
REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Rolul produșilor finali de glicozilare avansată (AGEs) în patologia orală în corelație cu afecțiunile generale

Doctorand **Anida-Maria Băbțan**

Conducător de doctorat Prof.dr. **Radu Septimiu Câmpan**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CUPRINS

INTRODUCERE

STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

1. Compușii finali de glicozilare avansată (AGEs)

- 1.1 Formarea AGEs
- 1.2 Clasificarea AGEs
 - 1.2.1. Clasificarea AGEs în funcție de proveniență
 - 1.2.2. Clasificarea AGEs în funcție de proprietatea fluorescentă
 - 1.2.3. Clasificarea AGEs în funcție de capacitatea de cross-link
 - 1.2.4. Clasificarea AGEs în funcție de substratul oxidat
- 1.3 Influența AGEs asupra metabolismului și metode de evaluare a acestora în țesuturi și biofluide
 - 1.3.1. Influența AGEs asupra sistemului osteoarticular și utilizare AGEReader
 - 1.3.2. Investigarea AGEs
- 1.4 Implicațiile AGEs cu proveniență alimentară în patologia generală și sindromul metabolic
 - 1.4.1. Interrelația AGEs cu dieta și sindromul metabolic
 - 1.4.2. Interrelația AGEs cu patologia degenerativă inflamatorie
 - 1.4.3. Interrelația AGEs cu patologia cardiovasculară
- 1.5 Implicațiile AGEs cu proveniență alimentară în patologia cavității orale
 - 1.5.1. AGEs la nivel dentinar
 - 1.5.2. AGEs la nivelul pulpei dentare
 - 1.5.3. AGEs în implantologie
 - 1.5.4. AGEs în țesuturile parodontiului
 - 1.5.5. AGEs la nivel salivar
 - 1.5.6. Evaluarea AGEs la nivelul cavității orale

2. Ultrasonografia tegumentară și mucozală în metainflamație

- 2.1 Hipersemnalul evidențiat ultrasonografic în procesele de metainflamație determinate de AGEs
 - 2.1.1. Ultrasonografia- background
 - 2.1.2. Ecografia și procesul de metainflamație
- 2.2 Glicarea și aspecte ultrasonografice ale procesului de îmbătrânire
 - 2.2.1. Aspecte ultrasonografice ale tegumentului expus la razele UV
 - 2.2.2. Aspecte ultrasonografice ale mucoasei labiale inferioare
 - 2.2.3. Ultrasonografia- metodă de evaluare a procesului de glicare în patologia inflamatorie periapicală

CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

1. Ipoteza de lucru

2. Studiul 1 – Implicațiile AGEs în patologia orală și generală- review al literaturii de specialitate

- 2.1 Introducere
- 2.2 Ipoteza de lucru/obiective
- 2.3 Material și metodă
- 2.4 Rezultate
- 2.5 Discuții
- 2.6 Concluzii

3. Studiul 2- Acumularea N-epsilon carboxymethyllysine (CML) în țesuturi și organe variate în relație cu procesul de îmbătrânire. Stadiul actual al cunoașterii și studiu experimental pe model animal.

- 3.1 Introducere
- 3.2 Ipoteza de lucru/obiective

3.3 Material și metodă

3.4 Rezultate

3.5 Discuții

3.6 Concluzii

4. Studiul 3 – Analiza CML în fluidele biologice asociat evaluării indirecte a proceselor de glicare la nivel tegumentar asistat ultrasonografic

4.1 Introducere

4.2 Ipoteză de lucru

4.3 Material și metodă

4.4 Rezultate

4.5 Discuții

4.6 Concluzii

5. Discuții generale

6. Concluzii generale

7. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei

REFERINȚE

Cuvinte cheie: Produși finali de glicozilare avansată (AGEs), N-epsilon carboxymethyllysine (CML), cavitatea orală, patologie asociată, AGEs salivari, biosenzor

Stadiul actual al cunoașterii

Alimentația reprezintă una dintre nevoile biologice umane. Alegerea unui anumit stil alimentar este o alegere proprie, influențată atât de factori individuali, cât și de normele și practicile sociale, care pot reprezenta un rol decisiv al tipului de dietă sănătoasă sau nesănătoasă. Nivelul educațional și venitul sunt determinanții principali ai alegerii în ceea ce privește alimentația cât și al comportamentului care determină o dietă sau anumite boli legate de dietă. Acest fapt este relevat de o stare de sănătate precară în rândul persoanelor cu venituri reduse, și a grupurilor vulnerabile din țările care se confruntă cu stări de inegalitate socială. În acest context, este clar că alegerea alimentației nu este doar legată de preferințele individuale și mai degrabă constrânsă de factori economici și sociali. Persoanele cu un venit redus au tendința de a avea o dietă dezechilibrată și un consum redus de fructe. O dietă echilibrată semnifică acces, cunoștințe și resurse financiare. Lipsa acestora a dus la dezvoltarea pieței fast-food și a meselor frugale (snack-ing), accesibile prin posibilitatea rapidă de preparare și a fi luate la pachet, dar sărace în substanțe nutritive.

Produsele alimentare, pentru a fi obținute în timp scurt, sunt procesate la temperaturi înalte. Aceste proceduri implică prăjire, rotisare, grătar, coacere, de multe ori și reîncălzire înainte de consumul propriu-zis. În timpul producției lor, se formează Maillard compounds [sau AGEs (Advanced Glycation End Products)], o serie de compuși formați prin reacția de glicozilare non-enzimatică între glucide cu proprietăți reducătoare și proteine, la care este adăugată și peroxidarea lipidică. Datorită obținerii facile, a gustului și a aspectului plăcut, compușii alimentari cu conținut AGEs sunt consumați pe scară largă.

AGEs sunt asociați cu stresul oxidativ, progresia și agravarea bolilor cu caracter inflamator și degenerativ (ateroscleroză, diabet zaharat, insuficiență renală). Reacție chimică identificată cu AGEs este glicarea. Glicarea are loc în mod spontan între compuși chimici (aminoacizi, lipide, glucide) și fibrele de collagen, prin glicozilare non-enzimatică, iar manifestarea clinică este dată de elastoză (pierderea elasticității tegumentare, afectarea producției de collagen și îmbătrânire).

Biodisponibilitatea AGEs a fost investigată în studii pe model animal și uman, însă există diferențe majore între rezultate, în ceea ce privește procentul de absorbție (1-10%), depozitare tisulară și eliminare renală (10-33%) sau fecală (20-33%). Expunerea la AGEs cu proveniență alimentară este completată cu alte surse exogene (UV, tutun, microunde) sau endogene (stres oxidativ, hiperglicemie). Unul dintre cei mai reprezentativi compuși AGEs este Nε-(Carboxymethyl)lysine (CML), investigat atât în nutrienți cât și în organismul uman.

Reacția Maillard, de obținere a AGEs, este asociată cu aroma și aspectul alimentelor, însă și cu producerea stresului oxidativ, alterare celulară cronică, îmbătrânire precoce prin cross-linkarea fibrelor de collagen, generarea unei stări de inflamație cronică, sau întreținerea uneia preexistentă. Ei sunt corelați cu dezvoltarea și întreținerea bolilor cunoscute ca fiind parte a sindromului metabolic (hipertensiune arterială, dislipidemii, diabet zaharat și obezitate). Odată cu înaintarea în vârstă, grosimea dermului scade iar fibrele de collagen și elastină se atrofiază, mecanism diferit la persoanele obeze, unde dermul crește în dimensiune iar rețeaua colagenică se dezorganizează. Afectarea fibrelor de collagen este evidențiată la nivelul structurilor cavității orale prin afectarea integrității mucoasei orale mobile și fixe, afectare a gradului lor de regenerare, creșterea incidenței leziunilor mucozale precum cheilita angulară, afte bucale, mouth burn syndrome. Relația dependentă de doză (cantitatea de alimente) și timp, se manifestă prin creșterea friabilității smalțului și dentinei, distrugerea collagenului din fibrele parodontale și activarea osteoclastelor. Astfel, se favorizează pierderea structurilor dure și alterarea celor moi, cu evoluție spre patologie carioasă și boală parodontală.

Collagenul are proprietatea de a fi fluorescent prin componenta tirozină, și astfel poate fi distins ecografic prin High Frequency Ultrasonography (HFU). Densitatea cutanată poate fi utilizată pentru cuantificarea stării de sănătate a tegumentului, pentru evaluarea degenerării și a regenerării dată de sinteza *de novo* a fibrelor de collagen, evidențiată ecografic prin creșterea ecogenității densității dermice. Prin evidențierea fibrelor de collagen, HFU este utilă în studiul procesului de glicare legate de AGEs, și corelarea procesului de la nivelul structurilor tegumentare și mucoase cu cele din biofluide și organe.

Ipoteză de lucru/obiective

AGEs au o proveniență variată (exogenă și endogenă). Reacțiile de formare a acestor produși duc la o stabilitate chimică ridicată în organismul uman a AGEs. Proprietățile chimice îi clasifică după caracterul de cross-link, fluorescență, capacitatea reducătoare. Odată legați de structurile din matricea extracelulară, dar mai ales de fibrele de colagen, realizează punți cross-link, care dezechilibrează funcția normală celulară. Mai mult, acești AGEs induc elastoza (îmbătrânire) tegumentară, activează mecanismele inflamatorii și sunt un factor declanșator al bolilor legate de dietă. Luând în considerare aspectele menționate, lucrarea de față a urmărit să prezinte evidențe importante asupra tipurilor de AGEs, ale patogeniei, biodisponibilității acestor produși, a interrelației cu patologii generale legate de dietă, dar și a celor de la nivelul cavității orale. Lucrarea a urmărit a evidenția fenomenul de îmbătrânire determinat de dietă și timp prin administrarea de AGEs (CML) pe cale orală pe model rodent. Studiul pilot pe cohorta umană a pornit de la ideea inovativă de a determina CML în biofluide cu ajutorul unui biosenzor electrochimic, care oferă date în timp real asupra valorilor produșilor de glicare. Acumularea AGEs la nivelul tegumentului generează elastoza (rigidizarea epidermică, dermică, scăderea densității și a elasticității), care poate fi evaluată ecografic. Pornind de la această premiză, s-a urmărit investigarea asocierii dintre valorile CML în biofluide cu cele obținute prin evaluarea tegumentului (din regiunea zigomatică) asistat ultrasonografic cu ultrasonografie de frecvență înaltă. Tehnicile utilizate pot reprezenta o abordare inovativă și non-invazivă în screening-ul pacienților cu patologie generală și dentară, în diagnosticul precoce și rapid al metainflamației, care poate fi de ajutor în crearea și implementarea unor strategii de prevenție și tratament a bolilor legate de dietă.

Studiul 1 – Implicațiile AGEs în patologia orală și generală- review al literaturii de specialitate

Primul studiu reprezintă un review al literaturii de specialitate și a avut ca scop revelarea aspectelor legate de sursele, mecanismul de acțiune, implicarea în bolile sistemice și a celor legate de dietă, implicarea în procesului de îmbătrânire a AGEs. Va fi prezentată o abordare inovativă ce are la bază AGEs salivari ca biomarkeri ai procesului inflamator, precum și metode de reducere a AGEs, testate *in vivo* sau *in vitro*.

Sursa de proveniență a AGEs poate fi exogenă sau endogenă. Proveniența exogenă este dată în cea mai mare parte de consumul de alimente gătite în timp scurt și la temperaturi înalte, produse pasteurizate, Fast-food (Western Diet), produse de patiserie coapte, expunerea la radiațiile Ultraviolete (UV), consumul de tutun, încălzirea alimentelor la microunde. AGEs de proveniență endogenă sunt formate în condiții de hiperglicemie, stres oxidativ, asociate cu diabetul zaharat. Fumul de țigară, prin conținutul de nicotină și nornicotină, stimulează expresia tisulară a AGEs. Datorită timpului scurt de înjumătățire a nicotinei (20-30 min) și a biodisponibilității foarte ridicate după consumul inhalator, AGEs se formează în decurs de câteva ore, comparativ cu cei cu proveniență alimentară, formați în decurs de 4-6 săptămâni, iar odată ajunși în circulație, se leagă de fibrele de colagen din țesutul conjunctiv, ducând la o rigiditate crescută a acestora.

Efectele CML sunt receptor-mediate (AGE-R1/OST-48, AGE-R2/80K-H, AGE-R3/galectin-3), receptori scavenger (SR-A, SR-B: CD36, SR-BI, SR-E: LOX-1; FEEL-1; FEEL-2). Interacțiunea AGE-RAGE activează NADPH-oxidaza, care promovează calea inflamatorie NF-κB, urmată de hiperexpresia markerilor de stres oxidativ iNOS și nivele ridicate de ONOO⁻.

Se consideră că AGEs au rol în îmbătrânire deoarece se acumulează în fibrele de colagen și elastină din matricea extracelulară, afectând elasticitatea acesteia. AGEs afectează funcția intracelulară prin glicarea proteică, iar prin interacțiunea AGE-RAGE activează căile inflamatorii. Există un mecanism endogen de AGEs-inducere a obezității dependent de RAGE. O dietă hipercalorică nu duce doar la obezitate, ci și la afectarea funcției cognitive și a memoriei.

Indiferent de sursa de proveniență, AGEs ajung la nivelul pulpei dentare prin fluxul sangvin, prin lichidul crevicular și difuziunea prin structurile de suport dento-parodontal. AGEs acționează prin mecanism inflamator și induce hiperpermeabilitate membranară, cu efect negative asupra fibrelor de colagen, reducerea sintezei osteoblastelor, modificări de culoare și duritate a țesuturilor dentare. Din pulpa dentară, AGEs ajung la nivelul tubulilor dentinari, suprafața intertubulare și predentinară, unde are loc reacția de cross-link-are a fibrelor de colagen. În fibrele ligamentului parodontal, AGEs duc la disoluția colagenului, pierdere de atașament, de asemenea activează activitatea osteoclastelor și inhibarea osteodiferențierii. Cumularea acestor mecanisme promovează resorbția osului alveolar. Adicional, mecanismele patogenice ale AGEs implică îndepărtarea ionilor de Ca^{2+} din dentină și precipitarea lor în tubulii dentinari. Astfel, fibrele de colagen sunt ranforsate iar tubulii dentinari obliterați, cu consecințe asupra durității tisulare. Lipsa nutrienților și a fluidelor datorată pierderii permeabilității tubulare duce la o creștere a riscului de fractură. Modificările de culoare, de la galben spre maroniu sunt dependente de timp și doză. Această discolorare poate fi asociată cu un nivel ridicat de acumulare a AGEs în dentină și pierderea grosimii smalțului prin funcționalizare sau condiții patologice ale aparatului dento-maxilar.

Unul din motivele pentru care evaluarea AGEs oferă credibilitate este stabilitatea lor chimică, odată ce reacțiile Maillard au fost încheiate. Sursa, localizarea din punct de vedere anatomic, procentul și nu în ultimul rând, prezența patologieilor asociate, au o influență majoră asupra rezultatului tratamentului asupra AGEs. Direcțiile curente sunt de a interveni în procesul de glicare în puncte cheie ale mecanismului de producere a AGEs, cu acțiune asupra receptorilor și a căilor specifice. O dietă restrictivă în ceea ce privește AGEs cu proveniență exogenă, însă bogată în nutrienți purificați- vitamine și antioxidanți naturali ar putea limita acumularea produșilor de glicare. Practicarea de activități fizice de intensitate scăzută sau ridicată pot reduce acumularea tisulară a AGEs, iar o deprindere constantă poate avea un efect de antiglicare și un rol protectiv în patologieile generale. Evaluarea și validarea AGEs ca biomarker în diagnosticarea metainflamației este oportună, datorită efectelor și a implicațiilor sale în bolile locale și sistemice.

Studiul 2- Acumularea N-epsilon carboxymethyllysine (CML) în țesuturi și organe variate în relație cu procesul de îmbătrânire. Stadiul actual al cunoașterii și studiu experimental pe model animal.

Rigiditatea vasculară crește odată cu vârsta și se asociază cu riscul cardiovascular înalt. Această rigiditate se datorează alterării fibrelor de colagen prin scăderea turnover-ului elastinei și colagenului, cu acumularea CML (care susține peroxidarea lipidică și transportul moleculelor metalice redox), mecanism care duce la crosslink-are a fibrelor de colagen tip IV, laminină. Pe model rodent, îmbătrânirea duce la o acumulare a CML în cortexul cerebral, mezencefal, hipocamp, corelate cu nivelul de stres oxidativ.

În studiile din literatura de specialitate, CML a fost mai consistent în fibrele de colagen insolubile, corelate cu vârsta și fragilitatea osoasă. Acumularea CML la nivelul colagenului s-a datorat expunerii fibrelor glucozei și formarea de fibre crosslinked care nu s-au resorbit pe parcursul metabolizării osoase. În cavitatea orală, nivele ridicate de CML au fost găsite în concentrație ridicată în patologii precum periimplantita sau boala parodontală. Au fost identificate modificări morfofuncționale la nivelul pulpei dentare și a fibrelor de colagen dentinare, alături de o creștere a durității dentinare și a fragilității, discolorații galben-maronii ale dentinei.

Îmbătrânirea este un proces complex care implică mecanisme patogenice multiple, având ca finalitate alterarea funcționalității și creșterea riscului de dezvoltare a patologieilor generale. Acumularea de substanțe nocive în celule și țesuturi, precum AGEs, accelerează declinul funcțional asociat cu îmbătrânirea. Luând în considerare faptul că CML, unul din reprezentanții majori ai AGEs, induce modificări ireversibile la nivelul proteinelor, și este implicat în diverse patologii legate de înaintarea în vârstă, scopul studiului a fost să evalueze expresia CML în țesuturile cavității orale și organe interne, pe model animal, asociat cu procesul de îmbătrânire.

Studiul a fost realizat pe model rodent Wistar, subdivizat pe categorii de vârstă în șoareci tineri și adulți, femele și masculi. Animalele au fost hrănite cu hrană peletată standard (20% proteine, 70% carbohidrați, 10% lipide) și apă *ad libitum*. Animalele au fost eutanasiate prin anestezie profundă cu eter și s-a practicat examinarea imunohistochimică (IHC)- marcarea cu un anticorp primar anti-carboxymethyl lysine NF-1G (Abcam, ab30917). S-au pregătit probe negative control pentru fiecare specimen, prin înlocuirea anticorpului primar cu IgG1 (Code X0931, Dako, Denmark).

Tehnica IHC evidențiat o distribuție variabilă a CML la nivelul țesuturilor și organelor. Expresia IHC a CML fost observată în citoplasma celulelor epiteliale, a celulelor endoteliale, celulele din țesutul conjunctiv (fibroblaști și celule inflamatorii) și asociată cu fibrele de collagen. În cavitatea orală, CML a prezentat o expresie difuză în mucoasa orală, țesutul dentar și parodontal.

În acord cu literatura de specialitate, expresia difuză și intensă a CML la nivelul structurilor tisulare este asociată proceselor inflamatorii cronice, diabet, îmbătrânire. În cazul indivizilor analizați în studiul de față, distribuția CML într-o manieră difuză și intensă a fost datorată vârstei înaintate a specimenelor. Studiul a investigat distribuția CML prin IHC pe o perioadă de timp determinată. Rezultatele noastre au indicat o corelație semnificativă între acumularea CML dependentă de vârstă, mai ales la nivelul celulelor epiteliale ($p < 0.01$) și a fibrelor de collagen ($p < 0.001$) în tegument și mucoasă orală. Ligamentul parodontal a prezentat o imunopozitivitate CML moderată, semnificativ mai mare la masculii adulți ($p < 0.05$) comparativ cu masculii tineri, probabil datorită componentei colagenice. Nu s-a găsit o acumulare semnificativă a CML dependent de timp la nivelul țesuturilor dentare și osului alveolar. Pentru obținerea de rezultate consistente și pentru a putea lua în considerare ca biomarkeri de precizie AGEs, viitoare studii vor trebui să demonstreze dacă expresia și acumularea CML la nivelul țesuturilor cavității bucale sunt influențate de nivelul salivar al CML.

Studiul 3 – Analiza CML în fluidele biologice asociat evaluării indirecte a proceselor de glicare la nivel tegumentar asistat ultrasonografic

Îmbătrânirea este un proces fiziologic care are loc în organismul uman, și duce la apariția senescenței (manifestarea clinică a îmbătrânirii), a declinului funcțiilor biologice și a capacității acestuia de a se adapta la stresul metabolic. Acest proces are la bază teorii genetice, biologice, imunologice, reacții cross-linked, de glicare, acumulare a stresului oxidativ. Glicarea este o reacție de glicozilare non-enzimatică a unui zahăr reducător de o structură proteică/lipidică, iar reacția de cross-link apare frecvent la nivelul structurilor fibrilare (collagen). Aceste reacții sunt direct asociate producției de AGEs.

Datorită procesului de glicare a fibrelor de collagen, AGEs pot fi vizualizate și cuantificate prin ultrasonografie (HFU). Conform literaturii de specialitate, a fost investigată legătura dintre diverși reprezentanți ai AGEs (CML, CEL, GOLD, MOLD, fructose-lysine) în fluidele biologice și autofluorescența tegumentară. După cunoștințele noastre, până în momentul de față, nu a fost evaluată legătura dintre CML salivar și a procesului de glicare la nivel tegumentar asistat ecografic prin US de frecvență înaltă.

Obiectivul studiului a fost de a evalua procesul de glicare, mai precis legătura dintre CML la nivelul biofluidelor din organismul uman (urină, salivă recoltată în mod neinvaziv nestimulat și după îndepărtarea mecanică a plăcii dentare) și la nivel tegumentar, prin intermediul ultrasonografiei de frecvență înaltă- High Frequency Ultrasonography (HFU), care permite evaluarea procesului de glicare în structurile în compoziția cărora intră fibrele de collagen. În studiul pilot au fost incluși 20 de pacienți. S-a realizat examinarea clinică exoorală și endoorală. Fiecare pacient a dat o probă de urină în dimineața înrolării. Au fost prelevate probe salivare prin mestecarea de bulete sterile din bumbac îmbibate cu acid citric (Salivette® Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Germany) timp de 2 minute înainte de periajul dentar și la 15 minute după îndepărtarea mecanică a plăcii dentare. Măsurătorile CML au fost realizate prin utilizarea unui potențostat Autolab PGSTAT 100 (Metrohm, Eco Chemie Netherlands) și un sistem de procesare specific Nova 1.10.4 software.

Acumularea tisulară a CML fost evaluate indirect prin intermediul HFU, utilizarea unui ecograf cu o frecvență utilizabilă de 22 Mhz (DUB@ cutis, Taberna Pro Medicum, Im Dorf, L€uneburg).

În ceea ce privește structurile regiunii zigomatice examinate ecografic, a fost găsită o corelație ridicată între profunzimea epidermului și CML salivar înainte de periaj dentar ($r= 0.508^*$), după periajul dentar ($r= 0.504^*$) și în urină ($r= 0.507^*$). A fost găsită o corelație medie inversă între grosimea țesutului celular subcutanat și CML salivar înainte de periaj dentar ($r= 0.469^*$) și în urină ($r= 0.452^*$). Nu au fost diferențe legate de sex în ceea ce privește profunzimea epidermului ($p=0.4$), numărul de pixeli ($p=0.7$), sau densitatea % ($p=0.1$). A fost identificată o corelație puternică între masa musculară și profunzimea dermului îmbătrânit ($r= 0.566^{**}$). În ceea ce privește structurile regiunii zigomatice examinate ecografic, a fost găsită o corelație ridicată între profunzimea epidermului și CML salivar înainte de periaj dentar ($r= 0.508^*$), după periajul dentar ($r= 0.504^*$) și în urină ($r= 0.507^*$).

Expresia CML la nivelul fluidelor biologice și a țesuturilor este asociată proceselor de metainflamație subclinică și îmbătrânire, sindrom metabolic (obezitate, diabet zaharat, tulburări cardiovasculare), senescență. Saliva poate reprezenta un fluid accesibil și ușor de recoltat pentru evaluare AGEs. Această evaluare poate fi completată de ecografia de rezonanță înaltă ca procedeu repetabil și non-invaziv, pentru evaluarea proceselor de glicare la nivel tegumentar, cât și mucus.

Concluzii generale

Bolile sistemice creează un mediu favorabil pentru producția de AGEs, prin alterarea răspunsului imun și activarea mediatorilor inflamatori. Western Diet, obiceiurile vicioase, vârsta și supraexpunerea la razele UV cresc și accelerează producția și depunerea AGEs.

Indiferent de sursa de proveniență, AGEs au asupra țesuturilor umane un efect negativ, dependent de doză și timp. Prin reacția de cross-link din etapele de formare, CML devin foarte stabili din punct de vedere chimic. Până în momentul de față, nu este cunoscut timpul 0 al formării și depozitării AGEs, important în înțelegerea metabolismului și efectelor produșilor de glicare.

Rolul AGEs în generarea proceselor de metainflamație demonstrează implicarea lor în generarea și agravarea patologiilor locale și generale. Interrelația dintre AGEs și patologia cavității bucale prezintă un domeniu de cercetare cu potențial ridicat. Evaluarea CML la nivel salivar poate reprezenta o metodă de evidențiere a stării de sănătate a structurilor cavității orale, dar de asemenea și a întregului organism.

Datorită legării fibrelor de colagen, procesul de glicozilare și AGEs pot fi evidențiați prin ecografie de frecvență înaltă. Această tehnică este foarte utilă în determinarea proceselor de îmbătrânire la nivelul extremității cervico-faciale, atât a structurilor tegumentare, cât și a celor mucoase, endooral.

Strategiile anti-AGEs actuale implică modificări ale dietei prin modularea metodelor de procesare a hranei, un stil de viață activ, pentru a crește mecanismele antioxidative, și nu în ultimul rând medicamente care să interfereze procesul de glicare.

Prepararea alimentelor la temperaturi scăzute, evitarea produselor care necesită fermentare și consumul de alimente cu proprietăți antioxidative pot aduce beneficii pentru starea de sănătate, printr-o restricție non-invazivă a input-ului de AGEs prin sursă exogenă, dar și a formării celor endogene, prin lipsa substratului și a stimulentei proinflamator.

Datorită stabilității lor în fluidele biologice, validarea AGEs ca biomarkeri, inclusiv AGEs salivari, ar putea reprezenta o nouă abordare în diagnosticul precoce și tratamentul bolilor legate de dietă, pentru o terapie eficientă și de lungă durată.

Evaluarea AGEs în timpul tratamentului stomatologic, prin recoltare non-invazivă a poate reprezenta o abordare inovativă în diagnosticul patologiilor corelate cu procesele de metainflamație, și pentru prognosticul protocoalelor de tratament propuse. Interdisciplinaritatea este imperioasă în design-ul terapiilor eficiente și

de durată. Medicii de medicină generală și dentară pot beneficia de informațiile date de cuantificarea AGEs, și coroborarea pentru o abordare holistică a ambelor tipuri de patologie.

ABSTRACT OF THE DOCTORAL THESIS

Advanced Glycation End products (AGEs) implications in oral pathology correlated to associated diseases

Doctoral candidate **Anida-Maria Băbțan**

Doctoral supervisor Prof.dr. **Radu Septimiu Câmpian**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

TABLE OF CONTENT

INTRODUCTION

CURRENT STATE OF KNOWLEDGE

1. Advanced Glycation End Products (AGEs)

- 1.1 AGEs formation
- 1.2 AGEs classification
 - 1.2.1. AGEs classification according to their provenience
 - 1.2.2. AGEs classification according to their fluorescent ability
 - 1.2.3. AGEs classification according to their cross-link ability
 - 1.2.4. AGEs classification according to their oxidative support
- 1.3 Metabolism AGEs influence, biological and tissue AGEs evaluation assays
 - 1.3.1. Osteoarticular AGEs influences and AGEReader's utility
 - 1.3.2. AGEs evaluation
- 1.4 Dietary AGEs implications in general pathology and metabolic syndrome
 - 1.4.1. AGEs interrelation with diet and metabolic syndrome
 - 1.4.2. AGEs interrelation with inflammatory degenerative pathology
 - 1.4.3. AGEs interrelation with cardiac disease
- 1.5 Dietary AGEs implication in oral pathology
 - 1.5.1. Dentine AGEs
 - 1.5.2. Dental pulp AGEs
 - 1.5.3. AGEs in implantology
 - 1.5.4. AGEs in periodontal tissue
 - 1.5.5. Salivary AGEs
 - 1.5.6. Oral cavity AGEs evaluation

2. Metainflammation skin and mucosa ultrasonography

- 2.1 Metainflammatory AGEs-related processes ultrasonographically evidenced
 - 2.1.1. Ultrasounds- background
 - 2.1.2. Ecography and metainflammation
- 2.2 Glycation and aging process ultrasound evidences
 - 2.2.1. Ultrasonographically sun-exposed skin features
 - 2.2.2. Ultrasonographically inferior lip mucosa features
 - 2.2.3. Ultrasonography- periapical inflammatory glycation process evaluation assay

PERSONAL CONTRIBUTION

1. Hypothesis

2. Study 1 –AGEs implications in oral and general pathology- literature review

- 2.1 Introduction
- 2.2 Hypothesis/objectives
- 2.3 Material and method
- 2.4 Results
- 2.5 Discussions
- 2.6 Conclusions

3. Study 2- Accumulation of N-epsilon carboxymethyllysine (CML) in various tissues and organs related to the aging process. Current state of knowledge and rodent model experimental study

- 3.1 Introduction
- 3.2 Hypothesis/objectives
- 3.3 Material and method
- 3.4 Results
- 3.5 Discussions
- 3.6 Conclusions

4. Study 3 – Analysis of CML in biological fluids associated with the indirect evaluation of the skin processes of glycation ultrasonographically assisted

4.1 Introduction

4.2 Hypothesis

4.3 Material and method

4.4 Results

4.5 Discussions

4.6 Conclusions

5. General discussions

6. General conclusions

7. Originality and thesis innovative contributions

REFERENCES

Key words: Advanced Glycation End Products (AGEs), N-epsilon carboxymethyllysine (CML), oral cavity, associated disease, salivary AGEs, biosensor

Current state of knowledge

Food is one of the human biological needs. Choosing a particular eating style is a choice of its own but influenced by both individual factors and social norms and practices, which can play a decisive role in the type of healthy or unhealthy diet. Educational level and income are the main determinants of both the choice of diet and the behavior that determines a diet or certain diet-related diseases. This is evidenced by the high level of poor health among low-income people, and vulnerable groups in countries facing social inequality. In this context, it is clear that the choice of food is not only related to individual preferences and rather constrained by economic and social factors. People with low incomes tend to have an unbalanced diet and low fruit consumption. A balanced diet means access, knowledge and financial resources. Their lack has led to the development of the fast food and snack-ing market, accessible through the rapid preparation and packing, but poor in nutrients.

Foods, order to be obtained in a short time, are processed at high temperatures. These procedures involve roasting, rotating, grilling, baking, and often reheating before the actual consumption. During their production, Maillard compounds (or AGEs (Advanced Glycation End Products))- a series of compounds formed by the non-enzymatic glycosylation reaction between carbohydrates with reducing properties and proteins, to which is also added lipid peroxidation. Due to their properties- easy to obtain, taste and pleasing appearance, food compounds containing AGEs are widely consumed. AGEs are associated with oxidative stress, progression and aggravation of inflammatory and degenerative diseases (atherosclerosis, diabetes, renal failure). The chemical reaction associated to AGEs is glycation. Glycation occurs spontaneously between chemical compounds (amino acids, lipids, carbohydrates) and collagen fibers, by non-enzymatic glycosylation, and the clinical manifestation is elastosis (loss of skin elasticity, impaired collagen production. The bioavailability of AGEs has been investigated in animal and human model studies, but there are major differences between results, in terms of percentage of absorption (1-10%), tissue storage and renal (10-33%) or fecal (20-) 33%). Exposure to dietary AGEs is supplemented by other exogenous (UV, tobacco, microwave) or endogenous sources (oxidative stress, hyperglycemia). One of the most representative compounds of AGEs is N ϵ -(Carboxymethyl) lysine (CML), investigated both in nutrients and in the human body.

The Maillard reaction (in order to obtain AGEs) is associated with the flavor and appearance of foods, but also with the production of oxidative stress, chronic cellular alteration, early aging by cross-linking collagen fibers, generating a chronic inflammation state, or maintaining a pre-existing one. They are correlated with the development and maintenance of diseases known to be part of the metabolic syndrome (high blood pressure, dyslipidaemia, diabetes and obesity).

With the process of aging, the thickness of the dermis decreases and the collagen and elastin fibers atrophy, a different mechanism in obese people, where the dermis increases in size and the collagen network becomes disorganized. The collagen fibers are affected in the structures of the oral cavity by disrupting the integrity of the mobile and fixed oral mucosa, their degree of regeneration, expanding the incidence of mucosal lesions such as angular cheilitis, mouth sores, mouth burn syndrome.

The relationship dependent on dose (amount of food) and time, is manifested by increasing the friability of the enamel and dentine, the collagen destruction in the periodontal fibers and the activation of the osteoclasts. Thus, it favors the loss of hard structures and the alteration of the soft ones, with evolution towards carious pathology and periodontal disease. Collagen has the property of being fluorescent through the tyrosine component, and thus can be ultrasonically evidenced by High Frequency Ultrasonography. The skin density can be used to quantify the health of the skin, to evaluate the degeneration and regeneration given by de novo synthesis of collagen fibers, ultrasonically highlighted by increasing the density of the dermal density. By highlighting collagen fibers, High Frequency Ultrasonography is useful in studying the glycation process related to AGEs and correlating the process in the skin and mucosal structures with those in biofluids and organs.

Hypothesis. Objectives

AGEs have a diverse origin (exogenous and endogenous). The production reactions of them lead to high chemical stability in the human body of AGEs. Once bound to the structures in the extracellular matrix, but especially to the collagen fibers, it creates cross-link bridges, which disbalance the normal cellular function. Moreover, AGEs induce skin elastosis (aging), activate inflammatory mechanisms and are a trigger factor for

diet-related diseases. These negative effects are directly proportional to the time and quantity of AGEs. Taking into account the mentioned aspects, the present paper aimed to present important evidences on the types of AGEs, of the pathogenesis, the bioavailability of these products, the interrelation with the general pathologies related to the diet, but also those of the oral cavity. The paper aimed to highlight the aging phenomenon determined by diet and time by administering oral AGEs (CML) in rodent model. The pilot study on the human cohort started from the innovative idea of determining CML in biofluids with the help of an electrochemical biosensor, which provides real-time data on the values of the glycation products. Accumulation of AGEs at the tegument level generates elastosis (epidermal, dermal stiffening, decreased density and elasticity), which can be evaluated by means of ultrasound. Starting from this premise, the aim was to investigate the association between CML values in biofluids with those obtained by evaluating the tegument (from the zygomatic region) ultrasonographically assisted with high frequency ultrasonography. The techniques used can represent an innovative and non-invasive approach in the screening of patients with general and dental pathology, in the early and rapid diagnosis of metainflammation, which may be helpful in creating and implementing strategies for the prevention and treatment of diet-related diseases.

Study 1 - Implications of AGEs in oral and general pathology - review of the profiled literature

The first study represents a literature review and aims to reveal the aspects related to the sources, the mechanism of action, the involvement in systemic and dietary diseases, the aging process of AGEs. An innovative approach based on salivary AGEs as biomarkers of the inflammatory process as well as methods of reducing AGEs tested *in vivo* or *in vitro* will be presented.

The source of the AGEs may be exogenous or endogenous. The exogenous provenance is mainly due to the consumption of cooked foods in the short term and at high temperatures, Fast-food (Western Diet), baked pastries, exposure to ultraviolet (UV) radiation, tobacco consumption, microwave heating. Endogenous AGEs are formed under conditions of hyperglycemia, oxidative stress, associated with diabetes. Cigarette smoke, through its nicotine and nornicotine content, stimulates the tissue expression of AGEs. Due to the short half-life of nicotine (20-30 min) and the high bioavailability after inhalation consumption, AGEs are formed within a few hours, compared to those with food origin, formed within 4-6 weeks, and once they are in circulation, they bind to the collagen fibers in the connective tissue, leading to tissue's stiffness.

CML effects are receptor-mediated (AGE-R1 / OST-48, AGE-R2 / 80K-H, AGE-R3 / galectin-3), scavenger receptors (SR-A, SR-B: CD36, SR-BI, SR -E: LOX-1; FEEL-1; FEEL-2), depending on the target tissue. The AGE-RAGE interaction activates NADPH-oxidase, which promotes the inflammatory pathway NF- κ B, followed by hyperexpression of oxidative stress markers iNOS and levels raised by ONOO⁻.

AGEs are considered to be biomarkers of the aging process, due to the continuous accumulation in biological fluids and tissues. It is considered that AGEs play a role in aging because they accumulate in the collagen and elastin fibers in the extracellular matrix, affecting its elasticity. AGEs affect intracellular function through protein glycation, and through AGE-RAGE interaction they activate inflammatory pathways. There is an endogenous mechanism of AGEs-induced obesity-dependent RAGE. A high-calorie diet does not only lead to obesity, but also affects cognitive function and memory. Considering that AGEs are predominantly derived from reducing sugars, neurological disorders could be associated with high carbohydrate intake - a form of non-diabetic hyperglycemia, and instead of these sugars being used as a neural energy substrate, they are transformed into dAGEs and induce neuronal dysfunction, with negative effects on cognitive functions. Regardless of the source of origin, AGEs reach the level of the dental pulp through blood flow, through the shrinkage fluid and diffusion through the dento-periodontal support structures. AGEs act by inflammatory mechanism and induce membrane hyperpermeability, with negative effect on collagen fibers, reduction of osteoblast synthesis, color changes and hardness of dental tissues.

From the dental pulp, AGEs reach the level of the dentinal tubules, the intertubular and predentinal surface, where the cross-linking reaction of the collagen fibers takes place. In the fibers of the periodontal ligament, AGEs lead to collagen dissolution, loss of attachment, and also activate osteoclast activity and inhibition of osteodifferentiation. The accumulation of these mechanisms promotes the resorption of the alveolar bone. Additionally, the pathogenic mechanisms of AGEs involve removal of Ca²⁺ ions from the dentin and precipitation in the dentinal tubules. Thus, the collagen fibers are reinforced and the dentinal tubes obliterated, with consequences on tissue's hardness. The lack of nutrients and fluids due to the loss of tubular

permeability leads to an increased risk of fracture. Color changes from yellow to brown are time and dose dependent. This discoloration may be associated with a high level of accumulation of AGEs in dentin and the loss of enamel thickness through functionalization or pathological conditions of the dento-maxillary apparatus.

One of the reasons why the assessment of AGEs provides credibility is their chemical stability, once the Maillard reactions have been completed. The source, the anatomical localization, the percentage and last but not least, the presence of the associated pathologies, have a major influence on the treatment outcome on AGEs. The current directions are to intervene in the process of glycation at key points of the mechanism of production of AGEs, with action on the specific receptors and pathways. A restrictive diet for AGEs of exogenous origin, but rich in purified nutrients - vitamins and natural antioxidants could limit the accumulation of glycation products. Practicing low or high intensity physical activity may reduce the tissue accumulation of AGEs. Constant physical activity can have an anti-glycative effect and a protective role in general pathologies. The assessment and validation of AGEs as a biomarker in the diagnosis of meta-inflammation is appropriate, due to its effects and implications in local and systemic diseases.

Study 2- Accumulation of N-epsilon carboxymethyllysine (CML) in various tissues and organs related to the aging process. Current state of knowledge and rodent model experimental study.

Vascular rigidity increases with age and is associated with high cardiovascular risk. This stiffness is due to the alteration of the collagen fibers by decreasing the turnover of elastin and collagen, with the accumulation of CML (which supports lipid peroxidation and the transport of redox metal molecules), a mechanism that leads to the crosslinking of type IV collagen fibers, laminin. On rodent model studies, aging leads to accumulation of CML in the cerebral cortex, mesencephaly, hippocampus, correlated with the level of oxidative stress. In the literature studies, CML was more consistent in insoluble collagen fibers, correlated with age and bone fragility. The accumulation of CML in the collagen level was due to the exposure of glucose fibers and the formation of crosslinked fibers that did not resorb during bone metabolism. In the oral cavity, high levels of CML have been found in high concentrations in pathologies such as peri-implantitis or periodontal disease.

Aging is a complex process that involves multiple pathogenic mechanisms, with the purpose of altering the functionality and increasing the risk of developing general pathologies. Accumulation of harmful substances in cells and tissues, such as AGEs, accelerates the functional decline associated with aging. Considering that CML, one of the major representatives of AGEs, induces irreversible changes in proteins, and is involved in various pathologies related to aging, the purpose of the study was to evaluate the expression of CML in the tissues of the oral cavity and internal organs, on animal model, associated with the aging process.

The study was carried out on rodent model Wistar, subdivided by age categories into young and adult mice, females and males. The animals were fed standard pelleted feed (20% protein, 70% carbohydrate, 10% fat) and water ad libitum. The animals were euthanized by deep ether anesthesia and immunohistochemical examination (IHC) was performed - staining with a primary anti-carboxymethyl lysine NF-1G antibody (Abcam, ab30917). Negative control samples were prepared for each specimen by replacing the primary antibody with rodent IgG1 (Code X0931, Dako, Denmark).

The IHC technique revealed a variable distribution of CML at the level of tissues and organs. IHC expression of CML has been observed in the cytoplasm of epithelial cells, endothelial cells, cells in connective tissue (fibroblasts and inflammatory cells) and associated with collagen fibers. In the oral cavity, CML showed diffuse expression in the oral mucosa, dental and periodontal tissue.

According to the literature, diffuse and intense expression of CML at the level of tissue structures is associated with chronic inflammatory processes, diabetes, aging. In the case of the individuals analyzed in the present study, the distribution of CML in a diffuse and intense manner was due to the advanced age of the specimens.

The study investigated the distribution of CML by IHC over a specific time period. Our results indicated a significant correlation between age-dependent CML accumulation, especially in epithelial cells ($p < 0.01$) and collagen fibers ($p < 0.001$) in the tegument and oral mucosa. The periodontal ligament exhibited moderate CML immunopositivity, significantly higher in adult males ($p < 0.05$) compared to young males, probably due to the collagen component. No significant time-dependent accumulation of CML was found in the dental tissues and alveolar bone. In order to obtain consistent results and to be considered as precision biomarkers of AGEs, future

studies will need to demonstrate whether CML expression and accumulation in the tissues of the oral cavity are influenced by the salivary level of CML.

Study 3 - Analysis of CML in biological fluids associated with the indirect evaluation of the skin processes of glycation ultrasonographically assisted

Aging is a physiological process that occurs in the human body, leading to the appearance of senescence (the clinical manifestation of aging), the decline of biological functions and its ability to adapt to metabolic stress. This process is based on genetic, biological, immunological theories, cross-linked reactions, glycation, oxidative stress accumulation. Glycation is a non-enzymatic glycosylation reaction of a sugar-reducing protein/lipid structure, and the cross-linking reaction frequently occurs in fibrillar (collagen) structures. These reactions are directly associated with the production of AGEs.

Due to the process of glycation of collagen fibers, AGEs can be visualized and quantified by ultrasonography (HFU). According to the literature, the connection between the various representatives of AGEs (CML, CEL, GOLD, MOLD, fructose-lysine) in biological fluids and tegumentary autofluorescence was investigated. To our knowledge, to date, the link between salivary CML and the skin ultrasound-assisted process through US high frequency has not been evaluated.

The objective of the study was to evaluate the glycation process, more precisely the connection between CML in the level of biofluids in the human body (urine, non-invasively collected saliva unstimulated and after mechanical removal of the dental plate) and at the skin level, by means of HFU, which allows the evaluation of the glycation process in the structures in which the collagen fibers enter.

The pilot study included 20 patients. Exooral and endooral clinical examination was performed. Each patient gave a urine sample in the morning of enrollment. Salivary samples were taken by chewing sterile cotton balls soaked with citric acid (Salivette® Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Germany) for 2 minutes before teeth brushing (unstimulated saliva) and 15 minutes after teeth brushing. dental. CML measurements were performed using an Autolab PGSTAT 100 potentiostat (Metrohm, Eco Chemie Netherlands) and a Nova 1.10.4 software-specific processing system.

Tissue accumulation of CML was assessed indirectly through HFU, using an ultrasound with a usable frequency of 22 MHz (DUB® cutis, Taverna Pro Medicum, ImDorf, Lüneburg).

Regarding the structures of the zygomatic region examined ultrasound, a high correlation was found between epidermal depth and salivary CML before dental brushing ($r = 0.508^*$), after dental brushing ($r = 0.504^*$) and in urine ($r = 0.507^*$). A moderate inverse correlation was found between subcutaneous cell tissue thickness and salivary CML before tooth brushing ($r = 0.469^*$) and in urine ($r = 0.452^*$). There were no gender-related differences in epidermal depth ($p = 0.4$), number of pixels ($p = 0.7$), or density ($p = 0.1$). A strong correlation between muscle mass and depth of the aged dermis was identified ($r = 0.566^{**}$). Regarding the structures of the zygomatic region examined ultrasound, a high correlation was found between epidermal depth and salivary CML before dental brushing ($r = 0.508^*$), after dental brushing ($r = 0.504^*$) and in urine ($r = 0.507^*$). A mean inverse correlation was found between subcutaneous cell tissue thickness and salivary CML before tooth brushing ($r = 0.469^*$) and in urine ($r = 0.452^*$).

CML expression in biological fluids and tissues is associated with subclinical and inflammatory processes, metabolic syndrome (obesity, diabetes, cardiovascular disorders), senescence. Saliva can be an accessible and easy-to-harvest fluid for evaluation of AGEs. This evaluation can be supplemented by high-resonance ultrasound as a repeatable and non-invasive procedure for evaluating the glycation processes at the skin level, as well as the mucosa.

General conclusions

Systemic diseases create a favorable environment for the production of AGEs, by altering the immune response and activating inflammatory mediators. Western Diet, vicious habits, age and overexposure to UV increase and accelerate the production and deposition of AGEs.

Regardless of the source of origin, AGEs have a negative effect, dose and time-dependent on human tissues. Through the cross-link reaction of the formation steps, CML becomes very stable chemically. So far, the time 0 of AGEs formation and storage is not known, important in understanding the metabolism and effects of glycation products.

The role of AGEs in generating the processes of meta-inflammation demonstrates their involvement in the generation and aggravation of local and general pathologies. The interrelation between AGEs and oral cavity pathology has a high potential for research.

The CML assessment at the salivary level can be a method of highlighting the health status of the structures of the oral cavity, but also of the entire organism.

Due to the binding to collagen fibers, the glycosylation process and AGEs can be highlighted by high frequency ultrasound. This technique is very useful in determining the aging processes at the level of the cervico-facial extremity, both of the skin and mucosal structures.

Current anti-AGEs strategies involve changes in the diet by modulating food processing methods, an active lifestyle, to increase antioxidative mechanisms, and last but not least, drugs that interfere with the glycation process.

Preparing foods at low temperatures, avoiding products that require fermentation and consuming foods with antioxidative properties can bring health benefits, through a non-invasive restriction of the input of AGEs through exogenous source, but also from the formation of endogenous ones, by lack of substrate and pro-inflammatory stimulant.

Due to their stability in biological fluids, the validation of AGEs as biomarkers, including salivary AGEs, could represent a new approach in the early diagnosis and treatment of diet-related diseases, for effective and long-term therapy.

The evaluation of AGEs during the dental treatment, by non-invasive harvesting may represent an innovative approach in the diagnosis of pathologies related to the processes of meta-inflammation, and for the prognosis of the proposed treatment protocols.

Interdisciplinarity is imperative in the design of effective and lasting therapies. General and dental practitioners can benefit from the information provided by quantifying AGEs and collaborating for a holistic approach to both types of pathology.