

## САЛИВАРНАТА МАТРИКСМЕТАЛОПРОТЕИНАЗА-8 (ММР-8), БИОМАРКЕР НА АКТИВНОСТА НА ПАРОДОНТАЛНАТА БОЛЕСТ

Ристоска С.<sup>1</sup>, Миновска А.<sup>1</sup>, Панов С.<sup>2</sup>, Андоновска Б.<sup>3</sup>, Пандилова М.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>СТОМАТОЛОШКИ ФАКУЛТЕТ - Скопје, Клиника за болести на устата и пародонтот

<sup>2</sup>ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ - Скопје, Институт за биологија, лабораторија за молекуларна биологија

<sup>3</sup>СТОМАТОЛОШКИ ФАКУЛТЕТ - Скопје, Клиника за орална хирургија

Матриксметалопротеиназиите (ММПs) прејствавуваат голема група ензими одговорни за деградацијата на екстрацелуларниот матрикс во текот на пародонталната болест.

Цел на оваа студија е да го утврдиме ниво на саливарната ММР-8 (неуирофилна колагеназа) кај здрави субјекти (без пародонтопатија), како и кај оние со умерена до силно изразена форма на хронична пародонтопатија и да ја проследиме нивната поврзаност (асоцираност) со клиничките параметри. За реализација на поставената цел беа проследени 40 испитаници, кои беа поделени во 2 групи. Првата група ја сочинуваа 20 пациенти, без радиографски дејектибилни знаци на пародонтална болест (контролна група), а втората група ја формираа 20 пациенти со умерена до силно изразена форма на пародонтопатија, со зауба на ајачмент по голем од 4мм, според критериумите предложени од ААР во 1999 година. Клинички беа проследени следниве параметри:

- индекс на денитален плак - ИДП (Silness-Loe 1963), индекс на гингивална инфламација - ИГИ (Loe-Silness 1964), индекс на епителна аикална миграција - ЕАМ (ААР 1999). Кај сите испитаници беше земена несимулирана џлунка по пат на едноставно екскортирање во стерилни шпиги. За одредување на концентрациите на ММР-8 во џлунката беше корисена квантитативната ензимска имуноанализа техника (ELISA). Беше употребен Human Quantikine ММР-8

ELISA кит (R&D Systems), кој служи за квантитативно одредување на хуманата активна и проматриксметалопротеиназа-8 (војната ММР-8) концентрација во џкивниот супернатант, џлунка, серум и џлазма. Резултатите укажаа на постоење на висока статистички значајна разлика на просечните вредности на клиничките параметри меѓу контролната и испитуваната група:

- ИДП ( $p=0,028$ ), ИГИ ( $p=0,014$ ), ЕАМ ( $p=0,000$ ). Пациентите со пародонтопатија имаа значително повисоко ниво на ММР-8 во однос на здравите субјекти ( $p=0,000$ ). Зголемените вредности на ММР-8 позитивно корелираа со ИГИ ( $r=0,66$ ) и со заубајата на ајачментите ( $r=0,64$ ) кај контролната група. Утврдиме присуство на позитивна корелација меѓу ИДП и ММР-8 ( $r=0,47$ ), како и меѓу ИГИ и ММР-8 ( $r=0,76$ ) кај испитуваната група.

Одредувањето на саливарниот ММР-8 може да послужи како биомаркер на пародонталната болест, како и за рана дејекција на активността на заболувањето и за преземање на соодветни терапевтски мерки.

**Клучни зборови:** пародонтална болест, џлунка, ММР-8, биомаркер

При хроничните инфламаторни состојби на сврзните ткива, адхезијата и инвазијата на ткивата на домаќинот од страна на пато-

гените бактерии, ја иницира деструкцијата на структурните протеини, вклучувајќи го и колагенот. Деградацијата на колагенот може да настане директно од страна на бактериските протеази, доколку постои силно изразена инфламација, меѓутоа екстензивни оштетувања на ткивата можат да настанат и од ензимите кои се секретирани од страна на домаќинот, особено од полиморфонуклеарните леукоцити (ПМН). При проучувањето на механизмите на колагената деградација во текот на хроничните инфекции предизвикани од грамнегативните анаеробни бактерии, пародонтопатијата е широко користена како модел, при кој сврзно-ткивната деструкција делумно е посредувана и од колагеназите ослободени од клетките на домаќинот (8). Пародонталната болест (пародонтопатијата), како хронично инфламаторно заболување е иницирано од патогените бактерии присутни во денталниот биофилм, кои ги индуцираат имуните одговори од страна на домаќинот. Таа доведува до долготрајни оштетувања на потпорните ткива на пародонтот, загуба на сврзно-ткивниот атакмент и алвеоларната коска, што резултира со целосно губење на забите. Многу често се посочува и како важен кофактор за иницијација на кардиоваскуларните, пулмоналните заболувања и многу други, меѓу кои и предвременото раѓање на деца со помала телесна тежина. Како хронично заболување се карактеризира со епизоди на акутна егзацербација, при што доаѓа до прогресија на заболувањето. Токму ваквата епизодична прогресија го оневозможува правилното проследување на факторите кои влијаат врз динамиката на заболувањето.

Доминантни процеси кои се случуваат во текот на пародонтопатијата се деградацијата на колагенот и екстрацелуларниот матрикс од страна на бројни протеази. Колагеназите го разградуваат колагенот под одредени физиолошки услови на рН на средината, температура и осмоларност (16). Последователно, значи дека нивната регулација е од големо значење за одржувањето на хомеостазата во сврзното ткиво. Колагеназната

регулација претставува комплексен процес, кој ја вклучува синтезата на ензимите, нивната секреција, активација и инхибиција. Различни цитокини и growth фактори можат да ја регулираат локалната експресија на колагеназите (особено MMP-1 и MMP-8) и нивните инхибитори, во текот на процесите на раст и на развој, ремоделирањето и репараторните процеси (1).

Колагеназите се дел од големата група матриксметалопротеинази (MMP), протеолитички ензими, одговорни за екстрацелуларната матрикс деградација, кои сигнификантно придонесуваат во ткивната деструкција при пародонталната болест, како и ремоделирањето на ткивата во текот на многу физиолошки процеси (4). Матриксметалопротеиназите вклучуваат најмалку 20 генетски различни, но структурно поврзани  $Zn^{2+}$  зависни ендопептидази, кои ги продуцираат различни типови клетки. Резидентните фибробласти, епителните клетки и макрофагите ја синтетизираат MMP-1 (интерстицијална или колагеназа-1), додека неутрофилите ја ослободуваат MMP-8 (колагеназа-2). Кога неутрофилните гранулоцити доаѓаат во инфламираните места, тие ослободуваат големо количество MMP-8, складирана во специфичните гранули. При тоа, инфламаторниот одговор на ткивото повеќе зависи од доаѓањето (регрутирањето) на нови клетки, отколку од локалната синтеза на MMP-8 (5). Овие ензими даваат придонес и се одговорни за колагенолитичната активност во заболените пародонтални ткива. Тие индицираат дека мерењето на молекуларните биомаркери, кои корелираат со пародонталната болест, ќе овозможат брза и точна дијагноза и динамичен мониторинг на активноста на болеста.

Цел на оваа студија е да го утврдиме нивото на саливарната MMP-8 (неутрофилна колагеназа) кај здрави субјекти (без пародонтопатија), како и кај оние со умерена до силно изразена форма на хронична пародонтопатија и да ја проследиме нивната поврзаност (асоцираност) со клиничките параметри.

## Материјал и метод

За реализирање на поставената цел на Клиниката за болести на устата и пародонтот при Стоматолошкиот клинички центар во Скопје, беа проследени 40 испитаници од двата пола. Кај сите беа спроведени комплетна анамнестичка постапка и детален клинички преглед, при што испитаниците беа поделени во две групи. Првата група ја сочинуваа 20 пациенти на возраст од 18 до 30 години (просечна возраст 24 години), кои беа во добра општа состојба, кај кои беа присутни најмалку 20 заби во оралната празнина и кај кои утврдивме постоење на клинички, но не и радиографски детектибилни знаци на пародонтална болест. Загубата на атачментот кај оваа група испитаници не беше поголема од 2мм кај помалку од 1% од присутните заби, додека при сондирањето крвавење постоеше кај помалку од 10% од присутните заби. Воедно тие беа контролната група. Втората група ја формираа 20 пациенти на возраст од 20 до 50 години (просечно 35 години), кои беа во добра општа состојба, без присуство на хронични и системски заболувања. Кај оваа група испитаници утврдивме присуство на умерена до силно изразена форма на пародонтопатија, со загуба на атачмент поголем од 4мм, според критериумите предложени од ААР во 1999 година. Кај сите пациенти беа нотирани следниве клинички параметри:

- индекс на дентален плак - ИДП (Silness-Loe 1963 ),
- индекс на гингивална инфламација - ИГИ (Loe-Silness 1964), проследен преку интензитетот на гингиворагија, како и
- индекс на епителна апикална миграција - ЕАМ ( ААР 1999).

По извршениот клинички преглед од сите испитаници земавме нестимулирана плунка (saliva), за одредување на концентрацијата на MMP-8. Методот на колекција на плунката (според Navazesh) се состоеше од едноставно експекторирање во стерилни шишенца, откако претходно секој пациент кратко ја испираше устата со млака вода.

Потоа примероците плунка веднаш беа замрзнувани на температура од  $-20^{\circ}\text{C}$  до понатамошна анализа. Непосредно пред анализата салива примероците беа одмрзнувани и разредувани 40x (10 ML плунка +390 L Calibrator Diluent RD5-10). За одредување на концентрациите на MMP-8 во плунката се користеше квантитативната enzyme-linked immunoassay техника (ELISA). Беше употребен Human Quantikine MMP-8 ELISA кит (R&D Systems), кој служи за квантитативно одредување на хуманата активна и проматриксметалопротеиназа-8 (вкупната MMP-8) концентрација во ткивните супернатанти, плунка, серум и плазма. Лабораториските испитувања беа изведени на Институтот за молекуларна биологија при Природно-математичкиот факултет во Скопје.

ELISA претставува вид лабораториска анализа кога моноклоналното антители се врзува за ензимот, при што доаѓа до промена во бојата, што може да се мери со спектрофотометар. Принципот на овој метод се состои во тоа што моноклоналните антители специфични за MMP-8 се поставуваат на една микроплоча. Внимателно, со пипета се зема од стандардот и од примероците плунка и се аплицира во секоја алвеола, при што MMP-8, кој е присутен во плунката, се врзува (задржува) за имобилизираните антители. По испирањето на преостанатите несврзани супстанции, моноклоналните антители специфични за MMP-8 се додаваат во алвеолите на микроплочата. Се продолжува со испирање за да се отстранат останатите несврзани антители и ензим реагенсот, а потоа се додава растворот од супстратот во самите алвеоли, при што доаѓа до промена на бојата пропорционално со количеството MMP-8 задржано во иницијалната фаза. Ензимската реакција се стопира со аплицирање на реагенсот за стопирање и се мери интензитетот на бојата.

Во текот на истражувањето, добиените податоци од клиничките и од параклиничките испитувања беа статистички обработени со помош на статистичките методи на дескриптивната и аналитичката статистика, при што се користеше програмот Statistika 6.0.

## Резултати

Од спроведените клинички и лабораториски испитувања и од нивната статистичка анализа ги добивме следниве резултати:

Во табела 1 се прикажани просечните вредности на индексот на денталниот плак, гингивалната инфламација, загубата на атачмент, како и просечните вредности на MMP-8 во плунката кај здравите испитаници и кај оние со пародонтална болест. Резултатите ни укажуваат дека постои статистичка значајност на просечните вредности на клиничките параметри меѓу контролната и испитуваната група. Просечните вредности на концентрациите на MMP-8 во плунката кај здравите субјекти (94,41 ng/ml) се сигнификантно пониски во однос на пациентите со пародонтопатија (603,99 ng/ml), што укажува на постоење на статистички сигнификантна разлика ( $p=0,000$ ).

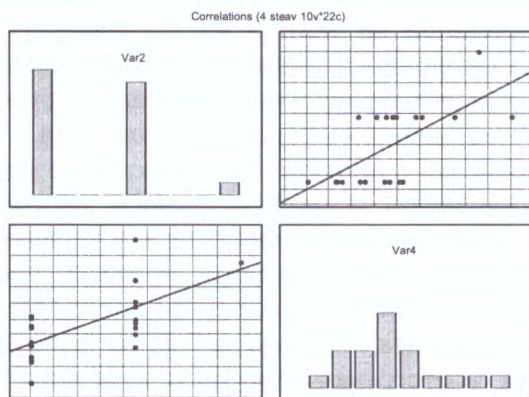
На графикон 1 претставена е корелацијата меѓу индексот на гингивалната инфла-

мација и MMP-8 кај контролната група. Кај оваа група испитаници утврдивме присуство на позитивна корелација ( $r=0,66$ ) меѓу овие два параметра.

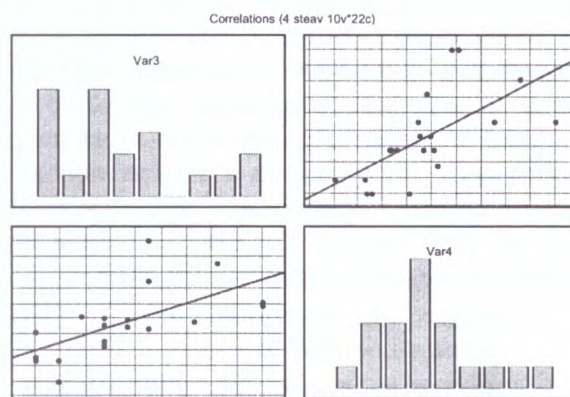
Нашите резултати укажаа дека и загубата на атачментот (епителната апикална миграција), исто така, позитивно корелира со концентрацијата на MMP-8 во плунката кај здравите испитаници ( $r=0,64$ ), графикон 2.

На графикон 3 е прикажана корелацијата меѓу индексот на денталниот плак и концентрацијата на MMP-8 во плунката кај пациентите со умерена до силно изразена форма на пародонтална болест. Утврдивме присуство на средно јака позитивна корелација ( $r=0,47$ ) меѓу овие два параметра кај оваа група испитаници.

Графикон 4 ја прикажува корелацијата меѓу индексот на гингивалната инфламација и концентрацијата на MMP-8 во плунката, кај пациентите со пародонтопатија. Spearman коефициентот на корелација укажува на постоење на позитивна корелација ( $r=0,76$ ) меѓу овие два параметра.



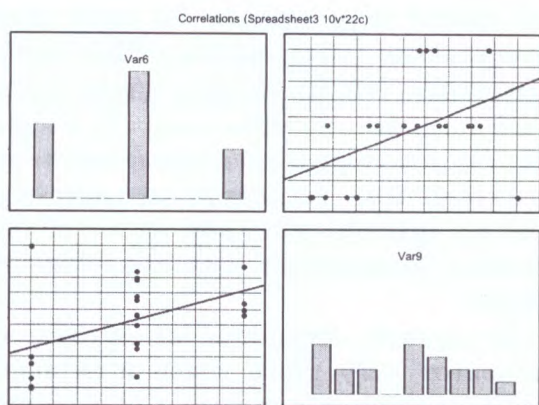
**Графикон 1.** Корелација меѓу индексот на гингивална инфламација и MMP-8 кај здравите испитаници ( $r=0,66$ )



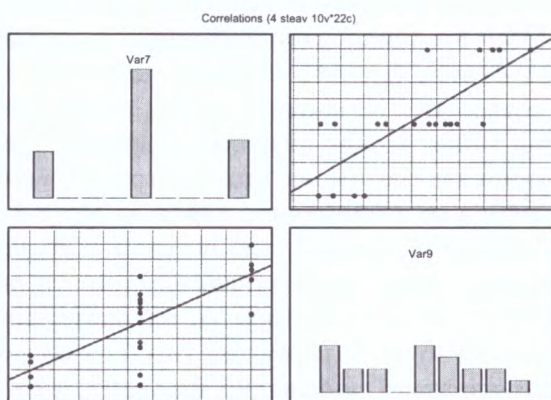
**Графикон 2.** Корелација меѓу загубата на атачмент и MMP-8 кај здравите испитаници ( $r=0,64$ )

**ТАБЕЛА 1.** ПРОСЕЧНИ ВРЕДНОСТИ НА ИДП, ИГИ, ЗАГУБА НА АТАЧМЕНТОТ И КОНЦЕНТРАЦИЈАТА НА MMP-8 КАЈ ЗДРАВИТЕ ИСПИТАНИЦИ И ОНИЕ СО ПАРОДОНТОПАТИЈА

ПАРАМЕТРИ	ЗДРАВИ		ПАРАДОНТОПАТ.		Студентов т-тест	p-вред.
	x-просек	St. Dev.	x-просек	St. Dev.		
ИДП	1,4	0,89	1,9	0,94	-2,36	0,028
ИГИ	1,55	0,6	2,05	0,68	-2,7	0,014
загуба на атачмент	1,88	0,3	5,05	0,83	-14,97	0,000
MMP-8	94,41	17,56	603,99	115,1	-21,19	0,000



**Графикон 3.** Корелација меѓу индексот на ден-тален плак и MMP-8 кај испитаниците со пародонтопатија ( $r=0,47$ )



**Графикон 4.** Корелација меѓу индексот на гингивална инфламација и MMP-8 кај испитаниците со пародонтопатија ( $r=0,76$ )

## Дискусија

Патофизиологијата на пародонталната болест, како бактериски индуцирано инфламаторно заболување кое доведува до прогресивно губење на забите, е комплексен процес во кој партиципираат голем број протеолитички ензими, и тоа по потекло од бактериите, како и од домаќинот (12, 14). Покрај инфламаторните медијатори, се детектираат и бројни ткивно-деструктивни молекули во гингивалните ткива, гингивалниот сулкусен флуид и во плунката кај пациентите афектирани со пародонтална болест. Свкупната салива која ја исполнува оралната празнина претставува важен физиолошки

флуид, кој содржи комплексна микстура на супстанции. Таа примарно се секретира од трите пара големи плунковни жлезди, како и од многубројните мали плунковни жлезди локализирани во субмукозата на оралната слuzница. Плунката содржи локално продуцирани протеини, како и различни молекули од системската циркулација. Исто така, во плунката се присутни различни количества крв, серум, серумски продукти, гингивален флуид, електролити, епителни и имуни клетки, микроорганизми, бронхијални продукти и останати надворешни супстанции. Ваквата богата микстура на супстанции ја прави плунката важен медиум за идентификување на единствени биомаркери, кои ќе ги рефлектираат оралните и системските промени на здравјето. (2, 6, 7)

Хуманата неутрофилна колагеназа (матриксметалопротеиназа-8, MMP-8) претставува важен медијатор на ткивната деструкција при инфламаторните заболувања. Се смета дека таа претставува клучен ензим кој е одговорен за колагената екстрацелуларна матрикс деградација. Има способност да ја разградува тројната хелична структура од типот I и III колаген, кои се критични за пародонталната деструкција. Го секретираат различни клетки на домаќинот, но доминантно се синтетизира и ослободува екстрацелуларно од специфичните гранули на полиморфонуклеарните леукоцити по мембранска стимулација, во текот на акутните состојби на пародонталната болест и се смета дека е одраз на активноста на заболувањето (17).

Анализата на добиените резултати на средните вредности на ИДП покажа дека постојат сигнификантни разлики меѓу контролната и испитуваната група ( $p=0,028$ ). Кај пациентите со пародонтопатија е присутно повисоко ниво на дентален плак. Резултатите укажаа и на значајно повисоко ниво на MMP-8 во плунката кај испитуваната, во однос на контролната група, што ни укажа на постоење висока статистичка сигнификантност ( $p=0,000$ ). Нашите наоди се во согласност со наодите на Miller и сор. (9) и Sorsa и сор. (18), Rai и сор. (13), кои забележале

зголемени нивоа на MMP-8 во плунката кај пациентите со гингивит и пародонтопатија, споредено со здравите субјекти. Spearman коефициентот на корелација ни укажа дека не постои корелација меѓу индексот на дентален плак и концентрациите на MMP-8 во плунката кај здравите субјекти. Меѓутоа, утврдивме позитивна корелација ( $r=0,47$ ) меѓу овие параметри кај пациентите со пародонтопатија, каде зголемувањето на нивото на плак условува зголемување на нивото на MMP-8 во плунката. Сметаме дека ваквиот наод се должи на интеракцијата меѓу бактериите присутни во денталниот биофилм со инфламаторните клетки, во прв ред неутрофилите, моноцитите или макрофагите, што резултира со ослободување на протеази од страна на клетките на домаќинот и зголемување на нивото на MMP-8 во инфламираното гингивално ткиво, гингивалниот флуид и, секако, во плунката. Имено, во податоците од литературата се посочуваат периопатогените бактерии, *Porphyromonas gingivalis* и *Treponema denticola* како доминантни компоненти на бактериската флора, присутни во супра и субгингивалниот дентален плак, кои продуцираат моќни протеази што посредуваат при ткивната деструкција преку намалување на одбранбените механизми на домаќинот, како и преку активирање на латентните проколагенази во активни форми. (15, 20) Исто така, утврдено е присуство на различни молекуларни форми на MMP-8, и тоа во гингивалниот флуид со молекуларна маса од ~80 kDa, но и во денталниот плак со мол. маса од 58 kDa. Се смета дека присуството на помалите молекули на MMP-8 во плакот се должи на протеолитичката фрагментација од страна на бактериските ензими. (19)

Резултатите од анализата на средните вредности на индексот на гингивалната инфламација ни укажаа дека постои статистички сигнификантна разлика меѓу контролната и испитуваната група ( $p=0,014$ ). Имено, пациентите со пародонтопатија имаа значително посилено изразена инфламација во однос на здравите субјекти. Утврдивме позитивна корелација меѓу ИГИ и саливар-

ните MMP-8 концентрации кај двете групи на испитаници (контролната  $r=0,66$ , како и испитуваната  $r=0,76$ ). Нашите наоди се совпаѓаат со наодите на Miller и сор. (9), Gangbar и сор. (3), кои утврдиле дека зголемените нивоа на MMP-8 во саливата (4 пати повеќе во однос на здравите) силно корелираат со гингивалната инфламација (крвавење при сондирање).

Просечните вредности на загубата на атачментот меѓу двете групи испитаници укажаа на постоење на висока статистичка сигнификантност ( $p=0,000$ ). Spearman коефициентот на корелација кај здравите субјекти покажа присуство на средно јака позитивна корелација меѓу саливарните концентрации на MMP-8 и апикалната миграција на припојниот епител ( $r=0,64$ ). Нашите резултати се во согласност со наодите на Rai и сор. (13), Craig, Miller и сор. (9), кои утврдиле дека клиничката загуба на атачментот значајно корелира со зголемените нивоа на MMP-8 и на MMP-2. Исто така, тие во своите студии утврдиле дека зголемените вредности на MMP-8, како и на IL-1beta во плунката, сигнификантно го зголемуваат ризикот од посилено изразено гингивално крвавење, зголемена длабочина на пародонталните џебови, како и клинички посилено изразена загуба на атачмент. Постоењето на позитивна корелација меѓу MMP-8 и клиничките параметри кои ги проследивме, го поддржуваат тврдењето дека MMP-8 е биохемиски индикатор на динамиката на пародонтално-ткивната деструкција и се поврзува со активноста на заболувањето.

Меѓутоа, неочекувано, не утврдивме корелација меѓу саливарните концентрации на MMP-8 и загубата на атачментот кај испитуваната група ( $r=1$ ). Иако неа ја сочинуваа пациенти со веќе изразена пародонтална болест, веројатно не постоела активна колагена деструкција. Можноста квантитативно да се одреди нивото на MMP-8 во плунката ни овозможува мониторинг на активноста на заболувањето. Имено, податоците од литературата укажуваат дека при хронична пародонтопатија, се зголемува нивото на

неутрофилната колагеназа (ММР-8) во гингивалниот сулкусен ексудат (11), но и во примероците од вкупната слива. (20) Пристаството на активната форма на ММР-8 (не и на латентниот ензим) е асоцирано со периоди на активна сврзно-ткивна деструкција и клинички манифестна егзацербација на болеста. (8) Меѓутоа, многу малку се знае за природата на активациониот процес на ММР-8 при пародонтопатија, како и за меѓусебната поврзаност на различните молекуларни форми на ММР-8 и нивната активност во гингивалниот флуид. Концентрацијата (нивото) на ММР-8 во плунката покажува широка варијабилност и меѓу самите пациенти со пародонтопатија, така што се смета дека ја рефлектира динамиката (активноста) на заболувањето. Забележани се значително повисоки нивоа на ММР-8 во плунката кај пациенти со силно изразена форма на пародонтопатија, во однос на оние со умерена форма (5). Бидејќи го секретираат различни клетки, како што се гингивалните и периодонталните лигаментарни фибробласти, можеби неговата концентрација во инфламираното гингивално ткиво или, пак, во гингивалниот ексудат е поголема во однос на онаа која ние ја детектираме во плунката. Саливарните протеини од типот на хистатини, кои имаат афинитет да се врзуваат со цинкот од матриксметалопротеиназите, можеби го инактивирале (ја инхибирале активноста) на ММР-8.

Сметаме дека сепак се работи за мала група испитаници која не ни дозволува да ги генерализираме нашите резултати. Конечно, тоа нè обврзува за понатамошни, посеопфатни и посуптилни истражувања со помош на кои ќе проникнеме подлабоко во сè она што се случува во гингивопародонталниот комплекс во текот на пародонтопатијата и ќе можеме да дадеме поконкретни одговори на многу прашања кои се однесуваат на механизмите на настанување и прогресија на ова многу често заболување.

За крај, сепак би заклучиле дека плунката претставува исклучително погоден медиум кој е лесен за колекционирање, со брзи и неинвазивни методи, а кој содржи значајни

биомаркери кои се однесуваат на различни аспекти на пародонталната болест. Преку проследување на некои од нив, на пример, на нивото на ММР-8 како индикатор на активноста на заболувањето, можеме да ги идентификуваме местата на активна колагена деградација, како и да преземеме соодветни терапевтски постапки.

## SALIVARY MATRIX METALLOPROTEINASE-8 (MMP-8), PERIODONTAL DISEASE ACTIVITY BIOMARKER

Ristoska S., Minovska A., Panov S., Andonovska B., Pandilova M.

### Summary

Matrix metalloproteinases (MMPs), the key enzymes responsible for matrix degradation, are derived from polymorphonuclear leukocytes during early stages of periodontitis. The aim of the present study was to determine the level of MMP-8 (neutrophil collagenase) in saliva samples from healthy subjects and patients with moderate to severe periodontitis, and to follow up the association between MMP-8 level with clinical parameters. In order to achieve the set aim, we have examined 40 patients divided into two groups: the first group was consisted of 20 patients with clinically, but no radiographic detectible sings of periodontal disease (control subjects). 20 patients with moderate to severe form of periodontal disease with clinical loss of attachment >4mm.were included in the second group (case group).

The periodontal evaluation included assessment of plaque index- Silness Loe (1963), gingival inflammation index (bleeding on probing) - Loe Silness (1964), clinical loss

of attachment according to American Academy of Periodontology (1999).

We collected the whole unstimulated expectorated saliva from each subject into sterile tubes. Salivary MMP-8 concentrations were measured by Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Human

Quantikine MMP-8 ELISA kit (R&D systems) was used for quantitative determination of human active and proMMP-8 (total MMP-8) concentrations in cell culture supernates, saliva, serum, and plasma.

Results: we have found statistically significant differences in average values of the clinical parameters between control and case subjects. IDP ( $p=0,028$ ); IGI ( $p=0,014$ ); CAL ( $p=0,000$ ). Elevated salivary levels of MMP-8 were observed in periodontitis patients compared to the healthy subjects ( $p=0,000$ ). Salivary MMP-8 levels were significantly correlated to the clinical parameters of the patients. Spearman's index showed positive correlation between bleeding on probing and salivary MMP-8 ( $r=0,66$ ); clinical loss of attachment and sMMP-8 ( $r=0,64$ ) in healthy subjects. Positive correlation existed between IDP and elevated level of MMP-8 ( $r=0,047$ ); IGI and MMP-8 ( $r=0,76$ ) in periodontitis patients.

Determining the concentration of salivary MMP-8, may serve as biomarker of periodontal disease for an early detection of the active phases of collagen degradation and for undertaking proper therapy actions.

**Key words:** periodontal disease, MMP-8, saliva, biomarker

## Литература

- Birkedal-Hansen H, Moore W G, Bodden M K, Windsor L J, Birkedal-Hansen B, DeCarlo A, Engler J A. Matrix metalloproteinases: a review. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1993; 4: 197-250.
- Fox PC. Salivary monitoring in oral diseases. *Ann N Y Acad Sci* 1993; 694: 234-7.
- Gangbar S, Overall CM, McCulloch CA, Sodek J. Identification of polymorphonuclear leukocyte collagenase and gelatinase activities in mouthrinse samples: correlation with periodontal disease activity in adult and juvenile periodontitis. *J Periodont Res* 1990; 25(5): 257-267
- 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.
- 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.
- Kaufman E, Lamster IB. Analysis of saliva for periodontal diagnosis: a review. *J Clin Periodontol* 2000; 27 (7): 453-65.
- Lamster IB, Grbic JT. Diagnosis of periodontal disease based on analysis of the host response. *Periodontol* 2000 1995; 7: 83-99.
- Lee W, Aitken S, Sodek J, McCulloch C A. Evidence of a direct relationship between neutrophil collagenase activity and periodontal tissue destruction in vivo: role of active enzyme in human periodontitis. *J Periodontal Res.* 1995; 30:23-33.
- Miller CS, King CP Jr, Langub MC, Kryscio RJ, Thomas MV (2006) Salivary biomarkers of existing periodontal disease: a cross-sectional study. *J Am Dent Assoc* 137, 322-329.
- Navazesh M. Methods for collecting saliva. *Ann N Y Acad Sci* 1993; 694:72-77.
- Overall C M, Sodek J, McCulloch C A, Birek P. Evidence for polymorphonuclear leukocyte collagenase and 92-kilodalton gelatinase in gingival crevicular fluid. *Infect Immun.* 1991; 59: 4687-4692.
- Potempa, J., A. Banbula, and J. Travis. 2000. Role of bacterial proteinases in matrix destruction and modulation of host responses. *Periodontol.* 2000 24:153-192.
- Rai B., Kharb S., Jain R., and Suresh C. A. Biomarkers of periodontitis in oral fluids. *Journal of Oral Science*, Vol. 50, No. 1, 53-58, 2008
- Reynolds, J.J., and Meikle. 1997. Mechanisms of connective tissue destruction in periodontitis. *Periodontol.* 2000 14:144-157.
- Saari, H., K. Suomalainen, O. Lindy, Y. T. Kontinen, and T. Sorsa. 1990. Activation of latent neutrophil collagenase by reactive oxygen species and serineproteases. *Biochem. Biophys Res. Commun.* 171: 979-987.
- Sellers A, Murphy G. Collagenolytic enzymes and their naturally occurring inhibitors. *Int Rev Connect Tissue Res.* 1981;9: 151-190.
- Sodek J, Overall CM. Matrixmetalloproteinases in periodontal tissue remodeling. *Matrix Suppl* 1992; 352-362.
- Sorsa T, Suomalainen K, Uitto VJ (1990) The role of gingival crevicular fluid and salivary interstitial collagenases in human periodontal diseases. *Arch Oral Biol* 35, Suppl, 193S-196S.
- Sorsa T, Ding Y L, Ingman T, Salo T, Westerlund U, Haapasalo M, Kontinen Y T. Cellular source, activation and inhibition of dental plaque collagenase. *J Clin Periodontol.* 1995; 22: 709-717.
- Uitto V J, Suomalainen K, Sorsa T. Salivary collagenase. Origin, characteristics and relationship to periodontal health. *J Periodontal Res.* 1990; 25: 135-142.