

АСОЦИРАНОСТ НА ХАПЛОТИПСКИОТ ЦИТОКИНСКИ ГЕНСКИ ПОЛИМОРФИЗАМ И ПАРОДОНТОПАТИЈАТА КАЈ МАКЕДОНСКАТА ПОПУЛАЦИЈА

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

¹СТОМАТОЛОШКИ ФАКУЛТЕТ - Скопје, Катедра за орална патологија и пародонтологија

²МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ - Скопје, Институт за Имунобиологија и Хумана Генетика

Апстракт. Со можностите за проучување на хуманите геном и запознавањето на генетската структура, станува можно да се идентификуваат сите метаболни механизми во човекоето тело, па и оние кои учествуваат во пародонталната деструкција и регенерација. Полиморфизмот на цитокинските гени, влијае на фенотипската експресија, односно на концентрациите на инфламаторните медијатори (цитокините) во крвта, што условува модулации во имуниот одговор, па токму поради тоа, може да ја детерминира и приемчивоста кон пародонталната, како хроничен инфламаторен процес.

Цел на истражувањето. Утврдување на присуството и проценителната значајност на полиморфизмот на цитокинските гени [(IL-1A), (IL-1B), (IL-1R), (IL-1RA), (IFN γ), (IL-2), (IL-4), (IL-4R), (IL-6), (IL-10), (IL-12-B), (TGF- β 1), и (TNF- α)] кај пациентите со хронична пародонтална обојба во македонската популација.

Утврдување на влијанието (проективно или асоцијативно) помеѓу секој одделен полиморфизам на цитокинските гени со хроничната пародонтална обојба во споредба со контролната група кај македонската популација.

Материјал и метод. За реализација на поставената цел проследени се 132 пациенти со

дијагностицирана хронична пародонтална обојба. Контролната група ја формира 301 здрава индивидуа, без пародонтална болест. Сите учесници во студијата беа писмено запознаени со генетското испитување и пополнија и потпишале Информативна дозвола за генетско испитување и складирање на изолираната ДНК во Македонската банка за хумана генетика. Полиморфизмот на цитокинските гени беше одредуван со комерцијален комплет PCR-SSP (Heidelberg kit). Популационата генетска статистичка анализа беше направена со RuPор програмата. Ризикот од развивање на пародонтална обојба во зависност од цитокините женски полиморфизам, одредуван е со примена на Odds ratio (OR).

Резултати. Значајна асоцијаност со хроничната пародонтална обојба, потврдувајќи од $p < 0,05$, најдовме за следниве цитокински полиморфизми: Проективна со цитокинските хипотетички (TGF- β 1 /TG, TNF- α /GA, IL-4/GCC, IL-4/TTC); Асоцијативна - со цитокинските хипотетички (TGF- β 1/CC, IL-4/TCC, IL-4/TCT, IL-10-ATC);

Заклучок. Хроничната пародонтална обојба кај македонската популација е во корелација со полиморфизмот кај алелите и генотиповите, кај следниве испитувани цитокински гени (TGF- β 1, TNF- α /GA, IL-4, IL-10).

Клучни зборови: хронична пародонтална обојба, цитокински полиморфизам

Технолошките придобивки од проучувањето на хуманиот геном го променија лицето на биолошките истражувања и ја ставија генетиката на чело на биомедицинските науки. Можноста од проучувањето на генетските мапи на организмите, како што е експерименталниот модел на глумците, како и на инфективните патогени, односно микроорганизмите (бактериите и вирусите), доведува до напредок во разбирањето на патолошките состојби врз генетска основа. Со тоа се создава потенцијал за увид и подобро разбирање на дијагностичките и терапевтските аспекти на бројни заболувања. Ова се однесува и на пародонталната болест, која се јавува со околу 30 % како хронична форма кај возрасната популација, со значителен процент 7-13% како многу напредната форма. Информациите кои што ги содржи хуманиот геном потенцијално водат кон подобро разбирање на контролните механизми кои што ја модулираат продукцијата на инфламаторните медијатори, а исто така и ја обезбедуваат пародонталната регенерација по спроведениот терапевтски третман (12).

Генетските варијанти се важни за класификација на болестите, дијагнозата и менаџирањето на пациентите со хроничните општи заболувања, во дефинирањето на етиологијата на овие заболувања и во евалуацијата на членовите од истото семејство (13). Некои хронични заболувања, вклучувајќи ја коронарната артериска болест, опструктивните белодробни заболувања и пародонтопатијата, имаат неколку слични фактори - клиничка појава во средни години, фамилијарна позитивна анамнеза и појава на патолошки микро промени во зафатените ткива уште во раната адолесценција (7).

Различниот генетски бекраунд креира различна предиспонираност и ја потенцира можноста различни етиолошки причинители да доведуваат до иста клиничка експресија на заболувањето (на пр. пародонталната болест може да биде предизвикана од различни бактериски видови). Откако ќе се развие заболу-

вањето, генетскиот код на афицираната особа може да влијае на текот на заболувањето во смисла на јачината и на појавата на можните компликации. Постојат четири типови на клинички студии кои што го потенцираат генетски поврзаниот ризик за развој на адултната пародонтопатија, а тие се:

- преваленција на пародонтопатија кај наследните заболувања (8),
- студии на близнаци (14,15),
- студии за генетската детерминираност во процесот на создавање на антитела од имунокомпетентните клетки (4),
- генетски студии за цитокинскиот полиморфизам спроведени врз пародонтопатични пациенти (10).

Иднината на генетските истражувања се состои во можноста да се групираат индивидуите со идентичен генетски тип, што би понудило високо персонализиран третман, кој ќе биде детерминиран во зависност од генетското ниво.

Студиите покажале дека некои имунолошки фенотипски карактеристики, кои што ја вклучуваат и цитокинската продукција, количеството (титарот) на одредени антитела и моноцитната функција, би можеле да бидат како резултат на специфичниот генетски полиморфизам (9). Варијациите во една или во повеќето од овие функции на цитокините доведува до различен одговор на домаќинот и различен степен на ткивна деструкција. Разликите во експресијата на цитокините, особено про-инфламаторните цитокини е од голем интерес за пародонталните истражувачи.

Од сето досега изнесено може да се заклучи дека генотипскиот статус влијае како предиспонирачки фактор за пародонтопатијата и јачината на нејзината експресија кај најголемиот број на заболени индивидуи, меѓутоа ниту една индивидуа не припаѓа во една универзална генотипска обликуваност. Влијанието од надворешните фактори како што се пушењето, оралната хигиена и терапевтскиот пристап е подеднакво значајно, заедно со различното расно, географско и етничко потекло врз појавата на пародон-

талната болест. Затоа се неопходни понатамошни истражувања на молекуларните механизми и кандидатски гени кои би биле инволвирани во пародонталната болест и кои ја одредуваат комплексната интеракција помеѓу домаќинот и патогените микроорганизми и надворешните влијанија.

Високо фреквентната застапеност на пародонталната болест во популацијата, нејзиниот прогресивен и хроничен карактер, како и сериозните последици коишто произлегуваат од еволуцијата на оваа заболување, ја наметнуваат потребата од нејзино рано откривање.

Имајќи ги предвид актуелните научно-стручни сознанија за улогата на цитокинскиот генски полиморфизам во експресијата на некои клучни медијатори на имуно-инфламаторниот одговор, што директно влијае врз предиспонираноста или отпорноста кон пародонталната инфекција и докажаните етнички разноликости во дистрибуцијата на генските варијанти ги поставивме и целите на овој труд:

- утврдување на присуството и процентуалната застапеност на полиморфизмите на цитокинските гени [интерлеукин (ИЛ) 1А(IL-1А), ИЛ-1 Б(IL-1В), ИЛ-1Р рецептор (IL-1R), ИЛ-1Р антагонист (IL-1RA), гама-интерферон (IFN γ), ИЛ-2(IL-2), ИЛ-4 (IL-4), ИЛ-4 рецептор алфа (IL-4R α), ИЛ-6 (IL-6), ИЛ-10 (IL-10), ИЛ-12Б(IL-12-В), ТРФ бета 1 (TGF- β 1), и ТНФ алфа (TNF- α)] кај пациенти со хронична пародонтопатија во македонската популација,
- утврдување на влијанието (протективно или асоцијативно) помеѓу секој одделен полиморфизам на цитокинските гени со хроничната пародонтопатија во споредба со контролната група кај македонската популација.

Материјал

Критериумите за избор за учество во студијата се однесуваа на следниве поединости: сите учесници беа од македонска нацио-

налност 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. Писмено беа запознаени со генетското испитување што требаше да се спроведе, пополнија и потпишаа информативна дозвола да учествуваат во оваа студија која беше одобрена од Комитетот на Министерството за образование и наука на РМ (Бр. 087405) и Етичкиот комитет на Медицинскиот факултет во Скопје.

Пациенти со пародонтална болест. На Клиниката за болести на устата и пародонтот при Универзитетскиот Стоматолошки Клинички Центар во Скопје беа проследени 132 пациенти со пародонтална болест на возраст $38,97 \pm 10,124$, по претходна селекција според интерно воспоставени критериуми. Сите пациенти од испитуваната група беа во добра општа состојба без податоци за компромитирачки состојби, како: (а) заболувања на оралните меки и тврди ткива во оралната празнина, со исклучок на кариес и пародонтопатија; (б) присуство на ортодонтски апарати во устата; (в) користење на системски антибиотици во период од три месеци пред вклучување во студијата; (г) бременост и лактација; (д) дијабет; (ѓ) примена на имуносупресивна терапија; (е) 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 исклучиво непущачи. Сите испитаници имаа најмалку 20 заби во устата.

Контролна група. Контролната група ја оформија 301 здрава индивидуа на возраст од 20-40 години без пародонтална болест, кои се јавиле за ДНК донација на Институтот за Имунобиологија и Хумана генетика во периодот од 2001-2002 година. Прелиминарните резултати од 125 здрави испитаници

се веќе објавени (21). Кај испитаниците кои ја оформија контролната група пародонтолошкиот преглед не покажа губиток на атачмент > од 2 мм.

Метод

Во методологијата на работа вклучивме клинички сегмент, параклиничко генетско тестирање и статистичка обработка на добиените податоци

Кај испитуваната група дијагнозата хронична (адултна) генерализирана пародонтопатија беше поставена врз база на клинички утврдени параметри и рентгенолошката верификација, а во согласност со критериумите на Американската академија за пародонтологија (ААП, 1999) (20), односно присуство на хроничен гингивит, крвавење на сондирање, присуство на пародонтален џеб (поголем или еднаков на 3 мм), хоризонтален или вертикален губиток на атачмент, кај $\geq 30\%$ од присутните заби. За секој заб, максималниот клинички губиток на атачмент (КГА), кој претставува растојание помеѓу емајлово-цементната граница и дното на пародонталниот џеб, беше одредуван со мерење на шест места на секој заб и беше забележувана максималната вредност.

Степенот на гингивална инфламација беше утврден по индексот на Loe-Silness (11):

- 0 - нормална гингива (бледо розева 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); (табела 1).

ТАБЕЛА 1. БАЗИЧНИ ПАРАМЕТРИ НА ИСПИТУВАНАТА ГРУПА (n=132 ПАЦИЕНТИ СО ХРОНИЧНА ГЕНЕРАЛИЗИРАНА ПАРОДОНТОПАТИЈА)

Параметар	Вредности
Жени	41,90 %
Мажи	58,10 %
Возраст (години)	38,97 ± 10,124*
Loe-Sillnes индекс (GI)	2,38 ± 0,675*
Крвавење на сондирање (BOR%)	82,52 ± 8,143*
Клинички губиток на атачмент (CAL)	5,18 ± 0,716*

* означува средна вредност ± SD

Геномската ДНК е изолирана со фенол-хлороформ методот од периферните леукоцити по строго определен протокол за работа: Издвојување на леукоцити од периферна крв по лизирање на еритроцитите; Дигестија на леукоцитите со протеиназа К; Фенол-хлороформна екстракција на ДНК; Преципитација на ДНК со апсолутен етил-алкохол; Мерење на преципитираната ДНК; Растворање на ДНК; Одредување на интактноста на ДНК (19).

Добиените примероци се складираани во Македонската банка за хумана ДНК.

За реализација на поставената цел ја користевме ПЦР (polimerase chain reaction-PCR) методата, која обезбедува исклучителна сензитивност и специфичност за детекција на целни твр. “таргет”-ни нуклеински киселини и претставува едно од најважните оружја во областа на молекуларната дијагностика.

За одредување на полиморфизмот на 13 цитокински гени се користевме со комплетот за генотипизирање цитокини, комерцијален комплет PCR-SSP (Heidelberg kit) на Институтот за Имунобиологија и Хумана генетика на Медицинскиот факултет во Скопје.

Комплетот се состои од различни формулации на смеси со различни лиофилизирани започнувачи (прајмери) кои се употребуваат за да се намножи геномската ДНК со употреба на пластичен носач од 96 ведренца наменета за два примероци.

Пројокол за работи. Методата се изведува со мешање на пуферот со примероците од човечката ДНК и Так ДНК полимера-зата распоредување во 96 ведренца, затворање и топлоотно циклирање. Се користат однапред дефинирани прајмери, со позната генска секвенца, кои се креирани во лабораториски услови. Доколку во испитуваниот примерок има присуство на секвенца која е компатибилна со познатиот прајмер, ќе дојде до нивно поврзување. Откога ќе заврши циклирањето, продуктите од ПЦР 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. Резултатите од фотографијата се интерпретираат со компјутерски програм или со специјални шеми приготвени за оваа намена.

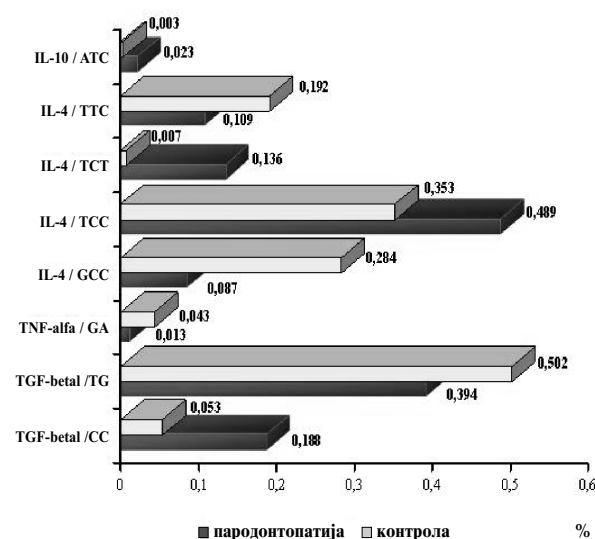
Статистичка анализа. За анализа на фреквенциите на цитокинските гени користен е компјутерскиот пакет Arlequin software version 2.000 (Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland) (17), како и Py Pop софтверскиот систем за популациона генетска анализа кој се користи за анализа на молекуларниот полиморфизам на испитуваните локуси, за фреквенција на алелите и генотиповите. Hardy-Weinberg еквилибриумот и Ewan-Watterson (22) статистичките методи се користени со цел да се испита присуството на селективните сили, кои имаат влијание врз дистрибуцијата на алелите (18).

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

Резултати

На табела 2 прикажани се резултати во врска со цитокинскиот генски полиморфизам (хаплотипови) кај пациентите со пародонтопатија и испитаниците од контролната група. На графикон 1 прикажани се хаплотиповите каде е регистрирана протективна улога, односно асоцијација во настанувањето на пародонтопатијата.

Значајни разлики во дистрибуцијата на хаплотиповите добивме за TGF- β 1, TNF- α , IL-4 и IL-10 цитокинските генски полиморфизми. Кај TGF- β 1 цитокиниот полиморфизам постои сигнификантна разлика во дистрибуцијата на CC (p<0,001) и на TGF- β 1/TG хаплотипот (p<0,01). Носителите на CC хаплотип имаат 4,09 пати поголем ризик да заболат од пародонтопатија OR=4,09 (95%CI 2,47-6,79). Наспроти овој наод носителите на TGF- β 1/TG имаат помал ризик да заболат од пародонтопатија OR=0,65 (95%CI 0,47-0,89). Кај TGF- β 1-GA постои сигнификантна разлика (p<0,05) во дистрибуцијата на GA хаплотипот што е врзано со помал ризик од пародонтопатија OR=0,29 (95%CI 0,09-0,98), за носителите на овој хаплотип.



Графикон 1. Процентуална дистрибуција на хаплотипскиот полиморфизам каде е регистрирана протективна, односно асоцијативна улога во настанувањето на пародонтопатијата

ТАБЕЛА 2. ХАПЛОТИПСКА ЗАСТАПЕНОСТ НА ЦИТОКИНСКИТЕ ПОЛИМОРФИЗМИ КАЈ ЗАБОЛЕНИТЕ ОД ПАРОДОНТОПАТИЈА НАСПРОТИ КОНТРОЛНАТА ГРУПА КАЈ МАКЕДОНСКАТА ПОПУЛАЦИЈА

Цитокин полиморфизам	Хаплотип	ПАРО		Контрола		OR	95% Ci	χ^2 / p naod	Fisher / p
		Број	Фрек.	Број	Фрек.				
TGF- β 1	CC	39	0,188	30	0,053	4,09	2,47-6,79	0,000***	/
	CG	85	0,409	250	0,444	0,86	0,62-1,19	0,37	/
	TG	82	0,394	282	0,502	0,65	0,47-0,89	0,01	/
	TC	2	0,01	0	0	/	/	/	0,07
TNF- α	AA	1	0,004	0	0	/	/	/	0,28
	AG	26	0,113	74	0,123	0,91	0,57-1,46	0,69	/
	GA	3	0,013	26	0,043	0,29	0,09-0,98	0,03*	/
	GG	200	0,87	502	0,833	1,33	0,86-2,06	0,20	/
IL-2	GG	72	0,327	178	0,31	1,08	0,78-1,51	0,64	/
	GT	7	0,032	14	0,024	1,31	0,52-3,30	0,56	/
	TG	81	0,368	244	0,425	0,79	0,57-1,09	0,14	/
	TT	60	0,273	138	0,24	1,18	0,83-1,69	0,35	/
IL-4	GCC	16	0,087	163	0,284	0,24	0,14-0,41	0,000***	/
	GCT	0	0	8	0,014	/	/	/	0,11
	GTC	0	0	4	0,007	/	/	/	0,33
	GTT	1	0,005	1	0,001	3,12	0,19-50,13	/	0,49
	TCC	90	0,489	202	0,353	1,75	1,25-2,45	0,001**	/
	TCT	25	0,136	4	0,007	22,33	7,66-65,09	0,000***	/
	TTC	20	0,109	110	0,192	0,51	0,31-0,85	0,01*	/
IL-6	TTT	32	0,174	80	0,14	1,29	0,83-2,03	0,26	/
	CA	72	0,316	172	0,288	1,15	0,83-1,61	0,39	/
	CG	2	0,009	9	0,015	0,58	0,13-2,72	/	0,38
	GG	153	0,671	420	0,698	0,88	0,64-1,23	0,46	/
IL-10	GA	1	0,004	1	0,002	2,65	0,16-42,51	/	0,47
	ACA	7	0,032	12	0,02	1,59	0,62-4,09	0,33	/
	ACC	72	0,324	177	0,26	1,14	0,82-1,59	0,49	/
	ATA	46	0,207	161	0,269	0,71	0,49-1,03	0,07	/
	ATC	5	0,023	2	0,003	6,87	1,32-35,65	/	0,02*
	GCA	1	0,005	0	0	/	/	/	0,27
	GCC	91	0,41	246	0,411	0,99	0,73-1,36	0,97	/

p<0,05*

p<0,01**

p<0,001***

ПАРО - Хронична пародонтопатија, Број-апсолутен број; Фрек.-фреквенција; CI confidential interval; * статистички значајно

За IL-4/GCC и IL-4/TTC хаплотипот постои сигнификантна разлика ($p < 0,001$) и ($p < 0,01$) во дистрибуцијата, помеѓу двете испитувани групи. Носителите на GCC хаплотипот имаат помал ризик да заболат од пародонтопатија OR=0,24 (95%CI 0,14-0,41). Носителите на IL-4/TTC хаплотипот исто така имаа значајна протективна улога OR=0,51 (95%CI 0,31-0,85) за развојот на пародонталната болест.

Кај IL-4/TCC и IL-4/TCT цитокинските полиморфизми постои сигнификантна разлика ($p < 0,001$) во дистрибуцијата. Носителите на TCC хаплотипот имаат 1,75 пати поголем ризик да заболат од пародонтопатија OR=1,75 (95%CI 1,25-2,45), а носителите на TCT хаплотипот имаат 22,33 пати поголем ризик OR=22,33 (95%CI 7,66-65,09), што им дава асоцијативна улога во настанувањето на пародонтопатијата.

Кај IL-10 хаплотипскиот полиморфизам постои сигнификантна разлика ($p < 0,01$) во дистрибуцијата на ATC хаплотипот што е врзано со 6,87 пати поголем ризик од пародонтопатија OR=6,87 (95%CI 1,32-35,65), за носителите на ATC хаплотипот.

Во останатите анализи на полиморфизмот на хаплотиповите кај испитуваните цитокински гени, не е утврдена нивна протективна улога, односно асоцијација со развивањето на пародонтопатијата.

Дискусија

Корисните генетски информации се од непроценливо значење во терапевтските стратегии насочени кон превенирањето на развојот на пародонтопатијата. Имено практичната примена на генетската предиспозиција би понудила потенцијални промени во раното детектирање, приодот и третманот на пародонталната болест. Генските варијабилности на цитокинските гени кај индивидуите имаат влијание врз системското ниво на инфламаторните медијатори преку кои го одредуваат степенот и јачината на инфламаторниот одговор кај пародонталната афекција со периопатогени. Докажаните најчести

високо-ризични полиморфизми, се наследуваат со генерации и создаваат кумулативни ефекти кои оформуваат еден високо-ризичен генетски профил.

Од дистрибуцијата на хаплотиповите аранжирани како алели за да ги согледаме сите можни комбинации на дадените цитокински полиморфизми, ги добивме следниве сигнификантни наоди. Кога ги групиравме алелите за двата анализирани TGF бета 1 полиморфизми добивме четири можни комбинации на хаплотипови, од кои хаплотипот CC имаше силна асоцијативна поврзаност со пародонталната болест, па носителите на овој хаплотип имаат 4 пати поголема веројатност да развијат пародонтопатија во однос на другите хаплотипови. Ова го потврдува нашиот наод кај алелската дистрибуција на TGF бета 1 полиморфизмот каде што носителите на C алелот покажаа силна асоцираност со болеста. Од друга страна TG хаплотипската фреквенца се покажа како протективна, поради значајно поголемата дистрибуција кај контролната група, што уште еднаш ни дава за право да ја истакнеме протективната улога на T алелот за TGF бета 1 цитокинскиот полиморфизам за пародонталната болест кај македонската популација.

TNF (tumor necrosis factor) алфа има најглавна улога во регулацијата на одговорот кон грам негативните бактерии, има улога во реакцијата на вродениот имун систем кон инфламацијата и претставува значајна врска помеѓу акутното воспаление и специфичниот имун одговор (2). Тој претставува продукт на единствен генски локус сместен помеѓу главниот ткивно совпаѓлив комплекс на шестиот хромозом кај луѓето. Локалните ефекти на малите количини на TNF се критични за ефикасна одбрана од микроорганизмите, што го прави особено значаен во патогенезата на пародонталното заболување. Така на пример покажано е неговото силно влијание врз ресорпцијата на алвеоларната коска и неговата вклученост во деградација на сврзното ткиво (1), па отаму идејата дека индивидуалната приемчивост за пародонтопатија би можела да биде поврза-

на со генетски детерминираниите разлики во продукцијата на TNF алфа.

Авторите кои се занимавале со оваа проблематика откриле неколку полиморфизми на генот на TNF алфа, кои што биле одговорни за промени во транскрипционата активност, а на што се должи и промената во фенотипската експресија на TNF алфа (6). И во овој случај, како и во полиморфизмот на другите гени постојат значителни етнички разлики. -308 и -238 полиморфизмите на TNF алфа имале значително поголема преваленца кај белците, додека неколку други полиморфизми ексклузивно се јавуваат во Јапонската популација. Постојат наоди дека G-A промената на позиција-308 доведува до 2-3 пати поголема транскрипциона активност на TNF алфа, откако тој ќе биде стимулиран со бактериски липополисахариди (23). Доказано е дека стимулираните мононуклеари од периферна крв кај пациенти со пародонтопатија, кај кои што има транзиција на аденин на -308 позицијата, продуцираат сигнификантно повисоки вредности за TNF алфа, кои што кога организмот е изложен на бактериски стимулус доведуваат до деструктивна имуна реакција, за разлика од индивидуи кои имаат гуанин на таа позиција (6). Овој податок треба да се докаже низ поголем број на случаи и студии, затоа што врската помеѓу -308 TNF алфа полиморфизмот и пародонтопатијата би била логична само доколку разликата во алелската дистрибуција, покрај промени во транскриптивната активност доведува и до сигнификантни промени на TNF алфа експресијата во инфламраното пародонтално ткиво. Иако биолошките вредности за TNF алфа не се во целост потврдени кај сите индивидуи кај кои е докажан TNF алфа полиморфизмот, се претпоставува дека овој генотип би можел да биде прогностички маркер за пародонтопатијата.

Во нашето испитување на хаплотипската дистрибуција на двата полиморфизми за TNF алфа -308 и -238, добивме релативно хомогена дистрибуција каде што од 230 вкупно добиени хаплотипови кај сите пациенти со пародонтопатија, дури двеста беа хомозиготи

за GG алелите, само 26 имаа аденин на -308 позицијата и гуанин на -238, што значи AG хаплотип, кои што резултати не покажаа статистички значајна разлика со контролната група. Сигнификантност добивме само за носителите на GA хаплотипот кој што има протективна улога во развивањето на пародонтопатијата кај македонската популација. Овој наш наод е во согласност со некои автори, кои опишале сигнификантни разлики во алелската дистрибуција кај пациенти со напредната пародонтопатија и здрави индивидуи и тоа многу интересен е податокот дека TNF алфа G алелот на позиција -308 бил пофреквентен значајно кај пациентите со пародонтопатија (3). Сепак, други автори го сметаат најчесто TNF алфа -308 A алелот како генетски маркер за приемчивост кон пародонтопатија поради неговата способност да ја влијае врз продукцијата на TNF алфа. Овие разлики во наодите може да ги протолкуваме врз основа на фактот дека хроничната пародонтопатија иако има силен генетски беграунд сепак во голема мерка зависи и од влијанијата од надворешната средина кои делуваат врз патогенетските случувања, како и докажаните популациски разлики (5).

Анализата на хаплотипската дистрибуција за алелите на IL-4 генот на трите различни СНПс -1098, -590 и -33 кај нашата група испитаници покажа исклучително значајни разлики во однос на контролната група. Хаплотиповите TCC и GCC покажаа силна протективна улога во однос на пародонталната болест кај македонската популација, затоа што од анализираните вкупно 572 хаплоти кај контролната група беа застапени со скоро 50 %, односно со 273, додека кај испитуваната група од вкупно 184 анализирани хаплотипови на овие отпаѓаа само 36. За разлика од нив TCC хаплотипот покажа асоцијативна врска со пародонтопатијата, каде што статистичката обработка покажува дека носителите на TCC хаплотипот имаат 1,75 пати поголем ризик од пародонтопатија во однос на оние кои го немаат овој хаплотип. Исто така многу силна асоцирано-

ст со пародонтопатијата покажа и ТСТ хаплотипот, кој што го имаа само 4 од 572 хаплотипови кај контролната група и за кој статистичката анализа покажа 22,33 пати поголем ризик за пародонтопатија кај носителите на овој хаплотип. Ова е во потполна согласност со нашиот претходен наод за алелската дистрибуција на IL-4 полиморфизмите, каде што носителите на Т алеот на позиција -1098 и -33 покажаа силна асоцираност со пародонталната болест кај македонската популација.

Од хаплотипската анализа за IL-10 полиморфизмите кај нашата испитувана група од вкупно 222 анализирани, најзастапени беа АСС, АТА и GСС хаплотиповите, коишто исто така беа најмногу застапени и кај контролната група. Статистички сигнификантна разлика добивме единствено за АТС хаплотипот, кој што иако беше редок и кај двете групи, кај испитуваната група беше со фреквенција од 0,023 наспроти контролната каде што имаше фреквенција од само 0,003, па статистичката анализа покажа 6,9 пати поголем ризик кај носителите на овој хаплотип да развијат пародонтопатија. Scarel(16) во својата студија испитувајќи ја хаплотипната фреквенција на IL-10 не добил статистички значајни разлики помеѓу белци заболени од пародонтопатија наспроти контролната група, меѓутоа укажал на тренд на преминација на хаплотипот АСС кај контролната група кој што докажано делува на секреција на повисоко количество на IL-10, наспроти преминација на АТС хаплотипот кај групата со хронична пародонтопатија. Неговиот наод за значителна фреквенција на хаплотипот АТС кај испитуваната група, е во потполна согласност со нашиот наод за асоцијативната улога на АТС хаплотипот со пародонтопатијата кај македонската популација.

Со резултатите од нашата студија за прв пат добивме сознанија за цитокиниот генски полиморфизам и неговата дистрибуција кај македонската популација, како и неговото влијание врз степенот на ткивната деструкција и интензитетот на инфламацијата кај

пародонталната болест, како едно хронично заболување, кај кое мултиплие генетски фактори имплицираат сигнификантен клинички ризик. Сознанијата извлечени од ова истражување заедно со понатамошната суптилна анализа на добиените резултати од нашата студија, ќе отворат простор за нов терапевски пристап кај генски сукцептибилните индивидуи.

Значајна асоцираност со хроничната пародонтопатија, почнувајќи од $p < 0,5$, најдовме за следниве цитокински полиморфизми

Протективна - со цитокинските хаплотипови (TGF- β 1 /TG, TNF- α /GA, IL-4/GCC, IL-4/TTC); Асоцијативна - со цитокинските хаплотипови (TGF- β 1/CC, IL-4/TCC, IL-4/TCT, IL-10-ATC);

Хроничната пародонтопатија кај македонската популација е во корелација со полиморфизмот кај хаплотиповите и хаплотипните зиготи кај следниве испитувани цитокински гени (TGF- β 1, TNF- α , IL-4, IL-10).

Нашите резултати кај Македонската популација 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.

ASSOCIATION OF HAPLOTYPE CITOKINE GENE POLYMORPHISMS AND CHRONIC PERIODONTITIS WITH MACEDONIANS

Atanasovska-Stojanovska A., Nakova M., Popovska M., Trajkov D., Spiroski M.

Summary

Polymorphisms of cytokine genes, which role in inflammatory process has been proved, affects the concentration of inflammatory mediators within the tissues, modulates the immune response, thus it can determinate

acceptability of periodontal disease, as chronic inflammatory process.

Considering the current scientific findings about the role of the cytokine genetic polymorphisms on predisposition or resistance towards periodontal disease, and the proved ethnical differences in the distribution of the genetic variants, we have set the aim of this study:

- to determine the presence and percentage of polymorphisms of the cytokine genes (interleukin (IL)1 alpha (IL 1 α), IL-1 beta (IL-1 β), IL-1 receptor (IL-1R), IL 1 R antagonist (IL-1RA), gamma-interferon (IFN γ), IL-2, IL-4, IL-4 receptor alpha (IL 4R α), IL-6, IL-10, IL-12B, TGF beta 1 (TGF- β 1), and TNF- α , within the Macedonian patients with periodontal disease.
- to determine the influence (protective or associate) between each polymorphisms of the cytokine genes with chronic periodontal disease, in comparison to the control group with Macedonian population.

In order to achieve the set aim we have formed an examined group consisting of 132 patients with chronic periodontal disease diagnosed. 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, without periodontal disease.

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 Genetics. From all the participants in the study, both control and examined group, vein blood sample was taken, and DNA was isolated, in order to establish the changes in genetic code. Polymorphisms of 13 cytokine genes was performed with commercial kit PCR-SSP (Heidelberg).

We have found a significant link, starting from $p < 0,05$ for the following polymorphisms: Protective with cytokine haplotype (TGF- β 1 /TG, TNF- α /GA, IL-4/GCC, IL-4/TTC); Associative - with cytokine haplotype (TGF- β 1/CC, IL-4/TCC, IL-4/TCT, IL-10-ATC);

Chronical periodontal disease among the Macedonian population correlates with the polymorphism of aleli and genotypes with the following examined genes (TNF- α , TGF- β 1, IL-4, IL-10,).

Key words: chronical periodontal disease, cytokine polymorphism.

Литература

1. Assuma R, Oates T, Cohran D, et al IL-1 and TNF antagonist inhibit the inflammatory response and bone loss in experimental periodontitis. *J Immunol* 1998;160:404-409
2. Beutler B. Cerami A. The biology of cachectin/TNF-alpha primary mediator of the host response. *Ann Rev Immunol* 1989;7:625-655.
3. Craandijk, J., van Krugten, M. V., Verweij, C. L., van der Velden, U. & Loos, B. G. (2002) Tumor necrosis factor-alpha gene polymorphisms in relation to periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology* 29, 28-34.
4. D'Aiuto, F., Parkar, M., Brett, P. M., Ready, D. & Tonetti, M. S. (2004) Gene polymorphisms in pro-inflammatory cytokines are associated with systemic inflammation in patients with severe periodontal infections. *Cytokine* 28, 29-34.
5. Folwaczny, M., Glas, J., Torok, H. P., Mende, M. & Folwaczny, C. (2004) Lack of association between the TnF alpha G -308 A promoter polymorphism and periodontal disease. *Journal of Clinical Periodontology* 31 449-453.
6. Galbraith, G. M., Steed, R. B., Sanders, J. J. & Pandey, J. P. (1998) Tumor necrosis factor alpha production by oral leukocytes: influence of tumor necrosis factor genotype. *Journal of Periodontology* 69, 428-433
7. Genco R.J. van Dyke T.E. Levine R.D. et al Molecular factors influencing neutrophil defects in periodontal diseases *J Dent Res.* 651986 1379-1391.
8. King RA, Rotter JI, Motulsky AG. The approach to genetic bases of common diseases. In: King RA, Rotter JI, Motulsky AG, editors. The genetic basis of common diseases. New York: Oxford University press www.oxfordinc.com; 1992.
9. Kobayashi T, van der Pol WL, van de Winkel JG, Hara K, Suigita N, Westerdaal NA, Yoshie H, Horigome T. Relevance of IgG receptor III b (CD16) polymorphism to handling of Porphyromonas gingivalis: implications for the pathogenesis of adult periodontitis. *J Periodontol Res* 2000;35:65-73.
10. Kobayashi T, Westerdaal NA, Miyazaki A, Relevance of IgG Fc receptor polymorphism to recurrence of adult periodontitis in Japanese patients. *Infect Immun* 1997;65(9):3556-60.

11. Loe H., Silness J.: Periodontal disease in pregnancy I Prevalence and severity Acta Odont. Scand. 21:553 1963.
12. McGuire MK, Nunn ME. Prognosis versus actual outcome. 4. The effectiveness of clinical parameters and PST genotype in accurately predicting prognosis and tooth survival. J Periodontol 1999;70:49-56.
13. Michalovicz BS. Genetic and heritable risk factors in periodontal disease. J. Periodontol 1994;65(5 Suppl):479-88
14. Michalovicz BS., Wolff D., Klump J.E. et al Periodontal bacteria in adult twins. J Periodontol. (1999) 70: 263-273.
15. Michalowicz BS, Aeppli DP, Kuba RK, A twin study of genetic variation in proportional radiographic alveolar bone height. J. Dent Res 1991; 70(11):1431-5.
16. Scarel-Caminaga, R. M., Trevilatto, P. C., Souza, A. P., Brito, R. B., Camargo, L. E. & Line, S. R. (2004) Interleukin 10 gene promoter polymorphisms are associated with chronic periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology* 31, 443-448.
17. 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.
18. Slatkin M, Excoffier L. Testing for linkage disequilibrium in genotypic data using the Expectation-Maximization algorithm. *Heredity*. 1996;76 (Pt 4):377-83.
19. Spirovski M., Trajkov D., Petlichovski A., Strezova A., Efinanska-Mladenovska O. Praktikum po imunologija i humana genetika. Medicinski fakultet, Skopje, 2006.
20. The American Academy of periodontology. Epidemiology of periodontal diseases (position paper). J Periodontol 1996;935-945.
21. Trajkov D., Arsov T., Petlichovski A., Strezova A., Efinanska-Mladenovska O., Spiroski M. Cytokine gene polymorphisms in population of ethnic Macedonians Croat Med. J. 2005;46(4):685-692.
22. Watterson GA. Heterosis or neutrality? *Genetics*. 1977;85:789-814.
23. Wilson, A. G., Symons, J. A., McDowell, T. L., McDevitt, H. O. & Duff, G. W. (1997) Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 94, 3195-3199.