Human Genetics*, 72, 5, 1154-1161. doi: 10.1086/375035.
11. Chocron, Y., Azzi, A.J., & Davison, P. (2019). Management of Pediatric Mandibular Fractures Using Resorbable Plates. *Journal of Craniofacial Surgery*, 30(7), 2111-4. doi: <https://doi.org/10.1097/SCS.0000000000006002>.
12. Ferrari, R., Lanzer, M., Wiedemeier, D., Rucker, M., & Bredell, M. (2018). Complication rate in mandibular angle fractures-one vs. two plates: a 12-year retrospective analysis. *Oral and Maxillofacial Surgery*, 22, 435-41. doi: <https://doi.org/10.1007/s10006-018-0728-4>
13. Kovach, I.V., Zub, G.E., Krjachkova, L.V., Kucherenko, O.M., Hotims'ka, Ju.V., Lavrenjuk, Ja.V., & Vlad, M.I. (2022). Optyimizacija hirurhichnogo likuvannja perelomu nyzhn'oi' shhelepy v ditej u zminnomu prykusi [Optimization of surgical treatment of mandibular fracture in children with variable bite]. *Medychni perspektyvy – Medical perspectives*, 27, 2, 146-152. doi: 10.26641/2307-0404.2022.2.260291 [in Ukrainian]