АНАЛИЗА НА АПОПТОТИЧНО ОДУМИРАЊЕ НА КЛЕТКИТЕ КАЈ РАЗЛИЧНИ СТЕПЕНИ НА ПАРОДОНТАЛНА ДЕСТРУКЦИЈА

Миновска - Ставревска А., Пандилова М., Јаневска В.

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

Апстракт

Апоптозата претставува програмирана и генетски контролирана клеточна смрт, која резултира во елиминација на клетките без притоа да биде нарушена структурата или функцијата на ткивото. Апоптотичните процеси се вплетуваат, како во бројни физиолошки процеси така и во голем број на патолошки процеси кои се одиграваат во организмот, вклучувајќи ги и инфламаторните процеси. Апоптозата може да биде модулирана од најразлични стимули како: хормони, цитокини, бактерии, вируси, како и од продуктите на инфламацијата. Апоптозата сè уште го нема најдено своето место во комплексниот патоген механизам на парадонталната болест. Токму овој недостиг го побуди нашиот интерес да преземеме испитување со основна цел да го утврдиме присуството на апоптоза за време на парадонталната деструкција во услови кога епителната инсерција е на цементно-емајловата граница или нешто под неа (< 3mm) во отсуство на инфламација, и кога епителната инсерција е апикално измигрирана (3-6 mm и >6 mm)

За реализација на поставената цел беше формирана испитувана група од 60 пациенти, со дијагностицирана адултна хронична парадонтопатија. Според изразеноста на губитокот на атачмент пациентите понатаму беа поделени во три групи и тоа: со губиток на атачмент до 3 mm, од 3 до 6 mm, и над 6 mm.

Во ткивото кое на патохистолошкиот наод покажа отсуство на било какви инфламаторни промени беа најдени апоптотични клетки со просечна застапеност на 1,0779. Бројот на апоптотични клетки покажа пораст напоредно со зголемувањето на губитокот на атачментот.

Клучни зборови: пародонтопатија, апоптоза, патогенеза

Вовед

Апоптоза е еден од двата досега познати механизми со помош на кој се случува клеточната смрт. Се дефинира како генетски програмиран и строго контролиран след на случувања во клетката кои доведуваат до губиток на микровилите и меѓуклеточните врски, промени во јадрото и хроматинска кондензација, кондензација и фрагментација на клеточното јадро, фрагментација на днк по строго специфичен редослед и формирање на цитоплазматски везикули, формирање на апоптотични телца и нивна фагоцитоза, во отсуство на било какви знаци на инфламација или нарушувања во соседното ткиво.

Апоптозата прв пат била откриена како случаен наод од страна на Керр(4) во 1965

кој во 1971 година ја нарекол кондензациона некроза за да 1972(5,6) конечно и го даде името апоптоза изведен од старо грчкиот збор апоптосис со значење отпаѓање на лисја од дрво или влакна од косата .

Промоција во големите истражувачки центри апоптозата доживува дури кон крајот на 80 години со сознаниниете дека контролата на апоптозата, во смисла на нејзино иницирање, би значела контрола на канцерогениот раст на клетките, додека супресијата на апоптозата би значело контрола врз сидата, Алцхајмеровата болест итн .

Меѓутоа и покрај интересот кој го предизвика апоптозата во научните кругови податоците за нејзината асоцираност со пародонтопатијата и до денешен ден се малубројни.

Првите објавени студии за поврзаноста на пародонтопатијата и апоптозата потекнуваат од Elllis 1989(2), Toneti 98(10) i Gamonall 2001(3). Овој недостаток на податоци беше и мотив во формирањето на целта на ова испитување

- да се проследи апоптозата во корелација со еден од клучните клинички симптоми на пародонтопатијата, различно изразениот губиток на атачмент во тек на пародонталната болест.

Материјал и метода

- Испитувањето беше изведено на 30 пациенти кои ги задоволија следните критериуми: возраст помеѓу дваесет и четириесет години;
- отсуство на било какви општи заболувања;
- клинички дијагностицирана адултна пародонтопатија според критериумите на Американската академија за пародонтологија (1) односно присуство на хроничен гингивит, крварење на сондирање, присуство на пародонтален џеб поголем или еднаков на 3мм
- кај пациентите клинички беа регистрирани и регии со здрав пародонт;

Мерењата беа извршени во долна премоларна моларна регија со градуирана сонда а во зависност од измерените вредности пациентите беа групирани во три групи користејќи го индексот по Рамфјорд (8) и тоа:

- **Прва група** од 10 пациенти кај кои беше нотиран губиток на атачмент до 3мм
- **Втора група** од 10 пациенти кај кои беше нотиран губиток на атачмент од 3 до 6мм
- **Трета група** од 10 пациенти кај кои беше нотиран губиток на атачмент поголем од 6 мм

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

Исечоците беа фиксирани во 10 постотен неутрален формалин, а потоа во исечоците беше пребаруван бројот на апоптотични клетки со помопш на светлосна микроскопија. Препаратите беа боени со хематоксилин еозин, а бројот на апоптотични клетки беше изразен како просечен број на клетки на десет видни полиња. Испитувањата беа реализирани на Институтот за патолошка анатомија на Медицинскиот факултет во Скопје.

За статистичката обработка на податоците беше користена компјутерската програма **Statistika 6,0**. Анализата на добиените статистички серии е направена со користење на студентовата т дистрибуција со цел да се видат разликите помеѓу здравите исечоци и испитуваните

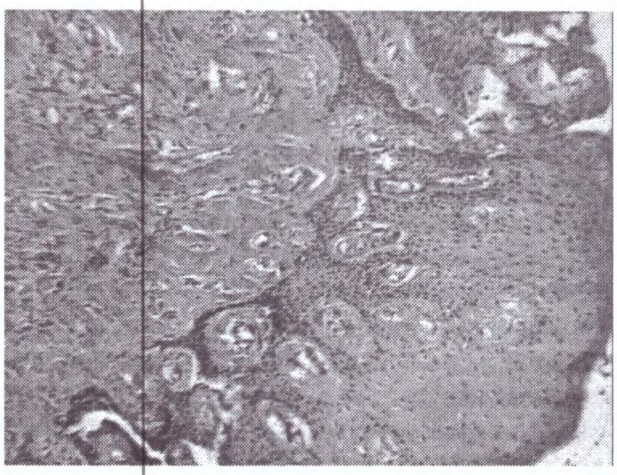
- Анализа на варијанси со цел да се видат варијациите во самите групи

- Pearson и Spearmen- ов коефициент на корелација за да се видат односите помеѓу испитуваните параметри

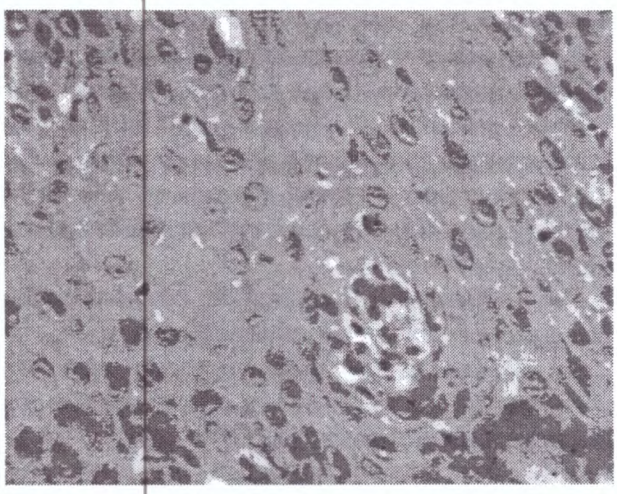
Резултати

Една од основните и водечки цели на нашето испитување беше, пред сè, да се потврди присуството на апоптозата во гингивалното ткиво како и да се проследи застапеноста на бројот на апоптотичните клетки, како во текот на различно изразени-

от губиток на атачмен, така и во текот на различните степени на инфламација и рецесија на гингивалното ткиво. Сите примероци од ткиво по соодветната подготовка беа патохистолошки анализирани за присуството на апоптотични клетки со светлосна микроскопија при што бројот на апоптотични клетки беше искажан како средна вредност од застапеноста на истите во десет видни полиња.



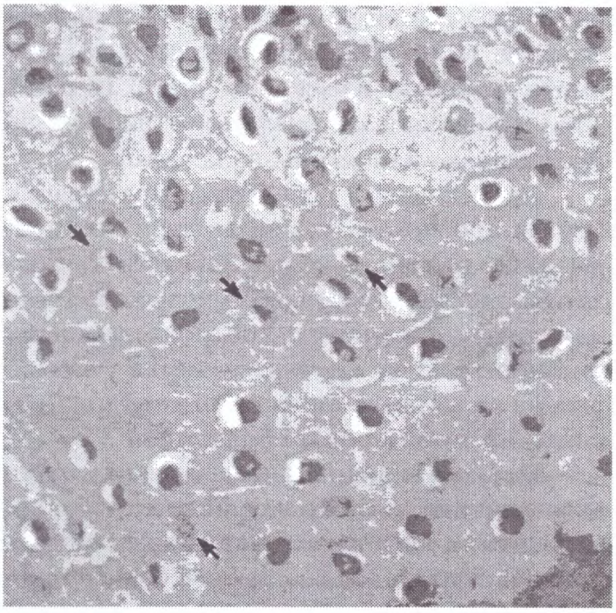
Слика 1 *Напречен пресек низ гингива: повеќереден плочест епител H&E X 100*



Слика 2 *Повеќереден плочест епител на гингива: присуство на апоптотични клетки*

Од патохистолошките испитувања кои ги спроведовме на нашиот материјал ги добивме следните резултати:

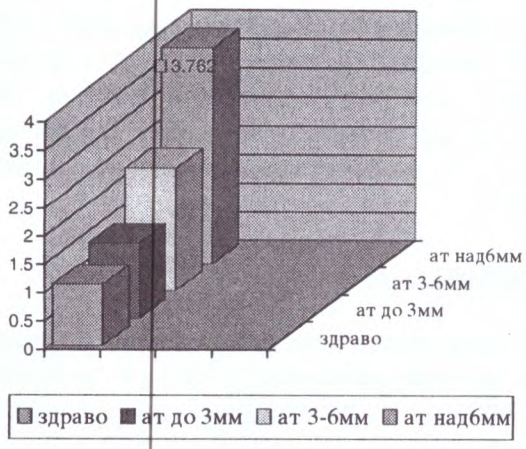
- Утврдивме постоење на апоптотични клетки во епителот на здраво гингивално ткиво. Како во литературата се наидува на



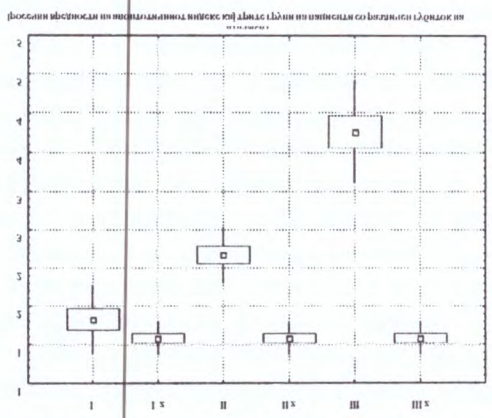
Слика 3 *Повеќереден плочест епител на гингива: присуство на апоптотични клетки (црните стрелки покажуваат апоптотични клетки) H&EX200*

контрадикторни податоци за присуство на апоптозата во неинфламирана гингива, сите примероци кои и покрај клиничкото отсуство на инфламација покажаа присуство на инфламаторни клетки на патохистолошкиот наод, беа отфрлени од примерокот за да не се компромитираат добиените резултати

- Просечното присуство на апоптотични клетки во здрава гингива изнесуваше 1,079Б-0,230 на десет видни полиња. Следејќи го присуството на апоптотични клетки во ткивните исечоци кои одговараа на различен губиток на атачмент, наидовме на различна застапеност на апоптотични клетки и тоа: за примероците на ткиво кои одговараа на губиток на атачмент од помалку или еднаков на 3мм 1,327 Б0, 44557(p=0,0079), за губиток на атачмент од 3 до 6мм 2,172Б0, 36212(p=0,000) и за губиток на атачмент поголем од 6мм 3,762Б0,6444(p=0,0000) апоптотична клетка на видно поле. Сите вредности споредени со вредностите добиени за здрава гингива, покажаа статистичка сигнификантност на разликите во вредностите ($p<0,05$) користејќи ја студентовата т дистрибуција. Добиените вредности прикажани се на графикон 1 и графикон 1а.



Графикон 1 *Застапеност на апоптотичните клетки во здрава гингива и гингива која одговара на различен степен на губиток на атачмент*



Графикон 1а. *Застапеност на апоптотичните клетки во здрава гингива и гингива која одговара на различен степен на губиток на атачмент*

Постои јака позитивна корелација (r=0,9 - Pearson-ов коефициент на корелација или Spearman-ов R=0,91 статистички сигнификантен за p=0,0000) помеѓу загубата на атачмент и апоптозата.

параметри	Spearman R	t (N-2)	p
апоптотичен индекс	**0,915849**	**12,06956**	**0,0000**

Табела 1 *Spearman коефициент на корелација помеѓу нотираниот губиток на атачментот со апоптозата*

параметри	Pearson- ов коефициент на корелација r
апоптотичен индекс	**0,89**

Табела 2 *Pearson-ов коефициент на корелација: губиток на атачмент апоптоза*

Дискусија

Основниот интерес на нашето испитување беше насочен, пред сè, кон детекцијата на апоптозата во тек на пародонтопатијата, но и да се направи обид апоптотичните процеси да се согледаат пошироко во динамиката на амбиентот на хронична инфламација на ткивото, присуството на модулаторите на апоптотичниот процес како и присуството на цитокините молекули, обидувајќи се на одреден начин да согледаме една куса секвенца од комплексните и динамични збиднувања во текот на пародонтопатијата.

Првото прашање на кое сакавме да понудиме одговор се однесуваше на присуството на апоптотични клетки во неинфламирана здрава гингива.

Податоците од литературата, иако малубројни, говорат за најразлични наоди. Првите податоци потекнуваат од Ellis (2) во 1992, кој во факторите кои придонесуваат за прогресија на пародонтопатијата ја вбројува и апоптозата, за да соопшти наод на апоптотични клетки само во гингивалното ткиво кое одговара на губиток на атачментот над 6мм.

Овој наод е цитиран во многу други трудови сè до објавувањето на наодите на Tonetti 1998 (10) која воедно е и прва студија за in situ детекција на апоптозата кај хронична адултна пародонтопатија. Моделот на испитување иако е различен од нашиот, сепак ни понуди податок за присуство на значителна количина на апоптотични клетки во сите слоеви на епителот со најголема застапеност во припојниот епител, кој воедно е изложен и на најбројна бактериска инфекција. Во испитувањето биле вклучени исечоци од регии каде отсуствувала и инфламација и губиток на атачмент. Сите ткива на патохистолошкиот наод покажале инфламација од 1 степен.

Апоптозата се дефинира како физиолошки процес преку кој се остварува нормалната смена на клетките, одржување на истиот квантум на ткиво, па конечно и ембрионалниот развој на органите, вклучувајќи го и пародонтот, се одвива преку апоп-

тотично одумирање на ткивата. Земајќи го сè ова во предвид, малку е веројатно дека апоптозата отсуствува кога нема инфламација. Слоевите на епителот постојано се изложени на влијание на периопатогени кои и најверојатно предизвикуваат апоптоза на одделни површни делови од епителот .

Токму ваквото размислување го потврдија наодите од претходната наша студија, каде при селекцијата беше водена сметка само за инфламацијата. Кај вкупно 64 пациенти најдовме присуство на апоптотични клетки во здрава гингива од 4 апоптотични клетки на 100 клетки, за разлика од инфламираната гингива каде беа најдени 7 апоптотични клетки на 100 клетки.(7)

Нашите наоди ги потврдија наодите од претходните автори со тоа што во исечоците од здрава гингива, каде беше земен во предвид и патохистолошкиот наод, најдовме присуство на апоптотични клетки во вредност од 1,079 на десет видни полиња , додека во примероците со најизразена инфламација беа најдени просечно 3 клетки на десет видни полиња. Разликата во вредностите со претходните испитувања се должат на различниот начин на броење на апоптотичните клетки. Ваквиот наод е во согласност и со фактот дека во текот на пародонтопатијата апоптотичните клети не надминуваат 10% од вкупниот број на клетки (9).

Понатаму, нашите наоди покажаа дискретен пораст на апоптотичните клетки во региите со апикална миграција на припојниот епител до 3мм (1,327 клетки на десет видни полиња). Иако дискретен, порастот на апоптотичните клетки сепак оствари сататистичка значајност на разликите во однос на здравото ткиво. Сите останати групи покажаа статистички значаен пораст на апоптозата во однос на здравото ткиво.

Анализата на варијанси изведена за групите на заболеното ткиво не покажа статистичка значајност за ниту една од ариметичките средини, што зборува за значителен пораст на апоптотичните клетки на преодот од здраво во болно, додека во текот на развојот на болеста овие промени се со помали амплитуди.

Очекуван беше и наодот на силна позитивна корелација помеѓу бројот на апоптотични клетки и губитокот на атачмент што ја потврди нашата теза - дека апоптозата учествува во прогресијата на пародонтопатијата.

Заклучоци

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

1. Во ткивото кое на патохистолошкиот наод покажа отсуство на било какви инфламаторни промени беа најдени апоптотични клетки со просечна застапеност на 1,0779.

2. Бројот на апоптотични клетки покажа пораст напоредно со зголемувањето на губитокот на атачментот, покажувајќи висока статистичка сигнификантност на разликите во однос на бројот на апоптотичните клетки за различните вредности на губитокот на атачмент споредено со бројот на апоптотичните клетки во здравата гингива .

3. Коефициентите на корелација покажаа силна позитивна корелација (r=0,9 - Pearson-ов коефициент на корелација или Spearman-ов R=0,91 статистички сигнификантен за p=0,0000) помеѓу степенот на губиток на атачмент и бројот на апоптотични клетки кај адултната пародонтопатија.

APOPTOTIC CELL DEATH IN CORELATION WITH ATTACHMENT LOSS DURING PERIODONTAL DISEASE

Stavrevska - Minovska A., Pandilova M., Janevska V.

Abstract

Apoptosis is a programmed form of cell death which results in the elimination of specific cells without disturbance of the tissue structure or func-

tion. It is implicated in a wide variety of biological phenomena.The apoptotic process can be modulated by various stimuli including hormones, cytokines, growth factors immune response. Implication of apoptosis in periodontal disease is poorly understood, therefore we studied apoptotic cell death during chronic adult periodontal disease in patients with different amount of attachment loss Gingival tissue biopsies from 60 patients were obtained. Patients were selected with different degrees of attachment loss and with no gingival recession. All the examined patients were between 20 and 40 years old and they all had regions with healthy periodontal tissue. Gingival tissue biopsies were taken from the examined region and from the healthy one for each patient. Samples were fixed in 10% formalin. The formalin fixed sections were submitted to haemotoxylin-eozin staining and detection of apoptotic cell death. After the statistical analysis of our results we can conclude that: apoptotic cells were detected in healthy gingival tissue. The number of apoptotic cells was growing as the values of attachment loss were increased. There was a strong positive corelation between apoptosis an attachment loss. Our results suggest that tissue frequency of apoptotic cell death is directly correlated with inflammation and inflammatory changes during periodontal disease. The greater number of apoptotic cell results in higher levels of attachment loss

Key woards: periodontal disease, pathogenesis, apoptosis

Литература

1. American Academy of Periodontology Proceedings of the World Workshop in Clinical Periodontics Chicago the American Academy of Periodon-tology 1989: 1: 123-1/24
2. Ellis S D, Tucci M A, Serio F G. Factors for progression of periodontal disease J. Oral. Pathol. Med. 1998: 27: 101-5
3. Gamonal J, Bascones A, Acevedo A, Blanco E, Silva A Apoptosis in chronic adult periodontitis analyzed by in situ DNA breaks, electron microscopy, and immunohistochemistry. J Periodontol 2001: 72: 517-25
4. Kerr J F R. A histochemical study of the hypertrophy and ischaemic rat liver with special reference to changes in lysosomes J. Pathol. Bacteriol. 1965: 90: 419
5. Kerr J F R. Shrinkage necrosis: a distinct mode of cellular death J. Pathol. 1971: 105: 13-20
6. Kerr J F R, Wyllie A H, Currie A R. Apoptosis: a basic biological phenomena with wide ranging implications in tissue kinetics Br. J. Cancer 1972: 26: 239-257
7. Pandilova M, Minovska A. Apoptozata kako morfoloski tip na kletocna smrt vo korelacija so stepenot na gingivalna inflamacija Maked. Stomatol. Pregl. 2000: 24:7-10
8. Ramfjord S P. Indices for prevalence and indices for periodontal disease J. Periodontal 1959: 30: 51
9. Sawa T, Nishimura F, Ohyama H, Takahashi K, Takashiba S, Murayama Y. In Vitro Induction of Activation-Induced Cell Death in Lymphocytes from Chronic Periodontal Lesions by Exogenous Fas Ligand Infection and Immunity, 1999: 67: 1450-1454
10. Tonetti M, Cortellini D, Lang N P. In situ detection of apoptosis at sites of bacterially induced inflammation in human gingiva Infect. Immun. 1998: 66 (11): 5190-5