НИВОТО НА IL2 И IL12 ВО ГИНГИВАЛНО ТКИВО ВО ТЕК НА ПАРОДОНТАЛНАТА БОЛЕСТ КАЈ РАЗЛИЧЕН СТЕПЕН НА ПАРОДОНТАЛНА ДЕСТРУКЦИЈА

Пандилова М., Ставревска-Миновска А., Спировски М., Трајковски Д.

СТОМАТОЛОШКИ ФАКУЛТЕТ - Скопје, Клиника за болести на устата и пародонтот

Апстракт

Цитокините се примарно одговорни за текот на пародонталната болест, пред сè поради нивната улога како молекуларни медијатори кои ја насочуваат и регулираат инфламацијата. Од големиот број на различни цитокини, значаен удел во хроничните инфламаторни процеси за време на пародонталната болест имаат интерлеукините, за кои се знае дека носат комплексни и често детални пораки помеѓу леукоцитите. Улогата на некои цитокини во тек на пародонталната болест се детално испитани како IL1 и IL6, но улогата на останатите останува сè уште непозната. Целта на нашето испитување беше да се утврди нивото на IL2, IL12 и С реактивните протеини во гингивалното ткиво од региı со различно изразен губиток на атачмент the. За таа цел во испитувањето беа вклучени 30 пациенти на возраст од 20 до 40 години при што кај сите беа регистрирани региı со здрав пародонт. Од пациентите беше земен исечок од гингива, како од испитуваната регија така и од здравата регија. Земеното ткиво беше замрзнато на -80 °С. Во замрзнатите исечоци со ELISA методата беше барано присуството на IL2, IL12, како и нивото на С-реактивните за што беше користена нефелометриска метода.

По анализата на добиените резултати можевме да ги изведеме следните заклучоци: Добиените резултати од испитувањето на цитокините покажаа сигнификантен пораст на IL2 напоредно со зголемувањето на апикалната миграција на прилојниот епител, нивоата на IL12 опаѓаа со напредувањето на губитокот на атачменот , додека нивото на С реактивните протеини не покажа статистички значајни промени.

Клуни зборови: пародонтопатија, патогенеза, цитокини

Вовед

Базичните принципи на етиопатогенезата на хроничната пародонтална болест не потсетуваат дека нејзината експресија е комбинација на ткивни, микробни и амбиентарни фактори. Хистолошките студии на пародонтопатично афецираните ткивни структури докажуваат присуство на различни популации на инфламаторни клетки, кои синтетизираат голем број на макромолекули. Индивидуално или заедно, овие макромолекули партиципираат како во резолуцијата, така и во деструкцијата на ткивата. Во литературата се сретнуваат голем број студии кои укажуваат на тоа дека цитокините се примарно одговорни за текот на болеста (6,20), пред сè поради нивната улога како мо-

лекуларни медијатори кои ја насочуваат и регулираат инфламацијата. Од големиот број на различни цитокини, значаен удел во хроничните инфламаторни процеси за време на пародонталната болест имаат интерлеукините, за кои се знае дека носат комплексни и често детални пораки помеѓу леукоцитите (8, 9, 19, 21).

Првите цитокини кои биле детектирани, потекнувале од лимфоцитите и биле наречени лимфокини или интерлеукини. Цитокините ослободени во најраните стадиуми на инфекцијата овозможуваат детерминирање на типот на консеквентниот имунолошки одговор. Според експресијата на цитокината продукција, CD4+Thellper клетките или Th клетките, се поделени во неколку субсетови, кои имаат клучна улога во организација на имунолошкиот одговор.

Различните субсетови на Th клетките ги модулираат различните типови на клеточна кооперација, одредувајќи ја на тој начин како специфичноста, така и механизмот на целуларниот одговор. Th клетките кои воопшто не биле стимулирани, продуцираат само IL12 и се означени како Th p.

При краткотрајна дразба Th клетките продуцираат бројни цитокини и истите се означени како Th0 клетки. Хроничната стимулација доведува до диференцијација на Th1 и Th2 субсетови, во зависност од цитокините кои ги продуцираат. Th1 клетките продуцираат IL2 IL12 интерферон. Th2 клетките продуцираат IL4 IL15 IL6 IL10.

Улогата на некои цитокини во текот на пародонталната болест се детално испитани како IL1 и IL6, но улогата на останатите останува сè уште непозната. Целта на нашето испитување беше да се утврди нивото на IL2, IL12 и С реактивните протеини во гингивалното ткиво од регии со различно изразен губиток на атачмент.

Материјал и метода на работа

Испитувањето опфати вкупно 30 пациенти кои ги задоволија следните критериуми:

- возраст меѓу дваесет и четириесет години;
- отсуство на било какви општи заболувања;
- клинички дијагностицирана адултна пародонтопатија според критериумите на Американската академија за пародонтологија (1) односно присуство на хроничен гингивит, крварење на сондирање, присуство на пародонтален џеб поголем или еднаков на 3мм
- кај пациентите клинички беа регистрирани и регии со здрав пародонт;
- нивото на маргиналната гингива беше над, или во нивото на цементно емаиловата граница.

Кај сите пациенти степенот на губитокот на атачмент беше одредуван со градуирана пародонтолошка сонда, со тоа што мерењата беа вршени во пределот на интерденталната папила почнувајќи од цементноемајловата граница .

Според степенот на губиток на атачмент, пациентите беа групирани во три групи користејќи го индексот по Ramfjord (16) и тоа:

Прва група од 10 пациенти кај кои беше нотиран губиток на атачмент до 3мм

Втора група од 10 пациенти кај кои беше нотиран губиток на атачмент од 3 до 6мм

Трета група од 10 пациенти кај кои беше нотиран губиток на атачмент поголем од 6 мм

Кај сите пациенти беше земен исечок од гингивата од соодветната регија, како и од здравиот гингивално ткивен супстрат.

Исечоците беа замрзнати на -80 степени и по хомогенизација на ткивото беа извршени следните анализи:

Одредување на С реактивните протеини со помош на имунонефелометриска метода.

Одредување на IL2, и IL12 во гингивалното ткиво со помош на ELISA методата.

Метода за квантитативно одредување на цитокините во ткивен хомогенат

Принцип на едностепена ELISA-метода со двоен сендвич за одредување на цитокини.

За оваа цел беше применуван високо сензибилниот хуман ELISA систем Biotrak™ од Amersham Pharmacia Biotech.

Принципот на изведување на методата се состои во тоа што sидовите на алвеолите на фабрички подготвената плоча се обложени со антителото специфично за бараниот цитокин. Потоа, одредено количество од ткивниот хомогенат се пипетира во алвеолите. Доколку е присутен испитуваниот цитокин, се врзува за специфичното антитело имобилизирано на зидовите од алвеолата. Во понатамошната постапка биотинилизирано специфично антитело се додава во алвеолите со цел да се поврзе со претходно создадените комлекси на испитуваниот цитокин и имобилизираното антитело на sидовите од алвеолите. По испирањето на неврзаниот дел од биотинилизираното специфично антитело се додава Amdex реагенс за амплификација по што се додава супстрат со помош на кој се развива одредена боја, која е во директна пропорција со количеството на цитокин кој бил поврзан на почетокот на постапката. За да се одреди концентрацијата, истовремено се прават проби со позната концентрација, кои служат да се изработи крива на која се отчитува оптичката густина на обојувањето и концентрацијата. Со споредување на добиените густини и обојувања, се одредува концентрацијата на испитуваниот цитокин.

Нефелометриска метода за одредување на С реактивните протеини

За оваа цел беше користен Turbiquant® системот.

Принципот на методата се заснова на афинитетот на создавање на имунохемиска реакција помеѓу испитуваните протеини во хомогенатот и специфичните антитела на реагенсот, при што се формираат имунокомплекси. Заматувањето кое се создава во реакцијата се мери фотометриски. Добиените концентрации се одредуваат со одредување на максималната брзина на заматувањето на формирањето на преципитати и времето за кое се постигнува максималното заматување. Со споредување на овие два параметри со стандардизираните криви се добива испитуваната концентрација.

Статистичка обработка на податоците

За статистичката обработка на податоците беше користен компјутерскиот програм Statistika 6,0. Анализата на добиените статистички серии е направена со користење на:

- Студентовата т дистрибуција со цел да се видат разликите меѓу здравите исечоци и испитуваните
- Анализа на варијанси со цел да се видат варијациите во самите групи
- Pearson i Spearman коефициент на корелација за да се видат односите меѓу испитуваните параметри.

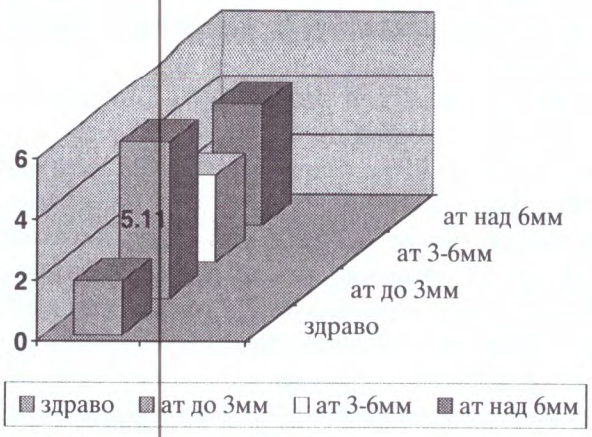
Резултати

По извршената статистичка анализа ги добивме следните резултати:

- За здраво ткиво просечната вредност на за IL2 изнесуваше 1,763±1,1 5177 пикограм на милиграм ткиво, додека за губиток на атачмент до 3мм - 5,11±0,8659, за губиток на атачмент од 3 до 6мм - 2,8112±2,6344, за губиток на атачмент поголем од 6мм - 3,976±2,72635. Статистичка сигнификантност покажа разликата на вредности помеѓу здраво ткиво и вредностите за губиток на атачмент до 3мм (p=0,05) како и здраво и губиток на атачмент над 6мм (p=0,0295). Добиените резултати се графички прикажани на графикон 1.

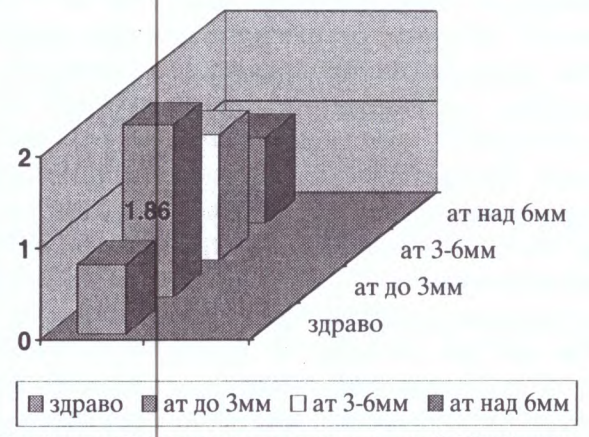
По извршената статистичка анализа за IL12 ги добивме следните резултати:

- За здраво ткиво просечната вредност за IL12 изнесуваше 0,7553±1,15 пикограм на милиграм ткиво, додека за губиток на атачмент до 3мм -1,863±1,18, за губиток на атачмент од 3 до 6мм -1,373±1,16 за губиток на атачмент поголем од 6мм -0,93±1,071. Статистичка сигнификантност не покажа само втората и третата група, додека првата група покажа статистички сигнификантна раз-



***Графикон 1** Просечни вредности за IL2 кај пациентите со различно изразен губиток на атачмент*

лика во однос на здравото (p=0,017). Добиените резултати се графички прикажани на графикон 2.



***Графикон 2** Просечни вредности за IL12 кај пациентите со различно изразен губиток на атачмент*

Во нашето испитување беше зацртано и да се проследат ткивните концентрации на С реактивните протеини. За сите исечоци добивме вредности помали од о,о5 мг на dl ткиво, при што ниедна вредност не покажа отстапување од нормалните вредности.

Дискусија

Цитокините се моќни хормони кои дејствуваат во многу мали концентрации во рангот на нано или пикомолари, па дури и помалку. Клетките во најголема мера се приспособуваат на надворешните услови, преку промената во експресијата на мембранските рецептори за цитокините. Регулаторните молекули кои сè уште на се докрај откриени, различните класи на мембрански рецептори, инхибиторните молекули и плеотропните дејства на цитокините, овозможуваат формирање на комплексна цитокина мрежа. Поврзувањето на цитокините за одредени класи на рецептори на клеточната мембрана, условува активација на интерцелуларни настани. Тој процес е наречен мембранска трансдукција на сигнали. Бактериите, од друга страна, имаат високо развиени модулаторни механизми, па така одредени бактерии имаат можност да продуцираат молекули кои наликуваат на цитокините, предизвикувајќи на тој начин абнормални инфламаторни реакции, кои го овозможуваат нивното преживување. Покрај ваквите генерални обележја, секој поединечен цитокин има и свои специфичности и различна улога во тек на пародонтопатијата.

Цитокините се продуцираат локално во самото ткиво, дејствуваат и се разложуваат во ткивото, иако, во одредени ситуации на хронично перзистирање на дразбата, можно е рецепторите да се заситат и да настане системско разлевање на цитокините. Понатаму, авторот укажува дека цитокините не се скаладираат во гранули или вакуоли, туку најчесто се наогаат како прекурзорни mRNA молекули. Едно од антиинфламаторните својства на стероидите е овозможено преку способноста на деградација на овие молекули.

IL2 се излачува за време на антигенската презентација од моноцитите како и за време на активацијата на Т клетките. IL2 ја стимулира Т клеточната диференцијација и митотичната експанзија на антиген специфични клонови на овие клетки. Под дејство на континуирана секреција на IL2 од страна на моноцитите, како и присуство на антигенот, ја стимулираат секрецијата на останатите интерлеукини, кои ја поттикнуваат В клеточната диференцијација.

Нашите резултати покажаа сигнификантни разлики во однос на здравото ткиво и

ткивото кое одговараше на губиток на атачмент до 3мм како и за ткивото кое одговараше на губиток на атачмент поголем од 6мм.

Повеќето автори известуваат за отсуство на IL2 во тек на пародонтопатијата. Pilon(14) утврдил намалени количества на IL2 во гингвалниот сулкус од регии со пародонтална деструкција, за разлика од здравите региите. Fujihashi(5) докажал дека гингивалните моноцити од региите зафатени со пародонтопатија продуцираат IL4 IL5 но не и IL2, Интересна е и студијата на Gemmel(6) кој со помош на интрацитоплазматска имунофлуоресцентна техника го детектирал присуството на IL2 и IL4 позитивни клетки во пародонталното ткиво веднаш по екстракција и по стимулација со P gingivalis i F nucleatum.

Веднаш по екстракцијата не се најдени IL2 и IL4 позитивни клетки во пародонталното ткиво. По стимулација со споменатите бактерии по истекот на 1 ден IL4 позитивни клетки покажале пораст , додека првите IL2 позитивните клетки биле забележани по истекот на третиот ден. Авторот укажува на можноста здружената инфекција на овие периопатогени бактерии да предизвикува Th2 клеточна профил. Студиите од понов датум потврдуваат отсуство на mRna за IL2 како и за IL4 во гингивалните мононуклеарни клетки (4) Тешко може да се објасни отсуството на IL2 во самото ткиво, за кое известуваат одделни автори, особено ако се проследат и следните наоди: IL2 е најден како во гингивалниот флуид кај регии со пародонтална афекција (2) , така и во серумот на пациенти со пародонтопатија (11). Нестимулираните лимфоцити изолирани од хронични инфламирана гингива продуцираат IL2 (17) во in vitro услови. Исто така, IL2 се продуцира и по стимулација на гингивалните моноцити со периопатогени бактерии (10). Активните фази на адултната пародонтопатија се поврзани во најголем дел со B клеточна инфилтрација од кои некаде и над 50% се плазма клетки (13, 17,18). Улогата на IL2 во B клеточната регулација е повеќе од потврдена со тоа што учествува во диференцијацијата на активираните B клетки во Ig секреторни клетки (12). Понатаму, поликлоналните активатори на B клетките кои потекнуваат од денталниот плак (липополисахаридите, лецитини, гликокортикоиди, наелектризираните карбохидрати и самите бактерии) ја искажуваат својата активност во присуство на IL2 иIL6(15). Отсуството на IL2 кое го утврдиле некои автори го прави тешко прифатлив фактот за доминација на B клетките во активните пародонтални лезии.

Директна поткрепа на нашиот наод за зголемено присуство на IL2 во ткивата кои одговараат различен губиток на атачмент, како и на различно изразена гингивална рецесија, даваат и поновите наоди на Prabhu (15), кој нашол експресија на mRna за IL2 и кај здрави и кај заболени ткива.

Во сите исечоци, и од здраво ткиво и од заболено ткиво, најдовме присуство на IL12 со тоа што вредностите во заболените ткива беа сигнификантно повисоки од здравите, меѓутоа со напредувањето на губиток на атачментот, покажаа опаѓање на вредностите. Поткрепа на нашите наоди најдовме во единствената достапна студија за присуството на IL12 согледана со прогресијата на пародонтопатијата (3) каде како и во нашите резултати, IL12 бележи пад напореден со губитокот на атачментот. Достапни се голем број на студии каде е најдена експресија на mRna за IL12 во гингивалните моноците од хронично инфламирана гингива кои, исто така, даваат потврда на нашиот наод. Наодот за намалување на вредностите на IL12 напоредно со прогредирањето на пародонталната лезија ја поткрепува тезата за поврзаноста на предоминација на Th2 клеточниот профил со прогресијата на пародонтопатијата и ја отвара можноста за одредена регулаторна улога на IL12 во ваквите настани. Намалените концентрации на IL12 во региите со најголем губиток на атачмент и најмногу изразена гингивална рецесија, возможно е да го оневозможуваат преминот во Th1 клеточна доминација на лезијата.

Детекцијата на одредени цитокини ја презедовме од неколку причини. Познавање-

то на цитокините и нивното учество во пародонталната болест се делумно разбрани

Брзиот прогрес во осознавање и разбирањето на цитокините изгледа дека го помести разбирањето на патогенезата на пародонтопатијата, од претходно дефинирана како дисрегулација на имунолошкиот систем, во сега, сè почесто разгледувана како високо функционален и координиран механизам на ампутација на сврзното ткиво со една единствена цел да се спречи системска инфекција, (7). Гледајќи ги збиднувањата од поширока перспектива, зачувувањето на животот е немерливо позначајно од зачувувањето на дентицијата. Губитокот на коската е спор и така дизајниран да ја одржи дентицијата до крајот на човековиот живот, кој до пред 200 години изнесувал просечно 35 до 40 год. Продолжувањето на човековиот животен век и потребата од подолготрајно зачувување на забите, ја наметнаа потребата од подобро разбирање на улогата на имуниот систем и неговата улога во тек на пародонтопатијата, пред сè, со цел да се изнајдат прецизни дијагностички методи кои ќе ја одредат активноста на болеста како и стратегии на терапија кои ќе бидат засновани на разбирањето за индивидуалната суспектибилност кон болеста.

Заклучок

Следејќи ги поставените цели, по анализата на добиените резултати од испитувањето можеме да ги изведеме следните заклучоци:

- IL 12 покажа сигнификантно опаѓање со напредување на апикалната миграција на припојниот епител.
- IL2 покажа присуство во сите исечоци како и сигнификантен пораст како во однос на здравото ткиво така и напоредно со напредување на апикалната миграција на припојниот епител.

LEVELS OF IL2 AND IL12 IN GINGIVAL TISSUE FROM SITES WITH DIFFERENT DEGREE OF ATTACHMENT LOSS

Pandilova M, Stavrevska-Minovska A., Spirovski M., Trajkovski D.

Abstract

The chronic inflammatory process of adult periodontal disease results in the destruction of the supporting tissues of the teeth. It has been proposed that periodontal pathogens stimulate inflammatory cytokine expression. Some cytokines and their role during periodontal disease have been thoroughly investigated like IL1 and IL6, but the participation of other cytokines remains poorly understood. Our objective was to study the levels of IL2, IL12 and C reactive proteins in gingival tissue from sites with different attachment loss.

Gingival tissue biopsies from 30 patients were obtained. Patients were selected with different degrees of attachment loss and with no gingival recession. All the examined patients were between 20 and 40 years old and they all had regions with healthy periodontal tissue. Gingival tissue biopsies were taken from the examined region and from the healthy one for each patient. Obtained samples were frozen on -80 °C. In the frozen tissue sections using ELISA method and nephelometry the levels of examined cytokines and C-reactive proteins were determined. From the analysis of the values of the examined cytokines conclusion can be made that IL2 levels were increasing as the inflammation and attachment loss increased. The levels of IL12 were significantly higher in the disease sites compared to the healthy ones. The levels of IL12 decreased as the attachment loss increased. Levels of C reactive proteins showed no statistical difference between healthy and diseased samples.

Key woards: periodontal disease, pathogenesis, cytokines.

Литература

1. American Academy of Periodontology Proceedings of the World Workshop in Clinical Periodontics Chicago the American Academy of Periodontology 1989: 1: 123-1/24
2. Ebersole J L, Singer R E, Steffensen B. Inflammatory mediators and immunoglobulins in GCF from heathy gingivitis and periodontitis sites J. Periodontol.Res. 1993: 28: 543- 546
3. Ellis S D, Tucci M A, Serio F G. Factors for progression of periodontal disease J. Oral. Pathol. Med. 1998: 27: 101-5
4. Fujihashi K, Kono Y, Yamamoto M. Interleukin production by gingival mononuclear cells isolated from adult chronic periodontitis J.Dent.Res. 1991: 70: 550
5. Fujihashi K. Molecular pathogenesis of periodontal disease A S M,Washington DC 135-145
6. Gemmell E, Marshall R I, Seymor G I. Cytokines and prostaglandines in immune homeostasis and tissue destruction in periodontal disease Periodontology 2000:1997: 14:112-43
7. Genco R J. Host responses in periodontal diseases: current concepts. J. Periodontol. 1992: 63: 338-355
8. Hillmann G, Hillmann B, Gartsen W. Immunohistological determination IL_1 beta in inflamed human gingival epithelium Arch. Oral Biol. 1995: 40: 353-9
9. Hou L T, Lui C M, Rossomondo E F. Cervical interleukin-1 beta in moderate and severe preiodontitis patients and the effect phase I periodontal treatment J. Clin. Periodontal.1995: 22: 162-7
10. Manhart S S, Reinhardt R A, Payne J B. Gingival cell IL2 andIL4 in early onset periodontitis J. Periodontol 1994: 65: 807-813
11. McFarlane C C, Meikle M C. IL2 and IL4 are elevated in sera in patients with periodontal disease J. Periodontol Res. 1991: 26: 402-8
12. Minami Y, Kono T, MiyazakiT. The IL2 receptor complex Its structure function and target genes Ann Rev Immunol 1993 : 11: 245-268
13. Okada H, Kida T,Yamagami H. Identification and distribution of immunocompetent cells in inflamed gingiva of human periodontitis Infect Immun. 1983: 41: 365-374
14. Pilon M, Williams-Miller C, Cox D S. IL2 levels in gingival cervical fluid in periodontitis J. Dent. Res. 1991: 70: 550 15. Prabhu A, Michalowicz B, Mathur A. Detection of local and systemic cytokines in adult periodontitis J. Periodontol 1996: 67: 515-527
16. Ramfjord S P. Indices for prevalence and indices for periodontal disease J. Periodontal 1959: 30: 51
17. Seymore G J, Cole K L, Poweel R N, Lewins E. IL2 production and bone resorption activity by unstimulated lymfocites extracted from chronicaly inflammed human periodontal tissue Arch Oral. Biol. 1985: 30: 481-4
18. Seymore G J, Greenspan J S. The phenotypic characterization of lymphocyte subpopulations in established human periodontal disease J. Periodontol. Res 1993: 28: 543-6
19. Shapira L, Van Dyke T E, Hart T C. A localized absence of interleukin-4 triggers periodontal activity-a novel hypothesis Med. Hypotheses 1992: 39: 319-22
20. Weber R L, Iakono V J. The cytokines: a review of interleukins Periodont. Clin. Invest. 1997: 19: 17-22
21. Yamazaki K, Nakajima T, Aoyagi T, Hara K. Immunohistological analysis of memory T lymphocytes and activated B lymphocytes in tissues with periodontal disease. J. Periodont. Res 1993: 28: 324-334