АСРА В СЛЮНКА И ВРЪЗКАТА ИМ С ПАРОДОНТИТ И РЕВМАТОИДЕН АРТРИТ**Т. Болярова-Коновска¹, Л. Стефанов¹, Зл. Коларов², Д. Танев³, П. Янкова⁴**¹Факултет по дентална медицина, Катедра по пародонтология, МУ – София²Клиника по ревматология, УМБАЛ „Свети Иван Рилски“, МУ – София³Отделение по ревматология, УМБАЛ Софиямед – София⁴Катедра по клинична имунология и банка за стволови клетки, УМБАЛ „Александровска“, МУ – София**ACPA IN SALIVA AND THEIR ASSOCIATION WITH PERIODONTITIS
AND RHEUMATOID ARTHRITIS****T. Bolyarova-Konova¹, L. Stefanov¹, Zl. Kolarov², D. Tanev³, P. Yankova⁴**¹Faculty of Dental Medicine, Department of Periodontology, MU – Sofia²Clinic of Rheumatology, University Hospital „Sv. Ivan Rilski“, MU – Sofia³Rheumatology Ward, UMHAT Sofia Med – Sofia⁴Department of Clinical Immunology and Stem Cells Bank, University Hospital „Alexandrovska“, MU – Sofia

Резюме. Антицитрулинираните протеинови антитела (АСРА) се формират под действие на възникнали в организма антигени и са част от етиологията на ревматоидния артрит (РА). Те са чувствителен и високоспецифичен показател за РА. В изследването участват 105 пациенти на възраст от 32 до 85 години (средна възраст $50,6 \pm 13,07$), разпределени в четири групи: I група – с пародонтит (П) и без РА (с диагностицирана остеоартроза) – 26 човека; II група – с П и РА – 28 човека; III група – без П и с РА – 26 човека; IV група – без П и без РА – 25 човека. При всички пациенти са извършени клинични и лабораторни изследвания за диагностика на РА и остеоартроза, клинично пародонтално изследване и е събрана нестимулирана цялостна слюнка. Установихме, че при пациентите с РА нивата на АСРА в слюнка са значително по-високи спрямо здравите лица ($p < 0,0001$). Установихме, че пациентите с П имат значително по-високи нива на АСРА в слюнка спрямо здравите лица ($p < 0,0001$). При пациентите с П установихме значима корелация между концентрацията на АСРА в слюнка и показателите: PISA, PD, BOP, съответно ($p < 0,001$, $p = 0,003$, $p = 0,007$). При пациентите с РА резултатите ни показват значима корелация на концентрацията на АСРА в слюнка с показателите: АСРА в серум ($p < 0,0001$); концентрация на RF в серум ($p < 0,0001$); DAS 28 (CRP) ($p = 0,009$). На основата на установените зависимости между АСРА в слюнка и показателите на РА може да се предложи високата концентрация на АСРА в слюнка като леснодостъпен показател за РА, но са необходими допълнителни изследвания, за да се верифицира като съответен маркер. Установената връзка между показателите за П и АСРА в слюнка потвърждава влиянието на пародонталното възпаление върху този показател и обосновава лечението на П като начин за превенция и контрол на РА.

Ключови думи: АСРА, пародонтит, ревматоиден артрит

Abstract. Anti-cyclic citrullinated peptide antibodies (ACPA) are formed by the action of host-generated antigens and are part of the etiology of rheumatoid arthritis (RA). They are a sensitive and highly specific indicator of RA. In the study were involved 105 subjects aged 32 to 85 years (Mean age $50,6 \pm 13,07$), divided into four groups: Group I – with periodontitis (P) and without RA, with diagnosed osteoarthritis – 26 patients; Group II – with P and RA – 28 patients; Group III – without P and with RA – 26 patients; Group IV – without P and RA – 25 individuals. All patients underwent clinical and laboratory tests for the diagnosis of RA and osteoarthritis, a clinical periodontal examination, and unstimulated whole saliva was collected. We found significantly higher salivary ACPA levels in RA patients compared to healthy subjects ($p < 0.0001$). In P patients, we found significantly higher levels of ACPA in saliva than in healthy subjects ($p < 0.0001$). Among P patients, we found a significant correlation between ACPA concentration in saliva and the following indicators: PISA, PD, BOP, respectively ($p < 0.001$, $p = 0.003$, $p = 0.007$). Among RA patients, our results showed a significant correlation of ACPA concentration in saliva with the following indicators: serum ACPA concentration ($p < 0.0001$); serum RF concentration ($p < 0.0001$); DAS 28 (CRP) ($p = 0.009$). Based on the established

correlation between salivary ACPA levels and RA indicators, a high concentration of ACPA in saliva may be suggested as an easily accessible indicator of RA, but further studies are needed to ascertain this possibility. The established association between periodontal parameters and salivary ACPA levels confirms the effect of periodontal inflammation on salivary ACPA concentration and justifies the treatment of P as a way of preventing and controlling RA.

Key words: ACPA, periodontitis, rheumatoid arthritis

Увод

През последните две десетилетия са известни антицитрулинирани протеинови антитела (ACPA), които са формирани под действие на възникнали в организма антигени и са част от етиологията на ревматоидния артрит (РА). ACPA са чувствителен показател за РА, но значително по-специфичен от ревматоидния фактор (RF) за диагностициране на РА и могат да се открият и при RF-отрицателни пациенти с РА [1, 2]. Наличието им в кръвен серум е асоциирано с по-тежка клинична картина, по-голяма костна деструкция и по-голяма вероятност за агресивен курс на заболяването [3]. Ролята на екстраартикуларната цитрулинация в патогенезата на РА все още продължава да се изяснява. Има данни, че ензимът пептидиларгинин деаминаза (PPAD) на пародонтопатогена *Porphyromonas gingivalis* и човешка PAD-4 са основни фактори в цитрулинирането на протеини във възпалени тъкани на пародонта при пародонтит (П), което стимулира производство на ACPA. От друга страна, вземането на слюнка е лесно, бързо, евтино и неинвазивно, което я прави удобна биологична течност за диагностика и мониториране на РА, ако в нея се установят маркери на заболяването.

Цел

Определяне на концентрациите на ACPA в слюнка при пациенти с П, с РА, с двете заболявания и при здрави лица. Съпоставяне на слюнчените и серумните нива на ACPA. Съпоставянето на концентрациите на ACPA в слюнка с клинични параметри на П и с показатели на РА.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

В изследването участват 105 пациенти на възраст от 32 до 85 години (средна възраст $50,6 \pm 13,07$), от които 71 жени и 34 мъже, разпределени в четири групи: I група – пациенти с П и без

INTRODUCTION

In the last two decades, anti-cyclic citrullinated peptide antibody (ACPA) has been known as antibodies formed by the action of antigens originated in the body, and ACPA are part of the etiology of rheumatoid arthritis (RA). ACPA are a sensitive indicator of RA, but significantly more specific than the Rheumatoid factor (RF) for diagnosing RA, and can be found in RF-negative patients with RA. [1, 2]. Their presence in blood serum is associated with more severe clinical signs, greater bone destruction, and a greater risk of an aggressive course of the disease [3]. The role of the extraarticular citrullination in the pathogenesis of RA remains to be elucidated. There is evidence that in the case of periodontitis (P), the enzyme peptidylarginine deaminase (PPAD) of periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis* and human PAD-4 are major factors in peptide citrullination in inflamed periodontal tissues, which stimulates ACPA production. Saliva collection, on the other hand, is easy, fast, inexpensive, and non-invasive, making it a convenient biological fluid for the diagnosis and monitoring of RA if disease markers are identified in it.

OBJECTIVE

To determine ACPA concentration in saliva in patients with P, with RA, with both diseases, and in healthy subjects. Comparison of salivary and serum ACPA levels. Comparison of ACPA concentration in saliva with clinical periodontal parameters and with RA indicators.

MATERIAL AND METHODS

The study involved a total of 105 patients, aged 32 to 85 years (Mean age $50,6 \pm 13,07$), 71 women and 34 men, divided into four groups: Group I – patients with P and without RA (diagnosed osteoarthritis).

РА (диагностицирана остеоартроза) – 26 човека; II група – пациенти с П и РА – 28 човека; III група – пациенти без П (с пародонтално здраве) и с РА – 26 човека; IV група – пациенти без П (пародонтално здраве) и без РА – 25 човека.

Пациентите, които са включени в изследването, са над 18 години, имат най-малко девет зъба в устата, не им е провеждано антибиотично лечение през последните три месеца, не им е провеждано пародонтално лечение през последните шест месеца, нямат нужда от антибиотична профилактика по време на процедури в устата, включително пародонтално сондиране. Изключват се пациенти, които имат диабет или друго заболяване, повлияващо имунния статус. Изключват се бременни и кърмещи жени.

Изследването е проведено в съгласие с етичните норми от Декларацията от Хелзинки на Световната медицинска асоциация. Институционалният съвет по медицински науки на Медицински университет – София, одобри протоколите на изследването, включително клиничните изследвания и събирането на слюнка. Всички субекти подписаха информирано съгласие, преди да влязат в проекта и след като прочетоха уведомителното писмо.

При всички пациенти са извършени клинични и лабораторни изследвания за диагностика на РА и остеоартроза – анамнеза, физикално изследване, пълна кръвна картина, възпалителни биомаркери – скорост на утаяване на еритроцитите, С-реактивен протеин; имунологични показатели – концентрация на ревматоиден фактор от клас IgM (RF-IgM) в серум и концентрация на АСРА в серум. От всички пациенти е взета периферна кръв от кубитална вена на гладно, която се използва за изследвания в клинична лаборатория и клинична имунология. Направено е рентгенографско изследване на длани и пръсти на двете ръце във връзка с диагностика на ставното заболяване. Определен е показателят за болестна активност (Disease Activity Score – DAS-28 (CRP), който е съвкупен индекс, включващ клинични и лабораторни данни.

При всички пациенти е извършено клинично пародонтално изследване чрез хигиенен индекс (HI), индекс за кървене от папилата (PBI); определяне дълбочината на пародонталния джоб при сондиране (PD); определяне на загубата на клиничен аташман (CAL); определяне на показателя кървене при сондиране (BOP); наличие на рецесии за всяка пародонтална единица. Изследването се извършва със специализирана градуирана пародонтална сонда на всяка пародонтална еди-

tis) – 26 patients; Group II – patients with P and RA – 28 patients; Group III – patients without P (with periodontal health) and with RA – 26 patients; Group IV – patients without P (periodontal health) and RA – 25 individuals.

Patients included in the study are over 18 years of age, have at least nine teeth, have not received antibiotic treatment in the last three months, have not undergone periodontal treatment in the last six months, do not need antibiotic prophylaxis during oral procedures, including periodontal probing. Patients who have diabetes or other disease affecting their immune status were excluded. Pregnant and lactating women were excluded.

The research was ethically conducted according to the Helsinki Declaration of the World Medical Association. The Institutional Council on Medical Science of Medical University – Sofia approved the study protocols, including the recording of clinical measurements and the collection of saliva samples. All subjects signed informed consent prior to entry into the project and after reading the notification letter.

All patients underwent clinical examination and laboratory tests for the diagnosis of RA and osteoarthritis – history, physical examination, complete blood count, inflammatory biomarkers – erythrocyte sedimentation rate, C-reactive protein; immunological parameters – serum concentration of rheumatoid factor class IgM (RF-IgM) and serum concentration of ACPA. Peripheral blood from the cubital vein on an empty stomach was obtained from all the patients and was tested in the clinical laboratory and clinical immunology. An X-ray examination of palms and fingers of both hands was performed regarding the diagnosis of joint disease. The Disease Activity Score – CRP (DAS-28 (CRP), which is a composite index, including clinical and laboratory data, have been determined.

All participants received a clinical periodontal examination, which includes: Hygiene index (HI), Papillary bleeding index (PBI), Periodontal pocket depth (PD), Clinical attachment loss (CAL), Bleeding on probing (BOP) and the presence of recessions for each periodontal unit. The examination is performed with a specialized graduated periodontal probe, and six sites of each periodontal unit were explored. PISA Indicator (Periodontal inflamed surface area), which shows the amount of inflamed

ница в устата в шест точки. Определя се показателят PISA (Periodontal inflamed surface area), който показва количеството на възпалена пародонтална повърхност, изчислена в mm^2 [4]. Изчисляването на PISA става чрез въвеждане на пародонтални измервания (CAL, PPD, BOP, ниво на гингивалния ръб) върху специално създаден за целта файл на програмата Microsoft Excel. Според авторите PISA отразява тежестта и активността на пародонталното заболяване и може да се свърже с влиянието на П върху други системни заболявания.

При пациентите с П (от първа и втора група) се изследват шест места в два квадранта с най-малко два засегнати зъба във всеки квадрант и всяко засегнато място е с дълбочина на джоба при сондиране $\text{PPD} \geq 5 \text{ mm}$, клинична загуба на аташман $\text{CAL} \geq 3 \text{ mm}$, кървене при сондиране $\text{BOP} \geq 20\%$ от всички изследвани места (изследвани са шест места на зъб). Участват пациенти с П, определени по новата класификация като II, III и IV фаза [5]. Пациентите с П се класифицират с различна активност на заболяването на основата на показателя PISA. В трета и четвърта група пациентите са с пародонтално здраве. Здравите лица имат $\text{PBI} \leq 10\%$ от всички изследвани места (изследвани са шест места на зъб), дълбочина на джоба при сондиране $\text{PPD} \leq 3 \text{ mm}$ на всички места, липса на места със загуба на аташман Clinical attachment loss ($\text{CAL} \geq 2 \text{ mm}$) [6].

От всички пациенти е събрана нестимулирана цялостна слюнка в съответствие с метода, описан от Navazesh [7] и модифициран съгласно IARC – International Agency for Research on Cancer (Collecting and Processing Saliva. The Molecular Methods database. Wed, 12/19/2012). Преди да се получи материалът от слюнка, не се прави никаква интервенция в устата. Пациентът изплаква устата си с обикновена чешмяна вода (приблизително 10 ml) за 30 секунди и изплюва извън съда за събиране. Пет минути след устното изплакване всяко лице отделя слюнка в стерилен контейнер, поставен в съд с лед, в продължение на 10 минути. Целта е да се събере количество около 2 ml. Контейнерите със слюнка се транспортират в хладилна чанта до лабораторията, която подготвя материала в рамките на 2 часа. Слюнковият материал се центрофугира на $2600 \times g$ за минута, за 15 минути, на $t 4^\circ \text{C}$. Супернатантът се прехвърля в надписана крио-епруветка, която съдържа разтвор на лиофилизиран протеазен инхибитор (SigmaFast Protease inhibitor, Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, USA) – 1 μL от протеазния инхибитор на всеки ml от слюнк-

periodontal surface calculated in mm^2 [4], was determined. PISA calculation is effectuated by entering of periodontal measurements (CAL, PPD, BOP, gingival margin level) on a specially designed Microsoft Excel file. According to the authors, PISA reflects the severity and activity of the periodontal disease and may be associated with the impact of P on other systemic diseases.

Patients with P (first and second group) – have six sites in two quadrants with at least two affected teeth in each quadrant and each affected site has a probing pocket depth $\text{PPD} \geq 5 \text{ mm}$, clinical attachment loss $\text{CAL} \geq 3 \text{ mm}$, bleeding on probing $\text{BOP} \geq 20\%$ of all examined sites (six sites per tooth). The study involved patients with P of II, III, and IV stages, according to the new classification [5]. Patients with P were classified with different disease activity based on the PISA indicator. Third and fourth group patients were periodontally healthy. Healthy individuals had $\text{PBI} \leq 10\%$ of all examined sites (six sites per tooth), all of the sites showed probing pocket depth $\text{PPD} \leq 3 \text{ mm}$, no sites with clinical attachment loss $\text{CAL} \geq 2 \text{ mm}$ [6].

Unstimulated whole saliva samples are taken from all participants in accordance with Navazesh's method [7] and modified in accordance with IARC – International Agency for Research on Cancer (Collecting and Processing Saliva. The Molecular Methods database. Wed, 12/19/2012). No interventions were done in the mouth before the saliva sample was gathered. All persons rinsed mouth with plain tap water (10 ml) for 30 seconds and spit out before saliva was collected. Five minutes after oral rinsing, individuals spit into a sterile container at least once a minute for 10 minutes. Around 2 ml of the whole saliva was collected. The containers with saliva were placed in a vessel, filled with ice during collection and transportation to the laboratory, where the processing of the material was performed within 2 hours. In the immunologic laboratory, the material was centrifuged at $2600 \times g$ per minute for 15 minutes at 4°C . The supernatant was collected in a new cryotube, which contains a solution of lyophilized protease inhibitor (SigmaFast Protease inhibitor, Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, USA) – 1 μL of a protease inhibitor for every mL of saliva. All samples were stored in a freezer at temperatures of -80°C until the time of analysis – quantifying salivary ACPA through en-

ка. Всички проби се съхраняват на $t - 80^{\circ}\text{C}$ до момента на анализа – количествено определяне на АСРА в слюнка чрез метода ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)(Euroimmun AG, Германия).

За статистическа обработка на данните се използват адекватни методи на медицинската статистика: честотен анализ; вариационен анализ; кростабулация (взаимни честотни разпределения на две качествени променливи); проверка за нормалност на разпределение на количествени променливи – Kolmogorov-Smirnov; дисперсионен анализ: T-Test или ANOVA в зависимост от броя на категориите на групиращата променлива, когато променливите са нормално разпределени; непараметрични подходи (Mann-Whitney U test, когато групиращата променлива има две категории и Kruskal-Wallis test при повече от две категории на групиращата променлива), ако разпределението не е нормално; корелационен анализ: параметричен (Pearson Correlation) и непараметричен (Spearman's rho). При проверка на хипотези, нулевата хипотеза се отхвърля, ако $p < 0,05$.

РЕЗУЛТАТИ

Резултатите показват значимо по-високи концентрации на АСРА в слюнка при пациентите от 3-та група (с РА) спрямо здравите лица от 4-та група (Mann-Whitney U test, $p < 0,001$), спрямо пациентите от 1-ва група (с П) (Mann-Whitney U test, $p = 0,016$) и спрямо пациентите от 2-ра група (с П и РА) (Mann-Whitney U test, $p = 0,017$). Установихме значимо по-високи концентрации на АСРА в слюнка при пациентите от 1-ва група (с П) спрямо здравите индивиди от 4-та група (Mann-Whitney U test, $p < 0,001$), както и на пациентите от 2-ра група (П и РА) спрямо здравите индивиди от 4-та група (Mann-Whitney U test, $p < 0,001$). Установихме, че пациентите с РА общо (от 2-ра и 3-та група) са със значително по-високи нива на АСРА в слюнка спрямо при пациентите от 4-та група (без П и без РА) (Mann-Whitney U test, $p < 0,0001$). Установихме, че пациентите с П общо (от 1-ва и 2-ра група) са със значително по-високи нива на АСРА в слюнка спрямо пациентите от 4-та група (без П и без РА) (Mann-Whitney U test, $p < 0,0001$) (табл. 1).

При изследваните пациенти с П (1-ва и 2-ра група) установихме статистически значима положителна корелация между концентрацията АСРА в слюнка и следните показатели: PISA; PD средно; BOP, съответно Spearman's $R = 0,525$, $p < 0,001$, Spearman's $R = 0,290$, $p = 0,003$, Spearman's $R = 0,263$, $p = 0,007$ (фиг. 1, 2,

zyme-linked immunosorbent assay (ELISA)(Euroimmun AG, Germany).

Adequate methods of medical statistics were used for statistical data processing: frequency analysis, variational analysis; crosstabulation; the test of normality (test of the normal distribution of quantitative variables) – Kolmogorov-Smirnov. Analysis of variance: T-Test or ANOVA depending on the number of categories of the grouping variable when the variables were normally distributed. Nonparametric approaches (Mann-Whitney U test when grouping variable has two categories and Kruskal-Wallis test for more than two grouping variables categories) if the distribution was not normal. Correlation analysis: parametric (Pearson Correlation) and nonparametric (Spearman's rho). Statistical significance was declared if the p-value was < 0.005 .

RESULTS

The results showed significantly higher concentrations of ACPA in saliva in patients in group 3 (with RA) compared to healthy subjects in group 4 (Mann-Whitney U test, $p < 0.001$), to the patients in group 1 (with P) (Mann-Whitney U test, $p = 0.016$) and the patients in group 2 (P and RA) (Mann-Whitney U test, $p = 0.017$). We found significantly higher concentrations of ACPA in saliva in patients in group 1 (with P) compared to healthy subjects in group 4 (Mann-Whitney U test, $p < 0.001$) as well as in patients in group 2 (P and RA) compared to healthy subjects in group 4 (Mann-Whitney U test, $p < 0.001$). We found that all the patients with RA (2nd and 3rd group) had significantly higher levels of ACPA in saliva than patients in group 4 (without P and RA) (Mann-Whitney U test, $p < 0.0001$). We found that all the patients with P (1st and 2nd group) had significantly higher levels of ACPA in saliva than patients in group 4 (without P and without RA) (Mann-Whitney U test, $p < 0.0001$) (Table 1).

In the studied patients with P (1st and 2nd group) we found significant positive correlation between ACPA concentration in saliva and the following indicators: PISA, mean PD, BOP, respectively (Spearman's $R = 0.525$, $p < 0.001$), (Spearman's $R = 0.290$, $p = 0.003$), (Spearman's $R = 0.263$, $p = 0.007$) (Fig. 1, 2, 3). We found a tendency for a

3). При изследваните пациенти с П (1-ва и 2-ра група) установихме тенденция за положителна корелация между концентрацията на АСРА в слюнката и брой на дълбоките пародонтални джобове ($PD > 7$ mm), както и тенденция за отрицателна корелация между концентрацията на АСРА в слюнка и брой плитки пародонтални джобове ($PD \leq 3$ mm).

positive correlation between the АСРА concentration in saliva and the number of deep periodontal pockets ($PD > 7$ mm), as well as a tendency for a negative correlation between АСРА concentration in saliva and the number of shallow periodontal pockets ($PD \leq 3$ mm) in all the patients with P (1st and 2nd group).

Таблица 1. Средни стойности на АСРА в слюнка в изследваните групи

Table 1. Mean АСРА values in saliva in the study groups

Групи пациенти Groups	Брой Number of patients	Средна стойност Mean value RU/ml	Стандартно отклонение Standard deviation
1-ва група / Group 1	26	9,7500 RU/ml	$\pm 8,65820$
2-ра група / Group 2	28	11,3014 RU/ml	$\pm 14,45057$
3-та група / Group 3	26	35,7992 RU/ml	$\pm 55,48167$
4-та група / Group 4	25	2,7708 RU/ml	$\pm 1,61123$

Фиг. 1. Зависимост между концентрацията на АСРА в слюнка и показателя PISA при пациентите с П (1-ва и 2-ра група)

Fig. 1. Correlation between АСРА concentration in saliva and PISA in patients with P (1st and 2nd group)

Фиг. 2. Зависимост между концентрацията на АСРА в слюнка и средна стойност на PD mm при пациентите с П (1-ва и 2-ра група)

Fig. 2. Correlation between АСРА concentration in saliva and mean PD mm in patients with P (1st and 2nd group)

Фиг. 3. Зависимост между концентрацията на АСРА в слюнка и разпространението на BOP при пациентите с П (1-ва и 2-ра група)

Fig. 3. Correlation between АСРА concentration in saliva and BOP prevalence in patients with P (1st and 2nd group)

Установихме значима положителна зависимост между концентрациите на АСРА в слюнка и АСРА в серум при пациентите от 2-ра група (с П и с РА) (Spearman's $R = 0,972$, $p < 0,0001$) и при пациентите от 3-та група (с РА) (Spearman's $R = 0,900$, $p < 0,0001$), както и при всички пациенти с РА (от 2-ра и от 3-та група общо) (Spearman's $R = 0,761$, $p < 0,0001$) (фиг. 4).

Резултатите показват значима корелация между концентрацията на АСРА в слюнка и концентрацията на RF в серум при пациентите от 2-ра група (с П и с РА) (Spearman's $R = 0,953$, $p < 0,0001$) и при пациентите от 3-та група (с РА) (Spearman's $R = 0,911$, $p < 0,0001$), както и при пациентите с РА общо от двете групи (2-ра и 3-та група) (Spearman's $R = 0,894$, $p < 0,0001$) (фиг. 5).

Открихме значима положителна зависимост между нивата на АСРА в слюнка и активността на РА, отразена чрез DAS 28 (CRP) при пациентите с РА общо от 2-ра и 3-та група (Spearman's $R = 0,353$, $p = 0,009$) (фиг. 6).

We found a significant positive correlation between ACPA concentration in saliva and serum ACPA concentration in patients of group 2 (with P and RA) (Spearman's $R = 0.972$, $p < 0.0001$) and in patients of group 3 (with RA) (Spearman's $R = 0.900$, $p < 0.0001$), as well as in all the patients with RA (2nd and 3rd group) (Spearman's $R = 0.761$, $p < 0.0001$) (Fig. 4).

Our results showed a significant correlation between ACPA concentration in saliva and serum RF concentration in patients in group 2 (with P and RA) (Spearman's $R = 0.953$, $p < 0.0001$) and in patients in group 3 (with RA) (Spearman's $R = 0.911$, $p < 0.0001$), as well as in patients with RA in total, in both groups (2nd and 3rd group) (Spearman's $R = 0.894$, $p < 0.0001$) (Fig. 5).

We found a significant positive correlation between saliva ACPA levels and RA activity reflected by DAS-28 (CRP) in patients with RA in total (2nd and 3rd group) (Spearman's $R = 0.353$, $p = 0.009$) (Fig. 6).

Фиг. 4. Зависимост между концентрацията на АСРА в слюнка и концентрацията на АСРА в серум при пациенти с РА (2-ра и 3-та група)

Fig. 4. Correlation between ACPA concentrations in saliva and serum ACPA concentration in patients with RA (2nd and 3rd group)

Фиг. 5. Зависимост между концентрацията на АСРА в слюнка и количеството RF в серума при пациенти с РА (2-ра и 3-та група)

Fig. 5. Correlation between ACPA concentration in saliva and serum RF concentration in patients with RA (2nd and 3rd group)

Фиг. 6. Зависимост между концентрацията на АСРА в слюнка и показателя активност DAS 28 (CRP) при пациенти с РА (2-ра и 3-та група)

Fig. 6. Correlation between ACPA concentration in saliva and DAS-28 (CRP) in patients with RA (2nd and 3rd group)

ОБСЪЖДАНЕ

Нашите резултати показват значимо по-високи нива на АСРА в слюнката на пациентите с П и РА спрямо здравите индивиди, както и при пациентите с П и без РА в сравнение със здравите контроли. Тези резултати свързваме с възможността пародонталното заболяване да е източник на цитрулинирани протеини, които предизвикват синтеза на антитела срещу тях. В предишно изследване Harvey et al. [8] откриват на цитрулинирани протеини и антитела срещу тях в пародонталните тъкани и положителна зависимост между тежестта на гингивалното възпаление и експресията на цитрулинираните протеини. Авторите установяват, че повечето пациенти с високи нива на АСРА в гингивална течност са от групата с пародонтит в сравнение с контроли. Според тези автори продукцията на АСРА зависи от наличието на цитрулинираните протеини, които съществуват генерично при тъканно възпаление, независимо дали диагнозата е гингивит, или П, а продукцията на АСРА зависи и от генетичната предразположеност на пациентите. Ние подкрепяме това становище. Нашите резултати показват увеличени нива на АСРА в слюнка при пациенти с П, вероятно с произход от пародонталните тъкани, резултат от два фактора: увеличена продукция на цитрулинирани протеини при П и генетична предразположеност за производство на антитела срещу увеличените цитрулинирани протеини.

Нашите резултати показват значими положителни зависимости между концентрацията на АСРА в слюнка и средната стойност на PD, BOP, както и тенденция за корелация между концентрацията на АСРА в слюнка и брой дълбоки пародонтални джобове (PD > 7 mm) и тенденция за отрицателна корелация между концентрацията на АСРА в слюнка и брой плитки пародонтални джобове (PD ≤ 3 mm). В предходни изследвания също са откривани зависимости между експресията на цитрулинирани протеини, антитела срещу тях в пародонтални тъкани и степента на възпалителния процес [8, 9]. Тези данни са в основата на хипотезата за извършваща се цитрулинация в пародонталните тъкани, която зависи от изявата на П и евентуалната локална продукция на АСРА. Механизмът на тези процеси се свързва най-вероятно с активността на *P. gingivalis* в цитрулинирането на протеини и последващо активиране на АСРА продуциращите клетки [8, 9, 10, 11]. Установените от нас увеличени концентрации на АСРА в слюнка при

DISCUSSION

Our results showed significantly higher levels of ACPA in saliva in patients with P and RA compared to healthy subjects, as well as in patients with P and without RA compared to healthy controls. We associate these results with the possibility that periodontal disease could be a source of citrullinated proteins that induce the synthesis of antibodies against them. In a previous study, Harvey et al. [8] found the presence of citrullinated proteins and antibodies against them in periodontal tissues and a positive correlation between the severity of gingival inflammation and the expression of citrullinated proteins. The authors found that most of the patients with high gingival crevicular fluid ACPA levels were in the periodontitis group compared to controls. According to these authors, ACPA production depends on the presence of generically existing citrullinated proteins in inflamed tissues, no matter the diagnosis gingivitis or periodontitis, and ACPA production depends on the genetic predisposition of the patients. We support this view. Our results showed in patients with periodontitis increased levels of ACPA in saliva, which are likely originate from periodontal tissues and result of two factors: increased production of citrullinated proteins in cases of periodontitis and genetically predisposed production of antibodies against increased citrullinated proteins.

Our results showed significant positive correlations between ACPA concentration in saliva and the mean PD, BOP, as well as a tendency for a correlation between ACPA concentration in saliva and the number of periodontal pockets with PD > 7 mm and a tendency for a negative correlation between ACPA concentration in saliva and the number of periodontal pockets with PD ≤ 3 mm. Previous studies have also found correlations between the expression of citrullinated proteins, antibodies against them in periodontal tissues, and the degree of inflammation [8, 9]. These data underlie the hypothesis of ongoing citrullination in periodontal tissues, which is dependent on the presentation of P and the possible local production of ACPA. The mechanism of these processes most likely being associated with the activity of *P. gingivalis* in protein citrullination and subsequent activation of ACPA-producing cells [8, 9, 10, 11]. In our opinion, increased salivary ACPA concentrations found in patients with higher periodontal

по-високи показатели на П свързваме с локалната им продукция в тъканите на пародонта във връзка с активността на възпалението и последващото им попадане в слюнката. Тези резултати са в подкрепа на хипотезата за евентуалната роля на П като извънставен източник на цитрулинирани протеини и антитела срещу тях, които биха могли при предразположени индивиди да допринесат за изява на РА, а при съществуващ РА да утежнят хода му [11].

Ние установихме наличие на АСРА в слюнката на всички участници в изследването, като концентрацията им е значително по-голяма при пациентите от 3-та група с РА в сравнение с пациентите от 1-ва група с П, пациентите от 2-ра група с РА и П и индивидите от 4-та група, които са здрави. Заедно с това установихме силна положителна корелация между концентрациите на АСРА в слюнка и АСРА в серум при пациентите от 2-ра група с РА и П и при пациентите от 3-та група само РА, както и при 2-ра и 3-та група общо (всички пациенти с РА). Считаме, че едно обяснение за наличието на АСРА в слюнка и корелацията на концентрациите им в слюнка с тези в серум при пациенти с РА е дифузията им от серум. Подобни резултати са представени и в друго съвременно изследване [12], в което се установява силна зависимост между нивата на серумните и слюнчените АСРА при болните с РА, както и значимо по-високи нива на АСРА в слюнка при пациенти с РА в сравнение с нивата на АСРА в слюнка при здравите контроли.

Ние установихме силна положителна корелация между концентрациите на АСРА в слюнка и RF в серум (един от основните маркери за РА) при пациентите с РА – от 2-ра група с РА и П; от 3-та група с РА и общо от двете групи. Установихме положителна зависимост и между концентрацията на АСРА в слюнка и активността на РА, оценена чрез DAS 28 (CRP). Резултатите ни кореспондират с публикации, показващи значително по-високи стойности на показатели за РА, които се свързват с активността му – Erythrocyte sedimentation rate, plasma C-reactive protein, DAS 28, брой на подути стави и цялостна лекарска оценка на болестната активност при пациенти с РА, които са АСРА-позитивни в серум [3, 13]. Считаме, че тези резултати ни дават основание да обсъдим концентрацията на показателя АСРА в слюнка като евентуален диагностичен маркер за РА.

clinical measurements are associated with their local production in periodontal tissues, depending on the activity of inflammation and their subsequent entry into saliva. These results support the hypothesis for the possible role of P as an extraarticular source of citrullinated proteins and antibodies against them, which in susceptible individuals may contribute to the expression of RA, and in existing RA could complicate its course [11].

We found the presence of ACPA in saliva in all of the study participants, with a significantly higher concentration in patients in group 3 with RA compared to patients in group 1 with P, patients in group 2 with RA and P, and healthy individuals in group 4. In addition, we found a strong positive correlation between ACPA concentration in saliva and serum ACPA concentration in patients in group 2 with RA and P, and in patients in group 3 with RA, as well as in groups 2 and 3 in total (all patients with RA). We consider that the presence of salivary ACPAs and the correlation of salivary ACPA concentration with serum ACPA concentration in patients with RA may be due to their diffusion from serum. Similar results have been reported in another contemporary study [12], which found a strong correlation between serum and salivary ACPA levels in RA patients, and significantly higher levels of ACPA in saliva in RA patients compared to ACPA levels in saliva in healthy controls.

We found a strong positive correlation between ACPA concentrations in saliva and RF in serum (one of the major markers for RA) in patients with RA – group 2 with RA and P; group 3 with RA; and 2 and 3 groups in total. We also found a positive relationship between the concentration of ACPA in saliva and the activity of RA, assessed by DAS 28 (CRP). Our results correspond with publications showing significantly higher RA indicators, associated with its activity – Erythrocyte sedimentation rate, plasma C-reactive protein, DAS-28, number of swollen joints, and physician's global assessment of disease activity in patients with RA who are ACPA-positive in serum [3, 13]. We believe that these results give us reason to suggest the saliva ACPA concentration as a possible diagnostic marker for RA.

Изводи

Получените резултати показват по-високи концентрации на АСРА в слюнка при пациенти с РА, както и положителна корелация на слюнчените нива на АСРА със серумните нива на АСРА, серумните нива на RF и показателя DAS 28 (CRP) при пациентите с РА. На основата на установените зависимости може да се предложи високата концентрация на АСРА в слюнка като леснодостъпен показател за РА, но са необходими допълнителни изследвания, за да се верифицира като маркер за РА. Ние считаме, че ако АСРА бъдат открити във високи концентрации в слюнка преди клиничната изява на РА, то това би определило такива индивиди във висок риск от развитие на РА, тъй като АСРА са високоспецифични за РА.

Установената връзка между показателите за П и АСРА в слюнка обосновава лечението на П като начин за превенция и контрол на РА и потвърждава необходимостта от тясно сътрудничество между специалисти в двете области.

Благодарности

Това проучване е финансирано от МУ – София, съгласно Договор по Грант № Д-94/23.04.2019 г. на тема: „Връзка между пародонтални заболявания и ревматоиден артрит. Изследване на генетичен полиморфизъм на FcyRIIIA и изследване на антицитрулинирани протеинови антитела в слюнка”.

Библиография / References

- Schellekens GA, Visser H, De Jong BA et al. The diagnostic properties of rheumatoid arthritis antibodies recognizing a cyclic citrullinated peptide. *Arthritis Rheum.* 2000;43(1):155-63. doi:10.1002/1529-0131(200001)43:1 < 155::AID-ANR20 > 3.0.CO;2-3
- VanVenrooij WJ, Zendman AJW, Pruijn GJM. Autoantibodies to citrullinated antigens in (early) rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev.* 2006;6(1):37-41. doi:10.1016/j.autrev.2006.03.008
- Kastbom A, Strandberg G, Lindroos A, Skogh T. Anti-CCP antibody test predicts the disease course during 3 years in early rheumatoid arthritis (the Swedish TIRA project). *Ann Rheum Dis.* 2004;63(9):1085-9. doi:10.1136/ard.2003.016808.
- Nesse W et al. Periodontal inflamed surface area: quantifying inflammatory burden. *J Clin Periodontol.* 2008, 35(8):668-73. doi: 10.1111/j.1600-051X.2008.01249.x.
- Papapanou PN, Sanz M, Buduneli N, et al. Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-

CONCLUSIONS

The obtained results are for higher concentrations of ACPA in saliva in RA patients, as well as a positive correlation between salivary ACPA levels and serum ACPA levels, serum RF levels, and DAS-28 (CRP) in RA patients. Based on the established dependencies, the high concentration of ACPA in saliva may be suggested as an easily accessible indicator of RA, but further studies are needed to verify it as a marker of RA. We believe that if ACPAs were detected in high salivary concentrations prior to the clinical presentation of RA, this would identify such individuals at high risk of RA developing since ACPAs are highly specific for RA.

The established association between P measurements and salivary ACPA concentration justifies the treatment of P as a way of preventing and controlling RA and confirms the need for close collaboration between specialists in both fields.

Acknowledgments

This study was funded by Medical University – Sofia, under Grant Contract Nr. D-94/23.04.2019 on the topic: Relationship between periodontal diseases and rheumatoid arthritis. Genetic polymorphism study of FcyRIIIA and examination of anti-citrullinated protein antibodies in saliva.

- Implant Diseases and Conditions. *J Periodontol.* 2018;89 Suppl 1:S173-S182. doi: 10.1002/JPER.17-0721.
- Chapple ILC, Mealey BL, Van Dyke TE et al. Periodontal health and gingival diseases and conditions on an intact and a reduced periodontium: Consensus report of workgroup 1 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *J Periodontol.* 2018;89 Suppl 1:S74-S84. doi: 10.1002/JPER.17-0719.
- Navazesh M. Methods for Collecting Saliva. *Saliva as a Diagnostic Fluid. Annals of the New York Academy of Sciences.* 1993, 694:72-77.
- Harvey GP, Fitzsimmons TR et al. Expression of peptidylarginine deiminase-2 and -4, citrullinated proteins and anti-citrullinated protein antibodies in human gingiva. *J Periodontal Res.* 2013;48(2):252-61. doi: 10.1111/jre.12002.
- Nesse W, Westra J et al. The periodontium of periodontitis patients contains citrullinated proteins which may play a role in ACPA (anti-citrullinated protein antibody) formation. *J Clin Periodontol.* 2012;39(7):599-607. doi: 10.1111/j.1600-051X.2012.01885.
- Rosenstein, ED et al. Hypothesis: the humoral immune response to oral bacteria provides a stimulus for the

- development of rheumatoid arthritis. Inflammation. 2004 Dec;28(6):311-8. doi:10.1007/s10753-004-6641-z.
11. Bright R, Proudman SM, Rosenstein ED, Bartold PM. Is there a link between carbamylation and citrullination in periodontal disease and rheumatoid arthritis? Med Hypotheses. 2015;84(6):570-6. doi: 10.1016/j.mehy.2015.03.006.
12. Priyadharshini S, Sathasivasubramanian S. Evaluation of Salivary Anti-Ccp in Rheumatoid Arthritis Patients. Journal of Dental and Medical Sciences (IOSR-JDMS), 2015;14(12):27-30.
13. Oluwagbemigun K, Yucel-Lindberg T, Dietrich T et al. A cross-sectional investigation into the association between Porphyromonas gingivalis and autoantibodies to citrullinated proteins in a German population. Ther Adv Musculoskelet Dis. 2019, 5; 11:1759720X19883152. doi: 10.1177/1759720X19883152.

Постъпил за печат: 09.04.2020 г.

Submitted: 09.04.2020

✉ *Адрес за кореспонденция:*

Доц. д-р Теодора Болярова-Конов, дм
Факултет по дентална медицина
Катедра по пародонтология
МУ – София
ул. Св. Г. Софийски 1
1431 София, България
e-mail: t_bolyarova@abv.bg

✉ *Correspondence address:*

Assoc. Prof. Theodora Bolyarova-Konova, MD
Faculty of Dental Medicine
Department of Periodontology
MU – Sofia
1 St. G. Sofiiski Str.
1431 Sofia, Bulgaria
e-mail: t_bolyarova@abv.bg