

Универзитет "Св. Кирил и Методиј"

Стоматолошки факултет - Скопје
Клиника за болести на устата и пародонтот

МАЈА ПАНДИЛОВА

**КОМПАРАТИВНА АНАЛИЗА НА
АПОПТОТИЧНОТО ОДУМИРАЊЕ НА КЛЕТКИТЕ
ВО ТЕК НА ПАРОДОНТАЛНАТА БОЛЕСТ**

ДОКТОРСКА ДИСЕРТАЦИЈА

Ментор: проф. д-р сци Ана Ставревска - Миновска

Скопје, 2003

Членови на рецензентската комисија и комисијата за одбрана:

Проф д-р Методи Симоновски

Проф д-р Ана Ставревска- Миновска

Проф. д-р Златанка Белазелкоска

Проф. д-р Мирко Спировски

Доц. д-р Весна Јаневска

Датум на одбрана:

Датум на промоција:

Научна област:

стоматологија, пародонтологија

Во изработката на оваа докторска дисертација свој придонес дадоа повеќе институции и поединци, за кои чувствувам не само должност, туку пред се, задоволство да ги споменам и да им се заблагодарам. Благодарност должам кон:

Мојот ментор, проф. д-р Ана Миновска- Ставревска, за отвореноста за соработка, одвоеното време за разговор и постојаниот поттик и поддршка, се до конечното обликување на овој труд.

Проф. д-р Мирко Спировски и вработените на Институтот за имунологија и хумана генетика, за помошта во изработката и толкувањето на резултатите од имунолошките испитувања.

Доц. д-р Весна Јаневска од Институтот за патолошка анатомија, за помошта во изработката на патохистолошките и имунохистохемиските испитувања, како и помошта во нивното толкување.

Доц. д-р Розалинда Исајановска, за помошта во статистичката обработка на податоците.

На вработените на Клиниката за болести на устата и пародонтот и Клиниката за орална хирургија, за помошта во собирањето на материјалот.

На Александар Кирјази за помошта во техничкото обликување на текстот.

Благодарност должам и на мојот сопруг Стефан, за постојаната поддршка и трпение искажани во тек на изработката на овој труд.

КОМПАРАТИВНА АНАЛИЗА НА АПОПТОТИЧНОТО ОДУМИРАЊЕ НА КЛЕТКИТЕ ВО ТЕК НА ПАРОДОНТАЛНАТА БОЛЕСТ

Кратка содржина

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 одигруваат 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 се уште го нема најдено своето место во тек на комплексниот патоген механизам на пародонталната болест. Токму овој недостиг го побуди нашиот интерес да превземеме испитување со основна цел да утврдиме:

- присуство на апоптоза за време на пародонталната деструкција во услови кога епителната инсерција е на цементно-емајловата граница или нешто под неа ($< 3 \text{ mm}$) во отсаство на инфламација, и кога епителната инсерција е апикално измигрирана ($3-6 \text{ mm}$ и $>6 \text{ mm}$)
- дали постои разлика во квантумот на апоптоза во гингивалното ткиво кај ниво на атачмент поголем од 6мм кога постои различен степен на гингивална рецесија, компарирано со пародонтална лезија каде повторно атачмент нивото е над 6 mm, меѓутоа отсаствува рецесијата.
- нивото на IL_1 , IL_2 , IL_6 , IL_{12} , како и нивото на С-реактивните протеини кај сите пациенти.

За реализација на поставената цел беше формирана испитувана група од 60 пациенти, со дијагностицирана адултна хронична

пародонтопатија, кои беа поделени во две групи. Во првата група беа селектирани пациенти кај кои беше утврден губиток на атачмент, меѓутоа позицијата на работ на гингивата беше во ниво или над цементно-емајловата граница. 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.

Втората група ја сочинуваа пациенти кај кои беше регистриран губиток на атачмент еднаков или поголем од 6 mm, а работ на гингивата се наоѓаше под цементно-емајловата граница. Според изразеноста на рецесијата пациентите беа понатаму поделени во три групи и тоа: со изразеност на рецесијата од 2 mm, од 2 до 5 mm и над 5 mm. Сите пациенти беа на возраст од 20 до 40 години и кај сите беа регистрирани регии со здрав пародонт. Од пациентите беше земен исечок од гингива, како од испитуваната регија така и од здравата регија. Дел од земеното ткиво беше фиксирано во формалин додека другиот дел беше замрзнат на -80 °C. Исечоците кои беа фиксирани во формалин по соодветната обработка беа боени со hemotoxylin-eosin за одредување на апоптотичните клетки, а истите понатаму беа и имунохистохемски боени за одредување на bcl2 и p53 позитивни клетки. Во замрзнатите исечоци со ELISA методата беше барано присуството на ИЛ₁, ИЛ₂, ИЛ₆, ИЛ₁₂, како и нивото на С-реактивните за што беше користена нефелометриска метода.

По анализата на добиените резултати можевме да ги изведеме следните заклучоци.

Во ткивото кое покажа на патохистолошкиот наод отсуство на било какви инфламаторни променим беа најдени апоптотични клетки со просечна застапеност на 1,0779. Исто така во здравото ткиво беше утврдено присуството на bcl2 и p53 позитивни клетки. Бројот на апоптотични клетки покажа пораст напоредно со зголемувањето на губитокот на атачментот. Во однос на различно изразената гингивална рецесија, бројот на апоптотични клетки покажа статистичка сигнификантност само за вредност на рецесијата од 2-5 mm.

Коефициентите на корелација покажаа силна позитивна корелација помеѓу степенот на губиток на атачмент и бројот на апоптотични клетки кај адултната пародонтопатија. Од испитувањата на модулаторите на апоптозата можевме да заклучиме дека bcl 2 покажа највисока вредност во ткивото кое одговара на губиток на атачмент до 3 mm и инфламација од прв степен, како и силно изразена негативна корелација во однос на апоптозата, што ни овозможува да го вброиме во значајните фактори на инхибиција на апоптозата која се одвива за време на пародонтопатијата.

p53 покажа најголема вредност во гингивата која одговара на апикална миграција на епителот над бмм и прогресивен раст со зголемување на степенот на инфламацијата, иако статистичка сигнификантност изостана.

Добиените резултати од испитувањето на цитокините покажаа сигнификантен пораст на IL1 α и IL1 β како и IL2 напоредно со заголемувањето на апикалната миграција на припојниот епител, како и со напредувањето на рецесијата. Анализата на варијабилитетот покажа сигнификантност за IL6 во групата на пациенти со различно изразен губиток на атачмент и за IL1 β за групата на пациенти со различно изразена рецесија на гингивата. Посочувајќи на најизразените амплитуди во нивоата на овие два цитокини во тек на пародонтопатијата. Ниеден од испитуваните цитокини не покажа зависност со експресијата на bcl2 ниту пак со експресијата на p53.

Нашите наоди посочуваат дека динамиката на апоптозата првенствено е поврзана со изразеноста на инфламацијата во ткивото. Поголемата апоптоза учествува во губитокот на атачмент, додека ваквото влијание за настанокот и прогресијата на рецесијата не беше потврдено.

Клучни зборови: апоптоза, пародонтопатија, инфламација, p53, bcl2, цитокини.

Comparative analysis of apoptotic cell death during periodontal disease

Abstract

Apoptosis is a programmed form of cell death which results in the elimination of specific cells without disturbance of the tissue structure or function. 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 attachment loss and gingival recession. Our objective was also to study the levels of IL₁, IL₂, IL₆, IL₁₂, and C reactive proteins.

Gingival tissue biopsies from 60 patients were obtained. Patients were divided into two groups. In the first group, patients were selected with different degrees of attachment loss and with no gingival recession. The second group was consisted of patients with attachment loss equal or greater than 6mm and various degrees of 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 split in two pieces. One tissue piece was fixed in 10% formalin and the remaining part of the tissue was frozen on -80 °C. The formalin fixed sections were submitted to immunohistochemical analysis for p53 and bcl2 positive cells, and detection of apoptotic cell death as well. In the frozen tissue sections using ELISA method and nephelometry the levels of the examined cytokines and C-reactive proteins were determined. After the statistical analysis of our results we can conclude that: apoptotic cells and p53 and bcl2 positive 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 correlation between apoptosis and attachment loss. No such connection between apoptosis and gingival recession was found. A strong negative correlation between apoptosis and bcl2 positive cells was determined, suggesting that bcl2 plays a key role in the inhibition of apoptosis during periodontal disease.

From the analysis of the values of the examined cytokines our data suggest that IL 1 α , IL1 β and IL2 levels were increasing as the inflammation and attachment loss increased. The analyses of variances (ANOVA) showed statistical significance for IL6 in the group with attachment loss and for IL1 β in the group with gingival recession. None of the examined cytokines showed any correlation for bcl2 or p53. 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, as for the gingival recession no such correlation was established.

Key words: apoptosis, periodontal disease, inflammation, bcl2, p53, cytokines

СОДРЖИНА

1. ВОВЕД	1
1.1 Апоптоза, механизам и регулација	4
1.2 Импликации на апоптозата и цитокината мрежа во пародонталната болест	18
2. ЦЕЛ НА ТРУДОТ	27
3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОД НА РАБОТА.....	28
4. РЕЗУЛТАТИ.....	35
4.1 Резултати за апоптоза.....	35
4.2 Резултати за Bcl2.....	41
4.3 Резултати за p53.....	44
4.4 Резултати за IL1 α	48
4.5 Резултати за IL1 β	50
4.6 Резултати за IL2.....	53
4.7 Резултати за IL6.....	56
4.8 Резултати за IL12.....	58
4.9 Резултати од испитуваните корелации.....	60
5. ДИСКУСИЈА	73
6. ЗАКЛУЧОЦИ.....	94

1. ВОВЕД

Клеточната смрт е процес кој се среќава како во патолошки изменетото ткиво така и во текот на физиолошката динамика на здравото ткиво во организмот. Морфолошките студии укажуваат на два типа на клеточна смрт: некроза и апоптоза (150). За разлика од некрозата која е детално опишана и проучена, поголем интерес за апоптозата се јавува во почетокот на осумдесетите години, па така во литературата се среќаваат уште и термините јадрена смрт или програмирана смрт на клетката.

Денес е веќе прифатено сознанието дека клеточното преживување зависи од репресијата на сопствениот деструктивен програм. Идентификацијата на генетската регулација на програмираната клеточна смрт доведе до прифаќање на идејата дека клетката може да преживее само кога е сигнализирана (од други клетки) супресијата на индукцијата на клеточниот суициден процес. Со други зборови, досегашните студии за програмираната клеточна смрт покажале дека истата е регулирана од сигнали добиени по пат на т. н. клеточна информација преку солубилни медијатори или од контактот клетка - клетка (32)

Опишани се различни фенотипови на програмирана клеточна смрт, меѓутоа во сите случаи, клеточниот суицид се одвива по строго уредни процеси на морфолошка дезинтеграција (72, 64, 18, 122), а најчестиот фенотип е претставен со апоптозната парадигма. Овој образец се карактеризира со хроматинска маргинализација, кондензација и фрагментација како и кондензација на цитоплазмата нејзина вакуолизација и фрагментација (153, 30).

Овој апоптотичен фенотип е асоциран со иницијално очување на интегритетот на клеточната мембрана, следно со формирање на апоптотични телца обрабени со клеточна мембрана и експресија на специфични клеточни површински молекули, кои овозможуваат брза ингестија на клетките кои умираат, по пат на фагоцитоза од страна на соседните клетки, доведувајќи до брзо

исчезнување на истите во одсуство на било каква инфламаторна реакција (88, 19, 119).

Студиите на интрацелуларната и генетската регулација на програмираната клеточна смрт го потврдија концептот за клеточниот суицид, односно идејата дека клетката може да преживее само кога прима доминантни сигнали кои дозволуваат превенција на егзекуцијата или клеточен суицид. Така апоптозата е регулирана од регулаторни гени, инхибитори и иницијатори на апоптозата кои се наследени во геномот, па оттука и терминот генетски програмирана клеточна смрт. Конечната одлука дали да се тригерира или не автодеструкцијата, се одигрува на ниво на цитоплазмата на клетката и е резултат на најмалку три фактори:

- протеолитичка активација на инактивните прекурзори на каспазата во активна каспаза;
- митохондријално ослободување на молекули потребни за оптимална протеолитичка активација на каспазата;
- интеракција на генски продукти од семејството на bcl_2 со надворешната митохондријална мембрана.

Регулацијата на апоптозата може да биде од ендогени и егзогени регулациони фактори. Егзогените клеточни стимули, кои ја регулираат апоптозата се во директна зависност со потребата за “преживувачки” фактори кои го превенираат откочувањето на апоптотичниот процес на одумирање по пат на клеточен суицид “by default” (32, 138, 111, 142, 51) што значи базичното јадро на регулацијата на програмираната клеточна смрт зависи од меѓусебното дејство на продуктите од две антагонистички генски фамилии.

Експериментите како “in vivo” така и “in vitro” на администрација на цитокини, покажаа дека PDGF (platelet-derived growth factor) и IGF (insulin-like growth factor) се важни преживувачки фактори кај одредени клеточни популации (10). Слично лимфоцитите во одсуство на IL_2 претрпуваат апоптотични измени (29).

Покрај цитокините во литературата се опишуваат и други фактори кои ја регулираат апоптозата, како промени во концентрацијата на калциум, магнезиум и цинк, хипоксија, гликокортикоиди, бактериски липополисахариди, имунолошките процеси, простагландини, слободни радикали, TNF и воглавно помали количества од сите фактори кои ја предизвикуваат некрозата.

Базичните принципи на етиопатогенезата на хроничната пародонтална болест не потсетуваат дека нејзината експресија е комбинација на ткивни, микробни и амбиентарни фактори. Хистолошките студии на пародонтопатично афецираните ткивни структури докажуваат присуство на различни популации на инфламаторни клетки, кои синтетизираат голем број на макромолекули. Индивидуално или заедно, овие макромолекули партиципираат како во резолуцијата така и во деструкцијата на ткивата. Во литературата се сретнуваат голем број на студии кои укажуваат на тоа дека цитокините се примарно одговорни за текот на болеста (40, 145), пред се поради нивната улога како молекуларни медијатори кои ја насочуваат и регулираат инфламацијата. Од големиот број на различни цитокини, значаен удел во хроничните инфламаторни процеси за време на пародонталната болест имаат интерлеукините, за кои се знае дека носат комплексни и често детални пораки помеѓу леукоцитите (52, 54, 125, 153).

Како во овие агенсии можат да се препознаат дел од чинителите кои учествуваат во пародонталната болест, како и во откочувањето на апоптозата, логично се наметнува и дилемата: дали и како апоптозата учествува во патогенетските збиднувања во текот на пародонтопатијата, дали постои корелација помеѓу клиничката слика и обемот на апоптозата во ткивото и она што можеби побудува најголем интерес, дали постои разлика во чувствителноста на клетките према апоптотичниот импулс, кај секој од нас, давајќи на тој начин придонес во модулацијата на клиничката слика на болеста.

1.1 Апоптоза, механизам и регулација

Литературен преглед

Сите клетки во отсуство на сигнали за опстанок подлежат на смрт. Сите досегашни сознанија ја потврдуваат тезата, колку парадоксално и да изгледа, дека за да се одржи животот во себе мора да ја вклучи и смртта.

Смртта на поедини клетки овозможува диференцијација и оформување на поедини ткива во тек на ембрионалниот развој, функционално организирање и созревање на двата најкомплексни регулаторни системи кај повеќеклеточните организми (имунолошкиот и нервниот систем), одржување на ткивата во нормалните рамки и отстранување на изменетите клетки во тек на животот, отстранување на клетките на имуниот систем кои не носат адекватни информации (self reactive клонови на имуниот систем), како и отстранување на вирусно инфицирани клетки.

Супресија на смртта на клетките од друга страна доведува до енормен раст на ткивата како кај карциномите, задржување на имуните клетки кои не го препознаваат сопственото ткиво и автоимуните заболувања, опстанок на клетките инфицирани од вируси и низа патолошки состојби како неуродегенеративните заболувања, сида итн.

Се до последните децении од минатиот век се верувало дека смртта на клетките е единствен и стериотипен процес, кој се одвива на еден ист начин независно од природата на причинителот или целта со која настанува.

Пресврт во ваквото мислење ќе предизвика случајниот наод на Kerr(62) во 1965 год, кој испитувајќи ја хепаталната исхемија на хистохемиски студии покрај руптурираните лизозоми во некротичните клетки забележал и интактни лизосоми опкружени со цитоплазматска мембрана. Користејќи електронска микроскопија во 1971 Kerr(63) утврдил дека се работи за целуларни фрагменти со збиени и очувани клеточни органели обрабени со клеточна мембрана. Овој процес Kerr(63)

го нарекол кондензациона некроза, за да една година подоцна (64) прв пат го употреби терминот апоптоза изведен од старогрчкиот термин *apto-sis* што значи отпаѓање на лисја од дрво.

Откривањето на апоптозата како механизам на самодеструкција, отвара една нова димензија во размислувањето на многу научници, пред се дали може да се контролира и како да се искористи.

Меѓутоа не е мал бројот на научниците чии интереси ги окупира идејата како и зошто во тек на еволуцијата се јавила апоптозата.

Во својата популарно напишана книга Dawkins(25) се прашува: како е можно во тек на еволуцијата да биде селектиран геном кој доведува до исчезнување на фенотипот?

Едно сосем ново гледиште на овој проблем нуди Ameisein(4) предлагајќи една интересна теза. Тој верува дека апоптозата е древно обележје на праклетката. Тргува од веќе сега општо прифатената теза на Marguilus(79) дека денешните клетки претставуваат ендосимбиоти помеѓу јадрото и митохондриите. Имено, со надоаѓањето на големи количини кислород во атмосферата, дотогашните анаеробни клетки со цел да се адаптираат на новонастанатата состојба, ги ингестирале митохондриите кои дотогаш биле "ентитети сами за себе", па на тој начин се јавило клеточното дишење, значајно во обезбедувањена енергија за клетката.

Со тек на еволуцијата, голем дел од гените кои ја регулираат синтезата на протеини потребни за митохондриите потпаднал под контрола на јадрото. На тој начин создадена е една зависност, во која отсуството на митохондриите ќе услови преод на анаеробен метаболизам кој е нерационален ивозможен само во одреден временски распон,а додека отсуството на јадрото ќе доведе до недостаток на неопходните митохондријални протеини.

Според мислењето на Ameisein(4) токму во овој контекст се јавила и програмираната клеточна смрт како праобележје на древната

аеробна клетка со основна функција на заштита на врската на јадрото и митохондриите.

Во прилог на оваа размисла одат неколку факти. Надворешната митохондријална мембрана претставува место каде се одвиваат поголем дел од збиднувањата за време на апоптозата. Егзекуторите на апоптозата, *caspazite* и *citohrom c*, се протеини строго специфични за митохондриите, додека *bcl* протеините кои ја инхибираат, се сметаат за јадрени протеини, па грубо речено, еквилибриумот на овие две групи протеини ја овозможува егзистенцијата како на јадрото така и на целата клетка.

Промоција во големите истражувачки центри апоптозата доживува дури 1980 год. со сериозните студии на Wiley(151) кој прв дава класификација на клеточната смрт, одвојувајќи ги дегенеративните процеси, познати како некроза, од еден активен процес на регулирана клеточна самодеструкција, која е и генетски контролирана.

Истиот автор дава и исцрпен морфолошки опис на апоптозата, посочувајќи дека е процес за кој е потребна енергија.

Trump(137) смета дека токму потребата од енергија го детерминира видот на смрта која ќе го одбере клетката. Очигледно клетките имаат развиено еден комплексен систем кој ги разликува стимулите предизвикани од повредата. Разликата, смета Trump(137), е во тоа дали повредата ја компромитира протеинската синтеза и АТФ како и целуларната регулација на натриум.

Во зависност од ова клетките подлежат на прелетална фаза која може да се одвива по пат на *oncosis* или апоптоза. Доколку прелеталната фаза се одвива по пат на онкоза, тогаш процесот е пасивен без губиток на енергија, пратен со пореметена регулација на натриум. Морфолошки карактеристики кои ја следат оваа фаза се бабрење на клетката и руптура на мембраната. Доколку пак клетката го одбере апоптотичниот модел, тогаш се одвива еден енергетски зависен процес, со специфична морфологија на кондензација на јадрото и цитоплазмата при што е сочуван интегритетот на клеточната мембрана.

Понатаму следи фаза на смрт на клетката при што онкозата преминува во некроза обележана со руптура на мембраната и инфламација во околното ткиво додека апоптотичната летална фаза завршува со разбивање во апоптотични телца и нивна фагоцитоза од околните макрофаги и паренхимални клетки без присуство на знаци на инфламација.

Морфологијата на апоптотичните клетки можеби е најдобро проучена, па бројни автори даваат идентичен опис на апоптозата, опишувајќи ја како стереотипен процес без оглед на видот на клетките, начинот на иницирање на процесот или биохемискиот механизам.

Прв и исцрпен опис на морфолошките карактеристики дава Wiley(151). Иницијалните промени се отчитуваат како кондензација на јадрениот хроматин потиснување на истиот кон периферијата на клетката. Напоредно со овие промени се згуснува и цитоплазмата, се вовлекува јадрената мембрана и започнува фрагментација на јадрото. Интегритетот и функцијата на клеточните органели е очуван се до крајните стадиуми кога настанува фрагментација на клетката во апоптотични телца обвиткани со клеточна мембрана. Содржината на апоптотичните телца не е иста, па некои содржат густо збиени органели и хроматин, додека други содржат само рибозоми (3). Апоптотичните телца за неколку часа биваат фагоцитирани од макрофагите во отсуство на инфламација.

Секако дека многу посложена е задачата да се утврдат динамичните процеси кои се одвиваат пред и за време на апоптозата во смисла на биохемиските промени, иницијаторите извршителите и инхибиторите на процесот. Проблемот е во тоа што иако сигналите кои можат да ја предизвикаат апоптозата се многубројни, а нивните интеракции комплексни сите покренуваат, во крајниот исход, еден ист механизам.

Аптозата е динамичен процес кој трае неколку часа и според случајувањата и партиципиентите поделен е во следните три фази(152)

- Иницијална фаза која зависи од специфичните соодноси помеѓу сигналите кои ја промовираат;
- Ефекторна фаза за време на која централните ефектори на апоптозата се активираат; и
- Деградациона фаза во која клетката ги поприма биохемиските и морфолошки обележја на апоптозата.

Во иницијалната фаза се преплетуваат дејствата на различни целуларни регулатори како и сигнали од опкружувањето на клетката. Дали ќе отпочне процесот и клетката ќе се осуди на смрт зависи од соодносот на различни модулатори на целуларниот одговор како bcl2, p53, bax, bclxl, bid количеството на калциум, цинк, присуството на слободни радикали итн.

Досега најмногу разбрани се bcl2 протеините. Bcl е протоонкоген кој за прв пат е откриен помеѓу 14-18 хромозомска транслокација кај фоликуларните В клеточни лимфоми од каде потекнува и името(136). Под негова контрола се цела низа на протеински продукти кои го носат името bcl, опишани како најмоќни модулатори на клеточната смрт.(113)

Bcl2 и bclxl претставуваат интегрален дел од мембранските протеини со ограничена субцелуларна дистрибуција. Тие се инкорпорирани во митохондријалната надворешна мембрана, мембраната на ендоплазматскиот ретикулум и нуклеарната мембрана (91) по пат на терминална карбоксилна врска, оставајќи сензитивен протеински рецептор слободен во цитосолот (66). Присуството на bcl во овие мембрани можеби посочува на взаемна врска во изнудувањето на апоптотични сигнали кои можат да бидат ефикасни само во одредени услови.

Најновите испитувања на Minn(83)го открија својството на bcl цитосолиниот рецептор да формира пори на синтетски биполарни мембрани, посочувајќи го заклучокот дека тој има својство да влијае на каналните активности на органелите во чии мембрани е инкорпорирани.

Митохондриите и ендоплазматскиот ретикулум, недвојбено учествуваат во контролата на електрохемиските промени кои во одреден дел ја промовираат апоптозата, а сето тоа е под супервизија на bcl2(53).

За време на апоптозата нарушен е потенцијалот на внатрешната митохондријална мембрана, уште пред да бидат активирани каспазите и ендонуклеазите. Ваквото нарушување овозможува формирање на т.н. митохондријален мегаканал односно јонски канал кој се јавува на местата на контакт помеѓу внатрешната и надворешна митохондријална мембрана. Формирањето на овој канал може да биде предизвикно од промените во количините на калциум, слободните радикали, аноксија, а како последици се јавуваат пореметувања во киселоста на средината, пореметен метаболизам на калциум, промени во волуменот на клетката и слободен проток на многубројни ензими кои се строго специфични за митохондриите во цитосолот на клетката(45).

Регулатор на мембранските активности на митохондриите е bcl2 кој според испитувањата на Ichas(56) го спречува истекувањето на *cytochrome c* и ја инхибира апоптозата. Сепак механизмите на се толку едноставни туку докажано е дека постои една прецизна и фина регулација детерминирана од соодносот на проапоптотични и антиапоптотични членови на bcl семејството. Два високо зачувани домени (BH1 и BH2) овозможуваат формирање на димери помеѓу bcl2 и bax(157) и помеѓу bax и останатите bcl протеини. Функцијата на bax е парадоксална, неговата експресија ја промовира апоптозата, меѓутоа и неговиот недостаток по се изгледа го прави bcl2 нефункционален да ја спречи апоптозата. Најверојатно мора да настане хетеродимеризација помеѓу bcl2 и bax за да се превенира апоптозата(99) па односот помеѓу овие два протеини е тој што ја детерминира чувствителноста на поедини клетки кон апоптотичните стимули(85). Поголема количество на bcl2 значи и поголемо количество на димери од bax i bcl2 и превенција на апоптозата, додека поголемото количество на bax значи поголема можност за асоцијација на bax bax димери и промоција на клеточната смрт. Boisell(12) ова и експериментално го докажал. Клетките кај кои била тригерирана апоптоза, со зголемена експресија на p53, искажале

намалена експресија на bcl2 и зголемена bax експресија. Многу апоптотични сигнали се блокирани од bcl2 како зголемена експресија на p53, јонизирачко зрачење, хипоксија. За да го оствари ваквиот ефект докажано е дека bcl2 врзува за себе и поедини протеински молекули(144) чиј идентитет и функција не се докрај разјаснети. Се верува дека постои и негативна врска помеѓу експресијат p53 и bcl2(47).

p53 е протеин кој е контролор на митотската делба на клетката и тоа и во двете нивоа G1 и G2 фазата. Се чини дека p53 е способен да направи проценка на оштетувањата на ДНК, доколку оштетувањето може да се поправи p53 предизвикува застој во G клеточниот циклус се додека не се отстрани, меѓутоа доколку е посериозно тогаш p53 го откочува апоптотичниот процес и ја отстранува оштетената клетка. Затоа p53 и е наречен "tumor supressor gene." Многу голем број на клетки имаат мутагени типови на p53 кои не функционираат од ваквите клетки најчесто се развиваат канцерогените клетки.(50) Најчесто оштетувањата од надвор предизвикуваат промени во ДНК и ја стимулираат p53 зависната апоптоза. Зголемената експресија на p53 ја промовира апоптозата делувајќи најчесто како трансактиватор на многу гени, првенствено на bax (47). Со цел точно да го утврди механизмот на p53 зависната апоптоза Lane(69) спровел биохемиски и фармаколошки испитувања во култури на клетки по што предлага дека p53 ја предизвикува апоптозата во три последователни фази транскрипционална индукција на редокс гени, формирање на слободни радикали и оксидативна деградација на митохондријалните компоненти. Graber(44) предлага сличен механизам при кој ако се земе хипоксијата како егзоген стимул, а во присуство на $TNF\alpha$ се генерира NO кој директно влијае на експресијата на p53.

Улогата на NO, како еден од модулаторите за трансмисија на сигнали, во откочување на процесот на апоптоза е сеуште неразјаснет. Постојат само неколку податоци добиени од експериментални модели, па така е утврдено дека NO се јавува како инхибитор на каспаза 3, 1 и 8, од друга страна се јавува како промотор на зголемената експресија на p53.

Постојат докази дека NO учествува во зголемувањето на количество на bcl2 и bclxl и во инхибицијата на истекување на cytochrome c во цитосолот. Секако овие дејства зависат од количеството на создаден NO и секако и од типот на клетките на кој делува .

Иако многу се знае за гените кои учествуваат во клеточната смрт, многу малку се знае за трансмисијата на сигнали кои ја регулираат апоптозата. Овие сигнали се наречени медијатори од втор ред и претставуваат дел од сигналната каскада која индуцира настани кои понатаму се преточуваат во целуларен одговор. Во оваа група спаѓаат cAMP, јоните на калциум, слободните радикали, а во последно време тука се вбројуваат и церамидите (107).

Церамидите се сфинголипиди(94). Овие ензими се распоредени во клеточната мембрана во цитоплазмата и нуклеозомите (98). Екстрацелуларни чинители, како $TNF\alpha 1$, interferon, IL1, VitD3, дексаметазон ја индуцираат продукцијата на церамидите што е и експериментално докажано (49).

Покрај другите функции кои ги имаат во клетката највпечатлива е способноста да предизвикаат апоптоза во култура на клетки (48). Нивото на церамиди во клетките расте при UV зрачење, отсуство на серум, хемотерапеутици и оксидативен стрес.

Иако доказот за учество на церамидите во апоптозата е неспорен сепак механизмот по кој делуваат останува сèуште непознат.

Obeid(94) сугерира дека дека церамидите го контролираат апоптотичниот пат на два члена на TNF лозата $TNF\alpha 1$ и Fas. Некои испитувања говорат дека биолошкиот или политропниот ефект на церамидите не зависи само од нивните целуларни концентрации туку и од видот и степенот на диференцијација на клетките.

Испитувањата на апоптозата на T клетките посочуваат дека каспазите можат да ја блокираат разградбата на BclXL во присуство на IL2.

Меѓутоа овие наоди се често оспорувани бидејќи сите податоци потекнуваат од истражувања изведени во *in vitro* услови, па се смета дека покачените нивоа на церамидите се најверојатно стресогено условени, а не како резултат на нивното учество во апоптозата.

Промените во генската експресија, како и во протеинската синтеза на клетките, можат да бидат резултат и на модификацијата во интеракциите на клетките со екстрацелуларниот матрикс.

Адхезијата на клетките за екстрацелуларниот матрикс е важна компонента во опстанокот пред се на клетките од епително и ендотелно потекло.

Кога ќе ја изгубат врската со екстрацелуларниот матрикс клетките многу бргу подлежат на апоптотични измени во процес кој се нарекува "anoikis" (35) или бездомност, кој, најверојатно се случува како резултат на губиток на инхибиторните сигнали, чија експресија е позитивно регулирана од контактот со субстратот.

Најзначајни се врските со базалната мембрана. Базалната мембрана претставува специјализирано ткиво на екстрацелуларниот матрикс составена од три ламини. Ламина ретикуларис првенствено изобилува со гликопротеини, laminin, fibronectin, vitronectin, proteoglikanti (70) кои овозможуваат прикрепување на клетките за базалната мембрана, раст, пролиферација и диференцијација (95), преку активација и експресија на соодветните гени (140).

Сите досегашни познавања за регулацијата на апоптозата преку промени во екстрацелуларниот матрикс ги вклучуваат интегрините.

Интегрините претставуваат голема група на рецептори кои клетките ги користат за интеракции со останатите клетки како и за реакции со екстрацелуларниот матрикс (117, 55). Составени се од два нековалентно врзани слободни ланци кои можат да реагираат меѓу себе, одредувајќи ги на тој начин специфичностите на рецепторните места (55). Протеините од екстрацелуларниот матрикс се поврзуваат како

лиганди за интегрините овозможувајќи на тој начин формирање на нерастворливи зони со кои се поврзуваат клетките со супстратот (13).

Reed(113) во своите испитувања вршени на култури од клетки утврдил дека регулацијата на апоптозата зависи како од адхезијата на клетките на супстратот, така и од количеството на интегрини и природата на врските кои тие ја остваруваат. Kulkarin(68) го посочува и присуството на серумските фактори на раст како регулатори на апоптозата.

Поврзувањето на лиганди преку интегринските хетеродимери може бргу да провоцира целуларен одговор во смисла на промена на киселоста, на концентрациите на калциум, промени во фосфолипидниот метаболизам, активација на кинази. Сите овие промени можат да доведат до активација на комплексни каскади на регулаторни механизми, кои вклучуваат повеќе од 20 сигнални молекули (84) афсцирајќи ја подвижноста, формата, пролиферацијата, диференцијацијата, па дури и опстанокот на клетката преку промоција на апоптоза.

Значаен е и наодот на Hockenbery(53) кој bcl го нашол само во базалните слоеви на кожата додека во погорните слоеви се губи со што тој заклучува дека сигналот за опстанок можеби и исчезнува во попериферните слоеви на кожата.

И секако постои можност за насилно механичко одвојување на клеточните врски, кое според Linn(71) ја зголемува активноста на киназите и генерира сигнални молекули за промоција на апоптоза.

Нешто слично се случува и со фибробластите кои при губиток на подлогата се трансформираат и селективно подlegнуваат на апоптоза(81).

Според многу автори, стадиум од кој нема повраток е ефекторната фаза, каде клетката трпи биохемиски промени кои ја нарушуваат нејзината функција.

Постојат два концепта кога се случува ова. Според едни автори тоа е активација на каспазната каскада, а според други тоа се случува и

порано со нарушување на митохондријалната мембрана и отварањето на митохондријалниот мегаканал(45).

Најголем број од протеините, кои подlegнуваат на протеолиза за време на апоптотичните измени се супстрат на една или повеќе видови на каспази.

Rozen(116) супстратите ги дели на три големи категории и тоа протеини кои учествуваат во хомеостатскиот одговор на инсулти во клетката, структурни протеини и протеини со непозната функција. Од доминантен интерес е разградбата на протеините од првата група, каде се вбројуваат ензимите кои го контролираат клеточниот циклус, ензими кои се одговорни за обновата на оштетената ДНК. Разградбата на овие протеини и нивното исчезнување од цитосолот на клетката го нарушува балансот во полза на клеточната смрт во однос на репарација на клетката (16).

Каспазите се голема група на протеини (ендопротеази) кои нормално во клетката се наоѓаат во нивната неактивна форма како проензими, а се активираат по пат на протеолитичка разградба чии карајни продукти се Asp резидуи. Комплетна активност постигнуваат со хетеродимеризација.

Fraser (34) укажува дека протеолитичката активација на каспазите може да биде постигната по пат на автопротеолиза, протеолитска активност од страна на други каспази, или од страна на granzyme B кои ги поседува истите карактеристики како и каспазите.

Интеракциите помеѓу рецепторите на смртта, адапторните протеини и каспазите како езекутори се многу комплексни со многу регулаторни молекули и повратни заштитни механизми.

Досега се познати десетина видови на каспази кои се поделени во две групи и тоа:

- каспази кои учествуваат во реакциите поврзани со цитокините како каспаза (4, 5, 11 и 14), за кои досега не

е докажано дека учествуваат во апоптотичните процеси;
и

- каспази кои се неопходни за целосно презентирање на фенотипот на апоптозата. Во оваа група спаѓаат каспаза 2, 8, 9 и 10 како иницијатори на каспазната каскада и каспаза 3, 6 и 7 како ефектори на протеолитичниот колапс на клетката. (148)

Најновите сознанија говорат за два начини на активација на каспазите (23). Активација која потекнува од внатрешните сигнали во цитосолот, и активација која потекнува од активатори на апоптозата кои своите ефекти ги искажуваат преку врзување со мембранските рецептори.

Доколку се работи за внатрешни сигнали тогаш почетните промени се одвиваат на ниво на митохондријалната мембрана. При што се пореметува соодносот помеѓу bcl2 и bax. Bcl2 ја губи функцијата на чувар на митохондријалната мембрана и по низа јонски измени настанува истекување на citochrome c. CitochromeC, претставува ензим кој исклучиво се наоѓа помеѓу двете мембрани на митохондриите и учествува во синџирот на дишење. Еднаш ослободен во цитосолот се поврзува со Apaf1 (apoptosis protease activating factor) кој се ослободува од врската со Bcl2, и каспаза 9. Оваа формација од: citochromeC, apaf1, caspase9 и atf наречена е апоптосом. Апоптосомите се агрегираат во цитосолот при што каспаза 9 се разложува и во овој процес ја активира ефекторната каспазна каскада почнувајќи од каспаза 3, 6 и 7 последователно.

Вториот начин на активација на каспазната каскада е наречена уште и трансмембранска екстрацелуларна активација зависна од рецептори, каде што апоптотичниот сигнал доаѓа од надворешноста на клетката.

Во овој вид на активација опишани се $TNF\alpha$ 1 и неговиот мембрански рецептор TNFR1 кои преку адапторен молекул TRADD ја активираат прокаспаза 2 која последователно ги активира каспаза 3, 6 и 7 и Fas/Fas лигандот, кои преку адапторен молекул FADD ја активираат

прокаспаза 8, а веројатно и 10. Формирањето на овој комплекс овозможува повторна активација на ефекторните членови на оваа каскада, каспаза 3, 6 и 7.

Овие два патишта можат да делуваат независно или да се вкрстуваат при што се развиваат позитивни feed back спреги, кои го мултиплицираат апоптотичниот сигнал.

Активација на каспазите со помош на granzym B е карактеристична за цитотоксичните клетки на имунолошкиот систем.

Активацијата на каспазите, без разлика како е постигната, предизвикува активација на бројни ензими, разградба на структурните протеини на цитоплазмата и деградација на хромозомалната ДНК задржувајќи ги сите обележја на апоптозната морфологија.

Хроматинската кондензација и строго специфичната фрагментација на ДНК, како водечки симптом на апоптозата, се и најисцрпно проучени Allison(3) оваа појава ја поврзува со фрагментација на ДНК на местата на поврзување на нуклеосомите при што се добиваат карактеристични фрагменти од по 180 до 200 парови на аминокиселини кои на гел електрофореза даваат специфичен скален примерок за апоптозата, за разлика од дифузната ДНК фрагментација која настанува во тек на некрозата. Во оваа интернуклеосомална фрагментација како медијатор се јавува калциум зависната ендонуклеаза (7). Кај некои клетки ендонуклеазата е составен дел од клетката, а се активира со пораст на цитосоличниот калциум и магнезиум, додека кај други причинителот на апоптозата индуцира транскрипција и продукција на ендонуклеаза, пред да започне процесот на фрагментација на ДНК (19). Зголемените количества на цинк се јавуваат како инхибитор на овој процес (19). Напоредно со активацијата на ендонуклеазата покаченото ниво на калциум ги активира и трансклутаминазите кои учествуваат во формирање на долги протеински полимери кои се врзуваат за клеточната мембрана (104) формирајќи т.н. школка околу клетката. Токму оваа згустната мембрана го оневозможува истекувањето на клеточните елементи и ензими во околотото ткиво и изнудување на инфламаторен

одговор. Поради пореметениот транспорт настанува губиток на вода и кондензација на цитоплазмата, понатаму клетката се разбива во ситни апоптотични телца кои на мембраната презентират изменети протени или протеини кои не се карактеристични за надворешната мембранска површина, со што апоптотичните телца ги привлекуваат макрофагите и ја стимулираат апоптозата (115).

Апоптозата е динамичен процес, меѓутоа времетраењето и кинетиката варираат во зависност од причинителот и видот на клетките во кои се случува. Green(45) смета дека штом започне процесот потребни се неколку минути до два часа за да се заврши. Спротивно на него Collinsa(21) испитувајќи ја кинетиката на апоптозата кај повеќе видови на клетки вели дека процесот трае од 12 до 24 часа, па и затоа сме во можност да ја видиме и осознаеме апоптозата. Опишувајќи ја кинетиката на процесот истиот автор забележува дека први промени се губиток на формата на клетката и формирање на израстоци на мембраната, по што следи еден нем период во кој најверојатно се одигруваат биохемиските промени, при што само за активација на каспазната каскада, почнувајќи од каспаза 9 потребни се 120 мин. Овој период е различно долг по што следи руптура на јадрената мембрана и фрагментација на ДНК.

1.2 Импликации на апоптозата и цитокината мрежа во пародонталната болест

Genso(41) во 1992 год. ја дефинира пародонталната болест како високо координиран и добро регулиран нормален имунолошки одговор на ткивото, предизвикан од хронична бактериска инфекција, при што бактериската флора, иако разновидна, не е толку вирулентна, а е сиромашна по бројност. Ваквите инфекции се најчесто опортуни инфекции кои предизвикуваат одложени имуни реакции во кои локалниот одговор генерира специфични механизми на одбрана (како опсонирачки антитела, цитокини, итн) како и механизми на ремоделирање на ткивото. Ремоделирањето е комплексен процес искажан преку фази на деструкција и фази на реконструкција, при што, клинички детектибилен е само морбидитетот или некомплетната реконструкција.

Поврзано со патохистолошките збиднувања, Page(101), дистрибуцијата и вклучувањето на поедини видови на клетки на имунолошкиот систем ја опишува следејќи ги развојните фази на лезијата.

По два до четири дена од инвазијата на микроорганизми се формира иницијална лезија. Припојниот епител е инфилтриран од малубројни неутрофилни гранулоцити кои излегуваат и во сулкусниот простор. Околното сврзно ткиво е инфилтрирано со сиромашен лимфоцитарен инфилтрат во кој преобладаат Т лимфоцитите. Бројот на неутрофилните гранулоцити рапидно расте со прогресијата на лезијата, а својот максимум го достигнува до дванаесетиот ден. Напоредно со нив расте и инфилтрацијата на околното ткиво со лимфоцити кои учествуваат со дури 75% од инфилтратот. Во пораните стадиуми доминираат Т клетките, а подоцна овој сооднос расте во корист на В клетките.

Во рамките на 14 до 21 ден се развива манифестната лезија. Инфилтрацијата на неутрофилите продолжува. В клетките претрпуваат бластна трансформација во плазма клетки и започнува продукцијата на

антитела, како и конверзија на моноцитите во макрофаги. Оваа лезија кај луѓето може да остане стабилна, без ткивна деструкција, долго време, па дури и со години. Меѓутоа, збиднувањата во ткивото можат да ја трансформираат оваа лезија во напредна лезија во која настанува и различен степен на коскена деструкција. Патохистолошки, епителот покажува знаци на улцерација, а припојниот епител, изразита тенденција за апикална миграција. Плазма клетките доминираат во сврзоткивниот инфилтрат, додека неутрофилите доминираат во припојниот епител и во просторот на пародонталниот џеб. Во овој стадиум се забележува и интензивна секреција на цитокини.

Цитокините ослободени во најраните стадиуми на инфекцијата овозможуваат детерминирање на типот на консеквентниот имунолошки одговор (115). Цитокините се протеини или гликопротеински медијатори кои ги продуцираат адекватно стимулираните различни типови на клетки, со основна функција на пренос на информации или сигнали меѓу различни типови клетки во исто ткиво, (паракрини), или меѓу исти клетки (автокрини). Првите цитокини кои биле детектирани, потекнувале од лимфоцитите и биле наречени лимфокини или интерлеукини. Тука спаѓаат и Growth факторите, кои најчесто ги иницираат анаболичките процеси во ткивото; хемокините, кои ја покренуваат клеточната регрутација; интерфероните, кои се значајни молекули во лимфоцитарната активација и tumor necrosis факторите со плеотропни дејства.

Според експресијата на цитокината продукција, CD4+Thelper клетките или Th клетките, се поделени во неколку субсетови, кои имаат клучна улога во организација на имунолошкиот одговор. Различните субсетови на Th клетките ги модулираат различните типови на клеточна кооперација, одредувајќи ја на тој начин како специфичноста така и механизмот на целуларниот одговор. Th клетките учествуваат во фината регулација на имунолошкиот одговор, во изборот на ефекторниот механизам кој ќе биде насочен кон избраниот епитоп, овозможуваат пролиферација на соодветни клетки и ја подобруваат функцијата на ефекторните клетки.

Th клетките кои воопшто не биле стимулирани, продуцираат само IL12 и се означени како Th p. При краткотрајна дразба Th клетките продуцираат бројни цитокини и истите се означени како Th0 клетки. Хроничната стимулација доведува до диференцијација на Th1 и Th2 субсетови, во зависност од цитокините кои ги продуцираат. Прогресијата на пародонталната лезија се повеќе се поврзува со преминацијата на Th2 цитокиниот профил во ткивото (32). Меѓутоа, цитокините и покрај плеотропните дејства, покажуваат некои генерални особености кои Offenbacher(96), согледувајќи ги во контекст на збиднувањата за време на пародонтопатијата, ги сумира во неколку целини.

Цитокините се продуцираат локално во самото ткиво, делуваат и се разложуваат во ткивото, иако, во одредени ситуации на хронично перзистирање на дразбата, можно е рецепторите да се заситат и да настане системско разлевање на цитокините. Понатаму, авторот укажува дека цитокините не се скаладираат во гранули или вакуоли, туку најчесто се наоѓаат како прекурзорни mRNA молекули. Едно од антиинфламаторните својства на стероидите е овозможено преку способноста на деградација на овие молекули.

Цитокините се моќни хормони кои делуваат во многу мали концентрации во рангот на нано или пикомолари, па дури и помалку. Клетките се приспособуваат на надворешните услови во најголема мера, преку промената во експресијата на мембранските рецептори за цитокините. Регулаторните молекули кои се уште не се докрај откриени, различните класи на мембрански рецептори, инхибиторните молекули, плеотропните дејства на цитокините, овозможуваат формирање на комплексна цитокина мрежа. Поврзувањето на цитокините за одредени класи на рецептори на клеточната мембрана, условува активација на интерцелуларни настани. Тој процес е наречен мембранска трансдукција на сигнали. Бактериите, од друга страна, имаат високо развиени модулаторни механизми, па така одредени бактерии имаат можност да продуцираат молекули кои наликуваат на цитокините, предизвикувајќи на тој начин абнормални инфламаторни реакции, кои го овозможуваат нивното преживување. Покрај ваквите генерални обележја, секој

поединечен цитокин има и свои специфичности и различна улога во тек на пародонтопатијата.

Еден од првите откриени и досега најисцрпно проучени цитокини е IL1, чие присуство и удел во пародонтопатијата е повеќе од еднаш докажано.

Повисоки нивоа на IL1 се детектирани во пародонталното ткиво (40, 39), кое се поврзува со значајната улога на IL1 во патогенезата на пародонталната болест, во смисла на стимулација на коскена ресорбција, секреција на протеинази, како и миграција на припојниот епител (86). Се смета дека IL1 во пародонталното ткиво потекнува од моноцитите, а неговата секреција е предизвикана од липополисахаридите на периопатогените бактерии како *Porphiromonas gingivalis* и *Fusobacterium nucleatum*. При стимулација на култури од моноцити со LPS од овие бактерии, регистрирани се зголемени вредности на IL1 β во првите 4 часа, додека, највисоки вредности постигнати се по 24 часа. Истото ниво на IL1 β се задржало и по 4 дена (9). IL1 е докажан и во ткиво од пародонтални болни. Hillman(52) со помош на имунохистолошки методи докажал дека нивото на IL1 расте со напредување на инфламацијата во ткивото. Stashenko(129) утврдува преминација на IL1 β во ткивата со пародонтална деструкција. Истиот автор утврдува зголемени количества на IL1 во активните пародонтални лезии, додека нивото на IL1 во стабилните лезии било приближно исто како и во здравите делови на гингивата. Побројни се студиите каде IL1 е испитуван во гингивалниот флуид. Hou(54) ги испитувал нивоата на IL1 пред и по третманот кај 11 пациенти, при што нашол зголемени нивоа на IL1 во гингивалниот флуид во инфламираните за разлика од неинфламираните регии, како и пад на нивото на IL1 по спроведениот третман, напоредно со смирување на инфламацијата. Yavuzylimaz(165) утврдил дека нивоата на IL1 β се зголемуваат напоредно со продлабочување на пародонталниот џеб. За разлика од него, Reinhardt(114) кај 14 пациенти не нашол промени на нивоата на IL1 β поврзани со длабочината на пародонталниот џеб ниту пак нашол намалување на количеството по завршениот третман

и смирување на инфламацијата. До ист наод дошол и Wilton(147) кој кај 37 пациенти не нашол поврзаност помеѓу споменатите параметри. И покрај ваквите различни наоди, останува сепак ист заклучокот, со кој се сложуваат сите автори, дека IL1e асоциран со макрофагите, дека нивоата во тек на болеста се значајно покачени како во ткивото така и во гингивалниот флуид и дека во тек на пародонтопатијата доминира IL1 β .

IL2 и IL6 се смета дека ги регулираат активностите на Т и В клетките како и на моноцитите во инфламаторниот инфилтрат. IL2 се излучува за време на антигенската презентација од моноцитите како и за време на активацијата на Т клетките. IL2 ја стимулира Т клеточната диференцијација и митотичната експанзија на антиген специфични клонови на овие клетки. Под дејство на континуирана секреција на IL2 од страна на моноцитите, како и присуство на антигенот, ја стимулираат секрецијата на останатите интерлеукини, кои ја поттикнуваат В клеточната диференцијација.

IL6 е продукт на лимфоцитите фибробластите и моноцитите. Неговата продукција најчесто е предизвикана од бактериски липополисахариди од IL1 и од TNF α , додека секрецијата на IL6 може да биде намалена под дејство на прогестерон и естроген. Takashaki(133) и сораб. нашле зголемени количества на IL6 пародонтално афецирано ткиво, како и зголемени количества на mRNA воглавно асоцирани со ендотелните клетки, фибробластите и макрофагите. Yamazaki(154) споредувајќи ги региите со гингивитис и региите со пародонтопатија утврдил зголемени количества на IL6 во регите каде е најдена коскена ресорпција. Во *in vitro* услови IL6 искажува особини на моќен промотор на моноцитната диференцијација во повеќејадрени гигантски клетки кои имаат способност за коскена ресорпција, па оттука уверувањето дека IL6 го носи крајниот сигнал за диференцијација на крвните моноцити во остеокласти. Студиите на Reinhardt(114) исто така потврдуваат дека нивоата на IL6 во гингивалниот флуид се зголемени кај пациенти со рефракторна пародонтопатија за разлика од пациентите каде е дијагностицирана стабилна пародонтална лезија. Истите автори нашле

заголемени количества на IL6, IL1 и IL8 кај жени со намалени количини на естроген и остеопороза потврдувајќи го на тој начин уште еднаш поврзаноста на овие цитокини со половите хормони и коскената ресорбција.

Сите досегашни сознанија го потврдуваат фактот дека проинфламаторната цитокина каскада во тек на развојот и прогресијата на пародонталната болест е откочена воглавно како резултат на бактериски инсулт. Секако прогресијата на пародонталната лезија е поврзана со помалку или повеќе изразена деструкција на пародонталните ткива. Оттука се наметнува мислењето дали во оваа деструкција свој удел има и апоптотичното одумирање на клетките. Првите согледувања на апоптозата во тек на пародонтопатијата се од понов датум и малубројни. Првите докази за постоење на апоптозата во пародонталното ткиво потекнуваат од Ellis(32), кој ја испитувал поврзаноста на бројот на апоптотични клетки со степенот на губиток на атачмент. Од добиените резултати тој заклучува дека апоптозата отсуствува кај деструкции помали од бмм, додека нејзиното присуство е евидентно кај деструкции еднакви или поголеми од бмм. Тој, ваквиот наод го толкува со поголемото присуство на bcl2 кај помали деструкции, додека нивоата на bcl2 опаѓаат со напредување на лезијата.

За разлика од него, Tonnetti(135) испитувајќи ја топографската распределба на апоптотичните клетки, заклучил дека апоптотичните процеси, како и експресијата на bcl2 и p53, играат значајна улога и кај клинички здравата гингива која патохистолошки покажува знаци на слабо назначена хронична инфламација. Најголема дистрибуција на апоптотични клетки забележана е во припојниот епител, како и силна експресија на p53, додека bcl2 отсуствува. За сите делови на епителот авторот нашол силна корелација помеѓу апоптозата и p53 додека корелацијата со bcl2 не била потврдена.

Поголем број на студии кои се однесуваат на пародонтопатијата и апоптозата се извршени кај индуцирана пародонтопатија кај експериментални животни. Uemira(139) одредувајќи

ја експресијата на *bax* *bcl2* и апоптозата кај експериментални животни, утврдил дека *bax* расте во епителот, коската и периодонциумот како што напредува инфламацијата, додека *bcl2* има највисоки вредности во првиот ден, а потоа опаѓа. Апоптозата расте прогресивно во сите денови на инфламацијата. Raabe(110), одредувајќи ја апоптозата на различни популации на клетки во гингивалниот сулкус за да ги прати промените кои настануваат во флуидот при различни степени на губиток на атачмент, утврдил дека клетки кои покажуваат најизразена апоптоза се неутрофилните гранулоцити. Апоптозата во региите со деструкција до 3,5мм е незначителна, додека со напредување на лезијата расте, за да во региите над 9мм губиток на атачмент клетките подлежат и на некротични промени кои преобладаваат. Gamonal(38), споредувајќи ги здравите со инфламаторни делови од гингивално ткиво, известува за присуство на *bcl2* и кај двете групи, додека p53 само кај инфламаторно изменетото ткиво. За разлика од него, Dekker (26) кај 5 биопсии од инфламирана гингива и ретикуларна форма на орален lichen planus не нашол позитивно бојење за *bcl2*, додека инфилтративните клетки покажале повеќе од 50% позитивно бојење. Dekker(26) ги објаснува своите наоди со тоа што или *bcl2* е веќе врзан или не игра позначајна улога во оваа регија.

Испитувањата поврзани со присуството на Fas антигенот во гингивата можеби се и првите испитувања кои се однесуваат на оваа проблематика. Присуството на Fas антигенот е утврдено и во гингивата. Muraki (90), испитувајќи ја дистрибуцијата на Fas антигенот во гингива и кај Lichen planus и leucoplacia, утврдил дека од 49 примероци на здрава гингива, 90% покажале позитивно бојење и тоа со најголем интензитет во stratum spinosum и базалните делови на stratum corneum, за разлика од леукоплакијата каде најинтензивно бојење е најдено во stratum granulosum. Yoshioka(158), најинтензивно бојење за Fas антигенот добил во спинозниот и гранулозниот слој, додека комплетно отсутувал во базалниот слој. Истиот автор истакнува дека боењата биле поинтензивни кај здрава за разлика од инфламираната гингива.

Во тек на пародонтопатијата испитувана е и апоптозата на имунокомпетентните клетки. Mangan(77) кај пациентите со пародонтопатија го обвинува леукотоксинот на *actinobacillus actinomicetemcomitans* кој предизвикува апоптоза на Т лимфоцитите, намалувајќи ја на тој начин локалната отпорност. Yamamoto (155), испитувајќи ја инфламираната гингива утврдил отсуство на IL₄ и супримирана апоптоза на макрофагите, давајќи свој удел во неконтролираната инфламација. До сличен заклучок дошол и Savill (120), испитувајќи ја хроничната инфламација на бубрезите. Тој смета дека отежнатото апоптотично отстранување на полиморфнонуклеарите допринесува за нивно подолго присуство во ткивото, а со тоа и подолготрајна изложеност на истото на деструктивните материи кои тие ги ослободуваат.

Ellis (32) испитувајќи ги факторите кои допринесуваат за прогресија на пародонтопатијата, укажува дека компромитираното апоптотично одумирање на неутрофилните гранулоцити ја зголемува изложеноста на ткивото на супероксидните слободни радикали кои покренуваат верижна реакција се до формирање на пероксидниот радикал (17). Антиоксидантниот капацитет на саливата во однос на другите ткивни течности е за два пати помал (87), додека во тек на пародонтопатијата дел од антиоксидансите се трошат во метаболизмот на периопатогените бактерии (14), па можностите за неутрализација на пероксидниот радикал се намалени. Пероксидниот радикал предизвикува реакција на липидна пероксидација чии крајни продукти предизвикуваат пореметување на Ca²⁺ АТР-азата (109), отворање на интрацелуларните пори (24), натрупување на калциум во клетката и активација на калциум зависните ензими.

Активацијата на ендонуклеазата од една страна и опаѓањето на bcl₂ во тек на пародонтопатијата, доведува до активација на апоптозата на епителните клетки.

Дека апоптозата навистина се случува во тек на пародонтопатијата укажуваат и првичните испитувања изведени на

нашата клиника каде кај 64 пациенти со различен степен на инфламација, бројот на апототични клетки покажа сигнификантна разлика помеѓу здрава и инфламирана гингива како и помеѓу различни степени на инфламација (130).

2. ЦЕЛ НА ТРУДОТ

И покрај големиот интерес за апоптозата кај истражувачите од различни области и многубројните податоци за присуството на истата кај различни заболувања, се чини дека овој феномен сеуште го нема најдено своето место во комплексниот патоген механизам во тек на пародонтопатијата, па литературните податоци се скудни или ги нема, а апоптозата останува или во размислувањето на поедини автори или постојат наговестувања за неа. Токму овој недостиг го побуди нашиот интерес да превземеме испитување со основна цел; да утврдиме:

- присуство на апоптоза за време на пародонталната деструкција во услови кога епителната инсерција е на цементно-емајловата граница или нешто под неа ($< 3\text{мм}$) во отсаство на инфламација, и кога епителната инсерција е апикално измигрирана ($3\text{-}6\text{мм}$ и $>6\text{мм}$)
- дали постои разлика во квантумот на апоптоза во гингивалното ткиво кога апикалната дислокација на атачментот е поголема од 6мм и кога постои различен степен на гингивална рецесија, компарирано со пародонталната лезија каде повторно нивото на атачмент е над 6мм , меѓутоа отсаствува рецесијата.
- нивото на IL_1 , IL_2 , IL_6 , IL_{12} , како и нивото на С-реактивните протеини кај сите пациенти.

3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОД НА РАБОТА

За остварување на поставената цел испитувањето беше реализирано во два дела:

ПРВ ДЕЛ ОД ИСПИТУВАЊЕТО

Материјал

Првиот дел на испитувањето опфати вкупно 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 (5) односно присуство на хроничен гингивит, крварење на сондирање, присуство на пародонтален џеп поголем или еднаков на 3мм;
- кај пациентите клинички беа регистрирани и регии со здрав пародонт;
- нивото на маргиналната гингива беше над или во нивото на цементно емаиловата граница.

Според степенот на губиток на атачмент, пациентите беа групирани во три групи користејќи го индексот по Ramfjord(112) 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.

Метод на работа

Кај сите пациенти степенот на губитокот на атачмент беше одредуван со градуирана пародонтолошка сонда, со тоа што мерењата беа вршени во пределот на интерденталната папила почнувајќи од цементно-емајловата граница.

Земените исечоци беа поделени на половина. Едниот дел беше фиксиран во 10% формалин и подложен на следните испитувања:

1. По парафинското калапење исечоците беа боени со haemotoxylin-eozin, по што со светлосна микроскопија беа преброени апоптотичните клетки, а нивниот број беше изразен како просечен број на клетки на десет видни полиња.
2. Одредување на bcl₂ во ткивото со помош на имунохистохемиска метода.
3. Одредување на p53 во ткивото со помош на имунохистохемиска метода

Останатиот дел беше замрзнат на -80 степени и по хомогенизација на ткивото беа извршени следните анализи:

4. Одредување на C реактивните протеини со помош на имунонефелометриска метода.
5. Одредување на IL₁, IL₂, IL₆, IL₁₂ во гингивалното ткиво со помош на ELISA методот.

Добиените резултати беа споредувани со резултатите од здравото ткиво, а потоа беа споредувани и помеѓу групите.

ВТОР ДЕЛ ОД ИСПИТУВАЊЕТО

Материјал

Вториот дел од испитувањето опфати 30 пациенти кои ги задоволија следните критериуми:

- возраст од дваесет до четириесет години;
- одсуство на општи заболувања;

- клинички дијагностицирана адултна пародонтопатија (5);
- губиток на атачмент поголем од 6мм;
- позиционирање маргинална гингива под цементно-емајловата граница.

Според степенот на изразеноста на рецесијата пациентите беа поделени во три групи користејќи го индексот по Ramfjord(112) и тоа:

- **Прва група** од 10 пациенти каде растојанието помеѓу цементно емајловата граница и работ на гингивата изнесуваше до 2 мм;
- **Втора група** од 10 пациенти каде растојанието помеѓу цементно емајловата граница и работ на гингивата изнесуваше од 2-5мм;
- **Трета група** од 10 пациенти каде растојанието понеѓу цементно емајловата граница и работ на гингивата изнесуваше над 5мм;

Кај сите пациенти беше земен исечок од гингива од соодветната регија и од здраво ткиво

Метод на работа

Мерењата беа извршени со градуирана сонда почнувајќи од цементно емајловата граница до работ на гингивата. Земените исечоци беа поделени на половина, едниот дел беше фиксиран во 10% формалин и подложени на следните испитувања:

1. По парафинското калапење исечоците беа боени со haemotoxylin-eozin, по што со светлосна микроскопија беа преброени апоптотичните клетки, а нивниот број беше изразен како просечен број на клетки на десет видни полиња.
2. Одредување на bcl_2 во ткивото со помош на имунохистохемиска метода.

3. Одредување на p53 во ткивото со помош на имунохистохемиска метода.

Останатиот дел од ткивото беше замрзнат на -80 степени и по извршената хомогенизација на ткивото беа направени следните испитувања:

4. Одредување на С реактивните протеини со помош на имунонефелометриска метода.
5. Одредување на IL₁, IL₂, IL₆, IL₁₂ во гингивалното ткиво со помош на ELISA методот.

Патохистолошката анализа, како и имунохистохемиските испитувања на материјалот беа изработени на Институтот за патолошка анатомија на медицинскиот факултет во Скопје.

Оредувањето на цитокините и Ц реактивните протеини во материјалот беше изработено на Институтот за имунологија и хумана генетика на медицинскиот факултет во Скопје.

Имунохистохемиски методи

Имунохистохемиските методи овозможуваат детекција на специфични хемиски супстанции во ткивото со помош на антитела специфични за бараните супстанции. Антителата се аплицираат на исечоците од ткивото и по нивното врзување се користи специфичен систем за детекција кој овозможува визуелизација на маркираните молекули. За детекција на bc_l₂ p53 препаратите беа боени по методата Avidin-Biotin peroxidase по Hsu.

Постапката на боење е сложена и опфаќа неколку последователни фази кои само накратко ќе бидат опишани. Материјалот беше веднаш фиксиран во 10% формалин. По парафинската обработка беа изработени стандардни парафински пресеци со дебелина од 6 микрони. По серија од наизменични испирања во ксилен, етанол и дејонизирана вода во траење од по 3 мин за секое. Пресеците беа потопени во 10% нормален серум за време од 45 мин. Потоа на препаратите беа аплицирани 3 до 4 капки од примарното антитело и

оставени на собна температура 30 минути. Во наредните 30 минути препаратите беа изложени на дејството на секундарното антителио. На препаратите понатаму се накапуваат неколку капки од Avidin-Biotin kompleksot и препаратите беа оставени 30мин со постојано одржување на влажноста. По испирањата препаратите беа боени со Gill-ov hematoxylin за време од 30 минути и наизменично беа испрани во дејонизирана вода етанол и ксилен. Позитивната антителио-антиген реакција беше отчитувана како темнокафеава зона на светлосина позадина

За регистрација на апоптозата по истата подготвителна постапка парафинските пресеци беа боени со haemotoxylin-eozin.

Метод за квантитативно одредување на цитокините во ткивен хомогенат

Принцип на едностепена ELISA-метода со двоен сендвич за одредување на цитокини.

За оваа цел беше применуван високо сензибилниот хуман ELISA систем Biotrak™ од Amersham Pharmacia Biotech.

Принципот на изведување на методата се состои во тоа што сидовите на алвеолите на фабрички припремената плоча се обложени со антителио специфично за бараниот цитокин. Потоа, одредено количество од ткивниот хомогенат се пипстира во алвеолите. Доколку е присутен испитуваниот цитокин се врзува за специфичното антителио имобилизирано на сидовите од алвеолата. Во понатамошната постапка биотинилизирано специфично антителио се додава во алвеолите со цел да се поврзе со претходно создадените комплекси на испитуваниот цитокин и имобилизираното антителио на сидовите од алвеолите. По испирањето на неврзаниот дел од биотинилизираното специфично антителио се додава Amdex реагенс за амплификација по што се додава супстрат со помош на кој се развива одредена боја, која е во директна пропорција со количеството на цитокин кој бил поврзан на почетокот на постапката. За да се одреди концентрацијата истовремено се прават проби со позната концентрација, кои служат да се изработи крива на која се отчитува оптичката густина на обојувањето и концентрацијата. Со споредување на

добиените густини и обојувања се одредува концентрацијата на испитуваниот цитокин .

Нефелометриска метода за одредување на C реактивните протеини

За оваа цел беше користен Turbiquant® системот.

Принципот на методата почива на афинитетот на создавање на имунохемиска реакција помеѓу испитуваните протеини во хомогенатот и специфичните антитела на реагенсот, при што се формираат имунокомплекси. Заматувањето кое се создава во реакцијата се мери фотометриски. Добиените концентрации се одредуваат со одредување на максималната брзина на заматувањето на формирањето на преципитати и времето за кое се постигнува максималното заматување. Со споредување на овие два параметри со стандардизираните криви се добива испитуваната концентрација.

Статистичка обработка на податоците

За статистичката обработка на податоците беше користен компјутерскиот програм Statistika 6,0. Анализата на добиените статистички серии е направена со користење на:

- Студентовата t 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 i Spearman коефициент на корелација за да се видат односите помеѓу испитуваните параметри.

Резултатите беа споредувани за секоја група меѓу себе како и со резултатите од првиот дел на испитувањето.

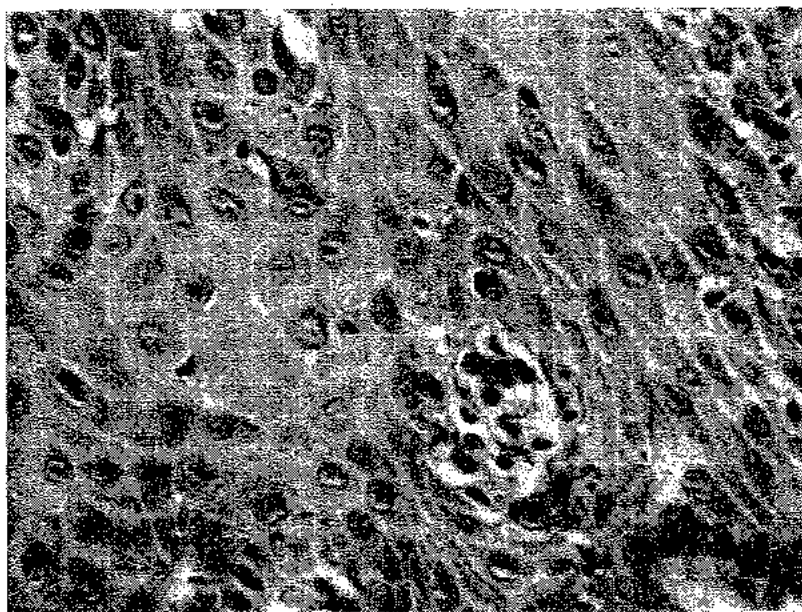
4. РЕЗУЛТАТИ

4.1 Резултати за апоптоза

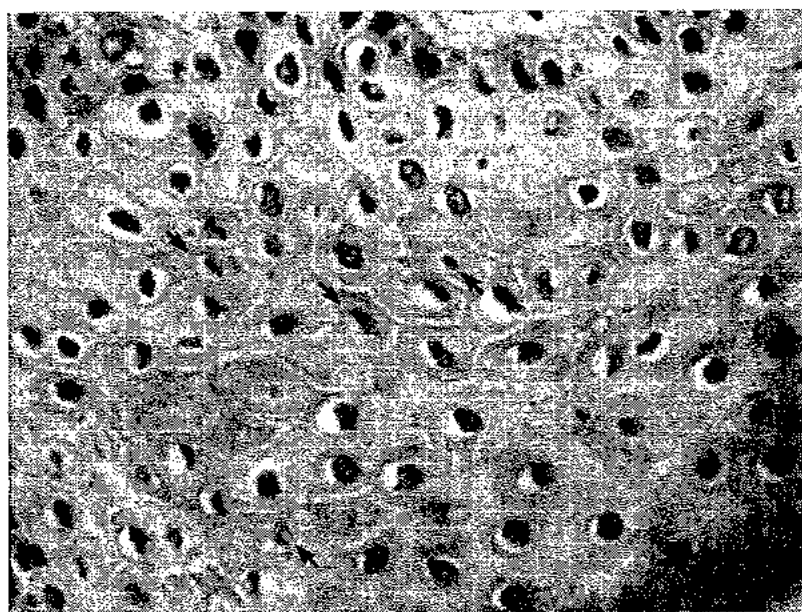
Една од основните и водечки цели на нашето испитување беше пред се да се потврди присуството на апоптозата во гингивалното ткиво како и да се проследи застапеноста на бројот на апоптотичните клетки, кога имаме различно изразен степен на губиток на атакмент како и во тек на различните степени на инфламација 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: HE 10X100



Слика 2: HE 100X60



Слика 3: HE 100X60 Приказ на апоптотичните клетки (стрелки)

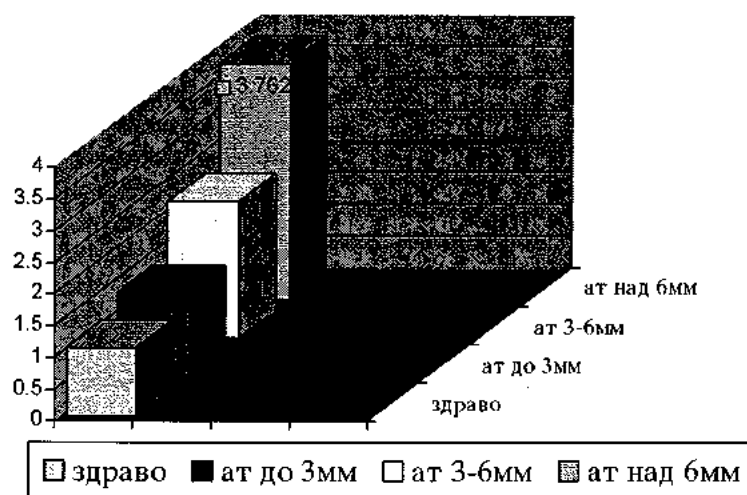
Од патохистолошките испитувања кои ги спроведовме на нашиот материјал ги добивме следните резултати:

Пред се утврдивме постоење на апоптотични клетки во епителот на здраво гингивално ткиво. Како во литературата се наидува на контрадикторни податоци за присуство на апоптозата во неинфламирана гингива сите примероци кои и покрај клиничкото

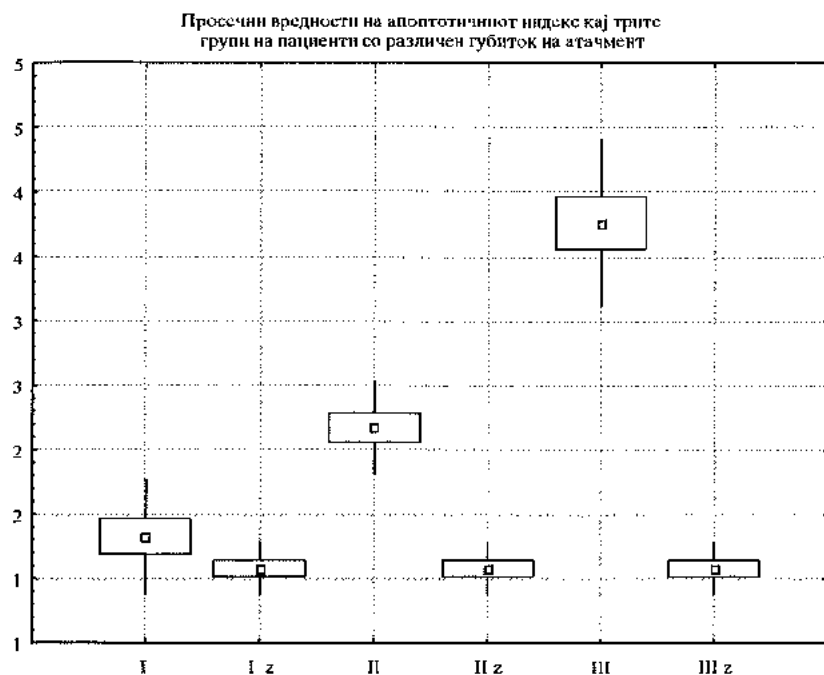
отсуство на инфламација покажаа присуство на инфламаторни клетки на патохистолошкиот наод беа отфрлени од примерокот за да не се компромитираат добиените резултати.

Просечното присуство на апоптотични клетки во здрава гингива изнесуваше $1,079 \pm 0,230$ 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- $1,327 \pm 0,44557$ ($p=0,0079$), за губиток на атачмент од 3 до 6мм- $2,172 \pm 0,36212$ ($p=0,000$) и за губиток на атачмент поголем од 6мм- $3,762 \pm 0,6444$ ($p=0,0000$) апоптотична клетка на видно поле. Сите вредност споредено со вредностите добиени за здрава гингива покажаа статистичка сигнификантност на разликите ($p<0,05$) користејќи ја студентовата t дистрибуција. Добиените вредности прикажани се на графикон 1 и графикон 1a.

Граф 1: Застапеност на апоптотичните клетки во здрава гингива и гингива која одговара на различен степен на губиток на атачмент



Граф 1а: Застапеност на апоптотичните клетки во здрава гингива и гингива која одговара на различен степен на губиток на атачмент

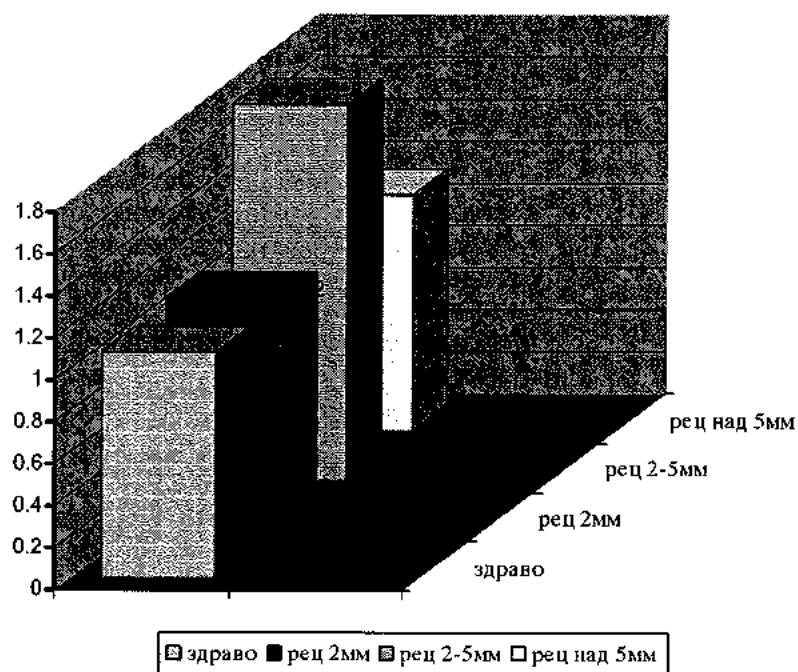


За втората група на пациенти каде што примероците на гингива беа земени од регии со губиток на атачмент еднаков или поголем од 6мм меѓутоа со различна поставеност на работ на гингивата под цементно емаиловата граница ги добивме следните резултати за застапеноста на апоптотични клетки.

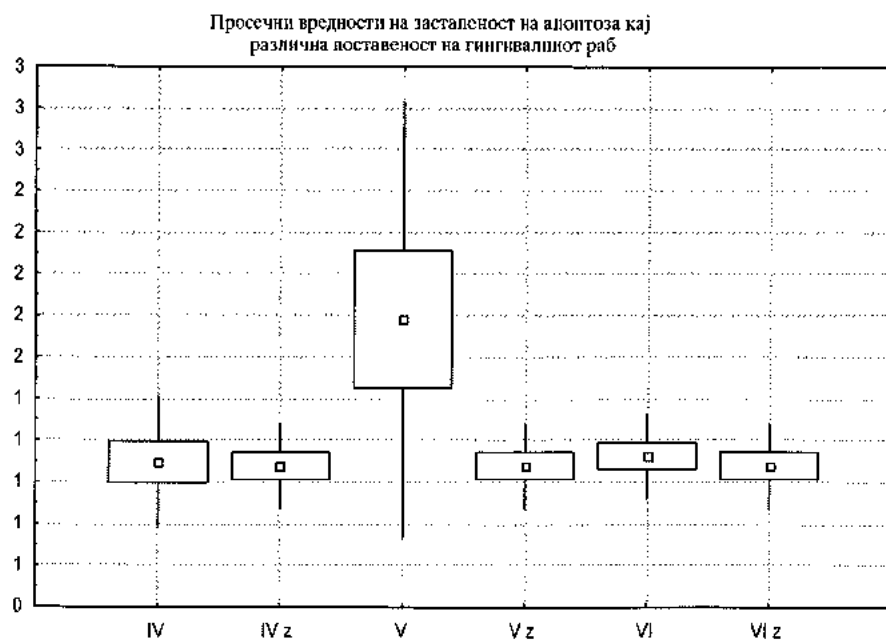
За поставеност на работ на гингивата до 2мм под цементно емаиловото споиште $1,096 \pm 0,31461$, за поставеност на работ на гингивата под цементното емаиловото споиште за вредност од 2 до 5мм- $1,782 \pm 0,04792$ и за поставеност на гингивата на под цементно емаиловото споиште за вредност од над 5мм- $1,125 \pm 0,20408$ апоптотични клетки по видно поле. Споредени со исечоците од здраво ткиво (каде вредноста за апоптотичните клетки изнесуваше $1,079 \pm 0,2030$) разликата која се јавува за првата и за третата група на пациенти и здравото ткиво е статистички несигнификантна ($p > 0,05$) и се должи на случајност во нашиот примерок. Разликата во вредностите помеѓу здравото ткиво и втората група на пациенти со поставеност на работ на гингивата помеѓу 2 и 5мм под цементно емаиловото споиште покажа висока статистичка

сигнификантност ($p < 0,05$). Резултатите се прикажани и на графикон 2 и 2а.

Граф 2: Застапеност на апоптотични клетки кај здраво ткиво и ткиво од регии со различна изразеност на гингивална рецесија



Граф 2а: Застапеност на апоптотични клетки кај здраво ткиво и ткиво од регии со различна изразеност на гингивалната рецесија

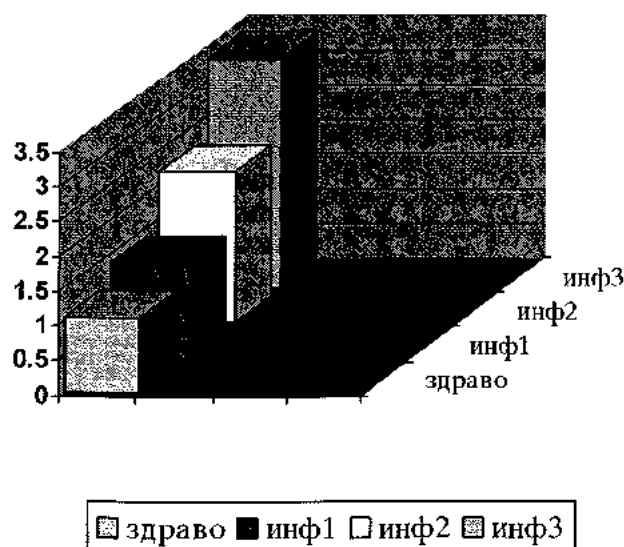


Податоците, понатаму беа регрупирани во однос на степенот на инфламација со цел да се види како се однесува застапеноста на апоптотичните клетки кај различно изразена инфламација. Просечната застапеност на апоптотични клетки во здраво ткиво изнесуваше $1,076 \pm 0,0201$. При индекс на инфламација 1 бројот на апоптотични клетки изнесуваше 1,383; при индекс на инфламација 2 - 2,17, а при индекс на инфламација 3 - 3,32 при што сигнификантност на разликите постои помеѓу здравото ткиво и ткивото со индекс на инфламација 2 и 3. Спроведената анализа на варијансите покажа сигнификантност помеѓу средните вредности на групата со индекс 2 на инфламација и групата со индекс 3 на инфламација. Добиените резултати се прикажани во табела 1 и на графикон 3.

Таб 1: Застапеност на апоптотични клетки во различни степени на инфламација

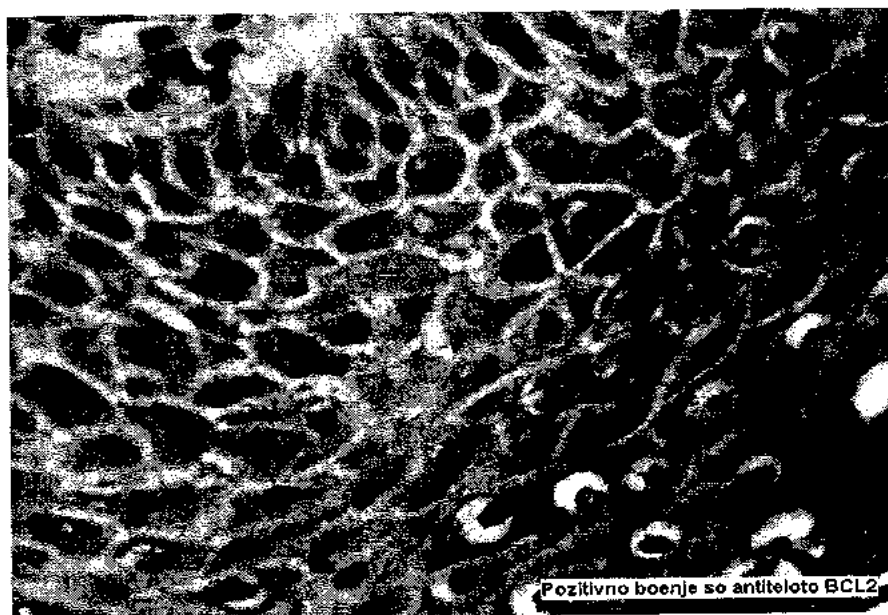
	X	SD	df	t	p	F	p
здро	1,076000	0,201340					
Инф 1	1,383333	0,603285	29	1,76083	0,088811	8,97813	0,001930
Инф 2	2,174211	1,153036	27	3,07127	0,004821	32,79638	0,000009
Инф 3	3,320625	0,777135	24	9,04436	0,000000	14,89819	0,000292

Граф 3: Застапеност на апоптотични клетки во различни степени на инфламација



4.2 Резултати за Bcl2

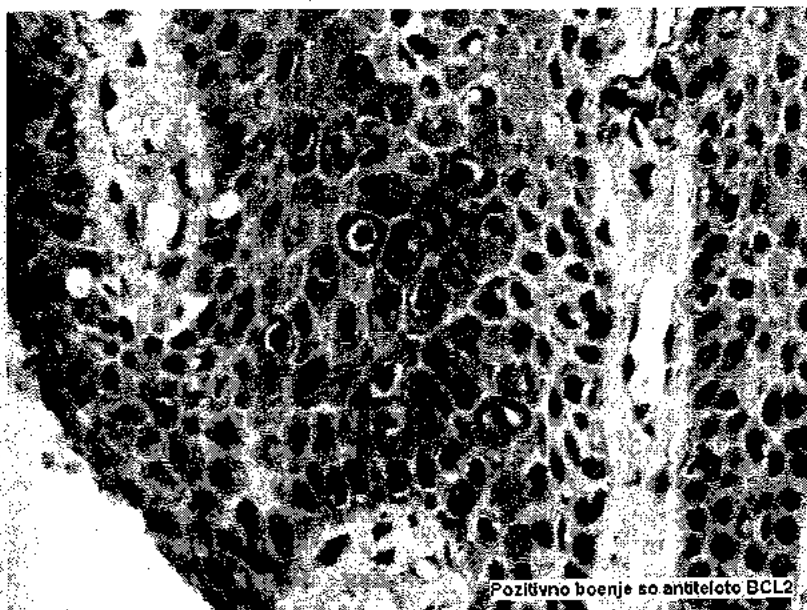
По одредувањето на апоптотичните клетки по пат на имунохистохемиски бојења на исечоците од ткиво беше и одредена експресијата на bcl2. Испитувањето беше извршено со светлосна микроскопија, при што беше баран позитивитет на цитоплазмата за бојењето, а бројот беше изразен како број на позитивни клетки на сто клетки (слика 4, 5, 6).



Слика 4: 100X60



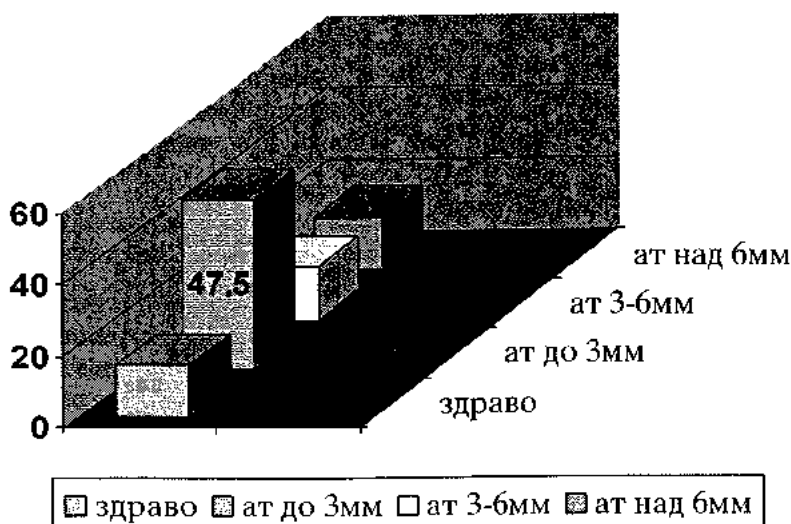
Слика 5: 100X10



Слика 6: 100X60

По извршената статистичка анализа ги добивме следните резултати. За здравото ткиво просечната застапеност на клетките кои покажаа експресија на bcl2 изнесуваше $15,0 \pm 12,9909$, додека за губиток на атачмент до 3мм- $47,5 \pm 24,86072$, за губиток на атачмент од 3 до 6мм- $15,0 \pm 24,15$ и за губиток на атачмент поголем од 6мм- $15,0 \pm 12,909$. Статистичка сигнификантност покажа разликата на вредности помеѓу здравото ткиво и вредностите за губиток на атачмент до 3мм ($p=0,0018$). Добиените резултати се графички прикажани на графикон 4.

Граф 4: Просечна застапеност на клетките кои покажаа позитивно боене за bcl2 во однос на различниот губиток на атачмент



За втората група на испитаници со различно изразена рецесија на гингивата ги добивме следните резултати:

Таб 2: Просечна застапеност на bcl2 позитивни клетки кај различно изразена рецесија на гингивата

	Рецесија до 2мм		Рецесија од 2-5мм		Рецесија над 5мм	
	здро	болно	здро	болно	здро	болно
x	15,00	25,0	12,5	7,5	15,0	7,5
SD	12,9099	16,666	13,176	12,0761	12,909	12,076

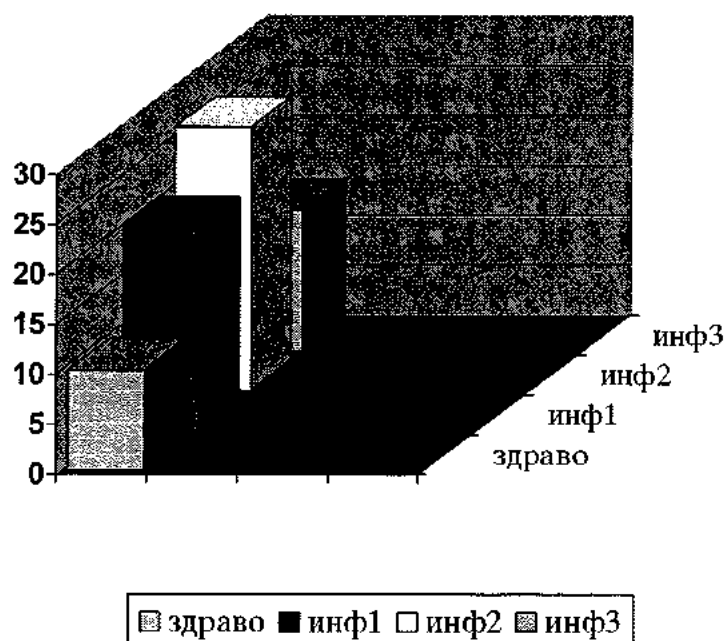
За ниту една од добиените вредности не е најдена сигнификантност во разликите, добиените сигнификантности за $p > 0,05$ се должат на случајност во нашиот примерок.

Во однос на дистрибуцијата на bcl2 позитивни клетки кај различно изразена инфламација на гингивата нашите резултати покажаа статистичка сигнификантност на разликите само во однос на индекс на инфламација 1 додека во останатите стадиуми на инфламацијата забележлив е пад на bcl2. Меѓутоа сигнификантност на разликите отсутуваше како во однос на здравото ткиво, така и помеѓу различните степени на инфламација на ткивото. Анализата на варијанси помеѓу групите покажа статистичка сигнификантност само за инфламација со индекс 1. Добиеените резултати се прикажани на табела 3 и графикон 5.

Таб 3: Просечна застапеност на bcl2 позитивни клетки кај различно изразена инфламација на гингивата

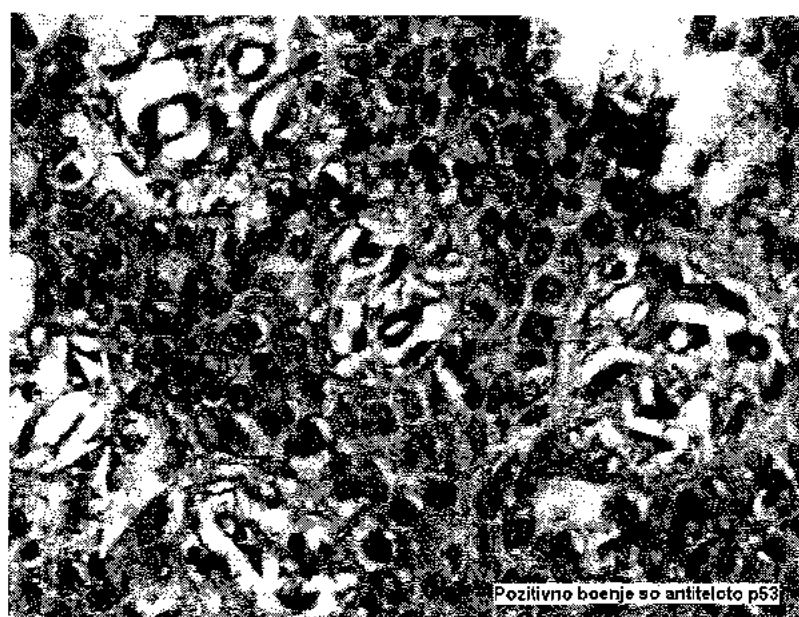
	x	SD	df	t	p	F	p
здро	10,00	12,909					
Инф 1	20,23810	28,09182	29	1,09	0,035332	4,732143	0,021146
Инф 2	26,31579	21,20	27	2,21570	0,287	2,697	0,131
Инф 3	14,06250	12,78446	24	0,78	0,44	1,015873	0,939315

Граф 5: Застапеност на bc12 позитивни клетки кај различно изразена инфламација на гингивата

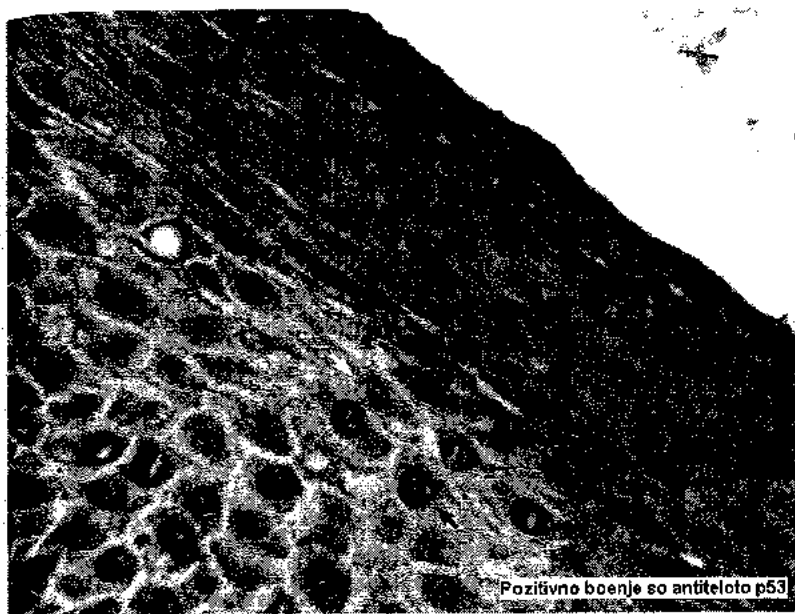


4.3 Резултати за p53

По пат на имунохистохемиска анализа беше одредена и застапеноста на p53 во јадрата на клетките од гингивата а бројот беше изразен како број на позитивни клетки на сто клетки (слика 7,8).



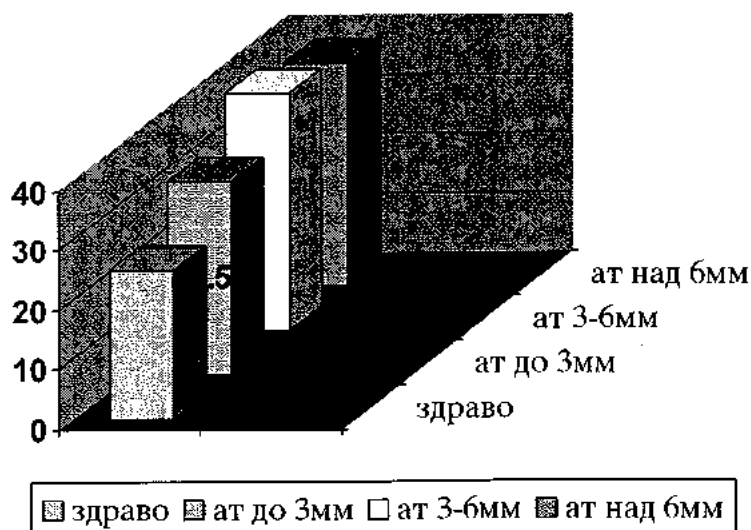
Слика 7: 100X60



Слика 8: 100X60 (бела стрелка-негативно, црна стрелка-позитивно)

По извршената статистичка анализа ги добивме следните резултати. За здраво ткиво просечната застапеност на клетките кои покажаа експресија на p53 изнесуваше $25,0 \pm 16,6667$, додека за губиток на атачмент до 3мм- $32,5 \pm 20,58612$, за губиток на атачмент од 3 до 6мм $40,0 \pm 21,08$ и за губиток на атачмент поголем од 6мм $37,5 \pm 21,245$. Статистичка сигнификантност не покажа ниту една разлика. Добиените резултати се графички прикажани на графикон 6:

Граф 6: Застапеност на p53 позитивни клетки во ткивата од регионите со различно изразен губиток на атачмент



Во однос на групите со различно изразена гингивална рецесија добивме воглавном сличен наод, при што отсутствуваше статистичка сигнификантност за било која група. Резултатите се прикажани на табела 4.

Таб 4: Просечна застапеност на p53 позитивни клетки во ткивата од регионите со различно изразена рецесија на гингивата

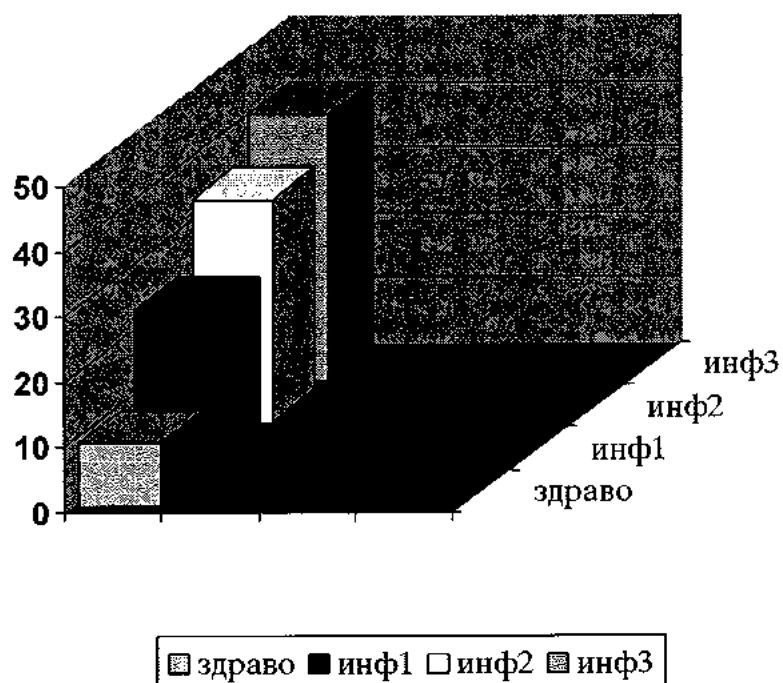
	Рецесија до 2мм		Рецесија од 2-5мм		Рецесија над 5мм	
	здро	бол	здро	бол	здро	бол
X	20,0	22,5	25,0	15,0	25,0	15,0
SD	15,81	7,905	16,6	12,9	16,6	12,9

Во однос на дистрибуцијата на p53 позитивни клетки кај различно изразена инфламација на гингивата нашите резултати покажаа статистичка сигнификантност на разликите во сите степени на инфламација, како во однос на здравото ткиво така и во однос на групите помеѓу себе. Добиените резултати се прикажани на табела 5 и графикон 7.

Таб 5: Просечна застапеност на p53 позитивни клетки во ткивата од региони со различно изразена инфламација на гингивата

	X	SD	df	t	p	F	p
здро	10,00	12,909					
Инф 1	23,80	14,73	29	2,530	0,017029	1,303571	0,705453
Инф 2	34,21	20,76	27	3,34	0,002	2,58	0,147316
Инф 3	40,62	17,96	24	4,67	0,0095	1,39	0,317964

Граф 7: Просечна застапеност на p53 позитивни клетки во ткивата од регии со различно изразена инфламација на гингивата



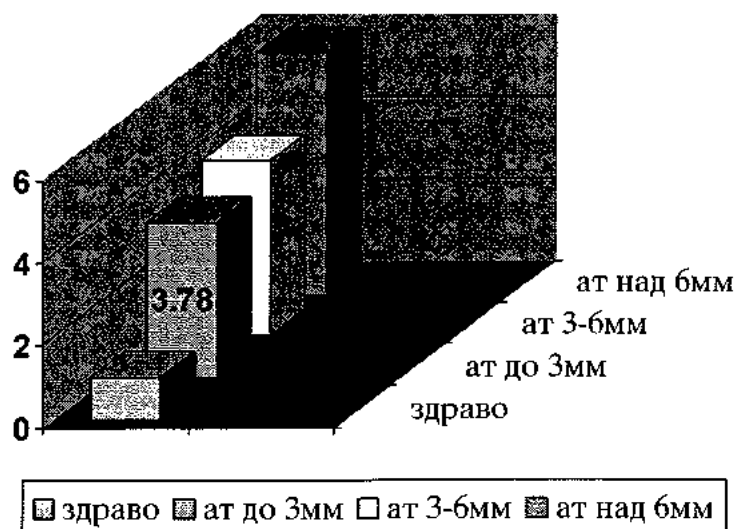
Резултати од имунолошките испитувања

Истите исечоци од ткиво беа подложени и на испитувања за присуството на IL1, IL2 IL6 и IL12 Резултати се изразени во пикограми на милиграм ткиво.

4.4 Резултати за IL1 α

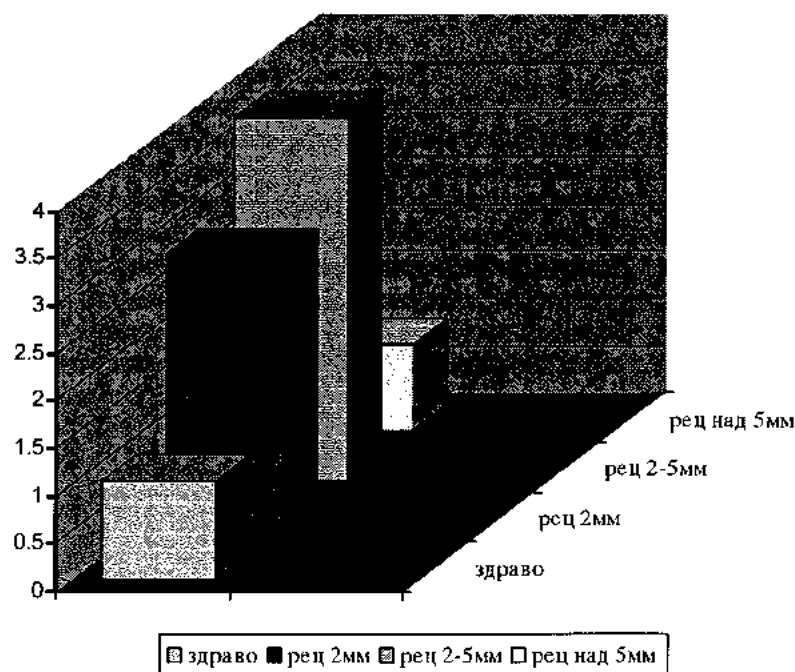
По извршената статистичка анализа ги добивме следните резултати. За здраво ткиво просечната вредност на за IL1 α изнесуваше $1,092 \pm 0,79446$ пикограм на милиграм ткиво, додека за губиток на атачмент до 3мм $3,7880 \pm 2,4598$, за губиток на атачмент од 3 до 6мм $4,261 \pm 3,62$ за губиток на атачмент поголем од 6мм $5,884 \pm 3,332$. Статистичка сигнификантност покажа разликата на вредности помеѓу здраво ткиво и вредностите за губиток на атачмент до 3мм ($p=0,004$) како и здраво и губиток на атачмент од 3 до 6мм ($p=0,0019$) и здраво ткиво и ткивата со губиток на атачмент поголем од 6мм ($p=0,0003$). Добиените резултати се графички прикажани на графикон 8.

Граф 8: Просечни вредности за IL1 α кај пациентите со различно изразен губиток на атачмент



За втората група на пациенти каде што примероците на гингива беа земени од регии со губиток на атачмент еднаков или поголем од 6мм меѓутоа со различна поставеност на работ на гингивата под цементно емаиловата граница ги добивме следните резултати за вредноста на IL1 α . За поставеност на работ на гингивата до 2мм под цементно емаиловото споиште $2,91 \pm 2,30012$, за поставеност на работ на гингивата под цементното емаиловото споиште за вредност од 2 до 5мм- $3,81 \pm 3,22$ и за поставеност на гингивата на под цементно емаиловото споиште за вредност од над 5мм- $0,91 \pm 0,24635$ пикограми на мг ткиво. Споредени со исечоците од здраво ткиво каде вредноста на IL1 α изнесуваше $1,029 \pm 0,79446$ се доби статистичка сигнификантност за првата и втората група на пациенти споредена со здраво ткиво ($p=0,029$ и $p=0,01$) додека вредностите од третата група и здравото ткиво не покажаа сигнификантност во разликите. Резултатите се прикажани и на графикон 9.

Граф: 9 Вредности за IL1 α кај пациентите со различно изразена рецесија на гингивата

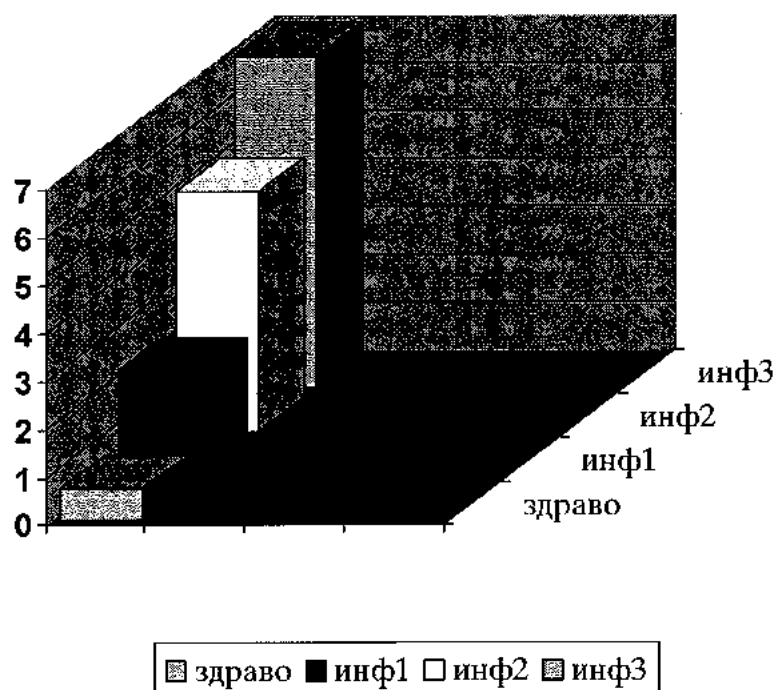


Во однос на вредноста на $IL1\alpha$ кај различно изразена инфламација на гингивата нашите резултати покажаа статистичка сигнификантност за сите испитувани стадиуми на инфламацијата во однос на здраво ткиво како и меѓу самите групи. Добиените резултати се прикажани на табела 6 и графикон 10.

Таб 6: Просечна вредност на $IL1\alpha$ кај различно изразена инфламација на гингивата

	X	SD	df	t	p	F	p
здроаво	0,65	0,32					
Инф 1	2,20	1,76	29	2,75	0,0100	28,8	0,00015
Инф 2	5,04	2,60	27	5,108	0,000	86,1	0,000
Инф 3	6,95	3,04	24	6,48	0,0000	67,07	0,0000

Граф. 10 Просечна вредност на $IL1\alpha$ кај различно изразена инфламација на гингивата

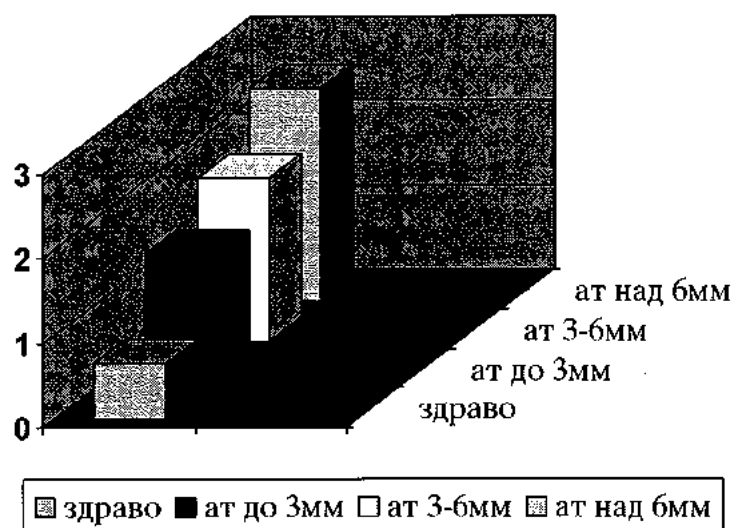


4.5 Резултати за $IL1\beta$

По извршената статистичка анализа ги добивме следните резултати. За здраво ткиво просечната вредност на за $IL1\beta$ изнесуваше

0,67±0,81 пикограм на милиграм ткиво, додека за губиток на атачмент до 3мм 1,496±0,7664, за губиток на атачмент од 3 до 6мм 1,962±1,68525, за губиток на атачмент поголем од 6мм 2,531±1,68378. Статистичка сигнификантност покажа разликата на вредности помеѓу здраво ткиво и вредностите за губиток на атачмент до 3мм ($p=0,05$) како и здраво и губиток на атачмент од 3 до 6мм ($p=0,0427$) и здраво ткиво и ткивата со губиток на атачмент поголем од 6мм ($p=0,0025$). Добиените резултати се графички прикажани на графикон 11.

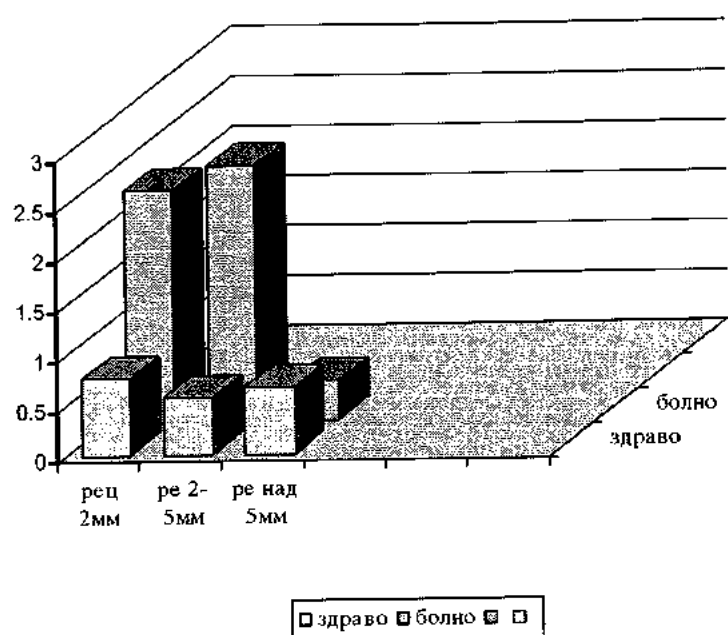
Граф 11: Просечни вредности за IL1 β кај пациентите со различно изразен губиток на атачмент



За втората група на пациенти каде што примероците на гингива беа земени од регии со губиток на атачмент еднаков или поголем од 6мм, меѓутоа со различна поставеност на работ на гингивата под цементно емаиловата граница, ги добивме следните резултати за вредноста на IL1 β . За поставеност на работ на гингивата до 2мм под цементно емаиловото споиште 2,335±3,23108, за поставеност на работ на гингивата под цементното емаиловото споиште за вредност од 2 до 5мм- 2,569±2,24008 и за поставеност на гингивата на под цементно емаиловото споиште за вредност од над 5мм-0,39± 0,007 пикограми на мг ткиво. Споредени со исечоците од здраво ткиво, каде вредноста на IL1 β изнесуваше 0,77±0,798 за првата група, 0,582±0,679 за втората група и

0,671±0,8193 за третата група, само разликата која се јавува помеѓу здраво и втората група е статистички сигнификантна ($p=0,016$) додека вредностите од останатите групи и здравото ткиво не покажаа сигнификантност во разликите. Резултатите се прикажани на графикон 12.

Граф 12: Вредности за IL1 β кај пациенти со различно изразена рецесија на гингивата

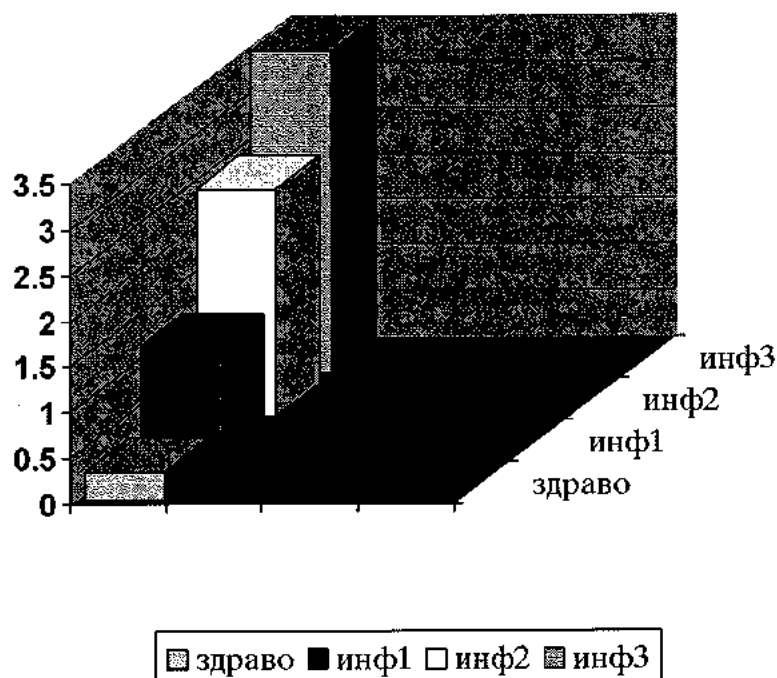


Во однос на вредноста на IL1 β кај различно изразена инфламација на гингивата нашите резултати покажаа статистичка сигнификантност за вториот и третиот стадиум на инфламацијата, во однос на здраво ткиво, како и меѓу самите групи. Добиените резултати се прикажани на табела 7 и графикон 13.

Таб 7: Просечна вредност на IL1 β кај различно изразена инфламација на гингивата

	Сред вред	Стан дев	df	t	p	F	p
здро	0,31	0,19					
Инф 1	1,21	1,36	29	2,04	0,05	49	0,01
Инф 2	2,47	2,27	27	2,99	0,006	67	0,000
Инф 3	3,50	1,593	24	6,25	0,00002	131	0,0000

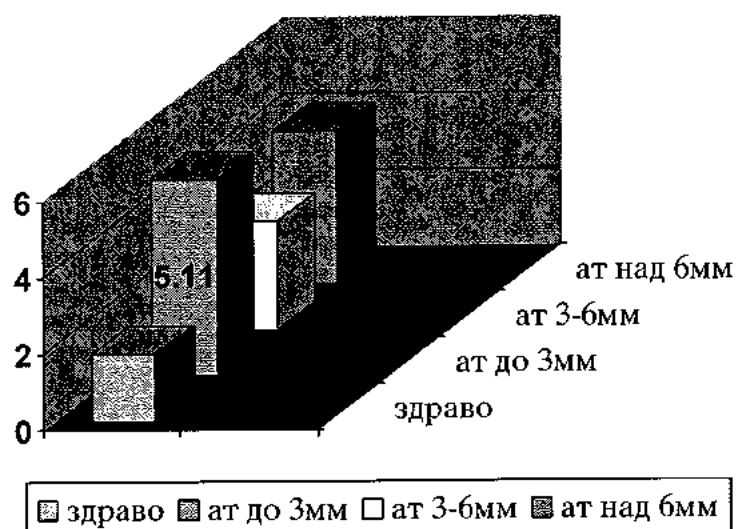
Граф 13: Просечна вредност на IL1 β кај различно изразена инфламација на гингивата



4.6 Резултати за IL2

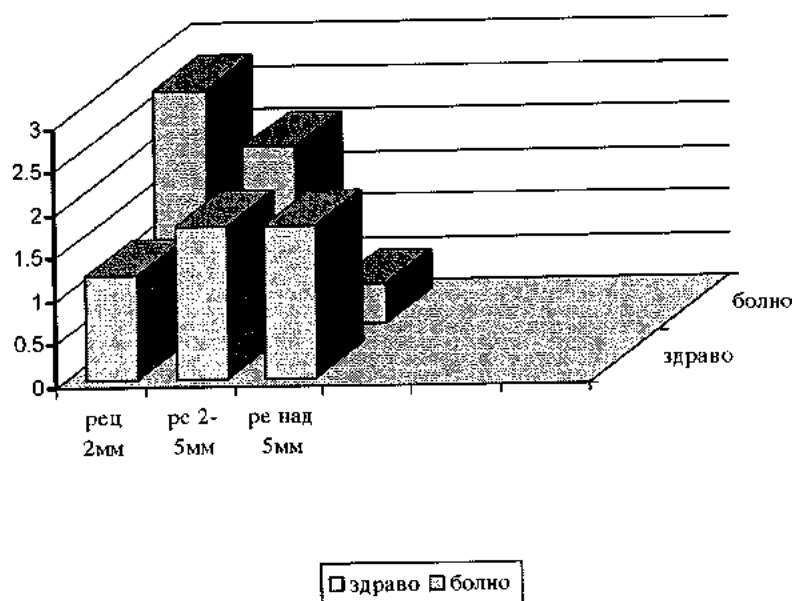
По извршената статистичка анализа ги добивме следните резултати. За здраво ткиво просечната вредност на за IL2 изнесуваше $1,763 \pm 1,15177$ пикограм на милиграм ткиво, додека за губиток на атачмент до 3мм- $5,11 \pm 0,8659$, за губиток на атачмент од 3 до 6мм- $2,8112 \pm 2,6344$ за губиток на атачмент поголем од 6мм- $3,976 \pm 2,72635$. Статистичка сигнификантност покажа разликата на вредности помеѓу здраво ткиво и вредностите за губиток на атачмент до 3мм ($p=0,05$) како и здраво и губиток на атачмент над 6мм ($p=0,0295$). Добиените резултати се графички прикажани на графикон 14.

Граф14: Просечни вредности за IL2 кај пациентите со различно изразен губиток на атачмент



За втората група на пациенти каде што примероците на гингива беа земен од регии со губиток на атачмент еднаков или поголем од 6мм меѓутоа со различна поставеност на работ на гингивата под цементно емаиловата граница ги добивме следните резултати за вредноста на IL2. За поставеност на работ на гингивата до 2мм под цементно емаиловото споиште $2,734 \pm 2,52$, за поставеност на работ на гингивата под цементното емаиловото споиште за вредност од 2 до 5мм- $2,078 \pm 1,752$ и за поставеност на гингивата на под цементно емаиловото споиште за вредност од над 5мм- $0,46 \pm 0,18$ пикограми на мг ткиво. Споредени со исечоците од здраво ткиво, каде вредноста на IL2 изнесуваше $1,20877 \pm 0,323$ за првата група, $1,763 \pm 0,15$ за втората група и третата група, само разликата која се јавува помеѓу здраво и третата група е статистички сигнификантна ($p=0,016$) додека вредностите од останатите групи и здравото ткиво не покажаа сигнификантност во разликите. Резултатите се прикажани и на графикон 15.

Граф 15 Вредности за IL2 кај пациенти со различно изразена рецесија на гингивата

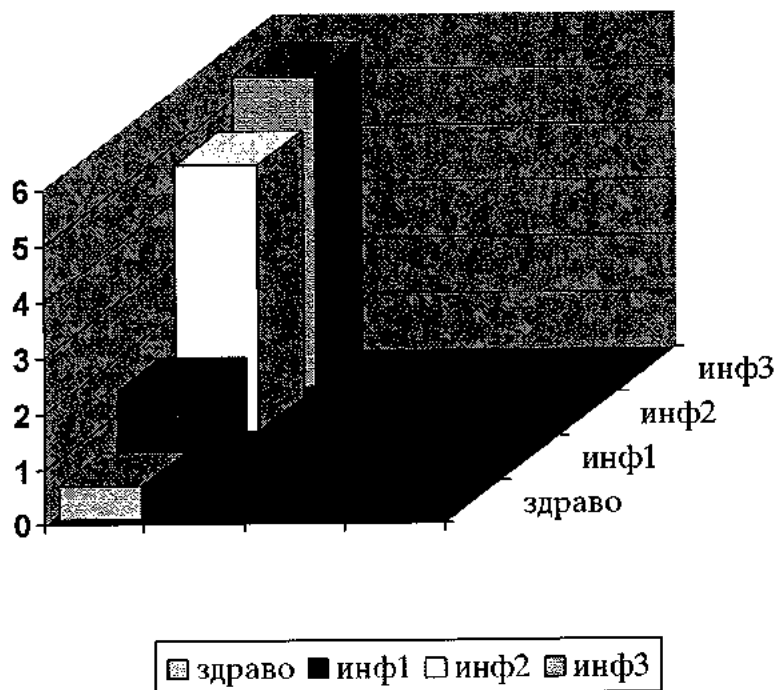


Во однос на вредноста на IL2 кај различно изразена инфламација на гингивата нашите резултати покажаа статистичка сигнификантност за вториот и третиот стадиум на инфламацијата, во однос на здраво ткиво, како и меѓу самите групи. Добиените резултати се прикажани на табела 8 и графикон 16.

Таб 8: Просечна вредност на IL2 кај различно изразена инфламација на гингивата

	X	SD	df	t	p	F	p
здро	0,624	0,701					
Инф 1	1,53	1,53	29	1,70	0,09	4,8	0,019
Инф 2	4,77	24,09	27	3,40	0,00396	34,18	0,0008
Инф 3	4,58	2,51	24	4,80	0,00002	12,9	0,000054

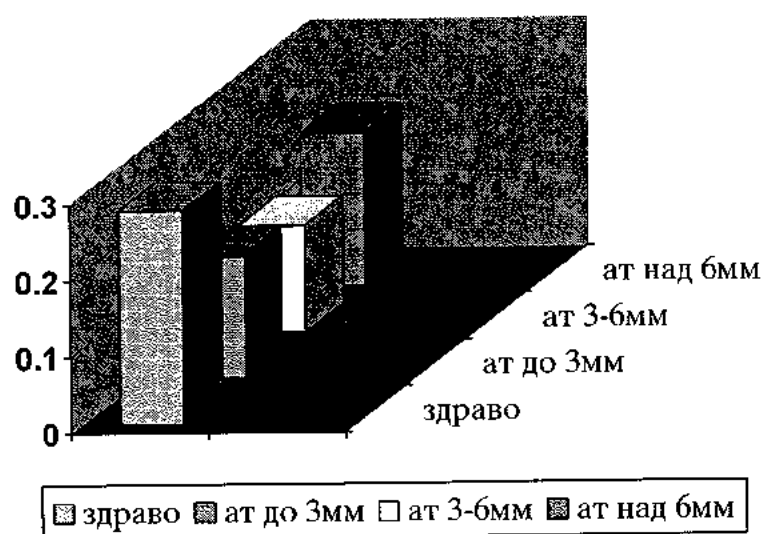
Граф 16: Вредност за IL2 кај различно изразена инфламација на гингивата



4.7 Резултати за IL6

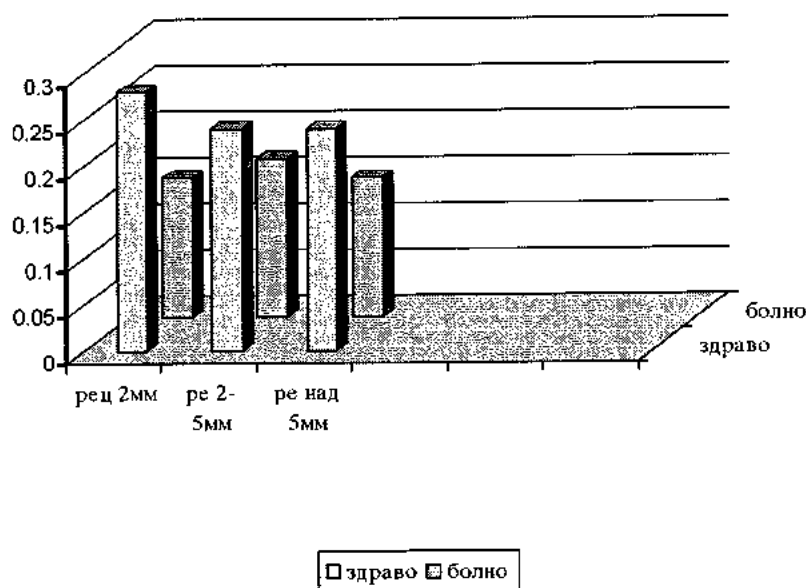
По извршената статистичка анализа ги добивме следните резултати. За здраво ткиво просечната вредност на за IL6 изнесуваше $0,286 \pm 0,54$ пикограм на милиграм ткиво, додека за губиток на атачмент до 3мм- $0,163 \pm 0,2659$, за губиток на атачмент од 3 до 6мм- $0,142 \pm 0,14$, за губиток на атачмент поголем од 6мм- $0,204 \pm 0,21$. Статистичка сигнификантност не покажа ниту една од вредностите во однос на здраво ткиво. Добиените резултати се графички прикажани на графикон 17.

Граф17: Просечни вредности за IL6 кај пациентите со различно изразен губиток на атачмент



За втората група на пациенти каде што примероците на гингива беа земени од регии со губиток на атачмент еднаков или поголем од 6мм, меѓутоа со различна поставеност на работ на гингивата под цементно емаиловата граница ги добивме следните резултати за вредноста на IL6. За поставеност на работ на гингивата до 2мм под цементно емаиловото споиште $1,088 \pm 1,62$, за поставеност на работ на гингивата под цементното емаиловото споиште за вредност од 2 до 5мм- $0,17 \pm 0,15$ и за поставеност на гингивата на под цементно емаиловото споиште за вредност од над 5мм- $0,15 \pm 0,26$ пикограми на мг ткиво. Споредени со исечоците од здраво ткиво, каде вредноста на IL6 изнесуваше $0,28 \pm 0,50$ за првата група, $0,24 \pm 0,50$ за втората група и третата група, не покажаа сигнификантност во разликите. Резултатите се прикажани и на графикон 18.

Граф 18: Просечни вредности за IL6 кај пациенти со различно изразена рецесија на гингивата



Во однос на вредноста на IL6 кај различно изразена инфламација на гингивата нашите резултати не покажаа статистичка сигнификантност помеѓу различните стадиум на инфламацијата во однос на здраво ткиво како и меѓу самите групи. Добиените резултати се прикажани на табела 9.

Таб 9: Просечна вредност на IL6 кај различно изразена инфламација на гингивата

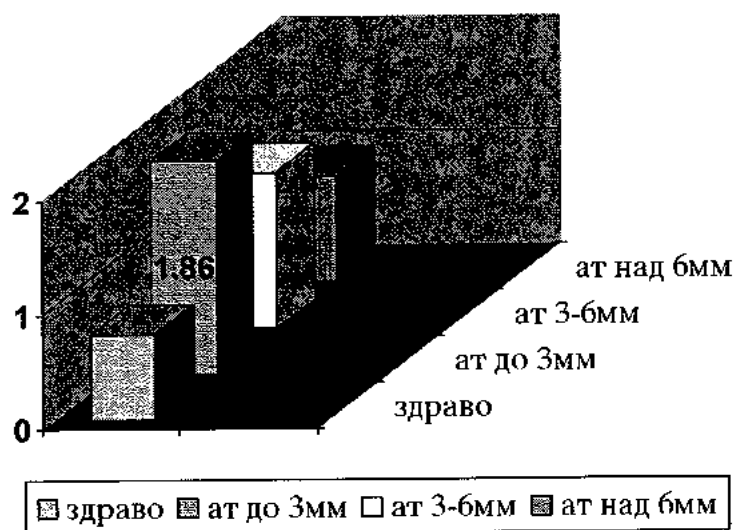
	X	SD	df	t	p	F	p
здро	0,16	0,26					
Инф 1	0,28	0,76	29	0,52	0,37	7,41	0,09
Инф 2	0,49	0,22	27	0,91	0,44	18,1	0,08
Инф 3	0,23	0,11	24	0,77	0,60	1,38	0,54

4.8 Резултати за IL12

По извршената статистичка анализа ги добивме следните резултати. За здраво ткиво просечната вредност за IL12 изнесуваше $0,7553 \pm 1,15$ пикограм на милиграм ткиво, додека за губиток на атачмент

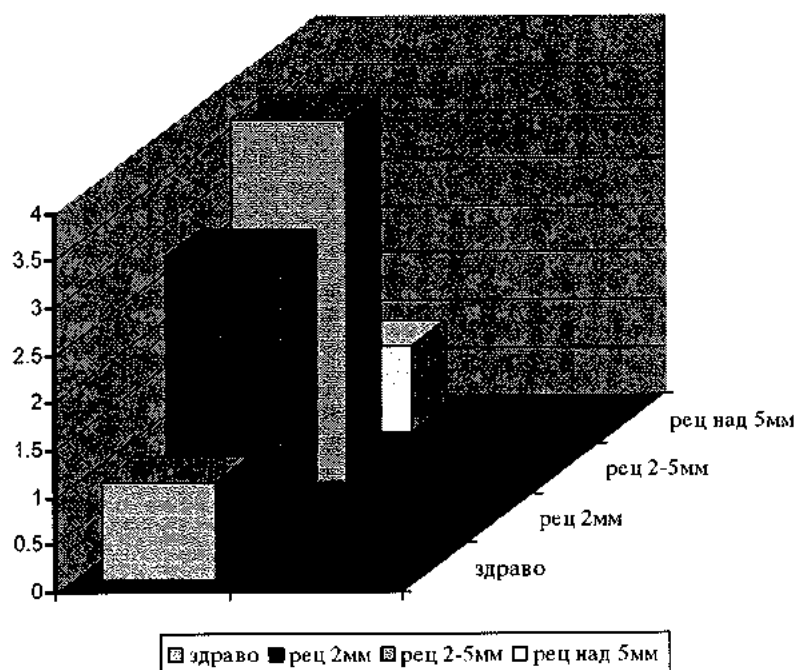
до 3мм- $1,863 \pm 1,18$, за губиток на атачмент од 3 до 6мм- $1,373 \pm 1,16$ за губиток на атачмент поголем од 6мм $0,93 \pm 1,071$. Статистичка сигнификантност не покажа само втората и третата група, додека првата група покажа статистички сигнификантна разлика во однос на здравото ($p=0,017$) Добиените резултати се графички прикажани на графикон 19.

Граф 19: Просечни вредности за IL12 кај пациентите со различно изразен губиток на атачмент



За втората група на пациенти каде што примероците на гингива беа земени од регии со губиток на атачмент еднаков или поголем од 6мм меѓутоа со различна поставеност на работ на гингивата под цементно емаиловата граница ги добивме следните резултати за вредноста на IL12. За поставеност на работ на гингивата до 2мм под цементно емаиловото споиште $1,66 \pm 1,662$, за поставеност на работ на гингивата под цементното емаиловото споиште за вредност од 2 до 5мм $-1,001 \pm 0,90$ и за поставеност на гингивата на под цементно емаиловото споиште за вредност од над 5мм $-0,24 \pm 0,05$ пикограми на мг ткиво. Споредени со исечоците од здраво ткиво каде вредноста на IL12 изнесуваше $0,754 \pm 0,64$ за првата група, $0,24 \pm 0,050$ за втората група и третата група, не покажаа сигнификантност во разликите. Резултатите се прикажани и на графикон 20.

Граф 20: Вредности за IL12 кај пациенти со различно изразена рецесија на гингивата



4.9 Резултати од испитуваните корелации

Покрај анализата која беше извршена за секој испитуван параметар поодделно, цел на нашето испитување беше и да се одредат взаемните односи помеѓу дадените параметри. За таа цел беше извршена анализа на варијансите во двете групи како и одредување на коефициентите на корелација.

Анализата на варијанси за сите параметри во групата со различно изразен губиток на атачмент покажа дека разликата на просечните вредности на IL6 во гингивалното ткиво кај трите групи со различен губиток на атачмент е статистички сигнификантна за $p=0,004$, додека разликата на просечните вредности на другите пресметани параметри кај трите групи се должи на случајност во нашиот примерок. Резултатите се прикажани на табела 11.

Таб 11: Резултати од анализа на варијансата помеѓу групите со различно изразен губиток на атачмент

аптоп.			
F= 2,132692	p = 0,189118*	df= 2,7	R ² =0,37862745
bcl2			
F= 0,2921739	p = 0,755*	df= 2,7	R ² =0,770
p 53			
F= 0,214964	p = 0,811984*	df= 2,7	R ² =0,5777112
IL1α			
F= 0,7119174	p = 0,523069*	df= 2,7	R ² =0,16902454
IL1β			
F= 0,4374518	p = 0,662193*	df= 2,7	R ² =0,11110023
IL2			
F= 0,252596	p = 0,783568*	df= 2,7	R ² =0,06731234
IL6			
F= 12,62974	p = 0,004759**	df= 2,7	R ² =0,78300953
IL12			
F= 1,243298	p = 0,345109*	df= 2,7	R ² =0,26211685
Инф			
F= 0,0146444	p = 0,985492*	df= 2,7	R ² =0,00416667

* p>0,05

** p< 0,05

Тестирање на разлика помеѓу поедини аритметички средини после завршената анализа на варијанса за IL6 по Scheffe post hoc Scheffe`s тест.

Таб 12: Завршна таблица на анализа на варијанса за IL6

извор на варијабилитетот	сума на квадрати SS	степен на слобода df	Среден квадрат (варијанса) MS	F	p
помеѓу групи	0,509791	2	0,254895	12,62974	0,004759
внатре во групи	0,141275	7	0,020182		
тотал	0,651066				

$$F = (x_1 - x_2)^2 / MS_{vg}(N_1 + N_2) / N_1 N_2$$

MS_{vg} = средниот квадрат внатре во групите

граничен F за 2 и 7 степени на слобода = 4,74

$$F' = \text{граничен } F \times (k-1) = 4,74 \times 2 = 9,48$$

Разлика помеѓу F

x_1 и x_2 0,1102963

x_1 и x_3 0,4123971

x_2 и x_3 0,9492617

Анализата на варијанси за сите параметри во групата со различно изразен рецесија покажа дека Разликата на просечните вредности на просечните вредности на IL1 β во гингивалното ткиво кај трите групи е статистички сигнификантна за $p=0,0058$, додека разликата на просечните вредности на другите пресметани параметри кај трите групи се должи на случајност во нашиот примерок. Резултатите се прикажани на табела 13.

Таб 13: Анализа на варијанса меѓу трите групи со различно изразена гингивална рецесија

аптоп.			
F= 0,7054263	p = 0,525900*	df= 2,7	R ² =0,16774192
bcl2			
F= 1,029412	p = 0,0405594*	df= 2,7	R ² =0,22727273
p 53			
F= 0,5090909	p = 0,621695*	df= 2,7	R ² =0,12698413
IL1α			
F= 3,689254	p = 0,080509*	df= 2,7	R ² =0,51316228
IL1β			
F= 11,73596	p = 0,005810**	df= 2,7	R ² =0,77028035
IL2			
F= 1,881795	p = 0,221816*	df= 2,7	R ² =0,34965936
IL6			
F= 1,316207	p = 0,327168*	df= 2,7	R ² =0,2738698
IL12			
F= 0,9779702	p = 0,422138*	df= 2,7	R ² =0,21839587
Инф			
F= 0,1447818	p = 0,867736*	df= 2,7	R ² =0,03972303

Тестирање на разлика помеѓу поедини аритметички средини после завршената анализа на варијанса за IL1 β по Scheffe post hoc Scheffe's тест.

Табела 14 Завршна таблица на анализа на варијанса за IL1 β

извор на варијабилитетот	сума на квадрати SS	степени на слобода df	Среден квадрат (варијанса) MS	F	p
помеѓу групи	72,37450	2	36,18725	11,73596	0,005810
внатре во групи	21,58415	7	3,08345		
тотал	93,95865				

$$F = (x_1 - x_2)^2 / MS_{vg}(N_1 + N_2) / N_1 N_2$$

MS_{vg}=средниот квадрат внатре во групите

граничен F за 2 и 7 степени на слобода = 4,74

$$F' = \text{граничен } F \times (k-1) = 4,74 \times 2 = 9,48$$

Разлика помеѓу	F
x ₁ и x ₂	0,1888
x ₁ и x ₃	10,297556*
x ₂ и x ₃	7,6992346

*Статистички е значајна разликата помеѓу првата и третата аритметичка средина на вредностите на IL1 β во гингивалното ткиво.

Во согледувањето на корелациите помеѓу испитуваните параметри првенствено беше испитувана зависноста на губитокот на атачментот за првата група и изразеноста на гингивалната рецесија за втората група и сите останати испитувани параметри. Од статистичката анализа произлегоа следните резултати.

Таб 15: Корелација помеѓу нотираниот губиток на атачментот со испитуваните параметри

параметри	Spearman R	t (N-2)	p
апоптотичен индекс	0,915849	12,06956	0,0000
bcl₂	- 0,496584	3,02731	0,005250
p53	0,126438	0,67446	0,505549
IL _{1α}	0,243206	1,32676	0,195307
IL _{1β}	0,165637	0,88874	0,381712
IL ₂	-0,132361	0,70661	0,485649
IL ₆	0,229474	1,24755	0,222528
IL ₁₂	-0,040199	0,21289	0,832958
inf	0,518460	3,20831	0,003334

Таб 16: Корелација помеѓу нотираниот губиток на атачмент со испитуваните параметри

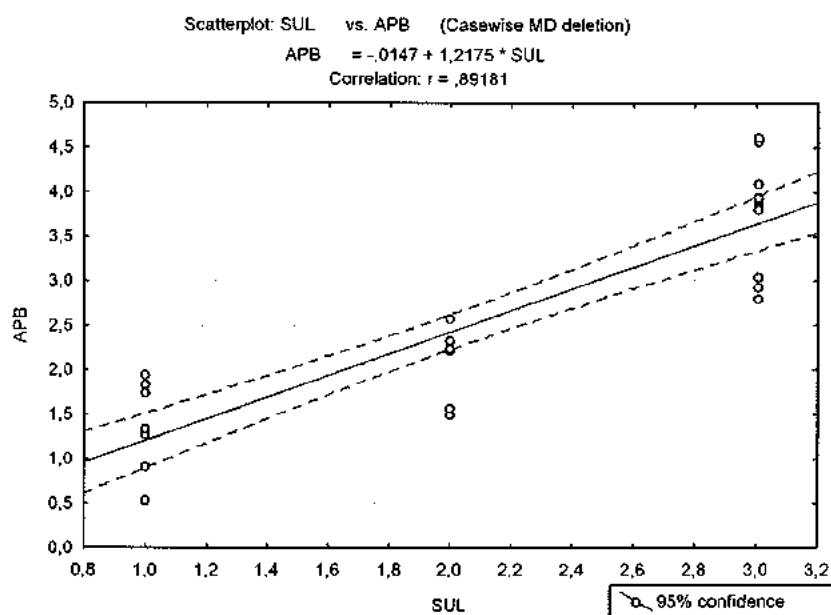
параметри	Pearson- ов коэффициент на корелација r
апоптотичен индекс	0,89
bcl₂	- 0,52
p53	0,1
IL _{1α}	0,27
IL _{1β}	0,29
IL ₂	-0,13
IL ₆	0,08
IL ₁₂	-0,07
inf	0,52

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

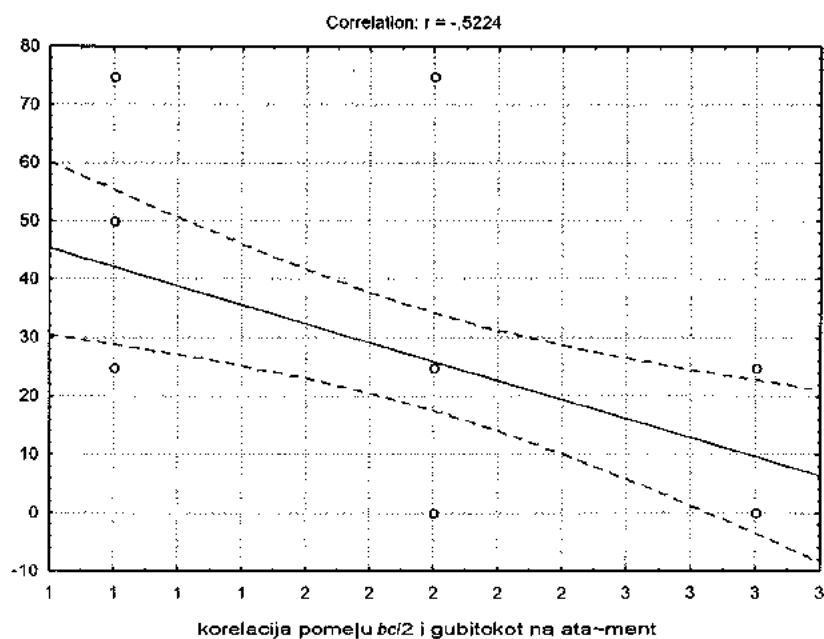
Постои умерено јака негативна корелација ($r=-0,52$ Pearson-ов коэффициент на корелација или Spearman-ов $r=-0,49$ статистички сигнификантен за $p=0,005$) помеѓу загубата на атачментот и вредностите на bcl₂ во гингивалното ткиво.

Помеѓу загубата на атачментот и другите испитувани параметри (p53, IL_{1α}, IL_{1β}, IL₂, IL₆, IL₁₂) се доби слаба корелација статистички несигнификантна. Добиените корелации се прикажани на графиконите 21, 22 и 23.

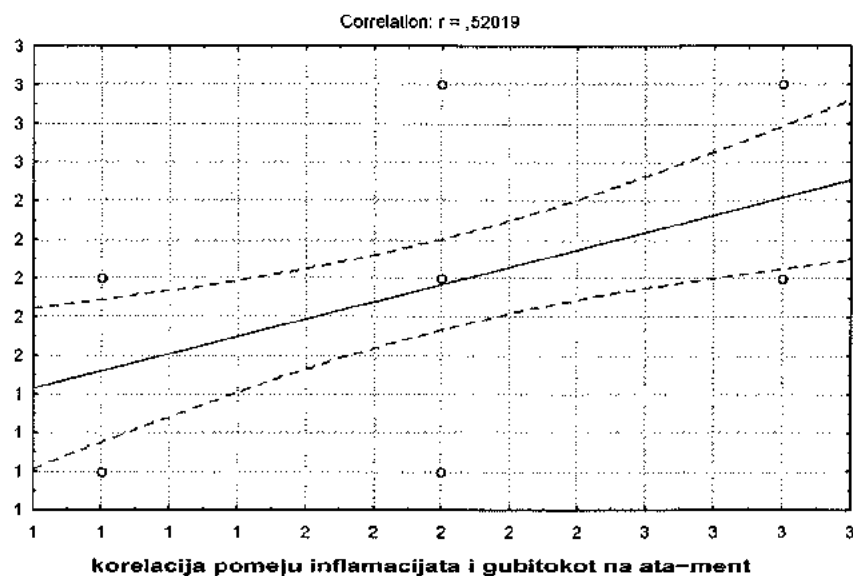
Граф 21: Pearson -ов коефициент на корелација: губиток на атачмент - апоптоза



Граф 22: Pearson -ов коефициент на корелација: губиток на атачмент - bcl2



Граф 23: Pearson -ов коефициент на корелација: губиток на атачмент - инфламација



Таб 17: Корелација помеѓу гингивалната рецесија со испитуваните параметри

параметри	Spearman R	t (N-2)	p
апоптогичен индекс	0,028392	0,15030	0,881609
bcl₂	- 0,447214	2,64575	0,013219
P53	- 0,267261	1,46760	0,153357
IL _{1α}	- 0,186641	1,00527	0,323374
IL _{1β}	0,042588	0,22556	0,823184
IL₂	- 0,363994	2,06793	0,047998
IL ₆	0,019017	0,10063	0,920546
IL ₁₂	- 0,184878	0,99544	0,328047
inf	- 0,412848	2,39854	0,023366

Таб 18: Корелација помеѓу потираниата гингивална рецесија со испитуваните параметри

параметри	Pearson- ов коефициент на корелација r
апоптотичен индекс	0,02
bcl₂	- 0,46
p53	- 0,27
IL _{1α}	- 0,33
IL _{1β}	- 0,34
IL₂	-0,48
IL ₁₂	-0,34
inf	- 0,37

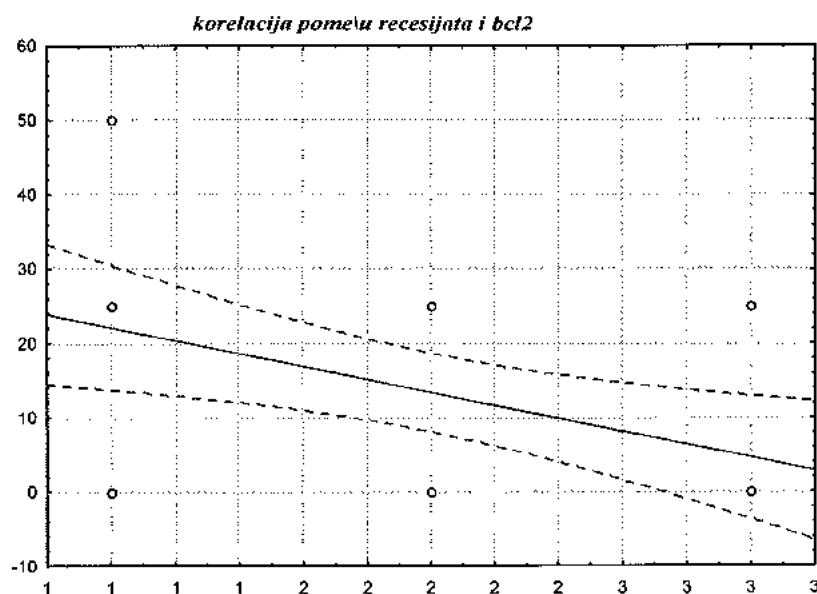
Постои умерено јака негативна корелација ($r=-0,46$ Pearson-ов коефициент на корелација или Spearman-ов $r=-0,45$ статистички сигнификантен за $p=0,013$) помеѓу различната поставеност на гингивалниот раб и bcl₂ во ткивото кај групите различно изразена рецесија на гингивата.

Постои умерено јака негативна корелација ($r=-0,48$ Pearson-ов коефициент на корелација или Spearman-ов $r=-0,36$ статистички сигнификантен за $p=0,047$; $r=-0,37$ Pearson-ов коефициент на корелација) помеѓу различната поставеност на гингивалниот раб и вредностите на IL₂ во ткивото кај групите различно изразена рецесија на гингивата.

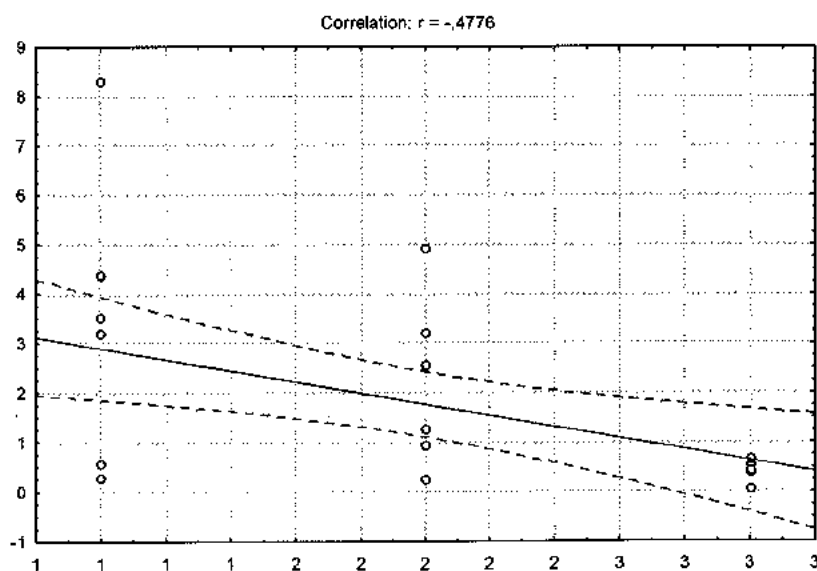
Помеѓу различната поставеност на гингивалниот раб и другите испитувани параметри (апоптотичниот индекс, p53, IL_{1α}, IL_{1β}, IL₁₂) се доби слаба корелација.

Добиените сигнификантни корелации графички се прикажани на графиконите 24 и 25.

Граф 24: Pearson -ов коефициент на корелација: изразеност на рецесијата – bcl2

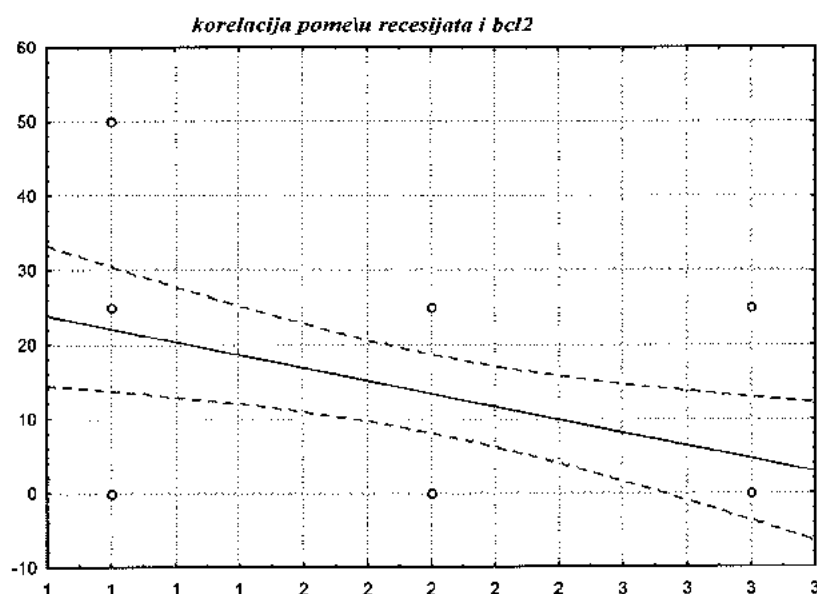


Граф 25: Pearson -ов коефициент на корелација: изразеност на рецесијата – IL2

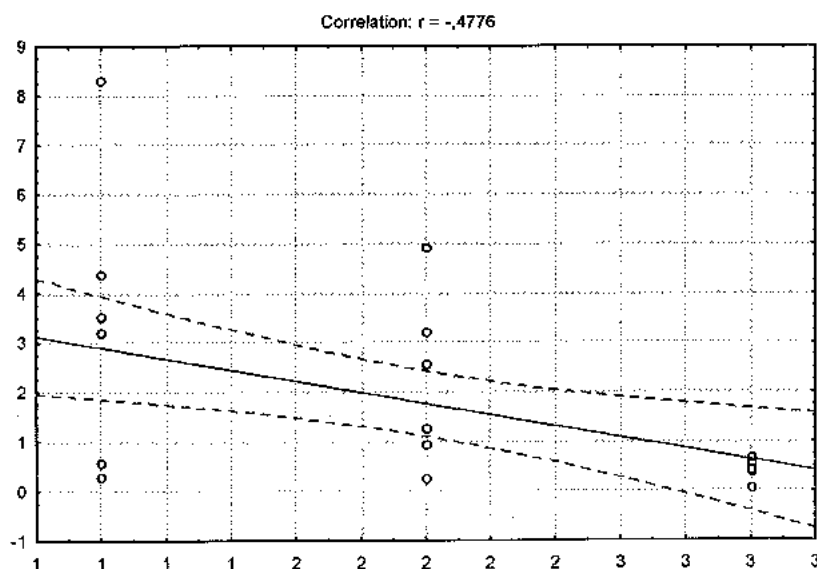


Во понатамошната анализа на взаемните влијанија, водејќи сметка за основната цел на нашето испитување, ја проследивме и корелацијата помеѓу апоптозата и испитуваните параметри.

Граф 24: Pearson -ов коефициент на корелација: изразеност на рецесијата – bcl2



Граф 25: Pearson -ов коефициент на корелација: изразеност на рецесијата – IL2



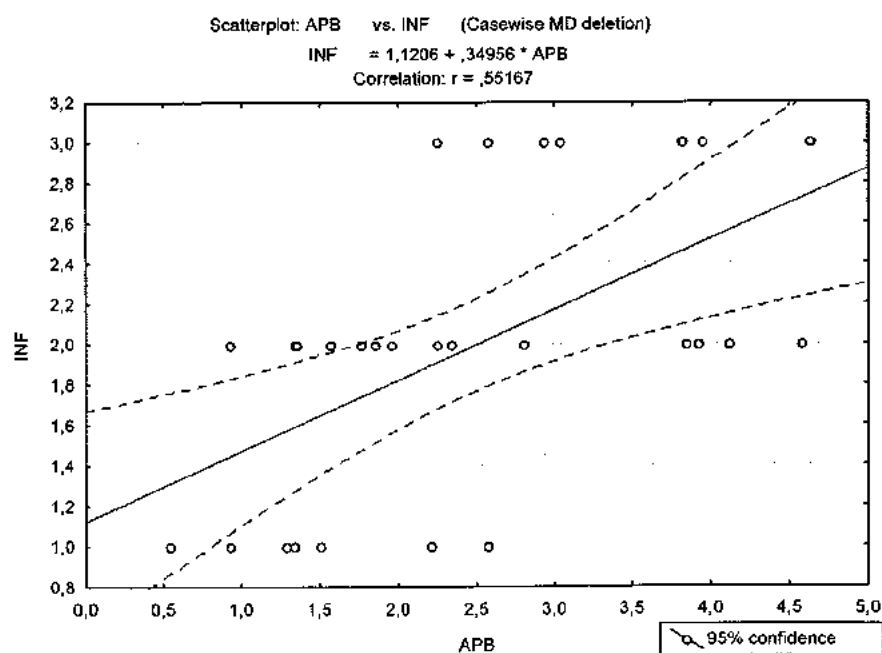
Во понатамошната анализа на взаемните влијанија, водејќи сметка за основната цел на нашето испитување, ја проследивме и корелацијата помеѓу апоптозата и испитуваните параметри.

За првата група пациенти само bcl2 покажа силно изразена негативна корелација, инфламацијата покажа силно изразена позитивна корелација, додека IL1 покажа умерено изразена позитивна корелација, за другите параметри отсуствуваше корелација во однос на апоптотичното одумирање на клетките. Резултатите се прикажани на табела 19 и графикон 26 и 27.

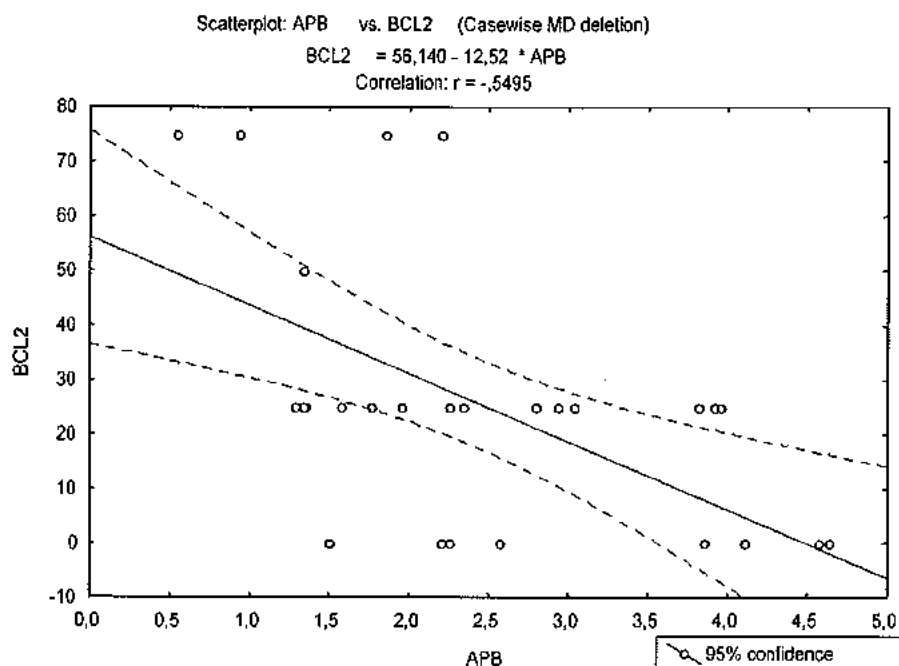
Таб 19: Корелација помеѓу апоптозата и испитуваните параметри за пациентите со различно изразен губиток на атачмент

параметри	Pearson- ов коэффициент на корелација r
bcl ₂	- 0,55
p53	0,21
IL ₁ α	0,37
IL ₁ β	0,43
IL ₂	0,05
IL ₆	0,03
IL ₁₂	0,02
inf	0,55

Граф 26: Pearson -ов коэффициент на корелација: апоптоза – инфламација



Граф 27: Pearson -ов коефициент на корелација: апоптоза-bcl2

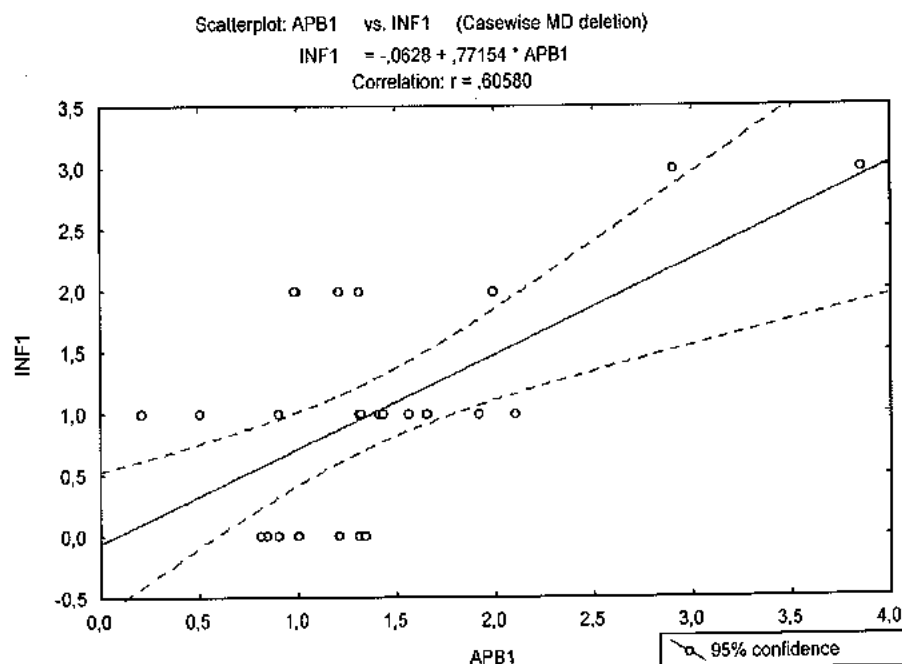


За втората група на пациенти со различно изразена гингивална рецесија, во однос на апоптозата статистички значајна корелација беше утврдена само за инфламацијата ($r=0,61$) и нешто послаба позитивна корелација за IL1 α . Добиените резултати се прикажани во табела 20 и на графиконите 28 и 29.

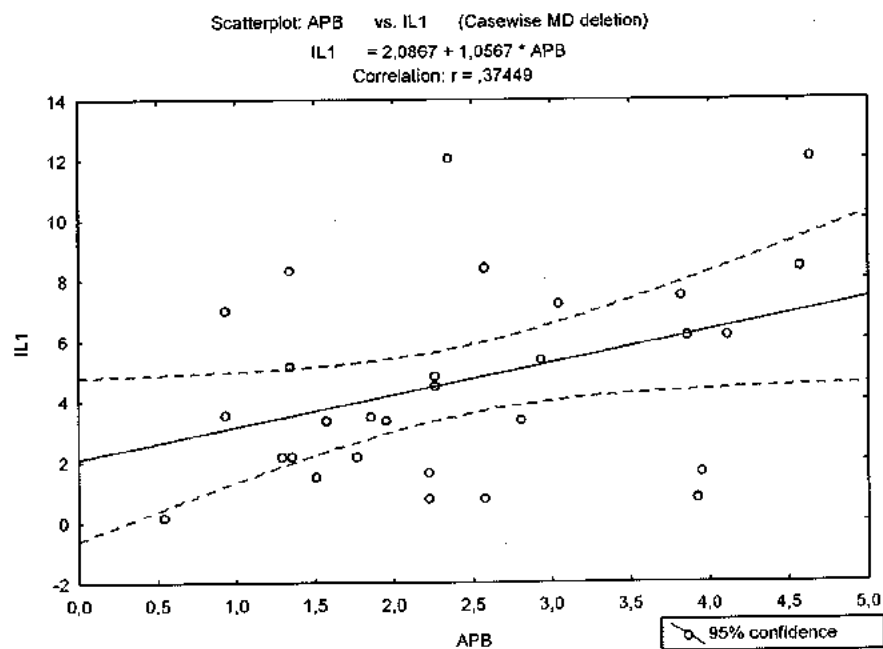
Таб 20: Корелација помеѓу апоптозата и испитуваните параметри за пациентите со различно изразена рецесија на гингивата

параметри	Pearson- ов коефициент на корелација r
bcl ₂	- 0,12
p53	0,24
IL₁α	0,54
IL ₁ β	0,32
IL ₂	0,27
IL ₆	0,19
IL ₁₂	0,07
inf	0,61

Граф 28: Pearson -ов коефициент на корелација: апоптоза – инфламација



Граф 29: Pearson -ов коефициент на корелација: апоптоза – IL1 α



Конечна цел на нашето испитување беше да се споредат вредностите за апоптотични клетки кај групата со губиток на атачмент над 6мм со гингивална рецесија и без гингивална рецесија. По

направената статистичка обработка можеше да се извлече заклучокот дека постои статистичка сигнификантна разлика во квантумот на апоптоза во гингивално ткиво кај ниво на атачмент поголем од 6мм кога постои различен степен на гингивална рецесија, компарирано со пародонтална лезија каде повторно атачмент нивото е над 6мм, меѓутоа отсаствува рецесија за $p=0,0000$. Добиените резултати се прикажани на табела 21.

Таб 21: Споредба на вредностите за апоптоза помеѓу групата со губиток на атачмент од 6мм и групите со различно изразена рецесија на гингивата

	X	SD	df	t	p	F	p
Гр без рец	3,762	0,64					
Рец 2мм	1,096	0,31	18	11,75	<i>0,00000</i>	4,195	<i>0,044</i>
Рец2-5мм	1,782	0,47	18	5,089	<i>0,000077</i>	2,644	<i>0,16</i>
Рец над5мм	1,125	0,20	18	12,335	<i>0,000000</i>	9,071	<i>0,002</i>

Во нашето испитување беше зацртано и да се проследат ткивните концентрации на С реактивни протеини. За сите исечоци добивме вредности помали од 0,05 мг на dl ткиво, при што ни една вредност не покажа отстапување од нормалните вредности.

5. ДИСКУСИЈА

Адултната пародонтопатија се дефинира како хронично заболување во чиј настанок учествуваат грам негативните бактерии како и локалниот инфламаторен одговор. Овој процес порано или подоцна завршува со деструкција на ткивата на пародонтот и губиток на забите.

Покрај директниот патолошки ефект на микроорганизмите врз пародонталните ткива, повеќе од евидентно е дека деструкцијата на ткивата е предизвикана и од индиректни механизми.

Иако многубројните студии ја потврдуваат способноста на микроорганизмите од денталниот плак за директна деградација на ткивото, мислењата се униформни дека сврзното ткиво, како и коската се деструирани по пат на автодеградациони механизми (11). Инфламацијата е процес кој подеднакво овозможува протекција на ткивото, но и ја поттикнува неговата деструкција.

Токму затоа пародонтопатијата претставува комплексен и специфичен процес во кој учествуваат голем број на инфламаторни клетки, се синтетизираат мноштво на макромолекули, кои покренуваат низа на клеточни и метаболни процеси.

Најповршните структури на пародонталните ткива постојано се изложени на разновидна грам негативна анаеробна флора, која предизвикуваа инфламаторен одговор и можна деструкција на ткивата.

Зачувувањето на пародонталното здравје зависи од воспоставувањето и одржувањето на бактериски и локално ткивен еквилибриум. Во прилог на овој еквилибриум се случуваат низа на процеси, пред сè постоење на висок степен на "turn over" на епителните клетки и високо регулиран локален имунолошки одговор кои ја ограничуваат пенетрацијата на микроорганизмите во подлабоките пародонтални ткива.

Најновите испитувања покажуваат дека регрутацијата на инфламаторни клетки на местото на продор на бактериите зависи од селективната активација за експресија на специфични молекули на

леукоцитарната адхезија на сидовите на капиларите кои припаѓаат на субепителијалните капиларни сплетови (89). По дијапедезата, полиморфонуклеарните леукоцити мигрираат во гингивалниот епител привлечени од хемотактичките и хаптотактичките адхезивни молекули достигнувајќи до местото на бактериски предизвик.

Мононуклеарните клетки навлегуваат во периваскуларното сврзно ткиво оформувајќи инфламаторен инфилтрат кој и покрај хроничитетот на заболувањето, кај здравите луѓе останува постојано константен (101), што наведува на заклучокот дека и покрај постојаниот инфлукс на клетки мора да постои механизам кој го одржува постојано количеството на овој инфилтрат. Во овие механизми најчесто е споменувана апоптозата.

Од друга страна за одредени периопатогени се знае дека се цититоксични за клетките на пародонтот. *Porphiromonas gingivalis*, *Prevotella loescheii* и *Fusobacterium nucleatum* предизвикуваат апоптоза како на Т лимфоцитите така и на епителните клетки (128). Сите овие податоци говорат во прилог на учеството на апоптозата во тек на пародонтопатијата.

Оттука и основниот интерес на нашето испитување беше насочен пред се 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, присуство на модулаторите на апоптотичниот процес како и присуството на цитокините молекули, обидувајќи се на одреден начин да согледаме една кратка секвенца од комплексните и динамични збиднувања во тек на пародонтопатијата.

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

Литературните податоци, иако малубројни, говорат за најразлични наоди. Првите податоци потекнуваат од Ellis (32) 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 бмм.

Овој наод е цитиран во многу други трудови се до објавувањето на наодите на Tonetti 1998 (135) 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 отсутствувала 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 апоптотично одумирање на ткивата. Земајќи го се ова во предвид малку е веројатно дека апоптозата отсутствува кога нема инфламација. Словите на епителот постојано се изложени на влијание на периопатогени кои и најверојатно предизвикуваат апоптоза на поедини површни делови од епителот.

Токму ваквото размислување го потврдија наодите од претходна 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 100клетки, за разлика од инфламираната гингива каде беа најдени 7 апоптотични клетки на 100 клетки (102).

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 тек на пародонтопатијата апоптотичните клетки не надминуваат 10% од вкупниот број на клетки (121).

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 статистичка 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 аритметичките 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.

Поголем проблем во толкувањето наметнаа резултатите добиени за групата на пациенти со различно изразена рецесија на гингивата. Оваа група беше составена од исечоци на гингива која одговараше на губиток на атачмент поголем или еднаков на 6мм, но со различна поставеност на работ на гингивата во однос на цементно емаиловото споиште. Очекувавме дека бројот апоптотични клетки приближно ќе одговара на бројот на истите од претходната група на пациенти каде беше нотиран губиток на атачмент поголем или еднаков на 6мм без рецесија на гингивата.

Меѓутоа добиените резултати покажаа значително пониски вредности (1,096, 1,782 и 1,123) за разлика од добиените 3,762 апоптотични клетки за група со губиток на атачмент поголем од 6мм без гингивална рецесија. Освен групата со рецесија од 2-5мм ниедна друга

група не покажа статистичка значајност на разликите во однос на здравото ткиво, ниту пак со анализата на варијанси успеавме да добиеме значајност во разликите помеѓу самите групи со различно изразена рецесија на гингивата. Корелацијата помеѓу рецесијата и апоптозата исто така одсуствуваше.

Во потрага по објаснување за ваквиот наод моравме да согледаме и други чинители, пред се инфламацијата на ткивото. Инфламацијата беше клинички нотирана за секој пациент иако групите беа составувани према губитокот на атачментот и изразеноста на рецесијата. Доколку се разгледаат средните вредности за инфламацијата кои за групата со рецесија до 2мм изнесуваа $1,2 \pm 0,88$ за групата со рецесија од 2-5мм $1,3 \pm 1,05$ и за рецесија над 5мм $0,4 \pm 0,5$, може да се забележи дека ниедна вредност не ја надминува средната вредност на инфламација добиена за групата со губиток на атачмент до 3мм ($1,6 \pm 0,51$), а се далеку пониски од вредностите за групата со губиток на атачмент поголем од 6мм ($2,5 \pm 0,52$).

Ваквиот наод не наведе да ги регрупираме сите пациенти во однос на клинички нотираната инфламација и да ја разгледаме динамиката на апоптотично одумирање на клетките во однос на различно изразената инфламација.

Резултатите покажаа статистичка значајност на разликите за индекс на инфламација 2 и 3 во однос на здраво, а анализата на варијанси покажа значајност на разликите за сите 3 аритметички средини. Pearson-овиот индекс на корелација покажа силно изразена позитивна корелација за инфламацијата во однос на апоптозата. Ваквите наоди посочуваат дека динамиката на апоптозата првенствено е поврзана со изразеноста на инфламацијата во ткивото. Поголемата апоптоза учествува во губитокот на атачмент, додека ваквото влијание за настанокот и прогресијата на рецесијата не беше потврдено.

Нашите наоди се во согласност со наодите на Carro(15) кој ги испитувал промените кои ги претрпуваат епителните клетки во тек на инфламацијата, за да заклучи дека постои силно изразена позитивна

корелација помеѓу изразеноста на инфламацијата и апоптозата, и негативна корелација помеѓу митотски делби во епителот и инфламацијата. До сличен наод дошол и Jarnbring(59), кој го испитувал соодносот помеѓу пролиферацијата и апоптозата во различни делови на гингивалниот епител во тек на гингивалната инфламација и манифестната пародонтопатија. Кај пародонталните болни бројот на апоптотични клетки го надминал бројот на пролиферативни кератиноцити во споредба со гингивитис. Овие промени најмногу биле изразени во припојниот епител. Истите наоди се потврдени и кај експериментално предизвикана пародонтопатија (139) при што е утврден пораст на апоптотичните клетки во сите делови на пародонталните ткива напоредно со инфламацијата. Апоптозата како процес се случува и во клетките на гингивалниот сулкус (110) при што најмногу подложни на апоптотични измени се неутрофилните гранулоцити. Според податоците добиени од истражувањето на Rabbe(110) бројот на апоптотичните клетки во гингивалниот флуид расте напоредно со губитокот на атачмент се додека не надмине димензија од и над 9мм каде веќе преовладуваат некротични промени. За разлика од овие наоди Gammonal(38) и Ellis(32) со електронска микроскопија утврдиле постоење на апоптотични клетки само во региите на губиток на атачмент поголем од 6мм.

Несогласувањето на нашите наоди со одредени автори најверојатно се должи на различниот полуживот на клетките, различниот пролиферативен сооднос и фактот дека детекцијата на апоптотичните клетки е работа поврзана со голем степен на ризик од грешка дури и кога се користат високо сензибилни техники. Конечно апоптотичниот процес е брз и завршува во рамките од неколку часа, додека во препаратите имаме увид во само еден замрзнат момент од динамиката на процесот.

Утврденото присуство на апоптозата во тек на пародонтопатијата, го наметна и прашањето за механизмите за активација и контрола на апоптотичниот процес.

Апоптозниот процес не е иреверзибилен. Општо прифатено е дека се до активацијата на каспазната каскада процесот може и да не заврши со апоптотична разградба на клетката. Клучни модулатори на овој процес се членовите на bcl2 лозата и контролорот на митотската делба p53.

bcl2 протоонкогенот е потврден инхибитор на апоптозата (53). Првите податоци за поврзаноста помеѓу експресијата на bcl2 и инхибиција на апоптозата се откриени кај лимфоидни клетки (113). Многубројните студии го потврдуваат фактот дека експресијата на bcl2 доведува до инхибиција на апоптоза кај најразлични ткива клетки и култури на клетки. Механизмот на инхибиција на апоптозата можеби е и еден од малкубројните подобро разјаснети моменти воопшто. Експресијата на bcl2 е поврзана за мембраната на митохондриите при што учествува во стабилизирањето на мембраната и го спречува истекувањето на содржината на митохондриите во цитосолот на клетката.

Отсуството на bcl2 предизвикува нестабилност на митохондријалната мембрана, посебно на местата на допир на надворешната и внатрешната митохондријална мембрана, отворање на јонскиот мегаканал и истекување првенствено на cytochrome c, кој е карактеристичен само за митохондриите, во цитосолот на клетката. Cytochrome c понатаму ја откочува каспазната каскада, а со тоа и апоптотичната смрт на клетка станува неминовна.

Отсуство на експресија на bcl2 во терминално диференцираните ткива зборува за баланс помеѓу апоптозата и пролиферацијата. Меѓутоа кај повеќередниот плочест епител, каде динамиката на смена на клетките е голема, bcl2 е карактеристичен за базалните слоеви на епителот (60).

Во нашето испитување bcl2 беше детектиран по пат на имунохистохемиска анализа при што бројот на клетките кои покажаа експресија за bcl2 беше изразен како процент од испитуваните клетки.

Во нашиот материјал добивме сигнификантност на разликите за bcl2 во однос на клинички здравото ткиво и испитуваните групи само за губиток на атачмент до 3мм.

Исто така анализата на варијанси помеѓу групите не покажа сигнификантност. Во однос на инфламацијата на гингивата статистичка значајност на разликите беше забележена само за индекс 1 на инфламација.

Spearman-овиот и Pearson-овиот индекс на корелација покажаа силна негативна корелација за bcl2 како во однос на губитокот на атачментот така и во однос на изразеноста на гингивалната рецесија.

Меѓутоа можеби подобро е да се согледаат резултатите за bcl2 споредени со изразеноста на апоптозата. Во здравото ткиво најдовме застапеност на апоптотични клетки од 1,079 и застапеност од 12% на клетки со експресија на bcl2. Во групата со губиток на атачмент до 3мм бројот на апоптотични клетки беше приближно ист иако имавме нотиран индекс на инфламација од 1,6. При првата анализа на податоците, отсуството на промена на бројот на апоптотични клетки го поврзувавме со дискретните инфламаторни промени, но кога ќе се споредат резултатите за bcl2 може да се забележи сигнификантен скок на вредноста на bcl2 (47,5%) како во однос на здравото ткиво така и во однос на останатите регии па најверојатно и дека и најмалиот бактериски инсулт или инфламаторни промени доведуваат до силна експресија на bcl2 штитејќи ги на тој начин клетките од апоптотично одумирање. Во понатамошната прогресија во губиток на атачментот се забележува пораст на инфламацијата (1,8 и 2,6) пораст на бројот на апоптотичните клетки и опаѓање на bcl2 приближно на почетните вредности.

Кај групата со гингивална рецесија голема промена не покажаше ниту инфламацијата, ниту бројот на апоптотичните клетки. Застапеноста на bcl2 покажа пораст во групата со изразеност на рецесијата до 2мм (од 12% кај здраво ткиво на 25% за изразеност на рецесијата до 2мм) иако не добивме сигнификантност во разликите, за да во посилено изразената рецесија падне дури и на 7,5%. Во овие групи бројот на апоптотични

клетки покажа пораст остварувајќи сигнификантност на разликите помеѓу здравото ткиво и ткивата кои одговараа на изразеност на рецесијата од 2-5мм.

Нашиот наод беше потврден и со добиената статистички сигнификантна негативна корелација помеѓу апоптозата и bcl2 за групата со различно изразен губиток на атачмент.

Нашите наоди се во согласност со наодите и на останатите автори. Ellis(32) известува за намалување на количеството на bcl2 напоредно со продлабочување на пародонталниот џеб и зголемување на губитокот на атачмент. Кај експериментално предизвикана пародонтопатија највисоки вредности на bcl2 се најдени по првиот ден, а потоа неговото ниво опаѓа (139) за разлика од нив Tonetti(135) утврдил присуство на bcl2 само во базалните слоеви на гингивалниот епител, додека во припојниот епител каде апоптозата била и најзастапена целосно отсутствувал и покрај ваквиот наод авторот не успеал да најде корелација помеѓу bcl2 и апоптозата. Gamonall(38) не наоѓа статистичка сигнификантност на разликите за количеството на bcl2 помеѓу здравата гингива и гингивата кај пародонтални болни.

За одредени активатори на апоптозата присуството на функционален p53 протеин е неопходно, па од овие причини, во анализата на апоптозата во нашиот материјал, беше земена во предвид можноста дека антионкогениот протеин p53 зема учество во апоптотичните процеси во гингивата.

p53 е тумор супресорен протеин кој во активна фаза учествува во регулација на клеточниот циклус, ги покренува репараторните механизми на ДНК и доколку не се случи репарација настанува апоптоза. Нормално се очекува да p53 биде присутен и во здраво ткиво но неговиот краток полуживот условуваат слаба детектибилност на неговата експресија (69). По активацијата p53 се стабилизира, па и неговата експресија може да се регистрира.

Во согласност со овие сознанија и во нашиот материјал беше слабо изразена експресијата на p53 во исечоците на клинички здраво

ткиво. Меѓутоа и по имунохистохемиската анализа за p53 на нашиот материјал резултатите не покажаа сигнификантност за ниедна група споредено со здравото ткиво. Сигнификантноста изостана и со анализата на варијанси во самите групи. Коефициентите на корелација не покажаа изразена корелација за p53 во однос на губитокот на атачмент, изразеноста на гингивалната рецесија, ниту пак покажаа корелација во однос на апоптотичното одумирање на клетките. Единствено од нашите наоди може да се утврди дека со интензивирањето на инфламацијата и експресијата на p53 се зголемува, остварувајќи сигнификантни разлики во однос на здравото ткиво.

Литературните податоци во однос на p53 не само што се малку туку се и разновидни. Tonetti(135) известува за силно изразена корелација помеѓу апоптозата и p53 како и корелација помеѓу bcl2 и p53. Gammonal (39) успеал да детектира слаба експресија на p53 во тек на пародонтопатијата оградувајќи се од некои посериозни заклучоци со напомена дека p53 зависната апоптоза возможно е да се случува во тек на пародонтопатијата. Земајќи ги во предвид добиените резултати за p53 каде сепак неговата експресија покажуваше благ пораст во однос на здравото ткиво во можност сме да се сложиме со заклучоците на Gammonal(39) дека p53 сепак го има повеќе кај пародонталната болест. Отсуството на било каква корелација за p53 со сите испитувани параметри, како и учеството во контрола на клеточниот циклус, репарацијата на ДНК, не ограничува во можноста да донесеме било каков заклучок за неговата поврзаност со апоптозата во тек на пародонтопатијата.

Сепак останува докрај неразјаснето прашањето кој ја поттикнува апоптозата во тек на пародонтопатијата. Бројни се размислувањата на авторите дека и одредени бактерии од денталниот плак можат да ги покренат директно или индиректно апоптотските механизми. Епителните клетки играат значајна улога во одржувањето на површинскиот интегритет. Гингивалните кератиноцити имаат можност за продукција, а и покажуваат сензитивност кон различни цитокини и инфламаторни молекули овозможувајќи одржување на хомеостазата

преку индукција и превенција на програмираната клеточна смрт (134). Епителните клетки под дејство на коменсалната флора како *Fusobacterium nucleatum* се секогаш во активна состојба (67). Активноста ја изразуваат преку експресија на специфични рецептори (tool-like, β defensin) за кои се врзуваат липополисахаридите од бактериите (2).

Поврзувањето на липополисахаридите за овие рецептори покренува два типа на одговор, апоптоза или активација на $\text{NF-}\kappa\text{B}$. $\text{NF-}\kappa\text{B}$ димерите кои се транслоцираат во нуклеусот влијаат врз засилување на имунолошкиот одговор и продукција на проинфламаторни цитокини и остваруваат антиапоптотични сигнали. Меѓутоа од друга страна со стимулација на овие рецептори се активира *fas* *fas* поврзаната апоптоза и активација на прокаспаза 8. Со активацијата на каспазната каскада се активира и прокаспаза 1 која го разлага прекурзот на $\text{IL-1}\beta$ во неговата активна форма. Присуството на IL-1 е карактеристично за пародонтопатијата меѓутоа помеѓу многубројните дејства остварува и регулација на апоптозата во ткивата во кои се продуцира (2).

IL-1 се состои од три структурно слични полипептиди од кои првите два се $\text{IL-1}\alpha$ и $\text{IL-1}\beta$ и IL-1 рецептор. И $\text{IL-1}\alpha$ и $\text{IL-1}\beta$ покажуваат широк спектар како на биолошки корисни така и на штетни дејства. Од познатите дејства на двете форми на IL-1 се способностите да предизвикаат треска, хипотензија, анорексија, зголемена синтеза на колагенази и деструкција на рскавиците и коскено ткиво, ја стимулираат синтезата на простагландини и развојот на атеросклеротични плаки. (27)

Во рамките на локалните одбрамбени стратегии IL-1 ги стимулира Т и В клетките, има протективно дејство врз клетките изложени на радијација и има заштитна улога при бактериски и фунгални инфекции. И покрај сличните функции и двете форми на IL-1 се продукти на различни гени, имаат различни аминокиселински секвенци, но делуваат преку истиот мембрански рецептор покажувајќи слични биолошки дејства.

Се синтетизираат воглавно од моноклеарните клетки, претежно од моноцитните фагоцити по стимулација од продуктите на инфламацијата или по директен бактериски инсулт. И двата се синтетизираат во нивната прекурзорна молекула со голема молекуларна тежина. Дел од прекурзорната молекула на IL1 α останува во цитосолот на клетката и учествува во автокриниот пренос на сигналите, додека останатиот дел се припојува за клеточната мембрана и се верува дека е биолошки активен во паракриниот пренос на информации до соседните клетки.

За разлика од него прекурзорната молекула на IL1 β се ослободува од клетките во екстрацелуларниот простор и циркулацијата. За да ја искаже својата биолошка активност мора да настане биолошко разлагање на IL1 β . Во овој процес учествува строго специфичен ензим IL1 β converting enzyme, член на cystein протеазите. Како IL1 е еден од првите цитокини кој е откриен и неговата улога во тек на пародонтопатијата е најмногу истражена.

Епителните клетки и Лангерхансовите клетки во епителот на гингивата продуцираат IL1 α и IL1 β (52) додека моноцитите во инфламираното ткиво секретираат IL1 β (58).

Учествува во регулацијата на експресијата на адхезивните молекули на фибробластите, ендотелијалните клетки и имуноцитите. Овие адхезивни молекули овозможуваат хемотакса на местото на инфламација и им овозможуваат на лимфоцитите и моноцитите да се припојат на клетките на сврзното ткиво. (133)

И обата IL1 се потентни стимулатори на сврзно ткивниот катаболизам стимулирајќи ја коскената ресорпција преку ослободување на големи количини на PgE2 од фибробластите и моноцитите и преку стимулација на секрецијата на матриксметалопротеиназите кои учествуваат во деградација на екстрацелуларниот матрикс. Од друга страна PgE2 учествува во вазодилатацијата, формирањето на едем и коскена ресорпција.

IL1 делува регулаторно на клетките на имуниот систем преку стимулација на Т и Б клетките. Учествува во експресијата на МНС протеините и презентација на антигените. Ја потпомага активацијата, пролиферацијата и секрецијата на антителата и клоналната експанзија на В клетките(27).

Воглавно сите досегашни студии се сложуваат дека IL1 β е карактеристичен за пародонтопатијата и дека се поврзува со обемна деструкција на ткивото (133, 52, 58).

Најзначајна улога на IL1 β се смета дека настанува со неговото делување врз клетките на периодонталниот лигамент кои се наоѓаат помеѓу цементот и алвеоларната коска. Основна функција на овие клетки е да го одржуваат интегритетот на лигаментот. (100) Фенотипските карактеристики, како експресија на алкална фосфатаза, TGF β 1, остеокалцин, синтеза на Camf и формација на Ca-Ph нодули ги карактеризира како остеобластоидни клетки (6,57). Способноста подеднакво да учествуваат во синтезата на коска и цемент, како и можноста за синтеза на екстрацелуларни матрикс протеини ги одвојува од остсобластите (100). Овие клетки во нормални услови не ги препознаваат бактериските липополисахариди ниту предизвикуваат проинфламаторна цитокина продукција.

Врз основа на *in vitro* изведените експерименти Agarwal(1) заклучува дека за време на инфламаторните процеси во гингивата локалните количества на IL1 β и TNF α иако многу мали се доволни да предизвикаат промени во фенотипот на овие клетки, со што ги изнудуваат овие клетки да учествуваат директно во имунолошките процеси за сметка на нивниот остеоиден ефект. Стимулираните клетки на периодонталниот лигамент се способни да го препознаат липополисахаридот од бактериите и да предизвикаат цитотоксични ефекти преку регрутација на имуни клетки во овој регион на периодонциумот. Иако овој процес е насочен кон отстранување на инфекцијата, го доведува во опасност зачувувањето на интегритетот на периодонталниот атачмент.

Во согласност со тоа во можност сме да ги толкуваме и нашите наоди каде вредностите на IL1 α и IL1 β во исечоците кои одговараа на различно изразен губиток на атачмент покажаа сигнификантни разлики во однос на здравото ткиво без губиток на атачмент. Анализата на варијанси во самите групи не покажа статистички сигнификантна разлика за трите групи ниту за IL1 α ниту за IL1 β . Во однос на групата на пациенти со различно изразена рецесија на гингивата IL1 α покажа сигнификантна разлика во однос на здравото ткиво за рецесија до 2мм и од 2 до 5мм додека сигнификантност во разликите во однос на здравото ткиво за IL1 β беше забележана само за изразеноста на рецесијата 2-5мм. Анализата на варијанси помеѓу групите покажа сигнификантност помеѓу првата и третата аритметичка средина за IL1 β . Нешто поинакви резултати се добија кога IL1 α и IL1 β беа разгледувани во однос на клинички нотираната инфламацијата на гингивата. И двата покажаа статистички сигнификантни разлики во однос на здравото ткиво за сите степени на инфламација. Исто така беше забележена и сигнификантна разлика внатре во самите групи. Било каква корелација помеѓу изразеноста на губитокот на атачментот или изразеноста на рецесијата и вредностите на IL1 α и IL1 β отсутствуваше. Воглавно добиените наоди се во согласност со наодите од литературата.

Докажан е фактот дека IL1 β за време на активните фази на болеста се зголемува повеќекратно како во ткивото така и во гингивалиот флуид споредени со пациенти без пародонтопатија (39, 40, 46). Компарирани со обемот на патохистолошки детектирана ткивна деструкција, најдените количества на IL1 не покажале корелација(33) што воглавно е случај и со нашите наоди. Ваквото отсуство на корелација со напредувањето на болеста најверојатно се должи на колевливоста на вредностите на IL1 која одговара на епизодите на прогресијата на болеста. Според Ваџи(8) најголеми вредности IL1 достигнува многу бргу за 24 часа во *in vitro* услови, кои вредности се задржале и по 4 дена. Во испитувањата изведени на експериментални животни (127) најголеми нивоа IL1 β достигнал за два месеци, а вредностите се вратиле на базично ниво по 3 месеци од почетокот на

индуцираната пародонтална инфекција. Нешто поинакви наоди добиени се кај периапикалните лезии, каде е најдена умерена корелација помеѓу величината на лезијата и IL1 β . (106) Сепак процесите во периапикалните лезии се поинакви отколку во тек на пародонтопатијата.

Коефициентите на корелација покажа силна позитивна корелација помеѓу IL1 α и IL1 β и апоптозата и кај двете испитувани групи. Наодот може да се толкува двонасочно: или зголемените количества на IL1 доведуваат до зголемена апоптоза или пак зголеменото апоптотично одумирање на клетките е пратено со ослободување на поголеми количества на IL1. Поверојатно е дека зголемената апоптоза доведува до пораст на количествата на IL1. Пред се зголемувањето на IL1 β е индикатор за каспазната активност во ткивото. Апоптозата, без разлика на причинителот секогаш е поврзана со активирање на каспазната каскада. Во прилог на ваквата претпоставка оди и отсуството на корелација помеѓу bcl2 и IL1 како и отсуството на корелација на помеѓу p53 и IL1.

IL1 генерално се опишува како инхибитор на апоптоза меѓутоа во поедини ткива тој е и промотор на апоптозата. Механизмот кој ги покренува и двата процеси докрај не е разјаснет, а уште помалку како делува на гингивалното ткиво. Во разгледувањето на добиената поврзаност со апоптозата би требало да се земат во предвид и можните зголемени количества на TNF α . Зголемените нивоа на IL1 се во тесна корелација со зголемувањето на нивоата TNF α , затоа што се секретираат од истите клетки и под дејство на истите стимули. TNF α од друга страна е докажан стимулатор на fas медираната апоптоза. Во комплексноста на патогенезата на пародонтопатијата, и засега слабото позанавање на апоптозата, голема е веројатноста дека и секој од споменатите процеси има свое учество.

Можеби најнеочекуван беше наодот кој го добивме за IL6 и IL2. IL6 е еден од цитокините кој со сигурност се поврзува со пародонтопатијата. Ellis(32) наодот на зголемени вредности на IL6 кај ткивата со пообемна деструкција го толкува со можноста IL6 да ја

превенира апоптозата на полиморфонуклеарите. Нивното подолго задржување во ткивниот супстрат доведува до продолжување на инфламацијата, а со тоа и до поголема деструкција на пародонталните ткива. Зголемени вредности на IL6 во тек на пародонтопатијата ги потврдуваат и наодите на Yamazaki(154), Giavelis(41), Reinhardt(114). Rinhardt(114) известува за поголеми количини на IL6 кај рефрактерната пародонтопатија отколку кај стабилните лезии.

За разлика од поедини литературни наоди нашите наоди не покажаа зголемување на количествата на IL6 во однос на здравото ткиво за ниту една група ниту пак покажаа било каква корелација со испитуваните параметри. Единствен наод кој беше добиен беше статистички сигнификантната анализа на варијансите во групите со различен губиток на атачмент. Вредностите на IL6 за групите со различно изразена рецесија беа нешто повисоки отколку во здравото ткиво иако статистичка сигнификантност на разликите не се доби. Можно објаснување за ваквиот наод е што пациентите покажаа големи варијации за вредностите на IL6 па и стандардната девијација на вредностите беше многу висока.

Поткрепа за ваквиот наод се и наодите на Yumoto(159) кој утврдува дека цитокиниот профил кој потекнува од клетките во пародонтот е воглавно ист, но постојат варијации во количеството на одредени цитокини кои најверојатно се должат на типот на бактериска колонизација, количеството на бактериите и нивните интеракции но во најголема мерка од индивидуалните варијации во локалниот имунолошки одговор во пародонтот.

Во потрага по објаснување за нашиот наод наидовме и на поинакви мислења кои индиректно и го поткрепуваат нашиот наод. Имено колонизацијата со различни видови на бактерии предизвикува за едни поголема додека за други помала секреција на IL6 од фибробластите. Во *in vitro* услови поголема стимулација со трепонема дентикола доведува до намалена продукција на IL6 за разлика од помалите количества кои ја зголемуваат количината на IL6 (92).

превенира апоптозата на полиморфонуклеарите. Нивното подолго задржување во ткивниот супстрат доведува до продолжување на инфламацијата, а со тоа и до поголема деструкција на пародонталните ткива. Зголемени вредности на IL6 во тек на пародонтопатијата ги потврдуваат и наодите на Yamazaki(154), Giavelis(41), Reinhardt(114). Rinhardt(114) известува за поголеми количини на IL6 кај рефрактерната пародонтопатија отколку кај стабилните лезии.

За разлика од поедини литературни наоди нашите наоди не покажаа зголемување на количествата на IL6 во однос на здравото ткиво за ниту една група ниту пак покажаа било каква корелација со испитуваните параметри. Единствен наод кој беше добиен беше статистички сигнификантната анализа на варијансите во групите со различен губиток на атачмент. Вредностите на IL6 за групите со различно изразена рецесија беа нешто повисоки отколку во здравото ткиво иако статистичка сигнификантност на разликите не се доби. Можно објаснување за ваквиот наод е што пациентите покажаа големи варијации за вредностите на IL6 па и стандардната девијација на вредностите беше многу висока.

Поткрепа за ваквиот наод се и наодите на Yumoto(159) кој утврдува дека цитокиниот профил кој потеснува од клетките во пародонтот е воглавно ист, но постојат варијации во количеството на одредени цитокини кои најверојатно се должат на типот на бактериска колонизација, количеството на бактериите и нивните интеракции но во најголема мерка од индивидуалните варијации во локалниот имунолошки одговор во пародонтот.

Во потрага по објаснување за нашиот наод наидовме и на поинакви мислења кои индиректно и го поткрепуваат нашиот наод. Имено колонизацијата со различни видови на бактерии предизвикува за едни поголема додека за други помала секреција на IL6 од фибробластите. Во *in vitro* услови поголема стимулација со трепонема дентикола доведува до намалена продукција на IL6 за разлика од помалите количества кои ја зголемуваат количината на IL6 (92).

Понатаму треба да се земе во предвид и фактот дека бактерите кои содржат trypsin like ензими као *porpfiromonas gingivalis* многу бргу го разградуваат IL6(131). Возможно е такво нешто да се случило и во нашиот материјал со оглед на тоа дека не беше испитуван типот на микроорганизми кои преобладаа во денталниот плак.

Меѓутоа наидовме и на некои поинакви согледувања. IL6 традиционално се смета за проинфламаторен цитокин иако искажува плеотропни дејства. Balto(8) при испитувањето на коскената ресорпција како последица на пулпалните инфекции утврдил значајно поголема коскена ресорпција кај експерименталните животни за разлика од експерименталните животни кај кои била супримирана продукцијата на IL6 посочувајќи дека инфламаторните промени како и коскената деструкција не мора да бидат поврзани со зголемената количина на IL6 кој има и антиинфламаторни особини кои можеби и преобладаат кај пародонтопатијата или кај поедини случаи.

Нивоата на IL6 директно ја контролираат и продукцијата на протеините на акутното воспаление од хепар богато со С реактивните протеини. Во нашиот материјал беше направена детекција за С реактивните протеини. Ниту еден примерок не покажа вредности поголеми од 0,5мг на dl ткиво. Вредностите беа исти како кај здравите ткива така и кај заболениите.

За разлика од ткивната концентрација на С реактивните протеини за која нема податоци во литературата правени се испитувања во плунка во гингивалната течност како и во серум (28, 103, 93), сите покажале зголемени вредности напоредно со прогресијата на пародонтопатијата. Нашиот наод единствено можеме да го толкуваме со малиот пораст на IL6 во нашиот материјал или евентуалното пак со брзото трошење на С- реактивните протеини и пред да бидат детектирани.

Подеднакво изненадувачки беше наодот за присуство на IL2 во сите исечоци од ткиво. Резултатите покажаа сигнификантни разлики во однос на здравото ткиво и ткивото кое одговараше на губиток на

атачмент до 3мм како и за ткивото кое одговараше на губиток на атачмент поголем од 6мм. Сличен наод беше добиен и за групата со различно изразената гингивална рецесија.

Повеќе од авторите известуваат за отсуство на IL2 во тек на пародонтопатијата. Pilon(105) сораб. утврдиле намалени количества на IL2 во гингивалниот сулкус од регии со пародонтална деструкција ,за разлика од здравите региите. Fujihashi(37) докажал дека гингивалните моноцити од региите зафатени со пародонтопатија продуцираат IL4 IL5 но не и IL2. Интересна е и студијата на Gemmel(40) кој со помош на интрацитоплазматска имунофлуоресцентна техника го детектирале присуството на IL2 и IL4 позитивни клетки во пародонталното ткиво веднаш по екстракција и по стимулација со *P gingivalis* и *F nucleatum*. Веднаш по екстракцијата не се најдени IL2 и IL4 позитивни клетки во пародонталното ткиво. По стимулација со споменатите бактерии по истекот на 1 ден IL4 позитивните клетки покажале пораст, додека првите IL2 позитивните клетки биле забележани по истек на третиот ден. Авторот укажува на можноста да здружената инфекција на овие периопатогени бактерии предизвикува Th2 клеточна профил. Студиите од понов датум потврдуваат отсуство на mRNA за IL2 како и за IL4 во гингивалните моноклеарни клетки (36). Тешко може да се објасни отсуството на IL2 во самото ткиво, за кое известуваат поедини автори, поготово ако се согледаат и следните наоди. IL2 е најден како во гингивалниот флуид кај регии со пародонтална афекција (31), така и во серумот на пациенти со пародонтопатија (80). Нестимулираните лимфоцити изолирани од хронични инфламирана гингива продуцираат IL2 (123) во *in vitro* услови. Исто така IL2 се продуцира и по стимулација на гингивалните моноцити со периопатогени бактерии (78). Активните фази на адултната пародонтопатија се поврзани во најголем дел со В клеточна инфилтрација од кои некаде и над 50% се плазма клетки (97, 124, 123). Улогата на IL2 во В клеточната регулација е повеќе од потврдена со тоа што учествува во диференцијацијата на активирани В клетки во Ig секреторни клетки (82). Понатаму поликлоналните активатори на В клетките кои потекнуваат од денталниот плак

(липополисахаридите, лецитини, гликокортикоиди, наелектризираните карбохидрати и самите бактерии) ја искажуваат својата активност во присуство на IL2 и IL6(108). Отсуството на IL2 кое го утврдило поедини автори го прави тешко прифатлив фактот за доминација на В клетките во активните пародонтални лезии.

Директна поткрепа на нашиот наод за зголемено присуство на IL2 во ткивата кои одговараат различен губиток на атачмент како и на различно изразена гингивална рецесија даваат и поновите наоди на Prabhu(108), кој нашол експресија на mRNA за IL2 и кај здрави и кај заболени ткива.

Коефициентите на корелација не покажаа никаква поврзаност на IL2 со апоптозата ниту со експресијата на bcl2 или p53.

Во сите исечоци и од здраво ткиво и од заболено ткиво најдовме присуство на IL12 со тоа што вредностите во заболени ткива беа сигнификантно повисоки од здравите, меѓутоа со напредувањето на губиток на атачментот, како и напредувањето на гингивалната рецесија покажаа опаѓање на вредностите. Поткрепа на нашите наоди најдовме во единствената достапна студија за присуството на IL12 согледана со прогресијата на пародонтопатијата (32) каде како и во нашите резултати IL12 бележи пад напореден со губитокот на атачментот. Студии за поврзаноста на IL12 и гингивалната рецесија според нашето пребарување досега не се правени. Меѓутоа достапни се голем број на студии каде е најдена експресија на mRNA за IL12 во гингивалните моноците од хронично инфламирана гингива кои исто така даваат потврда на нашиот наод. Наодот за намалување на вредностите на IL12 напоредно со прогресијата на пародонталната лезија ја поткрепуваат тезата за поврзаноста на преминација на Th2 клеточниот профил со прогресијата на пародонтопатијата и ја отвораат можноста за одредена регулаторна улога на IL12 во ваквите настани. Намалените концентрации на IL12 во региите со најголем губиток на атачмент и најмногу изразена гингивална рецесија возможно е да го оневозможуваат преминот во Th1 клеточна доминација на лезијата.

Детекцијата на одредени цитокини ја превзедовме од неколку причини. Пред се наодите од *in vitro* изведените студии укажуваат на молекуларната регулација на апоптозата со тоа што во отсуство на одредени цитокини различни клетки подlegнуваат на апоптоза (75, 76, 77). Генерално земено според досегашните сознанија изложеноста на проинфламаторните цитокини се поврзува со експресија на *bcl2* (22) и одложување на апоптозата, додека *IL4*, *transforming growth factor beta* се поврзани со зголемена експресија на *p53* и проапоптотични дејства (77). Голем број на *ex vivo* студии покажуваат дека гингивалните моноцити покажуваат експресија и на цитокини кои ја превенираат апоптозата како и на антиинфламаторни цитокини кои ја промовираат апоптозата што укажува на постоење на суптилно регулирана цитокина мрежа чиј баланс може или да ја промовира или да ја инхибира апоптозата (143). Сите досегашни испитувања се однесуваат на клетките од инфламаторниот инфилтрат каде превенцијата на апоптозата значи и подолго задржување на инфламаторните клетки во ткивото што допринесува за хроничитетот на инфламацијата. Меѓутоа нашето испитување беше насочено кон епителните клетки, кои исто така покажуваат способност за продукција и чувствителност кон голем број на цитокини (134). Испитувања за влијанието на цитокините врз апоптозата на епителните клетки досега не се правени. Наодите покажаа влијание само на *IL1 α* и *IL1 β* врз апоптозата на епителните клетки, додека за сите останати испитувани цитокини ваквата корелација отсуствуваше. Ниеден од испитуваните цитокини не покажа корелација ниту со експресијата на *bcl2* ниту со експресијата на *p53*. Секако останува фактот дека апоптозата на епителните клетки во тек на пародонтоопатијата е предизвикана и со директното дејство на периопатогените бактерии како и нивните метаболни продукти. Испитувањето на поедини цитокини за нас имаше и поинакво значење.

Пред се познавањето на цитокините и нивното учество во пародонталната болест се делумно разбрани.

Брзиот прогрес во осознавање и разбирањето на цитокините изгледа дека го поместија разбирањето на патогенезата на

пародонтопатијата, од претходно дефинирана како дисрегулација на имунолошкиот систем во сега се почесто разгледувана како високо функционален и координиран механизам на ампутација на сврзното ткиво со една единствена цел да се спречи системска инфекција (41). Гледајќи ги збиднувањата од поширока перспектива, зачувувањето на животот е немерливо позначајно од зачувувањето на дентицијата. Губитокот на коската е спор и така дизајниран да ја одржи дентицијата до крајот на човековиот живот, кој до пред 200 години изнесувал просечно 35 до 40 год. Продолжувањето на човековиот животен век и потребата од подолготрајно зачувување на забите ја наметнаа потребата од подобро разбирање на улогата на имуниот систем и неговата улога во тек на пародонтопатијата како и други феномени кои се помалку испитани како апоптозата, пред се со цел да се изнајдат прецизни дијагностички методи кои ќе ја одредат активноста на болеста како и стратегии на терапија кои ќе бидат засновани на разбирањето за индивидуалната суспектибилност кон болеста.

6. ЗАКЛУЧОЦИ

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

- **За присуството на апоптозата во различни стадиуми и форми на пародонтопатијата:**

- 1 Апоптотични клетки беа најдени во здрава гингива со просечна застапеност од 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 и бројот на апоптотичните клетки во здравата гингива.
- 3 Во однос на различно изразената гингивална рецесија, бројот на апоптотични клетки покажа статистичка сигнификантност само за вредност на рецесијата од 2-5мм.
- 4 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.
- 5 Најдена е силна позитивна корелација помеѓу бројот на апоптотичните клетки и степенот на инфламација.
- 6 Постои статистичка сигнификантна разлика во квантумот на апоптоза во гингивално ткиво кај апикална миграција на припојниот епител поголема и еднаква на 6мм кога постои различен степен на гингивална рецесија, компарирано со пародонтална лезија каде повторно апикалната миграција на припојниот епител поголема или еднаква на 6мм, меѓутоа отсаствува рецесија за $p=0,0000$.

- 7 Нашите наоди посочуваат дека динамиката на апоптозата првенствено е поврзана со изразеноста на инфламацијата во ткивото. Поголемата апоптоза учествува во губитокот на атачмент, додека ваквото влијание за настанокот и прогресијата на рецесијата не беше потврдено.

- **Во однос на модулаторите на апоптозата**

- 1 Експресијата на клетките за Bcl2 и p53 беше потврдено во здрава гингива.
- 2 bcl2 покажа највисока вредност во ткивото кое одговара на губиток на атачмент до 3мм и инфламација од прв степен, остварувајќи сигнификантност во разликите во однос на здравото ткиво.
- 3 p53 покажа најголема вредност во гингивата која одговара на апикална миграција на епителот над 6мм и прогресивен раст со зголемување на степенот на инфламацијата.
- 4 bcl2 покажа статистички сигнификантна негативна корелација како во однос на апикалната миграција на припојниот епител така и во однос на рецесијата на гингивата.
- 5 Bcl2 покажа силно изразена негативна корелација во однос на апоптозата што ни овозможува да го вброиме во значајните фактори на инхибиција на апоптозата која се одвива за време на пародонтопатијата.

- **Во однос на цитокините**

- 1 IL1 α и IL1 β како и IL2 покажаа сигнификантен пораст напоредно со зголемувањето на апикалната миграција на припојниот епител, како и со напредувањето на рецесијата и тоа: за IL1 α за изразеност на рецесијата од 2 до 5мм, додека во останатите стадиуми иако се забележуваше пораст изостана сигнификантност во разликите, за IL1 β и покрај забележливиот пораст,

сигнификантност се доби само за изразеност на рецесијата од 2 до 5мм, во однос на инфламацијата сите споменати параметри покажаа сигнификантно зголемување напоредно со зголемување на инфламацијата.

- 2 IL12 покажа сигнификантно опаѓање со напредување на апикалната миграција на припојниот епител, додека сигнификантни разлики на вредностите беа најдени само за гингивалната рецесија над 5мм.
- 3 Анализата на варијабилитетот покажа сигнификантност за IL6 во групата на пациенти со различно изразен губиток на атачмент и за IL1 β за групата на пациенти со различно изразена рецесија на гингивата. Посочувајќи на најизразените амплитуди во нивоата на овие два цитокини во тек на пародонтопатијата.
- 4 Коефициентите на корелација покажаа сигнификантна корелација помеѓу IL2 и изразеноста на гингивалната рецесија.
- 5 Ниеден од испитуваните цитокини не покажа зависност со експресијата на bcl2 ниту пак со експресијата на p53.

Од сите изведени досегашни заклучоци во можност сме да понудиме генерален заклучок:

Интензивирањето на инфламаторните промени во гингивално-ткивниот супстрат доведуваат до зголемена продукција на цитокини, намалување на експресијата на bcl2 и промоција на апоптотичното одумирање на клетките, кои случувања несомнено даваат свој придонес во продлабочување на апикалната миграција на припојниот епител и деструкција на пародонталите ткива. За разлика од нив зад атрофичните промени на гингивата кои клинички ги регистрираме како рецесија на гингивата, покрај учеството на сите споменати компоненти кои и ги најдовме во примероците сепак се одвиваат и некои други збиднувања кои здружени со споменатите доведуваат до клиничка манифестација на гингивалната рецесија.

сигнификантност се доби само за изразеност на рецесијата од 2 до 5мм, во однос на инфламацијата сите споменати параметри покажаа сигнификантно зголемување напоредно со зголемување на инфламацијата.

- 2 IL12 покажа сигнификантно опаѓање со напредување на апикалната миграција на припојниот епител, додека сигнификантни разлики на вредностите беа најдени само за гингивалната рецесија над 5мм.
- 3 Анализата на варијабилитетот покажа сигнификантност за IL6 во групата на пациенти со различно изразен губиток на атачмент и за IL1 β за групата на пациенти со различно изразена рецесија на гингивата. Посочувајќи на најизразените амплитуди во нивоата на овие два цитокини во тек на пародонтопатијата.
- 4 Коефициентите на корелација покажаа сигнификантна корелација помеѓу IL2 и изразеноста на гингивалната рецесија.
- 5 Ниеден од испитуваните цитокини не покажа зависност со експресијата на bcl2 ниту пак со експресијата на p53.

Од сите изведени досегашни заклучоци во можност сме да понудиме **генерален заклучок:**

Интензивирањето на инфламаторните промени во гингивално-ткивниот супстрат доведуваат до зголемена продукција на цитокини, намалување на експресијата на bcl2 и промоција на апоптотичното одумирање на клетките, кои случувања несомнено даваат свој придонес во продлабочување на апикалната миграција на припојниот епител и деструкција на пародонталите ткива. За разлика од нив зад атрофичните промени на гингивата кои клинички ги регистрираме како рецесија на гингивата, покрај учеството на сите споменати компоненти кои и ги најдовме во примероците сепак се одвиваат и некои други збиднувања кои здружени со споменатите доведуваат до клиничка манифестација на гингивалната рецесија.

ЛИТЕРАТУРА

1. Agarwal S, Chandra C, Piesco P, Langkamp H, Bowen L, Baran L
Regulation of Periodontal Ligament Cell Functions by Interleukin-1 β
Infect Immun, March 1998: 66: 932-937
2. Aliprantis A, Yang R, Weiss D, Godowski P, Zychlinsky A.
The apoptotic signaling pathway activated by Toll-like receptor-2
The EMBO Journal, 2000: 19-13: 3325-3336
3. Alison M R, Sarraf C E.
Apoptosis: A gene directed program of cell death
J. of Royal Colleg. Of Physicians London 1992: 26-1: 25-35
4. Ameisen J C.
The origin of programmed cell death
Science 1996: 272: 1278-79
5. American Academy of Periodontology
Proceedings of the World Workshop in Clinical Periodontics
Chicago the American Academy of Periodontology 1989: 1: 123-1/24
6. Arceo N, Sauk J J, Moehring J, Foster R A, Somerman J M.
Human periodontal cells initiate mineral like nodules in vitro
J. Periodontal Res. 1991: 62: 499-503
7. Arends M J, Moris R Q, Wyllie A H.
Apoptosis: The role of the endonuclease
Am. J. Pathol. 1990: 136: 593-608
8. Balto K, Sasaki H, Stashenko F.
Interleukin-6 Deficiency Increases Inflammatory Bone Destruction
Infection and Immunity. 2001: 69: 744-750
9. Baqui A, Meiller T, Chon J, Turng B, Falkler A Jr.
Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor Amplification of
Interleukin-1 β and Tumor Necrosis Factor Alpha Production in THP-1
Human Monocytic Cells Stimulated with Lipopolysaccharide of Oral
Microorganisms
Clin. and Diagnos Lab. Immunol. 1998: 341-347
10. Barres B A, Hart I K, Coles H S R.
Cell death and control of cell survival in the oligodendrocyte lineage
Cell 1992: 70: 31-46
11. Birkedal-Hansen H.
Role of cytokines and inflammatory mediators in tissue destruction
J. Periodont. Res. 1993: 28: 500-510

12. Boissell H, Gonzalezgarica M, Postema C E, Ding L Y, Lindsten T, Turks L A, Mao X N, Nunez G, Thompson C B.
Bclx, a bcl2 related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death.
Cell 1993; 74: 597-608
13. Burridge K K, Fath T, Kelly G, Turner N.
Focal adhesions and transmembrane junction between the extracellular matrix and the cytoskeleton
Ann. Rev. Cell Biol. 1988; 4: 487-525
14. Carlsson J, Larsen J T, Edlund E D.
Utilization of glutation by fusobacterium nucleatum
Oral Microbiology and Immunology 1993; 9: 297-300
15. Carro O M, Evans S A, Leone C W.
Effect of inflammation on the proliferation of human gingival epithelial cells in vitro.
J. Periodontol. 1997; 68: 1070-5
16. Casicola - Rozen L, Nicolson D W, Chong T, Rowan K R, Thornberry N A, Miller D K, Rosen A .
Apoptain /CPP32 cleaves proteins that are essential for cellular repair . A fundamental principle for cell death
J. Exp. Med. 1996; 183: 1957-64
17. Chapple I L C.
Reactive oxygen species and antioxidants in inflammatory periodontal disease
J. Clin. Periodontol. 1997; 24: 287-296
18. Clarke P G.
Developmental cell death: Morphological diversity and multiple mechanisms
Ann. Embriol. 1990; 181: 195-213
19. Cohen J J, Duke R C.
Glucocorticoid activation of a calcium dependent endonuclease in thymic nuclei leads to cell death
J. Immunol. 1984; 132: 38-42
20. Cohen J J.
Apoptosis
Immunol. Today . 1993; 14: 126-30
21. Collinsa A J, Cynthia A, Scandala A, Kristy K, Younga K, Veselya J.
Major DNA fragmentation is a late event in apoptosis
J. of Histochemistry and Cytochemistry. 1997; 45: 1547-1558

22. Colotta F, Re F, Polentarutti N, Sozzani S, Mantovani A
Modulation of granulocyte survival and programmed cell death by
cytokines and bacterial products.
Blood 1992; 80: 2012-2020
23. Corteze J .
Death watch : Cytotoxicity detection
The scientist 2001: 15 (5): 26
24. Crompton M, Costi A, Hyatt L.
Evidence for the presence of reversible Ca^{2+} dependent pore
activated by oxidative stress in heart mitochondria
Biochemical Journal 1987: 245: 915-918
25. Dawkins R.
The selfish gene
Oxford university press 1976
26. Dekker N P, Lozada Nur F, Lagenaur L A, et. al.
Apoptosis associated markers in oral lichen planus
J. Oral Pathol. Med. 1997: 26: 170-5
27. Dinarello A, Wolff S.
The Role of Interleukin-1 in Disease
The New England Journal of Medicine 1993:328:106-113
28. Dirjanska K.
Klinicko -biohemiska detekcija na inicijalnata parodontalna lezija
Magistarski trud Skopje 2002
29. Duke R C, Cohen J J.
IL₂ addiction: Withdrawal of growth factor activates a suicidal
program in dependent T cells
Lymphokine Res. 1986: 5: 284-294
30. Duvall E, Wyllie A H.
Death and the cell
Immunol. Today 1986: 7: 115-19
31. Ebersole J L, Singer R E, Steffensen B.
Inflammatory mediators and immunoglobulins in GCF from heathy
gingivitis and periodontitis sites
J. Periodontol.Res. 1993: 28: 543- 546
32. Ellis S D, Tucci M A, Serio F G.
Factors for progression of periodontal disease
J. Oral. Pathol. Med. 1998: 27: 101-5

33. Feldner B D, Reinhardt R A, Garbin C P.
Histological evaluation of IL1 beta and collagen in gingival tissue from untreated adult periodontitis
J.Periodontol.Res. 1994: 29: 54-61
34. Fraser A, Evan G.
A licence to kill
Cell 1996: 85: 781-84
35. Frisch S M, Francis H.
Disruption of epithelial cell matrix induces apoptosis
J.Cell Biol. 1994: 124: 619-626
36. Fujihashi K, Kono Y, Yamamoto M.
Interleukin production by gingival mononuclear cells isolated from adult chronic periodontitis
J.Dent.Res. 1991: 70: 550
37. Fujihashi K.
Molecular pathogenesis of periodontal disease
A S M,Washington DC 135-145
38. 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
39. Gemmell E, Seymour G J.
Interleukin 1, interleukin 6 and transforming growth factor-beta production by human gingival mononuclear cells following stimulation with *Porphyromonas gingivalis* and *Fusobacterium nucleatum*.
J. Periodontal Res. 1993: 28:122-129.
40. Gemmell E, Marshall R I, Seymor G I.
Cytokines and prostaglandines in immune homeostasis and tissue destruction in periodontal disease
Periodontology 2000:1997: 14:112-43
41. Genco R J.
Host responses in periodontal diseases: current concepts.
J. Periodontol. 1992: 63: 338-355
42. Giavelis M, Turner D W, Pederson E D.
Meassurments of IL6 in gingival cervical fluid from adults withdestructive periodontal disease
J. Periodontal . 1993: 64: 980-3
43. Gowen M D, Wood D, Ihrie D J, McGuire M K, Russel R G.
An interleukin-1 like factor stimulates bone resorption in vitro.
Nature 1983: 306: 378-380

44. Graeber T G, Peterson J F, Tsai M, Monica K, Fornace Jr, Giaccia A J.
Hypoxia induces accumulation of p53 protein, but activation of G1
phase check point is independent of p53 status
Mol. Cell Biol. 1994;14: 6264-77
45. Green D, Kroemer G.
The central executioners of apoptosis : caspases or mitochondria?
Trends in Cell Biol. 1988: 8: 267-271
46. Greenspan J S. (ed.)
Oral diseases,
8th ed. Appleton and Lange 1994: 8th ed. Norwalk, Conn.
47. Hadlar S, Negrini M, Moone M, Sabbioni S, Crole C M.
Down-regulation of bcl2 by p53 in breast cancer cells
Cancer Res 1994: 54: 2095-2097
48. Haimovitz -Friedman A, Kan C C, Ehleiter D, Persaud R S, McLoughlin
M, Fuks Z, Kolesnick R N.
Ionizing radiation acts on cellular membrane to generate ceramide
and initiate apoptosis
J Exp. Med. 1994;180: 525-35
49. Hannun Ya , Obeid L M, Wolff R A
The novel second messenger ceramide: identification, mechanism
of action and cellular activity.
Adv Lipid Res. 1993: 25: 43-63
50. Harris C C .
p53 the tumor suppressor gene :From the basic research laboratory
to the clinic.
Carcinogenesis 1996;17: 1187-98
51. Hengartner M O.
Life and death decisions: Ced 9 and programmed cell death in C.
elegans
Science 1995: 217: 931
52. Hillmann G, Hillmann B, Gartsen W.
Immunohistological determination IL₁ beta in inflamed human
gingival epithelium
Arch. Oral Biol. 1995: 40: 353-9
53. Hockenberry D M, Nunez G, Millman C, Schreiber R, Korsmeyer S.
Bcl2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks
programmed cell death.
Nature 1990: 348: 334-336

54. Hou L T, Lui C M, Rossomondo E F.
Cervical interleukin-1 beta in moderate and severe preiodontitis patients and the effect phase I periodontal treatment
J. Clin. Periodontol.1995: 22: 162-7
55. Hynes R O.
Integrins , versality , modulation and signaling in cell adhesion
Cell 1992: 69:11-25
56. Ichas, Jonavil L, Mazart J R.
Mitochondria are excitable organeles capable of generating and conveying electrical na calcium signals
Cell 1997: 89: 1145-1153
57. Iitaka M, Kitahama S, Ishii J.
Involvement of protein kinase A and C in the production of interleukin-1 β -induced prostaglandin E2 from mouse osteoblast-like cell line, MC3T3-E1.
Biochim. Biophys. Acta. 1994: 1221: 78-82
58. Jardinski J J, Stashenko P, Feder L S.
Localization of IL1beta in human periodonatal tissue
J . Periodontol .1991: 62: 36-43
59. Jarnbring F, Somogyi E, Dalton J, Gustafsson A, Klinge B.
Quantitative assessment of apoptotic and proliferative gingival keratinocytes in oral and sulcular epithelium in patients with gingivitis and periodontitis.
J Clin Periodontol. 2002: 29: 1065-71
60. Jordan R C K, Catzavelos G C, Barret A V, Speight P M.
Differential expression of bcl2 and bax in squamouse cell carcinoma of the oral cavity
Eur J Cancer.B. Oral. Oncol. 1996: 32B: 394-400
61. Kato S, Nakashima K, Inoue M, Tomioka J, Nonaka K, Nishihara T, Kowashi Y.
Human epithelial cell death caused by Actinobacillus actinomycetemcomitans infection.
J .Med. Microbiol. 2000 : 49: 739-45
62. 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
63. Kerr J F R.
Shrinkage necrosis: a distinct mode of cellular death
J. Pathol. 1971: 105: 13-20

64. 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
65. Krajewski S, Krajewska M, Shabiak A.
Immunohistochemical analysis of in-vivo patterns of BCL_x
expression.
Cancer Res. 1994: 54: 5501-7
66. Krajewski S, Tanaka S, Takayama S, Schibler M, Fenton W, Reed J C.
Investigation of the subcellular distribution of the bcl2
oncoprotein; residence in the nuclear envelope, endoplasmic
reticulum, and outer mitochondrial membranes.
Cancer Res. 1993: 53: 4701-4714
67. Krisanaprakornkit S, Kimball J R, Weinberg A, Darveau R, Bainbridge
B, Dale A.
Inducible Expression of Human β -Defensin 2 by *Fusobacterium*
nucleatum in Oral Epithelial Cells: Multiple Signaling Pathways and
Role of Commensal Bacteria in Innate Immunity and the Epithelial
Barrier
Infection and Immunity, 2000: 68: 2907-2915
68. Kulkarni G V, McCulloch C A.
Serum deprivation induces apoptotic cell death in fibroblasts
J. Cell Sci. 1994: 107: 1169-1179
69. Lane D, Lu X, Hupp T, Hall P.
The role of p53 protein in the apoptotic response
Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 1994: 345: 277-280
70. Laurie G W, Leblond G P, Martin G R.
Localization of type IV collagen, lamin, and fibronectin to the basal
lamina of basement membranes
J. Cell. Biol. 1982: 95: 340-4
71. Lin T H, Rosales K, Moudal J B, Polen S, Haskili L, Juliano R L.
Integrin mediated phosphorylation and cytokine message induction
in monocytic cells: a possible role for tyrosine kinase
J. Biol. Chem. 1995: 270: 16189-16197
72. Lockshin R A.
Program cell death in an insect
Doctorial dissertation, Harvard University Department of Biology 1963
73. Lockshin R A, Williams C M.
Cytology of degeneration in the intersegmental muscles of the silk
moth
J. Insect Physiology 1965: 11: 123-33

74. Lockshin R A, Zakeri Z, Tilly J.
When cells die
Wiley-Liss. New York 1998
75. Mangan D, Welch D, Wahl S.
Lipopolysaccharide, tumor necrosis factor alpha and IL-1 beta
prevent programmed cell death (apoptosis) in human peripheral
blood monocytes.
J. Immunol. 1991; 146: 1541-1546
76. Mangan D, Taichman N S, Lally ET, Wahl S M.
Lethal effects of Actinobacillus Actinomicetecomitans leucotoxin on
human T-ly.
Infect. Immunol. 1991; 59 (9): 3267-72
77. Mangan D, Robertson B, Wahl D.
IL-4 enhances programmed cell death (apoptosis) in stimulated
human monocytes.
J. Immunol. 1992; 148: 1812-1816
78. Manhart S S, Reinhardt R A, Payne J B.
Gingival cell IL2 and IL4 in early onset periodontitis
J. Periodontol 1994; 65: 807-813
79. Margulis L.
Symbiosis in cell evolution
New York: W.H. Freeman 1981
80. McFarlane C C, Meikle M C.
IL2 and IL4 are elevated in sera in patients with periodontal disease
J. Periodontol Res. 1991; 26: 402-8
81. McGill G, Shimamura A, Bates R, Savage R, Fisher D.
Loss of matrix adhesion triggers rapid transformation-selective
apoptosis in fibroblasts
J Cell Biol. 1997; 138-4: 901- 911
82. Minami Y, Kono T, Miyazaki T.
The IL2 receptor complex Its structure function and target genes
Ann Rev Immunol 1993 : 11: 245-268
83. Minn A J, et al.
Bcl xl forms an ion channel in synthetic lipid membranes
Nature 1997; 385: 353-357
84. Miyamoto S, Teramoto O, Silvio G, Burbello P.
Integrin function : molecular hierarchies of cytoskeletal and signaling
molecules
J. Cell Biol. 1995; 131: 791-805

85. Miyashita T, Krajewski S, Krajewska M, Wang Hg, Lin H K, Liebermann D A, Hoffman B, Reed J C.
Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl2 and bax gene expression in vivo and in vitro
Oncogene 1994; 9: 1799-1805
86. Mochan E, Armor L, Sporer R.
Interleukin-1 stimulation of plasminogen activator production in cultured gingival fibroblasts.
J. Periodontal Res.1988; 23: 28-32.
87. Moore S, Cadler K A, Miller N J.
Antioxidant activity of saliva and periodontal disease
Free Radical Res. 1994; 21: 6 417-25
88. Morris R G, Hargreaves A B, Duvall E, Wyllie A H.
Hormone induced cell death surface changes in thymocytes undergoing apoptosis
Am. J. Pathol. 1984; 115: 426-36
89. Moughal N A E, Adonogianaki M H, Thornhill.
Endothelial leucocyte adhesion molecule1(ELAM-1)and intercellular adhesion molecule-1(ICAM-1)expression in human gingival tissue during health and experimentally induced gingivitis .
J. Periodontol. Res. 27: 623-630
90. Muraki Y, Yoshioka C, Fukada J, Hanejit Kobayashi N.
Immunohistochemical detection of Fas antigen in oral epithelia
J. Oral. Pathol. Med. 1997; 26: 57-62
91. Nguyen M, Millar D G, Young V W, Krosmeier S J, Shore G C.
Targeting of bcl2to the mitochondrial outer membrane by a COOH – terminal signal anchore sequence
J. Biol. Chem 1993; 268: 25265-25268
92. Nixon C, Steffen M, Ebersole J.
Cytokine response to Treponema denticola and Treponema pectinovorum in human gingival fibroblasts
Infect and Immunity 2000; 68(9): 5284-5292
93. Noack B, Genco R J, Trevisan M, Grossi S, Zambon J J, De Nardin E.
Periodontal infections contribute to elevated systemic C-reactive protein level
J. Periodontal 2001; 72(9): 1221-7
94. Obeid L M, Linardic C M, Karolak L A, Hannun Y A.
Programed cell death induced by ceramide
Science 1993; 259: 1769-71

95. Oclan M, Goodman S L, Kuhl U, Hauschka S D.
Lamin alters cell shape and stimulates motility and proliferation of murine skeletal myoblasts
Develop. Biol. 1988; 125: 158-167
96. Offenbacher S.
Periodontal disease :pathogenesis
Ann Periodontal 1996; 1: 821-878
97. Okada H, Kida T, Yamagami H.
Identification and distribution of immunocompetent cells in inflamed gingiva of human periodontitis
Infect Immun. 1983; 41: 365-374
98. Okazaki T, Bielawska A, Haunn Ya.
Srhingomielin turn over induced by vit D 3
J. Biol Chem. 1989; 264: 19076-80
99. Oltavi Z N, Krosmayer S J.
Chekpoints of duelling dimers foil death wishes
Cell 1994; 791: 184-192
100. Ozaki K, Hanazawa S, Takeshita A, Chen Y, Watanabe A, Nishida K, Miyata Y, Kitano S.
Interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α stimulate synergistically the expression of monocyte chemoattractant protein-1 in fibroblastic cells derived from human periodontal ligament
Oral Microbiol. Immunol. 1996; 11: 109-114
101. Page R C, Schroeder H.
Periodontitis in man and other animals .A comparative review
1982 S. Krager, Basel, Switzerland
102. 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
103. Pederson E D, Stanke S R, Whitner S J, Sebastiani P T, Lamberts B L, Turner D W.
Salivary levels of Alpha 2 macroglobuline, Alpha 2antitrypsin, C-reaktive protein, cateprin G, elastase in humans with and without destructive periodontal disease
Arch. Oral. Biol. 1995; 40: 1151-5
104. Piacentini M, Autoriti F, Dini L.
Tissue transglutaminaze is specifically expressed in neonatal rat liver cells undergoing apoptosis upon epidermal growth factor stimulation
Cell Tissue Res. 1991; 263: 227-35

105. Pilon M, Williams-Miller C, Cox D S.
IL2 levels in gingival cervical fluid in periodontitis
J.Dent. Res. 1991: 70: 550
106. Popovska L.
Hronicni periapikalni leziji vo relacija so endodontski status na
zabite
Doktorska disertacija, Skopje 2002
107. Pushkareva M, Obeid L M, Huann Ya.
Ceramide : an endogenous regulator of apoptosis and growth
supresion
Immunol Today 1995: 16: 294- 97
108. Prabhu A, Michalowicz B, Mathur A.
Detection of local and systemic cytokines in adult periodontitis
J. Periodontol 1996: 67: 515-527
109. Pruiju F B, Bast A.
Effects of free radicals on hormonally regulated calcium homeostasis
in rat liver hepatocytes
Advances in Bioscience 1987: 76: 83-97
110. Raabe H, Sigusch B W, Pfitaner A, Vogelsang H, Klinger G, Glockman
E.
Apoptosis of CF-PMNL's by aggressive periodontitis patients
Proceedings of the Convenrtion of the American Academy of
Periodontology San Diego 2002 sec Apoptosis (270) 2992
111. Raff M C.
Social controls on cell survival and cell death
Nature 1992: 356: 397-400
112. Ramfjord S P.
Indices for prevalence and indices for periodontal disease
J. Periodontal 1959: 30: 51
113. Reed J C.
Bcl2 and the regulation of programmed cell death
J. Cell Biol. 1994: 124: 1-6
114. Reinhardt R A, Masada M P, Johnson G K.
Gingival fluid levels of IL1 and IL6 in refractory periodontitis
J.Clin.Periodontal. 1993: 20: 225-231
115. Roit I, Brostoff J, Male D.
Immunology
Mosby 1998: 4 th Edition 1.2- 1.6

116. Rozen A.
New marker along the road to death
Nature Genet 1996: 13: 380-82
117. Ruosalahti E.
Integrins
J. Clin. Invest. 1991: 87: 1-5
118. Sajama K, Yonehara S, Watanabe Y, Miki Y.
Expression of Fas antigen of keratinocytes in-vivo and induction of apoptosis in cultured keratinocytes
J. Invest. Dermatol. 1994: 103: 330-4
119. Savill J, Fadoc V, Henson P, Haslett C.
Phagocyte recognition of cells undergoing apoptosis
Immunol. Today 1993: 14: 131-6
120. Savill J.
Apoptosis and the kidney
J. Am. Soc. Nephrol. 1994: 5: 12-21
121. 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
122. Schwartz L M, Osborne B A.
Programed cell death, apoptosis and killer genes
Immunol. Today 1993: 14: 582-90
123. Seymore G J, Cole K L, Poweel R N, Lewins E.
IL2 production and bone resorption activity by unstimulated lymphocytes extracted from chronically inflamed human periodontal tissue
Arch Oral. Biol. 1985: 30: 481-4
124. Seymore G J, Greenspan J S.
The phenotypic characterization of lymphocyte subpopulations in established human periodontal disease
J. Periodontol. Res 1993: 28: 543-6
125. Shapira L, Van Dyke T E, Hart T C.
A localized absence of interleukin-4 triggers periodontal activity-a novel hypothesis
Med. Hypotheses 1992: 39: 319-22

126. Slootweg P J, De Veger R A.
Immunohistochemical demonstration of BCL₂ protein in human tooth germs
Arch. Oral. Biol. 1994; 39: 545-50
127. Smith M A, Braswell L D, Collins J G.
Changes in inflammatory mediators in experimental periodontitis in the rhesus monkey
Infection and Immunity, 1993; 61: 1453-1459
128. Sorkin B C, Niederman R.
Short chain carboxyl acids decreases human gingival proliferation and increases apoptosis and necrosis
J. Clin. Periodontol. 1998; 25: 311-315
129. Stashenko P, Fujiyoshi P, Obernesser M S.
Tissue levels of IL1 beta in tissue from sites of active periodontal disease
J. Clin. Periodontol. 1991; 18: 548-554
130. Stavrevska A, Pandilova M.
Apoptosis as a morphological type of cell death in correlation to some tissue events occurring during periodontal disease
Proceedings of the 4th Congress of Balkan Stomatological Society
1999: 200
131. Steffen M J, Holt S, Ebersole J.
Porphyromonas gingivalis induction and cytokine secretion by human gingival fibroblasts
Oral. Microbiol. Immunol 2000; 67: 1450-1454
132. Sttelar H.
Mechanisms and genes of cellular suicide
Science 1995; 267: 1445-8
133. Takahashi H, Takigawa M, Takashiba S.
Role of cytokine in the induction of adhesion molecules on cultured human gingival fibroblasts
J. Periodontol. 1994; 65: 230-5
134. Tonetti M.
Molecular factors associated with compartmentalization of gingival immune responses and transepithelial neutrophil migration
J. Periodontal Res. 1997; 32: 104-109
135. 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

136. Tsujimoto Y, Cossman J, Jaffe K.
Involvement of the BCL₂ gene in human follicular lymphoma
Science 1985: 228: 1440-3
137. Trump B F, Berezesky I K.
Cellular and molecular pathobiology of reversible and irreversible injury
Tyson C A, Fraiser J M. (eds); Methods in Toxicology, San Diego
academic press 1994: 1: 1-22
138. Ucker D S.
Death by suicide: one way to go in mammalian cellular
development?
New Biol. 1991: 3: 103-9
139. Uemura J, Bautista R, Tafolla E, Shibutani T, Kapila Y.
Bcl-2, bak expression and DNA fragmentation in ligature-induced
periodontitis -induced periodontitis
Proceedings American Academy of Periodontology, San Diego 2002
sec Apoptosis (270) 2990
140. Vachon P H, Loechel F, Xu H, Wewer U M, Engval E.
Merosin and laminin in myogenesis ; specific regrutment for merosin
in myotube stability and survival
J.Cell Biol. 1996: 134: 1483-1497
141. Vander Heiden M, et al
Bcl xl regulates the membrane potential and volumen homeostasis
of mitochondria
Cell 1997: 91: 627-637
142. Vaux D L.
Towards an understanding of the molecular mechanisms of
physiological cell death
Proc. Natl. Acad. Sci USA 1993: 90: 786-9
143. Wahl S M, Costa G L, Mizel D E, Allen J B, Skaleric U, and Mangan
D F.
Role of transforming growth factor beta in the pathophysiology of
chronic inflammation.
J. Periodontol. 1993: 64: 450-455
144. Wang H G, Miyasita T, Takayama S, Sato T, Torigos T, Krajewski S,
Tanaka S, Hovey L, Troppmair J, Raap U R, Reed J C.
Apoptosis regulation by interaction of bcl protein and Raff kinase
Oncogene 1994: 9: 2751-2756

145. Weber R L, Iakono V J.
The cytokines: a review of interleukins
Periodont. Clin. Invest. 1997; 19: 17-22
146. Williams G T, Smith C A.
Molecular regulation of apoptosis: genetic controls on cell death
Cell 1993; 74: 777-9
147. Wilton J M, Bampton J L, Hurst T J.
IL1 beta and IgG subclasses concentration in CGF from patients with
adult periodontitis
Arch. Oral. Biol. 1993; 38: 55-60
148. Wolf B B.
Suicidal tendencies : apoptotic cell death by caspase family
proteinases
J. Biol Chemistry 1999; 274(29): 20049-52
149. Wrone-Smith T, Johnson T, Nebson B, et. al.
Discordant expression of BCL_x, BCL₂ by keratinocytes and psoriatic
keratinocytes
Am. J. Pathol. 1995; 146: 1077-88
150. Wyllie A H.
Glucocorticoid – induced thymocyte apoptosis is associated with
endogenous endonuclease activation
Nature 1980; 284: 555-6
151. Wyllie A H.
Cell death: a new classification separating apoptosis from necrosis
Cell Death in Biology and Pathology (Bowen and Lockshin)
Chapman and Hall London 1981: 9
152. Wyllie H A.
The genetic regulation of apoptosis
Current options in genetics and development 1995: 5:97-104
153. Yamazaki K, Nakajima T, Aoyagi T, Hara K.
Immunohistological analysis of memory T lymphocytes and activated
B lymphocytes in tissues with periodontal disease.
J. Periodont. Res 1993; 28: 324-334
154. Yamazaki K, Nakajima T, Gemmell E.
IL₄ and IL₆ producing cells in human periodontal disease tissue
J. Oral Pathol. Med. 1994; 23: 347-53
155. Yamamoto M, Kawabata K, et. al.
Absence of exogenous IL₄ induces apoptosis of gingival macrophages
may contribute to chronic inflammation in periodontal disease
Am. J. Pathol. 1996; 148: 331-9

156. Yavuzylmaz E, Yamalik N, Bulut S.
The gingival cervical fluid IL1beta and TNFalfa levels in patients with
rapidly progressive periodontitis
Aust.Dent.J 1995; 40: 46-9
157. Yin X M, Oltvai Z N, Korsmeyer S J.
BH1 and BH2 domains of bcl2 are required for inhibition of
apoptosis and heterodimerization with bax
Nature 1994; 396: 321-323
158. Yoshioka C, Muraki Y, Fukada J, Haneji T, Kobayashi N.
Identification of Fas antigen in human gingiva
J. Dent. Res. 1996; 75 (6): 1353-7
159. Yumoto H, Nakae N, Fujinaka K, Ebisu K, Matsuo T.
Interleukin-6 (IL-6) and IL-8 Are Induced in Human Oral Epithelial
Cells in Response to Exposure to Periodontopathic Eikenella
corrodens
Infection and Immunity, 1999; 67: 384-394