

**UNIVERSITATEA DE MEDICINA ȘI FARMACIE
„CAROL DAVILA”, BUCUREȘTI
ȘCOALA DOCTORALĂ
DOMENIUL MEDICINĂ**

***Saliva: fluid de diagnostic al inflamației
în bolile autoimune***

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Conducător de doctorat:

PROF. UNIV. DR. GREABU MARIA

Student-doctorand:

STĂNESCU IULIA-IOANA

2019

Cuprins

Introducere.....	1
I. Stadiul actual al cunoașterii.....	4
1. Saliva – un remarcabil fluid de diagnostic.....	5
1.1. Secreția salivară.....	5
1.2. Compoziția salivei.....	8
1.3. Proprietățile salivei.....	11
1.4. Funcțiile salivei.....	12
1.5. Saliva – fluid de diagnostic.....	14
2. Noțiuni generale despre bolile autoimune.....	19
2.1. Lupusul eritematos sistemic.....	19
2.2. Poliartrita reumatoidă.....	25
2.3. Sclerodermia.....	30
2.4. Vasculitele.....	34
II. Contribuția personală.....	41
3. Ipoteza de lucru și obiective generale.....	42
4. Metodologie generală.....	43
4.1. Selecția pacienților.....	43
4.2. Recoltarea salivei.....	44
4.3. Analiza statistică.....	45
5. Studiul 1. Cercetări privind rolul hormonilor estrogeni și al testosteronului în bolile autoimune.....	46
5.1. Introducere.....	46
5.2. Ipoteza de lucru/obiective.....	47
5.3. Material și metodă.....	47
5.4. Rezultate.....	58
5.5. Discuții.....	65
5.6. Concluzii.....	67
6. Studiul 2. Biomarkeri ai inflamației și lupusul eritematos sistemic.....	68
6.1. Introducere.....	68
6.2. Ipoteza de lucru/obiective.....	69
6.3. Material și metodă.....	69

6.4. Rezultate.....	74
6.5. Discuții.....	79
6.6. Concluzii.....	85
7. Studiul 3. Metaloproteinazele matriceale și inflamația din bolile autoimune.....	86
7.1. Introducere.....	86
7.2. Ipoteza de lucru/obiective.....	89
7.3. Material și metodă.....	89
7.4. Rezultate.....	104
7.5. Discuții.....	116
7.6. Concluzii.....	124
8. Elementele inovative și de originalitate ale tezei de doctorat.....	125
9. Concluzii generale.....	126
Bibliografie.....	129
Anexe.....	159

LISTA CU LUCRĂRILE ȘTIINȚIFICE PUBLICATE

Articole publicate *in extenso* ca rezultat al cercetării doctorale

1. Stanescu I.I., Totan A, Rus F, Miricescu D, Mocanu B, Calenic B, Greabu M. Salivary diagnosis – clinical uses in assessing oral inflammation. *Revista de Chimie (Bucharest)*, 68 (6), 1200-1203, 2017; **ISI Impact Factor 1.412** (*articol cuprins în capitolul 1)*

<http://www.revistadechimie.ro/pdf/11%20STANESCU%20IULIA%206%2017.pdf>

2. Stanescu I.I., Calenic B, Dima A, Miricescu D, Badita D.G, Baicus C, Balanescu P, Balanescu E, Perlea P, Greabu M. Saliva as a monitoring fluid for hormonal activity in systemic lupus erythematosus. *Revista de Chimie (Bucharest)*, 69 (3), 654-659, 2018; **ISI Impact Factor 1.412** (*articol cuprins în capitolul 5 din contribuția personală*)

<http://www.revistadechimie.ro/pdf/26%20STANESCU%20I%203%2018.pdf>

3. Stanescu I.I., Calenic B, Dima A, Gugoasa L.A, Balanescu E, Stefan-van Staden R.I, Baicus C, Badita D.G, Greabu M. Salivary biomarkers of inflammation in systemic lupus erythematosus. *Annals of Anatomy*, 219, 89-93, 2018; **ISI Impact factor 1.852** (*articol cuprins în capitolul 6 din contribuția personală*)

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0940960218300347>

4. Stănescu I.I., Dima A, Bălănescu E, Miricescu D, Totan A, Rădulescu R, Calenic B, Perlea P, Bălan D, Greabu M. Salivary matrix metalloproteinases activity levels in autoimmune diseases. *Stomatology Edu Journal*, 5(3), 168-172, 2018; **BDI** (*articol cuprins în capitolul 7 din contribuția personală*)

http://www.stomaeduj.com/wp-content/uploads/2018/03/Article_5_3_4.pdf

Prezentări orale și postere la conferințe internaționale

1. Calenic B, Radulescu R, Totan A, **Stanescu I**, Miricescu D, Dima A, Baicus C, Greabu M. Salivary biomarkers of inflammation in systemic lupus erythematosus. *Association of Basic Science Teachers in Dentistry (ABSTD): 7th European Meeting, ACTA - Amsterdam, 2016.*

2. Greabu M, Totan A, Miricescu D, Calenic B, Radulescu R, **Stanescu I**. Saliva- a monitoring fluid of inflammation in systemic lupus erythematosus. **IADR/AADR/CADR General Session, California, San Francisco, 2017.**

3. Calenic B, **Stanescu II**, DimaA, Balanescu P, Balanescu E, Totan A, Miricescu D, Radulescu R, Radulescu C, Badita D, Greabu M. Salivary and serum monitoring of inflammation in systemic lupus erythematosus. *11th European Saliva Symposium on Saliva, Egmond aan Zee, 2017.*

4. **Stanescu II**, Calenic B, Dima A, Totan A, Miricescu D, Radulescu R, Balanescu P, Balanescu E, Badita D, Greabu M. Salivary assessment of hormonal activity in systemic lupus erythematosus. *11th European Saliva Symposium on Saliva, Egmond aan Zee, 2017.*

Prezentări orale și postere la conferințe naționale

1. **Stănescu II**, Calenic B, Totan A, Miricescu M, Rădulescu R, Vârlan RMJ, Greabu M. Corelarea unor parametri salivari și serici ai inflamației în lupusul eritematos sistemic. *Al 10-lea Congres Anual al Asociației Medicale Române, București, 2016.*

2. Calenic B, Rădulescu R, Totan A, **Stănescu I**, Miricescu D, Dima A, Băicuș C, Greabu M. Oral based diagnostic for inflammation in systemic lupus erythematosus. *Prima Conferință Națională a Asociației de Medicină de Laborator din România, Cluj-Napoca, 2016.*

3. **Stănescu II**, Calenic B, Totan A, Miricescu D, Rădulescu R, Vârlan RMJ, Greabu M. Salivary biomarkers of inflammation: clinical semnificance in systemic lupus erythematosus. *Ediția a 4-a a Congresului Universității de Medicină și Farmacie "Carol Davila" București, 2016 (Lucrare nominalizată pentru Premiul Tânărului Cercetător-Specialități preclinice și premiată cu Diplomă de Excelență).*

4. **Stănescu II**, Calenic B, Dima A, Totan A, Miricescu D, Rădulescu R, Rădulescu C, Bălănescu P, Bălănescu E, Bădiță D, Greabu M. Salivary diagnosis: a new approach for

hormonal monitoring in systemic lupus erythematosus. *A doua Conferință Națională a Asociației de Medicină de Laborator din Romania*, Timișoara, 2017.

5. Stănescu II, Calenic B, Dima A, Bălănescu P, Bălănescu E, Totan A, Miricescu D, Rădulescu R, Bădiță D, Greabu M. Clinical significance of salivary testosterone and 17- β estradiol in systemic lupus erythematosus patients. *Ediția a 5-a a Congresului Universității de Medicină și Farmacie "Carol Davila" București*, 2017.

6. Stănescu I, Calenic B, Totan A, Miricescu D, Rădulescu R, Rădulescu C, Calenic A, Bălan D, Greabu M. Evaluarea salivara a activitatii hormonale in lupusul eritematos sistemic. *Al Doilea Congres Internațional al Facultății de Medicină Dentară, UMF "Carol Davila", Bucuresti*, 2018.

7. Stănescu I, Calenic B, Totan A, Miricescu D, Rădulescu R, Rădulescu C, Calenic A, Greabu M. Systemic lupus erythematosus and salivary diagnosis. *2nd National Congress of the Romanian Association of Laboratory Medicine with International Participation*", București, 2018.

8. Stănescu II, Calenic B, Totan A, Miricescu D, Rădulescu R, Rădulescu C, Calenic A, Bălan D, Greabu M. Saliva as a diagnosis fluid in periodontal disease. *Ediția a 6-a a Congresului Universității de Medicină și Farmacie "Carol Davila" București*, 2018.

Proiecte de cercetare

1. Proiect de cercetare numărul PN-II-RU-TE-2014-4-1879, finanțat cu 125000 Euro de către *UEFISCDI Romania*, cu perioada de desfășurare 2015-2017.

Poziția ocupată: membru în echipa de cercetare

Director proiect: Șef de lucrări Dr. Calenic Bogdan

LISTĂ DE ABREVIERI

Ig – imunoglobuline	ANA – anticorpi antinucleari
EGF - factorul de creștere epidermal	AINS – antiinflamatoare nesteroidiene
NGF - factorul de creștere al nervilor	VSH – viteza de sedimentare a hematiilor
FGC - fluidul gingival crevicular	anti-Sm – anticorpii anti-Sm sau anti-Smith
MUC5B – mucina 5B	anti-U1RNP – anticorpii anti-ribonucleoproteina U1
MUC7- mucina 7	anti-Ro – anticorpii anti-ribonucleoproteina solubilă
cTnI – troponina cardiacă I	anti-La – anticorpii anti-proteina auxiliară a ARN polimerazei III
NT-proBPN – peptidul natriuretic N-terminal de tip B	ACR - American College of Rheumatology
PCR – proteina C reactivă	SLICC - The Systemic Lupus International Collaborating Clinics
IL– interleukină	PR – poliartrită reumatoidă
TNF- α – factorul de necroză tumorală α	ACPA - anticorpii anti-proteină citrulinată
CD40 – proteina CD40 (cluster of differentiation)	FR – factorul reumatoid
CMV – <i>Cytomegalovirus</i>	EULAR - European League Against Rheumatism
H. pylori – <i>Helicobacter pylori</i>	ScS - Sclerodermia sistemică
anti-SSA – anticorpii anti-nucleari anti-SSA	Th – celule T helper
anti-SSB - anticorpii anti-nucleari anti-SSB	HTA – hipertensiune arterială
ET-1 – endotelina-1	ANCA - anticorpi citoplasmatici anti-neutrofile
CD44 - proteina CD44 (cluster of differentiation)	PR 3- proteinaza 3
AZGP1 – precursorul zinc- α -2-glicoproteinei	MPO – mieloperoxidază
LES – lupus eritematos sistemic	anti-GBM – anticorpi anti-membrană bazală glomerulară
MHC – complexul major de histocompatibilitate	AECA – anticorpi anti-celule epiteliale
C1q – fracțiunea C1q a complementului	SNC – sistem nervos central
C2 - fracțiunea C2 a complementului	
C4 - fracțiunea C4 a complementului	

AVC – accident vascular cerebral
rpm – rotații pe minut
E2- 17- β estradiol
T2 – testosteron
C3 – fracțiunea C3 a complementului
INR – International Normalized Ratio
APTT – timpul de tromboplastină parțial activată
HDL – high density lipoprotein
LDL – low density lipoprotein
SLEDAI - Systemic Lupus Erythematosus Activity Index
ECLAM - European Consensus Activity Measurement
CH50 – fracțiunea 50 a complementului
DHT – dihidrotestosteron
ELISA - Enzyme-linked immunosorbent assay
PBS - phosphate buffered saline
IMC - indicele de masă corporală

PAI-1 - inhibitorul activatorului plasminogenului-1
MCP-1 - proteina chemoattractantă a monocitelor
IL-6R – receptorul pentru IL-6
DS – deviația standard
VEGF - factor de creștere vascular endotelial
COX – 2 – ciclooxigenaza-2
INF- γ – interferon- γ
MMP – metaloproteinaze matriceale
SO – stres oxidativ
CS – corticosteroizi
TGO – transaminaza glutamil oxaloacetică
TGP – transaminaza glutamil piruvică
LDH – lactat dehidrogenaza
GGT – gama-glutamil transferaza
MEC – matricea extracelulară

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

I. Stadiul actual al cunoașterii

1. Saliva – un remarcabil fluid de diagnostic

Saliva reprezintă un fluid de diagnostic foarte valoros atât pentru afecțiunile orale, cât și pentru cele sistemice. Abundența sa în biomarkeri, recoltarea non-invazivă și necesitatea unor probe mici necesare pentru analiză recomandă acest amalgam de substanțe organice și anorganice ca mediu de diagnostic și monitorizare pentru multiple patologii. În plus, existența unor corelații între concentrațiile din ser și cele salivare pentru numeroși biomarkeri promovează utilizarea salivei ca un fluid de diagnostic alternativ remarcabil [1].

1.1. Secreția salivară

Saliva este un fluid biologic complex produs de 3 perechi de glande salivare majore și de 800-1000 glande salivare minore. Glandele salivare majore sunt reprezentate de glandele parotide, glandele submandibulare și glandele sublinguale, în timp ce glandele salivare mici sau minore sunt diseminate la nivelul mucoasei orale, cu excepția gingiilor, a 2/3 posterioare ale limbii și a palatului dur [2, 3].

1.2. Compoziția salivei

Saliva este un amalgam de apă, substanțe organice și anorganice, a cărei compoziție depinde de numeroși factori, printre care tipul glandei salivare care o produce, pH salivar, flux salivar sau dacă ne referim la salivă stimulată sau nestimulată [7].

Substanțele organice din salivă sunt reprezentate de proteine, lipide, glucide, hormoni, vitamine și substanțe azotate neproteice (uree, acid uric, creatinină, amoniac - substanțe ce provin din catabolismul proteic). Proteinele salivare au o concentrație medie de 2.2 g/ L în saliva totală, și includ atât proteine produse la nivelul glandelor salivare, cât și proteine provenite din circulația sanguină [8].

Principalele componente anorganice ale salivei sunt Na^+ , K^+ , HCO_3^- , Ca^{2+} , Mg^{2+} și Cl^- . Fluxul salivar și stimularea secreției salivare reprezintă cei mai importanți factori de care depinde compoziția anorganică a salivei.

1.3. Proprietățile salivei

Saliva totală este un fluid filant, opalescent, cu osmolaritate de 50-100 mOsm/L (saliva primară este izotonă, dar saliva finală este hipotonă). Acest fluid are densitate de 1002-1012 g/cm³ și vâscozitate de 1.08-1.32 unități. Opalescența salivei se datorează sedimentului salivar format din celule epiteliale descumate, bacterii (*Streptococcus*,

Lactotobacillus, *Acidophilus*) și leucocite ajunse în șanțul gingivo-dentar din capilare prin diapedeză [3, 6].

1.4. Funcțiile salivei

Saliva îndeplinește multiple roluri, fiind implicată în masticăție, deglutiție, vorbire, apărarea cavității orale, gust și retenție dentară (**Figura 1.3.**).

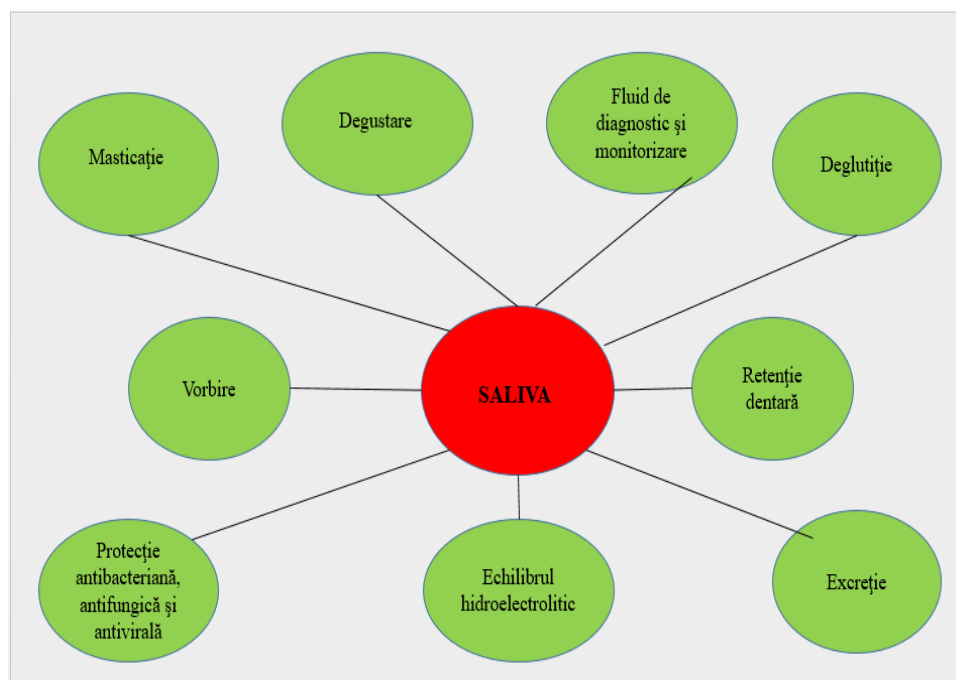


Figura 1.3. Rolurile salivei

1.5. Saliva – fluid de diagnostic

În ultimele decenii saliva a devenit una dintre temele majore de cercetare datorită avantajelor pe care aceasta le posedă.

Colectarea probelor de saliva este una facilă, non-invazivă, astfel încât asigură o cooperare mult mai bună cu pacienții, mai ales dacă ne referim la copii sau la vârstnici, pacienți mult mai reticenți la recoltarea de sânge sau urină [34]. Existența unor corelații între concentrațiile serice și cele din salivă a numeroși biomarkeri, necesitatea unor probe mici pentru analiză, manipularea și depozitarea ușoară a probelor reprezintă argumente suplimentare pentru utilizarea salivei ca fluid de diagnostic alternativ pentru mediile clasice [1, 34].

O gamă largă de studii din literatura de specialitate s-a concentrat pe utilizarea salivei pentru diagnosticul și monitorizarea a numeroase afecțiuni orale și sistemice, printre care

carcinomul oral cu celule scuamoase, afecțiuni autoimune (Sindromul Sjögren), sindromul Cushing, afecțiuni cardiovasculare, infecții virale și bacteriene.

2. Noțiuni generale despre bolile autoimune

2.1. Lupusul eritematos sistemic

Una dintre cele mai complexe afecțiuni autoimune este lupusul eritematos sistemic (LES). Această patologie inflamatorie acută sau cronică este caracterizată de polimorfism clinic și are în centrul său o supraproducție de anticorpi care conduce la acumularea de complexe imune în țesuturi și producerea inflamației în multiple organe. Această afecțiune autoimună este mai frecvent întâlnită la femei comparativ cu bărbații, boala debutând cel mai adesea la vârste cuprinse între 16 și 55 de ani. De asemenea, s-a constatat că există diferențe în ceea ce privește incidența și prevalența bolii în funcție de zonele geografice și de rasă. Astfel, se observă o incidență și o prevalență mai mare la indivizii de culoare, precum și la populația latino-americană, precum și o prevalență mai mare în SUA [41]. România are o incidență a LES cuprinsă între 1 și 10 cazuri la un milion de locuitori [42].

2.2. Poliartrita reumatoidă

Poliartrita reumatoidă (PR) sau artrita reumatoidă - așa cum este frecvent întâlnită în literatura medicală britanică, este o afecțiune autoimună cronică, manifestată în principal prin inflamarea articulațiilor sinoviale, la nivelul cărora produce leziuni ireversibile, dar care în același timp produce și efecte sistemice extrem de diverse [43, 56]. În consecință, pacienții pot prezenta forme de boală ușoare sau rapid progresive, astfel încât tratamentul trebuie adaptat atât tabloului clinic, cât și anticorpilor specifici prezenți [43].

2.3. Sclerodermia

Sclerodermia sistemică (ScS) este o afecțiune autoimună care afectează țesuturile conjunctive, microvascularizația și produce fibroză interstițială [57]. Din punct de vedere fiziopatologic, această boală determină disfuncția fibroblastelor și determină depunerea de matrice extracelulară în exces, hipoxie celulară consecutivă alterării calității vasculare și alterarea funcțională a limfocitelor T și B, și deci și formarea de anticorpi [64].

2.4. Vasculitele

Vasculitele reprezintă un grup de afecțiuni sistemice a căror principală manifestare este inflamația peretelui vascular [83]. Etiopatogenia acestor boli rare este încă necunoscută,

heterogenitatea tabloului clinic îngreunând elucidarea mecanismelor patogenezei vasculitelor [43].

II. Contribuția personală

3. Ipoteza de lucru și obiectivele generale

Motivația alegerii temei prezentei cercetări doctorale este reprezentată de necesitatea detectării unor biomarkeri salivari cu potențial, care să ajute la diagnosticarea precoce și mai facilă a bolilor autoimune, în vederea instaurării cât mai timpurii a terapiilor adecvate pentru a evita complicațiile severe ale acestor afecțiuni și a reduce riscul de morbiditate și mortalitate.

Astfel, mi-am propus ca această cercetare să abordeze aspecte relevante în clinică și să reprezinte un punct de plecare în domeniul cercetării salivare pentru afecțiunile autoimune, cu scopul final de a îmbunătăți protocoalele deja existente. Tema este extrem de actuală, una dintre prioritățile de cercetare medicală fiind evaluarea potențialului salivei ca fluid de diagnostic și monitorizare pentru afecțiunile sistemice. În plus, importanța practică a acestei abordări derivă din avantajele pe care saliva le oferă ca alternativă a fluidelor de diagnostic consacrate.

În acest context, cercetarea din prezenta lucrare constă în realizarea a trei studii ce au ca obiective:

1. Determinarea concentrațiilor salivare ale 17- β estradiolului și testosteronului la pacienții cu boli autoimune și analizarea lor comparativ cu cele ale subiecților sănătoși.
2. Studiarea concentrațiilor salivare ale 17- β estradiolului și testosteronului la pacienții cu LES și compararea lor cu cele ale celorlalți pacienți cu boli autoimune.
3. Determinarea concentrațiilor salivare și serice ale IL-6, leptinei, inhibitorul activatorului de plasminogen-1 (PAI-1) și proteinei chemoattractante a proteinelor – 1 (MCP-1) la pacienții cu boli autoimune și raportarea la cele ale subiecților sănătoși.
4. Evaluarea corelațiilor dintre concentrațiile serice și cele salivare ale parametrilor menționați mai sus.
5. Determinarea concentrațiilor salivare ale metaloproteinazelor matriceale (MMP) - 1, 2, 7, 9 și 10 ca biomarkeri ai inflamației în bolile autoimune.

6. Analizarea corelațiilor dintre concentrațiile salivare ale biomarkerilor determinați și o serie de parametri clinici și paraclinici, cu scopul de a raporta rezultatele studiilor în contextul clinic al pacienților.

4. Metodologie generală

4.1. Selecția pacienților

Prezenta cercetare doctorală a inclus pacienți cu 4 boli autoimune (lupus eritematos sistemic, poliartrită reumatoidă, sclerodermie și vasculite) al căror diagnostic a fost stabilit de către medicul specialist conform criteriilor de diagnostic specifice. Un accent deosebit în studiile prezentate în continuare a fost pus asupra pacienților cu lupus eritematos sistemic, al căror diagnostic pozitiv a fost stabilit conform criteriilor SLICC (Systemic Lupus Collaborating Clinics). Toți pacienții au fost internați în Spitalul Clinic Colentina.

Au reprezentat criterii de excludere din studiu:

- prezența bolilor infecțioase acute;
- existența unei boli infecțioase cronice;
- sarcina;
- perioada de 6 luni post-partum;
- cancere active;
- prezența unei alte boli autoimune (cu excepția sindromului Sjögren și a sindromului antifosfolipidic).

Pentru fiecare subiect inclus în studiu am notat o serie de date clinice și biologice precum vârsta la momentul includerii în studiu, sexul, vârsta în momentul diagnosticării, precum și o gamă largă de parametri biochimici.

Luând în considerare prevalența mai mare a acestor afecțiuni, majoritatea pacienților cu boli autoimune incluse în studiile acestei cercetări doctorale au fost de sex feminin. De asemenea, având în vedere că bolile autoimune asupra cărora m-am axat sunt boli relativ rare, menționez că loturile studiate nu sunt foarte mari. Cu toate acestea, complexitatea acestor patologii, severitatea lor și implicațiilor lor asupra calității vieții bolnavilor mi-au suscitat interesul de a le adresa această lucrare, încercând să identific parametri salivari cu potențial în vederea diagnosticării și monitorizării activității de boală.

Grupurile de control din fiecare studiu al prezentei cercetări au fost constituite din subiecți clinic și biologic sănătoși, fără afecțiuni autoimune și fără boli infecțioase.

Toți subiecții au participat voluntar la această cercetare și au semnat consimțământul informat. Aceștia au fost informați că datele lor vor fi folosite în scopuri științifice și că le va fi păstrat anonimul, iar cercetarea nu va avea niciun impact asupra managementului diagnostic sau terapeutic al pacienților. Acest studiu a fost aprobat de Comisia de Etică a Cercetării a Spitalului Clinic Colentina, București.

4.2. Recoltarea salivei

Tuturor participanților la studiu le-au fost colectați 2-5 mL de salivă totală nestimulată. Recoltarea probelor a fost realizată dimineața, în jurul orei 9, după clătirea cu o oră în prealabil a cavității orale cu 5 mL de apă distilată. Ulterior pacienților le-au fost solicitate următoarele până în momentul colectării:

- să nu consume alimente sau lichide;
- să nu fumeze;
- să evite efortul fizic;
- să nu comunice cu ceilalți;
- să stea în poziție relaxată;
- să nu înghită în momentul recoltării probelor.

Colectarea a fost realizată în eprubete sterile, gradate care au fost ținute pe gheață și apoi transportate în înveliș izoterm și centrifugate timp de 10-15 minute la 4000-5000 de rotații pe minut (rpm), în funcție de studiu. Probele au fost ulterior păstrate la o temperatură de -70°C până la -80°C până în momentul analizării.

Pentru unul dintre studiile realizate în cadrul acestei cercetări doctorale au fost recoltate și probe de sânge a căror pregătire a fost realizată după un protocol prezentat în capitolul respectiv.

4.3. Analiza statistică a rezultatelor

Analiza statistica pentru această cercetare a fost realizată cu ajutorul software-ului SPSS. Caracteristicile analizate au fost exprimate ca mediană (quartila 1; 3), medie $\pm$ deviația standard (DS) sau ca mediană (limita inferioară-limita superioară). Corelațiile cu semnificație statistică au fost obținute folosind testele Mann-Whitney, Kendall, Pearson și Spearman (am considerat semnificativă statistic o valoare a lui $p < 0.05$ determinată prin

metoda two-sided). În plus, în analiza statistică a datelor am utilizat și modele de regresie logistică prin metoda Enter.

5. Studiul 1. Cercetări privind rolul hormonilor estrogeni și al testosteronului în bolile autoimune

5.1. Introducere

Lupusul eritematos sistemic (LES) este o afecțiune autoimună cronică, afectează multiple organe și sisteme și este caracterizat de manifestări clinice extrem de variate [93]. Deși etiologia acestei afecțiuni relativ rare nu este încă pe deplin elucidată, există un consens în ceea ce privește rolul pe care factorii genetici și cei de mediu îl joacă în dezvoltarea și progresia lupusului eritematos sistemic [94, 95]. Sistemul endocrin și în mod particular, hormonii sexuali, au fost de asemenea catalogați ca factori implicați în patogeneza LES [94].

5.2. Ipoteza de lucru / obiective

Obiectivul principal al acestui studiu a fost determinarea concentrațiilor testosteronului și ale 17- β estradiolului în saliva pacienților cu lupus eritematos sistemic, poliartrită reumatoidă, sclerodermie și vasculite, propunându-mi compararea variațiilor din saliva pacienților cu LES nu doar cu nivele salivare ale acestor hormoni la subiecții sănătoși, dar și cu cele ale pacienților cu alte afecțiuni autoimune.

5.3. Material și metodă

În acest studiu am inclus 45 de pacienți cu LES (40 de femei și 5 bărbați) care îndeplinesc criteriile de diagnostic ale LES conform Systemic Lupus Collaborating Clinics (SLICC). Grupul de control a fost constituit din 10 subiecți fără afecțiuni autoimune, sănătoși din punct de vedere clinic și biologic - 5 femei și 5 bărbați. Un al doilea grup de control a fost reprezentat de 15 pacienți cu alte boli autoimune: 5 pacienți cu poliartrită reumatoidă, 5 pacienți cu sclerodermie și 5 pacienți cu vasculită. Toți participanții incluși în acest al doilea lot de control au fost de sex feminin. Pentru fiecare subiect inclus în aceasta cercetare au fost notate date clinice precum sexul vârsta, durata bolii, precum și informații legate de tratamentele urmate în cursul desfășurării studiului și numeroși parametri determinați în ser, printre care: VSH, fibrinogen, complement C3, complement C4, leucocite, neutrofile, eozinofile, monocite, limfocite, hemoglobină, hematocrit, indici eritrocitari, INR, APTT, creatinină, uree, acid uric, albumine, colesterol total, HDL, LDL, anticorpi ANA, anti-ADN,

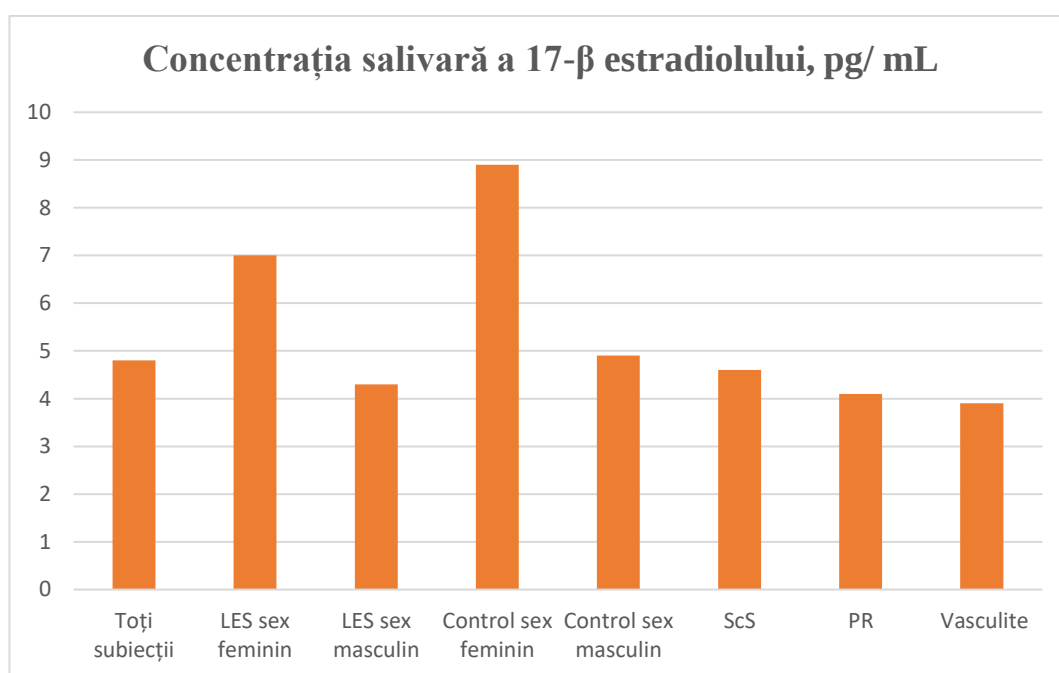
anti-Ro, anti-La, anti-Sm. De asemenea, au fost notați câțiva parametri determinați din urină: proteinuria din examenul sumar și total de urină, hematuria, leucocituria.

În plus, au fost înregistrate scorurile de activitate a bolii SLEDAI și ECLAM, pulsul arterial, valoarea tensiunii arteriale și asocierea cu sindromul Raynaud, precum și manifestările clinice cutanate, articulare, renale și neurologice.

Concentrațiile salivare ale 17- β estradiolului și testosteronului au fost determinate utilizând tehnica ELISA.

5.4. Rezultate

Concentrațiile salivare ale 17- β estradiolului (E2) la paciențele cu LES au fost găsite a fi semnificativ crescute doar comparativ cu femeile cu vasculită incluse în studiu. De fapt, concentrațiile E2 au fost crescute la paciențele cu LES comparativ cu toate celelalte grupuri exceptând grupul de control de sex feminin, dar nu am găsit nicio semnificație statistică în aceste cazuri.



Am observat de asemenea și concentrații semnificativ crescute ale E2 în saliva paciențelor cu un scor ECLAM mai mare în momentul includerii în studiu. În plus, utilizând un model de regresie logistică (realizat prin metoda Enter), ajustat pentru caracteristicile pacienților, am găsit nivelul salivar al 17- β estradiolului ca fiind un predictor independent al nefritei lupice. În cadrul acestui studiu am găsit și corelații pozitive între concentrațiile salivare ale E2 și alți parametri clinici și paraclinici, printre care vârsta la includere, durata tratamentului corticosteroid, presiunea pulsului și tensiunea arterială sistolică.

Concentrațiile salivare ale testosteronului (T2) au fost semnificativ scăzute la paciențele cu LES comparativ atât cu grupul de control de sex feminin, cât și cu grupul de control de sex masculin.

Pe de altă parte, rezultatele acestui studiu au arătat că nivelele salivare ale T2 și E2 se corelează atât atunci când am analizat concentrațiile hormonale pentru toți subiecții, cât și în cazul în care am luat în considerare doar paciențele cu LES.

5.5. Discuții

Rezultatele acestui studiu nu au arătat o creștere semnificativă din punct de vedere statistic a concentrațiilor salivare a 17- β estradiolului la femeile cu LES *versus* participante de sex feminin din lotul de control. Rezultate asemănătoare au fost relatate și de studii anterioare realizate pe ser [123, 124]. O meta-analiză realizată pe 8 studii care au luat în considerare doar paciențe de sex feminin cu LES a arătat că doar două din respectivele cercetări au prezentat concentrații serice semnificativ crescute pentru 17- β estradiol, în timp ce restul studiilor nu au găsit diferențe semnificative între paciențele cu LES și grupurile de control [123].

Cercetări realizate anterior prezentului studiu demonstrează că nivelele salivare ale testosteronului reflectă cu acuratețe concentrațiile testosteronului liber circulant din ser [116]. Concentrațiile semnificativ scăzute ale T2 în saliva paciențelor cu lupus eritematos sistemic comparativ atât cu femeile, cât și cu bărbații incluși în lotul de control sunt în concordanță cu rezultate raportate anterior în studii realizate atât pe ser [123], cât și pe salivă [116].

5.6. Concluzii

În concluzie, deși au am găsit nivele ale 17- β estradiolului semnificativ crescute în saliva pacienților cu lupus eritematos sistemic, corelațiile pozitive între concentrațiile salivare ale acestui hormon și vârsta la includerea în studiu, durata tratamentului cu corticosteroizi, tensiunea arterială sistolică și afectarea funcției renale, precum și corelația pozitivă dintre nivelele crescute ale E2 și scorul ECLAM promovează utilizarea nivelului salivar a acestui hormon pentru monitorizarea activității LES.

În plus, rezultatele acestui studiu arată că nivelul salivar al testosteronului a fost semnificativ mai mic la paciențele cu LES *versus* subiecții sănătoși și de asemenea, că există o corelație pozitivă între concentrațiile salivare ale E2 și T2, reflectând astfel potențialul salivei ca fluid de monitorizare al activității hormonale în LES.

6. Studiul 2. Biomarkeri ai inflamației și lupusul eritematos sistemic

6.1. Introducere

Etiologia lupusului eritematos sistemic rămâne încă incertă, însă heterogenitatea clinică a acestei patologii ar putea fi explicată de anormalitățile imunologice complexe care îi stau la bază. Supraproducția de anticorpi, nivelele crescute de citokine și perturbarea toleranței față de mecanismele proprii și cele apoptotice reprezintă procese cheie în dezvoltarea și progresia LES [128-130].

6.2. Ipoteza de lucru/obiective

Principalul obiectiv al prezentului studiu a fost explorarea potențialului de diagnostic al unor biomarkeri salivari cu relevanță pentru inflamația asociată lupusului eritematos sistemic. În acest scop, am determinat concentrațiile salivare, dar și cele serice pentru interleukina-6 (IL-6), leptină, proteina chemoattractantă a monocitelor (MCP-1) și inhibitorul activatorului de plasminogen 1 (PAI-1). Scopul acestor cercetări îl reprezintă dezvoltarea unor noi metode și paneluri de biomarkeri menite să ajute la diagnosticarea și monitorizarea non-invazivă a pacienților cu lupus eritematos sistemic.

6.3. Material și metodă

Prezenta cercetare a inclus un total de 29 de participanți împărțiți în 2 grupuri. Primul grup a fost reprezentat de 24 de subiecți (toți de sex feminin) diagnosticați cu lupus eritematos sistemic conform criteriilor de diagnostic al Systemic Lupus Collaborating Clinics (SLICC) din 2012 [54]. Principalul motiv pentru care am selectat doar femeile cu LES pentru acest studiu a fost prevalența mai mare a bolii la persoanele de sex feminin comparativ cu cele de sex masculin (raport 9:1) [99]. Cel de-al doilea grup a constituit grupul de control format din 5 subiecți clinic și biologic sănătoși. Au fost notate datele biologice, clinice și paraclinice importante, printre care vârsta, sexul, greutatea, vârsta la care s-a instalat boala (precum și ceilalți parametri menționați în **Capitolul 5.3.**).

Am recoltat probe de sânge și salivă tuturor subiecților incluși în studiu. Probele de sânge au fost centrifugate timp de 15 minute la 4000 rpm, iar saliva a fost prelucrată conform protocolului menționat în **Capitolul 4**. Probele au fost păstrate la -70°C până în momentul analizării.

Concentrațiile serice și salivare ale IL-6, leptinei, PAI-1 și MCP-1 au fost determinate utilizând 2 senzori stocastici.

6.4. Rezultate

Rezultatele obținute au relevat o corelație pozitivă între nivelele serice și cele salivare ale IL-6.

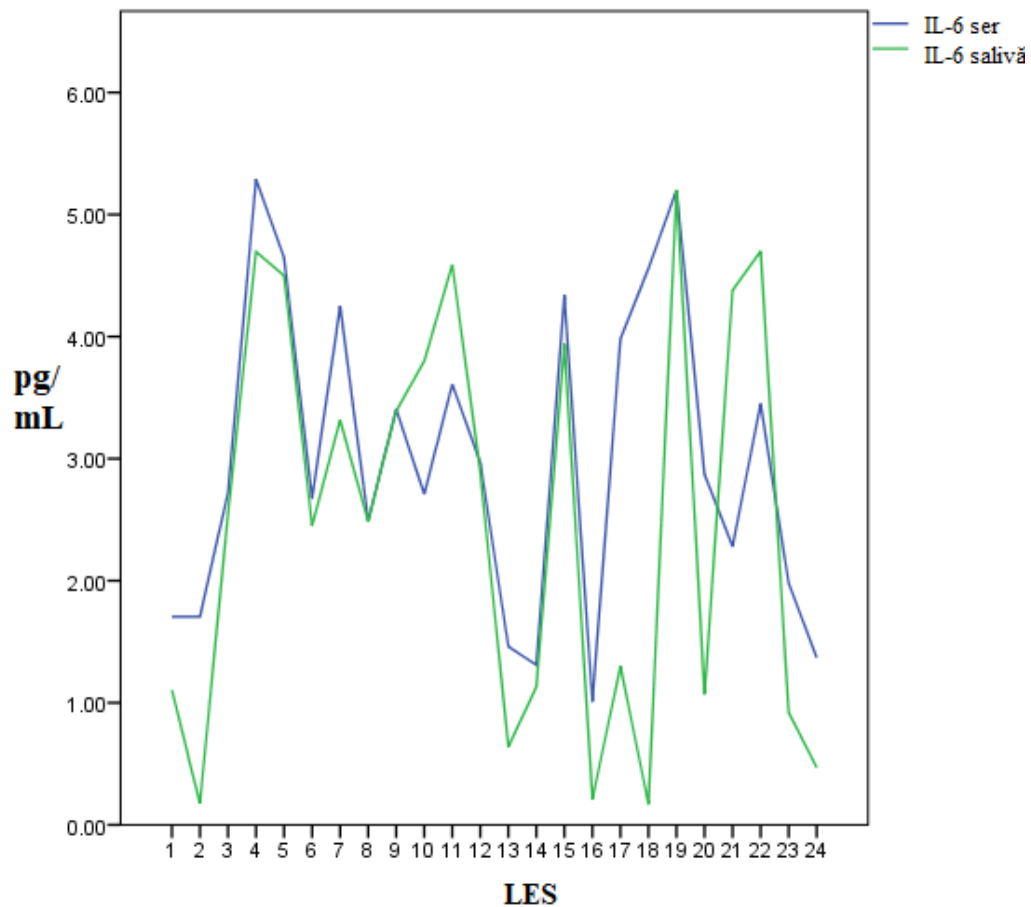


Figura 6.6. Cinetica IL-6 serice și salivare la pacienții cu lupus eritematos sistemic

Rezultatele prezentului studiu au reliefat nivele salivare mai mici la pacienții cu lupus eritematos comparativ cu grupul de control doar pentru PAI-1 și leptină, deși fără relevanță statistică. De asemenea, în cazul pacienților cu LES am observat concentrații serice semnificativ crescute pentru IL-6 și leptină. În plus, nivelele salivare ale IL-6 au fost mai mari la subiecții cu LES decât la cei din grupul de control, datele fiind aproape de relevanța statistică.

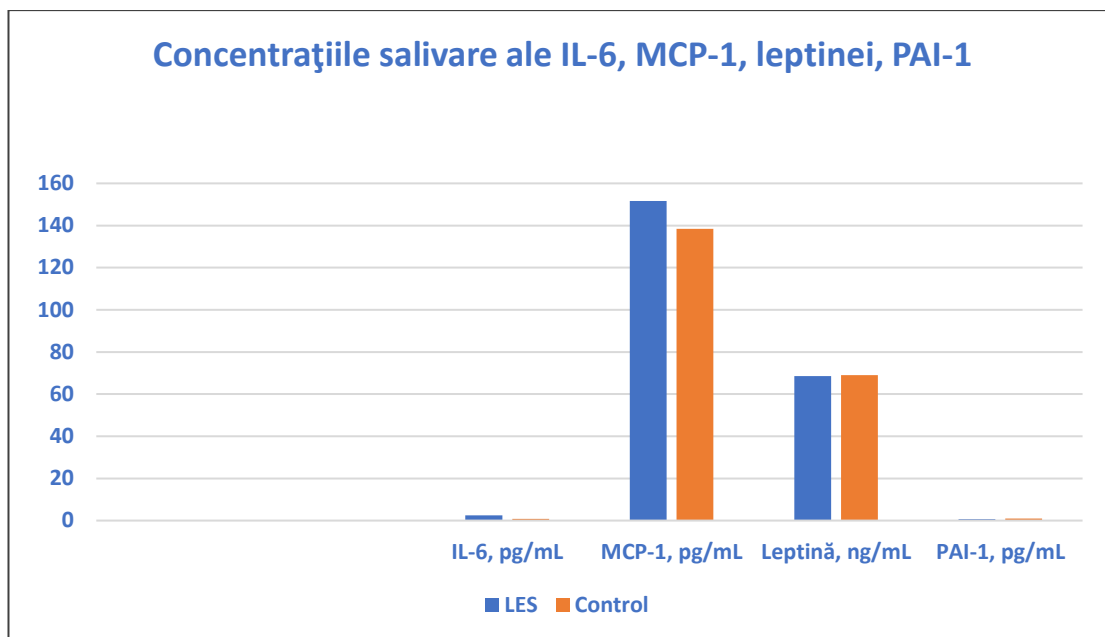


Figura 6.7. Concentrațiile salivare ale IL-6, MCP-1, leptinei, PAI-1

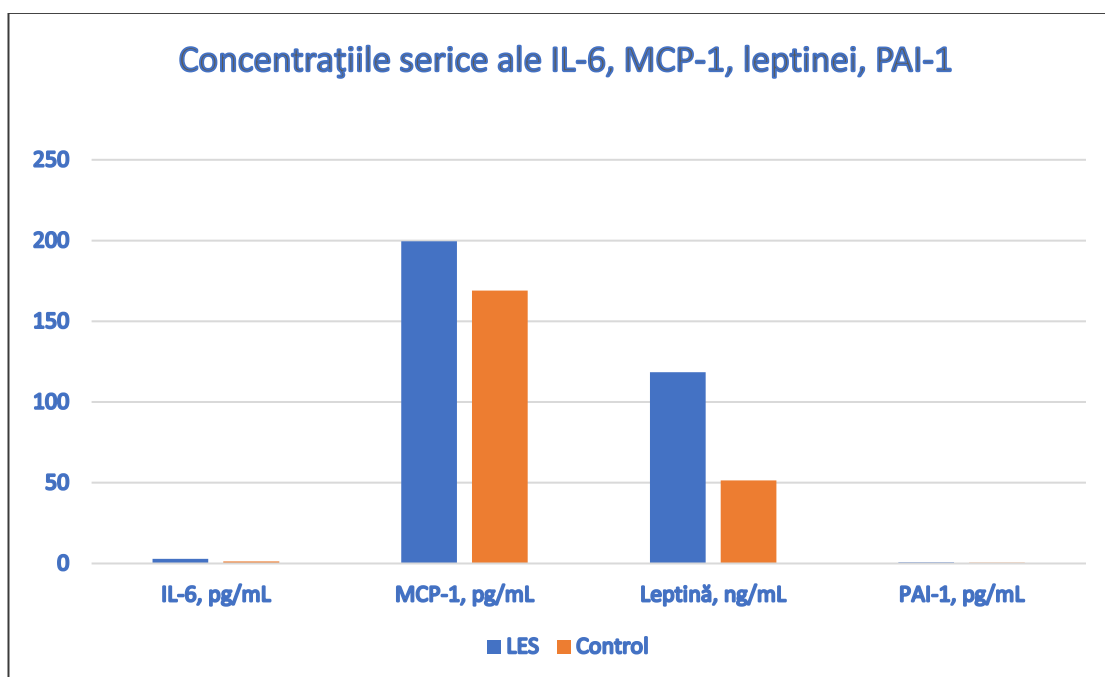


Figura 6.8. Concentrațiile salivare ale IL-6, MCP-1, leptinei, PAI-1

6.5 Discuții

La pacienții cu lupus eritematos sistemic concentrațiile acestei interleukine pleiotropice (IL-6) sunt de obicei mai mari comparativ cu subiecții sănătoși. Această observație se referă nu doar la nivelele serice, ci și la cele din urină, lichidul cefalorahidian sau fluidul bronhoalveolar [135-137]. În urma analizării cercetării existente la momentul actual, nu am găsit niciun studiu care să raporteze nivelele salivare ale IL-6 și corelarea acestora cu concentrațiile serice ale pacienților cu LES. Rezultatele prezentei cercetări doctorale au arătat că toți pacienții cu LES prezintă concentrații crescute ale IL-6 atât în ser, cât și în salivă *versus* subiecții din grupul de control, deși relevanța statistică au avut doar rezultatele obținute din ser. Pe de altă parte, am găsit o corelație pozitivă statistic semnificativă între nivelele din salivă și cele din ser.

6.6. Concluzii

În concluzie, rezultatele prezentei cercetări reliefează concentrații mai mari statistic semnificative ale IL-6 și leptinei în serul pacienților cu LES, precum și existența unei corelații pozitive între nivelul salivar și cel din ser al interleukinei-6. Astfel, nivelul salivar al IL-6 poate constitui o alternativă viabilă pentru diagnosticarea și monitorizarea inflamației asociate lupusului eritematos sistemic. Este fundamentală continuarea acestei linii de cercetare prin extinderea loturilor de pacienți și subiecți de control, pentru a putea valida potențialul nivelul salivar al IL-6 ca biomarker al inflamației în LES în clinică.

7. Studiul 3. Metaloproteinazele matriceale și inflamația din bolile autoimune

7.1. Introducere

În ultimele decenii saliva a devenit o prioritate în domeniul cercetării medicale în vederea descoperirii unor alternative la metodele de diagnostic convenționale. Saliva totală reprezintă un amestec complex de secreție salivară produsă de glandele salivare mari (parotide, submandibulare și sublinguale) și cele mici cu fluidul crevicular gingival (FCG), celulele epiteliale orale descumate, bacterii și detritus alimentar [188, 189, 190].

Metaloproteinazele matriceale (MMP) reprezintă un grup de proteaze produse de numeroase tipuri de celule, fiind implicate în remodelarea, degradarea și remodelarea matricii extracelulare, dar care în contextul unei afecțiuni cu componentă inflamatorie pot fi secretate și de celule cu rol pro-inflamator conducând la infiltrație leucocitară [201].

7.2. Ipoteze/obiective de lucru

Scopul acestui studiu l-a reprezentat evaluarea potențialului salivei ca fluid de diagnostic și monitorizare în bolile autoimune, prin determinarea nivelelor salivare ale unui grup de metaloproteinaze matriceale la pacienți cu lupus eritematos sistemic, poliartrită reumatoidă, sclerodermie și vasculite și compararea lor cu cele ale subiecților sănătoși, precum și analizarea acestor nivele în contextul clinic al pacienților participanți la prezenta cercetare.

7.3. Material și metodă

Toate concentrațiile salivare ale MMP au fost determinate utilizând tehnologia Miliplex Luminex. Kitul utilizat a fost MILLIPLEX® MAP Human MMP Magnetic Bead Panel 2 (MMP-1, MMP-2, MMP-7, MMP-9, MMP-10) al firmei Merck. Conform acestei tehnologii, abilitatea adăugării de bead-uri multiple conjugate în fiecare probă conferă posibilitatea de a obține mai multe rezultate din fiecare probă analizată. Astfel, tehnologia xMAP® permite reducerea timpului de lucru, a muncii și a costurilor comparativ cu metodele convenționale printr-o determinare multiplex.

7.4. Rezultate

Rezultatele noastre reflectă concentrații salivare crescute ale MMP-1 doar la pacienții cu LES, în timp ce MMP-2 a prezentat nivele salivare crescute la pacienții cu LES și la cei cu vasculite *versus* control, deși fără semnificație statistică. În mod interesant, la pacienții cu PR am determinat concentrații salivare semnificativ scăzute ale MMP-2 comparativ cu grupul de control respectiv. Rezultatele acestei cercetări doctorale au arătat concentrații salivare ale MMP-9 scăzute la pacienții cu LES comparativ cu grupul de control, dar fără semnificație statistică. Deși fără semnificație statistică, concentrațiile salivare ale MMP-7 la pacienții cu LES au fost mai mari comparativ cu cele ale grupului de control respectiv. Mai mult, atunci când am luat în calcul doar pacienții cu LES, am găsit corelații pozitive cu semnificație statistică ale concentrațiilor salivare ale MMP-7 cu numărul de neutrofile.

7.5. Discuții

Inflamația este în fapt un răspuns normal al organismului prin care acesta apară țesutul gazdă de infecții (non-self) și îl vindecă după lezare. Este fundamental ca această reacție să înceteze odată ce agresiunea a fost îndepărtată, astfel încât să nu fie perturbat echilibrul dintre mecanismele pro-inflamatorii și cele anti-inflamatorii. Mastocitele și macrofagele sunt printre primele celule care intervin în procesele inflamatorii, eliberând factori pro-inflamatori care determină infiltrație leucocitară, activarea cascadei coagulării și distrugerea matricei extracelulare [210].

În bolile autoimune, celule sinoviale, neutrofilele, fibroblastele și macrofagele sunt supuse acțiunii citokinelor pro-inflamatorii, printre care IL-1,6 și TNF- α și produc metaloproteinaze (MMP) în exces [228].

O serie de MMP reglează direct sau indirect activitatea chemokinelor, intervenind astfel în procesele inflamatorii și cele imune. Clivarea directă a chemokinelor de către metaloproteinazele matriceale produce inactivarea sau amplificarea activității lor, în timp ce alte chemokine sunt influențate prin clivarea substraturilor care sunt responsabile de legarea, reținerea și concentrarea moleculelor chemotactice în regiuni cheie. Toate aceste efecte au în final drept consecință influxul de celule imune efectoare (neutrofile, monocite și eozinofile), reflectând astfel rolul activ pe care MMP-uri îl joacă în inflamație [231].

În plus, am observat existența unor corelații pozitive între nivelele salivare ale MMP-1 la pacienții cu boli autoimune și tratamentele urmate de aceștia. Astfel, concentrațiile MMP-1 din salivă s-au corelat pozitiv statistic semnificativ cu doza zilnică de hidroxiclorochină și cu numărul de ani de tratament cu ciclofosfamidă. Hidroxiclorochina (denumire comercială Plaquenil) este un medicament antimalaric prescris pacienților cu boli autoimune, mai ales pacienților cu LES, deoarece s-a dovedit inițial util împotriva leziunilor cutanate specifice LES [234]. Astăzi tratamentul cu hidroxiclorochină este indicat tuturor pacienților cu LES care nu au prezentat reacții adverse sau alergice la administrarea sa. Prin mecanisme încă incomplet cunoscute, hidroxiclorochina s-a dovedit utilă în reducerea și menținerea remisiunii în lupus, efecte la care se adaugă rolul său antiplachetar, benefic la pacienții care asociază sindrom antifosfolipidic. De altfel, în special comparativ cu tratamentele corticosteroidiene sau imunosupresive folosite în LES, profilul de siguranță al hidroxiclorochinei este bun. Principalele reacții adverse sunt reprezentate de afectarea oculară, care poate conduce, în cazuri incomplet monitorizate conform recomandărilor actuale chiar la pierderea ireversibilă a vederii. Alte efecte secundare ce pot fi asociate administrării acestui medicament sunt efecte neuromusculare (insomnie, miotoxicitate), gastrointestinale, cardiovasculare și chiar cutanate [234, 235].

Corelația pozitivă statistic semnificativă dintre nivele salivare ale MMP-10 și VSH, respectiv și PCR, principalii reactanți de fază acută, reflectă potențialul concentrației salivare a MMP-10 ca marker al inflamației în bolile autoimune. Mai mult, atunci când am luat în calcul doar pacienții cu LES, nivelele salivare ale MMP-10 s-au corelat pozitiv statistic semnificativ cu numărul de neutrofile, susținând această ipoteză.

7.6. Concluzii

În concluzie, rezultatele prezentului studiu arată pentru prima dată că metaloproteinaze importante pentru evaluarea procesului inflamator caracteristic bolilor autoimune prezintă nivele salivare crescute în saliva pacienților cu afecțiuni autoimune. Astfel, determinarea concentrațiilor salivare ale MMP-1, -2, -7, -9 și -10 promovează utilizarea salivei ca o alternativă viabilă pentru stabilirea activității acestor enzime în LES, PR, sclerodermie și vasculită. În plus, corelațiile găsite între nivele salivare ale acestor MMP și o serie de parametri clinici și paraclinici identifică saliva ca un fluid cu potențial pentru monitorizarea activității bolii, precum și pentru efectele terapiei administrate.

8. Elementele inovative și de originalitate ale tezei de doctorat

Caracterul inovativ și original al prezentei lucrări de doctorat este conferit de perspectiva nouă a utilizării salivei ca fluid alternativ de diagnostic a bolilor autoimune, studiile realizate în cadrul acestei cercetări oferind o nouă abordare a relației dintre procesul inflamator și aceste afecțiuni complexe caracterizate de etiologie plurifactorială și heterogenitate clinică.

După cunoștințele noastre, această cercetare evaluează pentru prima dată conexiunea dintre inflamație, bolile autoimune și diagnosticul salivar printr-o serie de biomarkeri relevanți pentru patogeniza acestor afecțiuni. Deși saliva reprezintă una dintre temele majore de cercetare actuală, utilizarea sa în contextul acestor patologii este încă insuficient explorată.

Prin determinarea nivelelor salivare ale hormonilor sexuali la pacienții cu LES, PR, sclerodermie și vasculite, primul studiu al prezentei lucrări de doctorat evaluează pentru prima dată modificările hormonale apărute la pacienții cu boli autoimune diferite și sugerează potențialul o posibilă corelație între activitatea 17- β estradiolului și dezvoltarea și progresia LES.

Studiul concentrațiilor salivare ale biomarkerilor inflamației reflectă pentru prima dată, după cunoștințele noastre, potențialul utilizării nivelului salivar al IL-6 ca marker al inflamației din LES.

Rezultatele obținute prin analizarea concentrațiilor salivare ale MMP la pacienții cu boli autoimune contribuie la dezvoltarea noțiunilor despre procesul inflamator din cadrul acestor patologii. În plus, corelațiile obținute între nivelele salivare ale metaloproteinazelor

analizate și numeroși parametri clinici și paraclinici subliniază efectele inflamației și rolul său central în apariția bolilor autoimune. Mai mult, această cercetare doctorală evidențiază pentru prima dată, conform cunoștințelor noastre, legătura dintre terapiile utilizate la pacienții cu boli autoimune și nivelele MMP prin intermediul salivei.

În concluzie, prezenta lucrare doctorală oferă un nou orizont de cercetare a bolilor autoimune, demonstrând abilitatea salivei de a constitui o alternativă viabilă pentru diagnosticarea și monitorizarea inflamației asociate acestor afecțiuni care afectează milioane de oameni la nivel mondial și care au un impact extraordinar asupra calității vieții pacienților. Astfel, datorită avantajelor pe care le posedă, saliva ar putea reprezenta fluidul ideal de diagnostic și monitorizare a bolilor autoimune.

9. Concluzii generale

- Analizând comparativ activitatea hormonală la paciente cu boli autoimune, am constatat că pacientele cu LES au prezentat concentrațiile salivare crescute ale 17- β estradiolului comparativ cu cele cu alte boli autoimune, deși semnificație statistică au prezentat doar rezultatele *versus* pacientele cu vasculite.
- Pe de altă parte, luând în considerare vârsta participanților incluși în studiul monitorizării activității hormonale, am determinat concentrații salivare ale 17- β estradiolului mai mici la femeile cu LES și vârstă mai mare de 40 de ani comparativ cu grupul de control respectiv, format din paciente clinic și biologic sănătoase.
- În plus, rezultatele prezentei cercetări doctorale au identificat nivelul salivar al 17- β estradiolului ca fiind un predictor independent al nefritei lupice, una dintre cele mai importante complicații sistemice ale lupusului eritematos sistemic.
- Mai mult, concentrațiile salivare ale 17- β estradiolului s-au corelat pozitiv cu o serie de parametri clinici și paraclinici, printre care vârsta la includere, durata tratamentului corticosteroid, presiunea pulsului și tensiunea arterială sistolică.
- În același timp, rezultatele acestei cercetări au relevat concentrații salivare ale testosteronului semnificativ scăzute la pacientele cu LES comparativ atât cu grupul de control de sex feminin, cât și cu grupul de control de sex masculin, reflectând rolul protector pe care îl are acest hormon androgen față de dezvoltarea și progresia LES.
- Prezenta cercetare doctorală a evidențiat existența unei corelații pozitive între concentrațiile salivare ale 17- β estradiolului și cele ale testosteronului, atât atunci când

am analizat concentrațiile hormonilor pentru toți subiecții, cât și în cazul în care am luat în considerare doar paciențele cu LES.

- De asemenea, rezultatele obținute au evidențiat concentrații salivare mai mari pentru 17- β estradiol la pacienții cu un scor ECLAM mai mare în momentul includerii în studiu, aceste rezultate sugerând o posibilă corelație între activitatea acestui hormon estrogen și dezvoltarea și progresia LES.

- Studiul realizat în această lucrare doctorală cu scopul monitorizării activității hormonilor sexuali la pacienții cu boli autoimune s-a concentrat în mod deosebit asupra pacienților cu LES de sex feminin plecând de la datele deja existente în literatura de specialitate care sugerează implicarea acestor hormoni în patogeneza bolii, ei putând reprezenta cheia prevalenței diferite a bolii între sexe.

- Pacienții cu LES au prezentat concentrații serice semnificativ crescute pentru IL-6 și leptină, în timp ce alți doi biomarkeri ai inflamației analizați (MCP-1) și PAI-1 au fost găsiți în concentrații mai mari comparativ cu lotul de control, însă fără semnificație statistică.

- Pe de altă parte, nivelele salivare ale IL-6 au fost mai mari la subiecții cu LES decât la cei din grupul de control, datele fiind aproape de relevanța statistică.

- În plus, rezultatele prezentei cercetări au relevat o corelație pozitivă între nivelele serice și cele salivare ale IL-6.

- Analizând concentrațiile salivare ale MMP, biomarkeri deja cunoscuți ai inflamației, rezultatele noastre reflectă concentrații salivare ale MMP-1 crescute doar la pacienții cu LES, în timp ce nivelele salivare ale acestei metaloproteinaze la pacienții cu poliartrită reumatoidă, sclerodermie și vasculite au fost scăzute comparativ cu cele ale grupurilor de control respective, deși fără semnificație statistică pentru aceste date.

- Pe de altă parte, datele obținute au reliefat o serie de corelații între concentrațiile salivare ale MMP-1 și numeroși parametri clinici și paraclinici, printre care VSH, numărul de ani de tratament cu ciclofosamidă, doza zilnică de hidroxiclorochină, concentrația de hemoglobină, hematocritul, tratamentul cu corticosteroizi din momentul includerii în studiu și concentrația serică a trigliceridelor.

- Concentrațiile salivare ale MMP-2 la pacienții cu sclerodermie au fost crescute statistic semnificativ față de cele ale subiecților ce au constituit lotul de control respectiv, în timp ce pacienții cu LES și la cei cu vasculite au prezentat nivele salivare crescute ale acestei metaloproteinaze, dar fără semnificație statistică.

- Pacienții cu poliartrită reumatoidă au prezentat concentrații salivare semnificativ scăzute ale MMP-2 comparativ cu grupul de control respectiv.

- În plus, nivele salivare ale MMP-2 au prezentat corelații pozitive statistic semnificative cu gradul de afectare hematologică în momentul diagnosticării, dar și în momentul includerii în studiu, cu numărul de ani de tratament cu ciclofosfamidă și cu concentrațiile serice ale LDH și ale GGT.

- Rezultatele prezentei cercetări relevă nivele salivare ale MMP-9 semnificativ crescute la pacienții cu sclerodermie și vasculite *versus* grupurile de control respective, precum și o corelație pozitivă între o corelație pozitivă a acestora cu anticorpii anti-Sm.

- Nivelele salivare ale MMP-10 la pacienții cu sclerodermie au fost semnificativ crescute comparativ cu grupului de control.

- De asemenea, corelația pozitivă statistic semnificativă dintre nivele salivare ale MMP-10 și VSH, respectiv și PCR, principalii reactanți de fază acută, reflectă potențialul concentrației salivare a MMP-10 ca marker al inflamației în bolile autoimune.

- Coroborate, aceste rezultate sugerează potențialul salivei ca fluid de diagnostic și monitorizare a bolilor autoimune și a proceselor inflamatorii ce se află la baza fiziopatologiei lor. Aceste rezultate reprezintă însă punctul de plecare al unei noi abordări a diagnosticului acestor patologii complexe și ar fi necesară o viitoare cercetare post-doctorală realizată pe loturi extinse, în încercarea de a găsi noi instrumente utile în simplificarea protocoalelor de diagnostic deja existente, saliva având și avantajul major al non-invazivității.

Bibliografie (selectivă)

1. **Stanescu II**, Totan A, Rus F, Miricescu D, Mocanu B, Calenic, B, Greabu M. Salivary Diagnosis-Clinical Uses in Assessing Oral Inflammation. *Revista de Chimie* 68(6), 1201-1204, 2017.
2. Chojnowska S, Baran T, Wilińska I, Sienicka P, Cabaj-Wiater I, Knaś M. Human saliva as a diagnostic material, *Advances in medical sciences*, 63(1), 185-191, 2018.
3. Bălan DG, Balcangiu-Stroescu AE, **Stănescu II**, Piperea-Șianu D. *Fiziologia sistemului digestiv*. Editura Medicală, București, 2019.
4. Andreassen S. Molecular features of adenoid cystic carcinoma with an emphasis on micro RNA expression. *Apmis*, 126, 7-57, 2018.
5. Holsinger FC, Bui DT. *Anatomy, function, and evaluation of the salivary glands*. Salivary gland disorders, Springer, Berlin, Heidelberg, 2007.
6. Turner RJ. Mechanisms of fluid secretion by salivary glands. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 694(1), 24-35, 1993.
7. Edgar WM, O'Mullane DM, Dawes C. *Saliva and oral health, Fourth Edition*. Stephen Hancocks Limited, London, 2012.
8. Greabu M. *Biochimia cavității orale*. Editura Standardizarea, București, 2011.
9. Schulz BL, Cooper-White J, Punyadeera CK. Saliva proteome research: current status and future outlook. *Critical reviews in biotechnology*, 33(3), 246-259, 2013.
10. Rashkova M, Toncheva A. Gingival disease and secretory immunoglobulin a in non-stimulated saliva in children. *Folia medica*, 52(4), 48-55, 2010.
11. Jafarzadeh A, Sadeghi M, Karam GA, Vazirinejad R. Salivary IgA and IgE levels in healthy subjects: relation to age and gender. *Brazilian oral research*, 24(1), 21-27, 2010.
12. PulliShery F, Panchmal GS, SiDDique S. Salivary thiocyanate, uric acid and pH as biomarkers of periodontal disease in tobacco users and non-users- an in-vitro study. *Journal of clinical and diagnostic research*, 9(7), ZC47-ZC502015.

13. Proctor GB. The physiology of salivary secretion. *Periodontology* 2000, 70(1), 11-25, 2016.
14. Pedersen AM, Bardow A, Jensen SB, Nauntofte B. Saliva and gastrointestinal functions of taste, mastication, swallowing and digestion. *Oral diseases*, 8(3), 117-129, 2002.
15. Fejerskov O, Kidd E. *Dental caries: the disease and its clinical management*. John Wiley & Sons, 2009.
16. Koeppen BM, Stanton BA. The cephalic, oral and esophageal phases of the integrated response to a meal. *Berne & Levy Physiology, Elsevier Health Sciences*, 2009.
17. Singh M, Ingle NA, Kaur N, Yadav P, Ingle E. Effect of long-term smoking on salivary flow rate and salivary pH. *Journal of Indian Association of Public Health Dentistry*, 13(1), 11-13, 2015.
18. Lee MG, Ohana E, Park HW, Yang D, Muallem S. Molecular mechanism of pancreatic and salivary gland fluid and HCO₃⁻ secretion. *Physiological reviews*, 92(1), 39-74, 2012.
19. Wileman T, Kane LP, Carson GR, Terhorst C. Depletion of cellular calcium accelerates protein degradation in the endoplasmic reticulum. *Journal of Biological Chemistry*, 266(7), 4500-4507, 1991.
20. Proctor GB, Carpenter GH. Regulation of salivary gland function by autonomic nerves. *Autonomic Neuroscience*, 133(1), 3-18, 2007.
21. Ekström J, Ekman R, Luts A, Sundler F, Tobin G. Neuropeptide Y in salivary glands of the rat: origin, release and secretory effects. *Regulatory peptides*, 61(2), 125-134, 1996.
22. Zolotukhin S. Metabolic hormones in saliva: origins and functions. *Oral diseases*, 19(3), 219-229, 2013.
23. Kaczmarek MJ, Rosenmund H. The action of human pancreatic and salivary isoamylases on starch and glycogen. *Clinica Chimica Acta*, 79(1), 69-73, 1977.
24. Dawes C, Pedersen AML, Villa A, Ekström J, Proctor GB, Vissink A, Aframian D, McGowan R, Liko A, Narayana N, Sia YW, Joshi RK, Jensen SB, Kerr AR, Wolff A. The functions of human saliva: A review sponsored by the World Workshop on Oral Medicine VI. *Archives of oral biology*, 60(6), 863-874, 2015.

25. Katschinski M. Nutritional implications of cephalic phase gastrointestinal responses. *Appetite*, 34(2), 189-196, 2000.
26. McQuone SJ. Acute viral and bacterial infections of the salivary glands. *Otolaryngologic Clinics of North America*, 32(5), 793-811, 1999.
27. Tabak LA. In defense of the oral cavity: the protective role of the salivary secretions. *Pediatric dentistry*, 28(2), 110-117, 2006.
28. Hannig M, Joiner A. The structure, function and properties of the acquired pellicle. *Monographs in oral science*, 19, 29-64, 2006.
29. Siqueira WL, Zhang W, Helmerhorst EJ, Gygi SP, Oppenheim FG. Identification of protein components in in vivo human acquired enamel pellicle using LC–ESI–MS/MS. *Journal of proteome research*, 6(6), 2152-2160, 2007.
30. Hahn Berg IC, Rutland MW, Arnebrant T. Lubricating properties of the initial salivary pellicle—an AFM study. *Biofouling*, 19(6), 365-369, 2003.
31. Vukosavljevic D, Custodio W, Buzalaf MA, Hara AT, Siqueira WL. Acquired pellicle as a modulator for dental erosion. *Archives of oral biology*, 59(6), 631-638, 2014.
32. Eckley CA, Michelsohn N, Rizzo LV, Tadakoro CE, Costa HO. Salivary epidermal growth factor concentration in adults with reflux laryngitis. *Otolaryngology—Head and Neck Surgery*, 131(4), 401-406, 2004.
33. Pfaffe T, Cooper-White J, Beyerlein P, Kostner K, Punyadeera C. Diagnostic potential of saliva: current state and future applications. *Clinical chemistry*, 57(5), 675-687, 2011.
34. Martí-Álamo S, Mancheño-Franch A, Marzal-Gamarra C, Carlos-Fabuel L. Saliva as a diagnostic fluid. Literature review. *Journal of clinical and experimental dentistry*, 4(4), e237-243, 2012.
35. Nunes S, Alessandro L, Mussavira S, Sukumaran Bindhu O. Clinical and diagnostic utility of saliva as a non-invasive diagnostic fluid: a systematic review. *Biochemia medica: Biochemia medica*, 25(2), 177-192, 2015.
36. Pink R, Simek J, Vondrakova J, Faber E, Michl P, Pazdera J, Indrak K. Saliva as a diagnostic medium. *Biomedical Papers of the Medical Faculty of Palacky University in Olomouc*, 153(2), 103-110, 2009.
37. Mittal S, Bansal V, Garg SK, Atreja G, Bansal S. The diagnostic role of saliva: a review. *J Clin Exp Dent*, 3, 314-320, 2011.