

ТУМОР НЕКРОЗЕН ФАКТОР (ТНФ) ВО ГИНГИВАЛЕН ФЛУИД - МОЖЕН ИНДИКАТОР НА ИНИЦИЈАЛНА ПАРОДОНТАЛНА БОЛЕСТ

Стефановска Е., Накова М., Ивановски К., Горѓоски.И.,
Радојкова-Николовска В., Ристоска С., Митиќ К.

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

Во нашата студија си поставивме за цел да ја утврдиме влогдноста од користењето на цитокинскиот медијатор ТНФ-алфа, како можен индикатор на иницијалната пародонтална болест.

За нејзина реализација ги дефиниравме гингивално-флуидните и серумските концентрации на ТНФ-алфа кај пациентите со гингивална и иницијална пародонтална болест. Гингивалниот и пародонталниот статус кај испитуваните групи го анализиравме преку процена на: индекс на денитален плак ИДП (Silness-Loe), индекс на гингивална инфламација ИГИ (Loe-Silness) и индексот на гингивално крварење ИГК (Cowell). Гингивалниот флуид го колекциониравме со филтер стерилен хартија кај 90 пациенти, а испитот беше анализиран со ELISA методот за ТНФ-алфа. Серумските примероци земени по пат на венепункција исто така беа анализирани за ТНФ-алфа со ELISA методот.

Концентрациите на гингивално-флуидните нивоа на овој инфламаторен цитокин (ТНФ-алфа) беа статистички значајно повисоки кај пациентите со гингивална и иницијална пародонтална болест во споредба со здравите испитаници ($p < 0,05$). Серумските нивоа на ТНФ-алфа исто така укажаа на статистички значајни разлики во вредностите кај истите испитувани групи, иако покажаа високо индивидуални варијации на концентрационите вредности помеѓу испитуваните групи.

Нашите сознанија потврдија дека ТНФ-алфа може да биде дефиниран кај клинички

обсервирано пародонтално заболување, на кој начин испитот би можел да претставува гингивално-флуиден индикатор на иницијалната пародонтална болест.

Клучни зборови: ТНФ, пародонтална болест, гингивален флуид, ELISA.

Локализацијата на одредени Грам негативни орални бактерии во субгингивалната регија, може да иницира одговор на домаќинот кој резултира со сврзно-ткивна деструкција на забно-потпорниот апарат преку активирање на колагената и остеолитичната каскада (2,6). Се претпоставува дека иницијацијата на процесот на деградирање на пародонтот започнува со ослободување на солубилни компоненти или бактериски продукти. Бактериските продукти, вклучувајќи ги липополисахаридите се покажале како способни да ги стимулираат резидентните клетки, сулкусните епителни клетки и фибробластите, но и мигрираните полиморфонуклеарни леукоцити и макрофаги кон секретација на проинфламаторни цитокини и протеинази (2,5,6). Еден од клучните цитокински одговори во инфламацијата е локалната продукција на ТНФ-алфа, одговорен за иницијацијата и продолжувањето на инфламаторните и ткивно-деструктивните процеси во пародонтот.

ТНФ-алфа е способен да активира и многу други различни цитокини и хемокини, вклучувајќи ги IL-1, IL-11, IL-16 и IL-8, клеточно атхезивни молекули и транскрипциски молекули (21). Локалните пара, јукста и автокрини ефекти на ТНФ вклучуваат стимулација на експресија на фибробластната колагеназа тип 1 (матриксметалопротеиназа 1, MMP-1), колагеназа 2 (MMP-8) и колагеназа 3 (MMP-13) (9,10).

Сите овие колагенази се способни да го деградираат пародонталниот лигамент, што се должи на нивната единствена колагенолитична активност (2, 11). На тој начин ТНФ се смета за еден од клучните регулатори на инфламацијата со сигнификантен потенцијал за стимулирање на локалната коскена ресорпција на паракрин начин (12).

Во согласност со овие истражувања очекувано е дека ТНФ игра клучна улога во инфламацијата и ткивната деструкција.

Тргувајќи токму од овие сознанија ја оформивме и целта на нашата студија: да ја детектираме локалната (гингивално-флуидна) и серумска концентрација на овој инфламаторен цитокин кај пациенти со гингивална и иницијална пародонтална болест.

Материјал и метод

Кај пациентите со гингивална и иницијална пародонтална болест (испитувани групи) и здравите пациенти (контролна група), сите со по 30 пациенти, го детектиравме гингиво-пародонталниот статус преку клиничките параметри: ИДП (Silness-Loe), ИГИ (Loe-Silness) ИГК (Cowell). Гингивалниот флуид го колек-

циониравме со филтер стрип хартија од мезиобукалните површини на максиларните молари од соодветно испитуваните регии во времетраење од 30 секунди. Забите од испитуваната регија претходно беа испрани со вода, им беше елиминран супрагингивалниот дентален плак и изолирани со ватеролни заради минимизирање на евентуалната саливарна контаминација. Потоа флуидот го колекциониравме во микроквети со 0,5 ml солен фосфатен пуфер со рН =7,2, а потоа смрзнат на температура од -20 Ц до денот на анализирање. Пред анализата примероците беа центрифугирани, а потоа анализирани за ТНФ-алфа со комерцијално достапниот ELISA метод на Институтот за биологија при Факултетот за природни науки во Скопје. Серумските примероци беа земени по пат на венепункција и истите беа анализирани со ELISA методот за ТНФ-алфа.

Резултати

Табела 1 ги покажува индексните вредности на денталниот плак (ИДП) кај испитуваните групи. Индексните вредности ги потврдуваат статистички сигнификантните разлики за ИДП во рамките на сите испитувани групи ($p < 0,05$).

Табела 2 ги прикажува вредностите за ИГИ. Овие индексни вредности укажуваат на статистички сигнификантни разлики кај испитаниците со гингивална и иницијална пародонтална болест, но не и кај здравите, со оглед дека кај нив не нотиравме гингивална инфламација.

ТАБЕЛА 1. ПРОСЕЧНИ ВРЕДНОСТИ ЗА ДЕНТАЛЕН ПЛАК (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 ГИНГИВАЛНА ИНФЛАМАЦИЈА (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 ГИНГИВАЛНО КРВАВЕЊЕ (ИГК) КАЈ ИСПИТУВАНИТЕ ГРУПИ

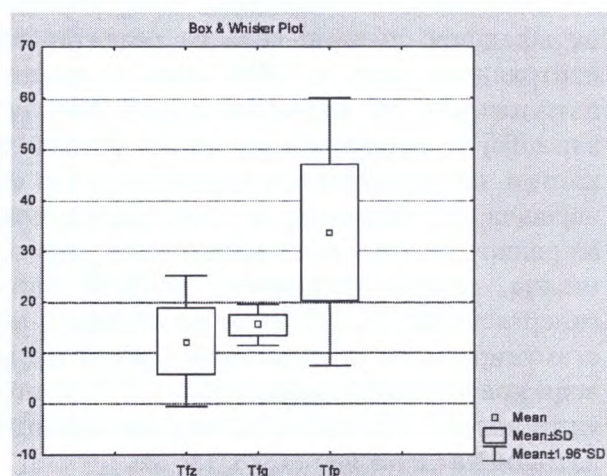
Испитаници	X	SD	df	t	p
Здрави	0,00	/	29	/	/
со гингивална болест	0,86	0,345	29	13,72	0,00000*
со иницијална пародонтална болест	1,70	0,46	29	19,97	0,00000*

Табела 3 ги презентира индексните вредности на ИГК. И за овој параметар регистриравме статистички сигнификантни разлики кај испитаниците со гингивална и иницијална пародонтална болест, но не и кај здравите, кај кои не нотиравме индексни вредности за гингивално крвање.

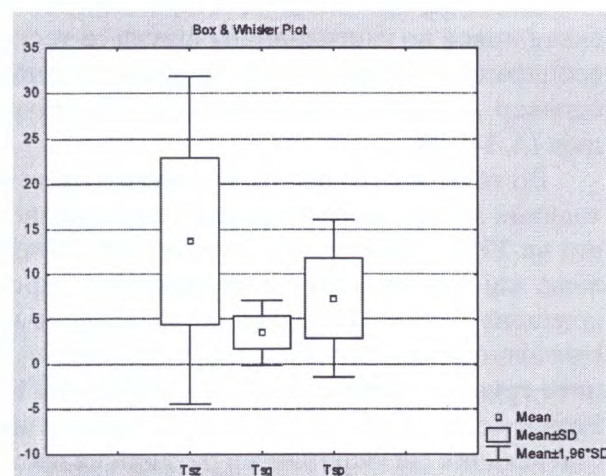
Графикон 1 ги покажува гингивално-флуидните нивоа на ТНФ-алфа кај испитува-

ните групи. Анализата на варијанса (ANOVA) покажа статистички сигнификантни разлики во гингивално-флуидните нивоа за ТНФ-алфа во рамките на сите испитувани групи. ($F=110,09$ $p=,00000$)

Графикон 2 ги покажува серумските нивоа на ТНФ-алфа кај испитуваните групи. Анализата на варијанса (ANOVA) покажа статистички сигнификантни разлики во



Графикон 1. Гингивално-флуидни нивоа на ТНФ-алфа кај испитуваните групи



Графикон 1. Ссерумски нивоа на ТНФ-алфа кај испитуваните групи.

серумските нивоа за ТНФ-алфа кај сите испитувани групи ($F=66,87$ $p=,00000$).

Анализата на варијанса (ANOVA) покажа статистички сигнификантни разлики во гингивално-флуидните нивоа за ТНФ-алфа кај сите испитувани групи ($F=110,09$ $p=,00000$).

Анализата на варијанса (ANOVA) покажа статистички сигнификантни разлики во серумските нивоа за ТНФ-алфа кај сите испитувани групи ($F=66,87$ $p=0,00000$).

Дискусија

Кога се генерираат инфламаторните одговори во било кое ткиво, експресијата на различни цитокини е вообичаено зголемена и тогаш настанува дисрегулација на локалниот имун одговор. Многу истражувања потврдуваат дека нерестриktivна продукција на инфламаторни цитокини доведува до одредено заболување и евентуална негова прогресија. Ова ја зголемува можноста да објективно се дијагностицира тежината на инфламацијата преку мониторингот на цитокинските нивоа и профилот на инфламираните регии. Со цел да се дијагностицира активноста на заболувањето во пародонталните ткива, научниците откриле можна асоцираност помеѓу нивоата на различните цитокини во гингивалниот флуид и пародонталниот статус или состојба.

Некои од нив истакнуваат дека цитокинските нивоа во гингивалниот флуид се тесно асоцирани со тежината на инфламаторниот одговор и пародонтално-тквивната деструкција (4, 14, 19).

Во тој контекст во нашата студија си поставивме за цел да ја утврдиме инволвираноста на ТНФ-алфа во инфламаторните случувања кај гингивалната и иницијаната пародонтална болест. Најпрвин го детектиравме гингиво-пародонталниот статус кај испитуваните групи, нотирајќи го ИДП, ИГИ и ИГК. Резултатите за ИДП (табела 1) укажаа на статистички сигнификантни разлики на вредностите во рамките на сите испитувани групи ($p<0,05$). За ИГИ (табела 2) и ИГК (табела 3)

нотиравме статистички сигнификантни разлики на вредностите кај испитаниците со гингивална и иницијална пародонтална болест, но не и кај здравите испитаници, со оглед на фактот дека овие индексни вредности не беа детектирани кај здравите испитаници.

Вредностите за гингивално-флуидните нивоа на ТНФ-алфа покажаа статистички сигнификантни разлики во рамките на сите испитувани групи.

Така кај здравите испитаници вредностите за ТНФ-алфа од 12,29 pg/ml се зголемија на 15,50 pg/ml кај испитаниците со гингивална инфламација, за да кај испитаниците со иницијална пародонтална афекција рапидно се зголемат на 33,72 pg/ml (графикон 1).

Серумските нивоа на ТНФ-алфа и покрај варијациите во концентрационите вредности, покажаа статистички сигнификантни разлики на вредностите кај сите испитувани групи ($p<0,05$). Така кај здравите испитаници вредностите изнесуваа 13,68 pg/ml. Со зголемување на степенот на инфламација кај испитаниците со гингивална болест нотиравме пад на серумската концентрација на ТНФ-алфа на 3,51 pg/ml, а кај иницијалната пародонтална лезија концентрација од 7,32 pg/ml (графикон 2).

Вака изнесените високо статистички зголемени вредности за гингивално-флуидните концентрации на овој цитокин, пред се кај испитаниците со иницијална пародонтална афекција сметаме дека се резултат на централната улога на ТНФ-алфа во имунопатологијата на пародонталното заболување. Тој се продуцира од повеќе различни клетки, но макрофагите и слични на нив се најзначајни генератори на овие медијатори во раниот стадиум на гингивалната инфламација, додека активноста на ТНФ-алфа синергистички со IL-1-алфа во процесот на стимулирање на гингивалните фибробласти води кон зголемена секреција на IL-6, со што уште повеќе ја продлабочуваат настанатата патолошка ситуација (7, 18, 15, 20).

Со добиените резултати за овој инфламаторен цитокин сме во согласност со

истражувањата на Graves, каде за време на гингивалната инфламација е забележано статистички сигнификантно покачување на ТНФ флуидните нивоа, меѓутоа само кај возрасната популација, а не и кај младата популација (8). Интересен е податокот дека ТНФ нивоата продолжувале да се зголемуваат после професионалното отстранување на плакот и воспоставувањето на орално хигиенските процедури.

Нашите наоди ја потврдуваат неговата улога како критичен цитокин во инфламаторниот одговор кон пародонталната инфекција, и со тоа сме во согласност со истражувањата на Beutler и сор. (1).

Главното сме согласни и со истаржувањата на Black и сор. (3), кои исто така нотирале пониски нивоа на ТНФ-алфа кај испитаници со гингивална болест отколку кај испитаници со хронична или агресивна пародонтопатија, но не многу различни од нивоата кај здрави лица. Идентични се и наодите од страна на Lum и сор. (13).

Ниските серумски концентрации на ТНФ-алфа нотирани во нашата студија сметаат дека се должат на фактот што нашите испитаници беа со добра општа здравствена состојба, па неговото системско делување како инфламаторен медијатор и не очекувавме да биде детектибилно, со што сме во согласност и со наодите на Rossomondo и сор. (17).

Тие исто така укажуваат на детектирани повисоки гингивално-флуидни нивоа на ТНФ-алфа во однос на серумските нивоа, претпоставувајќи дека овие медијатори се ослободуваат локално.

Исто така евидентираното присуство на ТНФ во ниски концентрации во клинички здрава гингива, потврдува дека цитокините се проминентни актери во нормалната ткивна хомеостаза, за што сме во согласност со наодите на Okada и сор. (16).

Сметаме дека нашите наоди кои укажаа на сигнификантно зголемени нивоа на ТНФ-алфа во гингивалниот флуид со зголемување на степенот на гингивалната инфламација, поткрепени со податоците од бројните

литературни истражувања ја потврдуваат неговата улога како ран индикатор на инфламаторно-деструктивните случувања во пародонталната патогенеза.

TUMOR NECROSIS FACTOR ALPHA IN GINGIVAL FLUID- POSSIBLE INDICATOR OF INITIAL PERIODONTAL DISEASE

Stefanovska E., Nakova M., Ivanovski K., Gjorgoski I., Radojkova-Nikolovska V., Ristoska S., Mitić K.

Summary

In the study we assessed the suitability of using the cytokine mediator TNF- alpha as a possible indicator of initial periodontal disease. We determined the gingival-fluid and serum concentration of this cytokine in sites with gingivitis and initial periodontitis.

Gingival and periodontal disease status was documented by recording the plaque index IDP(Silness-Loe) index of gingival inflammation IGI (Loe-Silness) and index of gingival bleeding GBI (Cowell). Gingival fluid was collected on filter strips from 90 patients and analyzed for TNF-alpha by ELISA. Serum samples were also analyzed for TNF-alpha by ELISA.

The concentrations of gingival fluid levels of this inflammatory cytokine were statistics significantly higher at patients with gingivitis and periodontitis compared with healthy patients. ($p < 0,05$). Serum levels also shows statistics significant differences, despite variation in clinical concentration among examine groups.

These findings suggest that TNF-alpha may be found in sites with clinically observable disease and therefore it can be a possible gingival-fluid indicator for initial periodontal disease.

Key words: tumor necrosis factor, periodontitis, gingival fluid, ELISA

Литература

1. Beutler B, Grau GE. Tumor necrosis factor in the pathogenesis of infectious diseases. Crit Care Med. 1993;21:423-35.

2. Birkedal-Hansen H (1993). Role of cytokines and inflammatory mediators in tissue destruction. *J Periodontol Res* 28:500-510.
3. Black RA (2002). Tumor necrosis factor-alpha converting enzyme. *Int J Biochem Cell Biol* 34:1-5.
4. Cox, D. S. and E.E. Mendoza: Interleukin-2 in Gingival Crevicular Fluid and Relationship to Periodontitis. *J. Dent. Res.* 66(Spec Issue): Abstr. 124 (1987).
5. Ding Y, Uitto V-J, Haapasalo M, Lounatmaa K, Kontinen YT, Salo T, et al., (1998). Membrane components of *Treponema denticola* trigger proteinase release from human polymorphonuclear leukocytes. *J Dent Res* 75:1986-1993.
6. Gemmell E, Marshall RI, Seymour GJ (1997). Cytokines and prostaglandins in immune homeostasis and tissue destruction in periodontal disease. *Periodontol* 2000 14:112-143.
7. Gemmell E, Seymour GJ. Interleukin1, interleukin 6 and transforming growth factor-b production by human gingival mononuclear cells following stimulation with *porphyromonas gingivalis* and *fusobacterium nucleatum*. *J Periodontal Res.* 1993;28:122-9.
8. Graves DT, Cochran D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction. *J Periodontol.* 2003;74:391-401.
9. Hanemaaijer R, Koolwijk P, le Clercq L, de Vree WJ, van Hinsbergh VW (1993). Regulation of matrix metalloproteinase expression in human vein and microvascular endothelial cells. Effects of tumour necrosis factor alpha, interleukin 1 and phorbol ester. *Biochem J* 296:803-809.
10. Johansson N, Westermarck J, Leppa S, Hakkinen L, Koivisto L, Lopez-Otin C, et al. (1997). Collagenase-3 (matrix metalloproteinase-13) gene expression by HaCaT keratinocytes is enhanced by tumor necrosis factor-alpha and transforming growth factor-beta. *Cell Growth Differ* 8:243-250.
11. Kunduper V, Lopez-Otin C, Smith B, Knight G, Murphy G (1996). Biochemical characterization of human collagenase-3. *J Biol Chem* 271:1544-1550.
12. Kontinen YT, Xu J-W, Patiala H, Imai S, Waris V, Li T-F, et al. (1997). Cytokines in aseptic loosening of total hip replacement. *Curr Orthop* 11:40-47.
13. Lum L, Wong BR, Josein R, Becherer JD, Erdjument-Bromage H, Schlondorff J et al. (1999). Evidence for a role of a tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha)- converting enzyme-like protease in shedding of TRANCE, a TNF family member involved in osteoclastogenesis and dendritic cell survival. *J Biol Chem* 274:13613-13618.
14. Masada MP, Persson R, Kenny IS, Lee SW, Page RC, Allison AC (1990). Measurement of interleukin-1 α and interleukin 1 β in gingival crevicular fluid: Implications for the pathogenesis of periodontal disease. *I Periodont Res* 25:156-163.
15. Murray J, Barbara J, Dankley S, et al. Regulation of neutrophil apoptosis by tumor necrosis factor-A. requirements for TNF-R55 and TNF-R75 for induction of apoptosis in vivo. *Blood.* 1997;90(7): 2772-83.
16. Okada H, Murakami S. Cytokine expression in periodontal health and disease. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1998;9:248-66.
17. Rossomando E F, Kennedy] E, Hadjimichael J. Tumor necrosis factor alpha in gingival crevicular fluid as a possible indicator of periodontal disease in humans. *Archs Oral Bio/ / 990; 35:431-434.*
18. Seymour GJ, Gemmel E. Cytokines and periodontal disease: where to from here? *Acta Odontol Scand.* 2001;59:167-73.
19. Stashenko P, Fujiyoshi P, Obernesser MS, Probst L, Haffajee AD, Socransky SS (1991). Levels of interleukin 13 in tissue from sites of active periodontal disease. *J Clin Periodontol* 18:548-554.
20. 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-b or tumor necrosis factor-a. *J Periodontol.* 1994;65:1122-7.
21. Vilcek J, Lee TH (1991). Tumor necrosis factor. New insights into the molecular mechanisms of its multiple actions. *J Biol Chem* 266:73 13-73 16.