

ИНФЛАМАТОРНИ МЕДИЈАТОРИ КАЈ ПЛАК - ИНДУЦИРАНА ГИНГИВАЛНА ИНФЛАМАЦИЈА

Стефановска Е., Накова М., Ивановски К., Ристоска С., Митиќ К.

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

Трѓнувајќи од сознанијата дека инфламаторниот одговор во пародонталното ткиво е регулиран од оркестрирана мултипла цитокинска мрежа чиј мониторинг во инфламирање пародонтално ткиво би можел да биде објективен параметар за евалуација на активността на пародонталното заболување ја поставивме и **целиа** на нашата студија: утврдување на инволвираноста на инфламаторните цитокини (IL-1 α и IL-1- β) и нивната модулација во клиничката експресија на плак-индуцираната гингивална инфламација. За нејзина реализација ги одредивме: ситејените и тежината на инфламаторно-деструктивните процеси во пародонталниот проследени преку индексите на гингива-пародонталното здравје и гингивално-флуидните концентрации на инфламаторните цитокини (IL-1 α и IL-1- β) кај испитуваните групи.

Материјал и метод: На Клиниката за болести на устата и пародонталниот проследивме вкупно 90 пациенти поделени во три групи. Првата група, која воедно преиспитуваше и контролна група, ја сочинуваа 30 здрави пациенти без знаци за гингивална или пародонтална болест (верифицирана клинички). Втората група ја сочинуваа 30 пациенти со дијагностицирана гингивална болест во различен стадиум на клиничка експресија, сите без знаци за почетна алвеоларно-коскена деструкција (верифицирана клинички и рентгенолошки). Третата група беше со 30 пациенти и дијагностицирана рана форма на пародонтална болест (AAP 1999), исто така верифицирана клинички и рентгенолошки. Од клиничките испитувања беше извршена проценка на гингиво-пародонталното здравје следено преку индексите на:

ИДП (Silness - Loe), ИГИ (Loe -Silness) и индекс на АЕМ (AAP,1999). Лабораторските испитувања за детектирање на гингивално-флуидните нивоа на инфламаторните цитокини (IL-1 α и IL-1- β) беа одредени со помош на високо сензибилизираните хуман ELISA систем. Добиените резултати ја потврдија високо статистички значајната разлика на гингивално-флуидните нивоа на (IL-1 α и IL-1- β) во рамките на сите испитувани групи ($p < 0,05$). Инфламаторните цитокини (IL-1 α и IL-1- β) во испитуваните медиум, гингивалниот флуид, кај сите испитувани групи, укажуваат на поттешното имуномодулаторно влијание кое тие го манифестираат врз експресијата на плак-индуцираната гингивална инфламација, што од своја страна ја потврдува нивната улога како рејзентивни на предклиничката иницијација на инфламаторните процеси и потешни индикатори на гингиво-пародонталните оштетувања.

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

Податоците за пародонталното заболување од публикуваните клинички студии во последните години даваат подобри објаснувања за природата и историјата на ова заболување. Пародонталните лезии се препознаваат како хронични состојби кои се карактеризираат со релативно краток период на егзацербација, а подолг период на ремисија (29). Пародонталната болест претставува инфективен процес кој се карактер-

изира со деструкција на сврзното ткиво и субсеквентна загуба на периодонталната инсерција и ресорпција на алвеоларната коска. Хистолошки гледано пак, овие состојби се карактеризираат со инфламаторно клеточна акумулација во екстраваскуларното гингивално сврзно ткиво. (19, 23, 28, 30). Утврдено е дека бројните бактериски специеси изолирани од субгингивалниот дентален плак се тесно поврзани со појавата и прогресијата на пародонталното заболување (1). Голем број од нив опстојуваат во пародонталниот џеб и го инвадираат пародонталното ткиво, а имуниот систем не може секогаш ефикасно да ги елиминира микроорганизмите. Оваа патолошка ситуација доведува до хронична инфламација и континуиран одговор на домаќинот кој резултира со ткивна деструкција. Локалниот одговор на домаќинот кон овие бактерии вклучува регрутација на леукоцити и субсеквентно ослободување на инфламаторни медијатори и цитокини, за кои се смета дека имаат клучна улога во патогенезата на пародонталната болест преку инволвирање на имунолошките и биолошките механизми. Одговорот на домаќинот кон периопатогените микроорганизми може да биде истражуван на многу начини. Најмалку инвазивните пристапи ги вклучуваат анализите на гингивалниот цервикаларен флуид, инфламаторен трансудат кој се ослободува циркумферентно во гингивалниот сулкус. Овој трансудат е продукт на крвниот серум, примарно составен од инфламаторни клетки, повеќе забележителни полиморфонуклеарни леукоцити и серумски протеини (8). Придружните конституенти ги вклучуваат бактериите, ткивно-распадните продукти, ензими, антитела, комплемент и бројни инфламаторни медијатори (2). Со оглед на фактот дека гингивалниот цервикаларен флуид е продукт на пародонталните ткива, анализата на неговите конституенти може да претставува ран индикатор за ткивно-инфламаторните состојби во ткивото кои конечно ќе се манифестираат како клинички лезии. Ова секако претставува предност, со оглед дека тежината на хуманото паро-

донталното заболување е варијабилна категорија во рамките на една афектирана дентиција. Студиите за истражувањата на гингивалниот флуид датираат од пред повеќе од 50 години (5), но споредбените испитувања на флуидната продукција и флуидните конституенти започнале во доцните 1950-ти години со студиите на (Brill и Krasse и Brill и Bjorn (6, 7). Тие рани студии и истражувања кои следат во наредните 20 години се фокусирани на механизмите на гингивално-флуидната продукција и колекција на голем број конституенти кои може да бидат детектирани во флуидот. Многубројни истражувачи се обиделе да ги искористат елементите присутни во гингивалниот флуид за идентификација или утврдување на активноста на заболувањето, за детерминирање на неговата прогресија, за антиципирачките фактори за ризик кон одредена болест и за нивно искористување како индикатори на ткивната загуба или мониторинг на одговорот од соодветниот третман (9). Овие елементи како што се: интрацелуларни ензими, протеини, имуноглобулини и цитокини може да се ослободат од ткивата или клетките на домаќинот, а исто така и од слични продукти од бактериите присутни во гингивалниот сулкус и истите може да бидат квантифицирани (10, 31, 32). Евалуацијата на целуларниот имун одговор во гингивалниот флуид била оневозможена заради игнорирање на специфичните медијатори кои имаат патолошка сигнификатност и недостаток на сензитивни техники за квантификација на овие медијатори застапени во мали количини во флуидот. Со идентификацијата и дескрипцијата на цитокините и развојот на моноклоналните антитела кои се користат за нивна идентификација, целуларната имуна активност во гингивалниот флуид денес може да се истражува. Од неодамна ELISA тестот (enzyme-linked immunosorbent assays) се користи за идентификација и на интерлеукините во гингивалниот цервикаларен флуид (12). На тој начин неспецифичниот одбранбен систем во гингивалниот флуид може да се детерминира преку цитокините или интер-

леукините кои овозможуваат идентификација на афектираните регии кои претставуваат ризик за пациентот. Овие цитокини се декларирани и како потентно корисни дијагностички и прогностички маркери на активноста на пародонталното заболување и процесот на заздравување. Тргувајќи токму од тука ја поставивме и **целта** нашата студија: утврдување на инволвираноста на инфламаторните медијатори (IL1- α и IL1- β) во гингивалниот флуид кај плак-асоцираната гингивална инфламација.

Материјал и метод

За реализација на поставената цел на Клиниката за болести на устата и пародонтот проследивме вкупно 90 пациенти поделени во три групи. Првата група, која воедно претставуваше и контролна група ја сочинуваа 30 здрави пациенти без знаци за гингивална или пародонтална болест (верифицирана клинички). Втората група ја сочинуваа 30 пациенти со дијагностицирана гингивална болест во различен стадиум на клиничка експресија, сите без знаци за почетна алвеоларно-коскена деструкција (верифицирана клинички и рентгенолошки). Третата група беше со 30 пациенти и дијагностицирана рана форма на пародонтална болест (загуба на атачмент до 3мм според класификацијата на ААП 1999), исто така верифицирана клинички и рентгенолошки. Испитуваните пациенти немаа присутни општи заболувања и не беа приматели на антибиотска терапија во последните 3 месеци. Кај испитуваните групи беа спроведени клинички и лабораториски испитувања. Од **клиничките испитувања** беше извршена проценка на гингиво-пародонталното здравје следено преку индексите на: дентален плак ИДП (Silness-Loe), ИГИ (Loe-Silness) и АЕМ (AAP, 1999). **Лабораториските испитувања** за детектирање на гингивално-флуидните нивоа на инфламаторните цитокини (IL1- α и IL1- β) беа реализирани на Институтот за биологија при Природно-математичкиот факултет во Скопје. Колекционирањето на флуидот го

извршивме со Perioraper филтер хартија, од мезиобукалните површини на максиларните молари од соодветно испитуваните регии во времетраење од 30 секунди, во согласност со генералниот став дека начинот на колекционирање кој обезбедува најмалку интерференци се местото и времетраењето на колекционирањето, со аплицирање на филтер хартија на место на орифициумот на гингивалниот сулкус. Забите од испитуваната регија претходно беа испрани со вода, беше отстранет супрагингивалниот дентален плак и изолирани со ватеролни, заради минимизирање на евентуална саливарна контаминација. Гингивалниот флуид потоа го колекциониравме во соодветни микроквети кои содржеа 0,5 ml солен фосфатен пуфер (phosphate buffered saline, pH =7,2) и смрзнати на t од -20C⁰ до денот на анализирањето. Примероците пред самата анализа беа центрифугирани, а потоа анализирани за (IL1- α и IL1- β) користејќи го комерцијално достапниот ELISA метод. Податоците добиени од изведените испитувања беа обработени со стандарни статистички параметри, за што ја користевме компјутерска програма “statistica for Windows” 7, со помош на дескриптивно-статистички и инференцијално-статистички методи.

Резултати и дискусија

Гингивитот и пародонталните заболувања денес се разгледуваат како мултифакториелни патогени ентитети кои се иницирани и потпомогнати од бактериската колонизација, но сигнификантно модифицирани од имуниот одговор на домаќинот кон бактерискиот плак (25). Одговорот на домаќинот во текот на пародонталното заболување се состои од серија одговори на микроорганизмите на плакот во цервикуларното опкружување. Овој одговор може да биде детектиран системски, но и локално. На пример, детектирани се лимфоцити трансформирани од периферните Т-клетки како одговор на плак антигените кај пациенти со пародонтопатија (14, 15, 19, 21, 30), како и зголемен серумски титар на антитела регистри-

ран кај афектираните индивидуи (11). Во првите истражувања спроведени кај нас, Накова (22) во својата докторска дисертација укажува на пропорционален сооднос помеѓу зголемената хијалуронидазна активност и намалениот “uptake” на маркираните аминокиселини во гингивалното ткиво кај пациенти со напредната пародонтална деструкција. Од клиничка важност е дека студиите за овој биохемиски одговор на домаќинот го потврдуваат учеството на хијалуронидазата во етиопатогенетските случувања на пародонталната болест, пред се на примарните измени во колагениот комплекс и истите можат да обезбедат механизам за мониторинг на прогресијата на заболувањето кај хуманата популација. Денес само колекцијата и анализата на периферната крв како и гингивалното ткиво не нудат практичен дијагностички пристап. Спротивно, анализата на ексудатот со потекло од гингивалниот сулкус може да обезбеди неинвазивен начин на проучување на одговорот на домаќинот преку евалуација на конституентите на гингивалниот флуид. Многу од супстанциите кои се ослободуваат од инфламаторните и имуните клетки во ткивата поминуваат во гингивалниот цервикаларен флуид. Тој е лесен за колекционирање и на тој начин овие супстанции се лесно достапни за анализа (18, 24). Гингивалниот флуид е инфламаторен ексудат кој може да се колекционира од гингивалниот сулкус или пародонталниот џеб, користејќи хартиени филтер стрип или микропипетни кивети. Како што поминува гингивалниот флуид низ инфламираното ткиво ги собира и ензимите и останатите

молекули кои партиципираат во процесот на заболувањето. Тој исто така со себе повлекува и дел од продуктите од субгингивалните бактерии (18) и клеточните и ткивни деградациони продукти (26). Гингивалниот флуид носи со себе голем потенцијал како резервоар на фактори кои може да бидат асоцирани со активноста на заболувањето. Супстанциите ослободени од инфламаторните и имуните клетки за време на заболувањето вклучуваат: антитела (имуноглобулини-ИГ), комплемент протеини, инфламаторни медијатори, простагландини и проинфламаторни цитокини, интерлеукини и ТНФ (3, 4). Сакајќи да го утврдиме влијанието на овие инфламаторни медијатори кај плак-индуцираната гингивална инфламација, ние во нашата студија си поставивме за цел прецизно да ја одредиме нивната гингивално-флуидна концентрација. Во нашето испитување вклучивме 90 испитаници, поделени во три групи со по 30 испитаници: здрави испитаници кои ја сочинуваа првата- контролна група, испитаници со гингивална болест (втора група), и испитаници со иницијална пародонтална болест. Кај сите нив најпрво ги проследивме индексите на гингиво-пародонталното здравје, (ИДП, ИГИ, АЕМ). Резултатите кои ги добивме за ИДП кај испитуваните групи укажаа на статистички сигнификантно различни вредности за овој параметар кај сите испитувани групи ($p < 0,05$, табела 1). За ИГИ (табела 2) добивме статистички сигнификантно поголеми вредности кај испитаниците со гинивална и иницијална пародонтална болест, во споредба со здравите испитаници ($p < 0,05$). Додека

ТАБЕЛА 1. ПРОСЕЧНИ ВРЕДНОСТИ ЗА ИДП КАЈ ИСПИТУВАНИТЕ ГРУПИ

Испитаници	X	SD	df	t	P
Здрави	0,33	0,47	29	3,80	0,000672*
со гингивална болест	1,30	0,534	29	13,30	0,00000*
со иницијална пародонтална болест	1,73	0,44	29	21,10	0,00000*

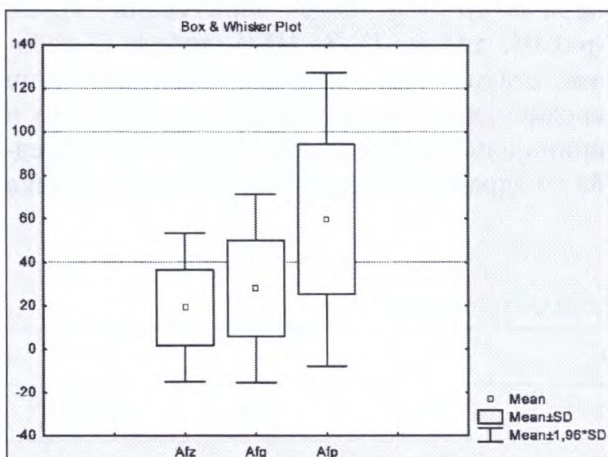
ТАБЕЛА 2. ПРОСЕЧНИ ВРЕДНОСТИ ЗА ИГИ КАЈ ИСПИТУВАНИТЕ ГРУПИ

Испитаници	X	SD	df	t	P
Здрави	0,00	/	29	/	/
со гингивална болест	1,233	0,43	29	15,70	0,00000*
со иницијална пародонтална болест	2,93	0,25	29	63,32	0,00000*

ТАБЕЛА 3. ПРОСЕЧНИ ВРЕДНОСТИ ЗА ИНДЕКС НА АЕМ КАЈ ИСПИТУВАНИТЕ ГРУПИ

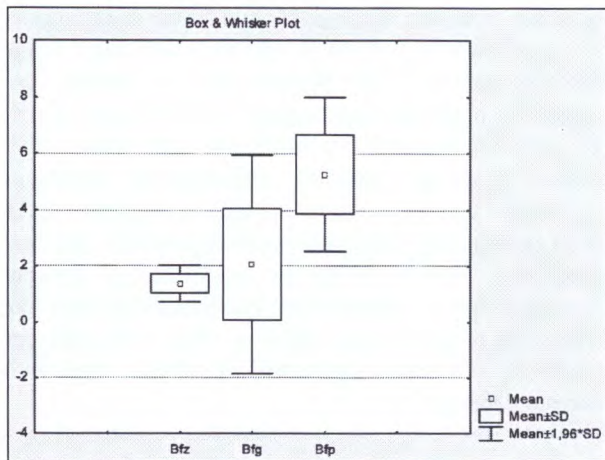
Испитаници	X	SD	df	t	P
Здрави	0,00	/	29	/	/
со гингивална болест	0,00	/	29	/	/
со иницијална пародонтална болест	1,00	/	29	/	/

пак за индексот на АЕМ (табела 3) не добивме статистички сигнификантни варијации во рамките на ниту една од испитуваните групи, со оглед на фактот дека овие индексни вредности ги нотиравме само кај испитаниците со иницијална пародонтална афекција, и тоа со најниски почетни вредности. Според добиените резултати за вредностите на гингивално-флуидните нивоа на IL1- α утврдивме статистички сигнификантни разлики кај сите испитувани групи ($p < 0,05$, графикон



Графикон 1. Просечни вредности за гингивално-флуидни нивоа на IL1- α кај испитуваните групи (здрави, со гингивална болест и иницијална пародонтална болест)

1). Кај здравите испитаници овие вредности изнесуваат 19,39 pg/ml, кај испитаниците со гингивална инфламација 28,27 pg/ml, за да истите рапидно се зголемат кај испитаниците со почетни иницијални пародонтални лезии на 59,92 pg/ml. Вредностите за гингивално-флуидната концентрација на IL1- β кај здравите испитаници, а која изнесуваше 1,39 pg/ml сигнификантно се зголеми кај испитаниците со гингивална болест 2,05 pg/ml, а кај испитаниците со иницијална пародонтална болест ја детектиравме со ниво од 5,25 pg/ml. Разликите помеѓу овие вредности покажаа висока статистичка сигнификантност кај сите испитувани групи ($p < 0,05$, графикон 2). До слични резултати доаѓаат и Preiss и сор. како и Kinane и сор. кои исто така укажуваат на детектирани повисоки нивоа на IL1- α и IL1- β во инфламира на гингива, а екстремно ниски концентрации се регистрирани и кај здрави индивидуи (17, 27). Во согласност со тоа сме во можност да ги толкуваме и нашите наоди каде вредностите на овие проинфламаторни цитокини (IL-1 α и IL1- β) се со високо сигнификантни разлики во однос на здравите испитаници како и во рамките на испитуваните групи. Сметаме дека истите се должат на интеракцијата помеѓу пародонтопатоген-



Графикон 2. Просечни вредности за гингивално-флуидни нивоа на ИЛ1-β кај испитуваните групи (здррави, со гингивална болест и иницијална пародонтална болест))

ните и одбранбените клетки на домаќинот. Оваа интеракција го активира првиот чекор во инфламаторниот одговор кој доведува до клеточна активација во сврзно-ткивниот дел и регрутација на неутрофили, стадиум кој го презентира и настанувањето на раната лезија кај клинички евидентентирана гингивална инфламација. Првите клетки кои се менуваат при оваа интеракција се епителните клетки. Тие се всушност и првите клетки кои претрпуваат измени од страна на бактериите во сулкусот или во пародонталниот џеб. Бактериската адхезија од своја страна пак активира секреција на проинфламаторни медијатори (IL-1 α , IL-1 β , TNF- α , IL-6 и IL-8) од страна на епителните клетки. Во исто време вирулентните фактори кои дифундирале во сврзното ткиво, како и инфламаторните медијатори продуцирани од епителните клетки ги стимулираат клетките на домаќинот присутни во таа ареа, како што се: моноцити/макрофаги, фибробласти и маст клетки да продуцираат и ослободуваат проинфламаторни цитокини (IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-12), хемотактични молекули (MIP-1a, MIP-2, MCP-1, MC-5, i IL-8), простагландини (PGE₂), хистамин, матрикс-металопротеинази, кои го деградираат колагенот од сврзно-ткивниот супстрат. Во понатамошните

клинички случувања, зголемените нивоа на IL-1 α и IL-1 β ја продолжуваат верижната реакција на ослободување на бројни други инфламаторни медијатори, кои уште повеќе го засилуваат инфламаторниот процес. Потврда за ваквите случувања претставува и хистолошката верификација кај напредната лезија, која укажува на продлабочување на процесот на пародонтална деструкција. Со текот на патолошките случувања и потврдувањето на воспоставената лезија се менува и патохистолошкиот супстрат кој се карактеризира со преминација на плазма клетки и инволвирање на Б лимфоцити, за што укажуваат и наодите на Kawai и сор. (16) и Han и сор. (13). Забележителен е голем број на неутрофили во припојниот епител и сврзно-ткивниот припој, а макрофагите се детектирани во регијата на lamina propria. Лестоцитите мигрираат во ткивото низ концентрираниот градиент од хемотактични материји ослободени од домаќинот или од бактериите, низ фокусот на инфекцијата, каде почнуваат со фагоцитоза на бактериите и нивните вирулентни фактори. Проинфламаторните цитокини и хистаминот ја зголемуваат васкуларната пермеабилност која доведува до излевање на плазма протеини и флуид во сврзното ткиво и субсеквентно во околното опкружување, составен дел на гингивалниот цервикаларен флуид. Конечно, локално продуцираните цитокини, IL-1 α , IL-1 β , TNF- α , IL-6 може да влезат во циркулацијата и да ги активираат хепатоцитите да синтетизираат акутно-фазни протеини, како LBP, sCDM, комплемент протеини и C реактивен протеин, кои ќе му помогнат на домаќинот да ја елиминира инфекцијата, на што укажуваат и наодите на Madianos и соработниците (20).

Заклучок: Зголемените вредности на испитуваните медијатори на инфламацијата (IL-1 α и IL-1 β) во нашата студија и истите потврдени во бројните литературни податоци, би можеле да претставуваат репрезенти на предклиничката иницијација на инфламаторните процеси и потентни индикатори на гингиво-пародонталните оштетувања. Нив-

ната идентификација и детекција во гингивалниот цервикуларен флуид, медиум извонредно лесен и достапен за анализа, би можеле во иднина да бидат од интерес и поттик за размислување за развој на идни дијагностички и терапевтски модалитети во третманот на пародонталната болест.

INFLAMMATORY MEDIATORS AT PLAQUE INDUCED GINGIVAL INFLAMMATION

Stefanovska E., Nakova M., Ivanovski K., Ristoska S., Mitić K.

Summary

Starting from cognition that inflammatory response in periodontal tissue is regulated from orchestral multiple cytokines network, which monitoring in inflamed periodontal tissue can be objective parameter for evaluation the activity of periodontal disease, we determined the aim of our study: to ratify the involment of inflammatory cytokines (IL1- α and IL1- β) and their modulation in clinical expression of plaque-induced gingival inflammation. For their realization we determined: the level and intensity of inflammatory and destructive changes in the periodontal tissue, proceed by indexes of periodontal health and gingival- fluid levels of inflammatory cytokines (IL1- α and IL1- β) at the examined groups. At the Clinic of Oral pathology and Periodontology we proceed total 90 patients divided in three groups. First group, which was the control group, consist 30 healthy patients without any signs of gingival or periodontal disease(verified clinically). Second group consist 30 patients with diagnosed gingival disease with different stage of clinical expression, all of them without signs of initial alveolar-bone destruction (verified clinically and with radiograph). The third group was with 30 patients and diagnosed periodontal disease at the early stage (AAP,1999), also verified clinically and with radiograph. From clinical examination we performed the rating of gingival and periodontal health by: indexes of dental plaque (IDP,Silness-Loe), index of gingival inflammation (IGI, Loe-Silness) and index of apical epithelial migration (AEM, AAP,1999). Laboratory ana-

lyzes for detection of gingival-fluid levels of inflammatory cytokines (IL1- α and IL1- β) were detected by high sensitive human ELISA system. Obtained results confirmed the high statistical significant differences of gingival-fluid levels of IL1- α and IL1- β in the frame of all examined groups ($p < 0,05$). Inflammatory cytokines (IL1- α and IL1- β) in examined medium, gingival fluid, at all examined groups, indicate their potential immunomodulated influence on the expression of plaque-induced gingival inflammation, confirmed their role like represents of preclinical initiation of the inflammatory processes and potent indicators of gingival and periodontal destroys.

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

Литература

1. AAP (1996). The potential role of growth and differentiation factors in periodontal regeneration. *J Periodontol* 67:545-553.
2. Armitage, G. C. (1996). "Periodontal diseases: diagnosis." *Ann Periodontol* 1(1): 37-215.
3. Attstrom R. and J. Egelberg: Emigration of Blood Neutrophils and Monocytes into the Gingival Crevice. *J Periodont Res.* 5:48-55 (1970).
4. Attstrom R. Presence of Leukocytes in Crevices of Healthy and Clinically Inflamed Gingivae. *J Periodont. Res.* 5:42-57 (1970)
5. Bodecker, C. F.: Dental erosion: Its Possible Causes and Treatment. *Dent. Cosmos.* 75: 1056-1062 (1933).
6. Brill N. and B. Krasse: The passage of Tissue Fluid into the Clinically Healthy Gingival Pocket. *Acta Odont. Scand.* 16:233-245 (1958)
7. Brill, N. and Bjorn: Passage of tissue Fluid into Human Gingival Pockets. *Acta Odont. Scand.* 17:11-21 (1959).
8. Ciamsoni, G.: Crevicular Fluid Updated. In: *Monographs in Oral Science.* (H. M. Myers, Ed) S. Karger, Basel (1983).
9. Cimasoni, G. and C. Giannopoulou (1988). "Can crevicular fluid component analysis assist in diagnosis and monitoring periodontal breakdown?" *Periodontology Today, International Congress, Zurich.* Basel: Karger: 260-270.
10. Curtis M A, Griffiths G S, Price S J, Coulthurst S K, Johnson N W The total protein concentration of gingival crevicular fluid; variation with sampling time and gingival inflammation. *J Clin Periodontol* 1988; 15:628-632.

11. Ebersole, J. L.: Systemic Humoral Immune Response in Periodontal Disease. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 1:283-331 (1990).
12. Geivellis, M., D. W. Turner and E. D. Pederson: A sensitive ELISA-Based Assay for Interleukin-6. *J. Dent. Res.* 69:(Spec. Issue):Abstr. 1084 (1990).
13. Han X, Kawai T, Eastcott JW, Taubman MA(2006). Bacterial- responsive B lymphocytes induce periodontal bone resorption. *J Immunol* 176:625-631.
14. Horton, J. E., J. J. Oppenheim and S. E. Mergenhagen: A Role for Cell-Mediated Immunity in the Pathogenesis of Periodontal Disease. *J. Periodontol.* 45:351-360(1974).
15. Ivanyi, L. and T. Lehner: Stimulation of Lymphocyte Transformation by Bacterial Antigens in Patients with Periodontal Disease. *Arch. Oral Biol.* 15:1089-1096(1970).
16. Kawai T, Matsuyama T, Hosokawa Y, Makhira S, Seki M, Karimbux NY, et al. (2006) B and T lymphocytes are the primary sources of RANKL in the bone resorptive lesion of periodontal disease. *Am J Pathol* 169:987-998.
17. 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.
18. Lamster I.B. The host response in gingival crevicular fluid: potential applications in periodontitis clinical trials. *J Periodontol* 1992; 63:1117-1123.
19. Mackler BF, Frostad KB, Robertson PB, Levy B (1977). Immunoglobulin bearing lymphocytes and plasma cells in human periodontal disease. *I Periodont Res* 12:37-45.
20. Madianos PN, Bobetsis YA, Kinane DF. Generation of inflammatory stimuli: how bacteria set up inflammatory responses in the gingiva. *J Clin Periodontol.* 2005;32:57-71.
21. Miller, D. R., I. B. Lamster and A. I. Chasens : Role of the Polymorphonuclear Leukocyte in Periodontal Health and Disease. *J. Clin. Periodontol.* 11:1-15 (1984).
22. Накова М. Процена на метаболните промени на гингивалното ткиво од пациенти со прогресивна пародонтопатија преку следење на вградувањето на маркирани аминокиселини и хијалуронидазната активност, докторска дисертација, Стоматолошки факултет, Скопје, 1979.
23. Okada H, Murakami S, Kitamura M, Nozaki T, Kusumoto Y, Hirano H, et al. (1996). Diagnostic strategies of periodontitis based on the molecular mechanisms of periodontal tissue destruction. *Oral Diseases* 2:87-95.
24. Page R.C. Host response tests for diagnosing periodontal diseases. *J Periodontol* 1992; 63:356- 366.
25. Page RC. Gingivitis. *J Clin Periodontol* 1986;13:345 -355.
26. Pattres M R, Niekrash C E, Lang N P. Assessment of complement cleavage in gingival fluid during experimental gingivitis. *J Clin Periodontol* 1989; 16:33-37.
27. Preiss DS, Meyle J. Interleukin-1 beta concentration of gingival crevicular fluid. *J Periodontol.* 1994;65:423-8.
28. Seymour GJ (1987). Possible mechanisms involved in the immunoregulation of chronic inflammatory periodontal disease. *I Dent Res* 66:2-9.
29. Socransky, S., A. D. Haffajee J. M. Goodson and J. Lindhe: New Concepts of Destructive Periodontal Disease. *J. Clin. Periodontol.* 11:21-32 (1984).
30. Taubman M, Eastcott JW, Shimauchi H, Takeichi O, Smith DI (1994). Modulatory role of T lymphocytes in periodontal inflammation. In: *Molecular pathogenesis of periodontal diseases.*
31. Uitto VJ, Overall CM, McCulloch C (2003). Proteolytic host cell enzymes in gingival crevice fluid. *Periodontol* 200 31:77-104.
32. Wilton JMA, Bampton JLM, Hurst Ti, Caves I, Powell JR (1993). Interleukin-143 and IgG subclass concentrations in gingival crevicular fluid from patients with adult periodontitis. *Arch Oral Biol* 38:55-60.