УДК : 616.314.17 – 008.1 : 575.2 (497.7)

ПОВРЗАНОСТ НА ПОЛИМОРФИЗМОТ НА IL-4 ГЕНОТ СО ФЕНОТИПСКАТА ЕКСПРЕСИЈА НА ПАРОДОНТАЛНАТА БОЛЕСТ КАЈ МАКЕДОНСКАТА ПОПУЛАЦИЈА

Атанасовска-Стојановска А.[1], Поповска М.[1], Трајков Д.[2], Спироски М.[2]

[1]СТОМАТОЛОШКИ ФАКУЛТЕТ-Скопје, Клиника за болести на устата и пародонтот
[2]МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ-Скопје, Институт за имунобиологија и хумана генетика

Цел на овој труд е да се утврдат присуството и процентуалната застапеност на полиморфизмот на IL-4 генот кај трите клинички стадиуми на хроничната пародонтопатија, како и асоцијацијата (заштитна или оптоварувачка) меѓу секој одделен полиморфизам на овој ген со секој клинички стадиум на хроничната пародонтопатија во споредба со контролната група кај македонската популација.

Испитуваната група ја сочинуваа 132 пациента со дијагностицирана хронична пародонтопатија, кои според изразеноста на загубата на атачментот понатаму беа поделени во три групи. Сите испитаници беа во добра општа состојба и поминаа низ анамнестичка постапка за исклучување на некои компромитирачки критериуми. Контролната група ја формираа 301 здрава индивидуа, кај кои пародонтолошкиот преглед не покажа загуба на атачментот > од 2 мм. Сите учесници во студијата беа писмено запознати со генетското испитување, пополнија и потпишаа информативна дозвола за генетско испитување и за складирање на изолираната ДНК во Македонската банка за хумана генетика. Сите учесници во студијата беа од македонска националност и кај сите беше земена венска крв, од која се изврши ДНК изолација. Полиморфизмот на IL-4 цитокинскиот ген беше генотипизиран со комерцијален комплет PCR-SSP (Heidelberg kit). Статистичката анализа беше направена со PyPop програмата.

Значајна асоцираност со различните стадиуми на пародонтопатијата, од аспект на клиничко губење на атачментот, најдовме за следниве полиморфизми (p<0,05):

- *кај првиот клинички стадиум на пародонтопатија: заштитна со цитокинските алели (IL-4/-1098G, IL-4/-33C), цитокинските генотипови (IL-4/-1098G:T) и цитокинските хаплотипови (IL-4/GCC); оптоварувачка со цитокинските алели (IL-4/-1098T, IL-4/-33T), цитокинските генотипови (IL-4/-1098T:T, IL-4/33T:T) и цитокинските хаплотипови (IL-4/TCT);*
- *кај вториот клинички стадиум на пародонтопатија: заштитна со цитокинските алели (IL-4/-1098G), цитокинските генотипови (IL-4/-1098G:T) и цитокинските хаплотипови (IL-4/GCC); оптоварувачка со цитокинските алели (IL-4/-1098T), цитокинските генотипови (IL-4/-1098T:T, IL-4/-33T:T) и цитокинските хаплотипови (IL-4/TCC, IL-4/TCT);*
- *кај третиот клинички стадиум на пародонтопатија: заштитна со цитокинските алели (IL-4/-1098G, IL-4/-590T, IL-4/-33C), цитокинските генотипови (IL-4/-1098G:T, IL-4/-590C:T) и цитокинските хаплотипови (IL-4/GCC); оптоварувачка со цитокинските алели (IL-4/-1098T, IL-4/-590C, IL-4/-33T), цитокинските генотипови (IL-4/-1098T:T, IL-4/-590C:C, IL-4/-33T:T) и цитокинските хаплотипови (IL-4/TCC, IL-4/TCT).*

Од анализата на добиените наоди може да се заклучи дека хроничната пародонтопатија кај македонската популација е поврзана со полиморфизмот кај алелите, генотиповите и

хаплотиповите на IL-4 генот. Интензитетот (заштитна, односно оптоварувачка асоцијација) е различен кај трите стадиуми на пародонтопатијата. Кај македонската популација нашите резултати се разликуваат во некои полиморфизми од другите популации во светот и можат да се искористат за мета анализа на секој поединечен полиморфизам во светски рамки.

Клучни зборови: хронична пародонтална болест, генетика, IL-4, цитокински полиморфизам

Постојат цврсти докази дека генетските фактори, во спрега со надворешните фактори, влијаат врз ризикот од појава на пародонтопатија, на возраста кога таа ќе се појави и на степенот на деструкција, со кој ќе биде зафатено забнопотпорното ткиво (8). Согласно фактот дека генетските фактори се оние кои се приоритетни во патогенетските случувања на пародонталната болест, особено внимание му се посветува на постоењето на повеќе генски локуси, кои се асоцирани со имунолошкиот одговор на домаќинот наспроти можната бактериска инфекција (18).

Истражувањата укажуваат дека генетските варијации, кои драматично ги нарушуваат главните заштитни механизми, главно, учествуваат во хроничните заболувања, чии почетоци се манифестираат во раните детски години и го нарушуваат комплетното системско здравје. Врз основа на овие сознанија за генетски предиспонирани индивидуи во појавата и во прогресијата на пародонталната болест се прогласени-токму оние каде се откриени генетски варијации, кои индуцираат само суптилни промени во интензитетот на биолошките процеси (2).

Познато е дека постои силна биохемиска врска меѓу јачината на пародонталната болест и медијаторите на инфламација, цитокините кои помагаат во развојот на имуните ефекторни клетки, а некои од нив имаат и директни ефекторни функции. Прогресијата на пародонтопатијата е резултат од комбинација на влијанието од околината, имунолошките и генетските фактори, што практично значи присуство на патогени бактерии, високо ткивно ниво на инфламаторни цитокини, ткивни деструктивни ензими како матрикс - металопротеиназа и простагландини, и ниско ниво на антиинфламаторни цитокини (22). Поради воспалителната природа на пародонталната деструкција се бара врската меѓу пародонтопатијата и варијациите во гените кои учествуваат во инфламаторниот имун одговор. Генските полиморфизми можат да се појават во било кој дел од генот, во промотерското подрачје, во кодирачкото подрачје или во 3eUTR (3' untranslated region). Многу од овие полиморфизми можат да бидат функционално неутрални, но некои можат да имаат директно функционално влијание врз генската транскрипција, РНК транскрипцијата или самиот кодиран протеин (20).

Терминот генски полиморфизам означува промени во секвенца од нуклеотидите, кои ги содржи генот. Различни верзии на една секвенца од ДНК на една определена хромозомска локација (локус) се нарекуваат *алели*. Кога тие се чести и се наоѓаат во повеќе од 1% од популацијата станува збор за *генски полиморфизам*. Промените во секвенците кои се сместени во кодирачкиот дел од гените можат да доведат до создавање на различни варијанти протеини, кои прикажуваат различни фенотипови (4). Најголем број од достапните наоди за генски условените заболувања се концентрирани на полиморфизмот на гените, кои имаат некаква улога во инфламаторниот одговор (21).

IL-4 е цитокин со антиинфламаторни својства, кој го продуцираат Т-клетките, маст клетките и базофилите. Тој претставува важен фактор во клоналната експанзија на антиген специфичните Б-клетки и го модулира хуморалниот одговор наспроти антигените стимулуси. Два полиморфизми на IL-4 генот, С-Т полиморфизмот на позиција -590 на промоторното подрачје (PP) и на 70 базен пар на интронот 2 (PI) биле детектирани кај 27,8 % од пациентите со агресивна пародонтопатија (6). Генските полиморфизми на IL-4 генот можат да ја засилат јачината на пародонтопатијата поради намалената регу-

лација на продукцијата на IL-4. Тоа го покажуваат хуманите студии кои намаленото присуство на IL-4 во гингивалните примероци го поврзале со пародонтално заболување (9).

Идентификацијата на генетскиот ризик фактор за пародонтопатија е комплицирана поради различната фенотипска експресија на болеста и променливите критериуми за нејзино класифицирање. Во зависност од стадиумот на хронична пародонтопатија постои степен на хетерогеност во генетскиот ризик фактор. Оттука произлезе и целта на овој труд, да се утврдат присуството и процентуалната застапеност на полиморфизмот на IL-4 генот кај трите клинички стадиуми на хроничната пародонтопатија, како и асоцијацијата (заштитна или оптоварувачка) меѓу секој одделен полиморфизам на овој ген со секој клинички стадиум на хроничната пародонтопатија во споредба со контролната група кај македонската популација.

Материјал и метод

Критериуми за избор

Критериумите за избор за учество во студијата беа идентични за двете групи и се однесуваа на следниве поединости: сите испитаници беа од македонска националност до вториот коленски род, не беа во блиски и далечни роднински врски, беа со православна религија, говореа македонски јазик и беа жители од различни географски подрачја на Република Македонија. Сите тие имаа најмалку дваесет заби во устата. Испитаниците од двете групи беа писмено запознати со генетското испитување, кое требаше да се спроведе, пополнија и потпишаа информативна дозвола за генетско испитување и складирање на изолираната ДНК.

Пациенти со пародонтална болест

На Клиниката за болести на устата и пародонтот при Универзитетскиот стоматолошки клинички центар во Скопје беа проследени 132 пациента со пародонтална болест на возраст од 20 до 40 години, по претходна селекција според интерно воспоставени критериуми. Сите пациенти од испитуваната група беа во добра општа состојба без податоци за компромитирачки состојби, како: (1) заболувања на оралните меки и тврди ткива во оралната празнина, со исклучок на кариес и пародонтопатија; (2) присуство на ортодонтски апарати во устата; (3) користење на системски антибиотици во период од три месеци пред вклучувањето во студијата; (4) бременост и лактација; (5) дијабетес; (6) примена на имуносупресивна терапија; (7) историја на било кое општо заболување, кое ја компромитира функцијата на имунолошкиот систем. Исто така, поради докажаниот ефект на пушењето врз гингиворагијата и степенот на коскена деструкција кај пародонтопатијата, а за да добиеме што поверодостојни резултати за етиопатогенетската улога на генетските фактори, во нашата студија вклучивме исклучително непушачи.

Кај испитуваната група дијагнозата хронична (адултна) пародонтопатија беше поставена врз база на клинички утврдените параметри и рендгенолошката верификација, а во согласност со критериумите на Американската академија за пародонтологија (ААП, 1999) (23), односно присуство на хроничен гингивит, крвавење на сондирање, присуство на пародонтален џеб (поголем или еднаков на 3 мм), хоризонтално или вертикално губење на алвеоларната коска. Според степенот на загуба на атачментот сите пациенти беа групирани во три групи, користејќи го индексот по Ramfjord (24) и тоа:

- *прва група* (ран стадиум на пародонтална болест (slight periodontitis), ПАРО 1) од 40 пациенти со нотирана клиничка загуба на атачментот до 3 мм (CAL) $\leq$ 3 мм;
- *втора група* (умерен стадиум на пародонтопатија (moderate periodontitis), ПАРО 2) од 49 пациенти со нотирана загуба на атачментот од 3 до 6 мм - клиничка загуба на атечментот (CAL) од 3 до 6 мм; и
- *трета група* (силно изразена пародонтопатија (severe periodontitis),

ПАРО 3) од 43 пациенти со нотирана загуба на атачментот поголема од 6 мм (CAL) ≥ 6 мм.

Кај сите пациенти степенот на загуба на атачментот беше одредуван со градуирана стоматолошка сонда, со тоа што мерењата се вршеа во пределот на интерденталната папила, почнувајќи од емајл-цементната граница. Степенот на гингивална инфламација беше утврден по индексот на Loe-Silness (15):

0 - нормална гингива (светло розова боја, со цврста и ситно зрнеста конзистенција);
1 - блага инфламација (маргиналната гингива е поцрвена, со благ едем и не крвави на блага провокација);
2 - умерена инфламација (гингива со црвена боја, со изразит едем на слободната гингива, постои крвавење на благ притисок со сонда);
3 - јака инфламација (гингива со јасно црвена боја, многу едематозна, со тенденција за спонтани крвавења).

Контролна група

Контролната група ја формираа 301 здрава индивидуа на возраст од 20 до 40 години, без пародонтална болест. Прелиминарните резултати од 125 здрави испитаници веќе се објавени (32). Кај испитаниците кои ја формираа контролната група пародонтолошкиот преглед не покажа загуба на атачментот > од 2 мм.

Испитување на полиморфизам на IL-4

Геномската ДНК беше изолирана со фенол-хлороформ методот од периферните леукоцити по строго определен протокол за работа (31), а добиените примероци беа складирани во Македонската банка за хумана ДНК (27). Полиморфизмот на IL-4 генот беше одредуван со комерцијален комплет PCR-SSP (Heilderbeg kit) на Институтот за имунобиологија и хумана генетика на Медицинскиот факултет во Скопје, за сите учесници вклучени во студијата (испитуваната и контролната група). Методот е базиран врз полимеризно верижната реакција (ПВР). Комплетот за овој метод содржи различни формулации од смеси со различни лиофилизирани започнувачи (прајмери), кои се употребуваат за да се намножи геномската ДНК. Накусо, методот се изведува со мешање на пуферот со примероците од човечката ДНК и Так ДНК полимеразата, распоредување во ведренца, затворање и топлинско циклирање. По циклирањето, продуктите од ПВР се поставуваат во 2% агарозен гел за електрофореза. По завршената електрофореза, гелот во кој има етидиум бромид се осветлува со ултравиолетово светло и се фотографира. Анализата на цитокинскиот генски полиморфизам се прави врз основа на специјализирани формулари во кои од фотографијата се внесуваат позитивните ампликони за секој одделен цитокин (33).

Статистичка анализа

Добиените резултати статистички се обработуваат со PyPop софтверскиот пакет за анализа на фреквенциите на алелите и генотиповите (12, 13, 26). Се пресметува Харди-Вајнберговата рамнотежа за секој алел и за секој генотип (7). Отстапувањето на генотипската фреквенција се пресметува со имплементација на Arlequin преку PyPop програмата (25). Се употребува Еванс-Вотерсоновиот хомозиготен тест за неутралност (Ewens-Watterson homozygozity test of neutrality) (35) со Слаткиновата p-вредност (Slatkin's p-values) за да се утврди дали постои значајно отстапување од хипотезата за неутрална селекција за секој полиморфизам (28, 29).

Кај сериите со атрибутивни белези одредувани се проценти на структурата. Значајноста на разликата во цитокиниот генски полиморфизам меѓу групите е тестирана во зависност од дистрибуцијата со χ^2 - тест (p) и со Fisher exact тест (p), доколку бројот е на фреквенциите во групите помал од пет. Ризикот од развивање пародонтопатија во зависност од цитокиниот генски полиморфизам (асоцијација, заштитна улога), одредуван е со примена на Odds ratio (OR) (статистичка програма Epi info 6). Како статистички значајни се сметаат разликите со $p<0,05$.

Резултати

Во табела 1 се прикажани алелските фреквенции на IL-4 генскиот полиморфизам кај пациентите со трите клинички стадиуми на пародонтопатија и испитаниците од контролната група. Статистички сигнификантна разлика во дистрибуцијата на алелите постои кај IL-4/-1098 и IL-4/-33 меѓу пациентите со прв клинички стадиум на пародонтопатија и испитаниците од контролната група.

Кај IL-4/-1098 полиморфизмот, носителите на G алелот имаат помал ризик да заболат од пародонтопатија од носителите на T алелот (p<0,01) (OR=0,31; 95%CI=0,10-0,83). Кај IL-4/-33 цитокинскиот полиморфизам постои сигнификантна разлика во дистрибуцијата на C и T алелите (p<0,004). Носителите на C имаат помал ризик да заболат од пародонтопатија од носителите на T алелот (OR=0,39; 95% CI=0,19-0,81). Кај вториот клинички стадиум на пародонтопатија за IL-4/-1098

ТАБЕЛА 1. *АЛЕЛСКИ ФРЕКВЕНЦИИ НА IL-4 ГЕНСКИОТ ПОЛИМОРФИЗАМ КАЈ ИСПИТАНИЦИТЕ СО ТРИТЕ КЛИНИЧКИ СТАДИУМИ НА ПАРОДОНТОПАТИЈА И ОД КОНТРОЛНАТА ГРУПА*

Цитокински полиморфизам	Алели	ПАРО 1		Контролна		OR‡	95% CI†	Значајност (p)
		Број	Фрек.	Број	Фрек.			
IL-4/-1098	G	5	0,119	177	0,306	0,31	0,10-0,83	0,01*
	T	37	0,881	401	0,694			
IL-4/-590	C	27	0,643	382	0,662	0,92	0,46-1,86	0,79
	T	15	0,357	195	0,34			
IL-4/-33	C	28	0,667	479	0,837	0,39	0,19-0,81	0,004*
	T	14	0,333	93	0,163			
Цитокински полиморфизам	**Алели**	**ПАРО 2**		**Контролна**		**OR‡**	**95% CI†**	**Значајност (p)**
		Број	**Фрек.**	**Број**	**Фрек.**			
IL-4/-1098	G	8	0,108	177	0,306	0,28	0,12-0,61	<0,001*
	T	66	0,892	401	0,694			
IL-4/-590	C	49	0,662	382	0,662	1,00	0,58-1,73	0,99
	T	25	0,338	195	0,34			
IL-4/-33	C	56	0,757	479	0,837	0,60	0,33-1,12	0,08
	T	18	0,243	93	0,163			
Цитокински полиморфизам	**Алели**	**ПАРО 3**		**Контролна**		**OR‡**	**95% CI†**	**Значајност (p)**
		Број	**Фрек.**	**Број**	**Фрек.**			
IL-4/-1098	G	4	0,059	177	0,306	0,14	0,04-0,41	<0,001*
	T	64	0,941	401	0,694			
IL-4/-590	C	54	0,794	382	0,662	1,97	1,03-3,81	0,03*
	T	14	0,206	195	0,34			
IL-4/-33	C	42	0,618	479	0,837	0,31	0,18-0,56	<0,001*
	T	26	0,382	93	0,163			

*- статистички значајни разлики; ‡- OR = Odds ratio; †- CI = Confidence Interval (интервал на доверба)

полиморфизмот постои сигнификантна разлика во дистрибуцијата на G и T алелите (p<0,0001). Пациентите со G алел имаат помал ризик да заболат од пародонтопатија од пациентите со T алел (OR=0,28; 95%CI =0,12-0,61). Кај третиот клинички стадиум на пародонтопатија за IL-4/-1098 полиморфизмот постои сигнификантна разлика во дистрибуцијата на алелите за G алелот (p<0,0001) и има заштитна улога во однос на развивањето на пародонтопатијата (OR=0,14; 95%CI=0,04-0,41). Кај IL-4/-590 постои сигнификантна разлика во дистрибуцијата на алелите (p<0,03). Носителите на C алел имаат 1,97 пати поголем ризик да заболат од пародонтопатија од носителите кои имаат T алел (OR=1,97; 95%CI=1,03-3,81). Кај IL-4/-33 цитокинскиот полиморфизам постои сигнификантна разлика во дистрибуцијата на алелите (p<0,0001). Испитаниците со C алел имаат помал ризик да заболат од пародонтопатија од пациентите со T алел (OR=0,31; 95%CI 0,18-0,56) (табела 1).

Во табела 2 се прикажани генотипските фреквенции на IL-4 генскиот полиморфизам кај пациентите со трите клинички стадиуми на пародонтопатија и испитаниците од контролната група.

Кај IL-4/-1098 полиморфизмот постои сигнификантна разлика во дистрибуцијата на G:T и на T:T генотипот (p<0,0001). Носителите на G:T генотипот имаат помал ризик да заболат од пародонтопатија (OR=0,11; 95%CI=0,02-0,40), наспроти тоа носителите на T:T генотипот имаат 5.65 пати поголем ризик да заболат од пародонтопатија (OR=5,65; 95%CI=2,36-13,94). Кај IL-4-33 полиморфизмот постои сигнификантна разлика (p<0,003) во дистрибуцијата на T:T генотипот. Носителите на T:T генотипот имаат 3,94 пати поголем ризик да заболат од пародонтопатија (OR=3,94; 95%CI =1,34-11,25). Кај вториот клинички стадиум на пародонтопатија за IL-4/-1098 полиморфизмот постои сигнификантна разлика во дистрибуцијата на G:T и T:T генотиповите (p<0,0001). Носителите на G:T генотипот имаат помал ризик да заболат од пародонтопатија (OR=0,18; 95%CI=0,07-0,43), што укажува на неговата заштитна улога. Носителите на T:T генотипот имаат 6,62 пати поголем ризик да заболат од пародонтопатија (OR=6,62; 95% CI=2,03-23,92), односно постои оптоварувачка улога на T:T генотипот во настанувањето на пародонтопатијата. Кај IL-4/-33 полиморфизмот постои сигнификантна разлика (p<0,001) во дистрибуцијата на T:T генотипот. Носителите на T:T генотипот имаат 5,27 пати поголем ризик да заболат од пародонтопатија (OR=5,27; 95%CI=1,47-18,07). Кај третиот клинички стадиум на пародонтопатија за IL-4/-1098 цитокинскиот полиморфизам постои сигнификантна разлика (p<0,0001) во дистрибуцијата на G:T и T:T генотипот. Носителите на G:T генотипот имаат помал ризик да заболат од пародонтопатија (OR=0,09; 95% CI=0,03-0,27), додека носителите на T:T генотипот имаат 11,68 пати поголем ризик да заболат од пародонтопатија (OR=11,68; 95% CI=3,79-40,23), односно постои оптоварувачка асоцијација меѓу носителството на T:T генотипот и настанувањето на пародонтопатијата. Кај IL-4/-590C:C постои сигнификантна разлика (p<0,0001) во дистрибуцијата на овој генотип. Носителите на C:C имаат 2,81 пати поголем ризик да заболат од пародонтопатија (OR=2,81; 95%CI=1,29-6,18). Постои сигнификантна разлика во дистрибуцијата на C:T генотипот за IL-4/-590 (p<0,0001). Носителите на C:T генотипот имаат помал ризик да заболат од пародонтопатија (OR=0,32; 95% CI=0,15-0,67), што му дава заштитна улога во однос на развивањето на пародонтопатијата. Кај IL-4/-33 цитокинскиот полиморфизам постои сигнификантна разлика (p<0,0001) во дистрибуцијата на T:T генотипот. Пациентите со T:T генотипот имаат 9,20 пати поголем ризик да заболат од пародонтопатија (OR=9,20; 95 %CI=3,56-23,83) (табела 2).

Во табела 3 се прикажани хаплотипските фреквенции на IL-4 генскиот полиморфизам кај пациентите со трите клинички стадиуми на пародонтопатија и испитаниците од контролната група.

Кај првиот клинички стадиум на пародонтопатија постои сигнификантна разлика

***ТАБЕЛА 2.** ГЕНОТИПСКИ ФРЕКВЕНЦИИ НА IL-4 ГЕНСКИОТ ПОЛИМОРФИЗАМ КАЈ ИСПИТАНИЦИТЕ СО ТРИТЕ КЛИНИЧКИ СТАДИУМИ НА ПАРОДОНТОПАТИЈА И ИСПИТАНИЦИТЕ ОД КОНТРОЛНАТА ГРУПА*

Цитокински полиморфизам	Генотип	ПАРО 1		Контролна		OR‡	95% CI†	Значајност (p)
		Број	Фрек.	Број	Фрек.			
IL-4/-1098	G:T	3	14,3	175	60,5	0,11	0,02-0,40	<0,001*
	T:T	17	81	113	39,1	5,65	2,03-23,92	<0,001*
	G:G	1	4,8	1	0,4	14,40	0,00-551,70	0,13
IL-4/-590	C:C	7	33,3	97	33,7	0,98	0,35-2,71	0,97
	C:T	13	61,9	187	64,9	0,88	0,33-2,40	0,78
	T:T	1	4,8	4	1,4	3,55	0,38-33,27	0,24
IL-4/-33	C:C	12	57,1	209	72,6	0,49	0,18-1,32	0,12
	C:T	4	19,0	61	21,3	0,76	0,27-2,88	0,53
	T:T	5	23,8	16	5,6	3,94	1,47-18,07	0,001*
Цитокински полиморфизам	**Генотип**	**ПАРО 2**		**Контролна**		**OR‡**	**95% CI†**	**Значајност (p)**
		Број	**Фрек.**	**Број**	**Фрек.**			
IL-4/-1098	G:T	8	21,6	175	60,5	0,18	0,07-0,43	<0,001*
	T:T	29	78,4	113	39,1	6,62	2,36-13,94	<0,001*
	G:G	0	0	1	0,4	0.00	0,00-138,46	0,89
IL-4/-590	C:C	14	37,8	97	33,7	1,20	0,56-2,56	0,62
	C:T	21	56,8	187	64,9	0,71	0,34-1,50	0,33
	T:T	2	5,4	4	1,4	4,06	0,50-27,13	0,14
IL-4/-33	C:C	26	70,3	209	72,6	0,87	0,39-1,98	0,72
	C:T	4	10,8	61	21,3	0,45	0,17-1,39	0,09
	T:T	7	18,9	16	5,6	5,27	1,34-11,25	0,003*
Цитокински полиморфизам	**Генотип**	**ПАРО 3**		**Контролна**		**OR‡**	**95% CI†**	**Значајност (p)**
		Број	**Фрек.**	**Број**	**Фрек.**			
IL-4/-1098	G:T	4	11,8	175	60,5	0,09	0,03-0,27	<0,001*
	T:T	30	88,2	113	39,1	11,68	3,79-40,23	<0,001*
	G:G	0	0	1	0,4	0,00	0,00-151,01	0,89
IL-4/-590	C:C	20	58,8	97	33,7	2,81	1,29-6,18	<0,001*
	C:T	14	41,2	187	64,9	0,32	0,15-0,67	<0,001*
	T:T	0	0	4	1,4	0,00	0,00-13,45	0,64
IL-4/-33	C:C	20	58,8	209	72,6	0,53	0,24-1,16	6,08
	C:T	2	5,9	61	21,3	0,23	0,04-1,03	0,03*
	T:T	12	35,3	16	5,6	9,20	3,56-23,83	<0,001*

*- статистички значајни разлики; ‡- OR = Odds ratio; †- CI = Confidence Interval (интервал на доверба)

во дистрибуцијата на GCC кај IL-4 хаплотиповите (p<0,04). Носителите на GCC хаплотипот имаат помал ризик да заболат од пародонтопатија (OR=0,26; 95%CI=0,08-0,79). Сигнификантна разлика (p<0,0001) постои и во дистрибуцијата на TCT хаплотипот за IL-4. Носителите на TCT хаплотипот имаат 12,53 пати поголем ризик да заболат од пародонтопатија (OR=12,53; 95%CI=3,04-54,40), односно постои оптоварувачка улога меѓу носителството на TCT хаплотипот и настанувањето на пародонтопатијата. Кај вториот клинички стадиум на пародонтопатија постои сигнификантна разлика во дистрибуци-

ТАБЕЛА 3. *ХАПЛОТИПСКИ ФРЕКВЕНЦИИ НА IL-4 ГЕНСКИОТ ПОЛИМОРФИЗАМ КАЈ ПАЦИЕНТИТЕ СО ТРИТЕ КЛИНИЧКИ СТАДИУМИ НА ПАРОДОНТОПАТИЈА И ИСПИТАНИЦИТЕ ОД КОНТРОЛНАТА ГРУПА*

Цитокински полиморфизам	Хаплотип	ПАРО 1		Контролна		OR‡	95% CI†	Значајност (p)
		Број	Фрек.	Број	Фрек.			
IL-4	GCC	4	0,095	163	0,285	0,26	0,08-0,79	0,04*
	GCT	0	0	8	0,014	0,00	0,00-9,42	0,56
	GTC	0	0	4	0,007	0,00	0,00-21,52	0,59
	GTT	1	0,024	1	0,001	13,93	0,00-520,21	0,13
	TCC	18	0,429	202	0,353	1,37	0,70-2,70	0,33
	TCT	5	0,119	4	0,007	19,19	4,24-89,69	<0,001*
	TTC	5	0,119	110	0,192	0,57	0,19-1,56	0,24
	TTT	9	0,214	80	0,140	1,64	0,72-3,82	0,19

Цитокински полиморфизам	Хаплотип	ПАРО 2		Контролна		OR‡	95% CI†	Значајност (p)
		Број	Фрек.	Број	Фрек.			
IL-4	GCC	8	0,108	163	0,284	0,30	0,13-0,67	0,001*
	GCT	0	0	8	0,014	0,00	0,00-5,26	0,38
	GTC	0	0	4	0,007	0,00	0,00-12,01	0,61
	GTT	0	0	1	0,001	0,00	0,00-135,36	0,88
	TCC	36	0,486	202	0,355	1,74	1,04-2,90	0,03*
	TCT	6	0,081	4	0,007	12,53	3,04-54,40	<0,001*
	TTC	13	0,176	110	0,192	0,90	0,45-1,75	0,73
	TTT	11	0,149	80	0,140	1,07	0,51-2,21	0,84

Цитокински полиморфизам	Хаплотип	ПАРО 3		Контролна		OR‡	95% CI†	Значајност (p)
		Број	Фрек.	Број	Фрек.			
IL-4	GCC	4	0,059	163	0,284	0,16	0,05-0,46	<0,001*
	GCT	0	0	8	0,014	0,00	0,00-5,73	0,40
	GTC	0	0	4	0,007	0,00	0,00-13,10	0,64
	GTT	0	0	1	0,001	0,00	0,00-147,47	0,89
	TCC	36	0,529	202	0,353	2,06	1,21-3,52	<0,001*
	TCT	14	0,206	4	0,007	36,81	10,81-137,81	<0,001*
	TTC	2	0,029	110	0,192	0,13	0,02-0,54	<0,001*
	TTT	12	0,176	80	0,140	1,32	0,64-2,67	0,42

*- статистички значајни разлики; ‡- OR = Odds ratio; †- CI = Confidence Interval (интервал на доверба)

јата на IL-4/GCC хаплотипот (p<0,001). Носителите на GCC хаплотипот имаат помал ризик да заболат од пародонтопатија (OR=0,30; 95%CI=0,13-0,67), што укажува на неговата заштитна улога. Сигнификантна разлика постои и во дистрибуцијата на TCC (p<0,03) и TCT (p<0,001) хаплотиповите за IL-4. Носителите на TCC хаплотипот имаат 1,74 пати поголем ризик да заболат од пародонтопатија (OR=1,74; 95%CI= 1,04-2,90), а носителите на TCT хаплотип имаат 19,19 пати поголем ризик да заболат од пародонтопатија (OR=19,19; 95%CI=4,24-89,69). Постои оптоварувачка асоцијација меѓу носителството на TCC и TCT хаплотиповите и настанувањето на пародонтопатијата. Кај третиот клинички стадиум на пародонтопатија за IL-4 цитокинскиот полиморфизам статистичката анализа покажа асоцијација меѓу носителството на TCC хаплотипот и 2,06 пати поголем ризик за настанување на пародонтопатија (OR=2,06; 95%CI=1,21-3,52; p<0,01), додека носителите на TCT хаплотипот имаат 36,81 пати поголем ризик да заболат од пародонтопатија (OR=36,81; 95%CI=10,81-137,81; p<0,001). IL-4/TTC хаплотипот има заштитна улога (OR=0,13; 95%CI=0,02-0,54; p<0,001), исто така, значајна беше и заштитната улога на IL-4/GCC (OR=0,16; 95%CI=0,05-0,46; p<0,001) (табела 3).

Дискусија

Адултната пародонтопатија се дефинира како хронично инфламаторно заболување каде грам негативните микроорганизми го иницираат и го одржуваат инфламаторниот имун одговор. Инфламацијата е добро координиран процес, кој се карактеризира со зголемена васкуларна пермеабилност следена со миграција на полиморфонуклеарните леукоцити, моноцитите и лимфоцитите од крвните садови во нападнатото ткиво, како и со нивно поттикнување да лачат воспалителни медијатори кои ќе доведат до каскада на биохемиски и целуларни случувања (14). Хуморалните фактори, специфичните антитела и комплементот им помагаат на неутрофилите во опсонизацијата и фагоцитозата на бактериите.

Оваа инфламација, од состојба на хроничен гингивит може да прогредира кај подложните (сусцептибилните) индивидуи во хронична деструктивна инфламаторна состојба на пародонталното ткиво и да доведе до ресорпција на алвеоларната коска. Иако многубројните студии ја потврдуваат улогата на микроорганизмите, како и на некои фактори од надворешната средина во етиопатогенезата, во најновите научни соопштенија сè повеќе се потенцира улогата на генетските фактори во предиспозицијата и во прогресијата на пародонталното заболување (10). Поддршката за овој аспект на етиологијата на пародонтопатијата доаѓа од бројните студии кои укажуваат на фактот дека генските фактори, односно имунорегулаторните гени влијаат врз инфламаторниот имун одговор кој, во зависност од таа повратна спрега, може да даде заштитни (протективни) или разурнувачки (деструктивни) резултати (3). Генските варијанти (полиморфизми), кои земаат свое учество во комплексните инфективни заболувања, се присутни во секоја популација и многу често се различни меѓу здравите и болните индивидуи. Многу од овие полиморфизми можат да бидат функционално неутрални, но некои можат да имаат директно функционално значење во генската транскрипција, РНК стабилноста или кодирањето на самите протеини. Најголемиот број достапни резултати за генската асоцијација денес се сконцентрирани врз полиморфизмите на гените кои имаат улога во инфламаторниот одговор (19).

Сакајќи да дадеме одговор за асоцијацијата на генски полиморфизам на IL-4 генот со пародонтопатијата кај македонската популација, ја спроведовме оваа студија во која се сконцентриравме на анализата на генската структура кај различните фенотипови, кои се јавуваат во рамките на заболувањето. Некои автори (30) за хроничната пародонтопатија препорачуваат класификација врз основа на јачината на болеста, изразена пре-

ку различниот степен на коскена деструкција, затоа што се смета дека овој параметар има значајна прогностичка улога. Идентификацијата на генетскиот ризик фактор за пародонтопатија е комплицирана поради различната фенотипска експресија на болеста и променливите критериуми за нејзино класифицирање. Најновите студии донесуваат битни докази дека, во зависност од стадиумот на хроничната пародонтопатија, постои степен на хетерогеност во генетскиот фактор за ризик (9, 36).

Примерок од 132 испитаника, според светската литература (34), спаѓа во средно голем, што ни овозможи да имаме валидна интерпретација на добиените резултати. IL-4, како дел од стекнатиот имун систем, учествува како регулатор и медијатор во ефекторните фази на имуниот одговор и има автокрино и паракрино дејство. Основна физиолошка улога е да ги регулира реакциите во кои учествуваат ИгЕ, мастоцитите и еозинофилите. IL-4 има круцијална улога кај астмата, што се должи на неговото влијание врз Б-клетките да се трансформираат од плазмоцити, кои лачат ИгМ во ИгЕ (17). Зголемувањето на количеството на ИгЕ е докажано во гингивалното ткиво кај индивидуите со хронична пародонтопатија. Во пародонталните лезии IL-4 може да ги активира Б-лимфоцитните клетки да продуцираат ИгЕ и ИгГ наспроти липополисахаридите, кои ги лачат пародонталните бактерии (11). Гледано од тој аспект се чини дека имуните механизми на алергиските нарушувања можат да бидат слични со патогенезата на пародонталната болест.

Од аспект на алелската дистрибуција кај иницијалната, умерената и силно изразената форма на пародонтопатија кај нашите испитаници забележавме сигнификантна разлика за IL-4 полиморфизмите кај сите испитувани подгрупи. Меѓутоа, кај пациентите со терминален стадиум на пародонтопатија значајни разлики добивме за сите три полиморфизми на IL-4, каде што T алелот кај IL-4/-1082 беше застапен со фреквенција од 0,941, со исклучок кај два пациента. Силно значаен ризик фактор е и T алелот од IL-4/-33 полиморфизмот со фрекфенција од 0,382 кај испитуваната група со терминален стадиум наспроти 0,163 кај контролната. Носителите на IL-4/-590C имаа два пати поголем ризик да развијат пародонтопатија. Кај пациентите со умерена форма на пародонтопатија добивме многу силна значајност само за IL-4/-1098 полиморфизмот, каде што T алелот се јави со фреквенција од 0,892 и претставува силен оптоварувачки фактор за пародонтопатија кај индивидуите кои го поседуваат.

Што се однесува до генотипскиот полиморфизам за IL-4 цитокинскиот ген, кај првиот, вториот и третиот клинички стадиум на пародонтопатија, кај IL-4/-1098 беше утврдена заштитната улога на G:T генотипот, наспроти оптоварувачката улога на T:T генотипот, каде носителите на овој генотип во првиот и во вториот клинички стадиум на пародонтопатија се изложени на 6 пати поголем ризик да развијат пародонтопатија, а кај третиот клинички стадиум до 11,68 пати поголем ризик. Заеднички за сите три групи беше полиморфизмот за IL-4/-33 каде што T:T генотипот имаше оптоварувачка улога во настанувањето на пародонтопатијата со дури 9 пати поголем ризик за носителите со трет клинички стадиум на пародонтопатија. За IL-4/-590 полиморфизмот, разлики во однос на контролната група утврдивме само кај третиот клинички стадиум на пародонтопатија, и тоа, умерено значајна оптоварувачка улога на C:C генотипот, наспроти силно сигнификантната заштитна улога на C:T генотипот. Овој наш наод укажува дека IL-4 полиморфизмот има значајна улога во приемливоста кон пародонтопатија кај македонската популација и дека има сооднос и со развојниот стадиум на болеста.

Прва ваква студија, во која полиморфизмот на IL-4 генот бил ставен во релација со јачината на пародонтопатијата, спровел Gonzales (6), меѓутоа тој не нашол асоцијација меѓу истражуваниот полиморфизам и стадиумот на пародонтопатија кај бразилската популација. Можно е дека различни резултати се појавуваат во различни попула-

ции и расни групи. Расните разлики се чести во полиморфниот систем (1), така што различни алели или групи од гени кои имаат интерактивна спрега доведуваат до експресија на различни клинички фенотипови кај различни популации (16). Од сите наши наоди за IL-4 полиморфизмот, како и од наодите на другите автори кои го истражувале, би можеле да кажеме дека тој е вклучен во комплексната генетска состојба, која ја модифицира фенотипската експресија на IL-4, како биолошки фактор кој има значајна улога во етиопатогенезата на пародонтопатијата.

Во однос на анализата на хаплотипскиот статус, сумарната анализа за сите три клинички стадиуми на пародонтопатијата ја покажа инволвираноста на IL-4 генскиот полиморфизам со клиничкиот стадиум на заболувањето. Кај иницијалната пародонтопатија заштитна улога имаше GCC наспроти силно сигнификантната оптоварувачка улога на TCT хаплотипот. Носителите на TCT имаа 12,53 пати поголем ризик да развијат пародонтопатија, што се гледа и од неговата фреквенција од 0,136 кај испитуваната група, наспроти само 0,007 кај контролната група. Кај вториот стадиум на пародонтопатија, исто така, добивме 19,19 пати поголем ризик од пародонтопатија за носителите на TCT хаплотипот, со фреквенција од 0,081 кај испитуваната, наспроти 0,007 кај контролната група. Кај оваа група добивме и оптоварувачка улога на TCC хаплотипот, наспроти докажаната заштитна на GCC, кој го имаше три пати повеќе кај контролната отколку кај испитуваната група. Кај третиот клинички стадиум на пародонтопатија, исто така, се потврди силната оптоварувачка улога на TCT хаплотипот (0,206) кај испитуваната група и беше асоциран со 36,81 пати поголем ризик за развој на пародонтопатија. Интересен беше и податокот за заштитната улога на TTC хаплотипот кој имаше повисоки вредности за контролната група и во двата претходни стадиума на пародонтопатија, меѓутоа кај третиот покажа високо значајна разлика во дистрибуцијата и се јави само кај два испитаника од терминалниот стадиум, наспроти 110 носители кај контролната група. Ова укажува дека постои силна асоцијација на цитокинскиот генски полиморфизам на IL-4 и стадиумите на хроничната пародонтопатија.

Генските варијабилности на цитокинските гени кај индивидуите имаат влијание врз системското ниво на инфламаторните медијатори, преку кои ги одредуваат степенот и јачината на инфламаторниот одговор кај пародонталната афекција со периопатогени. Најчестите и докажани високоризични полиморфизми се наследуваат со генерации и создаваат кумулативни ефекти кои оформуваат еден високоризичен генетски профил.

Комплексната интеракција меѓу цитокиниот генски полиморфизам и етиопатогенезата на пародонталната болест претставува современ тренд во светските научно-истражувачки кругови. Во најсовремената литература постојат податоци кои укажуваат на веројатно многу важната улога на генскиот полиморфизам во патогенезата на општите хронични заболувања, па и пародонтопатијата како едно од нив, што претставува голем предизвик за истражување на ова поле. Со резултатите од нашата студија прв пат добивме сознанија за IL-4 генскиот полиморфизам и неговата дистрибуција во македонската популација, како и за неговото влијание врз степенот на ткивната деструкција и интензитетот на инфламацијата кај пародонталната болест, како хронично заболување кај кое мултиплите генетски фактори се значаен клинички ризик. Сознанијата извлечени од ова истражување, заедно со натамошната суптилна анализа на резултатите од нашата студија, ќе отворат простор за нов терапевтски пристап кај генетски подложните (сусцептибилни) индивидуи.

ASSOCIATION OF IL-4 GENE POLYMORPHISM WITH PERIODONTAL DISEASE PHENOTYPE EXPRESSION IN MACEDONIAN POPULATION

Atanasovska – Stojanovska A., Popovska M., Trajkov D., Spiroski M.

Summary

Aim: The aim of this study is to determine the presence and percentage of polymorphisms of *IL-4* gene, during the three clinical stadiums of chronic periodontal disease, and to determine the influence (protective or associate) between each separate polymorphism of this gene during each clinical stadium of chronic periodontal disease, and the control group with Macedonian population.

Material and Methods: In order to achieve the set aim we have formed an examined group consisting of 132 patients with chronic periodontal disease diagnosed. They were further divided into three groups according to the lost of attachment. The physical condition of all patients was satisfactory and an anamnesis was taken to exclude some compromising criteria. The control group consisted of 301 healthy individuals, who didn't have lost of attachment bigger than >2mm. All the participants in the study were familiarized with the genetic research which was going to be conducted. They have filled in and signed informative permission for genetic research and storage of isolated DNA in the Macedonian Bank of Human DNA. All the participants in the study were Macedonians with orthodox religion, and they were not close or far relatives. From all the participants in the study, both control and examined group, vein blood sample was taken, and DNA was isolated. Polymorphisms of IL-4 cytokine gene were genotyped with commercial PCR-SSP kit (Heidelberg kit). Statistical analysis was performed by PyPop program.

Results: We have found a significant link of various phases of periodontal disease related to clinical lost of attachment, within the following polymorphisms ($p<0.05$):

- within the first clinical phase of periodontal disease: protective with cytokine alleles (IL-4/-1098G, IL-4/-33C), cytokine genotypes (IL-4/-1098G:T), and cytokine haplotypes (IL-4/GCC); associated with cytokine alleles (IL-4/-1098T, IL-4/-33T), cytokine genotypes (IL-4/-33T:T), and cytokine haplotypes (IL-4/TCT);
- within the second clinical phase of periodontal disease: protective with cytokine alleles (IL-4/-1098G); cytokine genotypes (IL-4/-1098G:T), and cytokine haplotypes (IL-4/GCC); associated with cytokine alleles (IL-4/-1098T), cytokine genotypes (IL-4/-1098T:T, IL-4/-33T:T), and cytokine haplotypes (IL-4/TCC, IL-4/TCT);
- within the third clinical phase of periodontal disease: protective with cytokine alleles (IL-4/-590T, IL-4/-33C), cytokine genotypes (IL-4/-1098G:T, IL-4/-590C:T), and cytokine haplotypes (IL-4/TCC); associated with cytokine alleles (IL-4/-590C, IL-4/-33T), cytokine genotypes (IL-4/-1098T:T, IL-4/-590C:C, IL-4/-33T:T), and cytokine haplotypes (IL-4/TCC, IL-4/TCT).

Conclusions: The analyses of the obtain results lead us to the following conclusion: Chronic periodontal disease among the Macedonian population correlates with the polymorphisms of alleles, genotypes and haplotypes with IL-4 gene. The intensity (positive or negative association) is differently linked to the three phases of periodontal disease. The results obtained from the Macedonian population are different in some polymorphism, from some other populations in the world, and they can be used for meta-analysis of each polymorphism worldwide.

Key words: chronic periodontal disease, IL-4, genetics, cytokine polymorphisms.

Литература

1. Anusaksathien O, Sukboon A, Sitthiphong P, Teanpaisan R. Distribution of interleukin-1beta (+3954) and IL-1alpha (-889) genetic variations in a Thai population group. Journal of Periodontology. 2003;74:1796-1802.
2. Baker JP, Roopenian CD. Genetic susceptibility to chronic periodontal disease. Microbes and Infection. 2002; 4:1157-1167.
3. Bret PM, Zygogianni GS, Tomaz M et al. Functional gene polymorphisms in aggressive and chronic periodontitis. J Dent Res. 2005;84(12):1149-1153.
4. Galbraith GM, Hendley TM, Sanders JJ et al. Polymorphic cytokine genotypes as markers of dis-

ease severity in adult periodontitis. J Clin Periodontol. 1999;26:781-785.

5. Gemmell E, Seymour GJ. Immunoregulatory control of Th1/Th2 cytokine profiles in periodontal disease. Periodontology 2000. 2004; 35:21-41.
6. Gonzales JR, Kobayashi T, Michel J, Mann M, Yoshie H & Meyle J. Interleukin-4 gene polymorphisms in Japanese and Caucasian patients with aggressive periodontitis. Journal of Clinical Periodontology. 2004;31:384-389.
7. Guo S, Thomson E. Performing the exact test of Hardy Weinberg proportion for multiple alleles. Biometrics. 1992;48:361.
8. Haffajee AD, Socransky SS. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. Periodontology 2000. 1994;5:78-111.
9. Holla LI, Fassmann A, Stejskalova A, Znojil V, Vanek J Vacha J. Analysis of the interleukin-6 gene promoter polimorphisms in Czech patients with chronic periodontitis. Journal of Periodontology. 2004;75: 30-36.
10. Kinane DF & Hart TC. Genes and gene polymorphisms associated with periodontal disease. Critical Reviews in Oral Biology and Medicine. 2003;14: 430-449.
11. Kornman KS, Crane A, Wang HY, diGiovine FS, Newman MG, Pirk FW, Wilson TGJr, Higginobottom FL, Duff GW. The interleukin-1 genotype as a severity factor in adult periodontal disease. Journal of Clinical Periodontology. 1997;24:72-77.
12. Lancaster A, Nelson MP, Meyer D, Thomson G, Single RM. PyPop: a software framework for population genomics: analyzing large-scale multi-locus genotype data. Pac Symp Biocomput. 2003;:514-25.
13. Lancaster AK, Single RM, Solberg OD, Nelson MP, Thomson G. PyPop update—a software pipeline for large-scale multilocus population genomics. Tissue Antigens. 2007; 69(Suppl 1):192-7.
14. Lee HJ. Kang IK, Chung CP, Choi SM. The subgingival microflora and gingival crevicular fluid cytokines in refractory periodontitis. J Clin Periodontol. 1995;22:885-90.
15. Loe H, Silness J. Periodontal disease in pregnancy: I. Prevalence and severity. Acta Odont Scand. 1963;21:553-551.
16. Loos BG, Leppers-Van de Straat FG, Van de Winkel JG, Van der Velden U. Fegamma receptor polymorphisms in relation to periontitis. Journal of Clinical Periodontology. 2003;30:595-602.
17. Malo D, Skamene E. Genetic control of host resistance to infection. Trends Genet. 1994;10:365-371.
18. McGee JM, Tucci NA, Edmundson TP,Serio CL, Johnson RB. The relationship between concentrations of pro-inflamatory cytokines within gingival and the adjacent sulkular depth. J Periodontol. 1998;69:865-871.
19. Nares S. The genetic relationships to periodontal disease. Periodontology 2000. 2003;32:36-49.
20. National Institutes of Health. Genetic architecture of complex phenotypes. Released on the internet, June 8, 1998.
21. Offenbacher S. Periodontal diseases: pathogenesis. Ann Periodontol. 1996;1:821-878.
22. Qureshi ST, Skamene E, Malo D. Comparative genomics and host resistance against infectious disease. Emerg Infect Dis. 1999;5:36-47.
23. Position paper: epidemiology of periodontal diseases. American Academy of Periodontology. J Periodontol. 1999;67(9):935-945.
24. Ramfjord SP. The periodontal disease index (PDI). J Periodontol. 1967;38(6): Suppl:602-629.
25. Schneider S, Roessli D, Excoffier L. Arlequin version 2.000: a software for population genetics data analysis. Geneva (Switzerland): Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva; 2000.
26. Single RM, Meyer D, Mack SJ, Lancaster A, Erlich HA, Thomson G. 14th International HLA and Immunogenetics Workshop: report of progress in methodology, data collection, and analyses. Tissue Antigens. 2007; 69(Suppl 1):185-7.
27. Spiroski M, Arsov T, Petlichkovski A, Strezova A, Trajkov D, Efinska-Mladenovska O, et al. Case Study: Macedonian Human DNA Bank (hDNAMKD) as a source for public health Genetics. In: Health Determinants in the Scope of New Public Health. Ed. by Georgieva L, Burazeri G. Hans Jacobs Company: Sofia, 2005:33-44.
28. Slatkin M, Excoffier L. Testing for linkage disequilibrium in genotypic data using the Expectation-Maximization algorithm. Heredity. 1996; 76 (Pt 4):377-83.
29. Slatkin M. An exact test for neutrality based on the Ewens sampling distribution. Genet Res. 1994; 64:71-4.
30. Suzuki A, Ji G, Numabe Y, Muramatsu M, Gomi K, Kanazashi M et al. Single nucleotide polymorphisms associated with aggressive periodontitis and severe chronic periodontitis in Japanese. Biochem Biophys Res Commun. 2004;317:887-892.

31. Towner P. Purification of DNA. Essential Molecular Biology (ed.T.A.Brown). Oxford University Press, Oxford. 1995:47-54.

32. Trajkov D, Arsov T, Petlichkovski A, Strezova A, Efinska-Mladenovska O, Spiroski M. Cytokine gene polymorphisms in population of ethnic Macedonians. Croat Med J. 2005;46(4):685-92.

33. Tseng LH, Chen PJ, Lin MT, Singleton K, Martin EG, Yen AH, et al. Simultaneous genotyping of single nucleotide polymorphisms in the IL-1 gene complex by multiplex polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism. J Immunol Methods. 2002; 267:151-6.

34. Wade AB. Validity of anterior segment gingival scores in epidemiological studies. J Periodontol. 1966;37:55.

35. Watterson GA. The homozygozity test of neutrality. Genetics. 1978;88: 405-17.

36. Wohlfahrt JC, Wu T, Hodges JS, Hinrichs JE, Michalowicz BS. No association between selected candidate gene polymorphisms and severe chronic periodontitis. J Peroiodontol. 2006;77:426-436.