

УНИВЕРЗИТЕТ “СВ. КИРИЛ И МЕТОДИЈ”

СТОМАТОЛОШКИ ФАКУЛТЕТ - СКОПЈЕ

КАТЕДРА ЗА БОЛЕСТИ НА УСТАТА И ПАРОДОНТОТ

СТЕВИЦА РИСТОСКА

**ПРОЦЕНКА НА ВЛИЈАНИЕТО НА
МАТРИКСМЕТАЛОПРОТЕИНАЗИТЕ ВРЗ
ДЕСТРУКТИВНИТЕ ПРОЦЕСИ НА ТКИВАТА ВО ТЕК НА
ПАРОДОНТАЛНАТА БОЛЕСТ**

ДОКТОРСКА ДИСЕРТАЦИЈА

МЕНТОР: ПРОФ. Д-Р КИРО ИВАНОВСКИ

СКОПЈЕ, 2011

Ментор:

Проф. д-р Киро Ивановски, dr. sci
Стоматолошки факултет- Скопје

Членови на комисијата за одбрана:

Проф. д-р Марија Накова dr. sci

Проф. д-р Златанка Белазелкоска dr. sci

Проф. д-р Мирјана Поповска dr. sci

Проф. д-р Сашо Панов dr. sci

Проф. д-р Киро Ивановски dr. sci

Научна област: стоматологија, пародонтологија

Изразувам благодарност до.....

..... мојот ментор, Проф. д-р Киро Ивановски, за целосната поддршка, насочувањето, сугестиите и несебичното пренесување на своите знаења, неопходни за реализација на оваа докторска дисертација,

.....Проф. д-р Марија Накова, претседател на Рецензентската комисија, за интересот и разбирањето во текот на спроведувањето и изработката на овој труд,

..... Проф д-р Сашо Панов, од Институтот за молекуларна биологија при Природно-математичкиот факултет во Скопје, за соработката и помошта во изведувањето на лабораторискиот дел од студијата,

.....колегите од Клиниката за Орална хирургија, за соработката во текот на собирањето на материјалот,

.....моето семејство, моите најблиски, за трпението и поддршката до конечната реализација на овој труд.

Проценка на влијанието на матриксометалопротеиназите врз деструктивните процеси на ткивата во тек на пародонталната болест

АПСТРАКТ

Матрикс-металопротеиназите (matrix-metalloproteinases, MMP) претставуваат фамилија на протеолитички ензими продуцирани од различни типови на клетки, кои имаат способност да ги деградираат речиси сите екстрацелуларни матрикс компоненти и базалната мембрана. Оваа група протеази имаат значајна улога при ремоделирањето и растот на здравото ткиво, но учествуваат и во голем број на деструктивни патолошки процеси, пр. воспалението, артритисот, туморската инвазија и ширењето на метастазите.

Земајќи ги во предвид бројните литературни податоци и современите научни сознанија за улогата на MMP во тек на пародонталната болест, ги формиравме целите на оваа дисертација: квантитативно определување на ткивните нивоа на колагеназите (MMP-1,-8,-13) во здраво гингивално ткиво; определување на концентрацијата на колагеназите во инфламираното гингивално сврзано ткиво кај пациенти со хронична и агресивна форма на пародонталната болест; компарација на концентрациите на ткивните нивоа на MMP-1, -8 и -13, помеѓу здравото и патолошки променетото ткиво при различните форми на пародонтопатија; одредување на степенот на гингиво-пародонталната афекција проследена преку пародонталните индекси; како и детерминирање на корелацијата помеѓу концентрацијата на колагеназите со клиничките параметри.

За реализација на поставените цели на Клиниката за болести на устата и пародонтот беа проследени вкупно 90 пациенти од обата пола, кои беа поделени во 3 групи: првата група ја оформија 32 пациенти со умерена до силно изразена хронична пародонтопатија, со над 4мм. губиток на атечмент според критериумите предложени од AAP 1999. Втората група ја сочинуваа 28 здрави испитаници со просечна возраст <35 години) кај кои со клиничкиот преглед утврдивме губиток на атечмент >5мм во регијата на првите молари и инцизивите. Третата група ја формираа 30 здрави испитаници кај кои не утврдивме клинички и радиографски детектибилни знаци на пародонталната болест - контролна група.

За определување на концентрациите на трите типа на MMP, беше применет квантитативен ензимски метод, со комерцијалните сетови: SensoLyte MMP-1 ELISA Kit *Colorimetric*, SensoLyte MMP-8 ELISA Kit *Colorimetric*, SensoLyte MMP-13 ELISA Kit *Colorimetric* од фирмата AnaSpec, Inc. со помош на кои е овозможено брзо, сигурно и сензитивно определување на концентрациите на MMP-1, -8 и -13 во гингивалниот ткивен супстрат. Клинички беа проследени: *индексот на дентален плак - ИДП по Silness-Loe; индексот на гингивална инфламација - ИГИ по Loe-Silness, индексот на епителна апикална миграција - ЕАМ (губиток на атечмент), според AAP, 1999, Miller-Pelzer-ов индекс на коскена ресорпција. Добиените податоци од клиничките и лабораториските*

испитувања беа статистички обработени со помош на програмот Statistica 7, а користен е и Pearson-овиот коефициент на корелација.

Врз основа на поставените цели, добиените резултати од клиничките и лабораториските истражувања, како и нивната статистичката обработка дојдовме до одредени сопствени сознанија, кои ќе се обидеме да ги сублимираме во следниве заклучоци:

Концентрациите на MMP-1, MMP-8 и MMP-13 во инфламираните гингивални исечоци кај пациентите со хронична и агресивна пародонтопатија беа повисоки во однос на здравите испитаници и покажаа висока статистичка сигнификантност ($p=0,0001$). Разликите во однос на MMP-1 помеѓу двете испитувани групи (агресивна и хронична) не се значајни ($p=0,5751$). Концентрациите на MMP-8 кај испитаниците со хронична пародонтопатија беа значајно повисоки и во однос на оние со агресивна форма. Разликите во однос на MMP-13 не беа значајни помеѓу двете испитувани групи- агресивна и хронична ($p=0,8957$).

Утврдивме присуство на значајна, средно јака позитивна корелација помеѓу ИДП и испитуваните MMP-1, -8 и -13 кај пациентите со хронична пародонтопатија. Позитивна корелација, но со различен интензитет (многу јака со MMP-1, умерена со MMP-8 и слаба со MMP-13) утврдивме помеѓу овие параметри и кај испитаниците со агресивна пародонтопатија, што потврдува дека микроорганизмите од биофилмот и нивните продукти ги иницираат патолошките процеси во ткивата и продукцијата на колагеназите од страна на клетките на домаќинот.

Позитивна значајна, јака корелација постоеше помеѓу ИГИ и испитуваните колагенази MMP-1, MMP-8 и MMP-13 кај испитаниците со хронична и оние со агресивна форма на пародонтопатија. Тоа ги потврдува сознанијата дека со напредокот на инфламаторните процеси се зголемуваат и концентрациите на матриксметалопротеиназите.

Губитокот на атечментот и ресорпцијата на алвеоларната коска беа силно позитивно корелирани со концентрациите на испитуваните MMP кај испитаниците со хронична пародонтопатија. Кај оние со агресивна форма на заболувањето исто така утврдивме присуство на позитивна корелација помеѓу испитуваните параметри, но добиените вредности беа нешто поумерени,

Утврдените корелации помеѓу клиничките параметри (ИДП, ИГИ) и индексот на коскена ресорпција со испитуваните колагенази кај здравите испитаници без пародонтопатија (контролната група) беа многу слаби, незначителни. Експресивноста и активноста на MMP во здравото ткиво се сосема ниски и се наоѓаат под строга контрола на ткивните инхибитори на MMP (TIMP). Деградацијата и синтезата на компонентите од ECM во здравото ткиво се во постојан баланс.

Клучни зборови: пародонтална болест, дентален плак, инфламација, агресивна пародонтопатија, MMP, колагенази, коскена ресорпција, губиток на атечмент, ECM.

Estimation of the influence of matrix metalloproteinases over the destructive processes of the tissues during the periodontal disease

ABSTRACT

Matrix-metalloproteinase (MMPs) represent a family of proteolytic enzymes produced by different types of cells, which have the ability to degrade nearly all extracellular matrix components and the basal membrane. This group of proteases have a crucial role in remodelling and growth of the healthy tissue, as well as a part in several destructive pathological processes, such as inflammation, arthritis, tumour invasion and the spread of metastases. Taking into consideration the numerous literature data and modern scientific discoveries for the role of MMPs in the pathogenesis of the periodontal disease, we formed the aims of this study:

- Quantitative qualification of the tissue levels of the collagenase (MMPs -1,-8,-13) in healthy gingival tissue
- Determination of the concentration of the collagenase (MMPs -1,-8,-13) in the inflammatory gingival bounding tissue at patients with
 - aggressive periodontal disease, as well as
 - chronic form of the periodontal disease
- comparison of the concentration of the tissue levels of MMPs -1,-8,-13, between the healthy and pathologically changed tissue at different form of the disease
- to clinically determine the level of gingival-periodontal affection, followed by periodontal indexes
- to determine the correlation between the concentration of the collagenase (MMPs -1,-8,-13) with the clinical parameters.

To accomplish the set aims, the total of ninety patients from both sexes were followed, that were divided in three groups: The first group was formed by 32 patients, with moderate to strongly expressed form of the periodontal disease, with over 4mm loss of attachment, according to the criteria set by AAP 1999. The second group was made of 28 healthy patients, whose age varied from 20-45 (the average <35), at whom with the clinical check we established loss of attachment >5mm in the region of the first molars and incisors. With the anamnestic practice we defines the family genesis of the disease. The third group was formed by 30 healthy patients at which we did not find detectible clinical and radiographic sings of the periodontal disease – the control group.

For setting the concentrations of all three types of MMPs, quantitative enzyme method was used, with the commercial sets: SensoLyte MMPs-1 ELISA Kit *Colorimetic*, SensoLyte MMPs-8 ELISA Kit *Colorimetic*, SensoLyte MMPs-13 ELISA Kit *Colorimetic*, by the company AnaSpec, Inc. and with the help of those, we were permitted quick, safe and sensitive assignment of the concentrations of MMPs -1, -8, -13 in the gingival tissue substrate. Clinically were followed: the index of the dental plague – IDP by Silness-Loe (1963); the index of the gingival inflammation – IGI by Loe-Silness (1964); the index of clinical attachment loss – CAL by the American Academy of Periodontology (1999), Miller – Pelzer index of bone resorption. The gathered information from the clinical and laboratory analysis were statistically elaborated with the program Statistica 7. Pearson index of correlation was used too.

Led by the previously set goals and the gathered data from our research, we came to certain conclusions on our own, which will now be sublimated into the following conclusions: The concentration of MMPs-1, -8, -13 in the inflammatory gingival tissues at the patients with chronic and aggressive form of the periodontal disease, were greater in comparison with the healthy patients and showed high statistic significance ($p=0.0001$). The difference in relation to MMPs-1 between the two groups (aggressive and chronic) are insignificant ($p=0.5751$). The concentrations of MMPs-8 at the patients with chronic periodontal disease were vitally greater in comparison with those with the aggressive form of the disease, which is a result of the misbalanced function of the neutrophilic granulocytes at the aggressive form of the periodontal disease. The differences concerning the MMPs-13 were irrelevant between the two groups – aggressive and chronic form of periodontal disease ($p=0.8957$). We appointed presence of an important, average-strong positive correlation between IDP and the examined MMPs - 1, -8, -13 at patients with chronic periodontitis. Positive correlation, but with different intensity (very strong with MMPs-1, average with MMPs-8 and weak with MMPs-13), was ascertained between these parameters at patients with aggressive periodontal disease, which confirms that the microorganism from the biofilm and their products initiate the pathological processes in the tissues and the production of the collagenase by the host cells. Important, positive and strong correlation was present between IGI and the examined collagenase MMPs-1, MMPs-8 and MMPs-13 at patients with chronic and those with aggressive form of the disease. That confirms the cognizance that with the development of the inflammatory processes, the concentrations of the matrix-metalloproteinase raise. The loss of attachment and resorption of the alveolar bone were strongly, positively correlated with the concentrations of the examined MMPs at patients with chronic periodontitis. At those with the aggressive form of the disease, we also established presence of a positive correlation between the examined parameters, but the gathered values were slightly milder.

The confirmed correlations between the clinical parameters (IDP, IGI) and the index of bone resorption with the observed collagenase at healthy patients, without any form of the periodontal disease (the control group) were very weak, inconsequential. The expressiveness and activity of the MMPs in the healthy tissue are very low and are under a strong control of the tissue inhibitors of MMPs (TIMP). The degradation and synthesis of the components of ECM in the healthy tissue are in perpetual balance.

Key words: periodontal disease, dental plaque, inflammation, aggressive periodontitis, MMPs, collagenase, bone resorption, loss of attachment, ECM.

Содржина

Вовед и литературен преглед	2
Цел на трудот	23
Материјал и метод на работа	26
Резултати	37
Дискусија	67
Заклучоци	88
Литература	92

ВОВЕД И ЛИТЕРАТУРЕН ПРЕГЛЕД

Пародонталната болест претставува многу често, бактериски индуцирано, инфламаторно заболување кое ги афектира потпорните ткива на забите, доведувајќи до прогресивна деструкција на сврзноктивниот атачмент и алвеоларната коска. Уште многу одамна, кога е откриена и потврдена бактериската етиологија на голем број заболувања во оралната празнина, меѓу кои секако се вбројува и пародонтопатијата, истражувањата во научните кругови се насочени кон идентификацијата на бактериите, механизмите кои доведуваат до настанок на заболувањето, како и начинот на справување со инфекцијата. Иако улогата на факторите кои партиципираат во иницијацијата и прогресијата на пародонталните лезии, се поткрепени со добро документирани клинички истражувања, сепак, значењето и придонесот на факторите поврзани со домаќинот сеуште не се докрај разјаснети. Имено, предизвикувачите на некои форми на пародонталната болест, како што е ANUG- (Acute Necrotizing Ulcerative gingivitis), како и агресивната пародонтопатија, се добро познати. Во согласност со "специфичната плак хипотеза", микроорганизмите со нивната вирулентност имаат способност да посредуваат при ткивната деструкција, директно, или индиректно(43). Меѓутоа, потешкотии се јавуваат во клиничкото проследување на активноста на заболувањето и нејзината корелација со присуството на суспектни патогени, како и неможноста да ја "изброиме", или "измериме" одбрамбената способност на домаќинот. Активноста на заболувањето се смета дека произлегува од интеракцијата на бројни фактори, вклучувајќи ја чувствителноста на домаќинот, присуството на патогени микроорганизми, како и отсуство на корисни специеси (44). Балансот помеѓу пародонталното здравје, со минимална ткивна деструкција, а рапидна репарација, како и заболување проследено со максимална деструкција, но минимална

регенерација, кои се наоѓаат во еден динамичен еквилибриум, можат да бидат под влијание на локални или системски фактори. Тоа вклучува намалена или зголемена одбрамбена способност на домаќинот или квантитативни и (или) квалитативни промени во периодите на патогените микроорганизми (21).

Познавањето на анатомото-хистолошката градба и функцијата на оралните ткива, каде што се развиваат различни патолошки процеси, претставува важен предуслов за да може да се проникне во патогенетските механизми на појавата и развитокот на болеста, како и да се предвиди можноста од појава на одредени компликации. Пародонциумот претставува ткивен комплекс изграден од четири ткива кои анатомски и функционално се разликуваат, но сепак градат една единствена целина, која има функција да ги фиксира забите во алвеоларната коска. Гингивата, периодонциумот, цементот на коренот на забот и алвеоларната коска образуваат динамичен систем кој, во физиолошка смисла континуирано се обновува, бидејќи поседува мошне изразен репаративен потенцијал, но истовремено е изложен на огромен број на патогени агенси кои ги атакуваат неговите одбрамбени способности. Коскениот ткиво, како високо диференцирано потпорно сврзно ткиво во кое покрај колагено-фибриларната структура се присутни и калциумовите соли, постојано се ремоделира со процесите на ресорпција и апозиција кои се постојан баланс. При појавата на воспалителен процес, овој баланс се нарушува и се фаворизира губитокот на коска. Постојат повеќе фактори кои ја стимулираат деструкцијата на сврзното ткиво и ресорпцијата на коската, како бактериските компоненти од типот на липополисахариди, ендотоксинот и останати вирулентни фактори. Исто така и одбрамбениот систем на домаќинот ги фаворизира деструктивните процеси преку ослободување на простагландини и др. медијатори на инфламацијата, како цитокини и матриксметалопротеинази.



Сл. 1 Модел на пародонталната болест

Екстрацелуларниот матрикс претставува мултикомпонентна тродимензионална структура составена од колаген, фибронектин, еластин и останати неколагени протеини и протеоглици. Тој служи како супстрат за клеточна адхезија, овозможувајќи ја цитоскелеталната организација. (12) Има големо значење бидејќи обезбедува простор за делба, диференцијација, клеточна миграција, опстанок или смрт на клетките. ECM ја регулира генската експресија на growth факторите, нивните рецептори и го детерминира клеточниот одговор кон growth факторите (12). Структурниот интегритет како и уникатната биохемиска композиција на ECM се неопходни за одржување на ткивната хомеостаза при здрава состојба, како и за обезбедување на регенеративните процеси во услови на оштетување на ткивото (50).

Ремоделирањето на сврзните ткива претставува составен дел на нормалниот раст и развој. Во тек на многу заболувања, пр. артритисот, туморската инвазија и ширењето на метастазите, доаѓа до забрзана

деградација на колагениот матрикс на коската, рскавицата и сврзното ткиво што се должи на дефекти во нормалните регулаторни механизми. Тој процес е прецизно регулиран преку комплексни, взаемно поврзани интерклеточни интеракции, вклучувајќи ја продукцијата на ензими, активатори, инхибитори и други регулаторни молекули како што се цитокините и growth факторите. Ендопептидазите (протеиназите) се клучни ензими во деградативните процеси, бидејќи протеинските компоненти на најголем дел од матрикс макромолекулите се доминантни во структурата на ткивата. Во *in vitro* експерименти, овие матрикс макромолекули најчесто се деструирани од страна на ендопептидазите од четирите големи класи: матрикс-металопроотеинази, серин-протеинази, цистеин-протеинази и аспаргин-протеинази. Нивната улога во *in vivo* услови се менува зависно од состојбата на ткивото и неговото опкружување, како и типовите на инфламаторни клетки кои се присутни. Исклучително во одредени околности, како што е коскената ресорпција, или пак во други ситуации кога клетките се во близок контакт со (протеинскиот) матрикс, екстрацелуларната деградација се смета дека се случува при неутрална pH вредност на средината. Следствено на тоа, протеиназите од типот на метало и серин-протеинази, ќе ја пројават својата оптимална функција и ќе бидат одговорни за иницијалната фаза на деструктивните процеси. (94) Бројни истражувачи својот интерес го фокусираат кон докажување дека клетките на сврзното ткиво синтетизираат и секретираат група на матрикс-металопроотеинази (MMP) кои се одговорни за деструкција на макромолекулите од сврзно-тквивниот комплекс.

Во 1962 година, за првпат MMP биле откриени од Gross & Lapiere (49) во опашката на полноглавците која подлегнува на ресорпција. Од тогаш, идентификувани се уште голем број на MMP.

Матрикс-металопроотеинази (matrix-metalloproteinases, MMP) претставуваат фамилија на протеолитички ензими продуцирани од различни типови на клетки, како што се неутрофилните гранулоцити, макрофагите, како и резидентните клетки од типот на фибробласти, епителни клетки, остеобласти и остеокласти. Тие имаат способност да

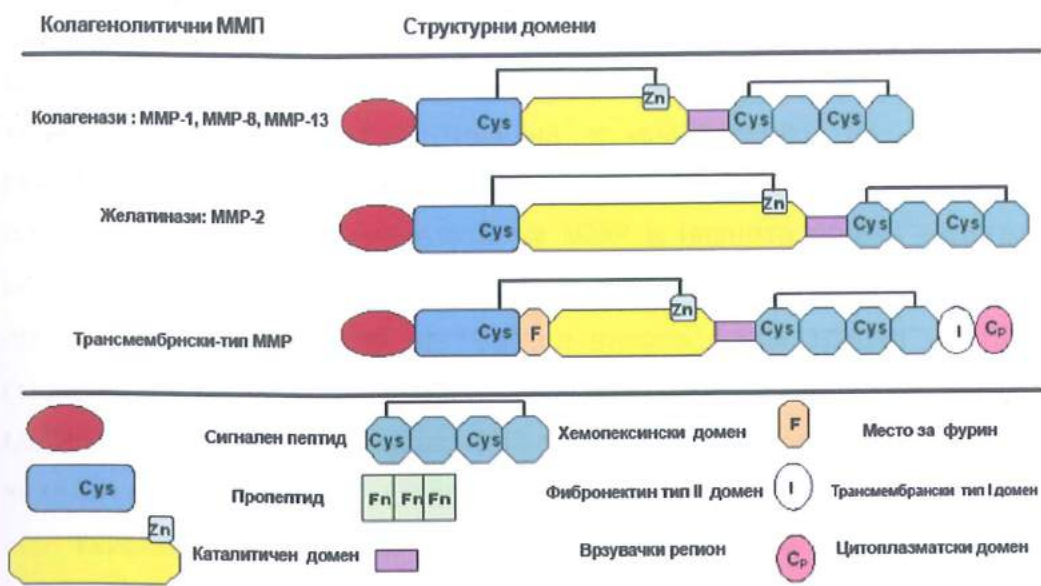
ги деградираат екстрацелуларните матрикс молекули, како што е колагенот, желатинот, еластинот, фибронектинот и протеоглуканите. Врз основа на специфичноста на супстратот врз кој делуваат, голем број на автори меѓу кои Sternlicht & Werb (124), ги делат MMP во 5 големи групи: 1) колагенази (MMP-1, MMP-8, MMP-13), 2) желатинази (MMP-2, MMP-9), 3) стромелизини (MMP-3, MMP-10, MMP-11), 4) мембрански-тип на MMP (MT-MMP) и 5) други MMP (MMP-7, -26, -12, -20, 28...) (2, 3, 16, 71, 103). MMP исто така можат да бидат продуцирани и од страна на одредени периопатогени микроорганизми како што се *Porphyromonas gingivalis*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, но се смета дека тие не претставуваат клучен фактор за прогресија на пародонталната болест.

Преструктурирањето и ремоделирањето на екстрацелуларниот матрикс (ECM) и базалната мембрана се процеси кои континуирано се одвиваат при многу физиолошки состојби, како што се ембрионалниот развој, развојот на ткивата и органите, заздравувањето на раните, ангиогенеза итн. При сите овие процеси MMP имаат значајна улога партиципирајќи во процесирањето на одредени супстанции. Меѓутоа, тие имаат силно влијание и врз прогресијата на одредени ткивни деструктивни, инфламаторни и малигни заболувања, како што се реуматоидниот артритис, остеоартритис (51, 82) пародонтопатијата (118, 63, 47) и туморската инвазија (66). Тие играат клучна улога во деструкцијата на сврзното ткиво кај хроничните инфламаторни лезии, па поради тоа важно е да се идентификуваат природните инхибитори кои ќе ја супримираат продукцијата на овие ензими.

Фамилијата на матрикс металопроотеинази опфаќа околу 25 генетски различни, но структурно поврзани, Zn^{2+} и Ca^{2+} зависни или клеточно асоцирани ендолептидази продуцирани од различни типови на клетки, кои ги деструираат компонентите на ECM и базалната мембрана (21). Оваа голема група на ензими е поделена на (95) колагенази, кои се одговорни за деградација на основниот тип на колагени фибрили (тип I колаген), желатинази (тип IV колагенази) кои имаат способност да го разградуваат денатурираниот колаген (желатин) и други колагени молекули, како ретикуларниот тип IV

колаген на базалната мембрана. Стромелизините имаат широка листа на супстрати на кои делуваат вклучувајќи ги еластинот, колагенот, ламининот и протеогликаните. Еднаквоста на аминокиселинските секвенци на MMP покажува дека постои висок степен на сличност помеѓу ензимите во секоја група (околу 80%), како и сличност помеѓу групите (околу 50%), а разликите во специфичноста на супстратот вклучуваат само мали разлики помеѓу нивната примарна структура. MMP имаат затворени места каде е присутен Zn и овие места имаат извесен степен на хомологност со бактериската MMP. Исто така постојат и региони на хомологност кои што можат да играат важна улога во активацијата на латентните про-форми во активни ензими. Сите MMP ензими имаат потреба од присуство на 2-3 Ca^{2+} јони за нивната стабилност и ензимска активност (105).

Значајна карактеристика на MMP е тоа што тие се секретираат во неактивни проформи. ProMMP имаат карактеристична структура која е заедничка за најголем број MMP. Генерално, MMP се состојат од 1) сигнален пептид (propeptide), 2) пропептид (латентен ензим), 3) каталитичен домен кој содржи Zn^{2+} , 4) поврзувачки (зглобен) регион, 5) трансмембрански дел (хемопексински домен) (96). Точните механизми на нивната активација во *in vivo* услови сеуште не се комплетно разјаснети. Меѓутоа, се смета дека MMP активацијата настанува со отстранување на мал дел од продоменот и преминување во активна форма на MMP со помала молекулска маса преку различни патишта. (96). Сигналниот пептид ги води MMP низ клетките, а потоа се откинува. Пропептидниот домен ја одржува латентноста на proMMP преку цистеинските резидуи кои ги поврзуваат Zn атоми во активните места на каталитичкиот домен. Во текот на активацијата на proMMP, врската помеѓу цистеинските резидуи во продоменот и Zn во каталитичкиот домен се прекинува. Активните места кои го содржат Zn сега стануваат способни да извршат хидролиза на пептидните врски. На оние места каде што бил Zn, доаѓаат нови јони на Zn^{2+} или Ca^{2+} кои придонесуваат во одржувањето на тродимензионалната структура на MMP (37).



Сл. 2 Структура на матриксометалопротеиназите

Постојат сигурни податоци кои укажуваат дека протеазите од периопатогените микроорганизми играат улога како активатори на проколагеназите (120). Бројни податоци исто така потврдуваат дека синтезата и активноста на MMP може да биде модулирана од бројните патолошки продукти на бактериите. Бактериите и нивните продукти може да делуваат при воспалението на ткивото и да иницираат деградација на екстрацелуларниот матрикс преку стимулација на моноцитите да продуцираат цитокини-интерлеукини и преку спроводниот пат да ја зголемат експресијата на MMP, или директно да ги стимулираат клетките да продуцираат MMP. Антигените од ѕидовите на бактериските клетки најчесто присутни во денталниот плак (Gram -) и (Gram +) како што се *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* и *Veillonella* специесите можат да индуцираат сврзно-ткивна деструкција преку механизми кои вклучуваат интеракција со циркулирачките мононуклеарни клетки (55). Овие клетки стимулирани од липополисахаридите или липотаихоичната киселина продуцираат простагландин E2 (PgE2) кој ја стимулира коскената ресорпција.

Во здравото ткиво, процесите на синтеза и деградацијата на компонентите од ECM се наоѓаат во постојан баланс. За да се одржи

ваквата состојба, постои ниско базично ниво на експресија на MMP, а при тоа нивната ензимската активност е прецизно контролирана. Биолошката активност на MMP може да биде регулирана на ниво на транскрипција на генот, активација и инактивација на ензимите. Нивната активност е контролирана преку промените во билансот помеѓу експресијата и синтезата на MMP и нивните бројни ендогени инхибитори (TIMP). Хуманите гингивални фибробласти нормално продуцираат ниски нивоа на MMP, а високи концентрации на TIMP (ткивни инхибитори на матрикс металопротеиназите). Активираниите MMP можат да го деградираат колагениот матрикс, тогаш кога нивните ткивни нивоа ќе ги надминат оние на TIMP.

Ткивните инхибитори на металопротеиназите за првпат се опишани во 1975 година како протеини, во култура на хумани фибробласти и серум кои имаат способност да ја инхибираат колагеназната активност (17, 138). Тие претставуваат мултигенска фамилија од четири членови (TIMP-1,-2,-3 и -4) кои реверзибилно ги инхибираат најголемиот број на MMP. Истражувањата на Ingman и сор.(63), Sorsa и сор. (122), Birkedal-Hansen и сор. (21) укажуваат дека инхибицијата од страна на TIMP се одвива преку создавање на комплекс MMP-TIMP, или пак преку инхибиција на активацијата на pro-MMP во активна форма. Тие сугерираат дека различни клетки вршат експресија на TIMP, а нивното присуство е потврдено не само во ткивата, туку во телесните течности, како и во гингивалниот сулкусен флуид. Бидејќи се смета дека металопротеиназите се активираат протеолитички, возможно е бактериските протеази да ја индуцираат матрикс деградацијата. Во таков случај влијанието на ткивните инхибитори ќе биде намалено и ќе преовладуваат деструктивните воспалителни процеси. Веројатно е дека леукоцитните лизозомални протеази, α -1-антитрипсин и α -2-макроглобулин, кои имаат улога на ткивни инхибитори, се деградирани од страна на *P.gingivalis* или од други периопатогени бактерии (26). Меѓу многубројните ткивни инхибитори на MMP, секако големо значење има и секреторниот инхибитор на леукоцитната протеаза (SLPI), чие што отсуство води кон пролонгирано и одложено зараснување на оралните мукозни рани,

нарушена ре-епителизација, нагласен инфламаторен одговор, изразена матриксметалопротеиназна активност и одложена матриксна депозиција. Зголемената еластазна активност, како и дополнителната еластазно условена активација на матриксметалопротеиназите, доведува до потенцирана матриксна разградба (117), консекутивна деградација на протеогликаните, колагенот и фибронектинот, кои претставуваат структурни и функционални протеини нормално депонирани во раните во тек на процесот на заздравување. (68)

Податоците дека деструкцијата на ткивото во тек на патолошките процеси е резултат на дисбаланс помеѓу MMP и нивните ткивни инхибитори - TIMP за првпат е опишана од Cambrey и сор. (25), кои забележале редукција на TIMP синтезата, споредена со експресијата на MMP во синовијалните мембрани на зајациите. Подоцна, тие своите наоди ги потврдиле со експерименти изведени на култура од хумани реуматоидни синовијални мембрани.

Колагените се голема фамилија на структурни и регулаторни протеини. Колагенот, претставува главна структурна компонента на екстрацелуларниот матрикс кој има тројна хелична структура. Тој претставува протеин кој се состои од различни аминокиселини, од кои најзначајни се глицин, пролин, хидроксилизин и хидроксипролин. Количеството на колаген во ткивото е детерминирано од содржината на хидроксипролинот. Познати се околу 19 видови на колаген, кодирани од страна на најмалку 25 различни гени, распределени во 12 хромозоми (39). Биосинтезата на колагенот се случува во фибробластите во форма на тропоколаген молекули. Овие молекули градат микрофибрили кои се пакетираат во форма на фибрили.

Колагенот го синтетизираат различни видови на клетки, како што се фибробласти, хондробласти, остеобласти, одонтобласти и др. Колагените се разликуваат по нивната хемиска структура, дистрибуција, функција и морфологија, па затоа постојат различни типови на колаген. Основните фибрили се изградени од тип I колаген, додека ретикуларните фибрили се изградени од колаген тип III. Колагенот тип IV е присутен во базалната ламина, а типот VI е локализиран во периодонталната лигаментарна мембрана и гингивата.

Тие го одржуваат интегритетот, даваат флексибилност и цврстина на ткивата кај човекот и обезбедуваат механичка сила.

Колагените се карактеризираат со релативна резистентност кон протеолизата предизвикана од неспецифични протеинази, поради нивната ковалентна фибриларна структура и структурата на троен хеликс. Се смета дека голем број бактериски протеинази имаат слаба деградациона активност кон колагенот, но (меѓутоа) посредуваат при ткивната деструкција, доведувајќи до намалување на одбрамбените механизми на домаќинот (44).

MMP се ендопептидази кои ги секретираат различни типови на клетки во форма на инактивни прекурсори (proMMP) и имаат способност да деструираат различни типови на колаген.

Матриксметалопротеиназа-1 (MMP-1, колагеназа-1, или интерстициелна, фибробластна колагеназа) Хуманата интерстициелна колагеназа за првпат е клонирана од фибробластите на кожата. Таа е детектирана и во оралните ткива. Се синтетизира и секретира од страна на сврзано ткивните клетки (фибробластите) и макрофагите, а најчесто е асоцирана со нормалното ткивно ремоделирање (136). *In vitro* MMP-1 се експресира во голем број на клетки, пример, кај фибробластите, ендотелните клетки, моноцитите, макрофагите, хондроцитите, остеобластите, кератоцитите и различни клетки на туморите (90, 21). MMP-1 е способна да го деградира типот III колаген.

Матриксметалопротеиназа-8 (MMP-8, Колагеназа-2 или хумана неутрофилна колагеназа). Се смета дека е еден од клучните медијатори на инфламаторната ткивна деструкција при пародонтопатијата и пери-имплантитот (118, 63, 47). MMP-8 се синтетизира и складира во специфичните гранули на полиморфонуклеарните леукоцити (PMN), во латентна форма, за да биде ослободен со дегранулација настаната како резултат на активираните PMN клетки во инфламираните места од страна на бактериските протеази. MMP-8 го експресираат и други видови на клетки, како што се гингивалните и периодонталните лигаментарни фибробласти, ендотелните клетки, одонтбластите и клетките на

пулпиното ткиво, реуматоидните синовијални фибробласти како и хуманите хондроцити (51, 101). Неговото присуство *in vivo* е потврдено во гингивалните сулкусни епителни клетки (129). Исто така тој е детектиран и во гингивата, саливата, денталниот плак, деминерализираните дентински кариозни лезии и периапикалното ткиво кај хроничните периапикални процеси. MMP-8 особено е ефикасен при хидролиза на тип I и II колаген (52).

Матриксметалопротеиназа-13 (MMP-13, колагеназа-3). Се карактеризира со широка супстрат специфичност, а најчесто се поврзува со патолошките состојби како што се остеоартритот и реуматоидниот артритис (82), инвазијата на карциномите на главата и вратот, како и други типови на карциноми (66). Се смета дека е медијатор на коскената ресорпција и деструкција на рскавицата, а зголемени нивоа на MMP-13 детектирани во гингивалниот флуид, укажуваат на коскен тип на колагена деградација при хронична форма на пародонтопатија *in vivo* (47). Особено ефикасно го деградира типот II колаген. Експресијата на MMP-13 е детектирана кај коскено ткиво за време на неговиот развој, во остеоартритичната рскавица и реуматоидната синовијална мембрана.

Меѓу првите автори кои се занимаваат со проучување на матриксметалопротеиназите се Birkedal- Hansen и сор. (21) Тие во своите научни студии укажуваат дека MMP претставуваат голема фамилија на структурно поврзани, но генетски различни ендолептидази, чија експресивност и активност се ниски во здравото ткиво, но нивните концентрации сигнификантно се зголемуваат во тек на различни патолошки процеси кои може да доведат до несакана деструкција на ткивото.

Page и сор. (100) во еден свој ревијален труд ја изнесуваат хипотезата дека прогресијата на пародонталната болест се должи на комбинација од неколку фактори, вклучувајќи ги присуството на периопатогени бактерии, високо ниво на про-инфламаторни цитокини, матриксметалопротеинази и PgE₂, како и ниско ниво на IL-10, TGF-beta и ткивните инхибитори на металопотеиназите. Во овој концепт тие сугерираат дека присуството на цитокините е она што детерминира

дали ќе настане ткивна деструкција или ќе постои хомеостаза. Кај нечувствителните индивидуи, присуството на неутрофилите и имуните клетки ќе го ограничат патолошкиот процес и ќе оневозможат екстензивен губиток на атечмент. Но, кај чувствителните индивидуи во присуство на дефинирани периопатогени бактерии, како што се *Porphyromonas gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans* или *Bacteroides forsythus* функцијата на неутрофилите нема да биде доволна за да го спречи продорот на бактериите, при што ќе настане деструкција на сврзно-ткивниот атечмент и прогресија на заболувањето. Тие сметаат дека природата на адаптивниот имун одговор е под контрола на Т-клетките кои ја регулираат Б-клеточната/ плазма клеточната диференцијација и продукцијата на антитела (100).

Sorsa и сор.(118), Ingman и сор.(63) и Golub и сор.(47), утврдиле патолошки зголемени нивоа на експресија и активација на MMP при инфламаторни состојби на пародонталниот лигаментарен комплекс. Тие укажуваат дека покрај ткивната деструкција индуцирана во текот на патолошките состојби, зголемена колагеназна активност во гингивалниот сулкусен флуид била детектирана и во тек на ортодонтското померување на забите, при што аплицираната механичка сила, довела до рапидно ремоделирање на периодонталниот лигаментарен комплекс. При тоа, MMP ослободени од периодонталните фибробласти, при механички стрес, се смета дека имаат голем удел во ремоделирањето на екстрацелуларниот матрикс (119).

Неутрофилната колагеназа MMP-8, како и желатиназа-B (MMP-9), се идентификувани во гингивалното ткиво и гингивалниот сулкусен флуид кај пациенти со пародонтопатија (130, 4). Seguíer и сор. (111), како и Soell и сор. (116) забележале дека вкупните количества на MMP-1,-2, -3 и -9 биле зголемени во инфламирана гингива. Истите автори во една своја студија посочуваат дека дисбалансот помеѓу MMP и ткивните инхибитори (TIMP) доведува до патолошка деструкција на екстрацелуларниот матрикс во тек на пародонтопатија. Тие сугерираат дека присуството на активни форми на MMP-9, можат да бидат маркер за клиничката манифестација на пародонталната болест. Ejeil и сор.

(38) потврдуваат високо ниво на латентни и активни форми на MMP-2 во инфламираната гингива, додека пак вкупните количества на MMP-2 биле идентични како и во здравата гингива.

Белазелкоска (18) во својата докторска дисертација ја проследила активноста на колагеназата, киселата и алкалната фосфатаза и DN-азата во гингивалното ткиво, мешаната плунка и крвниот серум кај пациенти со прогресивна пародонтопатија. Утврдила зголемени саливарни и гингивални вредности за активноста на испитуваните ензими кај испитуваната група, како и значајни разлики наспроти контролната група. Активноста на овие ензими била зависна од воспалително-деструктивните процеси во ткивото на пародонциумот, како и од присуството на дентален плак, т.е. нивната активност била највисока во третиот клинички стадиум на заболувањето и при индекс на дентален плак 3. Авторот заклучува дека микроорганизмите од плакот имаат удел во квантифицирањето на ензимската активност. Разликите помеѓу активноста на овие ензими во саливата и гингивалното ткиво, од една страна и серумот од друга страна е релевантна потврда за локалната причина на нивната биохемиска активност.

Во *in vitro* анимални студии потврдена е зголемена колагенолитична активност при ресорпцијата на ткивата на млечните заби (99), како и инволвираност на MMP-1 во ресорпцијата на коренот на млечните заби. (36) Вакви ресорптивни процеси на коренот се смета дека настануваат и кај човекот поради зголемување на активноста и количеството на MMP продуцирани од периодонталните фибробластни клетки (139). Испитувањата на Holliday и сор. (59) укажуваат дека MMP-1 се продуцира од страна на фибробластите, кератоцитите, ендотелните клетки, моноцитите и остеобластите. Имунохистохемиски, докажано е дека MMP-1 е локализиран околу воспалителните клетки кои може да го секретираат заедно со PMN леукоцити, макрофагите, плазма клетките и лимфоцитите.

Maeso и сор.(86) го проследило нивото на MMP-2, MMP-9 и TIMP-1, кај пациенти со гингивитис, пародонтопатија и здрави субјекти, со помош на ELISA методот. Тие утврдиле ниски нивоа на TIMP-1 кај

пациентите со инфламаторни промени на пародонталните ткива, чии што концентрации се зголемиле по спроведениот конвенционален тераписки третман. Нивоата на MMP-2 и -9 биле покачени. Тие сметаат дека редукцијата на TIMP-1 концентрациите во текот на заболувањето, доведува до дисбаланс помеѓу количеството на MMP и нивните инхибитори и е одговорно за ткивната деструкција.

Everts и сор. (40) детално ја проучувале колагената деградација, во одделот за коскена ресорпција, под дејство на остеокластите. Дошле до сознанија дека при оваа деградација подеднакво се вклучени MMP и цистеин-протеиназите, поткрепувајќи ги дотогашните сознанија дека и двете класи на протеинази се подеднакво важни. Податоците ги надградуваат и други автори (33) кои укажуваат дека постојат екстрацелуларен и интрацелуларен пат на колагена деградација и коскена ресорпција и на тој начин ја илустрираат комплексноста на овие специфични деструктивни процеси.

Андоновска (7) во својот магистерски труд го проследила влијанието на матриксметалопротеиназите кај хроничните периапикални процеси. Констатирала статистички значајна поврзаност меѓу концентрацијата на MMP и радиографската величина на хроничниот периапикален процес. Имено, концентрацијата на MMP кај помалите лезии била помала и обратно, поголемите лезии имале поголема концентрација на MMP, што е пропорционално со ширењето на лезијата и деструкцијата на коскено то ткиво. Утврдила силна линеарна поврзаност меѓу големината на лезиите и концентрацијата на MMP кај пациентите со дијагноза *Parodontitis periapicalis chronica granulomatosa* и *Parodontitis periapicalis chronica diffusa*. Во тој правец се насочени и истражувањата на Holliday и сор. (59) кои во своите студии укажуваат на улогата на остеокластите во ресорпција на коската околу хроничните апикални лезии. Тие сметаат дека ваквите ресорптивни процеси се должат на делувањето на MMP, особено MMP-9, кои го секретираат остеокластите, а пак тој се активира под влијание на MMP-13.

Ангелов (8) во својата докторска дисертација ја испитувал улогата на секреторниот инхибитор на леукоцитната протеаза (SLPI)

врз процесите на репарација на ткивото при експериментално создадена орална рана, кај експериментални животни, во услови на генетски детерминиран недостаток на SLPI. Од спроведените истражувања преку суптилна научна анализа на повеќе ткивно-цитолошки фактори, авторот заклучува дека веројатниот механизам на учество на SLPI во тек на процесите на зараснување на оралните рани се остварува преку инхибирање на еластазната и матриксметалопротеиназната активност, асоцирано со индиректна инхибиција на матриксните металопротеинази.

Iigenli и сор. (62) имале за цел да го проследат нивото, молекуларните форми и степенот на активација на MMP-13 во гингивалниот флуид кај пациенти со пародонтопатија и ги корелирале добиените резултати со клиничките параметри. Молекуларните форми на MMP-13 во примероците на GCF биле анализирани со Western immunoblotting методот. Резултатите укажале дека зголемените нивоа на MMP-13 во GCF играат важна улога во патогенезата на хроничната пародонтопатија и биле позитивно корелирани со сите клинички параметри.

Нивото на MMP-13 и TIMP-1 во гингивалниот флуид (GCF), и гингивалните ткивни биопсии кај пациенти со хронична пародонтопатија, го проучувале Hernandez и сор. (55). Тие земале материјал, од активните, како и од места без знаци на акутно воспаление и го анализирале со помош на Immunowestern blot и immunodot blots методите. Резултатите укажале на зголемена MMP-13 експресија. Во тек на прогресија на заболувањето кај активните места, авторите забележале намалување на нивото на TIMP-1, асоцирано со зголемување на нивото на MMP-13.

Многубројни студии укажале дека локалните медијатори, како што се простагландините, интерлеукините и growth факторите играат многу важна улога во коскено то ремоделирање во тек на ортодонтското померување на забите. Нивото на овие медијатори во GCF е зголемено при делување со механичка сила. Меѓутоа, мал е бројот на студии кои се фокусирани на MMP-зависното ремоделирање на периодонталните ткива во тек на ортодонтски третман. Во една

пилот *in vivo* студија, Ingman и сop. (64), утврдиле сигнификантно повисоки нивоа на MMP-8 во GCF кај пациентите со фиксни ортодонтски протези, споредено со контролната група, во тек на едномесечен период. Не била детектирана имунореактивноста на MMP-1 во гингивалниот флуид кај ортодонтските пациенти.

Killi и сop. (72) утврдиле присуство на различен степен на имунореактивност на MMP-8 во GCF кај ортодонтските пациенти, во однос на имунореактивноста на MMP-8 во GCF и денталниот плак, кај пациентите со хронична пародонтопатија.

Во една наша студија (107) која ја изведовме на Клиниката за болести на устата и пародонтот, имавме цел да го утврдиме нивото на неутрофилната колагеназа, MMP-8, во плунката на здрави субјекти (без пародонтопатија), како и кај оние со умерена до силно изразена хронична пародонтопатија. Резултатите ни укажаа на значајно повисоко ниво на MMP-8 во плунката кај испитуваната во однос на контролната група, што ни покажа постоење на висока статистичка сигнификантност ($p=0,000$). Присуството на активната форма на MMP-8 е асоцирана со периоди на активна сврзно-ткивна деструкција и клинички манифестна егзацербација на болеста.

Sorsa и сop. (120) проучувајќи го дејството на бактериските протеази од периопатогените бактерии како *P. gingivalis* и *T. denticola* дошле до заклучок дека тие имаат способност директно да ги активираат двата типа на proMMP (proMMP-1и proMMP-8), особено proMMP-1. Овие протеази покрај нивното делување како директни активатори на proMMP, се смета дека можат и да ја индуцираат нивната продукција од страна на клетките на домаќинот, преку ослободување на цитокини и исто така ефикасно да ги разградат колагените пептиди. Со помош на овие сознанија можат да се објаснат дел од молекуларните механизми на деструктивната инфламација инволвирана во периодонталната ткивна деструкција, индуцирана и посредувана од периопатогените бактерии.

Молекуларните форми на MMP-1 и MMP-8 во гингивалниот флуид кај ортодонтски пациенти, здрави субјекти, како и пациенти со гингивит и пародонтопатија, биле анализирани со Western blotting методата од

страна на Mantyla и сор. (87). Нивото на MMP-8 во GCF кај пациентите со фиксни ортодонтски апарати било повисоко во однос на она кај здравите пациенти, но било пониско во однос на нивото на MMP-8 кај пациентите со гингивитис и пародонтопатија.

Зголемена експресија на MMP-8 и MMP-13 mRNA кај периодонталниот лигаментарен комплекс на стаорци во тек на активно померување на забите, забележале и Takahashi и сор. (126).

Во *in vitro* студии на хумани периодонтални и гингивални фибробласти, Volcato-Bellemin и сор. (22) забележале значајни морфолошки и хистохемиски промени на периодонталните лигаментарни клетки, како и покачување на нивото на MMP-1 и -2.

Речиси сите податоци за нивото на матриксметалопротеиназите при пародонталната болест потекнуваат од истражувањата спроведени кај возрасни субјекти со хронична пародонтопатија. Постојат само мал број ограничени информации што се однесуваат за активноста на MMP кај млади пациенти со агресивна пародонтопатија. Токму тоа беше причината која не поттикна за пообемно истражување и проучување, па затоа како целна група во овој докторски труд ја оформивме групата на пациенти со агресивна пародонтопатија.

Агресивната пародонтопатија (*early-onset, juvenile, localized and generalized juvenile, rapidly progressive, severe, prepubertal periodontitis*), според класификацијата од 1999 година на International Workshop for a Classification of Periodontal Diseases and Conditions, претставува заболување на потпорниот апарат на забите кое клинички се манифестира во периодот на пубертетот или во млада возраст (9). Се карактеризира со брз, рапиден, екстензивен губиток на алвеоларната коска на повеќе од еден заб од трајната дентиција, најчесто на првите молари и инцизивите, при што степенот на коскената деструкција не е во корелација со количеството на дентален плак и локалните иритирачки фактори. Може да се јави во две клинички форми и тоа како локализирана агресивна пародонтопатија (LAP) и генерализирана форма (GAP). Бројни епидемиолошки студии од САД и други земји кои ја проследувале инциденцата на појава на овие тешки форми на пародонталната болест, укажуваат дека, за среќа, сепак се работи за

ретко заболување со зафатеност од само 1% од младата популација (102) и тоа 0,53% LAP и 0,13% GAP (83). Истражувањата посочуваат дека преваленцата на појавување е повисока кај Афро-Американците во однос на белата популација, а прогресијата на иницијалните лезии е поизразена кај субјектите со понизок социо-економски статус (102).

Примарен патоген микроорганизам кој е асоциран и најчесто изолиран од локализираните пародонтални лезии е *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (140). Тој има способност да продуцира моќен леукотоксин кој ги уништува неутрофилните гранулоцити кои ја обезбедуваат примарната одбрана на домаќинот кон периопатогените бактерии. Потврдено е дека различни соеви на A.a продуцираат различни нивоа на леукотоксини. Се смета дека кај пациентите со локализирана агресивна пародонтопатија, доминантно се присутни високо токсични соеви на A.a во споредба со здравите индивидуи, како и оние со хронична пародонтопатија (140,141). Кај субјектите со африканско потекло пронајдени се повирулентни соеви на оваа бактерија, со што може да се објасни зголемениот ризик за појава на заболувањето помеѓу Афро - Американската популација (110). Во една студија во која биле вклучени 21 фамилија со најмалку еден член со локализирана форма на заболувањето, децата кај кои биле изолирани високо токсични соеви на A.a имале поголем ризик за појава на LAP. (24) Присуството на фамилијарна оптеретеност со LAP, го наметнува прашањето, дали можната трансмисија на специфичните соеви на A.a помеѓу членовите во една фамилија придонесува за развој на патолошкиот процес? Генетските анализи на различните соеви на A.a изолирани од членовите на фамилиите, сугерираат дека трансмисијата помеѓу сопругниците, или од родителите кон децата се случува во приближно една третина од испитуваните семејства. (10)

Уште еден фактор за кој се верува дека е длабоко инволвиран во патогенезата на агресивната пародонтопатија е дефектот во функцијата на неутрофилите. Полиморфонуклеарните леукоцити (PMN) ја претставуваат примарната одбрана на домаќинот кон бактериските инфекции преку комплексни процеси кои инволвираат, адхеренција кон ендотелните клетки, трансмиграција низ ткивата и припојниот епител

во гингивалниот сулкус и хемотаксија на навлезените микроорганизми. Намалена и пореметена неутрофилна хемотаксија е доминантно присутна (70-75%) кај пациентите со локализирана и генерализирана форма на агресивната пародонтопатија (133, 114). Се смета дека заболувањето има фамилијарна предиспозиција, бидејќи дефектите во функцијата на неутрофилите се генетски условени. Имено, генскиот полиморфизам на Fc рецепторите на фагоцитните клетки се посочува како сигнификантен фактор кој ја детерминира чувствителноста на одредена индивидуа кон бактериската инфекција (100). Меѓутоа, сите индивидуи кои имаат намалена неутрофилна функција, сепак не развиваат агресивна пародонтопатија. Секако дека се идентификувани други, бројни фактори од страна на домаќинот кои се инволвирани во патогенезата на ова заболување.

Ingman и сор. (63) во своите студии укажуваат дека при агресивна пародонтопатија доминантни колагенази кои се пронајдени во инфламираните ткива и во гингивалниот флуид е MMP-1, како и присуство на TIMP-1. Ова е во спротивност со наодите кај хроничната пародонтопатија, каде што колагенолитичната активност е предизвикана од неутрофилите преку ослободување на MMP-8. Ваквите разлики во присуството на различни MMP се поврзуваат со алтерираната неутрофилна функција и ни укажуваат дека различни механизми на ткивна деструкција се инволвирани при овие две различни форми на пародонталната болест.

Како што веќе споменав, активноста на MMP, покрај бројните механизми, во најголем дел е контролирана од присуството на ендогените инхибитори во ткивото (TIMP). Меѓутоа, во поново време научните сознанија укажуваат дека нивната активност може да биде регулирана и од егзогени агенси, како што се нестероидните антиинфламаторни (NSAID) медикаменти, биофосфонатите и од некои антимикробни средства-тетрациклините.

Golub и сор. (48) се првите автори кои во своите студии користејќи различни тетрациклински препарати, укажуваат дека полусинтетските тетрациклини, доксицилинот, се особено ефикасни во редукција на екстензивната колагенолитична активност во

гингивалниот флуид кај пациенти со хронична пародонтопатија. Тие сметаат дека нивниот инхибиторен ефект се случува на повеќе нивоа: инхибиција на продукцијата на MMP од гингивалните епителни клетки, директна инхибиција на MMP преку врзување за активните места на Ca^{2+} и Zn^{2+} , регулација на експресијата на клучните инфламаторни цитокини како IL-1, IL-6, TNF- α и PGE2, инхибиција на продукцијата на реактивните оксигени специеси (ROS) - слободни радикали по потекло од полиморфонуклеарните леукоцити (PMN) и најверојатно претворање на MMP во неактивни форми како и стимулација на фибробластите за продукција на колаген. На ниво на коската се смета дека доксицилинот има ефект во редукција и блокада на остеокластичната активност, а со тоа и на коскената ресорпција, како и ги стимулира остеобластите за продукција на коска. Ваквите сознанија ги потврдиле и Smith и сор. (115) во своите истражувања. Тие исто така укажуваат дека ниските дози на доксицилин базирани врз инхибиција на MMP се користат како дополнителна терапија во третманот на пародонталната болест.

ЦЕЛ НА ТРУДОТ

Во функција на разрешување на многубројните прашања поврзани со етиопатогенезата на пародонталната болест направени се бројни научни истражувања кои потврдуваат дека се можни големи промени во активноста и концентрацијата на матрикс - металопротеиназите MMP (колагеназите - MMP-1,-8, -13).

Земајќи ги во предвид бројните литературни податоци и современи научни сознанија за улогата на матрикс-металопротеиназите во ремоделирањето и растот на здравото ткиво и нивната инволвираност во многу деструктивни патолошки состојби, а во недостаток на сопствени сознанија од оваа област, не поттикна да пристапиме кон посебно проучување на оваа проблематика и ја поставивме *главната цел на нашето истражување*:

да го утврдиме присуството и концентрацијата на матрикс-металопротеиназите (MMP-1,-8,-13) во здравото гингивално ткиво, да ја проследиме нивната концентрација во патолошки променетото гингивално сврзно ткиво и нивната асоцираност со различни облици на пародонталната болест. Во функција на постигнување на главната цел ги поставивме следниве оперативни цели:

- квантитативно определување на ткивните нивоа на колагеназите (MMP-1,-8,-13) во здраво гингивално ткиво;
- определување на концентрацијата на колагеназите (MMP-1,-8,-13) во инфламираното гингивално сврзно ткиво кај пациенти со
агресивна пародонтопатија, како и кај оние со
хронична форма на пародонталната болест;
- компарација на концентрациите на ткивните нивоа на MMP-1, -8 и -13, помеѓу здравото и патолошки променетото ткиво при различните форми на пародонталната болест;
- клинички да го одредиме степенот на гингиво-пародонталната афекција, проследена преку пародонталните индекси;

- да ја детерминираме корелацијата помеѓу вредностите на концентрацијата на матриксметалопротеиназите (MMP-1, -8, -13) со клиничките параметри.

МАТЕРИЈАЛ И МЕТОД

Материјал на истражување

За реализација на поставената цел на оваа докторска дисертација, на Клиниката за болести на устата и пародонтот при Стоматолошкиот клинички центар "Св. Пантелејмон" во Скопје, беа проследени вкупно 90 пациенти од обата пола. Изборот на материјалот за истражување беше извршен врз основа на клинички поставената дијагноза, после деталната анамнестичка постапка како и спроведениот клинички преглед. При тоа од сите испитаници беа формирани 3 групи:

Првата група ја оформија 32 пациенти од обата пола, на возраст од 21-65 години со дијагностицирана умерена до силно изразена хронична пародонтопатија, со длабочина на пародонталните џебови над 4мм. според критериумите предложени од ААР 1999.

Втората група ја оформија 28 здрави испитаници, на возраст од 20-45 години (просечно <35 години) кај кои со клиничкиот преглед утврдивме губиток на атечмент >5мм во регијата на првите молари и инцизивите. Со анамнестичката постапка ја потврдивме фамилијарната генеза на заболувањето, меѓутоа оние пациенти кај кои постоеја јасни клинички знаци на агресивна пародонтопатија, но немаа позитивна фамилијарна историја, исто така беа вклучени во истражувањето. Рентгенолошки уочивме губиток на коска >30% од должината на коренот на посочените заби.

Третата група ја сочинуваа 30 здрави испитаници на возраст од 18 - 40 години кај кои не утврдивме клинички и радиографски детектибилни знаци на пародонталната болест. Таа воедно ни претставуваше и контролна група.

Во студијата не беа вклучени пациенти кои имаат:

- историја на некое општо заболување; бубрежна дисфункција, гастроинтестинални заболувања, дијабет, крвни дискразии, алкохолизам, итн.

- приматели на долготрајна имunosупресивна терапија како и хемотерапија, кои го афектираат имунолошкиот одговор на домаќинот;
- калциум блокатори, циклоспорин А, фенитоин или други медикаменти асоцирани со гингивална хиперплазија, кои можат да ја афектираат концентрацијата на MMP во гингивалното ткиво;
- примена на антибиотици во последните 3 месеци, или потреба од антибиотска терапија поради ендокардитис профилакса, во тек на денталните интервенции,
- присуство на некоја орално-мукозна инфламаторна состојба (афти, lichen planus, leucoplakia). Исто така во студијата не беа опфатени бремени пациентки и оние во период на лактација.

Протоколот за ова истражување беше одобрен од страна на Етичката комисија за медицинско-стоматолошки инвестиции при Стоматолошкиот факултет во Скопје, во согласност со Хелсиншката декларација за човекови права.

Методи на работа

Во оваа студија кај сите испитаници беа спроведени следниве испитувања:

- детални анамнестичка постапка, клинички преглед како и анализа на рентгенограмот;
- собирање на материјалот за работа;
- лабораториски испитувања на добиениот материјал и
- статистичка обработка на податоците.

Анамнеза, клинички преглед

После исцрпно земената анамнеза пристапивме кон клинички преглед со кој извршивме проценка на состојбата на пародонталниот ткивен комплекс, преку нотирање на следниве параметри:

- индекс на дентален плак - ИДП по Silness-Loe (1963) според кој присуството на денталниот плак на забните површини се вреднува од 0-3 при што

0 - означува *отсуство на плак* на гингивалната третина од коронката на забот;

1 - плак се наоѓа во *тенок слој* на самата ивица на гингивата. Не може да се детектира со директна контрола на око, туку со помош на сонда на чиј што врв се задржува во мала количина. Може да се открие и со боење;

2 - *умерена количина* на дентален плак во гингивалниот сулкус или пародонталниот џеб. Може да се детектира и со голо око;

3 - *голема количина* дентален плак која потполно го исполнува гингивалниот сулкус или џеб. Интерденталниот простор е исто така исполнет со дентален плак.

За одредување на состојбата на гингивата го користевме

- *индексот на гингивална инфламација* - ИГИ предложен од страна на Loe-Silness (1964), кој служи за клиничка проценка на состојбата на гингивата врз основа на интензитетот на гингиворагија при благо сондирање при што индекс:

0 - означува *нормална гингива* со бледо розова боја, цврста конзистенција и ситнозрнеста структура;

1 - *блага инфламација*, маргиналната гингива е со поцрвена боја во однос на здравата, постои благ едем и гингивата не крвари при блага провокација со тапа сонда;

2 - *умерена инфламација*, гингивата е со црвена боја, постои изразен едем на маргиналната гингива, како и крварење при благо сондирање;

3 - *јака инфламација*, гингивата е со интензивно црвена или ливидна боја, изразито зголемена со тенденција кон спонтани крварења. Може да постојат улцерации на гингивата.

Степенот на оштетување на длабоките пародонтални ткива (пародонталната деструкција) го утврдивме преку:

- *индексот на епителна апикална миграција* - EAM (губиток на атечмент), според класификацијата предложена од American Academy of Periodontology, 1999 (1),
- *слабо изразен* губиток на атечмент до 2мм;
- *умерено изразен* губиток на атечмент. Апикалната миграција на припојниот епител изнесува од 2-5мм.
- *силно изразен* губиток на атечмент со над 5мм. апикална миграција на припојниот епител.

Кај одреден број на пациенти од секоја група беа направени ортопантомографска и по потреба ретроалвеоларна рентген снимка за детектирање и верифицирање на степенот на алвеоларно-коскената деструкција. За таа цел беше користен Miller - Pelzerov индекс на *коскена ресорпција* според кој ресорптивните промени на алвеоларната коска настанати во тек на пародонтопатијата се вреднуваат од 1-5 при што индекс

- 1- означува *нормална алвеоларна коска*, потполно зачувана ламина дура, непроменета периодонтална линија;
- 2- почеток на пародонтопатија, *благо истенчување на ламина дура*, задебелување на периодонталната линија;
- 3- изразена пародонтопатија, *напредната ресорпција на интерденталниот коскен септум*, а останатиот дел од алвеоларната коска е потполно непроменет;
- 4- пародонтопатија во напреден стадиум, *силно изразена ресорпција на интерденталниот коскен септум*, со тенденција на ширење на процесот во преостанатиот дел на алвеоларната коска;
- 5- ресорпцијата на алвеоларната коска е силно изразена, *потполно е ресорбиран интерденталниот коскен септум*. Болеста се наоѓа во терминален стадиум.

Рентгенолошките анализи беа извршени во Рентген кабинетот при Стоматолошкиот клинички центар.

Прибирање на материјалот за испитување на концентрациите на MMP-1, -8, и -13

Материјалот за испитување кај пациентите од првата и втората група (оние со хронична и агресивна пародонтопатија) го земавме со инцизија на инфламираното гингивално ткиво во текот на конвенционален пародонтален третман - киретажа на пародонталните џебови или во тек на орално-хируршка интервенција. Гингивалните ткивни биопсии содржеа епител, сврзно ткиво, пролифериран сулкусен епител и патолошки променет припоен епител од дното на пародонталниот џеб. Земениот материјал, беше складиран во пластични, стерилни епрувети, а потоа во најкраток временски период беше замрзнат и чуван на температура од -80°C до понатамошна лабораториска анализа, но не подолго од 6 месеци.

Кај третата група пациенти (контролна група), каде што клинички и рентгенолошки не утврдивме постоење на пародонтална болест, прибирањето на материјалот за испитување (здрово гингивално ткиво) , беше земен при орално-хируршка интервенција - екстракција на импактирани трети молари, или екстракција на прв или втор премолар поради ортодонтски причини. Земениот материјал беше ставан во стерилни епрувети и во најкраток временски период беше специјално складиран на температура од -80°C на која се чуваше се до неговата анализа, меѓутоа во период не подолг од 6 месеци.

Материјалот за истражување се замрзнуваше и чуваше во Лабораторијата на Фармацевтскиот факултет во Скопје.

Лабораториски испитувања

Лабораториските испитувања беа извршени во Лабораторијата за молекуларна биологија на Институтот за биологија при Природно-математичкиот факултет во Скопје.

Определување на концентрацијата на протеините во материјалот за испитување

Подготовката на материјалот за испитување се одвиваше на следниов начин. По одмрзнувањето, на секој примерок во епруветата му беа додадени по 1,5 ml фосфатно-пуфериран физиолошки раствор (Phosphate-Buffered Saline- PBS). Секој примерок за ензимско испитување беше измерен на вага и хомогенизиран во пуфер кој содржи коктел на протеазни инхибитори: апротинин, фенилметилсулфонил- флуорид (PMSF) и натриумова сол на етилендиаминтетраоцетна киселина (EDTA-Na₂). Секој поединечен примерок беше мацериран со стерилни игли во PBS и потоа хомогенизиран во стаклен хомогенизатор од +4°C до +8°C. Примероците беа центрифугирани во микроцентрифуга (Eppendorf-Centrifuge 5415), 10 000 гравитации во време од 10 минути. Супернатантот беше декантиран во нова епрувета и користен за понатамошна анализа.

Во хомогенатот со помош на Bradford микрометод, користејќи серија од пет стандарди на говедски серум албумин (BSA-Bovin Serum Albumin) и мерење на апсорбацијата на 450nm на спектрофотометарот, беше определена концентрацијата на вкупните протеини.

Стандардната крива за концентрацијата на протеините беше конструирана со софтверски програм CurveExpert 1.3. Од стандардната крива преку интерполација се пресмета концентрацијата на протеините во примероците.

Квантитативен ензимски метод за определување на концентрацијата на матрикс-металопротеиназите

За определување на концентрациите на трите типа на матрикс металопротеинази, беше применет квантитативен ензимски метод, со комерцијалните сетови: SensoLyte MMP-1 ELISA Kit *Colorimetric*, SensoLyte MMP-8 ELISA Kit *Colorimetric*, SensoLyte MMP-13 ELISA Kit *Colorimetric* од фирмата AnaSpec, Inc. со помош на кои е овозможено

брзо, сигурно и сензитивно определување на концентрациите на MMP-1, -8 и -13 во гингивалниот ткивен супстрат.

SensoLyte MMP ELISA Kit е дизајниран за квантитативно детерминирање на вкупните хумани колагенази MMP-1, -8, -13 (про и активните форми) во серум, плазма, клеточни култури, супернатанти и урина. Овој сет е опремен со микроплоча со 96 (8x12) алвеоли, препокриени со анти-хумани моноклонални антитела, специфични за врзување на хуманите MMP-1, -8, -13. Со него се овозможува детекција на колагеназната активност со аналитичка сензитивност помала од 10ng/mL.

Секој сет Sensolyte MMP-1, -8, -13 ELISA Kit *Colorimetric* поединечно ги содржи следниве компоненти:

1. Компонента А MMP-1 (-8,-13) микроплоча: препокриена со анти-хуман MMP-1 (-8,-13) (8x12 алвеоли)
2. Компонента В 20x разреден пуфер за испирање 25mL
3. Компонента С Рекombинантни хумани MMP-1 (-8,-13) стандарди (2 шишенца)
4. Компонента D Пуферски раствор за анализа, 5x разреден 15mL
5. Компонента Е Биотинлизирани антитела (2 шишенца)
6. Компонента F HRP- конјугиран Стрептавидин 8mL
7. Компонента G TMB супстрат реагенс 12mL
8. Компонента H Раствор за стопирање на реакцијата; 8mL

Сетот за квантитативно определување на концентрацијата на MMP како супстрат користи биотинизиран колаген. Овој природен супстрат со градба на троен хеликс бидува раскинат од активните MMP-1, MMP-8, MMP-13 (колагеназни) ензими. Кај овој метод, алвеолите од сетот на биотин-врзувачката плоча фабрички се обложени со стрептавидин. Во втората фаза, по додавањето на енхенсерот, преостанатите биотинизирани фрагменти се

трансферираат во 96-те алвеоли на биотин-врзувачката плоча, при што се детектираат со стрептавидин ензимскиот коњугат.

Конструирање на стандардна крива со MMP-1 позитивната контрола

Најнапред се изврши рехидрирање на MMP-1 позитивната контрола со 100 μL дејонизирана вода и сето тоа добро се меша. Во микротитрирачката плоча со 96 алвеоли беше извршено сериско разредување на MMP-1 позитивната контрола во однос 1:2 и тоа на следниов начин: во алвеолите од B1 до H1 беа додадени 20 μL од 5x разредениот дилуент. Во A1 алвеолата беа додадени 40 μL од реконституираната MMP-1 позитивната контрола. Почнувајќи од A1, по 20 μL од MMP-1 позитивната контрола беа пренесени во наредните алвеоли, кои веќе содржеа 20 μL од 5x разредениот дилуент, се додека MMP-1 не се разреди 64 пати во алвеолите од G1 редот.

Мерењата беа изведени на микро-ELISA микрочитач при бранова должина од 450 nm. Добиените вредности беа нормализирани во однос на концентрацијата на протеините во секој примерок т.е. вредностите на апсорбацијата на секој стандард беа корегирани според протеинската концентрација. Стандардната крива беше конструирана софтверски со програмот CurveExpert 1.3. Со интерполација на вредностите беа пресметани концентрациите на колагеназите MMP-1, -8 и -13 на примероците.

Постапка за определување на концентрацијата на MMP

Прв чекор во оваа постапка беше активација на примероците преку додавање на 350 μL од примерокот во 100 μL од 250mM Tris, со pH 7,5 и 50 mM CaCl₂. Беше извршена инкубација на примероците на температура од 37°C во време од 5 часа. Во 96-те алвеоли на микротитрациската плоча со автоматски пипетор беа аплицирани по 50 μL од примероците, а потоа се додадоа по 30 μL од 5x разредениот дилуент и по 60 μL од разредениот биотинизиран колаген супстрат.

Вака подготвената плоча беше затворена со самолеплива лента и инкубирана на температура од 37°C во време од 2 часа. По инкубацијата, во секоја алвеола беа аплицирани по 10 μ L од претходно рехидрираниот енхенсер. ELISA плочата повторно беше затворена и инкубирана на 37°C во време од 30 минути. Биотин-врзувачката плоча беше рехидрирана со по 200 μ L PBS во секоја алвеола и оставена на собна температура една минута. Внимателно, без да биде изгребана од неа беше аспириран пуферот. Во следниот чекор, 100 μ L од смесата примерок/биотинизиран колагеназен супстрат беа пренесени во рехидрираната биотин-врзувачка плоча. Вака подготвена плочата беше затворена и инкубирана 30 минути на температура од 37°C. По инкубацијата, алвеолите од плочата беа испирани пет пати со по 200 μ L дилутиран пуфер. Во секоја од алвеолите на плочата беа аплицирани по 100 μ L од разредениот стрептавидин-ензимски коњугат, а потоа плочата повторно беше инкубирана 30 мин. на температура од 37°C. Во следната фаза алвеолите повторно беа испирани 5 пати со по 200 μ L дилутиран пуфер, а по апликацијата на 100 μ L супстратен раствор, плочата за последен пат беше инкубирана на собна температура во времетраење од 15-20 минути, за кое позитивните контроли добиваат светло-сина боја. Ензимската реакција беше прекината со додавање на 100 μ L раствор за стопирање во секоја алвеола, кој го конвертира светло-жолтиот во светло сино обоен продукт.

Статистичка обработка на податоците

СТАТИСТИЧКИ МЕТОД

Сите податоци од интерес за изработка на докторскиот труд се статистички обработувани со помош на следните статистички методи:

- статистичките серии (сите дефинираните варијабли) се табеларно и графички прикажани;
- структурата на нумеричките статистички серии е анализирана со помош на мерките на централна тенденција (просек) и мерките на дисперзија (стандардна девијација);
- анализа на односите меѓу нумеричките статистички серии е направена со помош на Pearson-овиот коефициент на корелација - r;
- тестирање на значајност на разлики меѓу две аритметички средини кај независните примероци (помеѓу испитуваните групи) е направено со непараметарскиот Mann-Whitney U Test (кај неправилна дистрибуција);
- тестирање на значајноста на разликите меѓу три и повеќе аритметички средини е направено со Анализа на варијанса (ANOVA) и Tukey HSD test;

РЕЗУЛТАТИ

РЕЗУЛТАТИ

Во студијата се анализирани вкупно 90 испитаници според релевантните варијабли од интерес, поделени во три испитувани групи. Првата група ја чинат 32 испитаника со хронична пародонтопатија ($N_1 = 32$), во втората испитувана група се лица со дијагностицирана агресивна пародонтопатија ($N_2 = 28$), а третата група е контролна и во неа се вклучени 30 здрави лица ($N_3 = 30$).

Просечната возраст на испитаниците кои се анализирани во студијата од трите испитувани групи е дадена на табела бр. 1 и графикон бр. 1.

Табела бр. 1. Дистрибуција на испитаниците од трите испитувани групи според возраст

Испитувана група	просек	SD	min	max
(N1) Хронична пародонтопатија	48.3	13.6	21	65
(N2) Агресивна пародонтопатија	28.1	3.3	22	33
(N3) Здрави - контролна група	23.9	6.9	16	43

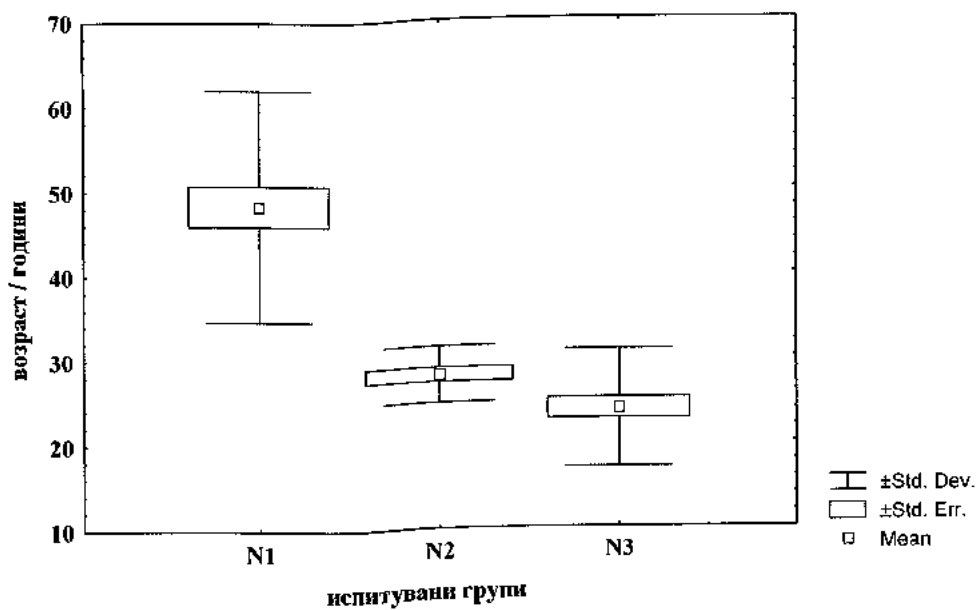
Анализата на варијанса покажа дека постојат статистички значајни (сигнификантни) разлики помеѓу трите испитувани групи во однос на средните вредности на возраста (ANOVA: $F = 50,664$ $p = 0,00001$). Tukey HSD test ги покажува поединечните разлики помеѓу испитуваните групи во однос на возраста / год. Испитаниците со хронична пародонтопатија се значајно повозрасни во однос на испитаниците со агресивна пародонтопатија и здравите испитаници. Помеѓу испитаниците со агресивна пародонтопатија и здравите испитаници разликите во однос на возраста не се значајни. (Табела бр. 1, Графикон бр. 1 и Табела бр. 1A).

Табела бр. 1А. Значајност на разлики на средните вредности на возраста кај испитуваните групи

споредувани групи	Tukey HSD test (p)
N1 - N2	0.00011*
N1 - N3	0.00013*
N2 - N3	0.3813

* статистички значајна разлика

Графикон бр. 1. Дистрибуција на испитаниците од трите испитувани групи според возраст



Табела бр. 2. Дистрибуција на испитаниците од трите испитувани групи според индекс на дентален плак (IDP)

Испитувана група	просек	SD	min	max
(N1) Хронична пародонтопатија	2.37	0.61	1	3
(N2) Агресивна пародонтопатија	1.07	0.26	1	2
(N3) Здрави - контролна група	1.16	0.37	1	2

Анализата на варијанса покажа дека постојат статистички значајни (сигнификантни) разлики помеѓу трите испитувани групи во однос на средните вредности на индексот на дентален плак (IDP) (ANOVA: $F = 64,488$ $p = 0,00001$). Tukey HSD test ги покажува поединечните разлики помеѓу испитуваните групи во однос на индексот на дентален плак (IDP). Испитаниците со хронична пародонтопатија имаат значајно повисоки средни вредности на IDP во однос на испитаниците со агресивна пародонтопатија и здравите испитаници. Помеѓу испитаниците со агресивна пародонтопатија и здравите испитаници разликите во однос на IDP не се значајни. (Табела бр. 2, Графикон бр. 2 и Табела бр. 2A)

Табела бр. 2A. Значајност на разлики на средните вредности на индекс на дентален плак (IDP) кај испитуваните групи

споредувани групи	Tukey HSD test (p)
N1 - N2	0.00011*
N1 - N3	0.00011*
N2 - N3	0.7830

* статистички значајна разлика

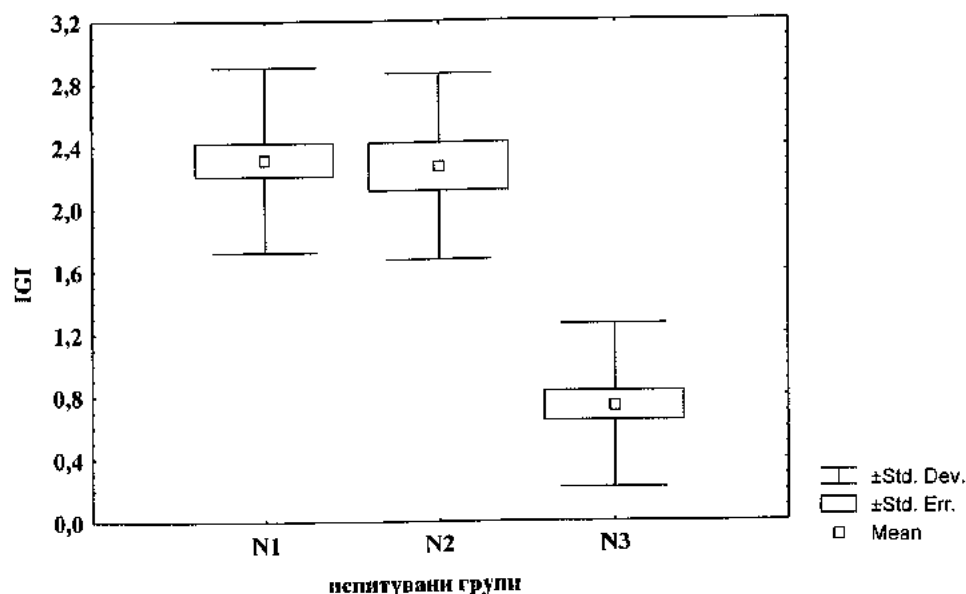
Постојат статистички значајни (сигнификантни) разлики помеѓу трите испитувани групи во однос на средните вредности на индексот на гингивална инфламација (IGI) - (ANOVA: $F = 70,084$ $p = 0,00001$). Tukey HSD test ги покажува поединечните разлики помеѓу испитуваните групи во однос на индексот на гингивалната инфламација (IGI). Испитаниците со хронична и со агресивна пародонтопатија имаат значајно повисоки средни вредности на IGI во однос на здравите испитаници. Помеѓу испитаниците со хронична пародонтопатија и оние со агресивна пародонтопатија разликите во однос на IGI не се значајни ($p = 0,9638$). (Табела бр. 3, Графикон бр. 3 и Табела бр. 3А)

Табела бр. 3А. Значајност на разлики на средните вредности на индекс на гингивална инфламација (IGI) кај испитуваните групи

споредувани групи	Tukey HSD test (p)
N1 - N2	0.9638
N1 - N3	0.00011*
N2 - N3	0.00011*

* статистички значајна разлика

Графикон бр. 3. Дистрибуција на испитаниците од трите испитувани групи според индекс на гингивална инфламација (IGI)

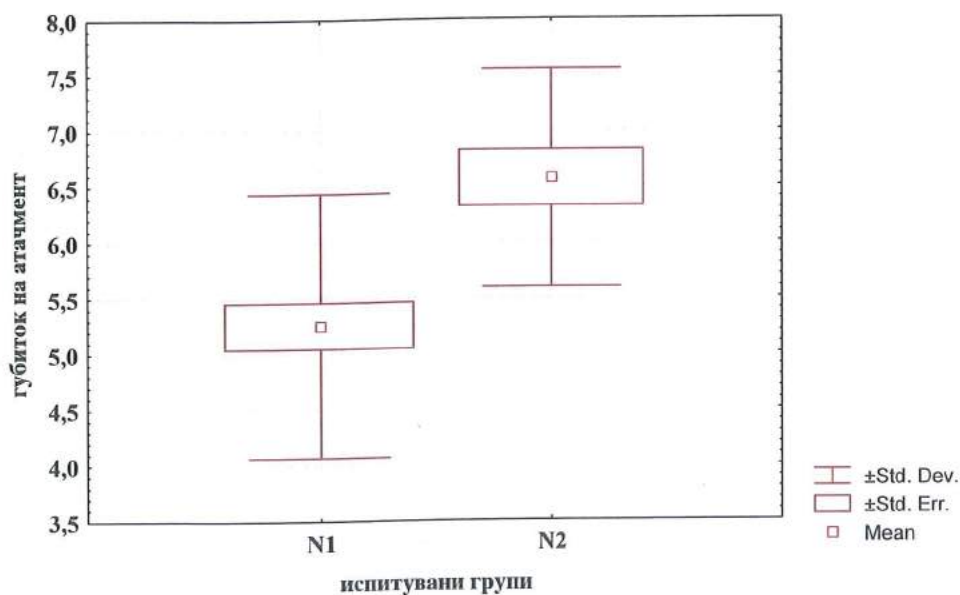


Табела бр. 4. Дистрибуција на испитаниците од двете испитувани групи според губиток на атачмент

Испитувана група	просек	SD	min	max
(N1) Хронична пародонтопатија	5.25	1.18	4	7
(N2) Агресивна пародонтопатија	6.57	0.98	5	8

Помеѓу испитаниците со хронична пародонтопатија и оние со агресивна пародонтопатија постојат сигнификантни разлики во однос на губитокот на атачмент (Mann-Whitney U Test: $Z = -3,161$ $p = 0,00157$). Испитаниците со агресивна пародонтопатија имаат значајно повисоки средни вредности на губиток на атачмент. Кај здравите испитаници (N3) - контролна група - клинички непостои губиток на атачмент. (Табела бр. 4 и Графикон бр. 4)

Графикон бр. 4. Дистрибуција на испитаниците од двете испитувани групи според губиток на атачмент

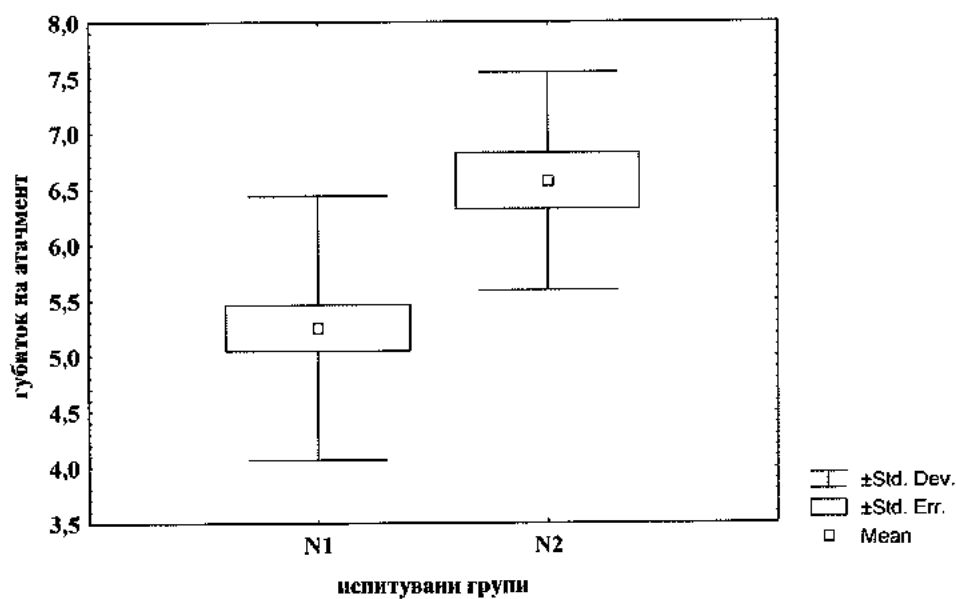


Табела бр. 4. Дистрибуција на испитаниците од двете испитувани групи според губиток на атачмент

Испитувана група	просек	SD	min	max
(N1) Хронична пародонтопатија	5.25	1.18	4	7
(N2) Агресивна пародонтопатија	6.57	0.98	5	8

Помеѓу испитаниците со хронична пародонтопатија и оние со агресивна пародонтопатија постојат сигнификантни разлики во однос на губитокот на атачмент (Mann-Whitney U Test: $Z = -3,161$ $p = 0,00157$). Испитаниците со агресивна пародонтопатија имаат значајно повисоки средни вредности на губиток на атачмент. Кај здравите испитаници (N3) - контролна група - клинички непостои губиток на атачмент. (Табела бр. 4 и Графикон бр. 4)

Графикон бр. 4. Дистрибуција на испитаниците од двете испитувани групи според губиток на атачмент



Табела бр. 5. Дистрибуција на испитаниците од трите испитувани групи според MMP - 1

Испитувана група	просек	SD	min	max
(N1) Хронична пародонтопатија	749.02	338.03	301.36	1456.76
(N2) Агресивна пародонтопатија	658.35	416.85	205.19	1801.11
(N3) Здрави - контролна група	232.72	73.56	60.61	397.66

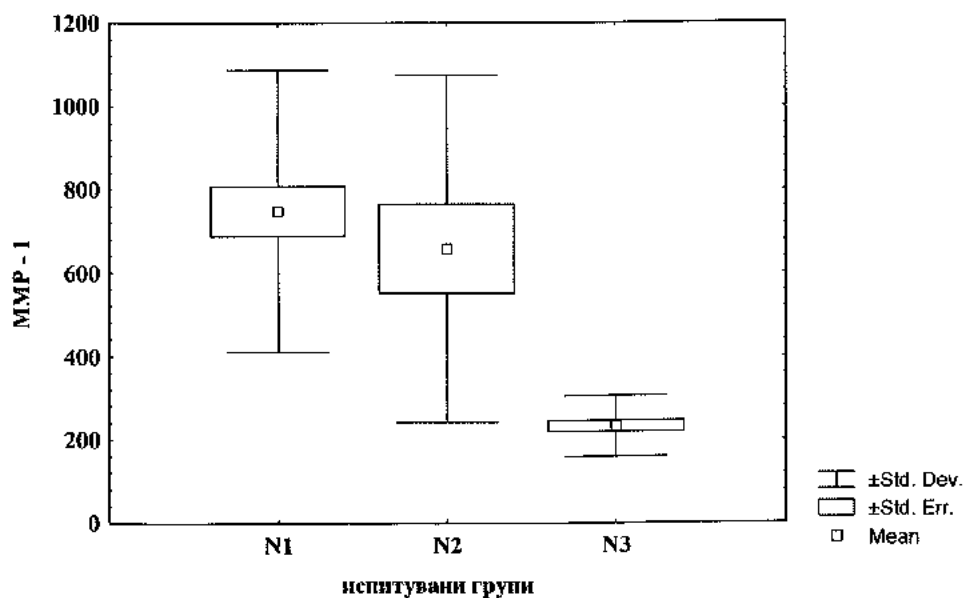
Постојат статистички значајни (сигнификантни) разлики помеѓу трите испитувани групи во однос на средните вредности на MMP - 1 (ANOVA: $F = 26,751$ $p = 0,00001$). Tukey HSD test ги покажува поединечните разлики помеѓу испитуваните групи во однос на MMP - 1. Испитаниците со хронична и со агресивна пародонтопатија имаат значајно повисоки средни вредности на MMP - 1 во однос на здравите испитаници. Помеѓу испитаниците со хронична пародонтопатија и оние со агресивна пародонтопатија разликите во однос на MMP - 1 не се значајни ($p = 0,5751$). (Табела бр. 5, Графикон бр. 5 и Табела бр. 5A)

Табела бр. 5A. Значајност на разлики на средните вредности на MMP - 1 кај испитуваните групи

споредувани групи	Tukey HSD test (p)
N1 - N2	0.5751
N1 - N3	0.00011*
N2 - N3	0.00014*

статистички значајна разлика

Графикон бр. 5. Дистрибуција на испитаниците од трите испитувани групи според MMP - 1



Табела бр. 6. Дистрибуција на испитаниците од трите испитувани групи според MMP - 8

Испитувана група	просек	SD	min	max
(N1) Хронична пародонтопатија	385.72	157.08	95.31	698.23
(N2) Агресивна пародонтопатија	275.98	60.20	199.41	387.92
(N3) Здрави - контролна група	101.81	55.38	46.23	258.81

Постојат статистички сигнификантни разлики помеѓу трите испитувани групи во однос на средните вредности на MMP - 8 (ANOVA: $F = 51,426$ $p = 0,00001$). Tukey HSD test ги покажува поединечните разлики помеѓу испитуваните групи во однос на MMP - 8. Испитаниците со хронична

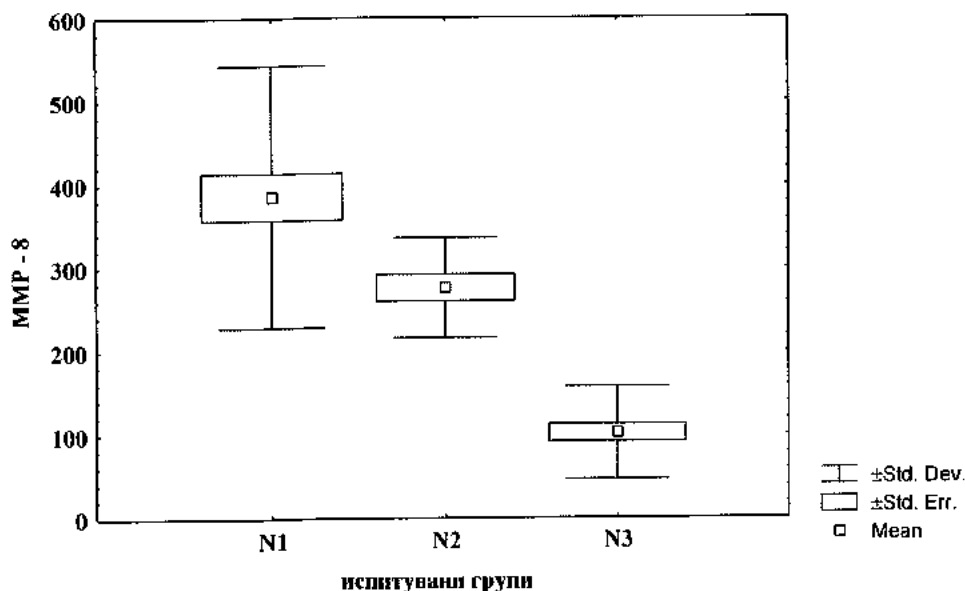
и со агресивна пародонтопатија имаат значајно повисоки средни вредности на MMP - 8 во однос на здравите испитаници. Понеѓу испитаниците со хронична пародонтопатија и оние со агресивна пародонтопатија исто така разликите во однос на MMP - 8 се значајни ($p = 0,00627$) - значајно повисоки кај лицата со хронична пародонтопатија. (Табела бр. 6, Графикон бр. 6 и Табела бр. 6А)

Табела бр. 6А. Значајност на разлики на средните вредности на MMP - 8 кај испитуваните групи

споредувани групи	Tukey HSD test (p)
N1 - N2	0.00627*
N1 - N3	0.00011*
N2 - N3	0.00012*

* статистички значајна разлика

Графикон бр. 6 Дистрибуција на испитаниците од трите испитувани групи според MMP - 8



Табела бр. 7. Дистрибуција на испитаниците од трите испитувани групи според MMP – 13

Испитувана група	просек	SD	min	max
(N1) Хронична пародонтопатија	531.57	282.03	153.81	1096.68
(N2) Агресивна пародонтопатија	501.80	239.72	280.38	1005.56
(N3) Здрави - контролна група	121.49	50.93	59.17	232.69

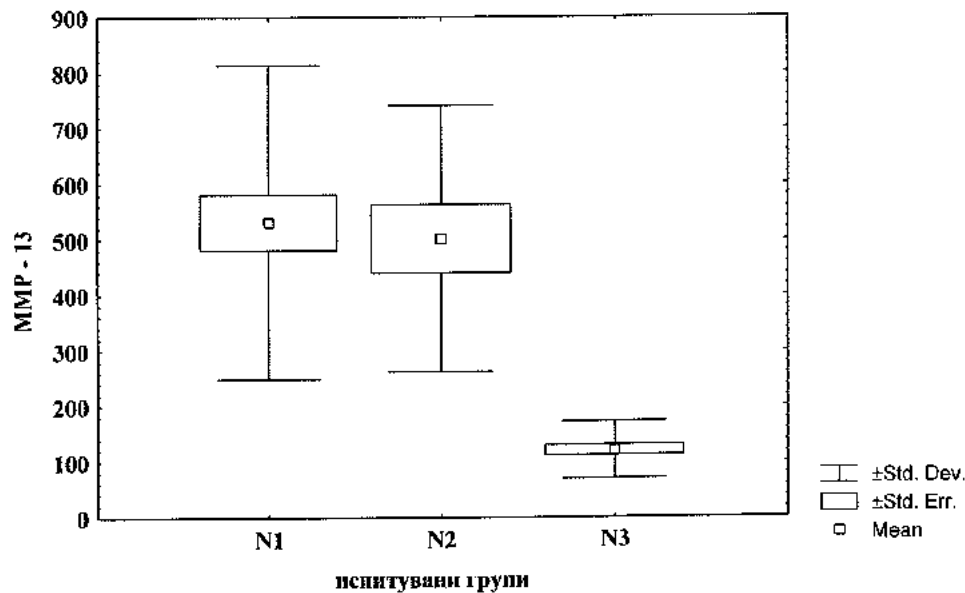
Постојат статистички сигнификантни разлики помеѓу трите испитувани групи во однос на средните вредности на MMP - 13 (ANOVA: $F = 32,596$ $p = 0,00001$). Tukey HSD test ги покажува поединечните разлики помеѓу испитуваните групи во однос на MMP – 13. Испитаниците со хронична и со агресивна пародонтопатија имаат значајно повисоки средни вредности на MMP - 13 во однос на здравите испитаници. Помеѓу испитаниците со хронична пародонтопатија и оние со агресивна пародонтопатија разликите во однос на MMP - 13 не се значајни ($p = 0,8957$). (Табела бр. 7, Графикон бр. 7 и Табела бр. 7А)

Табела бр. 7А. Значајност на разлики на средните вредности на MMP – 13 кај испитуваните групи

споредувани групи	Tukey HSD test (p)
N1 - N2	0.8957
N1 - N3	0.00010*
N2 - N3	0.00012*

* статистички значајна разлика

Графикон бр. 7. Дистрибуција на испитаниците од трите испитувани групи според MMP – 13



Табела бр. 8. Дистрибуција на испитаниците од трите испитувани групи според индекс на коскена ресорпција

Испитувана група	просек	SD	min	max
(N1) Хронична пародонтопатија	3.00	0.92	2	4
(N2) Агресивна пародонтопатија	4.53	0.51	4	5
(N3) Здрави - контролна група	1.13	0.34	1	2

Постојат статистички сигнификантни разлики помеѓу трите испитувани групи во однос на индексот на коскена ресорпција (ANOVA: $F = 140,039$ $p = 0,000001$). Tukey HSD test ги покажува поединечните разлики помеѓу испитуваните групи во однос на индексот на коскена ресорпција.

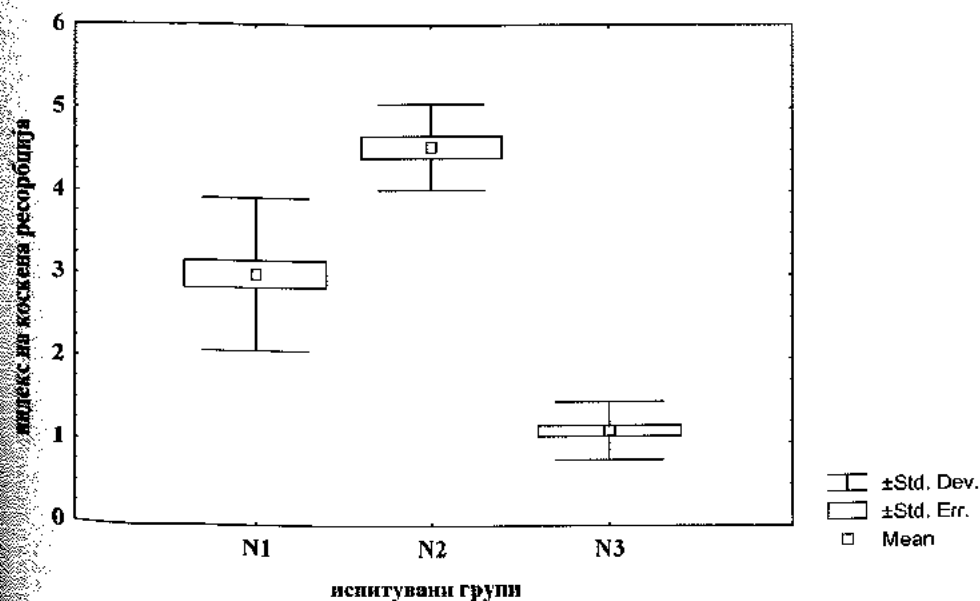
Испитаниците со хронична и со агресивна пародонтопатија имаат сигнификантно повисоки средни вредности на индексот на коскена ресорпција во однос на здравите испитаници. Помеѓу испитаниците со хронична пародонтопатија и оние со агресивна пародонтопатија исто така разликите во однос на коскената ресорпција се сигнификантни ($p = 0,00010$), односно, значајно повеќе се регистрира губиток на коска кај лицата со агресивна пародонтопатија. (Табела бр. 8, Графикон бр. 8 и Табела бр. 8А)

Табела бр. 8А. Значајност на разлики на средните вредности на индекс на коскена ресорпција кај испитуваните групи

споредувани групи	Tukey HSD test (p)
N1 - N2	0.00010*
N1 - N3	0.00001*
N2 - N3	0.000001*

* статистички значајна разлика

Графикон бр. 8. Дистрибуција на испитаниците од трите испитувани групи според индекс на коскена ресорпција

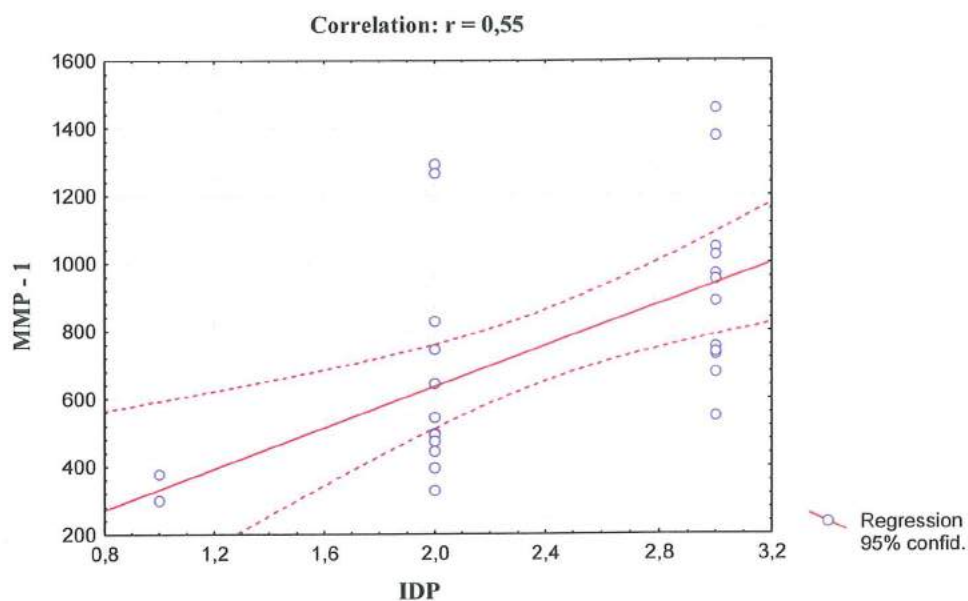


Табела бр. 9. Корелација помеѓу IDP и MMP - 1, MMP - 8 и MMP - 13 кај пациенти со хронична пародонтопатија

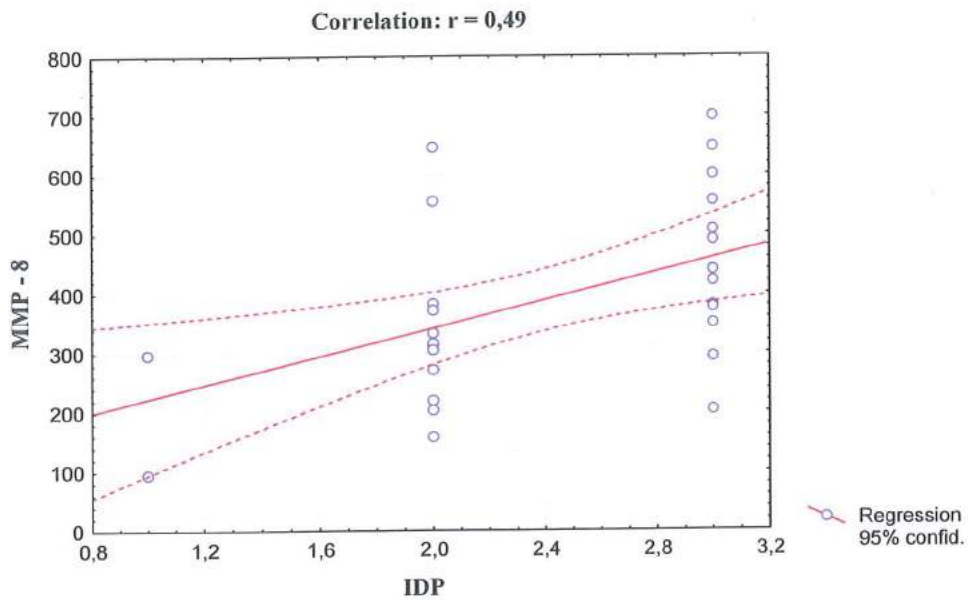
параметар	маркери	Pearson – ов коэффициент (r)
IDP	MMP - 1	r = 0,55
	MMP - 8	r = 0,49
	MMP - 13	r = 0,45

Кај пациентите со хронична пародонтопатија помеѓу индексот на дентален плак (IDP) и MMP - 1, MMP - 8 и MMP - 13 постои значајна, средно јака корелација. (Табела бр. 9, Графикон бр. 9А, Графикон бр. 9Б и Графикон бр. 9В)

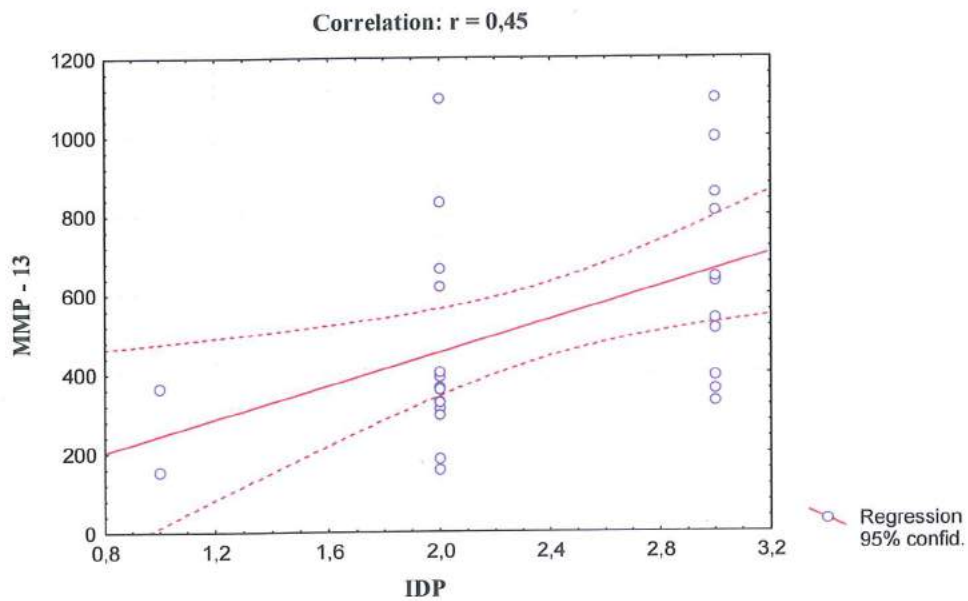
Графикон бр. 9А. Корелација помеѓу IDP и MMP - 1 кај пациенти со хронична пародонтопатија



Графикон бр. 9Б. Корелација помеѓу IDP и MMP - 8 кај пациенти со хронична пародонтопатија



Графикон бр. 9В. Корелација помеѓу IDP и MMP - 13 кај пациенти со хронична пародонтопатија

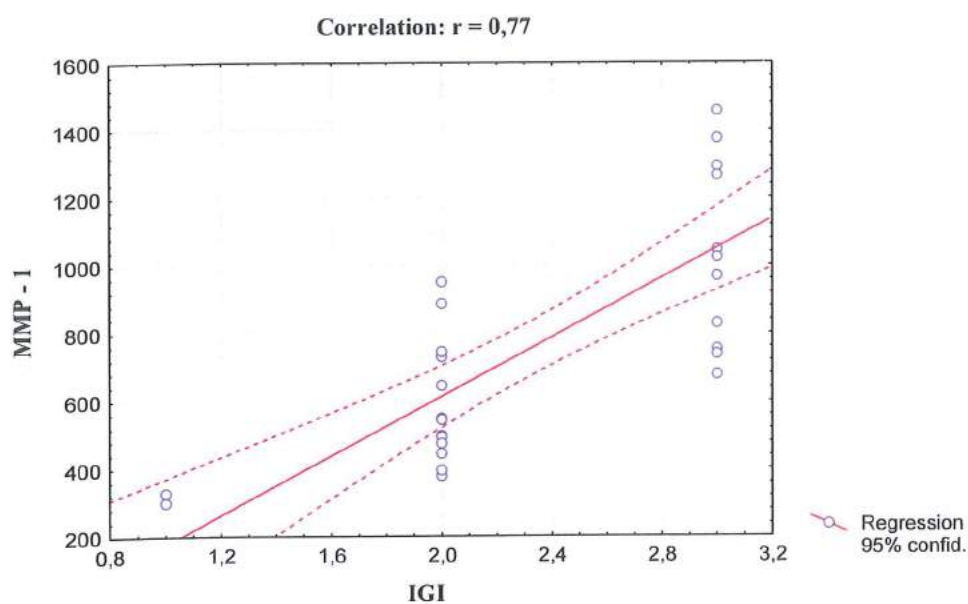


Табела бр. 10. Корелација помеѓу IGI и MMP - 1, MMP - 8 и MMP - 13 кај пациенти со хронична пародонтопатија

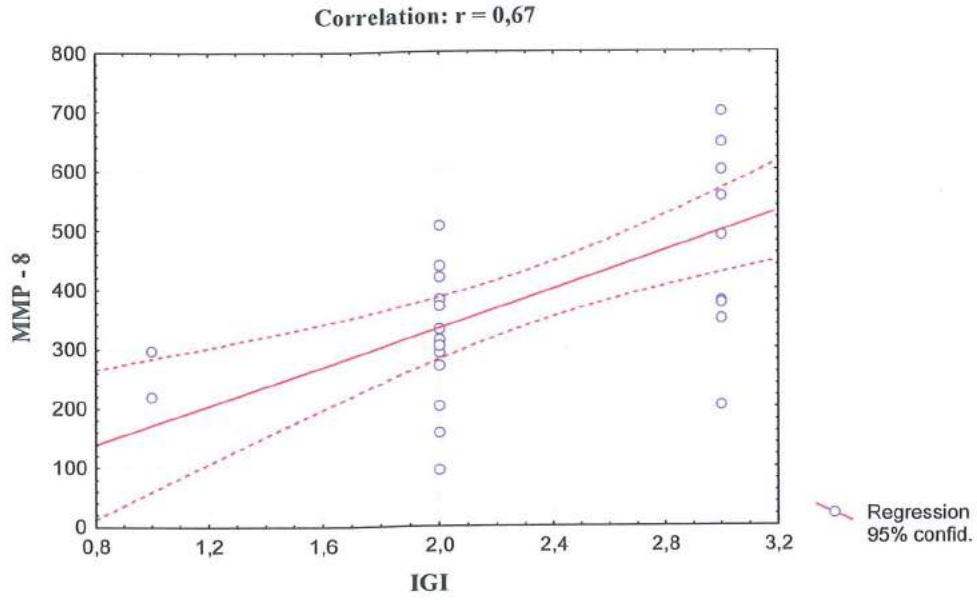
параметар	маркери	Pearson – ов коефициент (r)
IGI	MMP - 1	r = 0,77
	MMP - 8	r = 0,67
	MMP - 13	r = 0,62

Кај пациентите со хронична пародонтопатија помеѓу индексот на гингивална инфламација (IGI) и MMP - 1, MMP - 8 и MMP - 13 постои значајна, јака корелација. (Табела бр. 10, Графикон бр. 10А, Графикон бр. 10Б и Графикон бр. 10В)

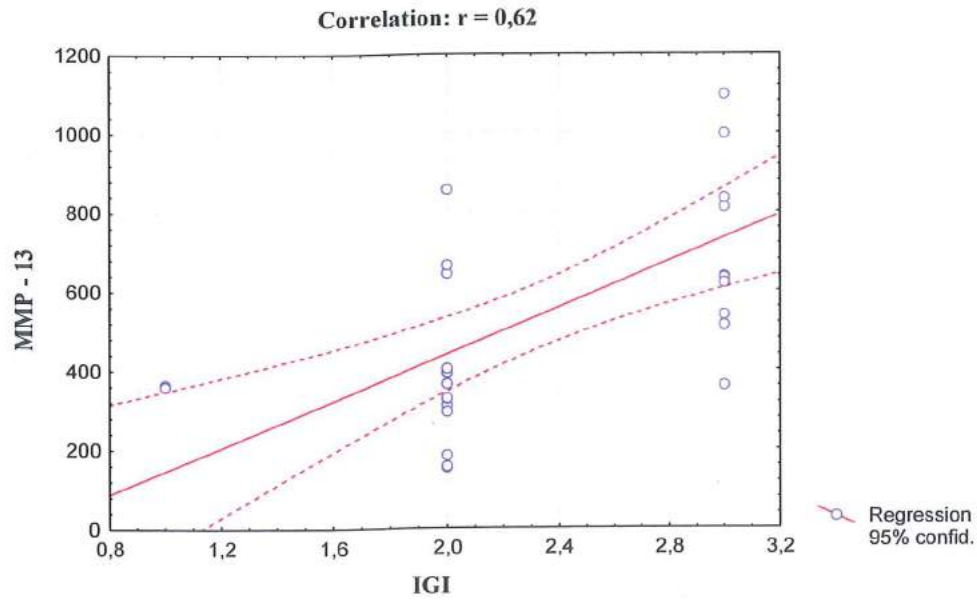
Графикон бр. 10А. Корелација помеѓу IGI и MMP - 1 кај пациенти со хронична пародонтопатија



Графикон бр. 10Б. Корелација помеѓу IGI и MMP - 8 кај пациенти со хронична пародонтопатија



Графикон бр. 10В. Корелација помеѓу IGI и MMP - 13 кај пациенти со хронична пародонтопатија

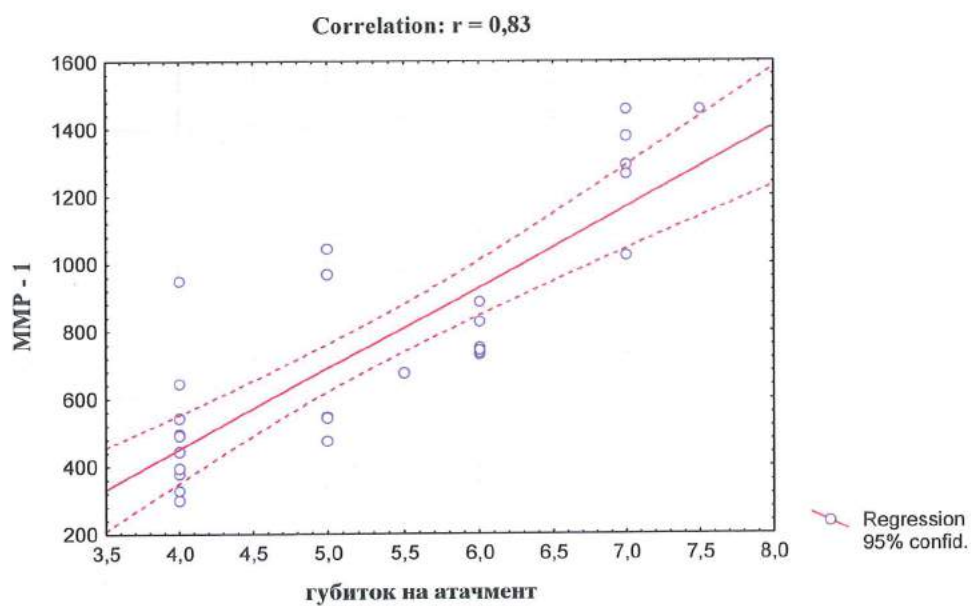


Табела бр. 11. Корелација помеѓу губиток на атачмент и MMP - 1, MMP - 8 и MMP - 13 кај пациенти со хронична пародонтопатија

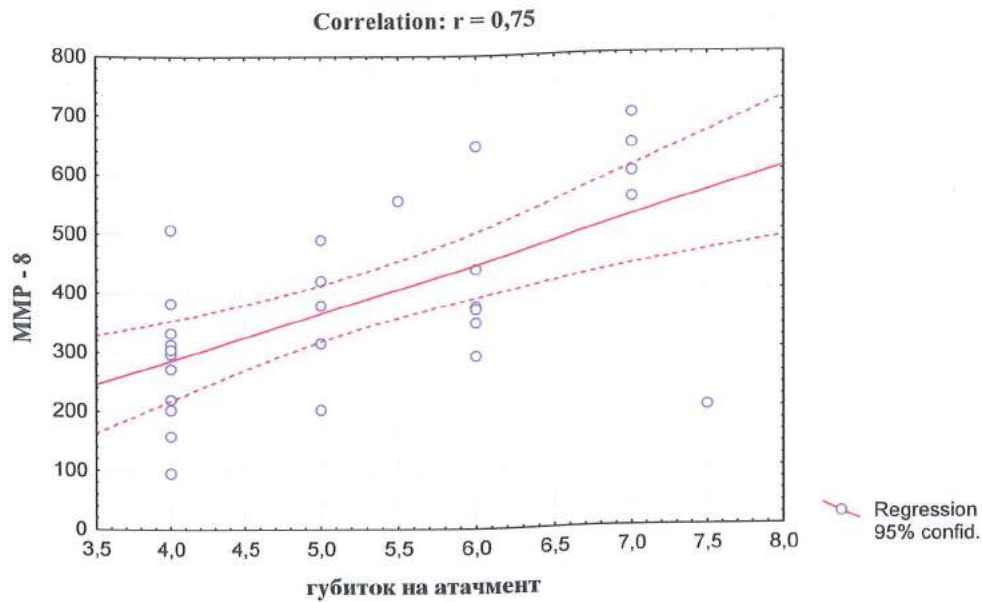
параметар	маркери	Pearson – ов коэффициент (r)
Губиток на атачмент	MMP - 1	r = 0,83
	MMP - 8	r = 0,75
	MMP - 13	r = 0,81

Кај пациентите со хронична пародонтопатија помеѓу губитокот на атачментот и MMP - 1, MMP - 8 и MMP - 13 постои многу значајна, многу јака корелација. (Табела бр. 11, Графикон бр. 11А, Графикон бр. 11Б и Графикон бр. 11В)

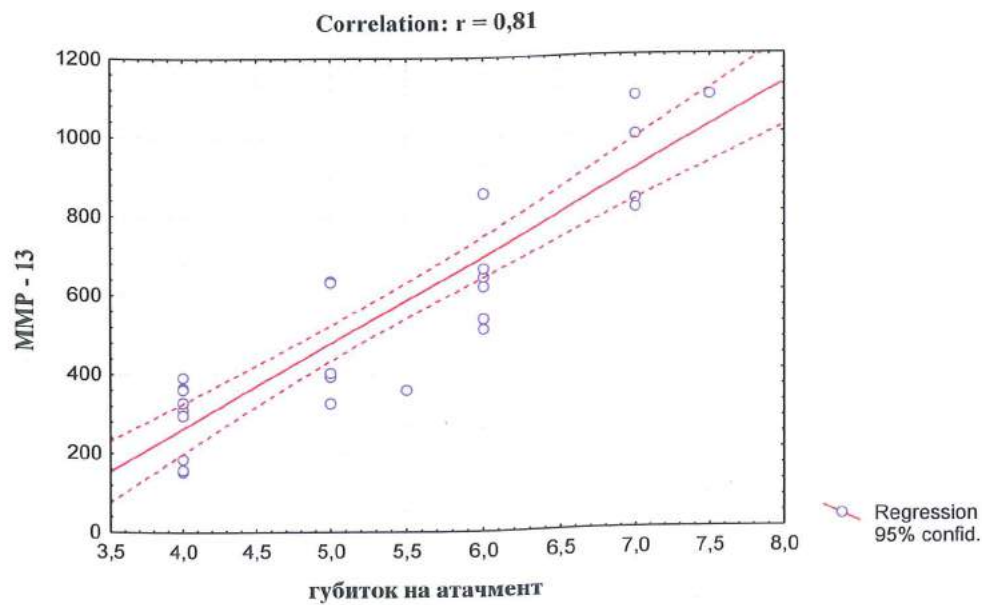
Графикон бр. 11А. Корелација помеѓу губитокот на атачментот и MMP - 1 кај пациенти со хронична пародонтопатија



Графикон бр. 11Б. Корелација помеѓу губитокот на атачментот и ММР - 8 кај пациенти со хронична пародонтопатија



Графикон бр. 11В. Корелација помеѓу губитокот на атачментот и ММР - 13 кај пациенти со хронична пародонтопатија

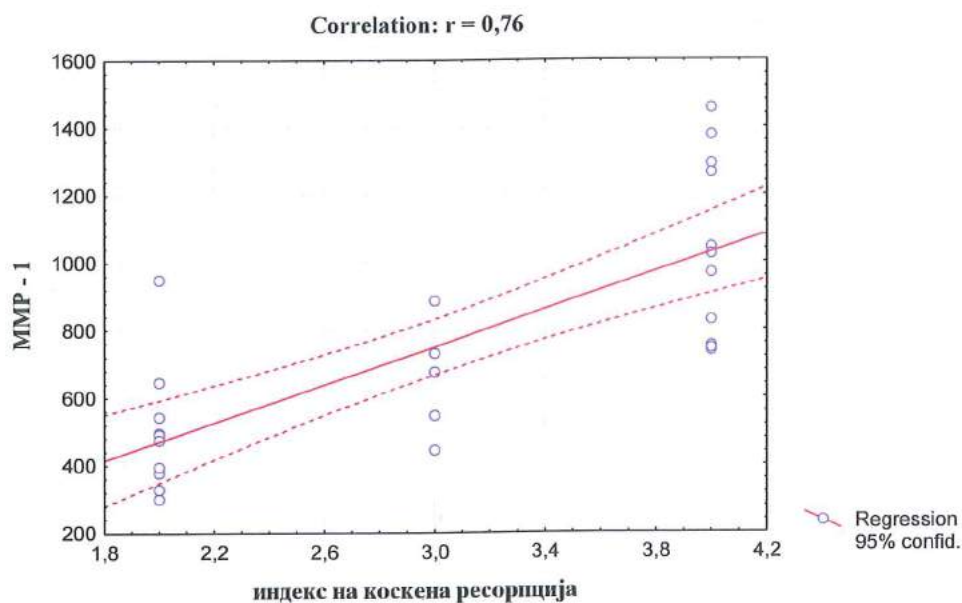


Табела бр. 12. Корелација помеѓу индекс на коскена ресорпција и MMP - 1, MMP - 8 и MMP - 13 кај пациенти со хронична пародонтопатија

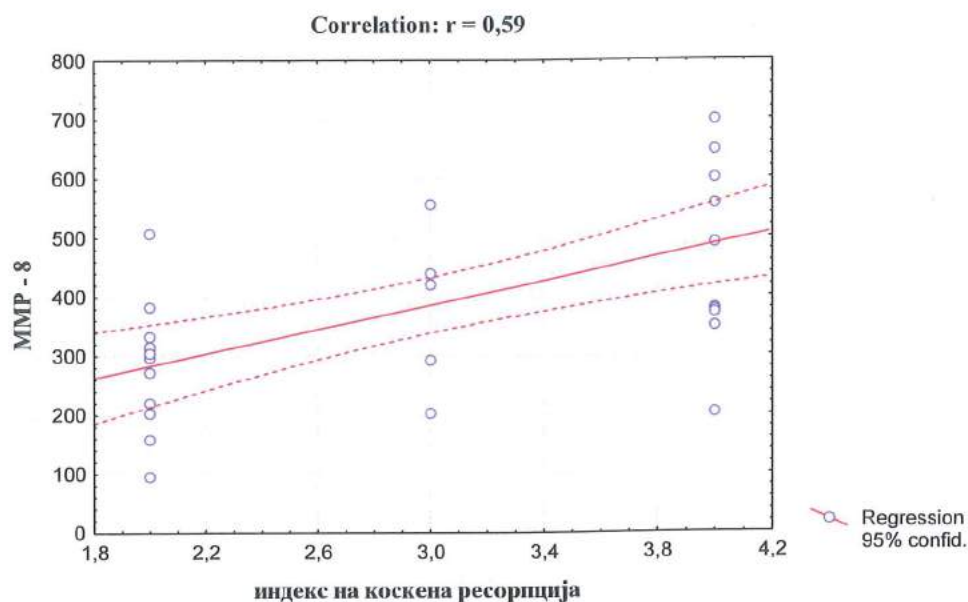
параметар	маркери	Pearson – ов коефициент (r)
Индекс на коскена ресорпција	MMP - 1	r = 0,76
	MMP - 8	r = 0,59
	MMP - 13	r = 0,77

Кај пациентите со хронична пародонтопатија помеѓу индексот на коскена ресорпција и MMP - 1, MMP - 8 и MMP - 13 постои значајна, јака (со MMP - 8) до многу јака корелација (со MMP - 1 и со MMP - 13). (Табела бр. 12, Графикон бр. 12А, Графикон бр. 12Б и Графикон бр. 12В)

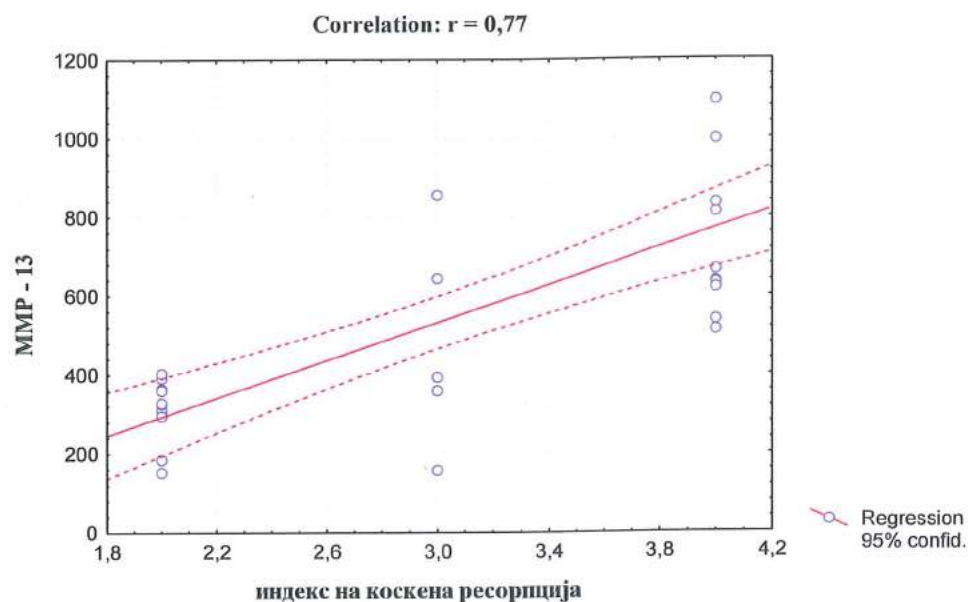
Графикон бр. 12А. Корелација помеѓу индексот на коскена ресорпција и MMP - 1 кај пациентите со хронична пародонтопатија



Графикон бр. 12Б. Корелација помеѓу индексот на коскена ресорпција и MMP - 8 кај пациентите со хронична пародонтопатија



Графикон бр. 12В. Корелација помеѓу индексот на коскена ресорпција и MMP - 13 кај пациентите со хронична пародонтопатија

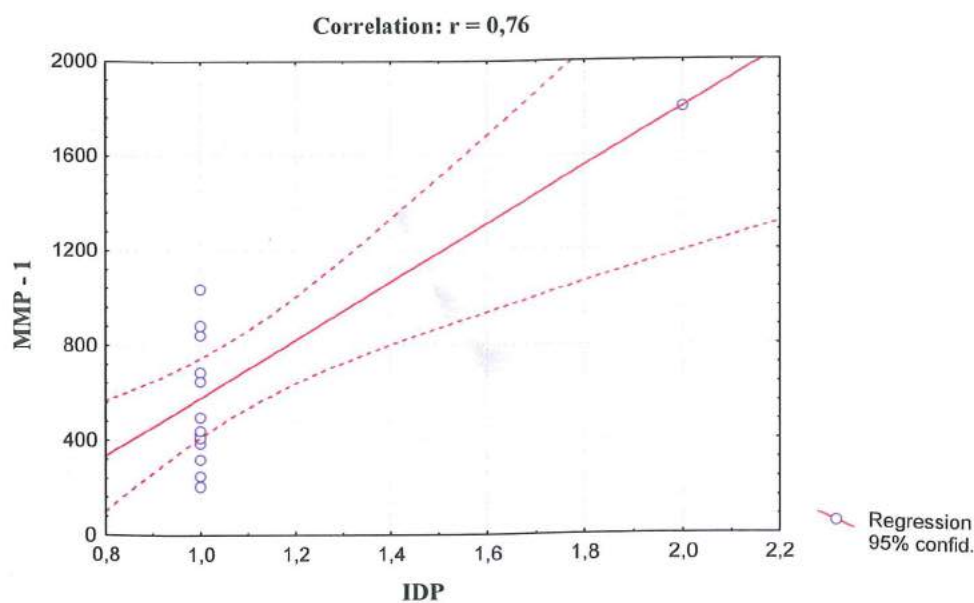


Табела бр. 13. Корелација помеѓу IDP и MMP - 1, MMP - 8 и MMP - 13 кај пациентите со агресивна пародонтопатија

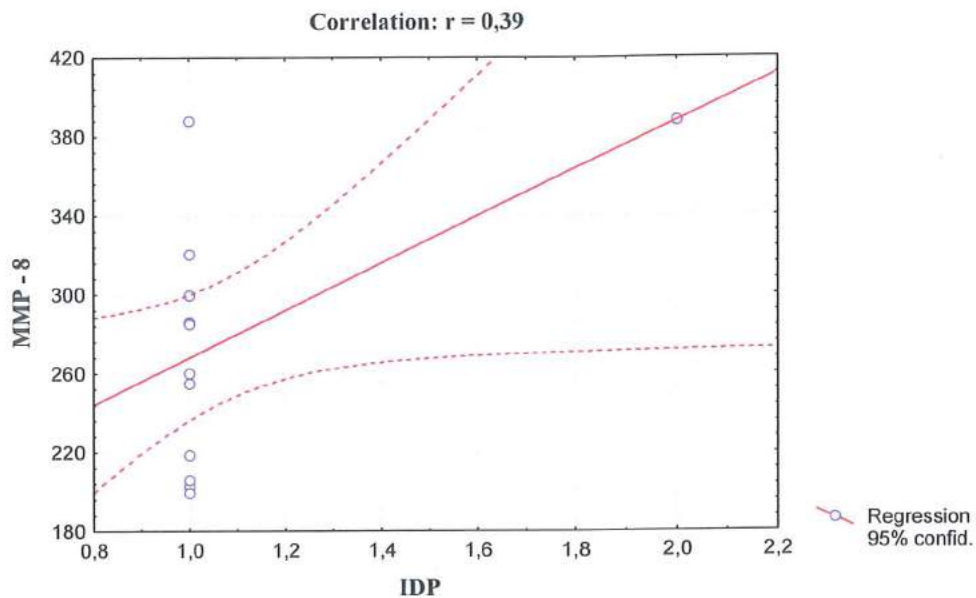
параметар	маркери	Pearson – ов коэффициент (r)
IDP	MMP - 1	r = 0,76
	MMP - 8	r = 0,39
	MMP - 13	r = 0,23

Кај пациентите со агресивна пародонтопатија помеѓу индексот на дентален плак (IDP) и MMP - 1 постои значајна, многу јака корелација; во однос на MMP – 8 корелацијата е умерена, а во однос на MMP – 13 корелацијата е слаба. (Табела бр. 13, Графикон бр. 13А, Графикон бр. 13Б и Графикон бр. 13В)

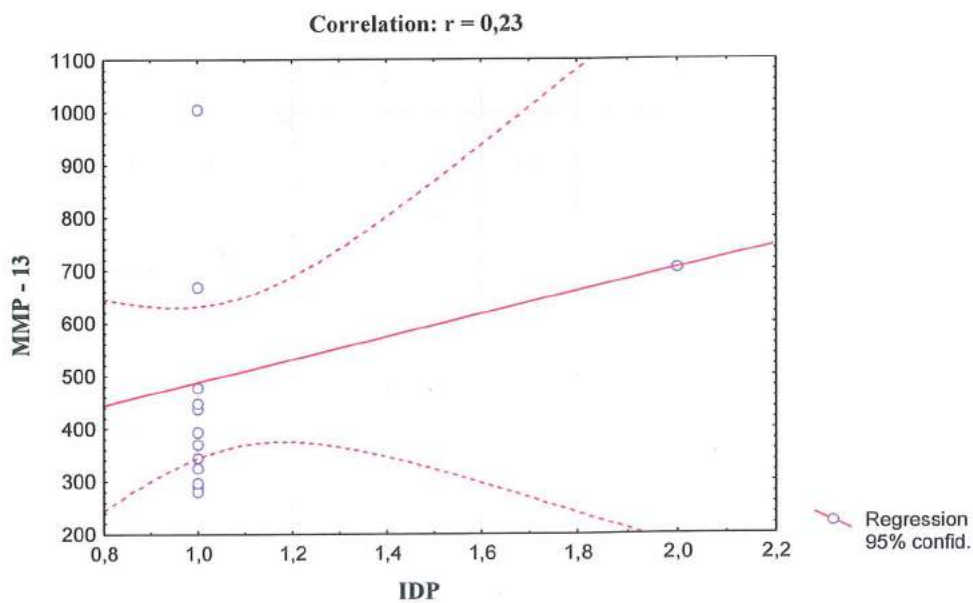
Графикон бр. 13А. Корелација помеѓу IDP и MMP - 1 кај пациентите со агресивна пародонтопатија



Графикон бр. 13Б. Корелација помеѓу IDP и MMP - 8 кај пациентите со агресивна пародонтопатија



Графикон бр. 13В. Корелација помеѓу IDP и MMP - 13 кај пациентите со агресивна пародонтопатија

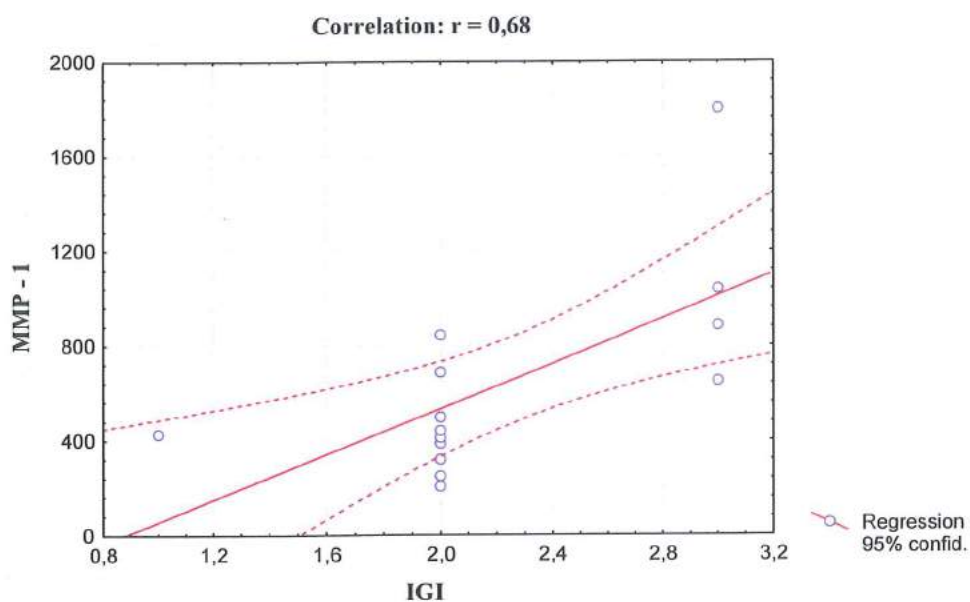


Табела бр. 14. Корелација помеѓу IGI и MMP - 1, MMP - 8 и MMP - 13 кај пациентите со агресивна пародонтопатија

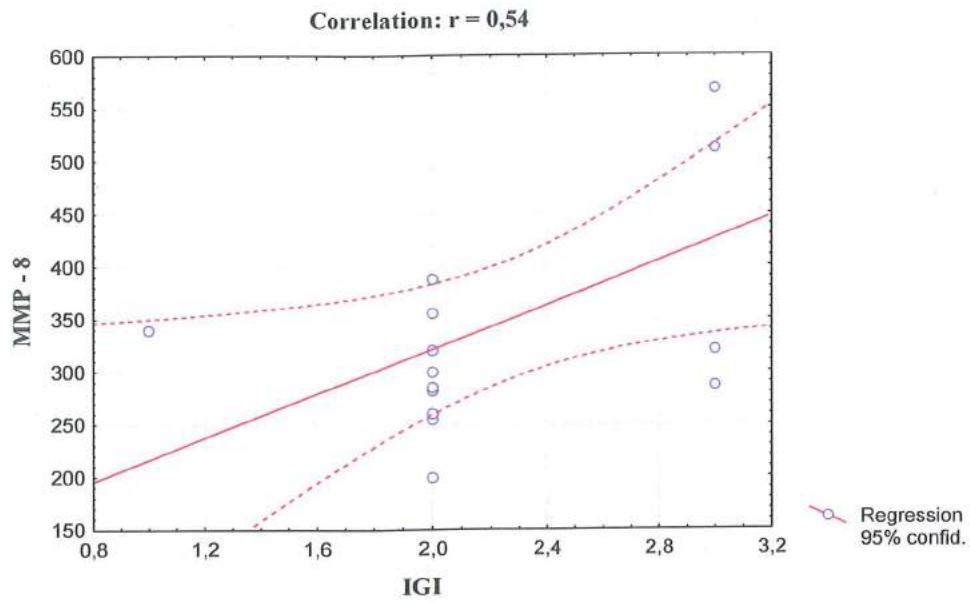
параметар	маркери	Pearson – ов коефициент (r)
IGI	MMP - 1	r = 0,68
	MMP - 8	r = 0,54
	MMP - 13	r = 0,67

Кај пациентите со агресивна пародонтопатија помеѓу индексот на гингивална инфламација (IGI) и MMP - 1, MMP - 8 и MMP - 13 постои значајна, јака корелација. (Табела бр. 14, Графикон бр. 14А, Графикон бр. 14Б и Графикон бр. 14В)

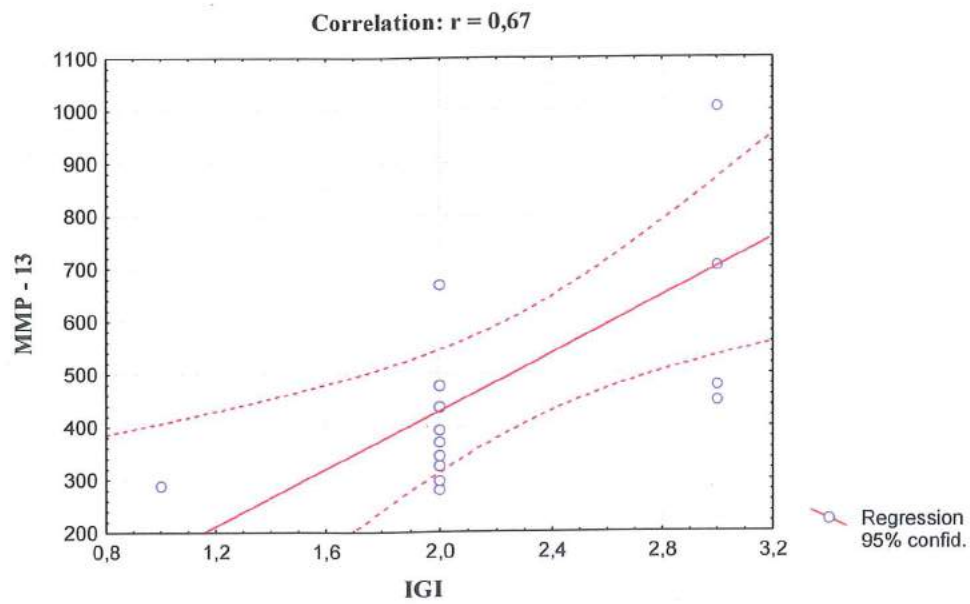
Графикон бр. 14А. Корелација помеѓу IGI и MMP - 1 кај пациентите со агресивна пародонтопатија



Графикон бр. 14Б. Корелација помеѓу IGI и MMP - 8 кај пациентите со агресивна пародонтопатија



Графикон бр. 14В. Корелација помеѓу IGI и MMP - 13 кај пациентите со агресивна пародонтопатија

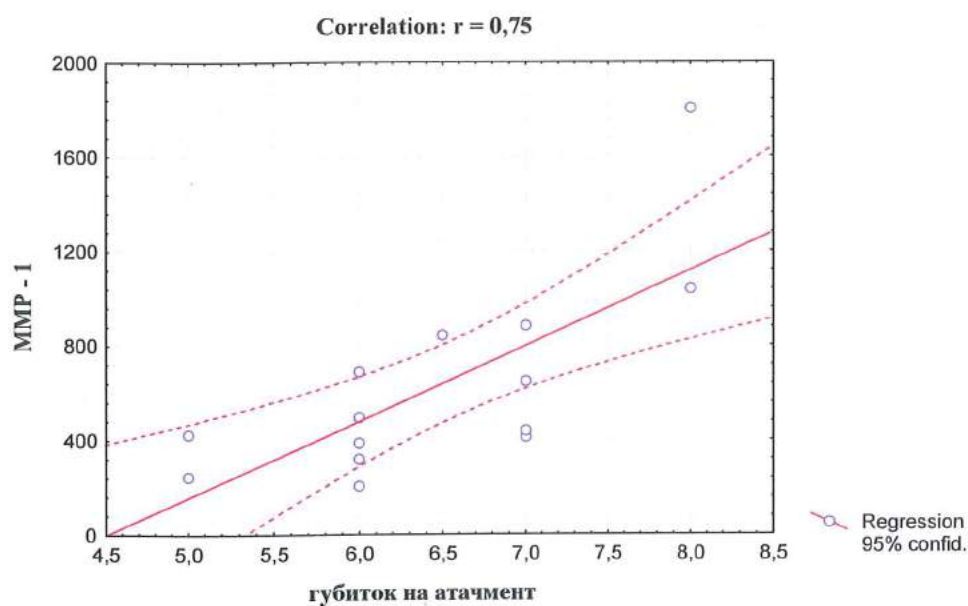


Табела бр. 15. Корелација помеѓу губиток на атачмент и MMP - 1, MMP - 8 и MMP - 13 кај пациенти со агресивна пародонтопатија

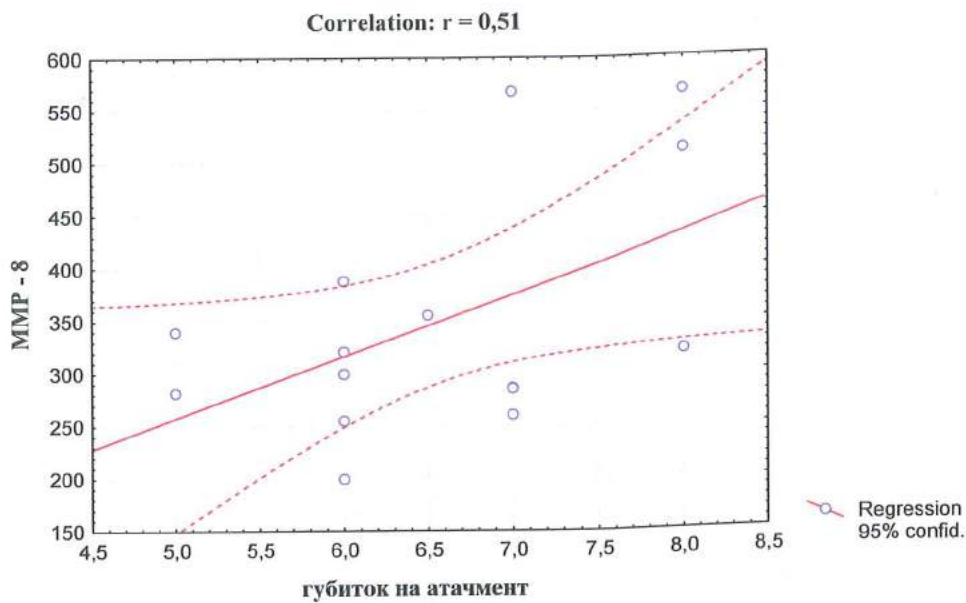
параметар	маркери	Pearson – ов коэффициент (r)
Губиток на атачмент	MMP - 1	r = 0,75
	MMP - 8	r = 0,51
	MMP - 13	r = 0,56

Кај пациентите со агресивна пародонтопатија помеѓу губитокот на атачментот и MMP - 1 постои многу значајна, многу јака корелација, додека со MMP - 8 и MMP - 13 корелацијата е средно јака. (Табела бр. 15, Графикон бр. 15А, Графикон бр. 15Б и Графикон бр. 15В)

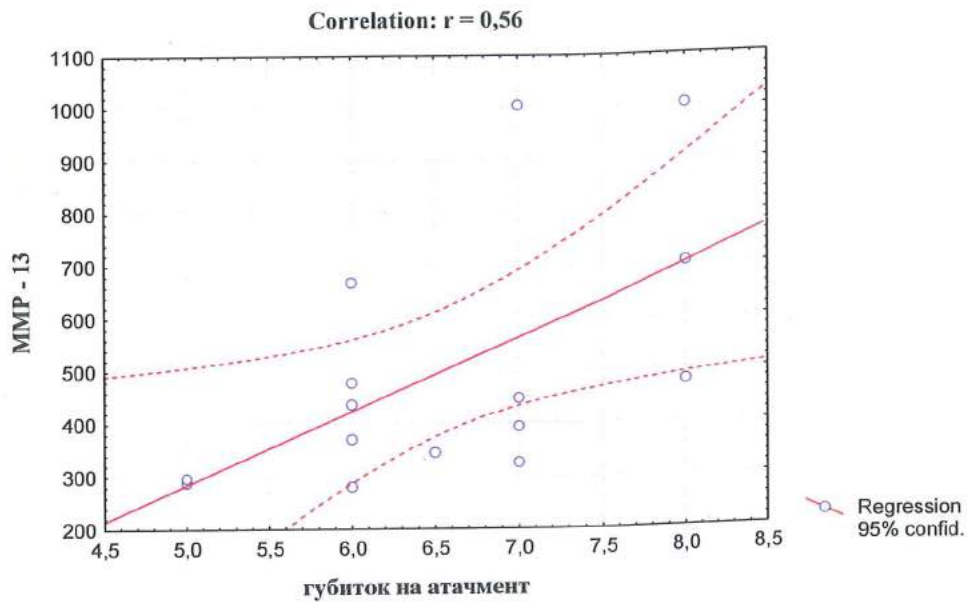
Графикон бр. 15А. Корелација помеѓу губитокот на атачментот и MMP - 1 кај пациентите со агресивна пародонтопатија



Графикон бр. 15Б. Корелација помеѓу губитокот на атачментот и ММР - 8 кај пациентите со агресивна пародонтопатија



Графикон бр. 15В. Корелација помеѓу губитокот на атачментот и ММР - 13 кај пациентите со агресивна пародонтопатија

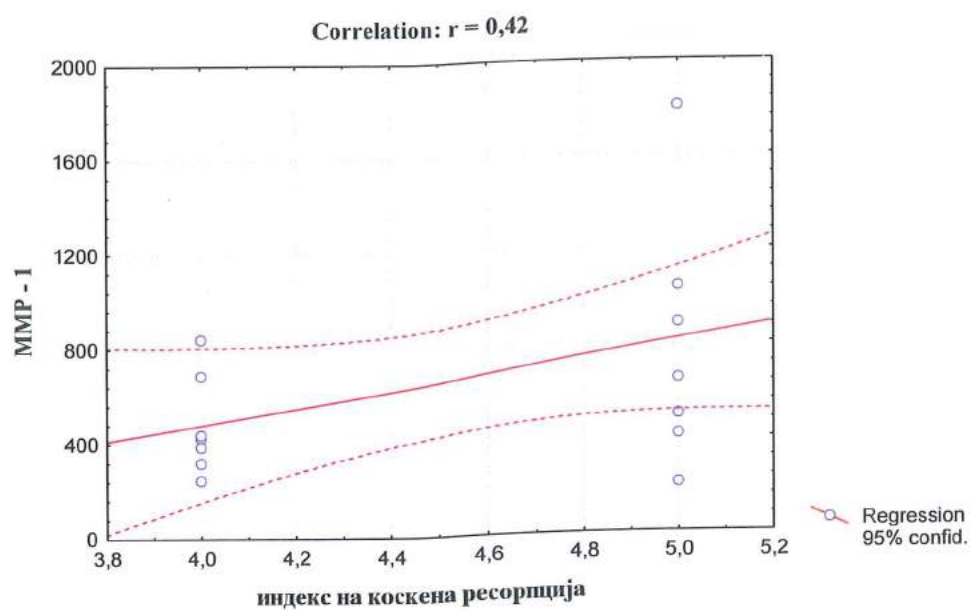


Табела бр. 16. Корелација помеѓу индекс на коскена ресорпција и MMP - 1, MMP - 8 и MMP - 13 кај пациенти со агресивна пародонтопатија

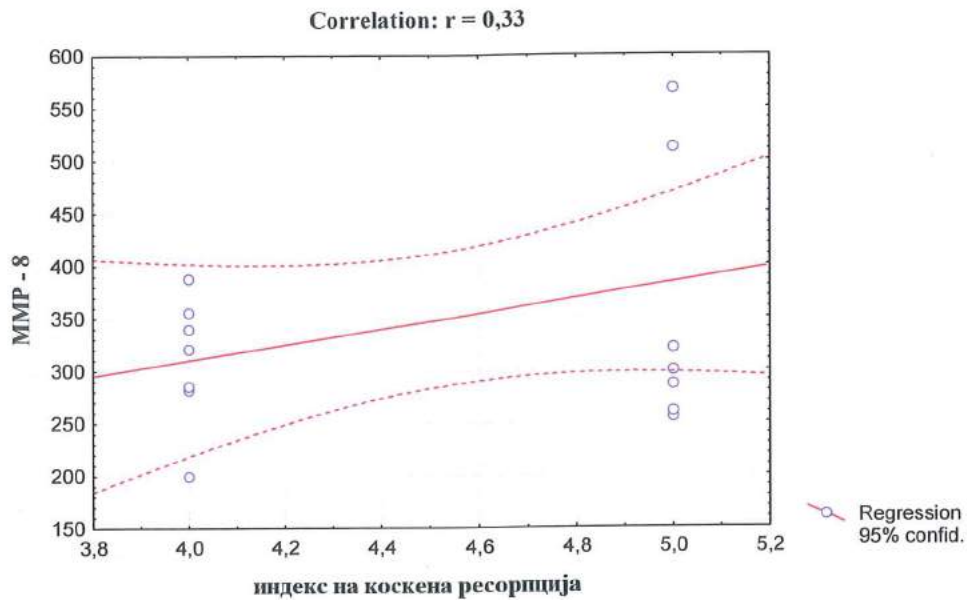
параметар	маркери	Pearson – ов коэффициент (r)
Индекс на коскена ресорпција	MMP - 1	r = 0,42
	MMP - 8	r = 0,33
	MMP - 13	r = 0,65

Кај пациентите со агресивна пародонтопатија помеѓу индексот на коскена ресорпција и MMP - 1 и MMP - 8 постои умерена корелација, додека со MMP - 13 постои значајна, јака корелација. (Табела бр. 16, Графикон бр. 16А, Графикон бр. 16Б и Графикон бр. 16В)

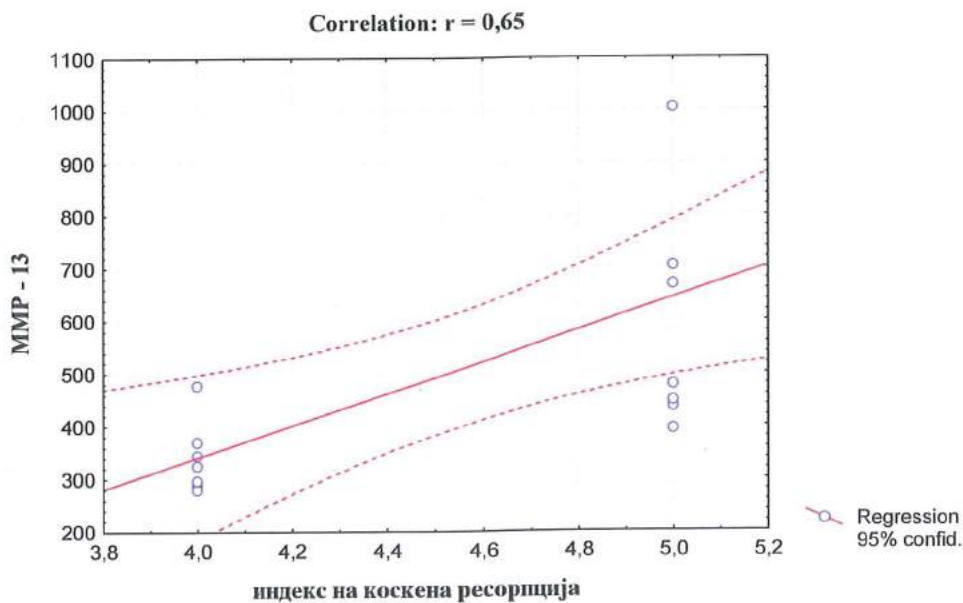
Графикон бр. 16А. Корелација помеѓу индексот на коскена ресорпција и MMP - 1 кај пациенти со агресивна пародонтопатија



Графикон бр. 16Б. Корелација помеѓу индексот на коскена ресорпција и ММР - 8 кај пациенти со агресивна пародонтопатија



Графикон бр. 16В. Корелација помеѓу индексот на коскена ресорпција и ММР - 13 кај пациенти со агресивна пародонтопатија



Табела бр. 17. Корелација помеѓу IDP, IGI и индекс на коскена ресорпција со MMP - 1, MMP - 8 и MMP - 13 кај здравите испитаници без пародонтопатија (контролна група)

параметар	маркери	Pearson - ов коефициент (r)
IDP	MMP - 1	r = 0,18
	MMP - 8	r = 0,11
	MMP - 13	r = 0,09
IGI	MMP - 1	r = 0,06
	MMP - 8	r = 0,07
	MMP - 13	r = 0,09
Индекс на коскена ресорпција	MMP - 1	r = 0,03
	MMP - 8	r = 0,10
	MMP - 13	r = 0,11

Кај здравите пациенти, сите корелации помеѓу IDP, IGI и индексот на коскена ресорпција со испитуваните маркери MMP - 1, MMP - 8 и MMP - 13 се многу слаби и незначителни. (Табела бр. 17)

ДИСКУСИЈА

Ткивната деструкција како доминантен процес кој ја условува прогресијата на пародонталната болест е предизвикана од каскада на бактериските протеолитички ензими присутни во биофилмот, како и од ензими по потекло од домаќинот. Се смета дека токму овие ензими, матрикс-металопротеинази кои ги продуцираат клетките на домаќинот (host-derived), играат многу важна улога во деструкцијата на периодонтално-лигаментарниот комплекс при пародонтопатијата. Молекуларните и целуларните студии (30) кои се однесуваат на патогенезата на пародонталната болест, покажуваат дека иако биофилмот е примарен етиолошки фактор, заболувањето сепак настанува како резултат на интеракцијата помеѓу специфичните патогени бактерии и чувствителните имунолошки и инфламаторни одговори на домаќинот.

Иако истражувањата за патогенезата на пародонталната болест традиционално се насочени кон влијанието на бактериската инфекција, во последните две декади особено е зголемен интересот кон проучување на одбрамбените фактори на домаќинот кои ја детерминираат болеста. Добро е познато дека имуните и инфламаторните одговори се клучни за патогенезата на пародонтопатијата, а се испреpletени со бројни внатрешни (генетски) и надворешни индуцирани фактори (128).

За постигнување на главната цел на истражувањето во оваа докторска студија, анализиравме вкупно 90 испитаници според релевантните варијабли од интерес, кои беа поделени во три групи. Просечната возраст на испитуваната група со хронична пародонтопатија изнесуваше 48,3 години (21-65 год.), на оние со агресивна форма 28,1 година (22-33год.), додека кај контролната група се движеше од 16-43 години, односно просечно 23,9 години. Анализата на варијанса покажа дека постојат статистички значајни разлики помеѓу трите испитувани групи во однос на средните вредности на

возраста ($p=0,00001$). Tukey HDS тестот ни укажа дека испитаниците со хронична пародонтопатија се значајно повозрасни во однос на оние со агресивна форма на пародонтопатија, како и во однос на здравите испитаници ($p=0,0001$). Додека помеѓу испитаниците со агресивна пародонтопатија и здравите субјекти разликите во однос на возраста не се значајни ($p=0,3813$).

За утврдување на степенот на гингивопародонталната афекција ги проследивме клиничките параметри, меѓу кои секако многу значаен е индексот на дентален плак, бидејќи микробниот биофилм ни претставува главен етиолошки фактор за настанување на пародонталната болест. Просечните вредности на IDP кај пациентите со хронична пародонтопатија изнесуваше 2,37, кај оние со агресивна 1,07, а кај контролната група 1,16. Анализата на варијанса покажа дека постојат статистички значајни разлики помеѓу испитуваните групи и тоа помеѓу испитаниците со хронична и агресивна форма на пародонтопатија, како и помеѓу хроничната со здравите испитаници ($p=0,0001$). Tukey-овиот HDS тест ни покажа дека разликите во однос на IDP помеѓу агресивната пародонтопатија и здравите испитаници не се значајни ($p=0,783$). Согледувајќи ги ваквите наоди си го поставивме прашањето: доколку биофилмот е основен етиолошки фактор кој ја иницира пародонталната болест, зошто при слични индексни вредности за плакот и несигнификантноста во однос на возраста, кај едната група се јавила силно изразена деструкција на пародонталниот комплекс, а кај другата група не забележавме никакви патолошки промени. Некои епидемиолошки студии укажуваат на широки варијации во преваленцијата на агресивната пародонтопатија, кои најверојатно се должат на расната припадност како и возраста на испитуваната популација. Варијациите исто така можат да потекнуваат од различните методи кои се користат при скринингот на популацијата, како и од примената на различни дијагностички критериуми за детерминирање на присуството и екстензивноста на заболувањето. (81) Така, најголем број од студиите укажуваат на присуство на агресивната пародонтопатија со мала преваленција $<0,1\%$ кај развиените нации и 5% кај неразвиените нации (91). Меѓутоа, модерната ера на

истражувањата на патогенезата, превенцијата и третманот на пародонталната болест која започнала во средината на шеесетите години, на хумани и анимални експериментални модели, ја потенцира критичната улога на бактериите од биофилмот во иницијацијата на гингивитот и пародонтопатијата. Така е создаден еден концептуален модел кој укажува дека бактериите присутни во депозитите на плакот се примарен, директен етиолошки фактор кој ја детерминира експресијата на пародонталната болест. Меѓутоа, спектарот на микробната флора во биофилмот вклучува различни типови на микроорганизми и нивна интеракција со имуноинфламаторните одговори на домаќинот кои ќе резултираат во одржување на стабилна состојба или појава на заболување. Бактериската композиција на плакот е релативно стабилна и се должи на балансот на синергистичките и антагонистичките микробни интеракции. Антагонизмот е секако главен механизам за одржување на хомеостазата во плакот. Бактериоцините и други инхибиторни супстанции како што се органските киселини, H_2O_2 и ензими (14) продуцирани од разни соеви на орални бактерии, (88) се важен фактор кој ја детерминира композицијата на микрофлората во плакот. Докажано е дека субгингивалниот плак од здрави субјекти содржи микроорганизми кои го инхибираат растот на одредени периопатогени бактерии (58) Плакот пак, од местата со LAgP или рефракторна пародонтопатија содржи малку микроорганизми кои продуцираат инхибиторни фактори, што придонесува кон колонизација со резистентни соеви на бактерии. Кога ќе се наруши хомеостазата во плакот, така се менува и композицијата на субгингивалната микрофлора, од доминантно присутни стрептококи преку соеви на актиномицес, до зголемување на облигатни анаероби како *Carnocytophaga*, *Fusobacterium*, *Prevotella* специеси (88) итн. Во овие случаи гингивитот се трансформира во пародонтална болест, при која, зависно од видот, бактериите припаѓаат кон соевите на *Actinobacillus*, *Campylobacter*, *Selenomonas*, *Treponema*, *Veillonella*, *Prevotella* и др. Ткивното оштетување ќе резултира директно од активноста на субгингивалната микрофлора, индиректно од ослободувањето на

лизозомалните ензими во текот на фагоцитозата или од продукцијата на цитокини кои ги стимулираат резидентните сврзно ткивни клетки да ослободуваат металлопротеинази (105).

Анализирајќи ги просечните вредностите на индексот на гингивална инфламација (IGI) утврдивме дека испитаниците со хронична (просечно 2,31) и оние со агресивна пародонтопатија ($x=2,27$) имаат значајно повисоки средни вредности на IGI во однос на здравите испитаници ($x=0,73$). Разликите помеѓу испитаниците со хронична и агресивна пародонтопатија во однос на IGI не се значајни ($p=0,9638$)

Иницијален одговор кон бактериската инфекција е локалната инфламаторна реакција, која го активира имунолошкиот систем. Амплификацијата на ваквата иницијална локализирана реакција резултира во ослободување на бројни цитокини, хемокини и други медијатори и ширење на инфламацијата низ гингивалното ткиво (104). Постојат голем број на молекули кои се протеолитички процесуирани од различни MMP во тек на инфламацијата, резултирајќи во модификација на хемокината функција (104). Неможноста да се ограничи инфламаторната реакција на ниво на гингивата, резултира во пропагирање на инфекцијата во подлабоките структури, деструкција на сврзното ткиво на периодонталната лигаментарна мембрана, како и алвеоларната коска кои се кардинални знаци на пародонталната болест (42).

Анализирајќи ги добиените резултати кои се однесуваат на уште еден многу значаен клинички параметар- губитокот на атачментот утврдивме дека помеѓу испитаниците со хронична и оние со агресивна форма на пародонтопатија постојат статистички сигнификантни разлики ($p=0,0015$). Mann-Whitney U тестот ни укажа дека пациентите со агресивна пародонтопатија (иако имаат минимално количество дентален плак, помало во однос на испитаниците со хронична пародонтопатија) сепак имаат значајно повисоки средни вредности на губиток на атачментот ($x=6,57$) во однос на оние со хронична пародонтопатија. Кај пациентите со хронична пародонтопатија просечните вредности на губиток на атачмент изнесуваа $x=5,25$. Не

регистриравме апикална миграција на припојниот епител кај здравите испитаници.

Проследувајќи го индексот на коскена ресорпција кај нашите испитаници, забележавме дека кај контролната група- здравите субјекти просечните вредности на Miller-Pelzeroviot индекс изнесуваат $x=1,13$, т.е. не постои коскена ресорпција. Меѓутоа, утврдивме дека испитаниците со хронична ($x=3,0$) и оние со агресивна пародонтопатија ($x=4,53$) имаат сигнификантно повисоки средни вредности во однос на здравите испитаници. Tukey HDS тестот ни укажа дека и помеѓу пациентите со хронична и оние со агресивна пародонтопатија разликите во однос на индексот на коскената ресорпција се сигнификантни ($p=0,0001$), односно значајно повеќе се регистрира губиток на алвеоларната коска кај пациентите со агресивна пародонтопатија. Нашите резултати се во согласност со наодите на голем број автори кои укажуваат на екстензивен степен на пародонтална деструкција, но минимално количество на плак и локални иритирачки фактори (9) кај здрави адолесценти и млади индивидуи. Интензивниот губиток на атачмент како и рапидната деструкција на алвеоларната коска која е доминантно присутна при агресивната пародонтопатија се смета дека се должи на хиперреактивноста на полиморфонуклеарните (PMN) леукоцити и макрофагите (134). Бројни студии особено фокусирани на локализираната форма на Ag пародонтопатија индицираат дека PMN кај пациенти со AgP имаат намалена хемотактична функција (134, 114), дефекти во фагоцитозата (97) и зголемена супероксидна продукција (11). Студиите (84) посочуваат на присуство на нуклеотиден полиморфизам кој ја афектира неутрофилната функција и веројатно ја зголемува предиспозицијата на одредена индивидуа кон развиток на агресивна форма на пародонтопатија. Nisu и соработниците (98) утврдиле сигнификантно повисок степен на фагоцитоза, дегранулација и ослободување на еластаза од PMN леукоцити со Fcy рецептор, H/H генотип кај пациентите со пародонтопатија, споредено со оние со R/R генотип, што ја поддржува хипотезата дека хиперреактивниот генотип се должи на генетските варијации. Фагоцитозата и ослободувањето на

високо реактивни кислородни деривати (oxidative burst) претставуваат две основни обележја на PMN леукоцити при нивното справување со бактериската инвазија. Тие го поттикнуваат ослободувањето на протеази, водородни радикали и хипохлорна киселина кои го штитат организмот од бактериската инвазија, но истовремено доведуваат до колатерално оштетување на ткивото на домаќинот. Kantarci и sor (69), укажуваат дека пациентите со AgP, особено оние со локализирана форма, имаат зголемена супероксидна продукција и фагоцитоза. Одредени автори сугерираат дека конститутивни и реактивни механизми лежат во основа на неутрофилната хиперреактивност кај пациентите со пародонтопатија, а пак генетските фактори се оние кои што ги кодираат промените на активноста на неутрофилите. (89) Проследувајќи ја асоцијацијата помеѓу AgP и oxidative burst, Nibali (97) ја поддржува хипотезата дека генетскиот полиморфизам на FcyR и CYBA гените веројатно ја афектираат неутрофилната функција, па ослободувањето на тие високо реактивни кислородни деривати (слободни радикали) доведува до екстензивно ткивно оштетување и губиток на алвеоларна коска, резултирајќи во клиничка слика на агресивна пародонтопатија. Секако треба да споменеме дека и останатите генетски како и фактори на околината придонесуваат кон развој и прогресија на агресивната форма на пародонталната болест.

Главната цел на оваа докторска студија беше да го детектираме присуството и концентрациите на матриксметалопротеиназите MMP-1, -8 и -13 (колагеназите) во здравото гингивално ткиво, како и да ја проследиме нивната концентрација и активност во инфламираните гингивални исечоци кај пациенти со хронична и агресивна форма на пародонталната болест. Тргувајќи од сознанието дека голем број на клетки од пародонталниот лигаментарен комплекс имаат способност локално да продуцираат различни матриксметалопротеинази, зависно од цитокината и хемокината стимулација, зголемената активност и присуство на овие колагенази во ткивата, ни претставува индикатор за активноста на пародонталната болест.

Лабораториските испитувања на примероците на материјалот земен од нашите испитаници ни укажа дека просечните вредности на

MMP-1 кај пациентите со хронична пародонтопатија изнесува $x=749,02$ pg/100microg. протеин, кај оние со агресивна $x=658,35$ pg/100microg., додека кај здравите утврдивме најниски нивоа на просечните вредности на MMP-1 ($x=232,72$ pg/100microg.) кои се движеа во рамките од 60,61-397,66 pg/100microg протеин. Анализата на варијанса (ANOVA) ни укажа дека постојат статистички значајни разлики помеѓу трите испитувани групи во однос на средните вредности на MMP-1 (ANOVA: $F=26,751$, $p=0,00001$). Tukey HDS test ни покажува дека испитаниците со хронична и агресивна пародонтопатија имаат значајно повисоки средни вредности на MMP-1 во однос на здравите испитаници, додека помеѓу овие две групи разликите во однос на MMP-1 не се значајни ($p=0,5751$). Нашите резултати се во согласност со наодите на Bildt и сор. (20) кои утврдиле дека инфламираната гингива содржи повеќе MMP-1 во однос на здравото ткиво. Во инфламираното гингивалното ткиво, пронајдено е 36% повеќе MMP-1, во однос на здравата гингива. Присуството на MMP-1 во гингивалниот епител е потврдено со *in situ* хибридизација. MMP-1 и -8 се силно асоцирани со пародонтална инфламација (19). Меѓутоа, овие автори детектирале и дека активноста на некои поединечни MMP била повисока во здравата гингива и периодонталниот лигамент отколку во соодветните инфламирани ткива (20), но тие разлики биле сосема мали, незначителни ($p<0,0001$). Наспроти тоа, утврдиле силно изразена активност на MMP во гингивалниот флуид колекциониран од заболените во споредба со здравите ткива. Измерените ниски вредности на MMP-1 во здравото гингивално ткиво ни укажуваат дека сепак постои ниско базично ниво на експресија на одредени MMP, чија што ензимска активност е строго контролирана од страна на ткивните инхибитори на MMP. Испитувајќи ја активноста на MMP-1 и MMP-3, Beklen и сор. (19) сугерираат дека активноста на овие MMP е индуцирана од страна на IL-1 beta, TNF-alfa како и IL-17 што го потврдуваат и други автори во своите студии (35). Зголемената продукција на MMP-1 и -3 и нивното синергистичко делување може да го зголеми нивниот протеолитички потенцијал, да ја забрза деструкцијата на екстрацелуларниот матрикс (ECM) и да предизвика оштетување на припојниот епител. Доколку фибробластите

ефикасно синтетизираат и ослободуваат pro-MMP-1 како одговор на стимулацијата со споменатите интерлеукини, тогаш деструктивните процеси можат да бидат силно изразени.

Анализата на добиените резултати од лабораториските испитувања на MMP-8 ни покажа дека вредностите на MMP-8 во инфламираното гингивално ткиво изнесуваа од 95,31-698,23pg/100microg. протеин, (просечно $x=385,72\text{pg}/100\text{microg.протеин}$), кај оние со агресивна пародонтопатија просечните вредности изнесуваа $x=275,98\text{pg}/100\text{microg}$ протеин, а во ткивото на здравите испитаници средните вредности изнесуваа 101,81 pg/100microg протеин. ANOVA- анализата на варијанса ни укажа дека постојат статистички сигнификантни разлики помеѓу трите испитувани групи во однос на средните вредности за MMP-8 ($F=51,426$ $p=0,00001$). Испитаниците со хронична и оние со агресивна пародонтопатија имаат значајно повисоки просечни вредности на MMP-8 во однос на здравите испитаници, но утврдивме и значајност на разликите на MMP-8 помеѓу двете испитувани групи (хронична и агресивна $p=0,00627$) - значајно повисоки MMP-8 кај субјектите со хронична пародонтопатија. Сметаме дека ваквиот наод произлегува од пореметената фагоцитоза и хемотактична функција, како и хиперреактивноста на неутрофилните гранулоцити (PMN) кај субјектите со агресивната пародонтопатија, при што деструктивните процеси доминантно настануваат како последица на ослободувањето на слободни радикали и други нискомолекуларни соединенија, а не како последица на ослободувањето на MMP-8. Одредени студии укажуваат дека значајно оштетената фагоцитоза се должи на намалениот степен на адхезија и опсонизација на неутрофилите кај пациенти со рефракторна пародонтопатија, во однос на здравите испитаници (133). Во гингивалниот сулкус неутрофилите формираат бариера помеѓу епителот и биофилмот, која може да ја спречи бактериската инвазија низ епителот во сврзното ткиво. На тој начин тие ќе ги намалат деструктивните ефекти на бактериите од плакот врз подлабоките пародонтални структури (133).

Постојат сигурни податоци за инволвираноста на MMP-8 во деструктивните процеси на пародонталните ткива. Таа е една од

главните колагенази одговорна за колагената деградација која настанува при пародонтопатијата и која се детектира во гингивата, гингивалниот флуид и саливата кај пациенти со хронична пародонтопатија (107,63). Средните концентрации на MMP-8 во плунката кај здравите индивидуи била 10-пати помала во однос на оние со пародонталната болест (57). Голем број автори во своите студии укажуваат на зголемено ниво на овој протеолитички ензим во инфламираните ткива во однос на здравото ткиво при хронична пародонтопатија (28, 74, 78), во пери-имплантниот сулкусен флуид (75) како и при локализирана агресивна пародонтопатија (129). Подоцнежните студии од овој автор покажуваат зголемен број на MMP-8 и -13 позитивни клетки во гингивата на заболените места и при хронична и при агресивна пародонтопатија. Miller и Christodoulides (92) во своите студии укажуваат на зголемени концентрации на MMP-8 во примероците од плунката кај пациенти со пародонтопатија. Costa и сор. (31) утврдиле негативна корелација помеѓу MMP-8 и пародонталните џебови со длабочина помала од 3мм, индицирајќи дека MMP-8 експресијата е намалена кај здравите субјекти. И други автори (41, 125) укажуваат дека неутрофилната колагеназа, MMP-8 е важна деструктивна металопротеиназа одговорна за деградација, но и ремоделирање на екстрацелуларниот матрикс, чии вредности корелираат со клиничките и радиографските параметри.

MMP-8 mRNA била детектирана во сулкусниот епител на ткивните исечоци од пациентите со AgP и хронична пародонтална болест. Силна имунореактивност на MMP-8 е пронајдена во интрацелуларните гранули на неутрофилите, сулкусните епителни клетки и под базалната мембрана кај AgP и хронична пародонтопатија. MMP-8 позитивни неутрофили биле дистрибуирани дифузно во гингивалното сврзно ткиво, додека во ткивните примероци на LAgP тие најчесто биле групирани периваскуларно. Средната густина на MMP-8 позитивна имунореактивност/mm² на гингивално ткиво била повисока кај испитуваните во однос на контролната група.

Екстрактите од нетретирана инфламирана гингива од пациенти со адултна пародонтопатија содржат патолошки зголемени нивоа на

MMP-8 во каталитички активна форма, во споредба со здравите субјекти (118, 46). Со методот на колагена зимографија училе колагенолитични фрагменти со 30kDa молекуларна маса во гингивата и периодонталниот лигамент, но релативно мал број во гингивалниот флуид. Некои од нив биле идентификувани како MMP-8 фрагменти во гингивата, MMP-13 и MMP-1 (62). MMP-8 фрагментите во гингивалниот флуид, некои автори сметаат дека исчезнуваат по спроведениот пародонтален третман (72). Овие колагенолитични фрагменти се смета дека настануваат со автолиза или со активност на другите MMP. Бидејќи колагенолитичните фрагменти и MMP-2 комплексите покажуваат јасна протеолитичка активност, тие најверојатно имаат важна улога во ткивната деструкција при пародонтопатијата (32).

Колагеназа-2 (MMP-8) се смета дека потекнува од PMN леукоцити, складирана во специфичните гранули на зрелите, циркулирачки PMN. Нивното ослободување и активност се регулирани од цитокините (IL-1 β или TNF- α) како и од различните периопатогени бактерии и нивните вирулентни фактори (34, 51). Овие фактори исто така можат да индуцираат нова експресија и синтеза на MMP-8 mRNA и протеини од страна на други клетки, како што се гингивалните и периодонталните фибробласти, ендотелните клетки и одонтобластите (51, 101). Анализата на овие податоци укажува дека PMN леукоцити и останатите клетки претставуваат вистински резервоар на MMP-8 во инфламираната хумана гингива. Меѓутоа, нема достапни информации за евентуалната *in vivo* експресија на MMP-8 во оралните и гингивалните епителни клетки при инфламаторните процеси на гингивата.

Во нашата студија ги проследивме и концентрациите на уште една значајна колагеназа, MMP-13 (колагеназа-3). Резултатите ни покажаа дека просечните вредности на MMP-13 во ткивните исечоци од инфламираната гингива од пациентите со хронична пародонтопатија изнесува $x=531,57$, кај оние со агресивна $x=501,80$ (од 280,38-1005,56pg/100microg.протеин), а кај контролната група испитаници $x=121,49$ (59,17-232,69pg/100microg протеин). Анализата на варијанса ANOVA ни укажа дека постојат статистички сигнификантни разлики

помеѓу трите испитувани групи во однос на MMP-13 ($F=32,596$ $p=0,00001$). Tukey HSD тестот ни ги покажува поединечните разлики помеѓу испитуваните групи т.е. испитаниците со хронична и агресивна пародонтопатија имаат значајно повисоки просечни вредности на MMP-13 во однос на здравите субјекти. Разликите на MMP-13 помеѓу двете испитувани групи не се значајни ($p=0,8957$). Нашите резултати се во согласност со наодите од истражувањата на Tervahartiala и соп. (129) кои детектирале присуство на MMP-13 mRNA во сулкусниот епител, субепителијалните фибробласти и моноцитите, ендотелните клетки како и субепително, под базалната мембрана во гингивалните исечоци кај пациенти со локализирана AgP и хронична пародонтопатија. MMP-13 позитивни инфламаторни моноцити се детектирани периваскуларно, а нивната концентрација била повисока во ткивните примероци од пациентите со LAgP и адултна пародонтопатија во однос на контролните примероци од здравите субјекти (129).

Експресија на MMP-13 (колагеназа-3) е забележана во остеоартритичните синовијални мембрани, во фибробластите при развитокот на коската и спорадично во оралните мукозни епителни и плазма клетки асоцирани со коскено-деструктивните лезии (82, 135). Неговата експресија е регулирана од различни цитокини и growth фактори (135). Зголемени вредности на MMP-13 се пронајдени во гингивалниот флуид кај пациенти со нетретирана хронична пародонтопатија, додека намалени вредности на MMP-13 се регистрирани во гингивалниот флуид од пародонталните лезии кај пациенти кои се долготрајно третирани со субантимикробни дози на MMP инхибитори- доксицилин (47)

Една од целите кои ги поставивме во нашата докторска студија беше да ги детерминираме взаемните соодноси (корелации) на клиничките параметри со вредностите на концентрациите на колагеназите (MMP-1, -8 и -13) во гингивалните ткивни исечоци. Нашите наоди т.е. Pears-оновиот коефициент на корелација ни укажа дека кај пациентите со хронична пародонтопатија помеѓу индексот на дентален плак (IDP) и MMP-1, MMP-8 и MMP-13 постои значајна, средно јака корелација ($r=0,55$; $r=0,49$; $r=0,45$) Тоа значи дека зголеменото

количество на дентален плак условило и покачување на концентрациите на испитуваните MMP. Се смета дека интеракцијата на некои бактерии присутни во биофилмот со инфламаторните клетки (неутрофилите, како и моноцитите/макрофагите) или резидентните епителни, ендотелните клетки и гингивалните фибробласти резултира во ослободување на протеази од страна на клетките на домаќинот. Зголемени нивоа на интерстициелните колагенази се детектираат во инфламираните хумани гингивални ткива, гингивалниот флуид, како и во инфламаторниот ексудат од гингивата (60). Интерстициелната колагеназа (MMP-1) која е присутна во овие ткива, докажано е дека се конвертира од латентна, во активна, деструктивна форма на овој ензим во текот на инфламаторните процеси при пародонталната болест. Page (100) укажува дека фибробластите нормално продуцираат неколку типа на колаген, но при активна пародонтопатија, гените одговорни за колагената продукција, како и за продукција на TIMP се исклучуваат (turned off), додека гените за продукција на MMP се вклучуваат (turned on), резултирајќи во деструкција на екстрацелуларниот матрикс и отвораат пат за зголемување на инфламаторниот клеточен инфилтрат.

Проследувајќи го взаемниот сооднос (корелација) помеѓу IGI и MMP-1, MMP-8 и MMP-13 кај пациентите со хронична пародонтопатија забележавме дека постои значајна јака позитивна корелација ($r=0,77$ $r=0,67$ $r=0,62$) Тоа значи дека дека интензивирањето на гингивалната инфламација доведува до покачување на нивото на MMP. Истражувањата покажуваат дека кај пациентите кои одржуваат задоволителна орална хигиена, гингивата долго може да не покажува клинички знаци на инфламација, додека инфламаторните процеси перзистираат на дното на пародонталниот џеб. Во такви случаи веројатно постои субклиничка инфламација која ја поттикнува пародонталната деструкција (109) Утврдената позитивна корелација помеѓу IGI и испитуваните MMP кај нашите испитаници е во согласност со Alfant и сор. (5) кои во една своја студија детектирале статистички сигнификантна редукција на колагеназите (MMP-1, 8 и -13), како и на желатиназите (MMP-2 и -9), 6 недели по спроведената пародонтална терапија. Нотирале намалување на индексот на гингивално крварење

индицирајќи на редукција на гингивалната инфламација. Нивните обсервации во однос на намалените вредности на колагеназите и желатиназите биле во согласност со резултатите на студиите спроведени кај пациенти со хронична пародонтопатија од страна на други автори (23, 131, 122). Резултатите од овие студии укажале на намалување на нивото на овие групи на MMP пост-тераписки, речиси идентични со оние на здравите субјекти, асоцирани со придружна редукција на гингивалната инфламација и поволна клиничка прогноза (132, 121, 106). Меѓутоа, и покрај намалените вредности на колагеназите кај пациентите со агресивна пародонтопатија, сепак нивните нивоа останале сигнификантно повисоки во однос на здравите контролни субјекти (6). Останало нејасно, дали намалената гингивална инфламација пост-тераписки претставува само моментален феномен, или пак има тенденција да продолжи во текот на процесот на заздравување? Постоеле одредени индикации дека иницијалниот третман може само да ја пригуши инфламацијата присутна во меките ткива, додека деструкцијата на длабоките пародонтални структури (алвеоларната коска) и понатаму да перзистира. Затоа Alfant и сор. (6) сугерираат на поопсежна клиничка евалуација, со цел да се детерминира дали прогредира губитокот на алвеоларната коска. Редукцијата на инфламацијата претставува само почеток на процесот на заздравување, но земајќи ја во предвид јачината и агресивната природа на оваа форма на пародонтопатија, императив кај овие пациенти е, што почесто мониторирање на состојбата со цел за превенција на понатамошните оштетувања.

Истиот автор во една студија сугерира дека активноста на MMP е силно асоцирана со јачината на пародонталната болест, но го наметнува прашањето дали зголемените нивоа на овие ензими доведуваат до егзацербација на патолошкиот процес, или пак тие се зголемени како резултат на самото заболување, правејќи ги клиничките и биолошките опсервации тешки за интерпретирање.

Кај пациентите со хронична пародонтопатија Pearson-овиот коефициент на корелација помеѓу губитокот на атечментот и

испитуваните MMP-1, -8 и -13 ни покажа дека постои многу значајна, јака позитивна корелација ($r=0,83$ $r=0,75$ $r=0,81$).

Проследувајќи го индексот на коскена ресорпција во однос на концентрациите на соодветните MMP-1, -8 и -13 присутни во инфламираното ткиво кај пациентите со хронична пародонтопатија забележавме дека постои значајна, јака корелација, до многу јака корелација помеѓу испитуваните параметри ($r=0,76$ $r=0,59$ $r=0,77$). Тоа значи дека со покачувањето на концентрациите на MMP се зголемува и коскената ресорпција. Нашите резултати се во согласност со Најами и сор. (53) кои во своите студии покажуваат дека инхибицијата на колагеназите со dexamethasone го зголемува формирањето на минерализирани нодули во PDL (113). Базирајќи се на своите истражувања, тие сметаат дека PDL клетките одговараат на модулатијата на MMP-1 и MMP-13 преку промени во експресијата на остеобласт-специфичните маркери. Во тек на пародонталната болест настанува деструирање и губиток на ECM што во најголем дел е посредувано од MMP со потекло од инфламаторните и резидентните PDL клетки (105). Резидентните PDL клетки се клучни за регенерација на изгубените периодонтални и минерализирани ткива, преку репараторните процеси кои се должат на диференцијација на прекурсорните клетки во остеобласти. Најами и сор. (54) сугерираат дека во присуство на зголемени нивоа на MMP-1 и (или) MMP-13 ваквата диференцијација може да биде инхибирана при што се намалува количеството на остеобласти кои се способни да извршат репарација на коскеното ткиво. Меѓутоа, тие сметаат дека се потребни понатамошни *in vivo* студии на анимални модели, за да се добијат поконкретни информации за механизмите кои ги инволвираат MMP-1 и MMP-13 во инхибиција на остеобластогенезата и ја ограничуваат коскената репарација. Таквите *in vivo* обсервации, би ја истакнале важноста на MMP за функцијата на остеобластите, а надополнети со *in vitro* студии, би обезбедиле дополнителни информации за дешифрирање на улогата на MMP во остеобластичната диференцијација.

Pearson-овиот индекс на корелација ни укажа дека постои позитивна корелација помеѓу IDP и испитуваните MMP-1, -8 и -13 кај пациентите со **агресивна** пародонтопатија, но е со различен интензитет ($r=0,76$ $r=0,39$ $r=0,23$). Имено, се смета дека протеазите од потентните периопатогени бактерии како *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, *A. Actinomycetemcomitans* доминантно присутни во биофилмот при агресивната пародонтопатија, можат да делуваат како директни активатори на pro-MMP и да ја индуцираат нивната продукција од страна на клетките на домаќинот. Вирулентноста на овие микроорганизми се поврзува со некои фактори. Особено вниманието се фокусира на силниот протеолитички арсенал со кои располагаат овие бактерии и посредуваат при ткивната деструкција, пореметувајќи ги одбрамбените механизми на домаќинот во текот на инфламаторните процеси (60). Утврдено е дека тие можат ефикасно да ги разградат колагените пептиди по делувањето на колагеназите и желатиназите. Делувајќи како типичен ендотоксин, липополисахаридите (LPS) кои претставуваат главни компоненти на клеточната мембрана на (Gr-) бактерии, иницираат каскада на процеси кои доведуваат до пародонтална ткивна деструкција. LPS ослободени од биофилмот присутен на површината на корените на забите ги привлекуваат PMN леукоцити. Моноцитите и активираниите макрофаги ослободуваат различни проинфламаторни цитокини, вклучувајќи ги IL-1beta и TNF-alfa кои директно го продлабочуваат деструктивниот процес. Заедно со катепсините и останатите медијатори на коскената ресорпција ослободени од остеокластите, MMP како силни ендопептидази се ослободуваат од фибробластите во оваа фаза на заболувањето (73).

Инфламаторните процеси на гингивата и периодонциумот резултираат во деструкција на длабоките пародонтални ткива и губиток на забите. Клинички инфламацијата се манифестира со црвенило, оток како и крварење при сондирање, меѓутоа на молекуларно и целуларно ниво инфламаторниот процес е дефиниран со присуство на клеточни инфилтрати и ослободување на различни цитокини (100). Цитокините, клеточни протеини, ги пренесуваат информациите во самата клетка или помеѓу различни клетки преку

бројни механизми. После поврзувањето со нивните специфични рецептори, проинфламаторните цитокини како IL-1beta, TNF-alfa ги откочуваат интрацелуларните сигнални механизми.

Утврдувајќи ги заемните соодноси (корелација) помеѓу IGI и испитуваните MMP во инфламираните гингивални исечоци кај нашите испитаници со агресивна пародонтопатија утврдивме дека постои значајна, јака позитивна корелација помеѓу овие параметри ($r=0,68$ $r=0,54$ $r=0,67$) Нашите наоди се во согласност со Alfant и сор. (5) кои во своите истражувања укажуваат на зголемени нивоа на колагеназите (MMP-1, -8 и -13) и на други типови на MMP кај децата на возраст од 7-19 години со локализирана форма на AgP. Нивоата на MMP биле зголемени во исечоците земени од инфламираните места зафатени со AgP во однос на незаболените места кај истата индивидуа. Исто така, биле утврдени зголемени нивоа на MMP асоцирани со AgP кај децата, во однос на возрасните пациенти со хронична пародонтопатија. Голем број автори укажуваат дека ткивните екстракти како и култивираниите ткивни исечоци од инфламирана гингива покажуваат зголемена колагеназна активност во однос на исечоците од здрава гингива (77, 108, 38). Колагеназната активност во гингивалниот флуид била исто така зголемена и покажува корелација со јачината на пародонталната болест (121).

Pearson-овиот коефициент на корелација ни покажа дека кај испитаниците со агресивна пародонтопатија постои многу значајна, јака корелација помеѓу губитокот на атачментот и MMP-1 ($r=0,75$), додека со MMP-8 и MMP-13 корелацијата е средно јака ($r=0,51$ $r=0,56$). Во својата студија Tervahartiala и сор. (129) користејќи специфични имунохисто-хемиски техники и *in situ* хибридизација, утврдиле дека во афектираниот гингивален сулкусен епител кај пациентите со хронична и LAgP постои експресија на MMP-8, MMP-13 и MMP-2. При пародонталната болест, инфламираниот сулкусен епител покажува локален губиток на интегритетот, асоциран со миграција на епителните клетки во подлабоките, апикални партии (21). Спорадичната и локална *in vivo* експресија на MMP-8 при LAgP и адултна пародонтопатија е придружена и со експресија на уште две други колагенолитични MMP

и тоа MMP-1 и MMP-13. Неинфламираниот сулкусен епител не покажува локална инвазија и миграција на клетките кон подлабоките сврзни ткива и пројавува само слаба експресија на колагенолитичните MMP-2, -8 и -13. Анализирајќи ги податоците од својата *in vivo* студија, Tervahartiala и сор. (129) укажуваат дека инфламаторните процеси можат да ги индуцираат клетките на сулкусниот епител локално да експресираат колагенолитични MMP, од типот на MMP-2, -8 и -13 при хронична и агресивна пародонтопатија. Квантитативните анализи на MMP-8 и MMP-13 имунореактивноста, покажуваат зголемена експресија на овие протеини во гингивалното ткиво кај пациентите со пародонтопатија (агресивна и хронична) споредено со здравата гингива (118, 63).

Во експериментална *in vitro* студија на култура од фибробласти, докажано е дека при стимулација со TNF-alfa, гингивалните фибробласти продуцираат само проформа на MMP-3. Бидејќи доминантни клетки во гингивалниот флуид се неутрофилните гранулоцити, а тие не го продуцираат MMP-3, најверојатно proMMP-3 преминува во гингивалниот флуид каде што се забележани зголемени нивоа на активна MMP-3. Се смета дека proMMP-3 најверојатно после секрецијата подлегнува на протеолитичка конверзија од неговата про-во соодветната активна форма. Ваквата состојба може да се објасни со кооперација помеѓу гингивалните ткива и гингивалниот флуид. Имено, при хронична пародонтопатија, потврдено е дека гингивалниот флуид содржи зголемени нивоа на катепсин G (129) како и еластаза ослободени од неутрофилните гранулоцити. Тие имаат способност да го активираат proMMP-3 (65) кој се продуцира од фибробластите. Потоа, активираниот MMP-3 го откинува пропептидот или активациониот пептид и го активира proMMP-8.

Фибробластите како доминантни клетки во крзното на гингивата имаат клучна улога во продукцијата на MMP (21). IL-1beta, TNF-alfa се инволвирани во иницијацијата и прогресијата на хроничната инфламација. Тие ја стимулираат синтезата и ослободувањето на MMP-1 и MMP-3 (35) и MMP-8 (51). Исто така, IL-17 делува како потентен стимулатор кој ја регулира продукцијата на некои MMP (123), но

споредено со IL-1 beta и TNF-alfa неговиот ефект е многу помал. Се смета дека ефектот на IL-17 врз синтезата и активноста на MMP-1 и MMP-3 е индиректен (секундарен) и функционира како процес кој се одвива во две фази. И тоа, првата фаза се состои од директна стимулација на гингивалните фибробласти да ослободуваат IL-6 и IL-8 (70, 61,127). При тоа, IL-6 ја стимулира локалната продукција на IL-1beta и TNF-alfa, додека IL-8 делува како локален хемотактичен фактор за PMN леукоцити (15). Во втората фаза, макрофагите ослободуваат IL-1beta и TNF-alfa, како резултат на стимулацијата од IL-17 (67), при што овие цитокини ја индуцираат продукцијата и ослободувањето на pro-MMP-1 и MMP-3 од гингивалните фибробласти (21). Во согласност со овие резултати, Beklen смета дека IL-1 beta и TNF-alfa имаат посилен ефект во продукцијата на MMP-1 и -3, додека IL-17 има послаб директен регулаторен ефект врз продукцијата на MMP, но неговото делување се остварува преку индукција на IL-1beta и TNF-alfa.

Протеолитичките ензими се инволвирани во бројни процеси на нормалното коскено ремоделирање, вклучувајќи го формирањето и ресорпцијата на коската. Активноста на овие ензими како што се MMP е неопходна за одржување коскената хомеостаза (137). Некои MMP се одговорни за деструкција на минерализираните ткива во тек на коскената ресорпција, додека пак остеобластите исто така можат секретираат MMP, кои го деградираат неминерализираното остеоидно ткиво на површината на коската (137).

Кај пациентите со агресивна пародонтопатија утврдивме дека постои умерена корелација помеѓу индексот на коскена ресорпција и концентрациите на MMP-1 и MMP-8 во испитуваните ткива ($r=0,42$ $r=0,33$), додека со MMP-13 постои значајна јака корелација ($r=0,65$).

Имено, екстрацелуларниот матрикс на коската содржи важни структурни и солубилни фактори потребни за развојот и морфогенезата на коскениот ткиво. Типот I колаген е примарна органска компонента на ЕСМ кој обезбедува услови неопходни за диференцијација на остеобластите (93, 85). Воедно, тој претставува супстрат на делување на колагеназите од типот на MMP-1 и MMP-13, кои веројатно можат да ја модулираат остеобластичната диференцијација преку

деградирањето на колагенот, притоа намалувајќи го стимулаторниот ефект на колагенот врз преостеобластичните клетки. Одредени автори во своите студии посочуваат дека стимулацијата со бактериски колагенази или индукција на ендогените колагенази преку експозиција на остеогеничните клетки со IL-1beta (27), ја намалува остеобластичната диференцијација на овие клетки. Докажано е дека базичната активност на MMP-1 е поголема во однос на MMP-13 и дека MMP-1 е повеќе потентен во деградирањето на колагенот тип I (76). Тоа сугерира дека MMP-1 многу побрзо ќе го деградира и намали количеството на колаген потребно за остеобластична диференцијација, отколку MMP-13. Ние, во нашата студија, кај нашите испитаници, детектиравме посилено изразена позитивна корелација помеѓу MMP-13 и коскената ресорпција, во однос на MMP-1 што ни укажува дека тука активноста на MMP-13 е посилено изразена. И Клауер (76) на крајот од својата студија се осврнува и констатира дека причините за различниот остеогеничен одговор на остеопрогениторните клетки кон овие матриксметалопротеинази, како и механизмите на модулација сеуште не се докрај разјаснети. Имено, периодонталниот лигаментарен комплекс (PDL) содржи хетерогена клеточна популација која вклучува различни видови на клетки, од прогенитор клетки кои ги формираат минерализираните ткива, стем клетки, фибробласти, остеобласти и цементобласти (79, 112, 113). Ваквиот микс на PDL клетки имаат способност да експресираат остеобластични маркери и да формираат минерализирани нодули во *in vitro* услови (53, 80, 113), а пак овие клетки трансплантирани во оштетените периодонтални ареи имаат способност да извршат репарација на алвеоларната коска во *in vivo* услови (79, 112).

Во нашата студија ги проследивме и взаемните односи помеѓу клиничките параметри со испитуваните матриксметалопротеинази MMP-1, MMP-8 и MMP-13 кај здравите испитаници. Утврдивме дека постојат многу слабо изразени, незначителни позитивни корелации помеѓу овие параметри. Овие резултати ни ги потврдуваат сознанијата дека матриксметалопротеиназите сепак се присутни во одредени концентрации и имаат одредена активност во здравите пародонтални

ткива. Тие се одговорни за ткивното ремоделирање, како и за репараторно-регенеративните процеси во здравите ткива. Нивната експресивност и активност е сосема ниска и е строго контролирана од присуството на ткивните инхибитори на MMP (TIMP). Деградацијата и синтезата на компонентите од екстрацелуларниот матрикс во здравото ткиво се во постојан баланс.

Реализирајќи ги предвидените истражувања во оваа докторска теза, дојдовме до одредени сопствени сознанија за влијанието на матриксметалопротеиназите врз деструктивните процеси во тек на пародонталната болест. На тој начин сметаме дека ќе придонесеме кон осознавање на комплексните патогенетски механизми кои учествуваат во прогресијата на ова многу често инфламаторно-деструктивно заболување. Утврдувањето на активноста на MMP, како молекуларни биомаркери ќе ни помогнат во идентификување на пациентите со зголемена склоност кон одредена форма на пародонталната болест, како и можност да ги предвидиме местата во кои би настанала егзацербација на процесот во блиска иднина. Воедно тие би можеле и да ни послужат како маркери за мониторинг на спроведената терапија. Со овој труд сакаме да придонесеме кон развивање на нови превентивни, дијагностички и терапевтски модалитети за подобар третман на пародонталната болест, како и проследување на пародонталниот статус во медицински и научно-истражувачки цели.

ЗАКЛУЧОЦИ

Врз основа на поставените цели и добиените резултати од нашето истражување, како и статистичката обработка на податоците дојдовме до одредени сопствени сознанија, кои ќе се обидеме да ги сублимираме во следниве заклучоци:

1. Концентрациите на MMP-1 (интерстициелната колагеназа) во инфламираните гингивални исечоци кај пациентите со хронична и агресивна пародонтопатија беа повисоки во однос на здравите испитаници и покажаа висока статистичка сигнификантност. Разликите во однос на MMP-1 помеѓу двете испитувани групи (агресивна и хронична) не се значајни.

2. Утврдените вредности на MMP-8 (неутрофилната колагеназа) кај испитуваните групи беа сигнификантно повисоки во однос на здравите испитаници. Но, концентрациите на MMP-8 кај испитаниците со хронична пародонтопатија беа значајно повисоки и во однос на оние со агресивна форма, што се должи на пореметената функција на неутрофилните гранулоцити кај агресивната форма на пародонталната болест.

3. Концентрациите на MMP-13 во инфламираните ткива кај пациентите со хронична и со агресивна пародонтопатија беа значајно повисоки во однос на здравите испитаници. Разликите во однос на MMP-13 не беа значајни помеѓу двете испитувани групи.

Колагеназите MMP-1, MMP-8 и MMP-13 се инволвирани во деградацијата на колагенот и сврзно-ткивниот матрикс при пародонтопатиите.

4. Испитаниците со хронична пародонтопатија имаа значајно повисоки вредности на ИДП во однос на испитаниците со агресивна

пародонтопатија и здравите субјекти. Помеѓу испитаниците со агресивна пародонтопатија и контролната група разликите во однос на ИДП не се значајни.

5. Испитаниците со хронична и агресивна пародонтопатија имаа значајно повисоки просечни вредности на ИГИ во однос на здравите, контролни субјекти. Разликите во однос на ИГИ помеѓу двете испитувани групи (хронична и агресивна) не беа значајни.

6. Деструктивните процеси на ткивата -губитокот на атачментот и коскената ресорпција беа значајно повисоки кај пациентите со агресивна во однос на пациентите со хронична пародонтопатија.

7. Утврдивме присуство на значајна, средно јака позитивна корелација помеѓу ИДП и испитуваните матриксометалопротеинази MMP-1, -8 и -13 кај испитаниците со хронична пародонтопатија. Позитивна корелација, но со различен интензитет (многу јака со MMP-1, умерена со MMP-8 и слаба со MMP-13) утврдивме помеѓу овие параметри и кај испитаниците со агресивна пародонтопатија, што потврдува дека микроорганизмите од биофилмот и нивните продукти ги иницираат патолошките процеси во ткивата и продукцијата на колагеназите од страна на клетките на домаќинот.

8. Позитивна значајна, јака корелација постоеше помеѓу ИГИ и испитуваните колагенази MMP-1, MMP-8 и MMP-13 кај испитаниците со хронична и оние со агресивна форма на пародонтопатија. Тоа ги потврдува сознанијата дека со напредокот на инфламаторните процеси се зголемуваат и концентрациите на матриксометалопротеиназите во инфламираните ткива. Но, сеуште останува неразјаснето дали зголемените нивоа на овие ензими доведуваат до егзацербација на патолошкиот процес, или пак тие се зголемени како резултат на самото заболување, сугерирајќи на понатамошни, посуптилни истражувања со цел да се проникне подлабоко во патогенетски механизми инволвирани во ова комплексно заболување.

9. Губитокот на атечментот и ресорпцијата на алвеоларната коска беа многу значајно, силно позитивно корелирани со концентрациите на испитуваните матриксометалопротеинази кај испитаниците со хронична пародонтопатија. Кај оние со агресивна форма на заболувањето исто така утврдивме присуство на позитивна корелација помеѓу испитуваните параметри, но добиените вредности на корелациите беа нешто поумерени, што ни сугерира дека покрај влијанието на колагеназите и други фактори ендеогени (генетски), како и фактори на средината се инволвирани и имаат значајна улога во текот на деструктивните процеси при пародонталната болест, особено кај агресивната пародонтопатија.

10. Утврдените корелации помеѓу клиничките параметри (ИДП, ИГИ) и индексот на коскена ресорпција со испитуваните колагенази кај здравите испитаници без пародонтопатија (контролната група) беа многу слаби, незначителни. Експресивноста и активноста на MMP во здравото ткиво се сосема ниски и се наоѓаат под строга контрола на ткивните инхибитори на MMP (TIMP). Деградацијата и синтезата на компонентите од ECM во здравото ткиво се во постојан баланс.

Нашите резултати покажаа дека матриксометалопротеиназите претставуваат значајни биомаркери според чија концентрација може да се следи активноста, текот на патолошките процеси, развојот на клиничката слика, како и да се предвидат можните компликации со цел да се направи план на терапија и да се преземат соодветните терапевтски постапки. Несомнено е дека резултатите од оваа докторска студија ја потврдуваат значајната улога на MMP во деструктивните процеси на пародонталната болест.

ЛИТЕРАТУРА

1. AAP 1999- American Academy of Periodontology, International Workshop for Classification of Periodontal Diseases, 1999.;
2. Ahokas K, Lohi J, Ilman SA, Liano E, Elomaa O, Impola U, Karjalainen Lindsberg ML, Saarialho-Kere U. Matrix metalloproteinase-21 is expressed epithelially during development and in cancer and is up-regulated by transforming growth factor-beta1 in keratinocytes. *Lab Invest* 2003; 83:1887-1899.
3. Ahokas K, Skoog T, Suomela S, Jeskanen L, Impola U, Isaka K, Saarialho-Kere U. Matrilysin-2 (matrix metalloproteinase 26) is upregulated in keratinocytes during wound repair and early skin carcinogenesis. *J Invest Dermatol* 2005; 124: 849-856.
4. Aiba T, Akeno N, Kawana T, Okamoto H, Horiuchi N (1996). Matrix metalloproteinases-1 and -8 and TIMP-1 mRNA levels in normal and diseased human gingivae. *Eur J Oral Sci* 104:562-569.;
5. Alfant B., Shaddox L. M., Tobler J., Magnusson I., Aukhil I. & Walker C. (2008) Matrix metalloproteinase levels in children with aggressive periodontitis. *J Periodontol* 79, 819-826.
6. Alfant B. (May 2009) Matrix metalloproteinase levels and microflora associated with aggressive periodontitis in children. Abstract of Thesis Presented to the Graduate School of the University of Florida in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Master of Science
7. Андоновска Б. Проценка на влијанието на матрикс-металопротеиназите кај хроничните периапикални процеси. Магистерски труд, Стоматолошки факултет- Скопје, 2006.;
8. Ангелов Н. Улогата на секреторниот инхибитор на леукоцитната протеаза во зараснувањето на оралните рани. Докторска дисертација, Стоматолошки факултет- Скопје, 2004.;
9. Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol* 1999; 4: 1-6.
10. Asikainen S, Chen C, Slots J: Likelihood of transmitting *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in families with periodontitis, *Oral Microbiol Immunol* 11: 387, 1996.

11. Asman B. Peripheral PMN cell in juvenile periodontitis, Increased release of elastase and of oxygen radicals after stimulation with opsonized bacteria. *J Clin Periodontol* 1988; 15: 360-364.
12. Assoian RK, Zhu X (1997). Cell anchorage and the cytoskeleton as partners in growth factor dependent cell cycle progression. *Curr Opin Cell Biol* 9; 93-98.
13. Atkinson SJ, Ward RV, Reynolds JJ, Murphy G (1992). Cell-mediated degradation of type IV collagen and gelatin films is dependent on the activation of matrix metalloproteinases. *Biochem J* 288: 605-611.;
14. Baba H (1986). Lysis of *Streptococcus sanguis* by an extracellular enzyme from the bacterium *Streptococcus mutans* from human dental plaque. *Arch Oral Biol* 31: 849-853.
15. Baggiolini M, Dewald B, Moser B (1994). Interleukin-8 and related chemotactic cytokines-CXC and CC chemokines. *Adv Immunol* 55: 97-179.
16. Bar-Or A, Nuttall RK, Duddy M, Alter A, Kim HJ, Ifergan I. et al. Analyses of all matrix metalloproteinase members in leukocytes emphasize monocytes as major inflammatory mediators in multiple sclerosis. *Brain* 2003; 126: 2738-2749.
17. Bauer EA, Stricklin GP, Jeffrey JJ, Eisen AZ (1975) Collagenase production by human skin fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 64: 232-240.
18. Белазелкоска З. Биохемиска верификација на хидролитичната ензимска активност кај пациенти со прогресивна пародонтопатија. Докторска дисертација, Стоматолошки факултет - Скопје 1985.;
19. Beklen A, Ainola M, Hukkanen M, Guran C, Sorsa T, Konttinen YT. MMPs, IL-1, and TNF are regulated by IL-17 in periodontitis. *J Dent Res* 2007; 86 (4): 347-351.
20. Bildt MM, Bloemen M, Kuijpers-Jagtman AM, Von den Hoff JW. Collagenolytic fragments and active gelatinase complexes in periodontitis. *J Periodontol* 2008; 79: 1704-1711.
21. Birkedal-Hansen H., Moore WG, Bodden MK, Windsor LJ, Birkedal-Hansen B., DeCarlo A., Engler JA. Matrix metalloproteinases: a review. *Crit Rev Oral Biol Med* 4: 197-250, 1993.;
22. Bolcato-Bellemin A L, Elkaim R, Abehsera A. (2000) Expression of mRNA encoding for MMPs and TIMPs in stretched human periodontal ligament and gingival fibroblasts. *Journal of Dental Research* 79: 1712-1716.;
23. Buduneli N., Vardar S., Atilla G., Sorsa T., Luoto H. & Baylas H. (2002) Gingival crevicular fluid matrix metalloproteinase-8 levels following

- adjunctive use of meloxicam and initial phase of periodontal therapy. *J Periodontol* 73, 103-109.
24. Bueno LC, Mayer MP, Dirienzo JM: Relationship between conversion of localized juvenile periodontitis-susceptible children from health to disease and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin promoter structure, *J Periodontol* 69: 998, 1998.
 25. Cambray GJ, Murphy G, Page-Thomas DP Reynolds JJ (1981). The production in culture of metalloproteinases and an inhibitor by joint tissues from normal rabbits, and from rabbits with a model arthritis. I. Synovium. *Rheumatol Int* 1: 11-16.;
 26. Carlsson J, Herrman BF, Hofling JF, Sundqvist GK (1984a). Degradation of the human proteinase inhibitors alpha-1- antitrypsin and alpha-2-macroglobulin by *Bacteroides gingivalis*. *Infect Immun* 43:644-648.;
 27. Chien HH, Lin WL, Cho MI. Interleukin-1 beta- induced release of matrix proteins into culture media causes inhibition of mineralization of nodules formed by periodontal ligament cells in vitro. *Calcif Tissue Int* 1999; 64: 402-413.
 28. Chien H, Cox S, Eley B, Mantyla P, Ronka H & Sorsa T. (2000) Matrix metalloproteinase-8 levels and elastase activities in gingival crevicular fluid from chronic adult periodontitis patients. *J Clin Periodontol* 27, 366-369.
 29. Christodoulides N, Floriano PN, Miller SC, et al. Labon-a-chip methods for point-of-care measurements of salivary biomarkers of periodontitis. *Ann N Y Acad Sci* 2007; 1098: 411-428.
 30. Ciancio SG. Farmacoterapia. In: Cohen W, Mealey BL, eds. *Periodontal Medicine*, vol.1. Sao Paulo: Santos; 2002: 243-272.
 31. Costa PP, Trevisan GL, Macedo GO, Palioto DB, Souza SS, et al. Salivary Interleukin-6, matrix metalloproteinase-8, and osteoprotegerin in patients with periodontitis and diabetes. *J Periodontol* 2010; 81: 384-391.
 32. Cox SW, Eley BM, Kiili M, Asikainen A, Tervahartiala T, Sorsa T. Collagen degradation by interleukin-1 beta stimulated gingival fibroblasts is accompanied by release and activation of multiple matrix metalloproteinases and cysteine proteinases. *Oral Dis* 2006; 12: 34-40.
 33. Delaisse J-M, Vaes G (1992). Mechanism of mineral solubilization and matrix degradation in osteoclastic bone resorption. In: Rifkin BR, Gay CV, editors. *Biology and physiology of the osteoclast*. Boca Raton (FL): CRC Press, 289-314.;
 34. Ding Y, Uitto V-J, Firth J, Haapasalo M, Kontinen YT, et al. (1995). Modulation of host matrix metalloproteinases by bacterial virulence factors relevant in human periodontal diseases. *Oral Dis* 1: 279-286.

35. Domeij H, Yucel-Lindberg T, Modeer T (2002). Signal pathways involved in production of MMP-1 and MMP-3 in human gingival fibroblasts. *Eur J Oral Sci* 110: 302-306.
36. Dommon S, Shimokawa H, Matsumoto Y, Yamaguchi S, Soma K. (1999). In situ hybridization for matrix metalloproteinase-1 and cathepsin K in rat root-resorbing tissue induced by tooth movement. *Archives of Oral Biology* 44: 907-915.;
37. Egeblat M. & Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer*. 2002; 2: 161-174.
38. Ejeil A, Igondjo-Tchen S, Ghomrasseni S, Pellat B, Godeau G & Gogly B. (2003) Expression of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) in healthy and diseased human gingival. *J Periodontol* 74, 188-195.
39. Embery G, Waddington RJ, Hall RC, et al 2000: Connective tissue elements as diagnostic aids in periodontology. *Periodontol* 2000 24:193.;
40. Everts V, Delaisse J-M, Korper W, Niehof A, Vaes G (1992). Degradation of collagen in the bone-resorbing compartment underlying the osteoclast involves both cysteine-proteinases and matrix metalloproteinases. *J Cell Physiol* 150: 221-231.
41. Frodge BD, Ebersole JL, Kryscio RJ, Thomas MV, Miller CS. Bone remodeling biomarkers of periodontal disease in saliva. *J Periodontol* 2008; 79: 1913-1919.
42. Garlet GP, Cardoso CR, Silva TA, et al. Cytokine pattern determines the progression of experimental periodontal disease induced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* through the modulation of MMPs, RANKL, and their physiological inhibitors. *Oral Microbiol Immunol* 2006; 21:12-20.
43. Genco RJ, Slots J (1984). Host responses in periodontal diseases. *J Dent Res* 63: 441-451.;
44. Genco RJ (1992). Host responses in periodontal diseases: current concepts. *J Periodontol* 63: 338-355.;
45. Giannobile VW. Host - response therapeutics for periodontal diseases. *J Periodontol* 2008; 79: 1592-1600.
46. Golub LM, Sorsa T, Lee HM, Ciancio S, Sorbi D, Ramamurthy NS, et al. (1995). Doxycycline inhibits neutrophil (PMN)-type matrix metalloproteinases in human adult periodontitis gingiva. *J Clin Periodontol* 22: 100-109.

47. Golub L M et al. (1997) A matrix metalloproteinase inhibitor reduces bone-type collagen degradation fragments and specific collagenases in gingival crevicular fluid during adult periodontitis. *Inflammation Research* 46: 310-319;
48. Golub LM, Lee HM, Ryan ME, Giannobile WV, Payne J, Sorsa T. Tetracyclines inhibit connective tissue breakdown by multiple non-antimicrobial mechanisms. *Adv Dent Res* 12: 12-26, 1998. ;
49. Gross J, Lapiere CM. Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay. *Proc Natl Acad Sci USA* 1962; 48: 1014-1022.
50. Grzesik JW, Narayanan A.S. (2002) Cementum and periodontal wound healing and regeneration. *Crit Rev Oral Biol Med* 13 (6): 474-484.
51. Hanemaaijer R et al. 1997 Matrix metalloproteinase-8 is expressed in rheumatoid synovial fibroblasts and endothelial cells. Regulation by TNF-alpha and doxycycline. *Journal of Biological Chemistry* 272:31504-31509.;
52. Hasty K A, Jeffry J J, Hibbs M S, Welgus H G 1987. The collagen substrate specificity of human neutrophil collagenase. *Journal of Biological Chemistry* 262: 10048-10052.;
53. Hayami T, Zhang Q, Kapila YL, Kapila S. Dexamethasone's enhancement of osteoblastic markers in human periodontal ligament cells is associated with inhibition of collagenase expression. *Bone* 2007; 40: 93-104.
54. Hayami T, Kapila YL, Kapila S. 2008. MMP-1 (Collagenase-1) and MMP-13 (Collagenase-3) differentially regulate markers of osteoblastic differentiation in osteogenic cells. *Martix Biol.* 27 (8): 682-692.
55. Heath JK, Atkinson SJ, Hembry RM, Reynolds JJ, Meikle MC (1987). Bacterial antigens induce collagenase and prostaglandin E2 synthesis in human gingival fibroblasts through a primary effect on circulating mononuclear cells. *Infect Immun* 55: 2148-2154.;
56. Hernandez M, Martinez B, Tejerina JM, Valenzuela MA, Gamonal J. MMP-13 and TIMP-1 determinations in progressive chronic periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2007 Sep; 34(9): 729-35.;
57. Herr AE, Hatch AV, Throckmorton DJ, et al. Microfluidic immunoassays as rapid saliva-based clinical diagnostics. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104:5268-5273.
58. Hillman JD, Socransky SS (1989). The theory and application of bacterial interference to oral diseases: In: Myers HM, editor. *New biotechnology in oral research.* Basel: Karger, 1-17.

59. Holliday LS, Welgus HG, Fliszar CJ, Veith M, Jeffrey JJ, Gluck SL. Initiation of osteoclast bone resorption by interstitial collagenase. *J Bio Chem* 35: 22053-22058,1997.
60. Holt S. C., and E. Bramanti. 1991. Factors in virulence and their role in periodontal disease pathogenesis. *Crit Rev Oral Biol Med* 2: 177-281.
61. Hwang SY, Kim JY, Park MK, Moon Y, Kim WU, et al. (2004). IL-17 induces production of IL-6 and IL-8 in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts via NK-kappaB and PI3-kinase/akt-dependent pathways. *Arthritis Res Ther* 6: R120-R128.
62. Ilgenli T, Vardar-Sengul S, Gurkan A, Sorsa T, Stackelberg S, Kose T, Ailla G. Gingival crevicular fluid matrix metalloproteinase-13 levels and molecular forms in various types of periodontal diseases. *Oral Dis.* 2006 Nov; 12(6): 573-579. ;
63. Ingman et al.1996 Matrix metalloproteinases and their inhibitors in gingival crevicular fluid and saliva of periodontitis patients. *Journal of Clin Periodontology* 23 (12): 1127-1132;
64. Ingman T, Apajalahti S, Mantyla P, Savolainen P, Sorsa T. 2005 Matrix metalloproteinase-1 and -8 in gingival crevicular fluid during orthodontic tooth movement: a pilot study during 1 month of follow-up after fixed appliance activation. *European Journal of Orthodontics* 27: 202-207.;
65. Jenne DE. Structure of the azurocidin, proteinase – 3, and neutrophil elastase genes. Implications for inflammation and vasculitis. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 150: 147-154.
66. Johansson N, Airola K, Grenman S, Kariniemi A, Kere U K, Kahari V M 1997 Expression of collagenase-3 (matrix metalloproteinase-13) in squamous cell carcinomas of the head and neck. *American Journal of Pathology* 151: 499-50;
67. Jovanovic DV, Di Battista JA, Martel-Pelletier J, Jolicoeur FC, He Y, et al. (1998). IL-17 stimulates the production and expression of proinflammatory cytokines, IL-1beta and TNF-alpha, by human macrophages. *J Immunol* 160: 3513-3521.
68. Kafienah, W., Buttle, D.J., Burnett, D., Hollander, A.P. Cleavage of type I collagen by human neutrophil elastase. *Biochem J* 1998; 330,897-902.;
69. Kantarci A, Oyaizu K, Van Dyke TE. Neutrophil-mediated tissue injury in periodontal disease pathogenesis: Findings from localized aggressive periodontitis. *J Periodontol* 2003; 74: 66-75.
70. Katz Y, Nadiv O, Beer Y (2001). Interleukin-17 enhances tumor necrosis factor alpha-induced synthesis of interleukins 1,6 and 8 in skin and synovial

fibroblasts: a possible role as a „fine-tuning” cytokine in inflammation processes. *Arthritis Rheum* 44: 2176-2184.

71. Kelly EA, Jarjour NN. Role of matrix metalloproteinases in asthma. *Curr Opin Pulm Med* 2003; 9: 28-33.
72. Kiili M et al. 2002 Collagenase-2 (MMP-8) and Collagenase (MMP-13) in adult periodontitis: Molecular forms and levels in gingival crevicular fluid and immunolocalisation in gingival tissue. *Journal of Clin Periodontology* 29: 224-232.;
73. Kinney JS, Ramseier CA, Giannobile WV. Oral fluid-based biomarkers of alveolar bone loss in periodontitis. *Ann N Y Acad Sci* 2007; 1098: 230-251.
74. Kinane, D.F.& Hart, T.C. (2003) Genes and gene polymorphisms associated with periodontal disease. *Crit Rev Oral Biol Med* 14, 430-449.
75. Kivela-Rajamaki M, Maisi P, Tervahartiala T, Teronen O, Husa V, Salo T & Sorsa T. (2003) Levels and molecular forms of MMP-7 (matrilysin-1) and MMP-8 (collagenase -2) in diseased human peri-implant sulcular fluid. *J Periodont Res* 38, 583-590.
76. Knauper V, Lopez-Otin C, Smith B, Knight G, Murphy G. Biochemical characterization of human collagenase-3. *J Biol Chem* 1996; 271: 1544-1550.
77. Korostoff J, wang J, Sarment D, Stewart J, Feldman R& Billings P. (2000) analysis of in situ protease activity in chronic adult periodontitis patients: expression of activated MMP-2 and a 40kDa serine protease. *J Periodontol* 71, 353-360.
78. Kumar M, vamsi G, Sripriya R.& Sehgal P. (2006) Expression of matrix metalloproteinases (MMP-8 and -9) in chronic periodontitis patients with and without diabetes mellitus. *J Periodontol* 77, 1803-1808.
79. Lekic P, Rojas J, Birek C, Tenenbaum H, McCulloch CA. Phenotypic comparison of periodontal ligament cells in vivo and in vitro. *J Periodontal Res* 2001; 36: 71-79.
80. Lekic PC, Rajshankar D, Chen H, Tenenbaum H, McCulloch CA. Transplantation of labeled periodontal ligament cells promotes regeneration of alveolar bone. *Anat Rec* 2001; 262: 193-202.
81. Levin L, Baev V, Lev R, Stabholz A, Ashkenazi M. Aggressive periodontitis among young Israeli army personnel. *J Periodontol* 2006; 77: 1392-1396.
82. Lindy O, KontinenYT, Sorsa T, Ding Y, Santavirta S, et al. (1997). Matrix metalloproteinases-13 (collagenase-3) in human rheumatoid synovium. *Arthritis and Rheumatism* 40: 1391-1399.;

83. Loe H, Brow LJ: Early onset periodontitis in the United States of America, *J Periodontol* 62: 608,1991.
84. Loos BG, Leppers-Van de Straat FG, Van de Winkel JG, Van der Velden U. Fc-gamma receptor polymorphisms in relation to periodontitis. *J Clin Periodontol* 2003; 30: 595-602.
85. Maehata Y, Takamizawa S, Ozawa S, Kato Y, Sato S, Kubota E, Hata RI. Both direct and collagen-mediated signals are required for active vitamin(D3)-elicited differentiation of human osteoblastic cells:Roles of osterix, an osteoblast-related transcription factor. *Matrix Biol* 2005; 30:30.
86. Maeso G, Bravo M, Bascones A. Levels of metalloproteinase-2 and -9 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 in gingival crevicular fluid of patients with periodontitis, gingivitis, and healthy gingiva. *Quintessence Int.* 2007 Mar; 38 (3): 247-52.;
87. Mantyla P et al. 2003 Gingival crevicular fluid collagenase-2 (MMP-8) test-stick for chair-side monitoring of periodontitis. *Journal of Periodontal Research* 38: 436-439.;
88. Marsh PD (1989).Host defenses and microbial homeostasis: role of microbial interactions. *J Dental Res* 68: 1567-1575.
89. Mature JD, Arias AA, Wright NA, et al. A new genetic subgroup of chronic granulomatous disease with autosomal recessive mutations in p40 phox and selective defects in neutrophil NADPH oxidase activity. *Blood* 2009; 114: 3309-3315.
90. Meikle MC, Bord S., Hembry RM, Comston J., Croucher PI, Reynolds JJ. Human osteoblasts in culture synthesize collagenase and other matrix metalloproteinases in response to osteotropic hormones and cytokines. *J Cell Sci* 103: 1093-1099, 1992.;
91. Melvin WL, Sandifer BJ, Gray LJ. The prevalence and sex ratio of juvenile periodontitis in young racially mixed population. *J Periodontol* 1991; 62:330-334.
92. Miller CS, King CP Jr., Langub MC, Kryscio RJ, Thomas MV. Salivary biomarkers of existing periodontal disease. A cross-sectional study. *J Am Dent Assoc* 2006; 137: 322-329.
93. Mizuno M, Fujisawa R, Kuboki Y. Type I collagen-induced osteoblastic differentiation of bone-marrow cells mediated by collagen-alpha2beta1 integrin interaction. *J Cell Physiol* 2000; 184: 207-213.
94. Murphy G, Reynolds JJ (1993). Extracellular matrix degradation. In: Royce PM, Steinmann B, editors. *Connective tissue and its heritable disorders*. New York: Willey-Liss, 287-316.;

95. Murphy GJP, Murphy G, Reynolds JJ (1991c) The origin of matrix metalloproteinases and their familial relationships. *FEBS Lett* 289: 4-7.;
96. Nagase H. Activation mechanisms of matrix metalloproteinases. *Biol Chem* 1997; 378: 151-60.
97. Nibali L, O'Dea M, Bouma G, Parkar M, Thrasher AJ, Burns S, Donos N. Genetic variants associated with neutrophil function in aggressive periodontitis and healthy controls. *J Periodontol* 2010; 81: 527-534.
98. Nicu EA, Van der Velden U, Everts V, Van Winkelhoff AJ, Roos D, Loos SG. Hyper-reactive PMNs in FcγR1a 131 H/H genotype periodontitis patients. *J Clin Periodontol* 2007; 34: 938-945.
99. Okamura T, Shimokawa H, Tagaki Y, Ono H, Sasaki S 1993 Detection of collagenase mRNA in odontoclasts of bovine root-resorbing tissue by in situ hybridization. *Calcified Tissue International* 52: 325-330.;
100. Page RC, Komman KS. The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. *Periodontology* 2000; 1997a; 14:9-11.
101. Palosaari et al. 2000 The expression of MMP-8 in human odontoblasts and dental pulp cells is down-regulated by TGF-beta1. *Journal of Dental Research* 79: 77-84.;
102. Papapanou PN: Periodontal diseases: epidemiology, *Ann Periodontol* 1:1, 1996.
103. Pardo A, Selman M. MMP-1: The elder of the family. *Int J Biochem Cell Biol* 2005; 37: 283-288.
104. Ra HJ, Parks WC. Control of matrix metalloproteinase catalytic activity. *Matrix Biol* 2007; 26: 587-596.
105. Reynolds JJ., Hembry R.M., Meikle M.C. Connective tissue degradation in health and periodontal disease and the roles of matrix metalloproteinases and their natural inhibitors. *Adv Dent Res* 8(2): 312-319, 1994.;
106. Ryan M.& Golub L. M. (2000) Modulation of matrix metalloproteinase activities in periodontitis as a treatment strategy. *Periodontol* 2000 24, 226-238.
107. Ристоска С, Миновска А, Панов С, Андоновска Б, Пандилова М. Саливарната матриксметалопроотеиназа-8 (MMP-8), биомаркер на активноста на пародонталната болест. *Македонски Стоматол. Преглед* 2008; 32(3-4): 173-180.
108. Sarment D.P, Korostoff J, D'Angelo M, Polson A. M. Feldman R. S. & Billings P. C. (1999) In situ localization and characterization of active proteases in chronically inflamed and healthy human gingival tissues. *J Periodontol* 70, 1303-1312.

109. Schatzle M, Loe H, Burgin W, Aneurund A, Boysen H, Lang NP. Clinical course of chronic periodontitis. Role of gingivitis. *J Clin Periodontol* 2003; 30: 887-901.
110. Schenkein HA: Etiology of localized juvenile periodontitis, *J Periodontol* 69: 1068, 1998 (editorial; comment).
111. Segulier S, Gogly B, Bodineau A, Godeau G, Brousse N. Is collagen breakdown during periodontitis linked to inflammatory cell and expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in human gingival tissue? *J Periodontol* 2001; 72:1389-1406.
112. Seo BM, Miura M, Gronthos S, Bartold PM, Batouli S, Brahimi J, Young M, et al. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet* 2004; 364: 149-155.
113. Shiga M, Kapila YL, Zhang Q, Hayami T, Kapila S. Ascorbic acid induces collagenase -1 in human periodontal ligament cells but not in MC3T3-E1 osteoblast-like cells: potential association between collagenase expression and changes in alkaline phosphatase phenotype. *J Bone Miner Res* 2003; 18:67-77.
114. Sigusch B, Eick S, Pfister W, Klinger G, Glockmann E. Altered chemotactic behavior of crevicular PMNs in different forms of periodontitis. *J Clin Periodontol* 2001; 28: 162-167.
115. Smith GN, Brandt KD, Hasty KA. Activation of recombinant human neutrophil procollagenase in the presence of doxycycline results in fragmentation of the enzyme and loss of enzyme activity. *Arthritis Rheum* 39:235-244, 2002.;
116. Soell M, Elkaim R, Tenenbaum H. Cathepsin C, matrix metalloproteinases, and their tissue inhibitors in gingiva and gingival crevicular fluid from periodontitis affected patients. *J Dent Res* 2002;81: 174-178.
117. Song X, Zeng L, Jin W, Thompson J, Mizel DE, Lei K, Billingham RC, Poole AR, Wahl SM. Secretory leukocyte protease inhibitor suppresses the inflammation and joint damage of bacterial cell wall-induced arthritis. *J Exp Med*. 1999 Aug 16;190(4)535-542.;
118. Sorsa et al. (1994) Effects of tetracyclines on neutrophil, gingival, and salivary collagenases. A functional and Western blot assessment with special reference to their cellular sources in periodontal diseases. *Annals of the New York Academy of Sciences* 732: 112-131. ;
119. Sorsa T, Ingman T, Mikkonen T, Suomalainen K, Golub L M, Thesleff I (1992) Characterisation of interstitial collagenase in gingival crevicular fluid during orthodontic tooth movement in man. In: Davidovitch Z (ed.) *The biological mechanisms of tooth movement and craniofacial adaptation*. EBSCO Media, Alabama, pp. 47-51;

120. Sorsa T, Ingman T, Suomalainen K, Haapasalo M, Kontinen YT, Lindy O. (1992). Identification of proteases from periodontopathogenic bacteria as activators of latent human neutrophil and fibroblast-type interstitial collagenases. *Infect Immun* 60: 4491-4495.;
121. Sorsa T, Tjaderhane L, & Salo T. (2004) Matrix metalloproteinases (MMPs) in oral diseases. *Oral Dis* 10, 311-318.
122. Sorsa T., Tjaderhane L., Kontinen Y., Lauhio A., Salo T., Lee H., Golub L., Brown D & Mantyla P. (2006) Matrix metalloproteinases: contribution to pathogenesis, diagnosis and treatment of periodontal inflammation. *Ann Med* 38, 306-321.
123. Stamp LK, James MJ, Cleland LG (2004). Interleukin-17: the missing link between T-cell accumulation and effector cell actions in rheumatoid arthritis? *Immunol Cell Biol* 82:1-9.
124. Sternlicht MD & Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behaviour. *Annu Rev Cell Dev Bio* 17: 463-516, 2001.;
125. Taba M Jr, Kinney J, Kim AS, Giannobile WV. Diagnostic biomarkers for oral and periodontal diseases. *Dent Clin North Am* 2005; 49: 551-571.
126. Takahashi I et al. 2003 Expression of MMP-8 and -13 genes in the periodontal ligament during tooth movement in rats. *Journal of Dental Research* 82: 562-567.;
127. Takahashi K, Azuma T, Motohira H, Kinane DF, Kitetsu S (2005). The potential role of interleukin-17 in the immunopathology of periodontal disease. *J Clin Periodontol* 32: 369-374.
128. Taubman MA, Kawai T, Han X. The new concept of periodontal disease pathogenesis requires new and novel therapeutic strategies. *J Clin Periodontol* 2007; 34: 367-369.
129. Tervahartiala T, Pirila E, et al. 2000 The in vivo expression of the collagenolytic matrix metalloproteinases (MMP-2,-8,-13, and -14) and matrilysin (MMP-7) in adult and localized juvenile periodontitis. *Journal of Dental Research* 79; 12: 1969-1977,
130. Tonetti MS, Freiburger K, Lang NP, Bickel M (1993). Detection of interleukin-8 and matrix metalloproteinases transcripts in healthy and diseased gingival biopsies by RNA/PCR. *J Periodontal Res* 28: 511-513.;
131. Tuter G., Kurtis B. & Serdar M. (2002) Effects of phase I periodontal treatment on gingival crevicular fluid levels of matrix metalloproteinase-1 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1. *J Periodontol* 73, 487-493.

132. Uitto V. J., Overall C.M. & McCulloch C. (2003) Proteolytic host cell enzymes in gingival crevice fluid. *Periodontol* 2000 31, 77-104.
133. Van Dyke TE, Schweinebraten M, Cianciola LJ, et al: Neutrophil chemotaxis in families with localized juvenile periodontitis, *J Periodontal Res* 20:503, 1985.
134. Van Dyke TE, Serhan CN. Resolution of inflammation: A new paradigm for the pathogenesis of periodontal diseases. *J Dent Res* 2003; 82: 82-90.
135. Wahlgren J, Maisi P, Sorsa T, Sutinen T, Tervahartiala T, Pirila E, Teronen O., Hietanen J., et al.(2001). Expression and induction of collagenases (MMP-8 and -13) in plasma cells associated with bone-destructive lesions. *J Pathol* 194 (2): 217-224.
136. Welgus H G, Jeffrey J J, Eisen A Z 1981. The collagen substrate specificity of human skin fibroblast collagenase. *Journal of Biological Chemistry* 256: 9511-9515.;
137. Woodward JK, Holen I, Coleman RE, Buttle DJ. The roles of proteolytic enzymes in the development of tumour-induced bone disease in breast and prostate cancer. *Bone* 2007; 41: 912-927.
138. Wolley DE, Roberts DR, Evanson JM (1975) Inhibition of human collagenase activity by a small molecular weight serum protein. *Biochem Biophys Res Commun* 66: 747-754.
139. Wu Y-M, Richards D W, Rowe D J 1999 Production of matrix-degrading enzymes and inhibition of osteoclast-like cell differentiation by fibroblast-like cell from the periodontal ligament of human primary teeth. *Journal of Dental Research* 78: 681-689.
140. Zambon JJ: Periodontal diseases: microbial factors, *Ann Periodontol* 1:879, 1996.
141. Zambon JJ, Haraszthy VI, Hariharan G, et al: The microbiology of early-onset periodontitis: association of highly toxic *Actinobacillus actinomycetemcomitans* strains with localized juvenile periodontitis, *J Periodontol* 67 (suppl): 282, 1996.