

## ЦИТОКИНСКА ЕКСПРЕСИЈА КАЈ ГИНГИВАЛНАТА И РАНАТА ПАРОДОНТАЛНА БОЛЕСТ

Стефановска Е.<sup>1</sup>, Накова М.<sup>1</sup>,  
Ивановски К.<sup>1</sup>, Ѓорѓоски И.<sup>2</sup>,  
Радојкова-Николовска В.<sup>1</sup>, Ристоска С.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>СТОМАТОЛОШКИ ФАКУЛТЕТ - Скопје, Катедра за болести на устата и пародонтот,  
<sup>2</sup>ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ - Скопје, Институт за биологија

## CYTOKINE EXPRESSION AT GINGIVITIS AND EARLY PERIODONTITIS

Stefanovska E.<sup>1</sup>, Nakova M.<sup>1</sup>,  
Ivanovski K.<sup>1</sup>, Gjorgoski I.<sup>2</sup>,  
Radojkova-Nikolovska V.<sup>1</sup>, Ristoska S.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>FACULTY OF DENTAL MEDICINE – Skopje, Department of oral pathology and periodontology,  
<sup>2</sup>FACULTY FOR NATURE SCIENCES - Skopje, Institute for biology

**Вовед:** Нерестриктивна продукција на некои цитокини доведува до специфично заболување или евентуална неговa прогресија. Бидејќи доминантна карактеристика на пародонталната афекција претставува ресорпцијата на алвеоларната коска, специфично внимание е посветено токму на улогата на овие медијатори (IL1- $\alpha$ , IL1- $\beta$ , IL-6, IL-8 TNF- $\alpha$ ) во патогените процеси и нивното влијание на коскената деструкција. Ова ја зголемува можноста за објективна дијагноза на стадиумот на инфламацијата преку мониторинг на цитокинските нивоа и нивниот профил во инфламаторните региони. Тргнувајќи од овие сознанија ја оформивме и **целта** на истражувањето: да ја потврдиме можноста за асоцираност и вовлечаност на инфламаторните цитокини (IL1- $\alpha$ , IL1- $\beta$  и TNF- $\alpha$ ) и нивната модулација во клиничката експресија на гингивалната и раната пародонтална болест.

**Материјал и метод:** За реализација на оваа студија истражувањето беше спроведено кај 90 пациенти на Клиниката за болести на устата и пародонтоот на Универзитетскиот стоматолошки клинички центар во Скопје, поделени во три групи. Првата, контролна група од 30 здрави пациенти, втората група од 30 пациенти со гингивална инфламација и третата група исто така од 30 пациенти со иницијална пародонтална болест. Од клиничките параметри беа ноширани: ИДП (Silness-Loe),

**Introduction:** Nonrestrictive production of some cytokines lead to specific disease and eventual their progression. Therefore the dominant characteristic of periodontal affection is resorption of alveolar bone, specific attention is dedicated just to role of these mediators (IL1- $\alpha$ , IL1- $\beta$ , IL-6, IL-8 TNF- $\alpha$ ) in pathogenic processes and their main influence of bone destruction.

This enhanced the possibility to objectively diagnose the stage of inflammation through monitoring the cytokines levels and their profile at inflamed areas.

Starting with these cognitions, we determined the **aim** of the study: to affirm the possible association and involvement of inflammatory cytokines (IL1- $\alpha$ , IL1- $\beta$  and TNF- $\alpha$ ) and their modulation in clinical expression of plaque induced gingival inflammation and early periodontitis.

**Material and methods:** For realizing our study the research was carried out among 90 patients at the Clinic of oral pathology and periodontology at the University Dental Clinical Center in Skopje divided in three groups. The first, control group with 30 health patients, second group with 30 patients with gingivitis and third group, also with 30 patients with initial periodontal disease. From clinical assays we noted; IDP (Silness-Loe), IGI (Loe-Silness) and AEM (AAP,1999).

ИГИ (Loe-Silness) и индекс на АЕМ (AAP, 1999). Лабораторискиот испитување за детекција на џингивално-флуидниот ниво на инфламаторните цитокини (IL-1  $\alpha$ , IL-1  $\beta$  и TNF- $\alpha$ ) беа реализирани со комерцијално достапниот ELISA метод.

**Резултати:** Гингивално-флуидниот концентрација на инфламаторните цитокини (IL-1  $\alpha$ , IL-1  $\beta$  и TNF- $\alpha$ ) во нашата студија ги потврдија нивните статистички значајно елевирани нивоа кај сите испитувани групи ( $p < 0,05$ ). За IL-1  $\alpha$  кај здравите испитаници овие нивоа изнесуваа 19,3 pg/ml, кај испитаниците со џингивитис 28,27 pg/ml, а кај оние со пародонтопатија тие ридно се зголемија на 59,92 pg/ml. Нивоата за IL-1  $\beta$  кај здравите изнесуваа 1,39 pg/ml, кај испитаниците со џингивитис 2,05 pg/ml, а кај пародонтопатичните 5,25 pg/ml. Исто така и за TNF- $\alpha$  кај здравите индивидуи овие вредности беа 12,29 pg/ml, кај џингивитисите се зголемија на 15,50 pg/ml, а кај оние со пародонтопатија покажаа риден скок на 33,72 pg/ml.

**Заклучок:** Зголемените концентрации на инфламаторните медијатори (IL-1  $\alpha$ , IL-1  $\beta$  и TNF- $\alpha$ ) би можеле да претставуваат репрезентивни на претклиничката иницијација на инфламаторните процеси и потврдни индикатори на џингивалната и пародонталната деструкција.

**Клучни зборови:** инфламаторни цитокини, гингивален флуид, дентален плак, гингивална инфламација.

Пародонталната болест е дефинирана како инфективен процес кој се карактеризира со деструкција на сврзно ткиво и субеквентна загуба на пародонтална инсерција и ресорпција на алвеоларна коска (1). Податоците за пародонталните заболувања од публикуваните клинички студии во последниве години даваат многу подобри објаснувања за природата и историјата на ова заболување. Пародонталните лезии се препознаваат како хронични состојби со ралтивно краток период на егзацербација, а подолг период на ремисија (2). Одговорот на домаќинот кон пародонталните патогени микроорганизми може да биде истражуван на многу начини. Најмалку инвазивните истражувања ги

Laboratory assays for detection of gingival-fluid levels of inflammatory cytokines (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ ) were realized by commercial available ELISA method.

**Results:** Gingival fluid concentration of inflammatory cytokines (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  in our study confirmed statistics significant elevated levels in all examine groups. For IL-1 $\alpha$  at health examiners these levels were 19,3 pg/ml, at the examiners with gingivitis 28,27pg/ml, and at the examiners with initial periodontal disease levels they were rapidly growth from starting level of 28,27 pg/ml to 59,92 pg/ml. Levels for gingival fluid IL-1 $\beta$  concentration at the health examinations which was 1,39 pg/ml, at the examiners with gingivitis growth to 2,05 pg/ml and at the examiners with initial periodontal disease was 5,25 pg/ml.

Also, for TNF- $\alpha$  at health individuals these levels from 12,29 pg/ml grow up to 15,50 at individuals with gingivitis, thus at individuals with early periodontitis rapidly growth to 33,72 pg/ml.

**Conclusion:** Elevated levels of these examine mediators of inflammation (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ ) in our study can be represent of preclinical initiation of inflammatory process and potent indicators of gingival and periodontal destruction.

**Key words:** cytokines, gingival fluid, dental plaque, gingival inflammation.

Periodontal disease is defined as infective process which is characterize with destruction on connective tissue and subsequently loss of periodontal insertion and resorption of alveolar bone (1). The dates of periodontal disease from published clinical studies in last years gives much better explanations for the nature and history of this disease. Periodontal lesions are recognized as chronic conditions with relative short period of exacerbation, but with longer period of remission (2). Host response of periodontal pathogenic microorganism can be research at many ways. Least invasive approach included analyzes of gin-

вклучуваат анализите на гингивалниот флуид, инфламаторен ексудат кој циркуферентно се ослободува во гингивалниот сулкус. Овој ексудат е продукт на крвниот срум, примарно составен од инфламаторни клетки, многу повеќе забележителни полиморфонуклеарни леукоцити (ПМН) и срумски протеин (3). Со идентификацијата и транскрипцијата на цитокините и прогресот на моноклоналните антитела кои се користат за нивна идентификација, целуларните имуни активности во гингивалниот флуид денес може да се истражуваат. Неспецифичниот одбранбен систем во гингивалниот флуид може да се детерминира преку цитокините и интерлеукините, на кој начин е овозможено да се идентификуваат афектираните регии кои претставуваат ризик за пациентот. Инфламаторните цитокини се дефинирани како цитокини (солубилни протеини), кои се индуцираат како резултат на инфламаторниот одговор и кои се тесно асоцирани со еволуцијата и прогресијата на пародонталното заболување. Како такви се наброени: IL1- $\alpha$ , IL1- $\beta$ , IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , кои генерално се класифицирани како инфламаторни цитокини и истите се обсервирани како елевирани нивоа во гингивален флуид кај пациенти со пародонтална болест (4, 5). Овие цитокини се декларирани како потентно корисни, дијагностички и прогностички маркери на активноста на пародонталното заболување и процесот на заздравување. Со оглед на фактот дека доминантна карактеристика на пародонталната афекција претставува ресорпцијата на алвеоларната коска, специфично внимание е посветено токму на улогата на овие медијатори во патогенетските процеси и нивното главно влијание на алвеоларно-коскената деструкција. Кога се генерираат инфламаторните одговори во било кое ткиво, експресијата на различни цитокини вообичаено се зголемува и тогаш стартува дисрегулацијата на локалниот имун одговор. Многубројни истражувања потврдуваат дека нерестриktivна продукција на цитокини доведува до специфично заболување и евентуална негова прогресија. Ова ја

гингивал флуид, inflammatory exudate which release circumference in gingival sulcus. This exudate is a product of blood serum, primary consists of inflammatory cells, much more noticable polimorphonuclear leukocytes (PMN) and serums proteins (3). With identification and description of cytokines and progress of monoclonal antibodies which use for their identification, cellular immune activities in gingival fluid today can be research. Nonspecific response system in gingival fluid can be determined by cytokines and interleukins which will be enable to identify the affected regions which are risks for patient. Inflammatory cytokines are defined like cytokines (soluble proteins), which are induce as a result of inflammatory response and which are close associated with evolution and progression of disease. Like that are numbered: IL1- $\alpha$ , IL1- $\beta$ , IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , which generally classify like inflammatory cytokines and the same are observed like elevated levels in gingival fluid at patients with periodontal disease (4, 5). These cytokines are declared like potently useful diagnostic and prognostic markers of activity of periodontal disease and the process of repairing. Therefore the dominant characteristic of periodontal affection is resorption of alveolar bone, specific attention is dedicate just to role of these mediators (IL1- $\alpha$ , IL1- $\beta$ , IL-6, IL-8 TNF- $\alpha$ ) in pathogenic processes and their main influence of alveolar bone destruction.

When inflammatory response are generate in any one tissue, the expression of different cytokines is usually growth and then starting dis-regulation of local immune response. Many research confirmed that nonrestrictive production of cytokines lead to specific disease and eventual their progression. This enhanced the possibility to objective diagnose the stage of inflammation through monitoring the cytokines levels and their profile at inflamed areas.

зголемува можноста за објективна дијагноза на степенот на инфламацијата преку мониторинг на цитокинските нивоа и нивниот профил во инфламираните регии.

Тргувајќи од овие сознанија, ја оформивме и целта на нашата студија: да ја утврдиме можната асоцираност и involviranost на инфламаторните цитокини (IL1- $\alpha$ , IL1- $\beta$  и TNF- $\alpha$ ) и нивната модулација во клиничката експресија кај плак-индуцираниот гингивит и раната пародонтална болест. За нејзина реализација ги детерминиравме: степенот на инфламаторните промени во пародонталното ткиво, проследени преку индексите на пародонталното здравје (IDP, IGI и AEM), и гингивално-флуидните нивоа на инфламаторните цитокини (IL1- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  и TNF- $\alpha$ ) кај испитуваните групи на пациенти како и кај контролната група.

## Материјал и метод

На Клиниката за болести на устата и пародонтот, на Универзитетскиот Стоматолошки клинички центар во Скопје проследивме 90 пациенти поделени во три групи. Првата група која ја претставуваше контролната група на пациенти беше составена од 30 пациенти без знаци за гингивална или пародонтална болест (верифицирана клинички). Втората група, составена од 30 пациенти со дијагностицирана гингивална болест со различен степен на клиничка експресија, сите без знаци за иницијална алвеоларна коскена деструкција (верифицирана клинички и радиографски). Третата група исто така беше со 30 пациенти и дијагностицирана иницијална, рана пародонтална болест (AAP, верифицирана клинички и радиографски). Испитаниците немаа општи заболувања и не беа приматели на антибиотска терапија во последните три месеци. Кај нив беа направени клинички и лабораториски испитувања. Од клиничките испитувања беа нотирани: IDP (Silness-Loe), IGI (Loe-Silness), и индекс на AEM (AAP, 1999). Лабораториските испитувања за детекција на гингивално-флуидните нивоа на инфламаторните ци-

Starting with these cognitions, we determined the aim of the study: to affirm the possible association and involment of inflammatory cytokines (IL1- $\alpha$ , IL1- $\beta$  and TNF- $\alpha$ ) and their modulation in clinical expression of plaque induced gingival inflammation and early periodontitis. For its realization we determined: the stage of the inflammatory changes in periodontal tissue, proceed by indexes of periodontal health (IDP, IGI and AEM), and gingival fluid levels of inflammatory cytokines (IL1- $\alpha$ , IL1- $\beta$ , and TNF- $\alpha$ ) at examined groups of patients and also at the control group.

## Material and method

At the Clinic of oral pathology and periodontology at the University Dental Clinical Center in Skopje we proceed 90 patients divided in three groups. The first group which represent the control group, was consist of 30 health patients without any signs for gingival or periodontal disease (verified clinically). Second group was consist with 30 patients with diagnosed gingivitis in different stage of expression, all without signs of initial alveolar bone destruction (verified clinically and with radiogram).

The third group also consist with 30 patients and diagnosed early stage of chronic periodontal disease (according to classification of AAP 1999, also verified clinically and with radiogram). The examine patients did not have any common diseases and did not take antibiotics therapy in last three months. At the examine groups were done clinical and laboratories assays. From clinical assays we noted; IDP (Silness-Loe), IGI (Loe-Silness) and AEM (AAP,1999). Laboratory assays for detection of gingival-fluid levels of inflammatory cytokines (IL-1 $\alpha$ , IL1- $\beta$  and TNF- $\alpha$ ) were

токини (IL1- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  и TNF- $\alpha$ ) беа реализирани на Институтот за биологија при Природно-математичкиот факултет во Скопје. Гингивалниот флуид го колекциониравме со перио филтер хартиени стрипови од мезиобукалните површини на максиларните моляри од испитуваните регии во времетраење од 30 секунди, со аплицирање на филтер стриповите околу влезот во гингивалниот сулкус, во согласност со генералниот став дека начинот на колекционирање кој обезбедува најмалку интерференци се местото и времетраењето на колекционирањето на флуидот. Забите од испитуваните регии беа претходно испрани со вода, кај нив беше елиминиран супрагингивалниот плак и истите беа изолирани заради минимизирање на евентуалната саливарна контаминација. Потоа го колекциониравме флуидот во микрокивети со 0,5 мл солен фосфатен пуффер (PbS), со pH=7,2, а потоа смрзнат на t=-20 C до денот на анализирањето. Пред самата анализа примероците беа центрифугирани, а потоа анализирани за (IL1- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  и TNF- $\alpha$ ) со комерцијално достапниот ELISA метод.

Податоците беа статистички обработени со стандарни статистички параметри со компјутерската програма "Statistics for Windows"-7.

## Резултати

Табела 1 ја покажува возрасната дистрибуција на испитуваните групи. Здравите испитаници имаат просечна возраст од 17,6 години, пациентите со гингивитис 23,9 години и пациентите со иницијална пародонтална болест 34,6 год.

Табела 2 ги презентира индексните вредности за дентален плак (ИДП) кај испитуваните групи. Овие вредности ја потврдуваат статистичката сигнификантност на разликите на вредностите во рамките на сите испитувани групи ( $p < 0,05$ ).

Табела 3 ги покажува вредностите за гингивалната инфламација (ИГИ). Овие индексни вредности укажуваат на статистичка значајност на разликите кај испитаниците со

realized at the Institute for biology at the Faculty for nature sciences in Skopje. Gingival fluid was collected with filter periopaper from mesiobuccal surfaces of maxillary molars from examine areas with action period for 30 seconds, according the generally state that the way of collection which assure least interferences are the place and the action time of collection the fluid, with application the filter paper at the orifice of gingival sulcus. Dens from the examine areas previously were washed, eliminated supragingival plaque and isolated for minimized the eventual salivary contamination. Than we collected the gingival fluid in microcivettes with 0,5 ml phosphate buffered saline, pH=7,2 and then frozen on the - 80 C to the day of analyze.

Before analyzes the samples were centrifugate and then analyze for IL1- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ , with commercial available ELISA method. The dates were statistical arrange with standard statistics parameters with computers programs "Statistics for Windows"- 7.

## Results

Table 1 shows the age distribution of examine groups. Health examiners have percentage age values of 17,6 years, patients with gingivitis 23,9 years, and patients with initial periodontal disease 34,6 years.

Table 2 shows the index values of dental plaque (IDP) at examine groups. Index levels of dental plaque confirmed the statistics significant differences in the range of all examine groups.

Table 3 shows the values of gingival inflammation index (IGI). This index values shows statistics significant differences at the examine groups with gingivitis and early periodontitis, matter of

**ТАБЕЛА 1. ВОЗРАСНА ДИСТРИБУЦИЈА НА ИСПИТУВАНИТЕ ГРУПИ**

Возраст на испитуваните групи	16	17	18	19	20	21	22	32	34	35	36	вкупно	%
Здрави	5	10	5	10	/	/	/	/	/	/	/	30	17,6
Гингивитис	/	/	3	7	5	10	5	/	/	/	/	30	23,9
Рана пародонтална болест	/	/	/	/	/	/	/	4	7	9	10	30	34,6

**TABLE 1. AGE DISTRIBUTION OF EXAMINE GROUPS (PERCENTAGE VALUES)**

Age of the examine groups	16	17	18	19	20	21	22	32	34	35	36	total	%
Health	5	10	5	10	/	/	/	/	/	/	/	30	17,6
Gingivitis	/	/	3	7	5	10	5	/	/	/	/	30	23,9
Early periodontitis	/	/	/	/	/	/	/	4	7	9	10	30	34,6

**ТАБЕЛА 2. ИДП КАЈ ИСПИТУВАНИТЕ ГРУПИ**

Испитувани групи	X	SD	df	t	p
Здрави	0,33	0,47	29	3,80	0,000672*
Гингивитис	1,30	0,534	29	13,30	0,00000*
Рана пародонтална болест	1,73	0,44	29	21,10	0,00000*

**TABLE 2. IDP VALUES AT EXAMINE GROUPS**

Examine groups	X	SD	df	t	p
Health	0,33	0,47	29	3,80	0,000672*
Gingivitis	1,30	0,534	29	13,30	0,00000*
Early periodontitis	1,73	0,44	29	21,10	0,00000*

гингивитис и иницијална пародонтопатија ( $p < 0,05$ ), но не и кај здравите испитаници, со оглед на фактот дека тие немаат гингивална инфламација.

Табела 4 ги покажува вредностите за индексот на апикална епителна миграција. За овој параметер не нотиравме статистички сигнификантни разлики на вредностите,

fact that health examiners have no gingival inflammation.

Table 4 shows index values of apical epithelial migration (AEM), and for this parameters we noted no significant differences because this index value was registry only at the examiners with early periodontitis.

ТАБЕЛА 3. ИГИ КАЈ ИСПИТУВАНИТЕ ГРУПИ

Испитувани групи	X	SD	df	t	p
Здрави	0,00	/	29	/	/
Гингивитис	1,233	0,43	29	15,70	0,00000*
Рана пародонтална болест	2,93	0,25	29	63,32	0,00000*

TABLE 3. IGI LEVELS AT EXAMINE GROUPS

Examine groups	X	SD	df	t	p
Health	0,00	/	29	/	/
Gingivitis	1,233	0,43	29	15,70	0,00000*
Early periodontitis	2,93	0,25	29	63,32	0,00000*

ТАБЕЛА 4. ИНДЕКС НА АЕМ КАЈ ИСПИТУВАНИТЕ ГРУПИ

Испитувани групи	X	SD	df	t	p
Здрави	0,00	/	29	/	/
Гингивитис	0,00	/	29	/	/
Рана пародонтална болест	1,00	/	29	/	/

TABLE 4. AEM INDEX VALUES AT EXAMINE GROUPS

Examine groups	X	SD	df	t	p
Health	0,00	/	29	/	/
Gingivitis	0,00	/	29	/	/
Early periodontitis	1,00	/	29	/	/

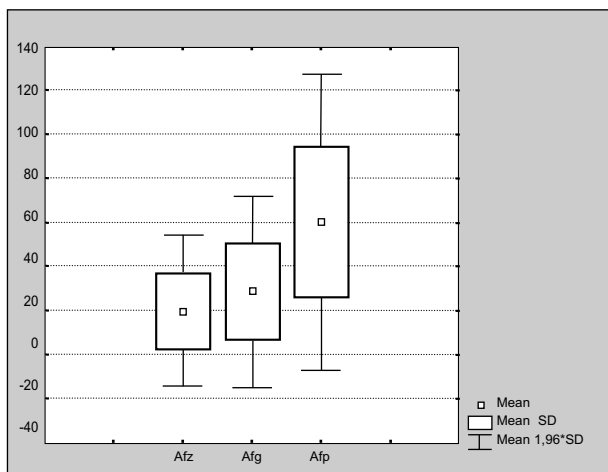
бидејќи овие индексни вредности ги нотираваме само кај испитаниците со иницијална пародонтопатија.

Графикон 1 ги покажува просечните вредности за гингивално-флуидните нивоа на IL-1 $\alpha$  кај испитуваните групи. Анализата на варијанса (ANOVA) укажа на статистички сигнификантни разлики за овој параметер кај сите групи (F=56,50 p=0,00000).

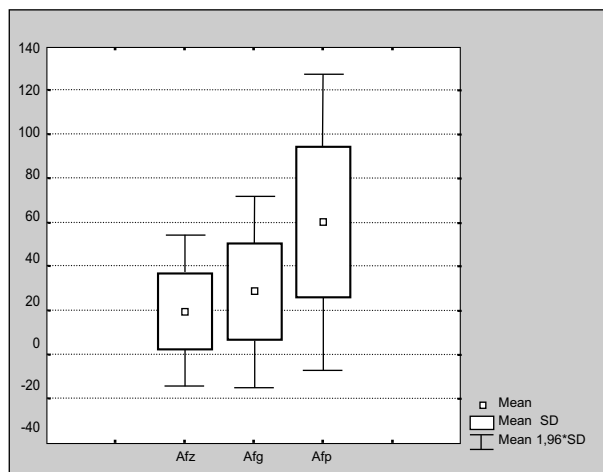
Графикон 2 ги покажува просечните вредности за гингивално-флуидните нивоа на IL-1 $\beta$  кај испитуваните групи. Анализата на варијанса (ANOVA) укажа на статистички

Graph. 1 shows mean values for gingival fluid levels of IL-1 $\alpha$  at the examine groups. Analyzes of variance (ANOVA) show statistics significant differences in gingival fluid levels of IL-1 $\alpha$  at all groups (F=56,50 p=0,00000).

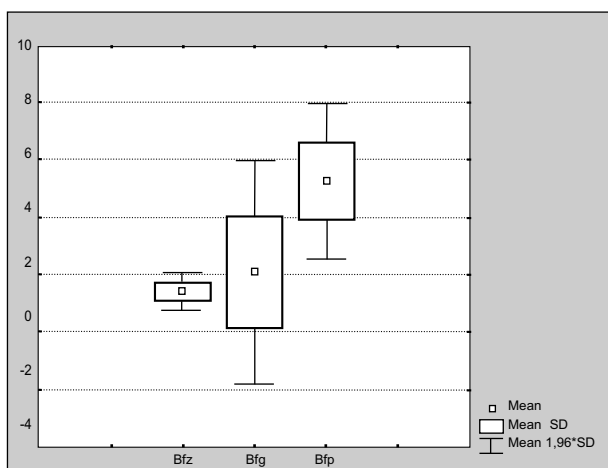
Graph. 2 shows mean values for gingival fluid levels of IL1- $\beta$  at examine groups. Analyzes of variance (ANOVA) show statistics significant differences in gingival fluid levels of IL1- $\beta$  at all groups (F=36,029 p=0,00000).



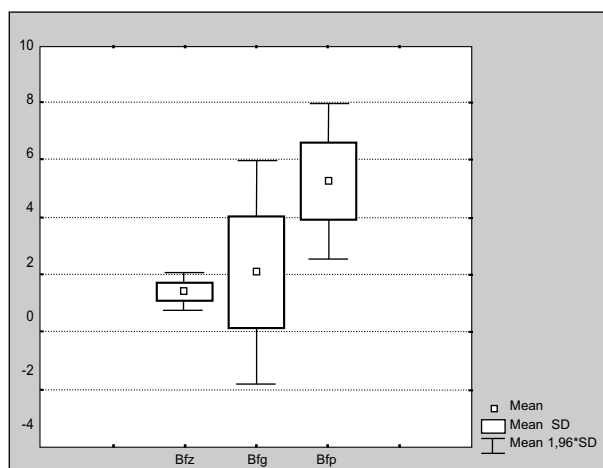
**Графикон 1.** Просечни вредности за гингивално флуидни нивоа на IL-1 $\alpha$  кај испитуваните групи



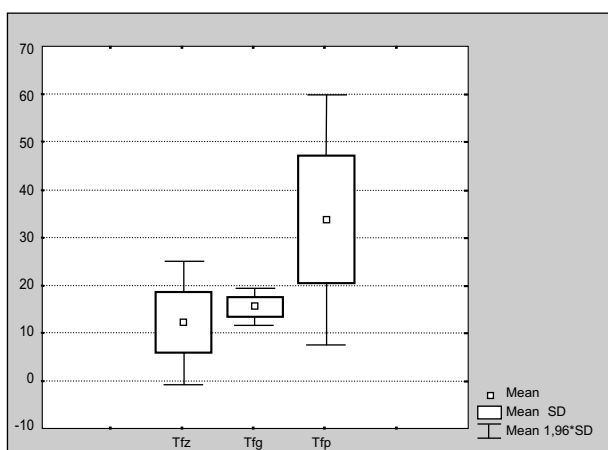
**Graph 1.** Mean values of gingival fluid levels for IL-1 $\alpha$  at examine groups



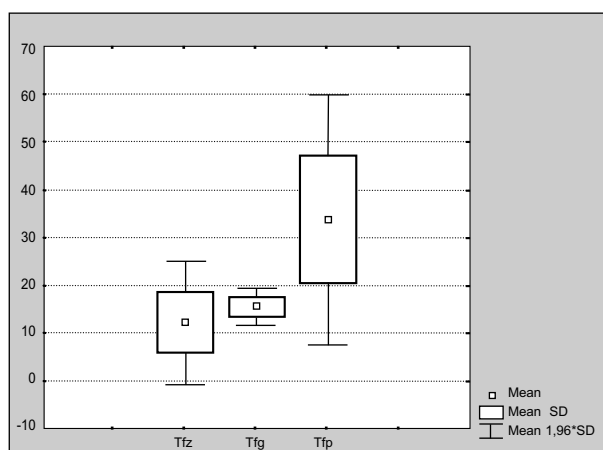
**Графикон 2.** Просечни вредности за гингивално флуидни нивоа на IL-1 $\beta$  кај испитуваните групи



**Graph 2.** Mean values of gingival fluid levels for IL-1 $\beta$  at examine groups



**Графикон 3.** Просечни вредности за гингивално флуидни нивоа на TNF- $\alpha$  кај испитуваните групи



**Graph 3.** Mean values of gingival fluid levels for TNF- $\alpha$  at examine groups



сигнификантни разлики за овој параметер кај сите групи ( $F=36,029$   $p=0,00000$ ).

Графикон 3 ги покажува просечните вредности за гингивално-флуидните нивоа на TNF- $\alpha$  кај испитуваните групи. Анализата на варијанса (ANOVA) укажа на статистички сигнификантни разлики и за овој параметер кај сите испитувани групи ( $F=110,09$   $p=0,00000$ ).

## Дискусија

И покрај многубројните инфламаторни и имуни медијатори идентификувани во гингивалниот флуид, сепак цитокините привлекуваат особено внимание, и се суспектни во инволвираноста на инфламацијата асоцирана со оштетувањето и репарирањето на пародонталното ткиво (6). Гингивалната и пародонталната болест денес се разгледуваат како мултифакториелни патогени ентитети кои се иницирани и потпомогнати од бактериска колонизација, но сигнификантно модифицирани од имуниот одговор на домаќинот кон бактерискиот плак (7). Денес само колекцијата и анализата на периферната крв и гингивалното ткиво не нудат практичен дијагностичен пристап. Спротивно, анализата на ексудатот со потекло од гингивалниот сулкус може да обезбеди неинвазивен начин за истражување на имуниот одговор преку евалуација на конституентите на гингивалниот флуид. Многу од компонентите кои се ослободуваат од инфламаторните и имуните клетки во ткивото, поминуваат низ гингивалниот сулкус. Тој е лесен за колекционирање па на тој начин и супстанциите присутни во него се лесно достапни за анализа (8, 9). Тргувајќи од овде, посебен мотив да го спроведеме нашето истражување беше можноста да го детерминираме нивото на проинфламаторните цитокини (IL1- $\alpha$ , IL1- $\beta$  и TNF-1  $\alpha$ ) во медиум од исклучително практично значење за нас стоматолозите, гингивалниот флуид (10, 11, 12, 13, 14).

Табела 1 ја покажува возрасната дистрибуција на испитуваните групи. Здравите испитаници имаат просечна возраст од приб-

Graph. 3 shows mean values for gingival fluid levels of TNF- $\alpha$  at examine groups. Analyzes of variance (ANOVA) show statistics significant differences in gingival fluid levels of TNF- $\alpha$  at all groups ( $F=110,09$   $p=0,00000$ )

## Discussion

Among the most of inflammatory and immune mediators identified in gingival fluid, cytokines attract special attention, and are suspect in involvement in both: inflammation associated with damage and repairing of periodontal tissue (6). Gingivitis and periodontal disease today are research like multifactor pathogen entity which are initiate and assistant by bacterial colonization, but significant modified by immune host response to bacterial plaque (7). Today only collection and analyzes of periphery blood and gingival tissue do not offer practice diagnostic approach. Opposite, analyzes of exudate with origin from gingival sulcus can assure not invasive way to research the host response through evaluating the constituents of gingival fluid. Many of components which are release from inflammatory and immune cells in tissues, passage in gingival fluid. It is easy for collection and that way these substances are easy available for analyzes (8, 9). Starting from this, special motive to carry out our investigation was the possibility to determine the level of pro inflammatory cytokines (IL1- $\alpha$ , IL1- $\beta$ , and TNF- $\alpha$ ) in medium with extraordinary and afore practical importance for us, dentist, in gingival fluid (10, 11, 12, 13, 14).

Table 1 shows the age distribution of examine groups. Health examiners have percentage age values of 17,6 years, patients with gingivitis 23,9 years, and patients with early stage of periodontal disease 34,6 years.

лижно 18 години, пациентите со гингивитис приближно 24 години и пациентите со иницијална пародонтална болест приближно 35 години.

Резултатите за индексните вредности на деналниот плак (ИДП) кај испитуваните групи ја потврдуваат статистичката сигнификантност на разликите на вредностите во рамките на сите испитувани групи ( $p < 0,05$ , табела 2).

За ИГИ (табела 3) детектиравме статистичка значајност на разликите кај испитаниците со гингивитис и иницијална пародонтопатија ( $p < 0,05$ ).

Додека за индексот на АЕМ, (табела 4) не нотиравме статистички сигнификантни разлики на вредностите кај ниту една од испитуваните групи, бидејќи истиот параметар го нотиравме само кај испитаниците со иницијална пародонтопатија.

Во врска со резултатите за гингивално-флуидните нивоа на IL1- $\alpha$  нотиравме статистички сигнификантни разлики во рамките на сите испитувани групи ( $p < 0,05$ ). Кај здравите испитаници концентрацијата на IL1- $\alpha$  изнесуваше 19,3 pq/ml, кај оние со гингивитис 28,27 pq/ml, а кај пародонтопатиците пациенти 59,92 pq/ml. За IL1- $\beta$  концентрациите вредности кај здравите изнесуваа 1,39 pq/ml, кај гингивитите 2,05 pq/ml, а кај оние со иницијална пародонтопатија 5,25 pq/ml.

Разликите помеѓу овие вредности укажаа на статистичка сигнификантност кај сите испитувани групи ( $p < 0,05$ , графикон 2). Сметаме дека ова е резултат на интеракцијата помеѓу пародонтопатогените микроорганизми и клетките на домаќинот.

Оваа интеракција го активира и првиот чекор на инфламаторниот одговор, кој води до клеточна активација во сврзно-ткивниот дел и регрутација на неутрофилни гранулоцити, стадиум кој го презентира и настанувањето на раната лезија кај клинички евидентната гингивална инфламација. Првите клетки кои се менуваат во оваа интеракција се епителните клетки. Тие се всушност и првите клетки кои претрпуваат измени од

Results for IDP at examine groups shows statistics differently levels for this parameters at all examine groups ( $p < 0,05$  table 2)

For IGI (table 3) we detected statistics significant higher levels at the examine groups with gingivitis and early periodontitis ( $p < 0,05$ ). While for index of AEM (table 4) we do not registry significant variances in any examine groups, respect the fact that these values we noted only at the examine with early periodontitis.

According with the results for gingival fluid levels of IL-1 $\alpha$  we noticed statistics significant differences among all examine groups ( $p < 0,05$  graph 1) At the health examiners these levels were 19,3 pq/ml, at the examiners with gingivitis 28,27 pq/ml and at the examiners with early periodontitis, levels were rapidly growth from starting level of 28,27 pq/ml to 59,92 pq/ml.

Levels for gingival fluid IL1- $\beta$  concentration at the health examinations which was 1,39 pq/ml, at the examiners with gingivitis growth to 2,05 pq/ml and at the examiners with early periodontitis was 5,25 pq/ml.

Differences between these levels show high statistics significant at all examine groups ( $p < 0,05$  graph 2). We suppose that this is the results of interaction between periodontal pathogenic microorganism and preserve host cells. This interaction activate the first step in inflammatory response which load to cell activation in connective-tissue part and recruitment of neutrophyles granulocytes, stage which presented the initiation of early lesion at clinical evident gingival inflammation. First cells that are changed in this interaction are epithelial cells. They are really first cells which sustain changes from bacteria in gingival sulcus or periodontal pocket.

страна на бактериите во гингивалниот сулкус или пародонталниот џеб.

Бактериската адхезија активира секретација на проинфламаторни медијатори (IL1- $\alpha$ , IL1- $\beta$ , TNF- $\alpha$ ) од епителните клетки. Во исто време вирулентните фактори кои дифундираат во сврзното ткиво, како и инфламаторните медијатори продуцирани од епителните клетки ги стимулираат клетките на домаќинот како: моноцити/макрофаги, фибробласти и маст клетки, да продуцираат и ослободуваат проинфламаторни цитокини (IL1- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12), простагландин PgE-2, хистамин, матриксметалопротеинази (MMP-s), кои го деградираат колагенот од сврзно-ткивниот комплекс. Во понатамошните случувања, клинички очекуваниот раст на нивоата на IL1- $\alpha$  и IL1- $\beta$  ја продолжуваат верижната реакција на ослободувања на многу други останати инфламаторни медијатори, кои понатаму го продлабочуваат инфламаторниот процес. Потврдата за овие случувања е исто така презентирана со хистолошката верификација на прогресивната лезија, која го покажува процесот на патолошката деструкција. Слични се резултатите и на Priess и сор. како и на Kinnane и сор. кои детектирале зголемени нивоа на IL1- $\alpha$  и IL1- $\beta$  во инфламирано гингивално ткиво, а екстремно ниски концентрации регистрирале кај здрави индивидуи (12, 13). Исто така и нивоата на TNF- $\alpha$  во нашата студија ја потврдија статистички сигнификантната разлика на вредностите кај сите испитувани групи. Така кај здравите индивидуи овие вредности изнесуваа 12,29 pg/ml, кај гингивитите се зголемија на 15,50 pg/ml, а кај оние со пародонтопатија нотиравме рапиден скок на 33,72 pg/ml (графикон 3). Овие резултати презентираат висок статистички сигнификантен пораст на ингивално-флуидните концентрации на овој цитокин, пред се кај испитаниците со иницијална пародонтална болест, потврдувајќи ја неговата улога како критичен цитокин во инфламаторните случувања на пародонталната инфекција, и тука сме во согласност со наодите на Beutler и сор. (15). Сметаме дека TNF- $\alpha$  има критич-

Bacterial adhesion activate secretion of pro inflammatory mediators (IL1- $\alpha$ , IL1- $\beta$ , TNF- $\alpha$ ) from epithelial cells. In same time virulent factors which diffuse in connective tissue, also and inflammatory mediators produced from epithelial cells stimulate the host cells in that area like: monocytes /macrophages, fibroblast and mast cells, to produce and release pro inflammatory cytokines (IL1- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12), prostaglandin (PgE2), histamine, matrixmetalloproteinases (MMPs), which degrade the collagen from connective-tissue compartment. In following clinical occurrence growth levels of IL1- $\alpha$  and IL1- $\beta$  continue the chain reaction of releasing many other inflammatory mediators, which furthermore recruitment the inflammatory process. Confirmation of these case is also presented by histological verification of progressive lesion, which indicate the engender the process of periodontal destruction. The same results are also the results from Priess at al. and Kinane at al., which detected growth levels of IL1- $\alpha$  and IL1- $\beta$  at inflamed gingival tissue, and extreme low concentration registry at health individuals (12, 13).

Also the levels of gingival fluid concentration of TNF- $\alpha$  in our study confirmed statistics significant differences in all groups. So, at health individuals these levels from 12,29 p/ml grow up to 15,50 at individuals with gingivitis, thus at individuals with early periodontitis rapidly growth to 33,72 pg/ml. (graph 3).

This presented high statistics growth values for gingival fluid concentration of this cytokine, also at examine group with early periodontitis, confirmed their role as a critical cytokine in inflammatory response to periodontal infection, and so, we agree with research of Beutler at al. (15).

на улога во имунолошките и патолошките реакции за време на пародонталната болест. Се продуцира од различни клетки, но макрофагите и слични на нив се најважни генератори на овој медијатор во раниот стадиум на гингивална инфламација (16, 17).

Од друга страна овој цитокин заедно со IL-1 $\beta$  ги стимулира гингивалните фибробласти кон зголемена секреција на IL-6, и на тој начин синергистички ја продлабочуваат евидентната патолошка ситуација (18, 19).

Со овие резултати за овој инфламаторен цитокин сме во согласност со истражувањата на Graves (20), каде за време на гингивалната инфламација е нотирано статистички сигнификантно зголемување на нивоата на TNF- $\alpha$ , само кај постара популација, но не и кај млади индивидуи.

Елевирани нивоа на овие испитувани медијатори на инфламацијата (IL1- $\alpha$ , IL1- $\beta$  и TNF- $\alpha$ ) во нашата студија и истите потврдени во мноштвото литературни податоци би можеле да претставуваат репрезенти на предклиничката иницијација на инфламаторните процеси и потентни индикатори на гингивалната и пародонталната деструкција.

We consider that TNF- $\alpha$  has a critical role in immune and pathology reaction during periodontal disease. It is produce from various kind of cells, but macrophages and similar to them are the most important generators of these mediators in the early stage of gingival inflammation (16, 17), on the other side this cytokine synergistically with IL1- $\beta$  stimulate gingival fibroblast to growth secretion of IL-6, and so, they destroy the evident pathologic situation (18, 19).

With these results for this inflammatory cytokine we are agree with research of Graves (20), where during the gingival inflammation was note statistics significant growth levels of TNF- $\alpha$ , only at the older population, but not at young individuals.

**Conclusion:** Elevated levels of these examine mediators of inflammation (IL1- $\alpha$ , IL1- $\beta$  and TNF- $\alpha$ ) in our study and the same confirmed in many literatures dates can be represent of preclinical initiation of inflammatory process and potent indicators of gingival and periodontal destruction.

## Литература / References

1. Van Dyke TE, Lester MA, Shapira L. The role of the host response in periodontal disease progression: implications for future treatment strategies. *J Periodontol* 1993;64:792-806.
2. Socransky, S., A. D. Haffajee J. M. Goodson and J. Lindhe: New Concepts of Destructive Periodontal Disease. *J. Clin. Periodontol.* 11:21-32 (1984).
3. Ciamsoni, G.: Crevicular Fluid Updated. In: Monographs in Oral Science. (H. M. Myers, Ed) S. Karger, Basel (1983).
4. Kamma, J. J., C. Giannopoulou, et al. (2004). "Cytokine profile in gingival crevicular fluid of aggressive periodontitis: influence of smoking and stress." *J Clin Periodontol* 31(10): 894-902.
5. Kishimoto T. The biology of interleukin- 6. *Blood.* 1989;74:1-10.
6. Alexander MB, Damoulis PD (1994). The role of cytokines in the pathogenesis of periodontal disease. *Curr Opin Periodontol* 1:39-53.
7. Page RC. Gingivitis. *J Clin Periodontol* 1986;13:345 -355.
8. Lamster I.B. The host response in gingival crevicular fluid: potential applications in periodontitis clinical trials. *J Periodontol* 1992; 63:1117-1123.
9. Page R.C. Host response tests for diagnosing periodontal diseases. *J Periodontol* 1992; 63:356-366.
10. Birkedal-Hansen H (1993). Role of cytokines and inflammatory mediators in tissue destruction. *J Periodontol Res* 28:500-510.
11. Genco RJ. Host responses in periodontal diseases: current concepts. *J Periodontol* 1992;63:338-55.
12. Kinane DF, Winstanley FP, Adonogianaki E, Moughal NA. Bioassay of interleukin 1 (IL-1) in human gingival crevicular fluid during experimental gingivitis. *Arch Oral Biol.* 1992;37(2):153-6.
13. Preiss DS, Meyle J. Interleukin-1 beta concentration of gingival crevicular fluid. *J Periodontol.* 1994;65:423-8.
14. Tatakis DN, Trombelli L. Modulation of clinical expression of plaque induced gingivitis. I. Background review and rationale. *J Clin Periodontol.* 2004;31:229-38.
15. Beutler B, Grau GE. Tumor necrosis factor in the pathogenesis of infectious diseases. *Crit Care Med.* 1993;21:423-35.
16. Gemmell E, Seymour GJ. Interleukin 1, interleukin 6 and transforming growth factor- $\beta$  production by human gingival mononuclear cells following stimulation with *Porphyromonas gingivalis* and *Fusobacterium nucleatum*. *J Periodontol Res.* 1993;28:122-9.
17. Seymour GJ, Gemmell E. Cytokines and periodontal disease: where to from here? *Acta Odontol Scand.* 2001;59:167-73.
18. Murray J, Barbara J, Dankley S, et al. Regulation of neutrophil apoptosis by tumor necrosis factor- $\alpha$ . requirements for TNF-R55 and TNF-R75 for induction of apoptosis *in vivo*. *Blood.* 1997;90(7):2772-83.
19. Takigawa M, Takashiba S, Takahashi K, Arai H, Kurihara H, Murayama Y. Prostaglandin E2 inhibits interleukin- 6 release but not its transcription in human gingival fibroblasts stimulated with interleukin 1- $\beta$  or tumor necrosis factor- $\alpha$ . *J Periodontol.* 1994;65:1122-7.
20. Graves DT, Cochran D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction. *J Periodontol.* 2003;74:391-401.