

ДНІПРОВСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ  
ДНІПРОВСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

Кваліфікаційна наукова праця  
на правах рукопису

**ТІТОВСЬКА СВІТЛАНА ОЛЕКСАНДРІВНА**

УДК 616.314.17-002-031.81-008.1-074-084

**ДИСЕРТАЦІЯ**

**ЗАСТОСУВАННЯ ІНГІБІТОРІВ МАТРИКСНИХ МЕТАЛОПРОТЕЇНАЗ У  
КОМПЛЕКСНОМУ ЛІКУВАННІ ХВОРИХ НА ГЕНЕРАЛІЗОВАНИЙ  
ПАРОДОНТИТ**

22 – Охорона здоров'я

221 – Стоматологія

Подається на здобуття наукового ступеня  
доктора філософії

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

\_\_\_\_\_ Світлана ТІТОВСЬКА

(підпис, ініціали та прізвище здобувача)

Науковий керівник:

доктор медичних наук, професор Самойленко Андрій Валерійович

Дніпро – 2022

## АНОТАЦІЯ

*Тітовська С. О. Застосування інгібіторів матриксних металопротеїназ у комплексному лікуванні хворих на генералізований пародонтит. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.*

*Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії у галузі знань 22 – Охорона здоров'я, зі спеціальності 221 - Стоматологія. – Дніпровський державний медичний університет, Дніпро, 2022.*

Генералізований пародонтит – одне з найпоширеніших стоматологічних захворювань людини, складні форми якого діагностуються в 11,0 % населення світу. Незважаючи на визнання мікробного чинника провідним в етіопатогенезі пародонтиту, антимікробна терапія гінгівіту, доповнена видаленням зубних відкладень, не запобігає подальшому розвитку запально-деструктивного процесу в навкол зубних тканинах. Звідси, на сучасному етапі розвитку стоматології інтерес представляє вивчення механізмів пошкодження тканин пародонта, ініційованих мікробним фактором, до яких належать прямі цитопатичні ефекти, зокрема апоптоз та піроптоз епітеліальних та сполучнотканинних клітин пародонта. Одночасно, дисбактеріоз викликає запалення, яке призводить до збільшення продуктів протеолізу. Вони є живильним середовищем для пародонтопатогенної мікрофлори та сприяють її росту. Таким чином, дослідження дисбалансу між активністю протеолітичних ферментів матриксних металопротеїназ та показниками їх регуляції в ротовій рідині в хворих на генералізований пародонтит є необхідним для створення ефективних методів ранньої діагностики та превентивного лікування захворювання, що включає застосування протизапальних препаратів, до яких належать інгібітори матриксних металопротеїназ.

Отже, мета представленого дисертаційного дослідження – підвищення ефективності комплексного лікування генералізованого пародонтиту шляхом застосування інгібіторів матриксних металопротеїназ.

На першому етапі виконання роботи обстежено 90 осіб віком 32-45 років, серед яких 30 – з інтактним пародонтом, 30 – із хронічним дифузним катаральним гінгівітом і генералізованим пародонтитом початкового ступеня та 30 – із хронічним генералізованим пародонтитом I-II ступеня тяжкості. Оцінювали стан пародонта за клінічними індексам та показником мінеральної щільності кісткової тканини щелеп за даними комп'ютерної томографії. За допомогою методу імуноферментного аналізу визначали в ротовій рідині вміст матриксних металопротеїназ ММП-2, ММП-3, ММП-8, ММП-9, ММП-13, тканинного інгібітору металопротеїназ ТІМР-1, інтерлейкінів-1 $\beta$ , -6 и -4, активність маркерів кісткового метаболізму – тартратрезистентної кислоти та кісткової лужної фосфатаз, остеокальцину.

На другому етапі дослідження для зіставлення імуногістохімічних показників експресії маркерів апоптозу та запалення в тканинах маргінального пародонта в нормі та при прогресуванні патологічного процесу було залучено 40 осіб віком 32-45 років, серед яких 30 хворих із хронічним генералізованим пародонтитом I-II ступеня тяжкості та 10 клінічно здорових осіб. Для морфологічного дослідження використовували біоптати ясен, які фіксували у 4 % розчині нейтрального формаліну протягом доби і заливали у парафін. Гістологічні зрізи товщиною 4,0-6,0 мкм наносили на адгезивні предметні скельця. Після їх депарафінізації та регідратації проводили демаскування антигенів у цитратному буфері з рН 6,0 при 121°C протягом 8 хвилин. Активність ендогенної пероксидази пригнічували 3 % перекисом водню протягом 20 хвилин. Інкубацію зрізів проводили з первинними антитілами у вологих камерах при 23-25°C протягом 30 хвилин. Вивчали цитоплазматичну експресію маркерів СОХ-2, каспази-3 та інтрануклеарну експресію маркерів ММП-1 та p21 (у запальному інфільтраті), p 53 та V $\alpha$ 1-2 (в ясенному епітелії).

На третьому етапі виконання дослідження проведена клінічна апробація комплексного лікування, доповненого інгібіторами матриксних металопротеїназ, серед 60 хворих із дифузним гінгівітом та генералізованим пародонтитом хронічного перебігу, яких було розділено на дві рівнозначні групи по 30 осіб (основну та зіставлення). У хворих із групи зіставлення застосовували традиційну

схему лікування, тоді як в основній групі її доповнювали препаратом-інгібітором матриксних металопротеїназ доксицикліном у субантимікробному дозуванні по 20 мг 2 рази на день протягом 3 місяців. Ефективність лікування оцінювали в найближчий та віддалений термін (через 1 рік) за даними клініко-рентгенологічного обстеження, комп'ютерної томографії, біохімічного дослідження ротової рідини на вміст матриксних металопротеїназ-8 та -9 (ММП-8, ММП-9), а також імуногістохімічного вивчення біоптатів ясен щодо цитоплазматичної експресії матриксної металопротеїнази-1 (ММП-1).

За результатами біохімічного дослідження, проведеного на першому етапі роботи, встановлено, що ініціація запально-деструктивного процесу в тканинах пародонта характеризувалася збільшенням у ротовій рідині рівнів матриксних металопротеїназ та прозапальних інтерлейкінів IL-1 $\beta$  та IL-6 ( $p < 0,05$ ), зменшенням концентрації тканинного інгібітора матриксних металопротеїназ TIMP-1 ( $p > 0,05$ ) та протизапального IL-4 ( $p < 0,05$ ), на тлі відсутності динаміки маркерів кісткового метаболізму. Прогресування процесу при I-II ступенях тяжкості пародонтиту супроводжувалося подальшим підвищенням у ротовій рідині вмісту прозапальних інтерлейкінів, а також збільшенням активності тартратрезистентної кислоти фосфатази та зменшенням – кісткової лужної фосфатази і остеокальцину ( $p < 0,05$ ), тоді як вміст матриксних металопротеїназ не змінювався ( $p > 0,05$ ). Таким чином, експресія матриксних металопротеїназ має значення для ранньої діагностики генералізованого пародонтиту, але не відповідає тяжкості захворювання при подальшому прогресуванні патологічного процесу. Встановлений достовірний дисбаланс між ММП і TIMP-1 на ранніх стадіях захворювання свідчить про більшу ефективність застосування інгібіторів матриксних металопротеїназ у лікуванні хворих на гінгівіт та пародонтит початкового ступеня.

Згідно отриманих результатів імуногістохімічного дослідження біоптатів ясен достовірної різниці між експресією маркерів антиапоптотичного білка Bcl-2 та маркера апоптозу p 53 в хворих на генералізований пародонтит та здорових не виявлено. Найбільш показовими щодо перебігу запально-деструктивного процесу в тканинах пародонта виявилися маркери запалення COX-2 та ММП-1, а також

маркери апоптозу каспаза-3 та p 21, що дозволяє їх застосування в діагностичних цілях у хворих на генералізований пародонтит.

В цілому, дані клініко-лабораторних досліджень на першому та другому етапах роботи дозволили обґрунтувати схему комплексного лікування генералізованого пародонтиту із застосуванням інгібіторів матриксних металопротеїназ, а також визначити найбільш показові маркери його ефективності.

Згідно даних проведеної апробації встановлено кращі клініко-рентгенологічні результати лікування в хворих, в яких було використана розроблена терапевтична схема, як у найближчий, так і у віддалений термін. Повне усунення запальних явищ у тканинах пародонта досягнуто в 93,3 % пацієнтів групи зіставлення через 12-14 днів та в 96,7 % – основної групи через 10-12 днів. У хворих, в яких застосовувалася розроблена схема лікування, зареєстрована краща динаміка індексної оцінки стану гігієни порожнини рота, ясен та всього пародонтального комплексу. Головною відмінністю між дослідними групами визнано збереження отриманих результатів лікування через 1 рік у пацієнтів основної групи ( $p < 0,05$ ). Так, через рік результати вимірювання мінеральної щільності кісткової тканини в пацієнтів основної групи не змінилися порівняно з вихідними показниками, тоді як у групі зіставлення відбулося їх достовірне зниження ( $p < 0,05$ ), що свідчить про прогресування запально-деструктивного процесу в тканинах пародонта.

Внаслідок проведеного лікування було досягнуто достовірне зниження рівня матриксних металопротеїназ ММП-8 та ММП-9 у ротовій рідині дослідних обох груп ( $p < 0,05$ ). У пацієнтів основної групи, на відміну від зіставлення, отримані результати не змінювались у віддалений термін ( $p > 0,05$ ). Так, при оцінці цитоплазматичної експресії ММП-1 в епітеліальних і стромальних клітинах після лікування нульовий результат встановлений в 96,7% пацієнтів основної групи та в 80,0% – у групі зіставлення, а через 1 рік – у 90,0 % проти 63,3 % відповідно.

Слід зазначити, що відмінності між основною групою та групою зіставлення у переважній більшості характеризували хворих на гінгівіт та генералізований пародонтит початкової стадії без деструктивних процесів у тканинах пародонта, що

свідчить про найбільшу ефективність запропонованого лікування на ранніх стадіях патологічного процесу.

Отже, виходячи з того, що активність матриксних металопротеїназ характеризує перебіг запального процесу в тканинах пародонта, зниження їх рівня за даними біохімічних та імуногістохімічних досліджень у групі зіставлення доводить кращу протизапальну дію розробленого лікування щодо запобігання прогресування генералізованого пародонтиту.

Отримані результати дозволяють рекомендувати застосування інгібіторів матриксних металопротеїназ в якості профілактичного патогенетичного засобу для лікування хворих із хронічним перебігом гінгівіту та генералізованим пародонтитом початкової стадії для пригнічення запальної ланки патологічного процесу.

**Ключові слова:** генералізований пародонтит, патогенез, лікування, матриксні металопротеїнази, інгібітори матриксних металопротеїназ, клінічна апробація, біохімічне дослідження, імуногістохімічне дослідження.

## **SUMMARY**

*Titovska S.O. The use of matrix metalloproteinase inhibitors in the complex treatment of patients with generalized periodontitis. – Qualifying scientific work on the manuscript.*

*Thesis for the degree of Doctor of Philosophy in the field 22 – Medical Care, in specialty 221 – Stomatology. – Dnipro State Medical University, Dnipro, 2022.*

Generalized periodontitis is one of the most widespread human stomatological diseases; its severe forms are diagnosed in 11.0 % of the world's population. Despite the recognition of the microbial factor as leading in etiopathogenesis of periodontitis, antimicrobial treatment of gingivitis, added with removal of dental plaque, does not prevent the further development of inflammatory-destructive process in periodontal tissues. At the current stage of the periodontology, it is interesting to study the mechanisms of periodontal tissue damage initiated by a microbial factor, which include direct cytopathic effects, in particular apoptosis and pyroptosis of periodontal epithelial and connective tissue cells. At the same time, dysbacteriosis causes inflammation which leads to an increase of proteolysis products. They are a nutrient medium for periodontal pathogenic microflora which contributes to its growth. So, the study of the imbalance between the activity of proteolysis ferments matrix metalloproteinases and indicators of their regulation in oral fluid in patients with generalized periodontitis is necessary for the creation of effective methods of early diagnosis and preventive treatment of the disease, which includes the use of anti-inflammatory drugs, such as matrix metalloproteinase inhibitors.

So, the aim of the presented research is to improve the effectiveness of complex treatment of generalized periodontitis by using matrix metalloproteinase inhibitors.

At the first stage of the work, 90 persons aged 32-45 years were examined, including 30 persons with intact periodontal tissues, 30 patients with diffuse catarrhal gingivitis and generalized periodontitis of the initial degree and 30 ones with chronic generalized periodontitis of I-II severity. Periodontal status was assessed using clinical

indices and bone mineral density according to computed tomography data. The method of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to determine the concentration of matrix metalloproteinases MMP-2, MMP-3, MMP-8, MMP-9, MMP-13, tissue inhibitor of metalloproteinases TIMP-1, interleukins-1 $\beta$ , -6 and -4, bone metabolism markers – tartrate-resistant acidic phosphatase and bone alkaline phosphatase, osteocalcin – in the oral fluid.

At the second stage of the research, for comparison of immunohistochemical indexes of expression of markers of apoptosis and inflammation in the tissues of the marginal periodontium in normal conditions and during the progression of the pathological process, 40 persons aged 32-45 years were studied. They were 30 patients with chronic generalized periodontitis of I-II severity and 10 clinically healthy persons. For morphological examination, gingival bioplates were used, which were put into 4% solution of neutral formalin for a day and poured into paraffin. Histological sections with a thickness of 4.0-6.0 microns were applied to adhesive slides. After their deparaffinization and rehydration, antigens were demasked in the citrate buffer with pH 6.0 at 121 ° C for 8 minutes. The activity of endogenous peroxidase was suppressed with 3 % hydrogen peroxide for 20 minutes. It was studied cytoplasmic expression of markers COX-2, caspase-3 and intranuclear expression of markers MMP-1 and p 21 (in inflammatory infiltrate), p 53 and Bcl-2 (in gingival epithelium).

At the third stage of the work, clinical testing of complex treatment supplemented with inhibitors of matrix metalloproteinases was carried out among 60 patients with diffuse gingivitis and generalized periodontitis of the chronic course, which were divided into two equivalent groups of 30 persons (base and comparison). In patients from the comparison group, the traditional treatment regimen was used, while in the base group it was supplemented with a matrix metalloproteinase inhibitor, doxycycline in submicrobial dose, which was prescribed 20 mg 2 times a day for 3 months. The effectiveness of the treatment was evaluated in the early and distant term (after 1 year) according to data of the clinical and radiological examination, computer tomography, biochemical examination of oral fluid for matrix metalloproteinases-8 and -9 (MMP-8, MMP-9) and



immunohistochemical study of gingival biopsies for cytoplasmic expression of matrix metalloproteinase-1 (MMP-1).

According to the results of carried out biochemical research, it was established that the initiation of the inflammatory-destructive process in the periodontal tissues was characterized by increased levels of matrix metalloproteinases and pro-inflammatory IL-1 $\beta$  and IL-6 ( $p < 0.05$ ), a decrease in the concentration of tissue inhibitor of metalloproteinases TIMP-1 ( $p > 0.05$ ) and anti-inflammatory IL-4 ( $p < 0.05$ ), against the background of the absence of dynamics of bone metabolism markers in the oral fluid. The progression of the process at the I-II degree of severity of periodontitis was accompanied by a further increase in the concentration of pro-inflammatory interleukins in the oral fluid, an increase in the activity of tartrate-resistant acid phosphatase and a decrease in bone alkaline phosphatase and osteocalcin ( $p < 0.05$ ), while the content of matrix metalloproteinases didn't change ( $p > 0.05$ ). Thus, the expression of matrix metalloproteinases is important for the preventive diagnosis of generalized periodontitis, but it is not indicative for determining the severity of the disease with further progression of the pathological process. In the early stages of the pathological process the reliable imbalance of matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases TIMP-1 indicates the greatest expediency of using matrix metalloproteinase inhibitors at the stage of gingivitis and the initial stage of periodontitis.

The data of the immunohistochemical study of gingival biopsies didn't show any difference between the expression of markers of the antiapoptotic protein Bcl-2 and the marker of apoptosis p 53 in patients with generalized periodontitis and healthy ones. The most indicative markers of the course of the inflammatory and destructive process in periodontal tissues were markers of inflammation COX-2 and MMP-1 and markers of apoptosis caspase-3 and p 21 that allows their use for diagnostic purposes in patients with generalized periodontitis.

On the whole, the data of clinical and laboratory studies at the first and second stages of the work made it possible to substantiate the scheme of complex treatment of generalized periodontitis with the use of matrix metalloproteinase inhibitors, as well as to determine the most indicative markers of its effectiveness.

In accordance with the data of the approbation, the best clinical and radiological results of treatment were established in patients who used the developed therapeutic scheme, both in the near term and in the distant term. Complete elimination of inflammatory symptoms in periodontal tissues was achieved in 93.3 % of patients in the comparison group in 12-14 days and in 96.7% – in the base group in 10-12 days. In patients in whom the developed therapeutic scheme was used, the best dynamics of the index assessment of the state of oral hygiene, gingiva and periodontal complex were established. The main difference between the research groups was the preservation of obtained results in 1 year after treatment in patients of the base group ( $p < 0.05$ ). In particular, a year later, the results of bone mineral density measurement for patients of the base group did not change from baseline, while in the comparison group there was their significant decrease ( $p < 0.05$ ), indicating the progression of inflammatory-destructive process in periodontal tissues.

As a result of treatment, a significant reduction in the level of MMP-8 and MMP-9 in the oral fluid of patients of both groups was achieved ( $p < 0.05$ ). In patients of the base group, in contrast to the comparison, these results were the same in the distant term ( $p > 0.05$ ). When assessing the cytoplasmic expression of MMP-1 in epithelial and stromal cells after treatment, zero result was in 96.7% of patients in the base group and in 80.0% – in the comparison group, and after 1 year – in 90.0% vs 63.3% respectively.

It was important that the differences between the base and comparison groups were most observed for patients with gingivitis and generalized periodontitis of initial stage without destructive processes in periodontal tissues. It suggests the greatest effectiveness of the proposed treatment in the early stages of pathological process.

Thus, based on the fact that the activity of matrix metalloproteinases characterizes the course of the inflammatory process in periodontal tissues, a decrease in their level according to biochemical and immunohistochemical studies in the base group against the comparison indicates a better anti-inflammatory effect of the developed treatment to prevent the progression of generalized periodontitis.

The obtained results allow recommending the use of matrix metalloproteinase inhibitors as a preventive pathogenetic treatment for the patients with chronic course of

gingivitis and generalized periodontitis of the initial stage, to inhibit the inflammatory component of the pathological process.

**Key words:** generalized periodontitis, pathogenesis, treatment, matrix metalloproteinases, matrix metalloproteinases inhibitors, clinical approbation, biochemical study, immunohistochemical study.

## СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА

*Список наукових праць, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації:*

1. Самойленко АВ, Шпонька ІС, Горшкова АЄ, Пославська ОВ, Карнаух СО. Імуногістохімічне дослідження маркерів апоптозу та запалення в тканинах пародонта у хворих на генералізований пародонтит. Морфологія. 2013; 3: 101-107. *(Здобувачкою відібрані хворі, взяті зразки ясен та проведений аналіз отриманих даних імуногістохімічного дослідження, зроблено висновки та підготовлено статтю до друку.)*

2. Самойленко АВ, Тітовська СО. Матриксні металопротеїнази в ротовій рідині як характеристика запально-деструктивного процесу в тканинах пародонта. Медичні перспективи. 2022; 3: 127-134. *(Здобувачка особисто брала участь у проведенні клінічних та біохімічних досліджень, нею узагальнені отримані результати, сформульовані висновки та підготовлена стаття до друку).*

3. Samoilenko AV, Titovska SO. Results of immunohistochemical study of markers of inflammation and apoptosis in gingival bioplates in patients with generalized periodontitis. Вісник стоматології. 2022; 2 (119): 28-32. doi: 10.35220/2078-8916-2022-44-2.5. *(Здобувачка особисто брала участь у проведенні клініко-імуногістохімічних досліджень, нею самостійно опрацьовані отримані результати, сформульовано висновки та підготовлена стаття до друку).*

4. Тітовська СО. Ефективність застосування інгібіторів матриксних металопротеїназ для превентивного лікування генералізованого пародонтиту. Український стоматологічний альманах. 2022; 2: 10-15.

*Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:*

5. Карнаух СО. Перспективи застосування біохімічних маркерів ротової рідини для діагностики генералізованого пародонтиту. Мат. Всеукр. наук.-практ. конф. «Сучасні принципи планування стоматологічного лікування». Запоріжжя. 2016. С. 62-63.

6. Тітовська СО. Маркери апоптозу та запалення в діагностиці генералізованого пародонтиту. Зб. наук. праць V міжнародн. наук.-практ. конф. «Стоматологія Придніпров'я». Україна, Дніпропетровськ-Запоріжжя. 2019. С. 174-176.

7. Тітовська СО. Імуногістохімічне дослідження маркерів апоптозу в біоптатах ясен у хворих на генералізований пародонтит. Зб. тез VI Всеукр. наук.-практ. конф. «Стоматологія Придніпров'я 2020». Запоріжжя. 2020. С. 31-34.

## ЗМІСТ

	С.
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ	16
ВСТУП	18
РОЗДІЛ 1 Матриксні металопротеїнази, їх значення в патогенезі та діагностиці генералізованого пародонтиту, застосування їх інгібіторів у комплексному лікуванні захворювання (огляд літератури)	23
1.1. Роль матриксних протеїназ у патогенезі генералізованого пародонтиту	24
1.2. Визначення матриксних металопротеїназ у біологічних рідинах для діагностики генералізованого пародонтиту	29
1.3. Сучасний досвід застосування інгібіторів матриксних металопротеїназ у комплексному лікуванні генералізованого пародонтиту	35
РОЗДІЛ 2 Об'єкти та методи дослідження	44
2.1. Порядок формування та склад дослідних груп на різних етапах дослідження	44
2.2. Клініко-лабораторні методи дослідження	47
2.2.1 Клінічні методи дослідження	47
2.2.2 Біохімічне дослідження зразків ротової рідини	49
2.2.3 Імуногістохімічне дослідження біоптатів ясен	50
2.3. Розроблена лікувальна схема та методи оцінки її ефективності	55
2.4. Статистичні методи дослідження	56
РОЗДІЛ 3 Зміни матриксних металопротеїназ ротової рідини залежно пародонтологічного статусу обстежених осіб	58
РОЗДІЛ 4 Результати імуногістохімічного дослідження біоптатів ясен	80
РОЗДІЛ 5 Ефективність комплексного лікування пацієнтів із генералізованим пародонтитом при застосуванні інгібіторів	

матриксних металопротеїназ	93
5.1. Результати клінічного дослідження в динаміці лікування	93
5.2. Дані лабораторних методів дослідження до та після лікування	98
АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ	104
ВИСНОВКИ	115
ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ	117
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	118
ДОДАТКИ	153

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

BOOЗ –	Всесвітня організація охорони здоров'я;
ММП –	матриксні металопротеїнази;
ЮНЕСКО –	англ. UNESCO; United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization – Освітня, наукова та культурна організація об'єднаних націй;
ADAMTS –	A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin motifs – дезінтегриноподібні металопротеїнази, що містять мотив тромбоспондину;
aММП-8 –	active Matrix Metalloproteinase-8 – активна матриксна металопротеїназа-8;
ВАР –	Bone-Specific Alkaline Phosphatase – кісткова лужна фосфатаза;
ВМД –	Bone Mineral Density – показник мінеральної щільності кісткової тканини;
СРІТН –	Community Periodontal Index of Treatment Needs – комплексний пародонтальний індекс потреби в лікуванні;
СОХ-2 –	Cyclooxygenase-2 – циклооксигеназа 2;
СІ-S –	Calculus Index – індекс зубного каменю (складова ОНІ-S);
ДАВ –	3-diaminobenzidine tetrachloride-3-діамінобензидина тетрахлорід (хромоген);
ДІ-S –	Debris Index – індекс зубного нальоту (складова ОНІ-S);
ЕLІSА –	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay – метод імуноферментного аналізу;
НУ –	Hounsfield Units – одиниці Хаунсфілда;
ІL –	interleukins – інтерлейкіни;



MIP-1 $\alpha$ –	Macrophage Inflammatory Proteins-1 $\alpha$ – макрофагальний запальний білок-1 $\alpha$ ;
O –	остеокальцин – osteocalcin;
OHI-S –	Oral Hygiene Index - Simplified – спрощений індекс гігієни порожнини рота;
p53, p21 та Bcl-2 –	продукти трьох генів, які кодують білки;
PMA –	Papillary Marginal Alveolar Index – папілярно-маргінально-альвеолярний індекс;
RANKL –	Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa-B Ligand – активатор рецептора ліганду ядерного фактору каппа В;
TIMP –	Tissue Inhibitor of Metalloproteinase – інгібітор тканинних металопротеїназ;
TNF- $\alpha$ –	Tissue Necrosis Factor - $\alpha$ – фактор некрозу пухлини- $\alpha$ ;
TRAP –	Tartrat Resistant Acid Phosphatase – тартратрезистентна кисла фосфатаза.

## ВСТУП

### Обґрунтування вибору теми

Актуальність представленої дисертаційної роботи зумовлена значною поширеністю генералізованого пародонтиту, складні форми якого діагностуються в 11,0 % світового населення [170]. Попри те, що захворювання вважають найпоширенішою хронічною інфекцією людини, збудником якої є пародонтопатогенна мікрофлора зубної бляшки, воно не є заразним. В той же час видалення зубних відкладень та антимікробне лікування гінгівіту неефективне щодо профілактики пародонтиту [95].

В зв'язку з цим, натеper вважається, що генералізований пародонтит розвивається внаслідок формування підясенної біоплівки, в якій порушення дисбіозу зумовлені не тільки впливом пародонтопатогенної мікрофлори, а й особливостями відповіді організму «хазяїна» [148]. При цьому запалення, викликане дисбактеріозом, призводить до збільшення кількості продуктів протеолізу тканин, які є поживним середовищем для пародонтопатогенної мікрофлори та сприяють зростанню її кількості. Таким чином, виникає так зване «хибне коло», коли інфекція ініціює розвиток запалення, а продукти запалення підживлюють інфекцію. Тому одна зі стратегій лікування пародонтиту полягає в тому, щоб розірвати замкнений цикл, спрямувавши лікування на сам запальний процес, або доповнити ним антимікробне лікування [275].

Традиційно як протизапальні, що модулюють загальну відповідь, використовують нестероїдні препарати, проте, на наш погляд, як альтернативний шлях пригнічення процесів протеолізу більш доцільним є застосування інгібіторів матриксних металопротеїназ. Треба зазначити, що дані препарати використовувалися в пародонтології і раніше [62, 97, 115], проте для них остаточно не визначеними залишаються показання до використання, зокрема стадія розвитку запально-деструктивного процесу в тканинах пародонта, наявність супутніх захворювань, тривалість та інтенсивність курсу лікування, а також оцінка його успішності.

На наш погляд, здійснені на сучасному рівні біохімічні дослідження ротової рідини та імуногістохімічне вивчення біоптатів ясен у хворих на дифузний гінгівіт та генералізований пародонтит хронічного перебігу дозволять визначитися з особливостями проведення комплексного лікування захворювання, зокрема із застосуванням інгібіторів матриксних металопротеїназ.

### **Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами**

Дисертаційне дослідження проведене в рамках науково-дослідної роботи кафедри терапевтичної стоматології Державного закладу «Дніпропетровська медична академія Міністерства охорони здоров'я України» (з березня 2021 року – Дніпровського державного медичного університету) «Удосконалення нових методів діагностики, лікування та профілактики основних стоматологічних захворювань» (реєстраційний номер 0117 У 004731). За цією темою дисертантом виконаний окремий фрагмент.

**Мета роботи** – підвищення ефективності комплексного лікування генералізованого пародонтиту шляхом застосування інгібіторів матриксних металопротеїназ.

### **Завдання роботи:**

1. Дослідити ротову рідину осіб зі здоровим пародонтом, хворих на дифузний гінгівіт та генералізований пародонтит хронічного перебігу на вміст матриксних металопротеїназ та їх інгібітору, рівень проти- та прозапальних цитокінів, маркери кісткового метаболізму та зіставити отримані результати.

2. Порівняти імуногістохімічні показники експресії маркерів апоптозу та запалення в тканинах маргінального пародонта здорових та хворих на генералізований пародонтит.

3. На підставі отриманих результатів біохімічних та імуногістохімічних досліджень доповнити комплексне лікування генералізованого пародонтиту інгібіторами матриксних металопротеїназ, із визначенням показань та критеріїв його ефективності.

4. Визначити успішність комплексного лікування дифузного гінгівіту та генералізованого пародонтиту хронічного перебігу на підставі вивчення інгібіторів матриксних металопротеїназ у найближчий термін спостереження.

5. Встановити ефективність запропонованої лікувальної схеми щодо подальшого прогресування патологічного процесу в тканинах пародонта.

*Об'єкт дослідження* – активація протеолізу тканин при розвитку генералізованого запального та дистрофічно-запального процесу у тканинах пародонта.

*Предмет дослідження* – ефективність комплексного лікування генералізованого пародонтиту із застосуванням інгібіторів матриксних металопротеїназ.

**Методи дослідження:** клінічні, зокрема спеціальні пародонтологічні – для оцінки стану тканин пародонта; індексної оцінки стану гігієни ротової порожнини та тканин пародонта – для об'єктивізації даних клінічного дослідження; рентгенологічний (ортопантомографія) та комп'ютерна томографія – для оцінки стану кісткової тканини пародонта; біохімічні – для визначення вмісту матриксних металопротеїназ та їх інгібітору, рівня проти- та прозапальних цитокінів, маркерів кісткового метаболізму; імуногістохімічні – для вивчення показників експресії маркерів апоптозу та запалення в тканинах маргінального пародонта; статистичні – для аналізу результатів дослідження, для визначення ефективності запропонованого лікування, для оцінки достовірності даних.

### **Наукова новизна одержаних результатів**

Доповнено наукові дані про роль матриксних металопротеїназ у патогенезі генералізованого пародонтиту.

Уточнено залежності між інтенсивністю запально-деструктивного процесу в тканинах пародонта та рівнем матриксних металопротеїназ у ротовій рідині.

Вперше обраховані кореляції між вмістом матриксних протеїназ та їх інгібітору, рівнем проти- та прозапальних цитокінів, а також маркерів кісткового метаболізму в ротовій рідині в хворих на генералізований пародонтит різного ступеня тяжкості.

Вперше доведено, що найбільш показовими щодо перебігу запально-деструктивного процесу в тканинах пародонта виявились імуногістохімічні маркери запалення СОХ-2 та ММП-1, а також маркери апоптозу каспаза-3 та р 21.

Вперше описаний зв'язок між клінічними ознаками генералізованого пародонтиту, динамікою біохімічних маркерів у ротовій рідині та результатами імуногістохімічного дослідження біоптатів ясен.

Уточнено, що найбільш показовими для оцінки отриманого лікувального результату серед хворих на генералізований пародонтит слід вважати вміст ММП-8 та ММП-9 у ротовій рідині, а також ММП-1 у біоптатах ясен.

Вперше за результатами комплексних клінічних, біохімічних та імуногістохімічних досліджень, доведено, що найбільш ефективним застосування інгібіторів матриксних металопротеїназ є на стадії гінгівіту та на початкових стадіях пародонтиту.

### **Практичне значення отриманих результатів**

Запропонована схема превентивного лікування генералізованого пародонтиту, що передбачає застосування інгібіторів матриксних металопротеїназ, а також уточнені показання до найбільш ефективного її застосування.

Для ранньої діагностики, визначення показань та оцінки ефективності проведеного лікування рекомендовано використання біохімічного дослідження ротової рідини та імуногістохімічного – біоптатів ясен.

Результати роботи впроваджені в стоматологічних установах міст Дніпра та Запоріжжя, а матеріали дисертації використовуються в навчально-педагогічному процесі Дніпровського державного медичного університету, Запорізького державного медичного університету та Товариства з обмеженою відповідальністю «Дніпровський медичний інститут традиційної і нетрадиційної медицини».

### **Особистий внесок здобувача**

Дисертантка особисто обрала напрямок наукових досліджень, обґрунтувала його доцільність даними аналізу сучасних літературних джерел та проведеного патентно-інформаційного пошуку. Вона самостійно сформулювала мету та завдання роботи, розрахувала репрезентативний об'єм спостережень, а також обрала та

оволоділа відповідними методами дослідження. Дисертанткою організовано та проведено клініко-лабораторні спостереження, узагальнено та статистично опрацьовано отримані результати. Вона власноруч оформила висновки та практичні рекомендації.

### **Апробація результатів дисертації**

Результати дисертаційного дослідження доповідалися та обговорювалися на Всеукраїнській науково-практичній конференції «Сучасні принципи планування стоматологічного лікування» (21-23 квітня 2016 р., м. Запоріжжя), на V міжнародній науково-практичній конференції «Стоматологія Придніпров'я» (19 квітня 2019 р., мм. Дніпропетровськ-Запоріжжя), на VI міжнародній науково-практичній конференції «Стоматологія Придніпров'я 2020» (22 жовтня 2020 р., м. Запоріжжя), на Всеукраїнській науково-практичній конференції «Актуальні питання реабілітації стоматологічних пацієнтів» (27-28 травня 2021 р., м. Запоріжжя).

### **Публікації**

За темою дисертації опубліковано 7 наукових робіт, серед яких 4 статті у фахових виданнях, рекомендованих ДАК України, з них 1 – у виданні, що індексується наукометричною базою Web of Sciences та 1 – Scopus), 3 тез у збірках конференцій.

### **Структура та обсяг дисертації**

Дисертація викладена на 158 сторінках комп'ютерного тексту та складається зі вступу, огляду літератури, описання об'єктів і методів досліджень, трьох розділів власних досліджень, аналізу і узагальнення результатів дослідження, висновків, практичних рекомендацій, списку використаних літературних джерел, що містить 298 бібліографічних джерел, з них 46 – кирилицею та 251 – латиницею. Роботу ілюстровано 10 таблицями та 33 рисунками.

## РОЗДІЛ 1

### **МАТРИКСНІ МЕТАЛОПРОТЕЇНАЗИ, ЇХ ЗНАЧЕННЯ В ПАТОГЕНЕЗІ ТА ДІАГНОСТИЦІ ГЕНЕРАЛІЗОВАНОГО ПАРОДОНТИТУ, ЗАСТОСУВАННЯ ЇХ ІНГІБІТОРІВ У КОМПЛЕКСНОМУ ЛІКУВАННІ ЗАХВОРЮВАННЯ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)**

За даними ВООЗ генералізований пародонтит – шосте за поширеністю захворювання людини, яке вражає 10-15 % світового населення, що складає приблизно 740 мільйонів осіб [85, 123, 188, 189]. Діагностичними ознаками генералізованого пародонтиту вважають запалення та кровотечу ясен, клінічну втрату зубоясенного прикріплення, формування патологічних пародонтальних кишень, резорбцію альвеолярної кістки, патологічну прогресуючу рухомість зубів [94].

Причиною виникнення захворювання вважають дисбіотичні порушення резидентного мікробіому порожнини рота та появу анаеробних пародонтопатогенних мікроорганізмів, зокрема *Porphyromonas gingivalis* [14, 48, 239, 295]. Проте подальший перебіг патологічного процесу в тканинах пародонта визначається низкою чинників, до яких належать генетичні та епігенетичні фактори, що визначають відповідь, зокрема імунну, організму «хазяїна» на патоген; наявність супутніх захворювань; умови навколишнього середовища, що включають дієту та спосіб життя тощо [13, 94, 187, 217, 244, 283]. Пародонтит пов'язують із понад 50 системними захворюваннями та станами, серед яких аутоімунні розлади та цукровий діабет [68, 74, 103, 264], а також тяжкими інфекціями, на кшталт коронавірусної [230].

Попри велику кількість досліджень, розуміння причинно-наслідкової ролі запалення в розвитку пародонтиту потребує подальшого вивчення [15, 187]. Відповідно уточнення патогенезу захворювання передбачає зміну парадигми від теоретичного уявлення патологічного процесу до розробки заходів його

профілактики та лікування, що є передумовою до створення об'єктивної діагностичної процедури, яка повинна передбачати визначення особливостей перебігу процесу для верифікації та диференціації різних станів тканин пародонта [101].

Відповідно, дослідження характеру експресії матриксних металопротеїназ (ММП) є важливим як для розуміння механізмів патогенезу захворювань пародонта, так і для описання характеру їх перебігу, необхідного для вибору раціональної та своєчасної тактики лікування [19].

### **1.1. Роль матриксних протеїназ у патогенезі генералізованого пародонтиту**

Матриксні металопротеїнази (ММП) належать до цинкзалежних ендопептидаз, які здатні руйнувати практично всі компоненти позаклітинного матриксу. ММП беруть участь у морфогенезі, фізіологічному обміні тканин, а також у патологічній деструкції сполучної тканини, що входить до складу пародонтального комплексу. ММП сприяють виникненню та розвитку пародонтиту шляхом руйнування майже всіх його білків [183].

Активність ММП модулюється та регулюється специфічними інгібіторами, відомими як інгібітори тканинних металопротеїназ (TIMP) [291]. При розвитку захворювань пародонта спостерігаються зміни рівня ММП [43]. Дисбаланс між ММП та TIMP призводить до патологічного руйнування позаклітинного матриксу при пародонтиті [9, 56, 82, 241].

В свою чергу, ADAMTS (дезінтегриноподібні металопротеїнази, що містять мотив тромбоспондину) – це група з 19 цинкзалежних металопротеїназ, які приймають участь в адгезії, злитті клітин, передачі сигналів, протеолізі та деградації позаклітинного матриксу. Зміни експресії ADAMTS є складовою патологічних процесів у пародонті, а деструкція тканин пародонта може бути пов'язана з ADAMTS -4 та -5 [263].

Оскільки колаген типу I є основним компонентом позаклітинного матриксу тканин пародонта, особлива увага в патогенезі захворювань пародонта приділяється



колагеназам, особливо ММП-8 і ММП-13, і желатиназам, ММП-2 і ММП-9 [90, 189, 234, 255]. Експериментально доведено зростання рівня ММП-2 і ММП-9 при гінгівіті та під час прогресування пародонтиту [183, 296].

Результати мета-аналізу 6 досліджень, які загалом включали обстеження 923 здорових осіб та 557 хворих на пародонтит, виявили для них статистично значущі відмінності рівнів ММП-9 у сироватці крові та в ясенній рідині [285]. Відповідно, в роботі [112] вказується на підвищений рівень ММП-9 у ротовій рідині при пародонтиті, а також його зростання при загостренні процесу.

Підвищені рівні матриксної ММП-7 спостерігались у зразках сироватки крові та ясенної рідини в хворих на пародонтит із цукровим діабетом 2 типу. Встановлено, що в них підвищена експресія ММП-7 у тканинах пародонта пов'язана з активацією активних форм кисню через гіперглікемію. Відповідно пригнічення експресії ММП-7 призводить до порушення трансміграції нейтрофілів у яснах [290].

Встановлено, що вміст ММП-3 у сироватці крові та ясенній рідині в хворих на пародонтит значно підвищується. При цьому рівень експресії ММП-3 у сироватці крові позитивно корелює з глибиною зондування ( $r=0,45$ ,  $P=0,04$ ), а рівень експресії ММП-3 в ясенній рідині має прямий зв'язок з клінічною втратою зубоясенного прикріплення ( $r=0,58$ ,  $p < 0,01$ ) [297].

Відомо, що ММП-12 бере участь у вроджених імунних відповідях. Її рівень підвищується при пародонтиті та корелює з інтенсивністю кровоточивості ясен. При цьому в осіб віком 40-64 років рівень ММП-12 в ясенній рідині нижчий, аніж в осіб віком до 40 років, а в курців нижчий аніж в осіб, що не палять [138].

При пародонтиті полімікробний дисбактеріоз активує хронічну запальну імунну відповідь «хазяїна», яка полягає у висхідній продукції прозапальних медіаторів, таких як цитокіни, фактори росту та ММП [27, 69, 83, 165, 259].

Розрізняють дві групи протеїназ, які приймають участь у розвитку запальної реакції – бактеріальні та макрофагальні (людини). Так, *Porphyromonas gingivalis* продукує дві позаклітинні цистеїнові протеїнази, які є факторами вірулентності та сприяють руйнуванню тканин пародонта [140].

В свою чергу, ліпосахариди *Porphyromonas gingivalis* збільшують експресію ММП [88]. Доведено, що гемаглютинін В цього мікроорганізму індукує підвищену експресію ММП-1 і ММП-9 у дендритних клітинах [67].

Виявлено кореляцію в слині між рівнями ММП-8 та ММП-1, та вмістом *Porphyromonas gingivalis* і *Tannerella forsythia* в зубному нальоті при пародонтиті [201].

Доведено, що до видів, які індукують вивільнення прозапальних медіаторів, належать спірохета ротової порожнини *Treponema denticola* [108]. Протеїназа дентилізін, що виробляє даний мікроорганізм, викликає експресію та активацію ММП-2 в клітинах періодонтальної зв'язки [61, 114], тоді як хімотрипсиноподібна протеїназа *Treponema denticola* може стимулювати експресію білка та активацію ММП-8 (або колагенази-2) [219].

Вказується на стимулювання фібробластичних та моноцитарних клітин до вироблення ММП-1 пародонтопатогенним *F. alocis* [209]. Були виявлені позитивні кореляції між рівнем ММП-8 і поширеністю *Fusobacterium nucleatum* у зразках ясенної рідини [206].

Встановлено, що ММП-9, остеоактивін, ІЛ-8 і запальний білок макрофагів МІР-1а значною мірою пов'язані з видовим складом мікробіоти ротової порожнини [298].

В роботі [243] вивчався зв'язок запальних захворювань кишківника з наявністю пародонтопатогенної мікрофлори та концентрацією активної матриксної металопротеїнази-8 (аММП-8) у ротовій рідині. Досліджено, що в хворих на генералізований пародонтит із патологією кишківника спостерігаються зміни в імунній відповіді «хазяїна» через зміни рівня ММП-8 у ротовій рідині.

В експерименті на мишах показано, що порушення мікробіоти викликає прозапальний оральний дисбіотичний стан, який посилює природну втрату альвеолярної кістки [260].

Мікробіота ротової порожнини впливає на гомеостаз альвеолярної кістки та викликає порушення «спільних» дій остеокластів-остеобластів опосередковано, через остеоімуннологічні механізми [84, 118, 131, 177, 184, 267]. Так, при

пародонтиті запальні цитокіни (інтерлейкіни ІЛ-6, ІЛ-10, ІЛ-17, ІЛ-22, фактор некрозу пухлини TNF- $\alpha$ , активатор рецептора ліганду ядерного фактору каппа В (RANKL), ядерний фактор активованих Т-клітин) діють на остеобласти та на рецепторний активатор клітин, які продукують ліганд ядерного фактору  $\kappa$ B (RANKL), що призводить до диференціації та активації остеокластів [57, 258, 274]. Остеопротегерин, який експресується самими остеокластами, може відігравати ауторегуляторну роль у пізній фазі остеокластогенезу через індукцію апоптозу [152]. У свою чергу, вміст остеопонтину знижується при інфікуванні *P. Gingivalis*, що призводить до пригнічення апоптозу мітохондріального шляху в макрофагах [80].

Основною патогенетичною роллю ММП при запаленні вважається міграція лейкоцитів, пов'язана зі здоланням тканинних бар'єрів та тканинної деструкції. Найбільш клінічно значущими поліморфізмами генів ММП при пародонтиті є 5A(-1612) 6A гену ММП-3, С(-799)Т гену ММП-8 та С(-1562) Т ММП-9 [44].

Слід зазначити, що при пародонтиті в організмі «хазяїна» прозапальні медіатори, зокрема ММП, екскретуються як резидентними клітинами періодонтальної зв'язки (фібробласти та епітеліальні), так і тими, що інфільтрують, насамперед, поліморфноядерними нейтрофілами [198, 204, 279].

Тромбоцитарний фактор 4 (PF 4), основний тромбоцитарний цитокін, впливає на експресію ММП-1 (колагенази) у фібробластах ясен людини, зокрема призводить до 2-3-кратного збільшення транскрипції та секреції ММП-1 із культивованих клітин [150]. Роль функціональної активності тромбоцитарної ланки гемостазу доведена при експериментальному моделюванні гінгівіту в щурів [41].

Інгібуючий фактор міграції макрофагів MIF є прозапальним цитокіном і контррегулятором ендогенних глюкокортикоїдів. Він бере участь у гострих і хронічних запальних захворюваннях тканина пародонта шляхом вивільнення ММП-2, що було вивчено в умовах *in vivo* та *in vitro* [137].

Інтерлейкін-12 (ІЛ-12) є прозапальним цитокіном, підвищений рівень якого корелює з тяжкістю пародонтиту. У фібробластах періодонтальної зв'язки людини

IL-12 активує передачу сигналів канонічного ядерного фактору- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), що призводить до збільшення експресії ММП-1, ММП-3 і ММП-13 та зниження експресії ММП-2 і ММП-9, тоді як змін рівня TIMP-1 і TIMP-2 не відбувається [197, 236].

Інтерлейкін IL-1 $\beta$ , цитокін, який бере участь в імунних і запальних реакціях «хазяїна», індукує активацію різних внутрішньоклітинних сигнальних шляхів. Один із цих сигнальних механізмів включає регуляцію експресії генів шляхом активації факторів транскрипції AP-1 і NF- $\kappa$ B. Ці фактори транскрипції контролюються мітоген-активованими протеїнкіназами, які підвищують вивільнення цитокінів і матриксної металопротеїнази ММП-3 у фібробластах ясен людини [251]. Встановлена кореляція рівнів IL-1 $\beta$  та ММП-1 в ясенній рідині з тяжкістю патологічних процесів у пародонті дітей віком від 9 до 12 років [122]. Доведено, що секрецію ММП-1, ММП-2, ММП-3 і ММП-9 стимулює IL 18 [280].

Рівень індуктора позаклітинної матриксної металопротеїнази, імуноглобуліноподібного глікопротеїну клітинної поверхні, корелює з експресією ММП, зокрема ММП-1 і ММП-2, та тяжкістю пародонтиту [185].

Оцінено вплив специфічного інгібування ММП-13 на запалення ясен та резорбцію кісткової тканини на мишачій моделі періодонтиту, індукованого ліпополісахаридом. Встановлено, що припинення експресії ММП-13 значно зменшує резорбцію кісток. Проте інгібування ММП-13 не впливає на вираженість запального інфільтрату [121].

Показано, що гіпометилування промоторів генів IL-6 та ММП-13 у пацієнтів з пародонтитом на фоні цукрового діабету призводить до активації цих генів, підвищення синтезу IL-6 та ММП-13, що веде до прогресування патологічного процесу в навкол зубних тканинах [29].

Пародонтит позитивно асоціюється з ендотеліальною дисфункцією, що проявляється підвищенням вмісту комплексу ММП-2/TIMP-2 в слині. Більш того, між продукцією комплексу ММП-2/TIMP-2 та наявністю пародонтальних параметрів виявлено достовірний зв'язок [199]. У роботі [143] було показано, що ММП-9 відіграє ключову роль в ендотеліальній функції та, можливо, відіграє

провідну роль у реалізації зв'язка між пародонтитом і серцево-судинними захворюваннями.

Таким чином, наведені результати досліджень ролі ММП у патогенезі генералізованого пародонтиту, проведених як у клінічних умовах, так і в умовах експерименту на тваринах, дозволяють ефективно застосовувати дані ферментів для діагностики захворювання на ранніх стадіях, а також для визначення особливостей перебігу патологічного процесу, зокрема після проведеного лікування, про що піде мова у наступному підрозділі.

## **1.2. Визначення матриксних металопротеїназ у біологічних рідинах для діагностики генералізованого пародонтиту**

Застосування біомаркерів, до яких належать ММП, дає можливість раннього виявлення пародонтиту, визначення активності процесу на різних стадіях його розвитку, а також вибору індивідуального лікування, бажано мінімально інвазивного [28, 40, 144, 145, 207], окрім того дозволяє скоротити витрати на гігієну ротової порожнини [227]. Всебічне вивчення біохімічних маркерів у ротовій рідині дає змогу ідентифікації унікальних профілів пацієнтів, які можуть передбачити конкретні траєкторії розвитку захворювання та його спрямоване лікування [200]. Належна оцінка ризиків прогресування генералізованого пародонтиту допомагає здійснювати правильний моніторинг та успішне підтримуюче лікування протягом 20 років [277].

Традиційні клінічні методи діагностики дозволяють визначитися тільки з теперішнім обсягом руйнування пародонтальних тканин [288]. Звідси виникає потреба в нових діагностичних методах, які здатні визначити особливості перебігу захворювання, а також оцінити ефективність лікування, що здійснюється [167, 257]. Згідно сучасного розуміння патологічних процесів, верифікація захворювань пародонта повинна виходити за межі описання тяжкості перебігу та має включати характеристику усіх передумов розвитку патологічного процесу, як на місцевому та загальному рівнях, та є першим кроком до впровадження концепцій прецизійної медицини в лікуванні пародонтиту. Такий підхід забезпечує необхідну основу для

широкого впровадження застосування біомаркерів у діагностику та прогнозування генералізованого пародонтиту [268, 109].

В зв'язку з цим, останнім часом із збільшенням кількості біомаркерів та розвитком нових технологій були розроблені різні методи «point-of-care testing» для діагностики та моніторингу пародонтиту. Вони прості у виконанні, швидкі, недорогі та ідеально підходять для високоточної діагностики пародонтиту. До них належать дослідження на чіпі, паперові платформи та тести в кріслі [132, 174].

При захворюваннях пародонта діагностичне значення набули показники вмісту ММП у ротовій рідині (слині) [271], у вмісті пародонтальних кишень (ясенній рідині) [111, 126], у змивах із ротової порожнини після 30 секундного полоскання водою без попереднього полоскання [92, 225, 291].

Мета-аналізи показують, що рівні ММП-8 у слині значно вищі при пародонтиті [90, 100, 292] та гінгівіті [179]. Цей біомаркер показовий також і щодо агресивного перебігу пародонтиту [180]. Доведено, що рівень ММП-8 в ротовій рідині знижується після проведеного лікування [30, 179]. Оцінка рівня ММП-8 в ясенній рідині допомагає встановленню правильного діагнозу та відповідного лікування [154, 195]. У пацієнтів із генералізований пародонтитом ММП-8 у вмісті пародонтальних кишень виявився чутливим і об'єктивним біомаркером щодо ефективності проведеного лікування [124, 255]. Застосування незнімної апаратури при ортодонтичному лікуванні призводить до виникнення хронічного катарального гінгівіту, розвиток якого характеризується зростанням рівня ММП-8 у ротовій рідині [11].

Показники ММП-8 у ротовій рідині (слині) або в ясенній рідині за допомогою твердофазного імуноферментного аналізу (ELISA) є натеper найбільш поширеним біомаркером пародонтиту [272, 273]. Проте технології визначення ММП-8 постійно вдосконалюються. Так, антитіла до ММП-8 і ММП-9 можуть бути стабілізовані додаванням 5 % розчину трегалози на тестові зони з наступним сушінням у вакуумній печі. Після стабілізації паперові пристрої зберігають еквівалентну зв'язувальну активність, як і свіжоприготовлені тести, протягом 14 днів [287]. Також доведена ефективність нового імунопотокового пристрою для виявлення

концентрації ММП-8 у ротовій рідині порівняно із золотим стандартом лабораторного імунологічного аналізу [151]. Вказується на більшу ефективність при визначенні ММП-8 імунофлюоресцентного аналізу порівняно з імуноферментним методом [175].

До інноваційних діагностичних тестів належить визначення активної ММП-8 (аММП-8) у ротовій або ясенній рідині [51, 128, 255]. Концентрацію аММП-8 визначають у зразках полоскань порожнини рота за допомогою імуноферментного аналізу (ELISA) [188].

За даними [206] рівні активної та загальної ММП-8 однаково корелюють із тяжкістю пародонтальної деструкції, тоді як загальний ММП-8 виявився кращим методом для диференціації ступенів тяжкості пародонтита, а тест аММП-8 зручніший в користуванні. В свою чергу, за результатами дослідження 80 осіб доведено, що рівень аММП-8 має високу прогностичну цінність, навіть на дуже ранніх стадіях пародонтиту [212], що було підтверджено результатами роботи [288].

Згідно даних аналізу показника аММП-8, отриманого для 408 дорослих пацієнтів, чутливість тесту для діагностики пародонтиту склала 82,5 %, специфічність – 84,4 % [92].

За результатами обстеження 83 дослідних встановлено, що рівень аММП-8 у сироватці крові та в ясенній рідині були значно підвищені при захворюваннях пародонта порівняно зі здоровими ( $p < 0,001$ ), тоді як у пацієнтів із гінгівітом та пародонтитом спостерігалися подібні значення цього показника ( $p > 0,05$ ) [158].

Одночасно в роботі [136] зазначається, що аММП-8 має більшу прогностичну цінність, тоді як загальна ММП-8 дозволяє диференціювати інтенсивність патологічного процесу. Кореляційний і регресійний аналіз дозволив виявити зв'язок між аММП-8 у сироватці крові та станом тканин пародонта. Сироваткові рівні суттєво корелювали з пероральним вмістом аММП-8, а також із клінічними параметрами [208].

Разом з тим зазначається, що рівень гігієни ротової порожнини може маскувати зв'язок між ступенем кровоточивості ясен і тяжкістю запального стану навкол зубних тканин, що потребує додаткових досліджень [228], зокрема

проведення тесту на аММП-8 для прогнозування «прозапального» профілю слини та стану здоров'я пародонта в підлітків [226, 227]. Авторами описана прозапальна субклінічна стадія пародонтиту, яка характеризується підвищеним рівнем аММП-8 у ротовій рідині [134, 229]. аММП-8 можна використовувати окремо або в комбінації з іншими прозапальними та/або мікробіологічними біомаркерами [54]. Навпаки, у роботі [242] доводиться, що тест аММП-8 не дозволяє ефективний скринінг захворювань пародонта серед дітей та підлітків.

Визначення активної ММП-8 (аММП-8) при проведенні так званого «point-of-care testing» довело свою ефективність як для діагностики захворювань пародонта, так і контролю ефективності проведеного лікування, хоча розробники зазначають необхідність подальших досліджень [253, 255].

Рекомендується доповнювати оцінку рівня активної ММП-8 результатами опитування за спеціально розробленими анкетами [171, 252].

Попри високу діагностичну цінність ММП-8 у хворих із захворюваннями пародонта, останнім часом розвиток технологій дозволяє звернути увагу на решту ММП, а також їх специфічні інгібітори [31, 70].

Так, якщо ММП-8 у ротовій рідині визнана найбільш показовим біомаркером пародонтиту, то ММП-9 слід вважати більш чутливим до запалення пародонта під час ортодонтичного лікування [189]. Рівень ММП-9 в ясенній рідині виявився показовим щодо характеру перебігу запально-деструктивного процесу в пародонті в хворих на цукровий діабет [218]. Визначення ММП-9 у слині показало високу діагностичну ефективність пародонтиту в експерименті на собаках [182] та щурах [125], а також у клінічній практиці [161, 162], зокрема серед хворих на цукровий діабет [59].

Концентрації ММП-8 та ММП-9 у ротовій рідині пропонують розглядати як маркери алергічної реакції на зубопротезні матеріали [21]. Одночасно виявлено, що ММП-9 у ротовій рідині може застосовуватись як маркер пародонтиту незалежно від наявності металевих реставрацій в порожнині рота, тоді як рівень ММП-8 підвищується відносно норми тільки при пародонтиті за умови присутності металевих реставрацій. В свою чергу, протезування хворих на пародонтит



конструкціями з хромокобальтового або хромонікелевого сплавів призводить до збільшення вмісту в ротовій рідині ММП-2, IL-1 $\beta$  та IL-6 [23, 35].

У дослідженні [175] найвищу діагностичну точність при пародонтиті спостерігали для ММП-2, ММП-9, ММП-8 і TRAP-5.

Аналіз характеру експресії ММП у біоптаті ясен показав, що ММП-2 та ММП-13 приблизно однаково беруть участь у розвитку та перебігу всіх досліджених форм пародонтиту. Найбільше значення в патогенезі швидкопрогресуючого процесу має підвищення експресії ММП-1, ММП-8 і ММП-14 і зниження – ММП-9. Більш того для вмісту ММП-1 та ММП-8 в ясенній рідині зареєстровано статистично значущі зміни після проведеного лікування пародонтиту [19].

Навпаки, у роботі [18] попри те, що зазначається участь ММП-1 у деградації колагенових фібрил у процесі ремоделювання екстрацелюлярного матриксу, вказується на нестабільність фрагментів її структури в крові, а отже в ротовій рідині, що нівелює її діагностичне значення.

Також виявлено великий потенціал ММП-3 як біомаркера в діагностиці захворювань пародонта. Визначено чутливість і специфічність показника ММП-3 в слині для прогнозування пародонтиту, що дорівнювали 81,8 % і 55,5 % відповідно [163]. В роботі [153] показано, що рівень ММП-3 в ясенній рідині корелює зі ступенем деструкції тканин пародонта. У дослідженні [169] спостерігалось значне підвищення концентрації ММП-3 і зниження TIMP-1 в ясенній рідині при прогресуванні пародонтиту. Окрім того зазначені маркери позитивно корелювали з ясенним індексом, глибиною пародонтальних кишень та клінічною втратою зубоясенного прикріплення.

Виходячи з того, що активність ММП регулюється тканинними інгібіторами металопротеїназ (TIMP), дисбаланс між їхніми рівнями пов'язаний з прогресуванням захворювань пародонта. Звідси, TIMP-1 є часто досліджуваним біомаркером захворювань пародонта [70]. Проведений систематичний огляд 322 досліджень виявив, що вміст TIMP-1 у ротовій рідині значно знижується при генералізованому пародонтиті. Проте статистично значущих змін цього показника не зареєстровано [87].

Окрім описаних вище результатів вивчення ММП, рівень яких у біологічних рідинах є показовим щодо перебігу пародонтиту, слід зазначити поодинокі дослідження щодо діагностичної цінності ММП-7, ММП-26, ММП-14, ММП-25 [16].

Виходячи з того, що жоден із біомаркерів не має прогностичної переваги над іншим, тому рекомендується комбінація двох або більше біомаркерів разом із клінічною оцінкою [55, 123]. В роботі [71] було доведено, що співвідношення біомаркерів ММП-8, ММП-9 і TIMP-1 має більшу діагностичну цінність порівняно з окремими показниками.

Вміст ММП-2, ММП-8, ММП-9, IL-1 $\beta$  в ротовій рідині достовірно вищий в хворих на пародонтит, аніж в осіб із клінічно інтактним пародонтом, та достовірно відображає ступінь тяжкості захворювання, глибину пародонтальних кишень та ступінь кровоточивості ясен [4].

Встановлено, що рівні IL-1 $\beta$ , IL-6 та ММП-8 були значно вищими в пацієнтів з пародонтитом [233]. Найбільше діагностичне значення щодо пародонтиту надають таким біомаркерам слини, як IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, ММП-8 і TIMP-2. У свою чергу, найбільш показовими щодо ефективності проведеного лікування виявились IL-1 $\beta$ , ММП-8, ММП-9 і TIMP-2 [164]. За результатами мета-аналізу [157] найбільш прийнятними біомаркерами захворювань пародонта назвали макрофагальний запальний білок-1 $\alpha$  (MIP-1 $\alpha$ ), IL-1 $\beta$ , IL-6 і ММП-8. Загалом комбінація IL-6 і ММП-8 продемонструвала найкращу діагностичну ефективність. Крім того, комбінація чотирьох ключових біомаркерів (IL-1 $\beta$ , IL-6, ММП-8 і MIP-1 $\alpha$ ) показала багатообіцяючі результати для розрізнення гінгівіту та пародонтиту. ММП-8, TRAP-5 і остеопротегерин мають високий потенціал точності в ідентифікації запально-деструктивних процесів в пародонті [135]. Доводиться, що визначення біомаркерів ММП-8 та хітинази в ротовій рідині дозволяє диференціювати гінгівіт та пародонтит [155].

ММП-8 у комплексі з IL-1 $\beta$  та *Porphyromonas gingivalis* пропонується як ефективний діагностичний інструмент [254]. Одночасно комбінація IL-1 $\beta$ , колагену I типу і *Porphyromonas gingivalis* показала найвищу ефективність для диференційної

діагностики гінгівіту та пародонтиту [294]. Для діагностики пародонтиту рекомендується комплексне вивчення зразків слини на IL-1 $\beta$ , ММП-8 та навантаження *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* і *Tannerella forsythia* [186].

Підвищений рівень ММП-8 у ротовій та ясенній рідинах має більшу діагностичну цінність у хворих на гінгівіт/пародонтит у комбінації з дослідженням показників умісту лактоферину [231].

Слід зауважити, що не завжди підвищення запальних маркерів у біологічних рідинах ілюструє характер деструкції кісткової тканини пародонта, що потребує використання специфічних маркерів кісткового метаболізму (телопептиду колагену типу I, остеокальцину, кальпротектину, остеопонтину і стійкої до тартрату кислоти фосфатази (TRAP)) [64], які є показовими щодо перебігу генералізованого пародонтиту, зокрема посилення резорбції кісткової тканини [1, 17, 26].

Таким чином, визначення ММП у біологічних рідинах має значний потенціал із точки зору діагностичної та прогностичної ефективності. Проте необхідні подальші дослідження для з'ясування можливості підвищення їх чутливості та специфічності шляхом комбінування більш ніж одного біомаркера та об'єднання цих наборів тестів із інструментами клінічної оцінки пародонтального ризику.

### **1.3. Сучасний досвід застосування інгібіторів матриксних металопротеїназ у комплексному лікуванні генералізованого пародонтиту**

Рання діагностика пародонтиту, зокрема із застосуванням біомаркерів, до яких належать ММП, у першу чергу спрямована на призначення відповідного лікування на початкових стадіях захворювання, що виключає подальше прогресування патологічного процесу та попереджує виникнення системних порушень в організмі [3, 25, 146].

Найбільш сучасна всесвітня класифікація захворювань пародонта (2017) побудована на принципі індивідуального підходу, насамперед, спрямована на персоналізацію лікування та профілактики генералізованого пародонтиту [240].

Натепер, оцінка ефективності пародонтологічного лікування передбачає вивчення загальних клінічних симптомів та системних біомаркерів [98].

Стверджується, що успіх комплексного лікування пародонтиту полягає у впливі на різні ланки етіопатогенезу захворювання [6, 46, 47].

Виходячи з теперішнього трактування причин та механізмів розвитку генералізованого пародонтиту, активне пародонтальне втручання має на меті зменшити запальну реакцію, насамперед, шляхом видалення зубних відкладень [60, 193].

На пригнічення мікробного фактору спрямована антибіотикотерапія, яка, на жаль, лише в 12 % випадків призначається правильно [50, 141]. Для пацієнтів із пародонтитом середнього та тяжкого ступеня системні антибіотики необхідні [95, 156, 159, 178], зокрема їх застосування доцільне серед хворих із цукровим діабетом [34]. Проте, з появою бактерій, стійких до антибіотиків, спостерігається тенденція до зміщення антимікробного лікування в бік інших терапевтичних методів [261].

Більш того, самостійне застосування антибіотиків не забезпечує достатнього лікувального ефекту. Призупинити запальні процеси можливо шляхом модуляції відповіді «хазяїна», що передбачає застосування таких препаратів, як інгібітори ферменту циклооксигенази-II (ЦОГ II), інгібітори матриксної металопротеїнази (ММП) та остеоінтегруючі агенти [147]. Згідно даних [168] найбільш часто призначають лікувальну схему «амоксцилін + інгібітор ферментів» (58,6 %).

Моделююча терапія, що доповнює традиційне пародонтальне лікування та спрямована на полегшення деструктивних аспектів запальної реакції організму, не нова стратегія в лікуванні пародонтиту [49]. Раніше в цьому аспекті досліджувалися нестероїдні протизапальні препарати [160, 202]. Проте ризик значних небажаних ефектів виключає використання як неселективних нестероїдних протизапальних засобів, так і селективних інгібіторів циклооксигенази-2 [224]. Звідси, пошук препаратів, які впливають на запальні реакції в тканинах пародонта, на даний момент триває [166].

Дисбіотична бактеріальна біоплівка, що контактує з тканинами пародонта, ініціює каскад запальних реакцій, опосередкованих і модульованих імунною

відповіддю «хазяїна», яка характеризується підвищеною експресією низки медіаторів запалення, таких як цитокіни та хемокіни, у сполучній тканині [5]. Зазначені процеси призводять до руйнування альвеолярної кістки. Цей процес залежить від диференціювання та активності остеокластів, клітин, відповідальних за реабсорбцію кісткової тканини. Отже, інгібування диференціювання або активності цих клітин є перспективною стратегією для контролю резорбції кісткової тканини [216].

Так, куркумін, препарат рослинного походження, має протизапальну дію, що полягає в зниженні активності ММП, на тлі незначних побічних ефектів [293]. Клінічне дослідження показало, що він здатний пригнічувати ММП-9 поліморфноядерних лейкоцитів [129]. У свою чергу, хімічно модифікований куркумін продемонстрував безпеку та ефективність *in vitro*, у клітинній культурі та *in vivo* на моделях тварин, що дозволяє можливість його застосування як доповнення до традиційної місцевої терапії в комплексному лікуванні захворювань пародонта [116].

Позитивні результати щодо ефективності застосування були отримані в дослідженні для синтезованих бісфосфонових інгібіторів ММП на моделі *in vitro*, що складається з ясенних фібробластів людини, які зазнали впливу ліпосахаридів пародонтопатогенів [88].

Вивчено вплив системного введення колхіцину, антизапального препарату, на здоровий пародонт та експериментально індукований пародонтит у 42 самців-щурів лінії Вістар. У тварин визначали втрату альвеолярної кістки шляхом вимірювання, тоді як активність остеобластів та остеокластів та експресію ММП-1 досліджували гістологічно. Встановлено, що колхіцин не збільшує втрату альвеолярної кістки в здоровому пародонті, а також може сповільнювати прогресування пародонтиту [266].

Включення в лікувальну схему хворих на генералізований пародонтит препарату ізотретиноїну (синтетичного ретиноїду) сприяє зниженню рівнів ММП-8 і ММП-9 у слині та пригнічує активність *P. gingivalis*, *T. forsythia* та *T. denticola* та *F. nucleatum* [52, 53].

Останнім часом ціла низка робіт присвячена вивченню впливу пробіотиків на рівні ММП у слині, що ймовірно зумовлено їх імуномодельюючим впливом. Зазначається про підвищення рівня ММП-9 та зниження ТІМР-1 у слині при пероральному введенні *Bifidobacterium* і *Lactobacillus* [149].

Окрім вищезазначених препаратів, спрямованих на пригнічення активності ММП, при пародонтиті найбільш часто застосовуються тетрацикліни.

Тетрацикліни раніш використовували в стоматології як протимікробні засоби, що пригнічують розмноження бактерій. Проте їх застосування обмежувалося негативною побічною дією (з боку шлунково-кишкового тракту, порушеннями розвитку зубів, кандидозом, проблемами з вестибулярним апаратом, фоточутливістю/фототоксичністю, неконтрольованою гіпертензією тощо). Натепер переважно використовується протизапальний ефект субантимікробної дози цих препаратів [104, 139]. Так, тетрацикліни та їх похідні [115, 119], мають антиколагеназний ефект, які реалізується через пригнічення позаклітинної активності ММП та захисту ТІМР у нейтрофілах та остеобластах. Окрім того, тетрацикліни є потужними інгібіторами функції остеокластів. Вони є хелаторами кальцію і тому втручаються в ремоделювання кісток. Вони запобігають окислювальній активації проколагеназ шляхом поглинання активних форм кисню. Тетрацикліни пригнічують секрецію інших колагенолітичних ферментів, зокрема серинових протеїназ, що відносяться до лізосомальних катепсинів. Ця група препаратів інгібує пародонтопатогенні бактеріальні протеїнази, які безпосередньо чи опосередковано сприяють каскадам руйнування тканин під час розгортання клініки пародонтиту, викликаючи реакцію «хазяїна» [58, 89, 202, 215, 237, 281].

Відповідно позаклітинні цистеїнові протеїнази, які називаються гінгіпаїнами, вважаються важливими факторами вірулентності для *P. gingivalis*. В експерименті тетрацикліни в дозі 100 мкМ повністю інгібували амідолітичну активність аргінін-специфічних гінгіпаїнів. Серед похідних тетрацикліну найпотужнішим інгібітором гінгіпаїну визнано доксициклін, потім тетрациклін і міноциклін [142].

Похідні тетрацикліну, до яких належить доксициклін, у субантимікробних дозах пригнічують ММП-8 нейтрофілів людини, що було підтверджено зниженням

рівня даної колагенази в ясенній та ротовій рідині, яке клінічно проявлялось у зменшенні глибини кишень і втраті прикріплення [10].

При застосуванні доксицикліну в експериментальній моделі запальні цитокіни та ММП-2 в сироватці крові знижуються, а протизапальні IL-10 і TIMP-1 підвищуються [133].

Дослідження тканин пародонта *in vitro* дозволило встановити, що концентрація доксицикліну, необхідна для пригнічення ММП-8, яку екскретують поліморфноядерні лейкоцити, становить 16-18 мкмоль у присутності або 1,2 мМ при відсутності оптимального ртутноорганічного активатора латентних проколагеназ. Цікаво, що колагеназа *P. gingivalis* також пригнічувалась аналогічними рівнями доксицикліну. При цьому було виявлено, що активність ММП-8, що спостерігається в екстрактах ясенної тканини, має клітинне, а не бактеріальне походження. Інгібування ММП-1 із культурального середовища ясенних фіброblastів людини, вимагало набагато вищих рівнів доксицикліну (280 мкмоль), тоді як для ММП-9 достатнім був рівень 30-50 мкмоль [40].

Визначено ефективність субантимікробної дози доксицикліну серед 30 пацієнтів із пародонтитом, що пояснюється зниженням у слині рівня двох основних ММП, асоційованих з пародонтитом, ММП-8 і ММП-9, а також їх потенційного окислювального активатора мієлопероксидази. В свою чергу, для ММП-13, остеопротегерину і стійкої до тартрату кислу фосфатази-5 (TRAP-5) статистично достовірних відмінностей не встановлено [97].

Було виявлено, що неантимікробна композиція доксицикліну різко знижує рівні IL-6 і ММП-9 у плазмі пацієнтів із пародонтитом. Одним із задіяних механізмів може бути здатність доксицикліну пригнічувати опосередковану ММП шляхом захисту аполіпопротеїну А-I від атаки протеїнази [120].

Доксициклін у дозі 10 мкМ є потужним інгібітором прозапальної цитокінової відповіді, зокрема знижує секрецію медіаторів запалення (IL-1 $\beta$ , -6 і -8 і TNF- $\alpha$ ) у моделях макрофагів і *ex vivo* цільної крові людини, стимульованих ліпополісахаридами *A. actinomycetemcomitans* [78].

Вивчення впливу доксицикліну на моделях *in vitro* та *in vivo* довело, що препарат пригнічує остеокластогенез, індукований RANKL, шляхом інгібуючої дії на активність ферменту ММП-9 [106].

Тетрацикліни не пригнічують колагеназу фібробластного типу, що може допомогти пояснити відсутність їх впливу на нормальне ремоделювання сполучної тканини [196]. На експериментальній моделі мишей доведено, що тривалий вплив доксицикліну не є шкідливим для мікроархітектури або біомеханічних властивостей здорової кістки [105]. В експерименті на щурах короткотермінове лікування субантимікробними дозами доксицикліну та еритроміцину посилювало формування нової кістки без будь-яких переваг на користь кожного препарату [246].

Низькі дози доксицикліну збільшують фрагментацію ламініну-5, компоненту базальної мембрани, опосередковано через ММП, що зменшує утворення пародонтальних кишень за рахунок міграції епітеліальних клітин [96].

При лікуванні генералізованого пародонтиту протизапальні властивості тетрациклінів реалізуються через застосування субантимікробної дози доксицикліну 20 мг двічі на день протягом трьох місяців. Важливо, що саме таке дозування препарату після застосування до 2 років не викликає побічних ефектів антибіотиків [30, 115, 256]. Також добрі клінічні результати отримані при вживанні 40 мг доксицикліну один раз на день [9].

Саме в дозуванні 20 мг доксициклін випускається в США під комерційної назвою Periostat® [77]. Додаткові дослідження призвели до розробки подібних неантимікробних препаратів Oracea® і композицій тетрациклінів (зокрема, хімічно модифікованого тетрацикліну-3) як препаратів-модуляторів для лікування пародонтиту [116].

При застосуванні субмікробних доз доксицикліну позитивна клінічна динаміка співпадала зі зниженням рівня ММП-8 та ММП-13 в ясенній рідині [270], вмісту ММП-9 і ММП-13 у ротовій рідині [62].

Цікавим є те, що субінгібіторні концентрації тетрацикліну та доксицикліну індуюють виділення ліпополісахариду *Porphyromonas gingivalis* і, як наслідок,



можуть сприяти посиленню запальної реакції організму, пов'язаної з пародонтитом [262].

Хімічно модифіковані тетрацикліни, позбавлені антимікробної активності, були отримані шляхом видалення диметиламіногрупи з позиції вуглецю-4 кільця А чотирикільцевої (А, В, С, D) тетрациклінової структури. Основна їх перевага полягає у відсутності токсичного ефекту щодо шлунково-кишкового тракту. Застосування даної групи препаратів при пародонтиті запобігає розпаду сполучної тканини шляхом інгібування ММП, пригнічення нейтрофілів та інгібування генерації метаболітів арахідонової кислоти шляхом блокування синтезу фосфоліпази А<sub>2</sub> та PGE<sub>2</sub>, поглинання активних форм кисню, посилення прикріплення фібробластів і сполучної тканини до поверхні зуба [49, 102, 117, 276].

Проведено порівняльне дослідження впливу тетрацикліну, доксицикліну і хімічно модифікованого тетрацикліну-3 на продукцію прозапальних медіаторів і ММП у людини *ex vivo* на моделі цільної крові, стимульованої ліпополісахаридом *P. gingivalis*. Усі зазначені препарати сприяли зниженню секреції цитокінів, проте не мали значного впливу на секрецію ММП-8 і ММП-9 [79].

Слід зауважити, що останнім часом багато досліджень спрямовані на розробку безпечних і ефективних біоматеріалів на основі колагену як носіїв для систем доставки ліків та пародонтальних бар'єрних мембран [85]. Полімерний матеріал відіграє важливу роль як утворювач матриці в модуляції вивільнення ліків із завантаженого антимікробними препаратами *in situ* формуючого гелю для ефективного лікування пародонтиту. Більш того, ефект поєднання природного полімеру, такого як колаген, із доксицикліном та глютаровим альдегідом, як хімічним агентом, що зшиває, дозволяє регенерацію тканин пародонта [265, 223]. Вибілений шелак, нерозчинна у воді поліефірна смола; Ethocel та Eudragit RS, четвертинний поліакрилатний полімер із позитивним зарядом, також наповнювали доксицикліном гіклатом для місцевого лікування пародонтиту [220, 221, 222]. Зазначені композиції були ефективними для зменшення росту *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Streptococcus mutans*, *Porphyromonas gingivalis* і *Candida albicans* [245]. У дослідженні [172] для пародонтальної доставки були розроблені мікросфери

хітозану, вкриті молочною кислотою спільно з гліколевою, наповнені гідроксиапатитом і комплексом доксицикліну гіклату.

Високу клінічну ефективність показують комбінації препаратів різних фармакологічних груп із доксицикліном у комплексному лікуванні пародонтиту. Так, алендронат та доксициклін забезпечують суттєве пригнічення основних медіаторів запалення в тканинах пародонта, а комбіноване їх введення забезпечує сприятливий ефект при лікуванні пародонта [72]. Застосування комбінації доксицикліну та алендронату в експериментальній моделі пародонтиту, відтвореній на щурах, довело її здатність пригнічувати експресію ММП-8 та збільшувати експресію ТІМР-1 в яснах [73].

За клінічними результатами дослідження, проведеного серед 19 хворих на пародонтит, застосування субантимікробної дози доксицикліну більш ефективно в комплексі з нестероїдними протизапальними препаратами [173].

Доведено, що доксициклін у комбінації з хлоргексидином пригнічують колагенолітичні нейтрофіли людини, а також рівень активної ММП-8 в ясенній рідині [255].

На моделях експериментального пародонтиту в щурів доведена ефективність доповнення традиційного лікування субантимікробними дозами доксицикліну та використанням низькоінтенсивного лазера [247, 248].

Супутня патологія має велике значення в успішності лікування пародонтиту. Місцевий доксициклін як доповнення до традиційного лікування значно покращив клінічний стан тканин пародонта в курців [205] та хворих на цукровий діабет [62, 86, 172, 286, 289].

В свою чергу, ревматоїдний артрит і захворювання пародонта є хронічними запальними захворюваннями, які впливають на перебіг одне одного [22], мають подібну остеоклазію, алельні гени людського лейкоцитарного антигену-DR4 та імунологічний профіль, а також характерні цитокіни [24, 176]. Одні автори стверджують, що лікування ревматоїдного артриту відіграє на стан тканин пародонта [8, 235], інші на підставі власних досліджень роблять висновки, що протиревматичне лікування має незначний вплив на стан пародонта [91]. Подібність

перебігу ревматоїдного артриту та пародонтиту дає можливість розглядати застосування інгібіторів ММП у комплексному лікуванні пародонтиту [194]. Разом з тим, у роботі [63] показано відсутність впливу протиревматичних препаратів на рівні ММП-8 і співвідношення ММП-8/TIMP-1 у слині хворих на пародонтит на тлі ревматоїдного артриту.

### **Висновок за розділом**

Підсумовуючи аналіз сучасного досвіду застосування інгібіторів матриксних металопротеїназ, слід зробити висновок про те, що наразі єдиним доступним допоміжним модулятором відповіді організму, який має обґрунтування при лікуванні пародонтиту, є субантимікробна доза доксицикліну, яка функціонує як інгібітор матриксних металопротеїназ. Клінічні переваги їх застосування були продемонстровані в ретельно проведених рандомізованих контрольованих дослідженнях, проте ефективність субантимікробної дози доксицикліну в рутинній клінічній практиці ще належить визначити. До того ж, на нашу думку, потребують уточнення показання до проведення такої терапії, а також критерії її ефективності, на що і спрямоване теперішнє дослідження.

## РОЗДІЛ 2

### ОБ'ЄКТИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Насамперед, зазначимо, що всі проведені дослідження схвалені комісією з питань біомедичної етики Дніпровського державного медичного університету та проведені згідно з письмовою згодою учасників і відповідно до принципів біоетики, викладених у Гельсінській декларації «Етичні принципи медичних досліджень за участю людей» та «Загальній декларації про біоетику та права людини (ЮНЕСКО)».

#### **2.1. Порядок формування та склад дослідних груп на різних етапах дослідження**

Представлена робота виконувалась у три етапи. Перші два етапи (клініко-лабораторні) проводилися паралельно на одному ж тому контингенті хворих, які звернулися за спеціалізованою стоматологічною допомогою на кафедру терапевтичної стоматології Дніпровського державного медичного університету. Критеріями відбору до дослідження були молодий вік (за ВООЗ – до 45 років) та інтактні зубні ряди у фізіологічному прикусі. До дослідження не включали осіб із тяжкою соматичною, ендокринною та онкологічною патологією, вагітних, а також курців.

Як видно з табл. 2.1, первинна кількість осіб, що прийняли участь у дослідженні, склала 90 осіб, порівно чоловіків та жінок, 30 здорових та 60 осіб із захворюваннями пародонта. Вік дослідних осіб коливався від 32 до 45 років і склав у середньому  $40,0 \pm 1,0$  років.

Учасники дослідження були розподілені на три ідентичні та однорідні за статевою та віковою ознаками групи.

В роботі для верифікації захворювань пародонта використана класифікація М. Ф. Данилевського [12].

Таблиця 2.1

**Характеристика контингенту дослідних,  
залучених до клініко-лабораторних досліджень**

Характеристика дослідних осіб	Кількість спостережень (n=90)	%
Стать:		
- чоловіки	45	50,0
- жінки	45	50,0
Стан пародонта:		
- інтактний	30	33,3
- хронічний дифузний катаральний гінгівіт	18	20,0
- генералізований пародонтит хронічного перебігу:		
- початкового ступеня	12	13,3
- I ступеня	13	14,5
- II ступеня	17	18,9

До I групи увійшло 30 осіб зі здоровим пародонтом, до II групи – 30 хворих із хронічним дифузним катаральним гінгівітом та генералізованим пародонтитом початкового ступеня, хронічного перебігу (без виразних резорбтивних змін у кістковій тканині), до III групи – 30 хворих із хронічним генералізованим пародонтитом I-II ступеня тяжкості, хронічного перебігу.

Серед вищезазначеного контингенту дослідних проведено клініко-рентгенологічне обстеження та біохімічне дослідження ротової рідини.

У свою чергу, біоптати ясен для імуногістохімічного дослідження на другому етапі було взято рандомно в осіб з первинного контингенту дослідних. До основної групи взято 30 хворих із хронічним генералізованим пародонтитом I-II ступеня тяжкості, до контрольної групи – 10 осіб зі здоровим пародонтом.

Відповідно, контингент хворих для третього етапу виконання дисертаційного дослідження (клінічної апробації) формувався окремо і хронологічно пізніше з осіб,

що звернулися на кафедру терапевтичної стоматології Дніпровського державного медичного університету та потребували комплексного лікування (табл. 2.2).

Таблиця 2.2

**Характеристика контингенту дослідних,  
залучених до клінічної апробації**

Характеристика дослідних осіб	Кількість спостережень (n=60)	%
Стать:		
- чоловіки	30	50,0
- жінки	30	50,0
Стан пародонта:		
- хронічний дифузний катаральний гінгівіт	14	23,3
- генералізований пародонтит хронічного перебігу:		
- початкового ступеня	16	26,7
- I ступеня	18	30,0
- II ступеня	12	20,0

В рамках клінічної апробації проліковано 60 пацієнтів із захворюваннями пародонта, віком 32-45 років (середній вік дослідних склав  $38,7 \pm 0,9$  років), нарівно чоловіків та жінок, з інтактними зубними рядами та фізіологічним прикусом, які не підлягали будь-яким пародонтологічним втручанням, а також не вживали антибіотики протягом 12 місяців. До дослідження не включали осіб із тяжкою соматичною, ендокринною та онкологічною патологією, вагітних, а також курців.

Таким чином, під час клінічної апробації проліковано 14 хворих із хронічним дифузним катаральним гінгівітом та 16 – із генералізованим пародонтитом початкового ступеня, хронічного перебігу (без резорбтивних змін у кістковій тканині), 18 хворих із хронічним генералізованим пародонтитом I ступеня тяжкості та 12 – II ступеня.

Із зазначених пацієнтів було сформовано дві дослідні групи по 30 осіб, рівнозначні за віком, статтю, ступенем тяжкості та перебігом запально-деструктивного процесу (клінічною картиною) (основна група та група зіставлення).

Результати проведеного лікування оцінювали в найближчий та віддалений терміни спостереження. Зазначимо, що нам вдалося проаналізувати результати лікування в зазначені терміни в усіх хворих, включених до дослідження.

## **2.2. Клініко-лабораторні методи дослідження**

### *2.2.1 Клінічні методи дослідження*

Клінічне обстеження учасників дослідження проводили за традиційною методикою [12]. Насамперед, з'ясовували скарги та анамнез захворювання (тривалість симптоматики, її динаміку, характер та ефективність проведеного раніш лікування), особливу увагу приділяли наявності супутньої патології.

При огляді порожнини рота визначали вид прикусу, особливості оклюзійних взаємовідносин, наявність зубощелепних деформацій, стан зубних рядів та окремих зубів (дефекти та характер їх заміщення).

При визначенні стану тканин пародонта проводили візуальне обстеження ясен, відзначали їх колір, щільність, кровоточивість, набряклість, наявність рецесії ясенного краю. У хворих із патологією тканин пародонта оцінювали втрату епітеліального прикріплення. При наявності пародонтальних кишень вимірювали їх глибину за допомогою калібрувального пародонтального зонда по вертикальній осі з усіх поверхонь. Встановлювали наявність, кількість та характер ексудату. Діагностичне значення мала патологічна рухомість зубів, що визначалася пальпаторно.

Традиційно для описання стану гігієни ротової порожнини та пародонтального статусу використовували індексну оцінку [12]. Для описання гігієни порожнини рота застосовано індекс ОНІ-S (Oral Hygiene Index - Simplified), що складався з індексу зубного нальоту (DI-S) та індексу зубного каменю (CI-S). Для описання запального процесу в яснах використовували індекс гінгівіту РМА (Papillary

Marginal Alveolar Index, папілярно-маргінально-альвеолярний індекс). Для об'єктивізації даних клініко-рентгенологічного дослідження стану тканин пародонта розраховували комплексний пародонтальний індекс CPITN (Community Periodontal Index of Treatment Needs, комплексний пародонтальний індекс потреби в лікуванні).

Для оцінки стану кісткової тканини застосовували ортопантомографію та комп'ютерну томографію. Методику здійснювали за допомогою апарату Planmeca ProMax 3D Mid (Finland) та програмного забезпечення Planmeca Romexis Viewer (рис. 2.1).

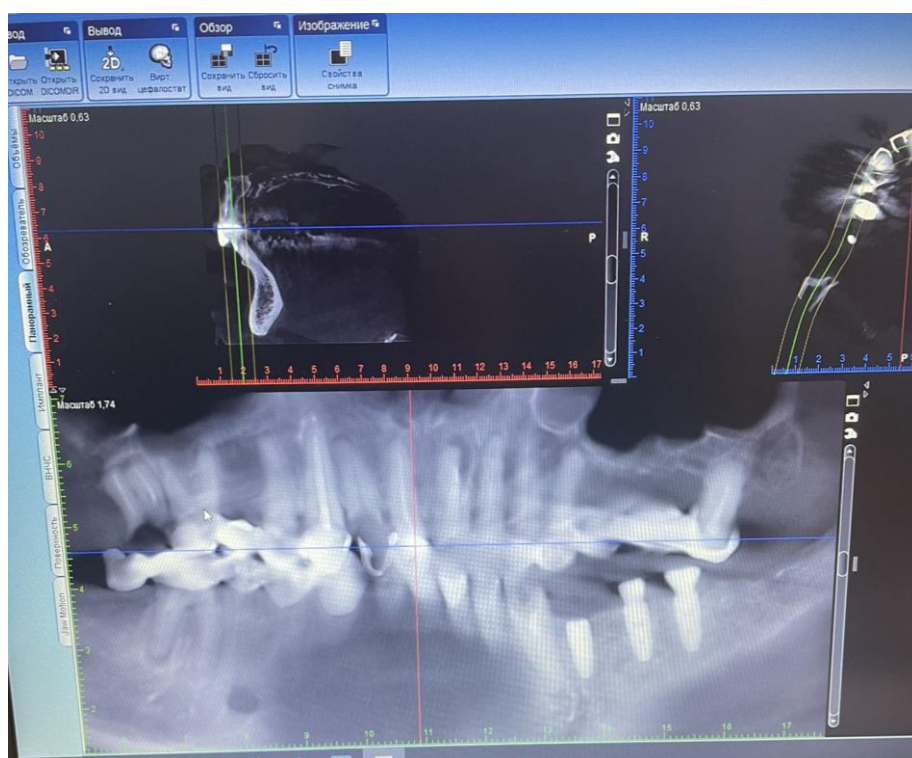


Рис. 2.1. Оцінка результатів комп'ютерної томографії за допомогою програмного забезпечення Planmeca Romexis Viewer

Під час постановки діагнозу враховували ступінь резорбції міжзубних альвеолярних перегородок на ортопантомограмі, стан кортикальної пластинки, наявність зон остеопорозу або остеосклерозу.

Також за результатами комп'ютерної томографії визначали мінеральну щільність кісткової тканини щелеп (Bone Mineral Density, BMD) в одиницях



Хаунсфілда (Hounsfield units, HU). За розрахунковий брали усереднений показник мінеральної щільності кісткової тканини щелеп за вимірюваннями в трьох ділянках: тіла нижньої щелепи в проекції центральних різців та в проекції верхніх перших молярів справа та зліва.

### *2.2.2. Біохімічне дослідження зразків ротової рідини*

Вивчення вмісту біомаркерів у ротовій рідині натепер є ефективним інструментом діагностики захворювань пародонта. На даний момент існує понад 90 різних компонентів ротової рідини, які досліджуються як діагностичні та прогностичні маркери захворювань пародонта, включаючи медіатори запалення, маркери окислювального стресу, ферменти, продукти розпаду тканин і маркери кісткового гомеостазу [271]. Проте низка авторів зазначає про вплив методики забору на інформативність результатів при застосуванні складних методик [214, 232].

В нашій роботі для проведення біохімічних досліджень використовували ротову рідину, яку збирали вранці натще. Отримані зразки центрифугували 15 хвилин при 8000 обертів на хвилину. Надосадову частину зберігали в пластикових пробірках при температурі 30°C.

В дослідженні застосовувався метод імуноферментного аналізу (enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)) – метод виявлення антигенів та антитіл, який оснований на визначенні комплексу антиген-антитіло за рахунок введення в один із компонентів реакції ферментативної мітки з наступною її детекцією за допомогою відповідного субстрату, який змінює своє зафарбовування [3].

Цей метод на сьогодні є найбільш поширеним для діагностики захворювань пародонта, а його ефективність, зокрема щодо вивчення вмісту ММП у ротовій рідині доведена результатами досліджень [272, 273].

Нами були застосовані відповідні комерційні набори реагентів (Immundiagnostik, Німеччина), які використовували відповідно до інструкцій виробника на імуноферментному аналізаторі Lab Line-90 (Австрія).

Рівні ММП у ротовій рідині є надійним інструментом для виявлення найменших змін стану пародонта [101]. До того ж, попри те, що встановлено ініціаторну роль пародонтальних патогенів у розвитку пародонтиту, більшу діагностичну цінність, як показника запального процесу в організмі «хазяїна», належить саме ММП [272].

В представлений роботі нами досліджено матриксні металопротеїнази ММП-2, ММП-3, ММП-8, ММП-9, ММП-13, а також тканинний інгібітор металопротеїназ ТІМР-1 (його дисбаланс з рівнем ММП призводить до патологічного руйнування позаклітинного матриксу при пародонтиті [9, 56, 82, 241]).

Окрім того, для зіставлення з показниками ММП, нами в якості маркерів запального процесу в тканинах пародонта вивчався вміст у ротовій рідині інтерлейкінів ІЛ-1 $\beta$ , ІЛ-6 та ІЛ-4. Зазначені показники є показовими щодо стану тканин пародонта [213].

Нарешті, запальні цитокіни та ММП індукують механізми резорбції кісткової тканини [42]. Для оцінки стану кісткового метаболізму визначали активність тартратрезистентної кислоти фосфатази (TRAP, Tartrate Resistant Acid Phosphatase) за допомогою набору Bone-TRAP ELISA та кісткової лужної фосфатази (BAP, Bone-Specific Alkaline Phosphatase) із застосуванням кінетичного колориметричного методу за реакцією з р-нітрофенілофосфатом, а також вміст остеокальцину (O) із застосуванням тест-набору N-MID Osteocalcin ELISA.

Отримані біохімічні показники зіставлялись одне з одним, а також з даними клініко-функціональних досліджень стану пародонта та результатами імуногістохімічного дослідження маркерів апоптозу та запалення в біоптатах ясен.

### *2.2.3. Імуногістохімічне дослідження біоптатів ясен*

Основою імуногістохімічного дослідження є специфічна взаємодія поліклональних або моноклональних антитіл із антигенами тканин, яка візуалізується за допомогою маркування на світлооптичному рівні. Даний метод дозволяє оцінювати стан структурних елементів, рецепторів та продукту синтезу клітин та позаклітинного простору [3].

В нашому дослідженні для виявлення реакції зв'язування антиген-антитіло використано полімерні молекули декстранів, на яких містяться вторинні антитіла, імуногенні до первинних, та численні молекули пероксидази, що дозволило скоротити обсяг дослідження до двох кроків та підвищити його чутливість та специфічність.

Зауважимо, що пероксидаза здатна розщеплювати перекис водню та призводить до кумулювання хромогену DAB (3-діамінобензидина тетрахлорід), який забезпечує забарвлення продуктів реакції в інтенсивно брунатний колір, що дозволяє ідентифікувати місце зв'язування антигену, який вивчається, з моноклональним антитілом. Проте методика потребує попереднього пригнічення активності ендогенної пероксидази тканини рідиною, що містить перекис водню.

Для імуногістохімічних досліджень використовували біоптати ясен об'ємом 5 мм<sup>2</sup> (2,0 мм на 2,5 мм), які представляли собою тканини міжзубних сосочків. Їх отримували під час пародонтологічних маніпуляцій після попереднього місцевого ін'єкційного знеболення 4 % розчином Ubistesin forte.

Отримані зразки фіксували в 4 % розчині нейтрального формаліну протягом доби і заливали в парафін. Гістологічні зрізи товщиною 4,0-6,0 мкм наносили на адгезивні предметні скельця SuperFrost Plus, які потім депарафінізували згідно прийнятих стандартів.

З огляду на те, що при фіксації в формаліні порушуються структури антигенних детермінант, що викликає зниження їх імуногенності, проводили теплову індукцію епітопного (антигенного) звороту (HIER – Heat Induction of Epitope Retrieval), внаслідок чого відновлювались антигенні властивості тканин.

Отже, температурне демаскування антигенів здійснювали після депарафінізації та регідратації зрізів. Для цього їх розміщували в цитратному буфері з рН 6.0 і підігрівали в автоклаві при температурі 121°C протягом 8 хвилин із симетричним розташуванням скельців у кюветі.

Значення рН буферного розчину, яке може коливатися від 6,0 до 9,0, обрано відповідно до антитіл, що використовували. Окрім того, суворо додержувалися параметрів експозиції та температури демаскування, порушення яких могло

призвести до неповного відтворення антигенів або неспецифічного зв'язування антитіл, або деформації та відокремлення зрізів від скельців.

Активність ендогенної пероксидази пригнічували 3 % розчином перекису водню протягом 20 хвилин. В подальшому інкубацію зрізів проводили з первинними антитілами у вологих камерах при температурі 23-25°C протягом 30 хвилин.

В представленому дослідженні як первинні використовували моноклональні антитіла до p 21, p 53, Bcl-2, каспази-3, COX-2 (LabVision) та поліклональні до ММП-1 (DakoCytomation, Denmark). Титр антитіл підбирався індивідуально для всіх маркерів із використанням в якості розчинника Antibody Diluent (DakoCytomation, Denmark). При цьому для кожного маркера виконували контрольні дослідження для виключення помилково негативних або помилково позитивних результатів.

Для ідентифікації реакції використовували надчутливу систему візуалізації UltraVision Quanto (LabVision). Вторинні антитіла, які містили багато пероксидази, наносили на зрізи та інкубували у вологих камерах 30 хвилин із промиванням у ТРИС-буферному розчині між кожним етапом протягом 10 хвилин.

Ідентифікація реакції проводилась із застосуванням хромогену 3-діамінобензидин тетрахлориду (DAB, Quanto, LabVision), під контролем мікроскопу від 20 секунд до 3 хвилин, із проявом у вигляді брунатного забарвлення специфічних структур у залежності від маркера (ядерна, цитоплазматична, мембранна реакція).

Для диференціювання структур тканин зрізи додатково забарвлювали гематоксиліном Майєра протягом 1-3 хвилин. Наступну дегідратацію і включення в бальзам здійснювали за традиційними методиками (рис. 2.2).

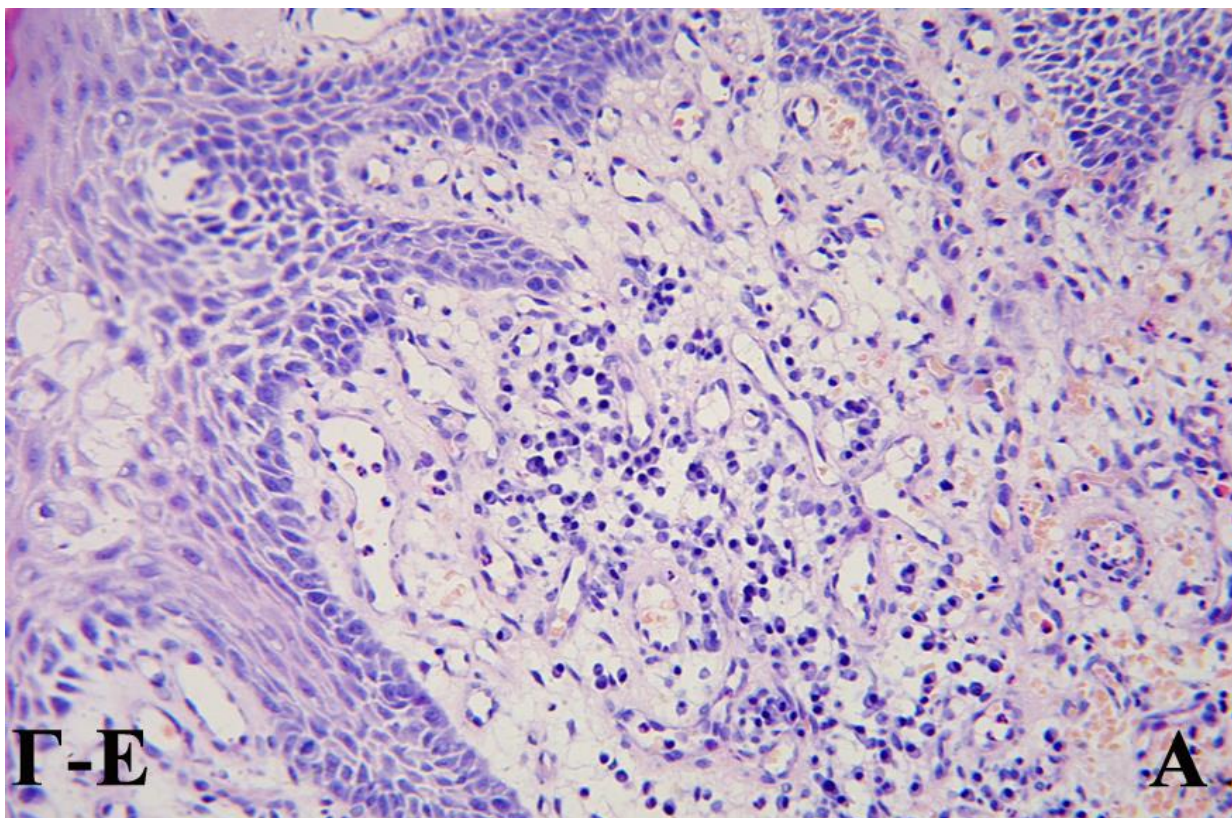


Рис. 2.2. Імуногістохімічне дослідження біоптатів ясен у дослідних хворих: забарвлення гематоксилін-еозином. Імуногістохімічний метод, додаткове забарвлення гематоксиліном Майєра (x400)

При виготовленні серії зрізів перший з них забарвлювали гематоксиліном та еозином для перевірки гістологічного діагнозу та можливості виконання імуногістохімічного дослідження (рис. 2.3).

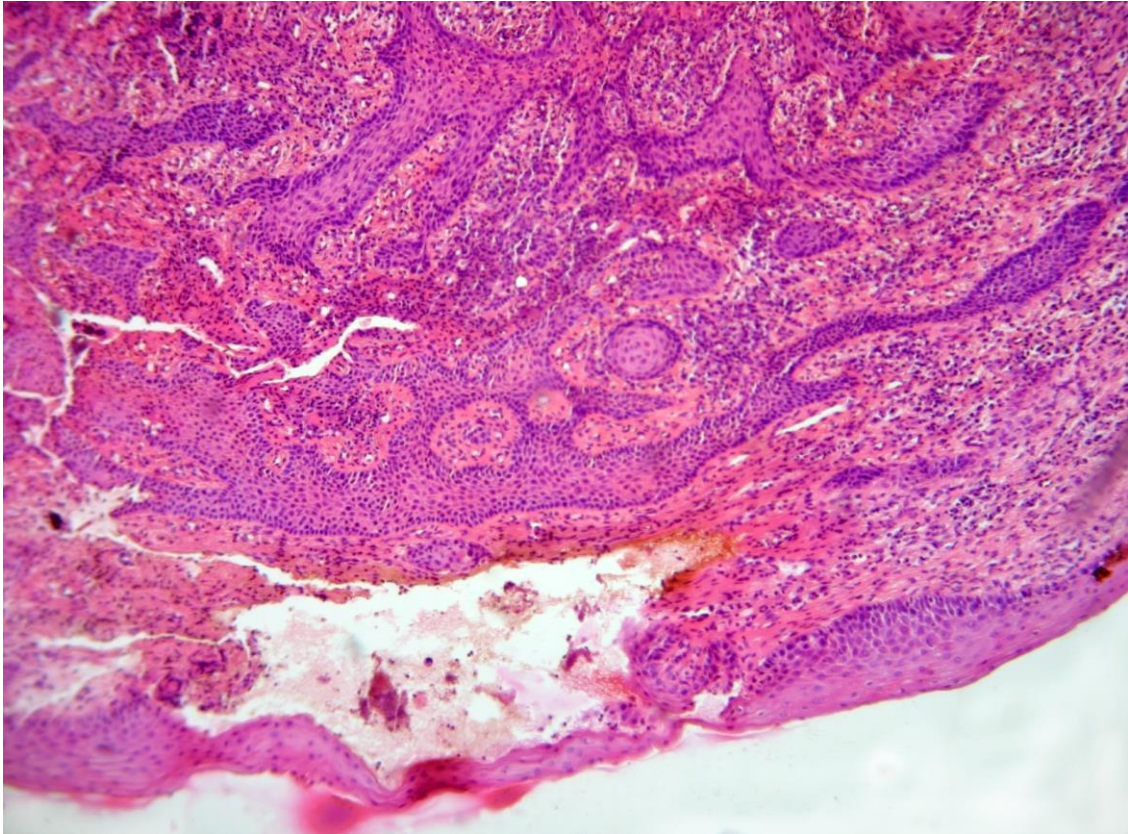


Рис. 2.3. Зразок біоптату ясен (пояснення в тексті). Імуногістохімічний метод, додаткове забарвлення гематоксиліном Майєра (x400)

Надалі проводили аналіз результатів імуногістохімічних реакцій з одночасним уточненням структур на зрізах пофарбованих рутинними барвниками. В кожному зразку диференціювали три ділянки для можливості оцінки кількісного розподілу зазначених клітин із забарвленням: (1) сполучний епітелій, (2) власна пластинка; (3) епітелій ротової порожнини.

Оцінку здійснювали в десяти випадково обраних полях мікроскопу під збільшенням ( $\times 400$ ).

Описання експресії кожного маркера здійснювали окремо за наступними критеріями. Цитоплазматичну експресію маркера СОХ-2 оцінювали за трьома градаціями забарвлених клітин: (+1) – слабкий інфільтрат, (+2) – помірний інфільтрат, (+3) – виражений запальний інфільтрат з позитивною міткою [66].

В свою чергу, цитоплазматичну експресію маркера каспаза-3 оцінювали за бінарною шкалою: (0) – забарвлених клітин менше 30 % запального інфільтрату; (+1) – відповідно забарвлення більше 30 %.

Рівні інтрануклеарної експресії маркерів MMP-1 та p 21 (у запальному інфільтраті), p 53 та Vcl-2 (в епітелії маргінального пародонта) були розбиті на 4 градації від 0 до +3: (0) – немає забарвлення; (+1) – забарвлених клітин до 10 %, (+2) – кількість забарвлених клітин варіює в діапазоні від 10 до 30 % та градація (+3), де забарвлених клітин більше на 30 % відповідно [75].

Отримані результати опрацьовували статистично за допомогою методів, наданих у підрозділі 2.3.

### **2.3. Розроблена лікувальна схема та методи оцінки її ефективності**

Аналіз літературних джерел, а також результати проведених клінічних, біохімічних та імуногістохімічних досліджень дозволили нам обґрунтувати схему комплексного лікування захворювань пародонта, показання до її проведення та визначити критерії оцінки її ефективності. Апробація розробленої методики лікування проведена на третьому етапі роботи для двох груп спостереження (основна та зіставлення).

У хворих із групи зіставлення застосовували традиційну схему лікування генералізованого пародонтиту: видалення зубних відкладень, місцева антибактеріальна та протизапальна терапія. За показаннями в хворих на генералізований пародонтит I-II ступеня проводили вибіркоче пришліфовування та іммобілізацію зубів скловолоконними шинами, кюретаж пародонтальних кишень. В якості загального антимікробного лікування призначали перорально «Амоксиклав» по 875 мг щодня курсом 7 днів, як остеотропну терапію застосовували препарат «Остеогенон» по 2 таблетки на добу протягом 3 місяців.

Хворим основної групи в якості інгібіторів матриксних металопротеїназ додатково призначали доксициклін по 20 мг 2 рази на день протягом 3 місяців.

Стан тканин пародонта оцінювали в динаміці лікування. При цьому клінічні, біохімічні та імуногістохімічні дослідження за вищеприведеними методиками

проводили відразу після лікування (через 3 місяці від початку) та у віддалений термін (через 1 рік після закінчення повного курсу лікування). В якості біохімічних маркерів у ротовій рідині використовували показники вмісту матриксних металопротеїназ ММП-8 та ММП-9, які визначали за методиками, приведеними в підрозділі 2.2.2.

У біоптатах ясен вивчали вміст ММП-1 із застосуванням імуногістохімічного дослідження (див. підрозділ 2.2.3). При цьому рівні інтрануклеарної експресії маркера ММП-1 у запальному інфільтраті розбивали на 4 градації від 0 до +3: (0) – немає забарвлення; (+1) – забарвлених клітин до 10 %, (+2) – кількість забарвлених клітин варіює в діапазоні від 10 % до 30 %, (+3) – забарвлених клітин більше 30 %.

У віддалений термін спостереження додатково до клініко-лабораторних досліджень проводили ортопантомографію та комп'ютерну томографію.

#### **2.4. Статистичні методи дослідження**

Отримані дані проведених досліджень підлягали статистичній обробці з використанням програм Microsoft Excel 2010 (ліцензійний номер 02260-018-0000106-48794) і Statistica 6.1 (серійний номер AGAR909E415822FA).

Для опрацювання одержаних результатів нами використано традиційні методи як описової, так і аналітичної статистики. Згідно здійсненої перевірки відповідності розподілу показників нормальному закону за критеріями Колмогорова-Смирнова і Шапіро-Уїлка, таке розподілення змінних на деяких етапах дослідження в окремих групах було відсутнє, проте в більшості спостережень гіпотеза про нормальний закон розподілу прослідковувалась. Отже, нами застосовані параметричні методи описової та аналітичної статистики.

В дослідженні нами використано такі статистичні показники як кількість спостережень, середня арифметична величина із приведенням стандартної помилки середньої, відносна величина, рівень статистичної значущості.

За результатами досліджень нами розраховано узагальнюючі статистичні показники; встановлені відмінності між показниками груп спостереження за статистичними критеріями. Нами проведений розрахунок t-критерію за Стьюдентом



для незалежних змінних та Т-критерію за Стьюдентом для залежних змінних, що дозволило встановити відмінності, що описують динаміку показників в процесі лікування. При множинних порівняннях нами використано поправки Бонферроні та Холма.

Вірогідність різниці відносних показників визначалась із використанням критерію Хі-квадрат ( $\chi^2$ ) Пірсона, зокрема з поправкою Йейтса на безперервність.

Критичне значення статистичної значущості при перевірці нульових гіпотез приймалося нами таким, що дорівнює 0,05. Відмінності показників, які порівнювалися, вважалися достовірними при значеннях  $p < 0,05$  [2].

### РОЗДІЛ 3

## ЗМІНИ МАТРИКСНИХ МЕТАЛОПРОТЕЇНАЗ РОТОВОЇ РІДИНИ ЗАЛЕЖНО ПАРОДОНТОЛОГІЧНОГО СТАТУСУ ОБСТЕЖЕНИХ ОСІБ

Проведенню лабораторних досліджень передували клінічні, спрямовані на формування контингенту трьох груп обстеження.

Головним критерієм відбору до I (контрольної) групи була відсутність будь-яких запально-деструктивних явищ у тканинах пародонта. Звідси дослідні з цієї групи мали здорові ясна блідо-рожевого кольору, що щільно охоплювали шийки зубів, фізіологічну рухомість зубів та добрий стан гігієни ротової порожнини, що відповідав індексній оцінці, результати якої представлені в табл. 3.1.

Таблиця 3.1

### Індексна оцінка стану пародонта в дослідних групах (M±m)

Показник	Група			p I-II	p II-III	p I-III
	I (n=30)	II (n=30)	III (n=30)			
ОНІ-S, бали	0,21±0,05	3,88±0,23	4,02±0,28	<0,001	<0,05	<0,001
PMA, бали	0,36±0,07	1,83±0,17	2,51±0,22	<0,001	<0,05	<0,001
SPITN, бали	0,06±0,01	2,10±0,16	3,60±0,25	<0,001	<0,001	<0,001
BMD, HU	1480,0 ±60,0	1380,2 ±57,0	1223,7 ±45,6	>0,05	<0,05	<0,001

Примітка. Достовірної різниці між показниками чоловіків та жінок не встановлено ( $p > 0,05$ ).

Навпаки, дослідні, що були включені до II та III (основних) груп мали виразну клініку запального процесу в яснах, що проявлялася болісними відчуттями, кровоточивістю, почервонінням, набряклістю, порушенням зубоясенного прикріплення. У хворих цих груп спостерігався низький рівень гігієни порожнини

рота (рис. 3.1). Про прогресування патологічного процесу в періодонті та кістковій тканині свідчила патологічна рухомість зубів, формування патологічних пародонтальних кишень, наявність в них ексудату.



Рис. 3.1. Стан тканин пародонта у хворі Н., 45 років, що була включена до I основної групи дослідження

При цьому головною диференційною ознакою між хронічним катаральним гінгівітом та генералізованим пародонтитом, хронічного перебігу, вважали руйнування міжзубних перегородок та наявність змін у структурі кісткової тканини за даними ортопантомографії та комп'ютерної томографії (рис. 3.2).

Характеристика дослідних груп за індексною оцінкою стану пародонта, що об'єктивно описує клінічний статус хворих, представлена в табл. 3.1.

Як видно з рис. 3.3, хворі II та III груп мали достовірні відмінності в значеннях індексів гігієни ротової порожнини, а також індексів РМА та СРІТН порівняно з I групою.



Рис. 3.2. Ортопантомограма хворої М., 43 років, що була включена до II основної групи дослідження

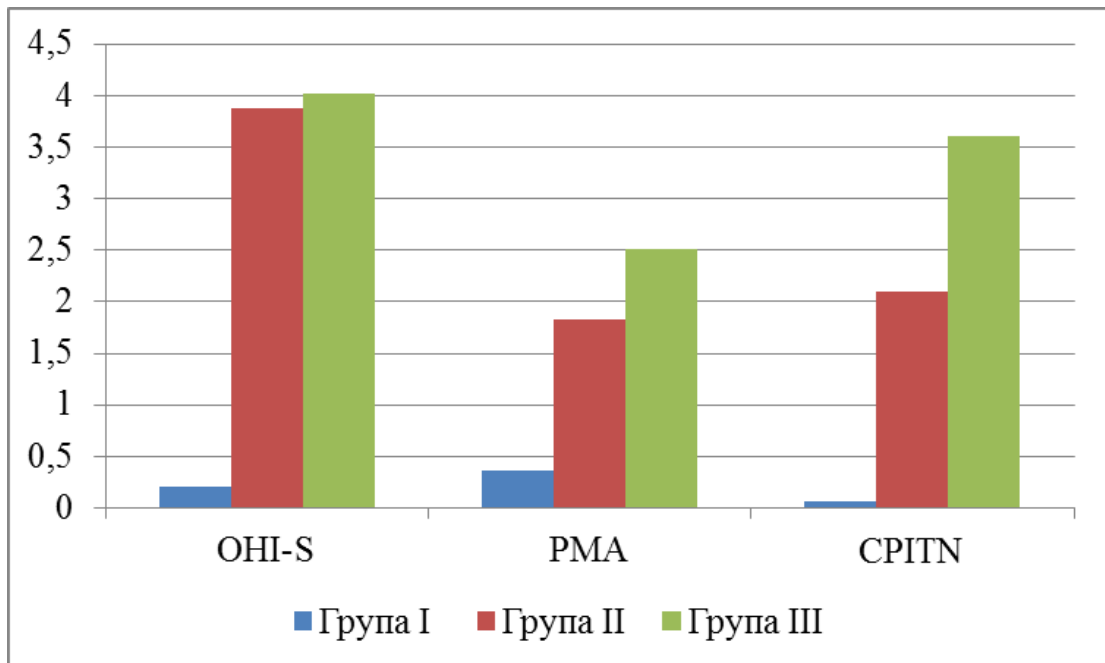


Рис. 3.3. Порівняльна індексна оцінка гігієни порожнини рота та стану тканин пародонта дослідних груп (бали,  $p < 0,05$ )

Середні показники глибини пародонтальних кишень коливалися від  $3,10 \pm 0,08$  мм у II групі до  $5,90 \pm 0,12$  мм – у III групі.

До того ж у цього контингенту дослідних спостерігали зниження мінеральної щільності кісткової тканини щелеп за даними комп'ютерної томографії, особливо виражене при генералізованому пародонтиті I-II ступеня тяжкості, де середні значення показника BMD склали  $1223,7 \pm 45,6$  HU проти  $1480,0 \pm 60,0$  HU здорових осіб (рис. 3.4,  $p < 0,001$ ).

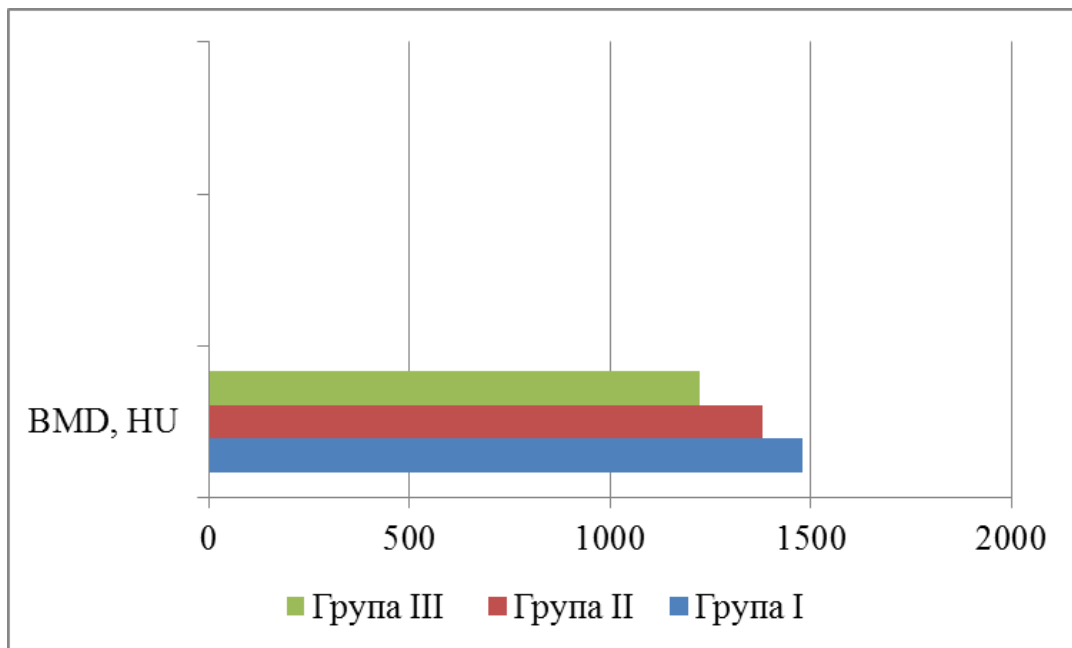


Рис. 3.4. Порівняльна оцінка показників мінеральної щільності кісткової тканини в дослідних групах за даними комп'ютерної томографії (BMD, HU)

Після постановки кінцевого діагнозу проводилося біохімічне дослідження ротової рідини. У рамках представленої роботи вивчено 90 зразків ротової рідини на предмет вмісту ММП, маркерів запалення та кісткового метаболізму.

Отримані результати біохімічного аналізу на вміст ММП та TIMP-1 у ротовій рідині приведені в табл. 3.2.

При розвитку запально-деструктивного процесу в тканинах пародонта цілком очікуваним є зростання рівня ММП, як ферментів катаболізму міжклітинної речовини, спричинене збільшенням деградації ясенних тканин, зокрема базальної

пластинки епітелію, а також екстрацелюлярного матриксу власної пластинки слизової оболонки [43].

Таблиця 3.2

**Рівень ММП та TIMP-1 у ротовій рідині в дослідних різних груп, нг/мл (M±m)**

Показник	Група			p I-II	p II-III	p I-III
	I (n=30)	II (n=30)	III (n=30)			
ММП-2	0,68±0,21	2,75±0,87	3,07±0,95	<0,05	>0,05	<0,05
ММП-3	0,32±0,07	1,31±0,41	1,34±0,45	<0,05	>0,05	<0,05
ММП-8	110,0±35,2	324,3±75,1	377,8±80,0	<0,05	>0,05	<0,001
ММП-9	69,0±25,3	173,7±42,0	210,8±53,4	<0,05	>0,05	<0,05
ММП-13	0,18±0,06	0,23±0,08	0,22±0,08	>0,05	>0,05	>0,05
TIMP-1	218,0±60,4	177,2±55,0	162,0±53,0	>0,05	>0,05	>0,05

**Примітка.** Достовірної різниці між показниками чоловіків та жінок не встановлено ( $p > 0,05$ ).

ММП-2 секретується фібробластами, остеобластами та одонтобластами у вигляді проферменту. Проте на відміну від інших ММП, які активуються цитокінами та протеїназами, у тому числі ММП дружнього типу, експресія цього ферменту відбувається конституційним шляхом, зокрема вона збільшується під дією пародонтопатогену *Treponema denticola* [61, 192].

Відомо, що рівень ММП-2 в ясенній рідині зростає в підлітків з пародонтитом [269], проте досліджень вмісту ММП-2 в ротовій рідині хворих із патологією пародонта в доступній нам літературі ми не знайшли.

В свою чергу, згідно результатів наших досліджень, приведених в табл. 3.2, вміст ММП-2 достовірно зростав при появі запальних явищ у пародонті в хворих на гінгівіт (2,75±0,87 нг/мл проти 0,68±0,21 нг/мл здорових осіб,  $p < 0,05$ ). Але з розвитком запального процесу в деструктивний вміст даного ферменту в ротовій рідині залишається практично на тому ж рівні ( $p > 0,05$ ). Подібну динаміку можна пояснити механізмом активації проферменту, який за даними літератури пов'язаний

з мікробним фактором [61, 192], інтенсивність якого не змінюється при прогресуванні захворювання).

Аналогічні зміни спостерігались і для вмісту ММП-3 в ротовій рідині (див. табл. 3.2). Цей показник достовірно збільшувався на початкових стадіях процесу в хворих II групи порівняно з I групою ( $1,31 \pm 0,41$  нг/мл проти  $0,32 \pm 0,07$  нг/мл здорових осіб,  $p < 0,05$ ). Але практично не відрізнявся в хворих II та III групи ( $1,31 \pm 0,41$  нг/мл та  $1,34 \pm 0,45$  нг/мл відповідно,  $p > 0,05$ ).

Для пояснення змін рівня ММП-3 в ротовій рідині при захворюваннях пародонта слід згадати, що ця протеаза синтезується переважно фібробластами ясен та не характерна для нейтрофілів [251]. Отже, при залученні в запальний процес слизової та періодонтальної зв'язки очікуваним є зростання рівня ММП-3 в ротовій рідині, що не пов'язано з ініціацією деструкції кісткової тканини при прогресуванні захворювання.

Зауважимо, що також як і ММП-2, ММП-3 може бути використаний для ранньої діагностики пародонтиту, але рівень цього ферменту не корелює з тяжкістю захворювання. Утім це протирічить даним, приведеним у [43], згідно яких така кореляція існує. Дану відмінність показників можна пояснити різними середовищами, які досліджувалися. Ймовірно, в рідині зубоясенної кишені зростання ММП-3 при прогресуванні пародонтиту має більшу прогностичну цінність.

Найбільш показовим щодо перебігу патологічного процесу в тканинах пародонта, очікувано, виявився рівень ММП-8 у ротовій рідині (див. табл. 3.2).

ММП-8 (нейтрофільна колагеназа або колагеназа-2) міститься переважно в специфічних гранулах поліморфно-ядерних лейкоцитів у вигляді неактивного проферменту, однак синтезується і епітеліоцитами, фібробластами, моноцитами, макрофагами, плазмоцитами. ММП-8 – ключовий фермент, що починає руйнування екстрацелюлярного матриксу, при запальних процесах [16, 189]. ММП-8 вважається найбільш значимою для ранньої діагностики захворювання [39], а також відіграє значну роль у подальшій деструкції альвеолярної кістки, тому що активна до кісткового колагену I типу [99]. Зростання рівня ММП-8 у ротовій та в ясенній

рідинах є підтвердженим діагностичним маркером запально-деструктивного процесу в тканинах пародонта, що показано нами в огляді літератури (див. підрозділ 1.2).

Проте під сумнівом залишається показовість цього ферменту щодо ступеня тяжкості захворювання. Так, у роботі [127] зазначається, що ММП-8 є маркером пародонтиту, який є показовим щодо руйнування альвеолярної кістки. Навпаки, згідно результатів дослідження [75] зв'язок даного біохімічного маркера зі ступенем тяжкості пародонтиту відсутній.

Отже, за результатами наших спостережень, як показано в табл. 3.2, показник ММП-8 у ротовій рідині достовірно збільшувався від показників I групи в хворих II групи ( $p < 0,05$ ), набуваючи значних відмінностей в хворих III групи ( $p < 0,001$ ). Рівень ММП-8 у ротовій рідині хворих з початковими стадіями пародонтиту перевищував майже в три рази значення осіб зі здоровим пародонтом ( $p < 0,001$ ). Однак, достовірної різниці між показниками II та III групи не встановлено ( $324,3 \pm 75,1$  нг/мл проти  $377,8 \pm 80,0$  нг/мл,  $p > 0,05$ ), що не дозволяє використовувати вміст ММП-8 для характеристики тяжкості генералізованого пародонтита та в прогностичних цілях.

Головним джерелом ММП-9 у ротовій рідині слід вважати поліморфноядерні лейкоцити та макрофаги, тоді як фібробласти в екскреції цієї протеази участі не приймають. ММП-9 активується IL-1 $\beta$  та TNF- $\alpha$  та нарівно з ММП-8 вважається провідним біомаркером при пародонтиті [234].

За даними, приведеними в роботі [43], при пародонтиті ММП-9 в ясенній рідині виявляється у 98 % спостережень, тоді як при гінгівіті – в 11 %. Подібні результати дозволяють припустити прогностичну значущість цього маркера в ротовій рідині, тобто показовість щодо тяжкості захворювання.

Показники вмісту ММП-9 у ротовій рідині, отримані в нашому дослідженні, в різних дослідних групах, представлені в табл. 3.2. Рівень ММП-9 у II групі зростає більше ніж у два рази від значень I групи ( $173,7 \pm 42,0$  нг/мл проти  $69,0 \pm 25,3$  нг/мл,  $p < 0,05$ ). У III групі цей показник перебільшує значення I групи в три рази ( $210,8 \pm 53,4$  нг/мл проти  $69,0 \pm 25,3$  нг/мл,  $p < 0,05$ ). Отже, подібні достовірні відмінності свідчать про значне діагностичне значення вмісту ММП-9 у ротовій рідині як при



пародонтиті, так і при гінгівіті. Отримані нами результати співпадають з даними дослідження [161], згідно яких діагностична ефективність цього біомаркера висока та складає 0,86 ( $p < 0,05$ ).

Утім відсутність достовірної різниці між показниками II та III груп ( $p > 0,05$ ) не дозволяє використовувати цей маркер як показник прогресування запального процесу в деструктивний.

Нарешті, доцільність вивчення ММП-13 у ротовій рідині визначена нами за даними попередніх досліджень, згідно яких цей фермент є показовим щодо діагностики захворювань пародонта [189], більш того він відіграє певну роль в активації резорбції кісткової тканини [121].

Однак, згідно наших спостережень, показник концентрації ММП-13 у ротовій рідині взагалі виявився непоказовим щодо стану навколозубних тканин. Він практично не змінювався внаслідок прогресування захворювання ( $p > 0,05$ ) (див. табл. 3.2). Отримані нами дані відрізнялися від результатів дослідження [12], згідно яких більший вміст ММП-13 у ротовій рідині супроводжував більшу втрату висоти прикріплення періодонтальної зв'язки.

Таким чином, при порівнянні даних, отриманих для різних дослідних груп (див. табл. 3.2), встановлено, що вміст ММП збільшувався з виникненням запального процесу в тканинах пародонта порівняно зі здоровими. Проте, слід зауважити, що зі зростанням ступеня тяжкості захворювання достовірного збільшення показників ММП не спостерігалось ( $p > 0,05$ ).

У відповідь на зростання інтенсивності протеолізу тканин, зокрема пародонтального комплексу, викликаного збільшенням екскреції ММП, в організмі існує механізм виділення клітинами стромы тканинних інгібіторів металопротеїназ ТІМР [45]. Таким чином, розглядати активність процесів протеолізу тільки за показниками активності ММП не доцільно, тому що до патологічного руйнування позаклітинного матриксу при пародонтиті призводить лише дисбаланс між ММП та ТІМР [82, 241].

В нашому дослідженні для показника ТІМР-1 у ротовій рідині, результати вивчення якого приведені в табл. 3.2, встановлена тенденція до зменшення при

погіршанні перебігу генералізованого пародонтиту, проте достовірних відмінностей для дослідних груп не виявлено ( $p > 0,05$ ).

Якщо в здорових осіб показник вмісту TIMP-1 у ротовій рідині складав  $218,0 \pm 60,4$  нг/мл, то в хворих із гінгівітом він дорівнював  $177,2 \pm 55,0$  нг/мл, а при прогресуванні патологічного процесу в кісткову тканину при пародонтиті –  $162,0 \pm 53,0$  нг/мл.

Зіставляючи отримані дані з результатами попередників, зауважимо, що в роботі [204] вміст TIMP разом з вмістом MMP-8 у ротовій рідині виявився показовим щодо перебігу запального процесу в яснах.

Отриманий нами результат пояснюється даними здійсненого мета-аналізу [203], в якому зазначається про суперечливість діагностичної значимості TIMP-1 у ротовій рідині в хворих на пародонтит.

В свою чергу, згідно спостережень [71] доцільним є вивчення не тільки показника вмісту TIMP-1 у ротовій рідині, але в співвідношенні до рівня MMP, зокрема MMP-8 та MMP-9. Тут слід зазначити, що TIMP-1 не має специфічності до певної MMP, хоча в публікації [45] зазначається про перевагу цього інгібітору до MMP-9.

За результатами наших розрахунків, наданих у табл. 3.3, зміни співвідношень MMP-2/TIMP-1, MMP-3/TIMP-1, MMP-13/ TIMP-1 виявилися непоказовими щодо розвитку запально-деструктивного процесу в тканинах пародонта. Тоді як для показників MMP-8/TIMP-1 та MMP-9/TIMP-1 виявлена достовірна різниця між значеннями здорових та хворих на гінгівіт та пародонтит (рис. 3.5).

Втім, як видно з табл. 3.3, зазначені співвідношення для хворих I та II групи достовірно не різнилися, що не дозволяє однозначно застосовувати показники співвідношень MMP/TIMP-1 для залучення в патологічний процес кісткової тканини пародонтального комплексу.

Таблиця 3.3

**Співвідношення ММП та TIMP-1 у ротовій рідині  
в дослідних різних груп (M±m)**

Показник	Група			p I-II	p II-III	p I-III
	I (n=30)	II (n=30)	III (n=30)			
ММП-2/ TIMP-1	0,0015 ±0,0005	0,0045 ±0,0015	0,0057 ±0,0021	>0,05	>0,05	>0,05
ММП-3/ TIMP-1	0,0008 ±0,0003	0,0021 ±0,0007	0,0032 ±0,0012	>0,05	>0,05	>0,05
ММП-8/ TIMP-1	0,46±0,14	1,73±0,48	2,21±0,55	<0,05	>0,05	<0,05
ММП-9/ TIMP-1	0,32±0,10	1,32±0,37	1,80±0,51	<0,05	>0,05	<0,05
ММП-13/ TIMP-1	0,0006 ±0,0002	0,0005 ±0,0001	0,0005 ±0,0001	>0,05	>0,05	>0,05

**Примітка.** Достовірної різниці між показниками чоловіків та жінок не встановлено (p > 0,05).

ММП мають декілька перехресть з цитокіновою системою. З одного боку, прозапальні цитокіни можуть регулювати експресію ММП. Активація клітин цитокінами призводить до підвищення утворення ММП з неактивних проферментів. З іншого боку, цитокіни та їх рецептори можуть бути субстратами для дії ММП. Прозапальний цитокін IL-1 $\beta$  може бути зруйнований та інактивований ММП-1, ММП-2, ММП-3 та ММП-9. Тоді як IL-6 звільнюється з мембрани клітин під дією ММП [45]. В свою чергу, IL-4 є протизапальним цитокіном, який здатний пригнічувати синтез прозапальних цитокінів при пародонтиті [81].

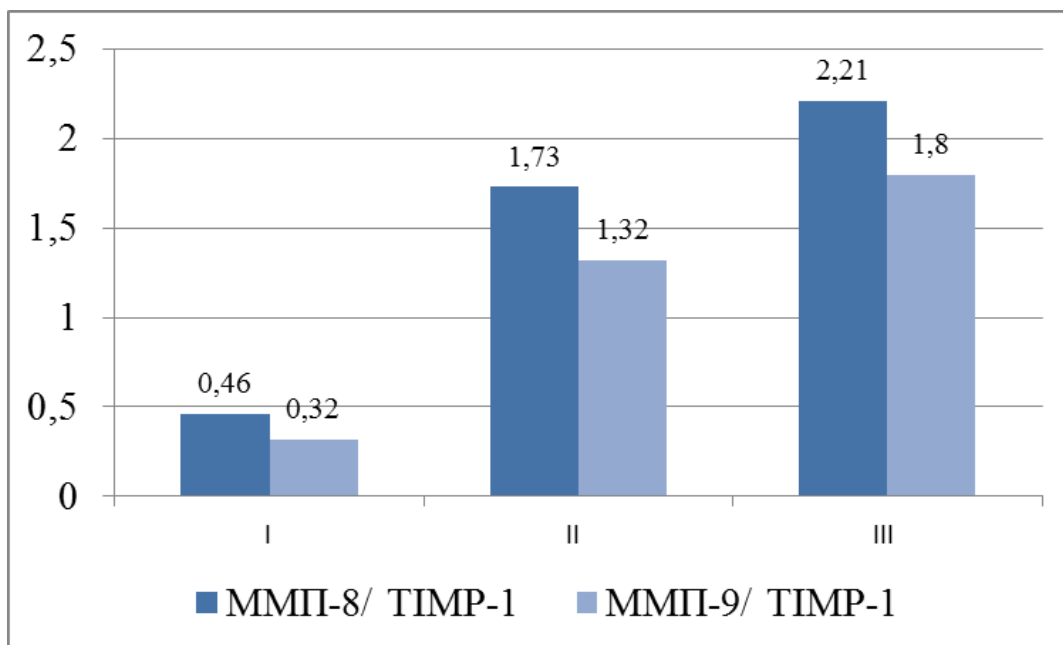


Рис. 3.5. Співвідношення ММП-8/ TIMP-1 та ММП-9/ TIMP-1 для дослідних I, II та III груп ( $p < 0,05$ )

Результати дослідження вмісту цитокінів у ротовій рідині в дослідних різних груп представлені в табл. 3.4.

Таблиця 3.4

**Вміст цитокінів у ротовій рідині в дослідних різних груп, пг/мл ( $M \pm m$ )**

Показник	Група			p I-II	p II-III	p I-III
	I (n=30)	II (n=30)	III (n=30)			
IL-1 $\beta$	71,4 $\pm$ 13,1	218,0 $\pm$ 34,5	334,2 $\pm$ 48,6	<0,001	<0,05	<0,001
IL-6	17,1 $\pm$ 3,0	39,2 $\pm$ 8,3	56,4 $\pm$ 11,4	<0,05	<0,05	<0,001
IL-4	3,55 $\pm$ 0,22	2,72 $\pm$ 0,18	1,58 $\pm$ 0,15	<0,05	<0,05	<0,001

**Примітка.** Достовірної різниці між показниками чоловіків та жінок не встановлено ( $p > 0,05$ ).

З появою запального процесу в тканинах пародонта в хворих II та III групи очікуваним у них було зростання рівня прозапальних інтерлейкінів IL-1 $\beta$  та IL-6 на тлі зменшення значень показників протизапального IL-4 в ротовій рідині в порівнянні зі здоровими особами I групи ( $p < 0,001$ ).

Відмінності між показниками вмісту інтерлейкінів у ротовій рідині в здорових осіб та хворих із хронічним гінгівітом та початковим ступенем пародонтиту, а також пацієнтів із пародонтитом I-II ступеня представлені на рис. 3.6.

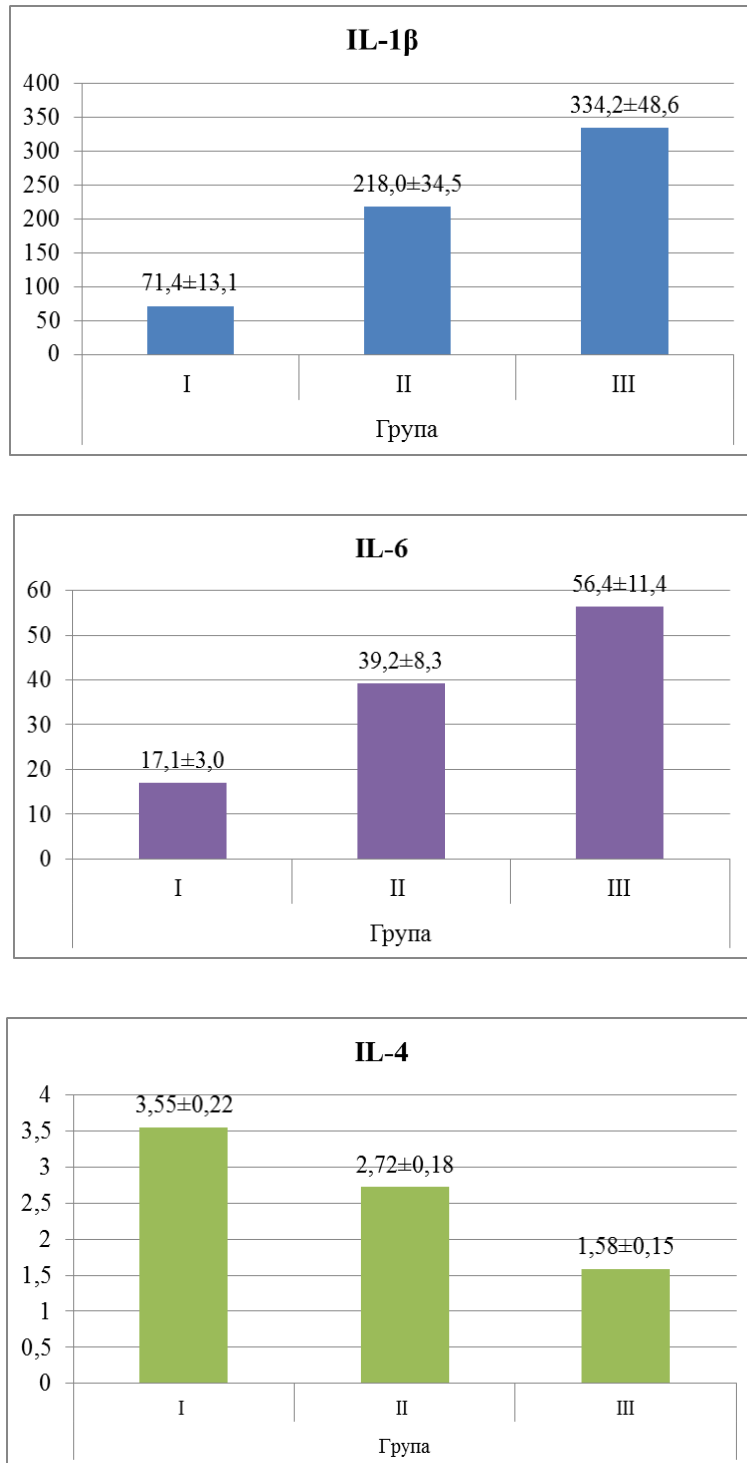


Рис. 3.6. Відмінності між показниками вмісту інтерлейкінів у ротовій рідині в дослідних різних груп, пг/мл ( $M \pm m$ )

Як добре видно з рисунка, при прогресуванні запально деструктивного процесу в тканинах пародонта спостерігається відповідне зростання прозапальних маркерів IL-1 $\beta$  та IL-6 та зниження рівня протизапального IL-4.

Отриманий нами результат вивчення обраних інтерлейкінів повністю відповідає даним, приведеним в огляді цитокінової системи, яка пов'язана із відповіддю «хазяїна» при пародонтиті [213], згідно яких динаміка прозапальних IL-1 $\beta$  та IL-6 та протизапального IL-4 є вельми показовою для діагностики пародонтиту, а також при визначенні ефективності лікування, що здійснюється.

Також, на відміну від вмісту ММП у ротовій рідині, для даних показників спостерігалось достовірне зростання при погіршанні перебігу патологічного процесу в хворих із I-II ступенем тяжкості захворювання порівняно з хворими на хронічний гінгівіт ( $p < 0,05$ ). Це відповідає даним [113], згідно яких рівень IL-1 $\beta$  в ясенній рідині відповідає тяжкості пародонтиту.

Проте метою представленого дисертаційного дослідження було вивчення взаємозв'язків між групами біомаркерів у ротовій рідині в залежності від ступеня тяжкості патологічного процесу в тканинах пародонта. Звідси, окрім ММП та медіаторів запалення, до яких належать інтерлейкіни, нами вивчено вміст маркерів кісткового метаболізму в ротовій рідині. В цьому аспекті слід вказати на роботи попередників, за результатами яких доведено, що IL-6 приймає участь у кістковому гомеостазі: він регулює RANKL остеобластів, що призводить до диференціації остеокластів та кісткової резорбції [282]. Відповідно IL-4 здатний пригнічувати остекластогенез при пародонтиті [130]. Тобто кореляції між медіаторами запалення та маркерами кісткового гомеостазу є очікуваними.

Підвищення запальних маркерів у біологічних рідинах не завжди ілюструє характер деструкції кісткової тканини пародонта, що викликає потребу застосування специфічних маркерів кісткового метаболізму, які найбільш показово ілюструють прогресування запального процесу з ясен у резорбцію альвеолярної кістки [64].

Так, тартратрезистентна кисла фосфатаза (TRAP) виділяється з лізосом клітин, що розсмоктують кістку, таких як остеокласти та певні субпопуляції макрофагів/моноцитів та дендритних клітин [64]. Навпаки, кісткова лужна

фосфатаза (ВАР) та остеокальцин (О), який характеризує активність утворення кісткової тканини, колагену І типу та регулює активність остеобластів, є маркерами кісткового ремоделювання за рахунок їх здатності активувати остецити та підвищувати ремінералізацію. Баланс зазначених біомаркерів дозволяє повною мірою охарактеризувати метаболізм кісткової тканини пародонта [7, 10].

На наш погляд, зіставлення рівня ММП та TIMP-1 у ротовій рідині на різних стадіях розвитку захворювання з вмістом про- та протизапальних інтерлейкінів та маркерами кісткової резорбції та формування, сприятиме з'ясуванню їх ролі в патогенезі захворювання та може бути використане для розробки заходів ранньої діагностики та патогенетичної превентивної терапії генералізованого пародонтита.

Насамперед, проаналізуємо маркери кісткового метаболізму в хворих дослідних груп, результати вивчення яких представлені в табл. 3.5.

Вміст TRAP достовірно збільшувався в ротовій рідині дослідних III групи порівняно зі здоровими ( $25,7 \pm 0,8$  од/л проти  $19,3 \pm 0,6$  од/л,  $p < 0,001$ ). Окрім того, значення хворих II та III груп дослідження теж суттєво різнилися ( $p < 0,001$ ). Проте достовірних відмінностей між значеннями I та II дослідних груп не встановлено ( $19,3 \pm 0,6$  од/л проти  $20,1 \pm 0,7$  од/л,  $p > 0,05$ ).

Для вмісту ВАР зареєстроване достовірне зменшення значень у III групі порівняно з I ( $42,3 \pm 0,8$  од/л проти  $54,8 \pm 1,2$  од/л,  $p < 0,001$ ). Така ж достовірна відмінність розрахована і для значень II та III дослідних груп ( $53,7 \pm 1,0$  од/л проти  $42,3 \pm 0,8$  од/л,  $p < 0,001$ ). Тоді як значення цього показника для I та II груп практично не відрізнялися ( $54,8 \pm 1,26$  од/л проти  $53,7 \pm 1,0$  од/л,  $p > 0,05$ ).

Подібну динаміку зниження показників остеогенезу відповідно до прогресування патологічного процесу в пародонті продемонстрував і вміст остеокальцину в ротовій рідині. Цей показник мав подібні значення для I та II груп ( $2,4 \pm 0,5$  нг/мл проти  $2,0 \pm 0,3$  нг/мл,  $p > 0,05$ ) та різко зменшувався в хворих III групи ( $1,2 \pm 0,2$  нг/мл,  $p < 0,05$ ).

Таблиця 3.5

**Маркери кісткового метаболізму в ротовій рідині  
в дослідних різних груп (M±m)**

Показник	Група			p I-II	p II-III	p I-III
	I (n=30)	II (n=30)	III (n=30)			
Тартратрезистентна кисла фосфатаза (TRAP), од/л	19,3±0,6	20,1±0,7	25,7±0,8	>0,05	<0,001	<0,001
Кісткова лужна фосфатаза (BAP), од/л	54,8±1,2	53,7±1,0	42,3±0,8	>0,05	<0,001	<0,001
Остеокальцин (O), нг/мл	2,4±0,5	2,0±0,3	1,2±0,2	>0,05	<0,05	<0,05

**Примітка.** Достовірної різниці між показниками чоловіків та жінок не встановлено ( $p > 0,05$ ).

Таким чином, згідно отриманих нами результатів вивчення маркерів кісткового метаболізму в ротовій рідині, представлених на рис. 3.7, показовим було збереження подібності показників на початкових стадіях патологічного процесу (II група) до значень осіб зі здоровим пародонтом (I група) ( $p > 0,05$ ) та стрімке зростання рівня маркера кісткової резорбції тартратрезистентної кислоти фосфатази поряд зі зниженням показників кісткового формування (вмісту кісткової лужної фосфатази та остеокальцину) в хворих з генералізованим пародонтитом I-II ступеня тяжкості (III група) ( $p < 0,05$ ). Таким чином, згідно наших спостережень маркери кісткового метаболізму виявилися показовими лише для III групи спостереження.



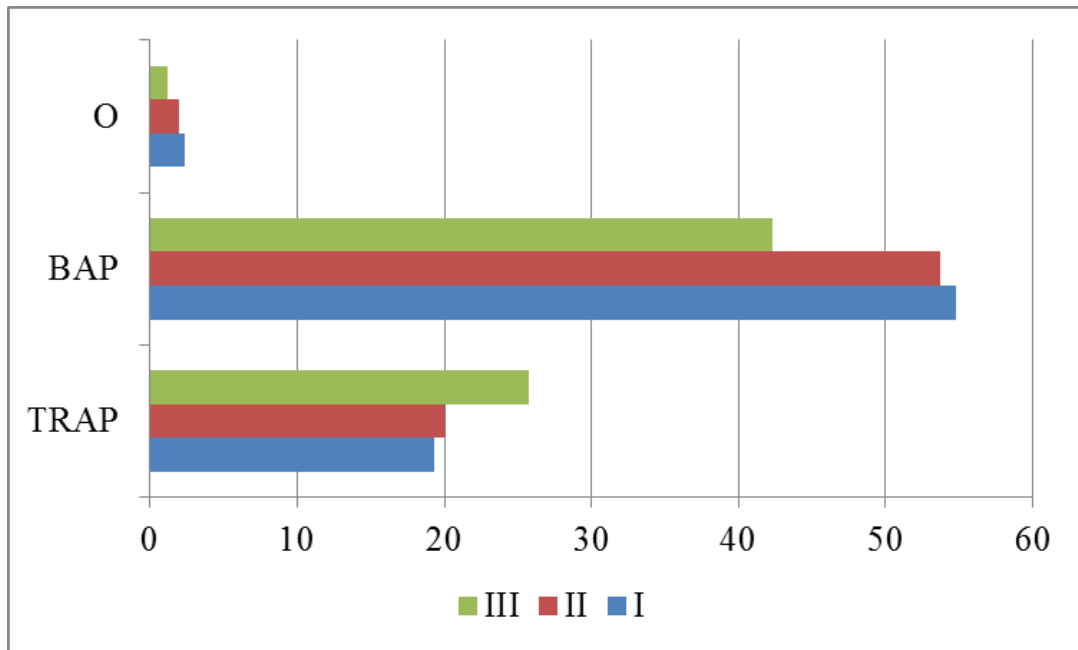


Рис. 3.7. Порівняльний аналіз вмісту маркерів кісткового метаболізму в ротовій рідині в дослідних різних груп ( $p > 0,05$ )

Подібні результати характеризують порушення гомеостазу в кістковій тканині пародонта, зокрема підвищення резорбції на тлі зменшення кісткового утворення, у хворих на генералізований пародонтит I-II ступеня, що підтверджується роботами наших попередників [99].

Наукова новизна нашої роботи полягає у зіставленні показників ММП, маркерів запалення та кісткового метаболізму в ротовій рідині хворих на генералізований пародонтит.

Проведений нами кореляційний аналіз не дозволив виявити значущих залежностей між клінічними індексами стану пародонта та вмістом ММП у ротовій рідині (табл. 3.6).

Як видно з рис. 3.8, спостерігається подібність кореляційних зв'язків між клінічними індексами та рівнем різних ММП. Найбільший за силою прямий зв'язок спостерігався для ММП-2, ММП-8, ММП-9 та ММП-13 для РМА та СРІТН. Найменші показники кореляції встановлені для всіх ММП для показника BMD та гігієнічного індексу ОНІ-S.

Таблиця 3.6

**Коефіцієнти кореляції Спірмена ( $r_s$ ) між вмістом у ротовій рідині матриксних металопротеїназ та клінічними індексами, маркерами запалення і кісткового метаболізму**

	Клінічні індекси				Цитокіни			Маркери кісткового метаболізму		
	OH-S	PMA	CRITN	BMD	IL-1	IL-6	IL-4	TRAP	ВAP	O
ММП-2	0,28	0,42	0,32	0,18	0,61	0,67	-0,62	-0,29	0,19	-0,14
ММП-3	0,26	0,41	0,31	0,20	0,57	0,68	-0,55	-0,17	0,17	-0,14
ММП-8	0,37	0,52	0,57	0,40	0,71	0,74	-0,58	-0,54	0,43	-0,33
ММП-9	0,33	0,47	0,50	0,36	0,65	0,70	-0,57	-0,48	0,42	-0,37
ММП-13	0,24	0,33	0,33	0,15	0,58	0,47	-0,52	-0,18	0,12	-0,21

**Примітка.**  $p < 0,05$  – достовірна різниця встановлена для всіх розрахованих коефіцієнтів кореляції.

Окремо для дослідних II групи вдалося виявити достовірні прямі кореляційні зв'язки між індексами PMA та CRITN із концентрацією ММП-8 ( $r_s=0,75$ ;  $p < 0,05$ ) та ММП-9 ( $r_s=0,65$ ;  $p < 0,05$ ) у ротовій рідині. На підставі цього ми дісталися висновку про діагностичне значення активності даних ММП переважно на ранніх етапах розвитку захворювання.

Кореляційний аналіз отриманих даних дозволив виявити значущі прямі кореляційні зв'язки між рівнем ММП та інтерлейкінів, що не суперечить даним [181] про пролонговану дію інтерлейкінів щодо активації продукції ММП сполучнотканинними клітинами, коли спостерігається їх достовірне збільшення у хворих на початку запально-дистрофічного процесу з подальшим уповільненням зростання значень.

Відповідно для прозапальних ІЛ-1 та ІЛ-6 кореляції були прямі, а для протизапального ІЛ-4 – зворотня.

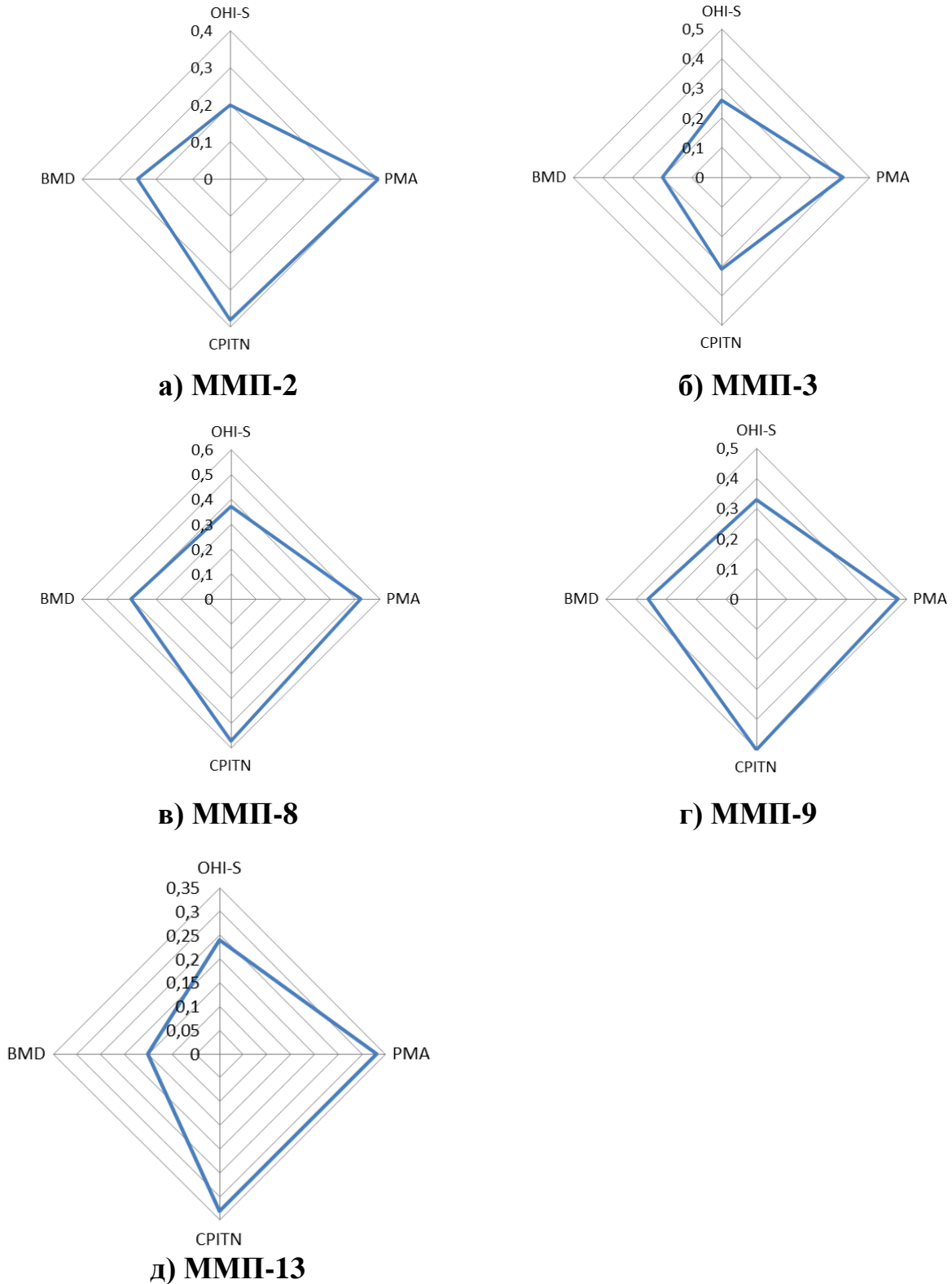


Рис. 3.8. Коефіцієнти кореляції Спірмена ( $r_s$ ) між вмістом у ротовій рідині ММП та клінічними індексами стану пародонта ( $p < 0,05$ )

З рис. 3.9 прослідковується подібність кореляційних зв'язків для всіх ММП з рівнями інтерлейкінів, що вивчалися. Більш виражені кореляції, наближені до сильних, розраховані для ММП-8 та ММП-9 та для ІЛ-1 та ІЛ-6. Менші за силою кореляційні зв'язки, наближені до середніх, зареєстровані для протизапального ІЛ-4.

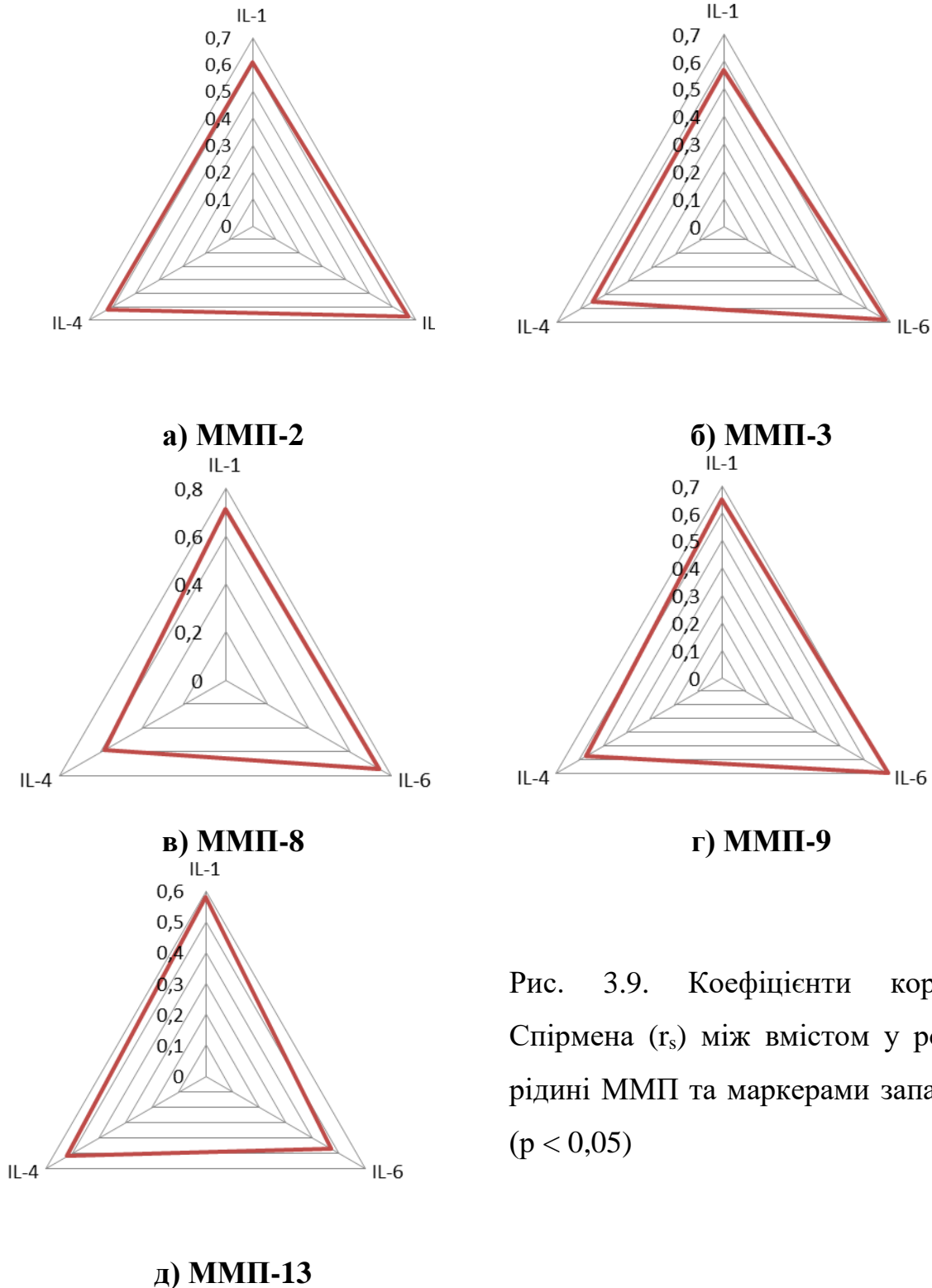


Рис. 3.9. Коефіцієнти кореляції Спірмена ( $r_s$ ) між вмістом у ротовій рідині ММП та маркерами запалення ( $p < 0,05$ )

Статистично значущих залежностей між активністю ММП та показниками кісткового метаболізму не виявлено (див. табл. 3.6).

Важливо, що для тартратрезистентної кислоти фосфатази (TRAP) кореляція була прямою, а для кісткової лужної фосфатази (BAP) та остеокальцину (O) – зворотною.

Як показано на рис. 3.10, для ММП-2, ММП-3 та ММП-13 зв'язок з маркерами кісткового метаболізму відсутній. Для ММП-8 та ММП-9 він теж незначний, який тільки наближується до середнього. Найбільша кореляція розрахована для ММП-8 та TRAP, що дорівнює лише ( $r_s=0,54$ ;  $p < 0,05$ ).

Разом з тим, приведені в табл. 3.6 дані обчислювалися для всього масиву отриманих даних для всіх дослідних груп. При диференційованому для різних груп розрахунку кореляцій у хворих III групи встановлені більш значущі, проте статистично не достовірні, прямі кореляційні зв'язки для ММП-8 та концентрації TRAP у ротовій рідині ( $r_s=0,70$ ;  $p < 0,05$ ). Останнє дозволяє нам підтвердити висновки, отримані в роботі [17], щодо причетності ММП-8 до активації процесів резорбції в альвеолярній кістці при пародонтиті.

На останнє зазначимо, що для III групи значущі прямі кореляційні зв'язки розраховано між комплексним пародонтальним індексом CPITN і та мінеральною щільністю кісткової тканини (BMD) та концентрацією TRAP у ротовій рідині ( $r_s=0,71$ ;  $p < 0,05$ ).

Отже, підсумовуючи результати біохімічних досліджень, ми дісталися наступних висновків.

По-перше, розвиток запально-деструктивного процесу в тканинах пародонта характеризується зростанням у ротовій рідині рівнів матриксних металопротеїназ та прозапальних цитокінів IL-1 $\beta$  та IL-6, а також зменшенням концентрації TIMP-1 та протизапального інтерлейкіну IL-4. При цьому вміст маркерів кісткового метаболізму достовірно не змінюється.

По-друге, прогресування запального процесу в деструктивний в хворих із I-II ступенем тяжкості пародонтиту супроводжується подальшим зростанням у ротовій рідині рівня прозапальних інтерлейкінів, а також збільшенням вмісту

тартратрезистентної кислій фосфатази на тлі зменшення кісткової лужної фосфатази та остеокальцину, тоді як достовірного зростання матричних металопротеїназ не реєструється.

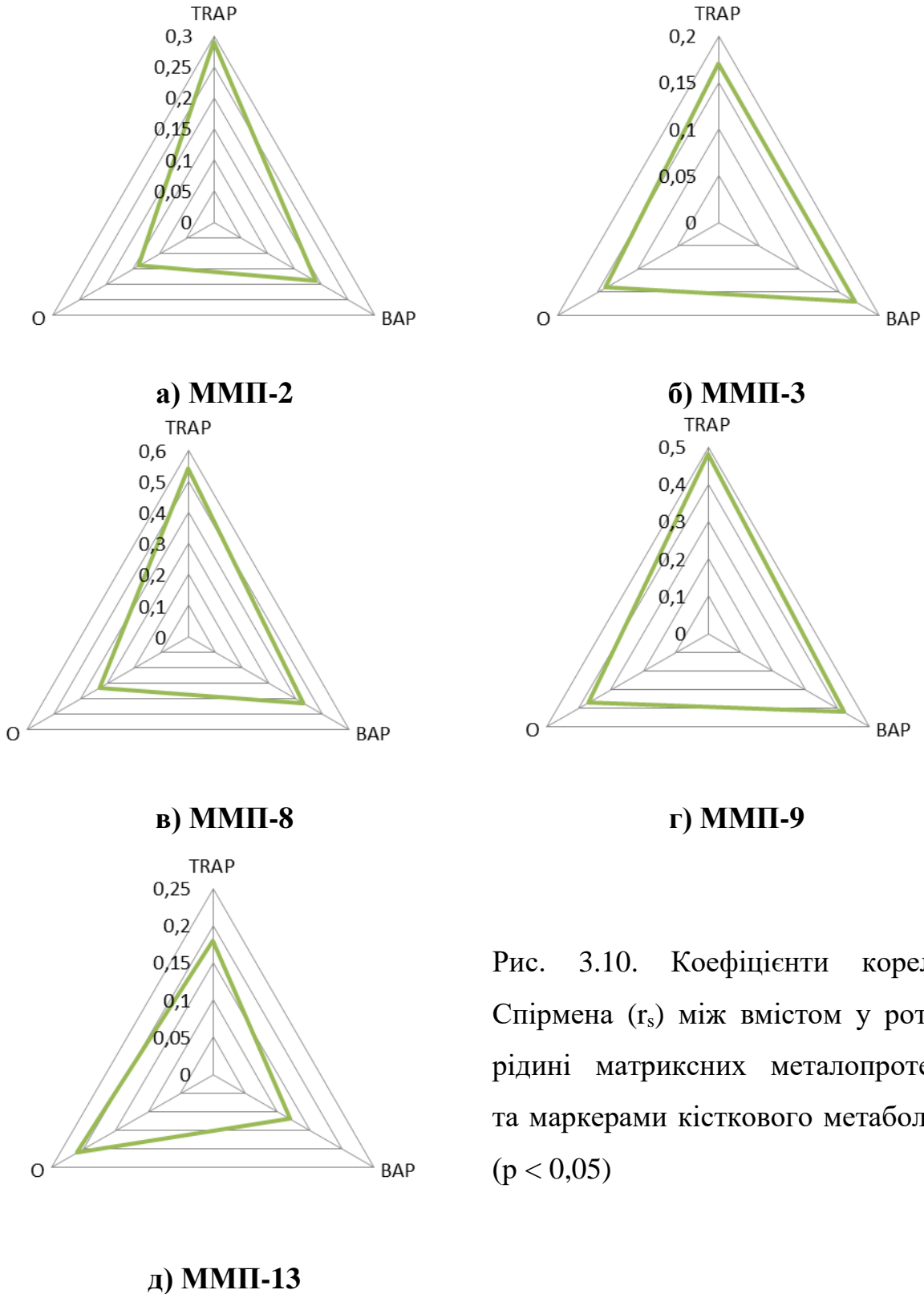


Рис. 3.10. Коефіцієнти кореляції Спірмена ( $r_s$ ) між вмістом у ротовій рідині матричних металопротеїназ та маркерами кісткового метаболізму ( $p < 0,05$ )

По-третє, вміст матриксних металопротеїназ у ротовій рідині найбільше корелює з показниками інтерлейкінів, особливо в хворих із гінгівітом та пародонтитом на початкових стадіях. Значущої кореляції з показниками клінічної індексної оцінки стану тканин пародонта та маркерами кісткового метаболізму не встановлено.

В-четвертих, рівень експресії матриксних металопротеїназ є прогностичною ознакою генералізованого пародонтиту на початкових стадіях розвитку запально-деструктивного процесу, проте не є показовим щодо тяжкості його перебігу.

По-п'яте, встановлений дисбаланс між зростанням матриксних металопротеїназ та зменшенням TIMP-1 у ротовій рідині вказує на доцільність застосування інгібіторів матриксних металопротеїназ у комплексному лікуванні захворювання на стадії гінгівіту та на початкових стадіях пародонтиту. При цьому найбільш показовими для оцінки отриманого лікувального результату слід вважати вміст MMP-8 та MMP-9 у ротовій рідині.

В-шостих, отримані результати біохімічного дослідження дозволяють проведення клінічної апробації препаратів-інгібіторів матриксних металопротеїназ у комплексному лікуванні захворювання.

В-сьомих, порівняльний аналіз отриманих результатів дослідження біомаркерів у ротовій рідині хворих на генералізований пародонтит та гінгівіт з результатами аналогічних спостережень попередників свідчить про значні розбіжності в отриманих значеннях. Це, напевно, обумовлено особливостями забору ротової рідини, методологією проведення досліджень, контингентом обстежених хворих.

Встановлена закономірність унеможлиблює визначення певних абсолютних значень показників в якості норми. Проте це не виключає доцільність вивчення їх комплексної динаміки в конкретного хворого, що має безсумнівне практичне значення щодо діагностики, прогресування та визначення ефективності лікування, та було використано нами в подальшій клінічній апробації.

Результати досліджень, приведених у даному розділі, представлені в роботі [20, 32].

## РОЗДІЛ 4

### РЕЗУЛЬТАТИ ІМУНОГІСТОХІМІЧНОГО ДОСЛІДЖЕННЯ БІОПТАТІВ ЯСЕН

Згідно отриманих результатів біохімічного дослідження, приведених у попередньому розділі, при розвитку захворювань пародонта спостерігається зростання рівнів різних ММП у ротовій рідині порівняно з показниками осіб із інтактним пародонтом. З великим ступенем ймовірності можна стверджувати, що такі зміни рівня ММП мають значення в патогенезі генералізованого пародонтиту.

Слід зазначити, що ММП, рівень яких збільшується при пародонтологічних захворюваннях, можуть бути бактеріального походження, але все ж таки головними продуцентами ММП є нейтрофіли, епітеліоцити та фібробласти власної пластинки слизової. При цьому більшість ММП мають нейтрофільне походження. Одна і та ж клітина може синтезувати різні ММП у вигляді проферменту, активація якого відбувається внаслідок відщеплення протеазами, зокрема ММП іншого типу, невеликого пептиду від N-кінця, тобто процес синтезу ММП регулюється самими ж ММП [43].

Таким чином, враховуючи первинну локалізацію ММП у міжклітинному матриксі ясен, можна припустити, що їх рівень в ротовій рідині не здатний в повній мірі відображати динаміку вмісту даних протеаз в тканинах пародонта внаслідок розвитку запально-деструктивних явищ при генералізованому пародонтиті. Отже, ми дісталися висновка, що порівняльне дослідження рівня ММП в біоптатах ясен здорових та хворих на пародонтит із використанням імуногістохімічного методу дозволить нам більш точно описати розвиток патологічного процесу.

Враховуючи переважне клітинне походження ММП-1, зокрема в ясенній рідині, де 95-97 % клітинної популяції представлено нейтрофілами [43], та можливу роль цього ферменту в розвитку запальних явищ у тканинах пародонта, ми визнали за доцільне проаналізувати її вміст у біоптатах ясен за допомогою методу



імуногістохімічного дослідження, як альтернативі біохімічному дослідженню ротової рідини.

Нами звернено увагу на ММП-1, яку називають колагеназою фібробластів, хоча вона також продукується і кератиноцитами, остеобластами, хондробластами, ендотеліальними клітинами, макрофагами та моноцитами. Профермент активується в ММП-1 під дією ММП-2 та ММП-7. Синтез ММП-1 стимулюється цитокінами, а інгібується ТІМР [16].

Клінічні дослідження підтверджують участь ММП-1 у розвитку захворювань пародонта. Так, при генералізованому пародонтиті доведено зростання рівня ММП-1 в ясенній рідині від значень здорових осіб, при цьому консервативне лікування призводило до його зниження [190]. У підлітків віком 14-18 років при генералізованому пародонтиті спостерігалось значне зростання рівня ММП-1 в ясенній рідині порівняно зі значеннями контрольної групи [269].

На рис. 4.1 показана змішана ядерно-цитоплазматична реакція з маркером ММП-1 у запальному інфільтраті та навколишніх епітеліальних клітинах (рівень експресії +2) при генералізованому пародонтиті, II ступеня, хронічного перебігу, що дозволила провести кількісну оцінку вмісту ММП у зразках ясен.

При оцінці цитоплазматичної експресії ММП-1 в епітеліальних та стромальних клітинах встановлено, що в здорових осіб у 30,0 % спостережень відзначалась її нульова градація (0), у 60,0 % – слабка (+1), у 10,0 % – помірна (+2). В основній групі випадків нульового результату не спостерігалось, слабка (+1) експресія маркера ММП-1 зареєстрована в 23,3 % хворих, помірна (+2) – у 60,0 %, висока (+3) – у 16,7 % (рис. 4.2).

Отже, експресія маркера ММП-1 продемонструвала достовірну різницю значень у залежності від клініко-морфологічних характеристик біоптату ( $p < 0,05$ ). Таким чином, збільшення активності ММП-1 відповідає розвитку запально-деструктивного процесу в тканинах пародонта.

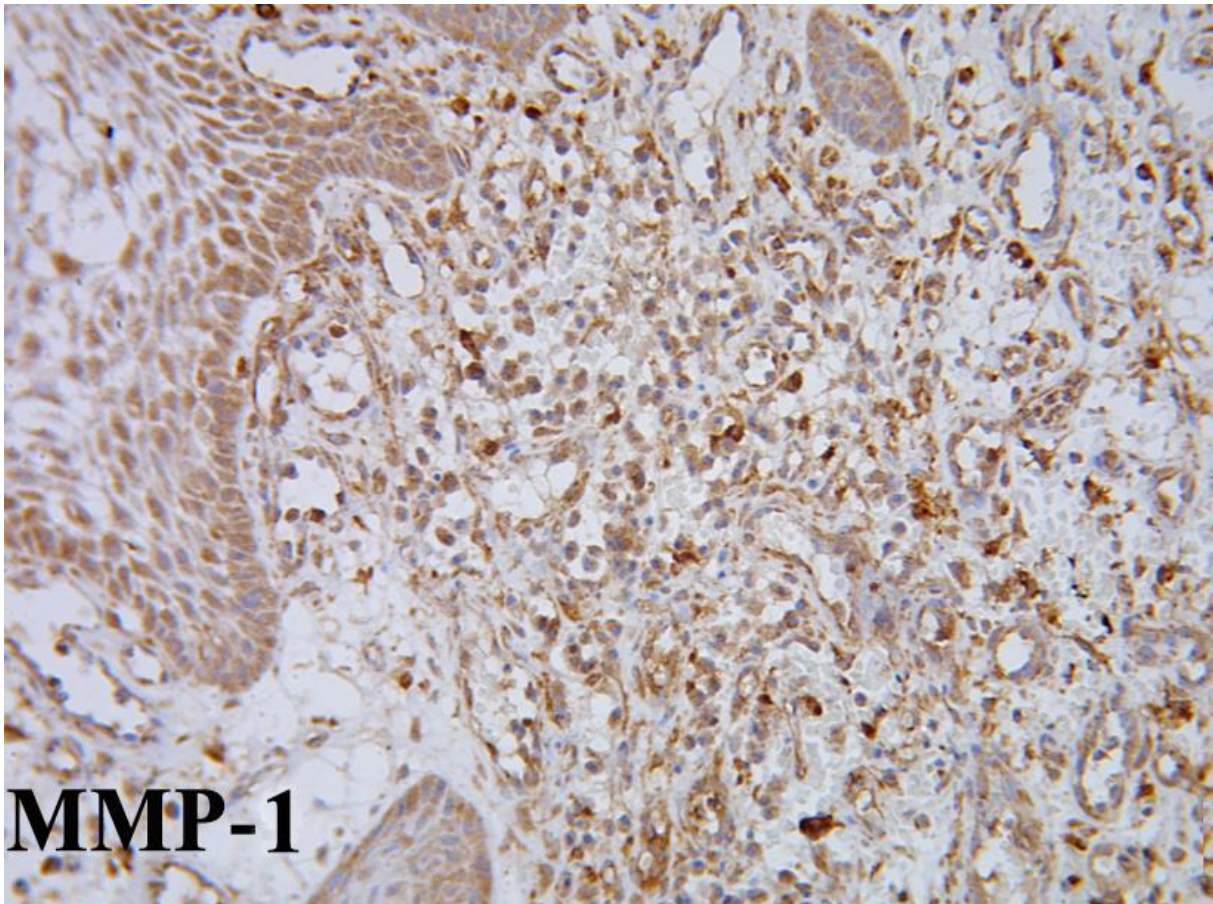


Рис. 4.1. Змішана ядерно-цитоплазматична реакція з маркером ММП-1 у запальному інфільтраті та навколишніх епітеліальних клітинах (+2) у хворого з генералізованим пародонтитом, II ступеня, хронічного перебігу. Імуногістохімічний метод, додаткове забарвлення гематоксиліном Майєра (x400)

Отримані нами результати підтверджують висновок про те, що активність ММП-1 відповідає ступеню стромальної деградації при пародонтиті [203]. Відповідно зниження імунного захисту та зростання рівня медіаторів запалення призводить до поширення запального процесу з ясен на утримуючий апарат зуба та кісткову тканину, що супроводжується дезінтеграцією колагену під дією матриксних металопротеїназ (ММП).

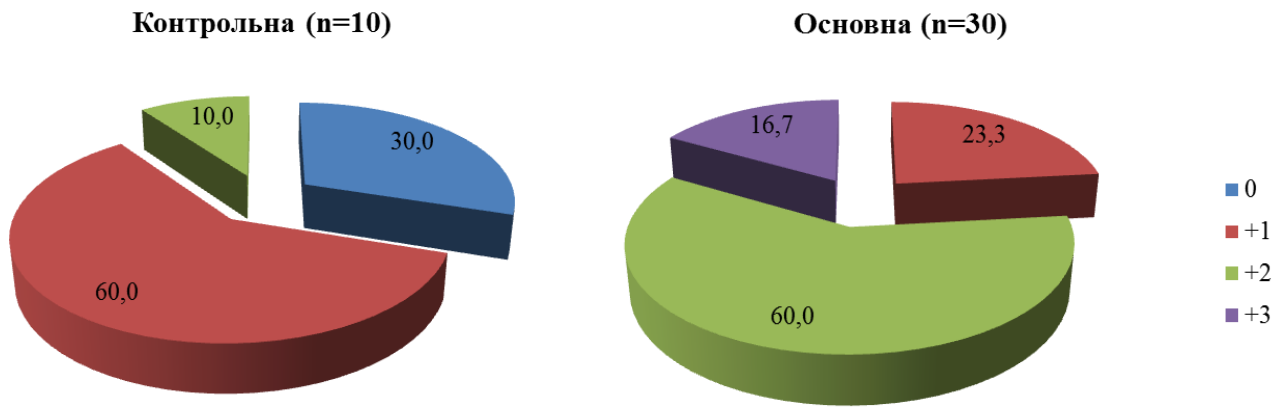


Рис. 4.2. Частка градацій для експресії маркера ММП-1 в дослідних групах (% ,  $p < 0,05$ )

В свою чергу, місцева реакція макроорганізму включає в себе нейтрофілну інфільтрацію та подальший викид медіаторів запалення та цитокінів [210]. Маркер запалення циклооксигеназа 2 (СОХ-2) приймає участь у синтезі простагландинів через перетворення арахідонової кислоти. Цей фермент завжди виділяється сполучнотканинними клітинами тільки після індукції їх цитокінами або факторами росту [66].

За результатами проведеного нами імуногістохімічного дослідження в хворих основної групи зареєстровано збільшення експресії СОХ-2 в запальному інфільтраті (рис. 4.3).

На рис. 4.4 показана частка градацій для експресії маркера СОХ-2 у здорових та хворих на генералізований пародонтит. Якщо у всіх осіб з інтактним пародонтом експресія маркера запалення СОХ-2 визначена як слабка (+1), то в хворих на пародонтит у 80,0 % випадках виявлена помірна його експресія (+2), а в 20,0 % – висока (+3).

Отже, згідно результатів порівняння даних імуногістохімічних досліджень біоптатів ясен здорових та хворих на генералізований пародонтит встановлено, що маркери запалення СОХ-2 та ММП-1 виявилися достатньо інформативними щодо перебігу запально-деструктивного процесу в тканинах пародонта ( $p < 0,05$ ).

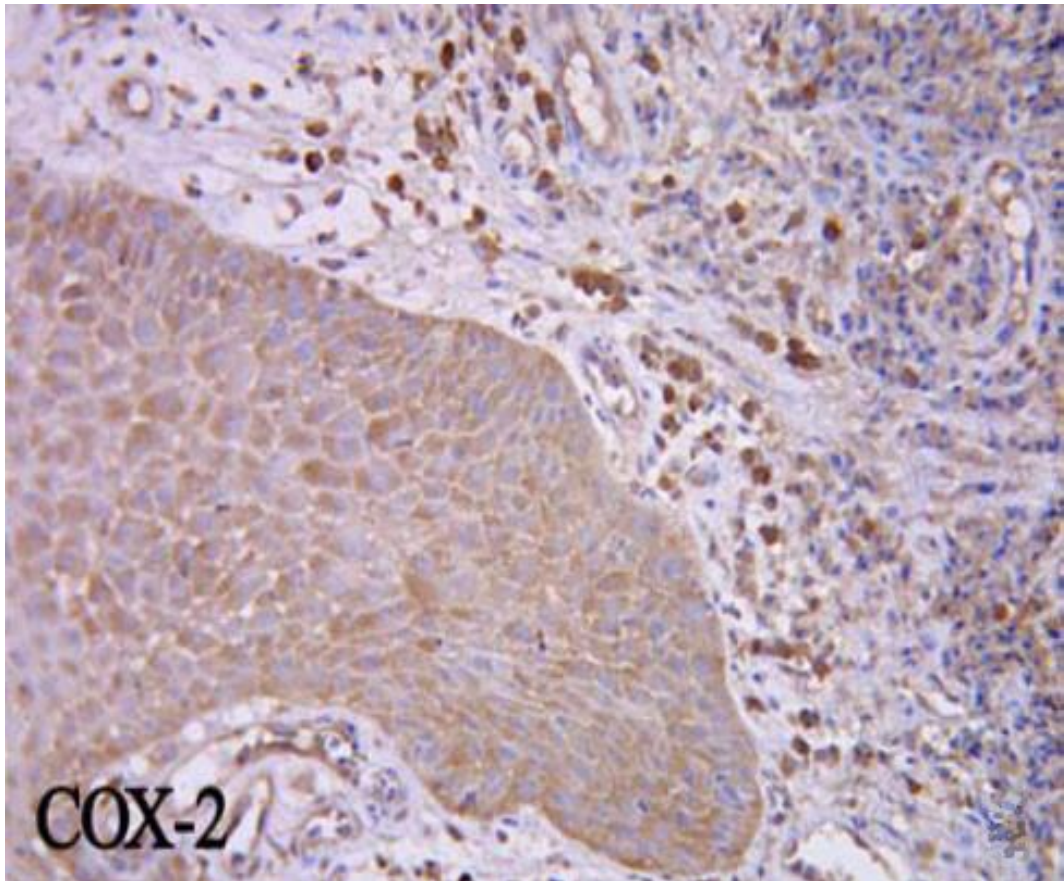


Рис. 4.3. Цитоплазматична експресія маркера COX-2 в запальному інфільтраті навколо багатошарового епітелію (+3) у хворого з генералізованим пародонтитом, II ступеня, хронічного перебігу. Імуногістохімічний метод, додаткове забарвлення гематоксилином Майєра (x400)

Надалі, розглядаючи питання патогенезу генералізованого пародонтиту, слід зауважити, що серед механізмів пошкодження тканин пародонта, ініційованих мікробним фактором, найменш вивченими та найбільш перспективними є прямі цитопатичні ефекти, зокрема апоптоз та піроптоз [181, 250, 284]. Натепер встановлено, що *Treponema denticola*, *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum* та *Actinobacillus actinomycetemcomitans* здатні стимулювати запрограмовану загибель епітеліальних та сполучнотканинних клітин пародонта [117, 191, 211].

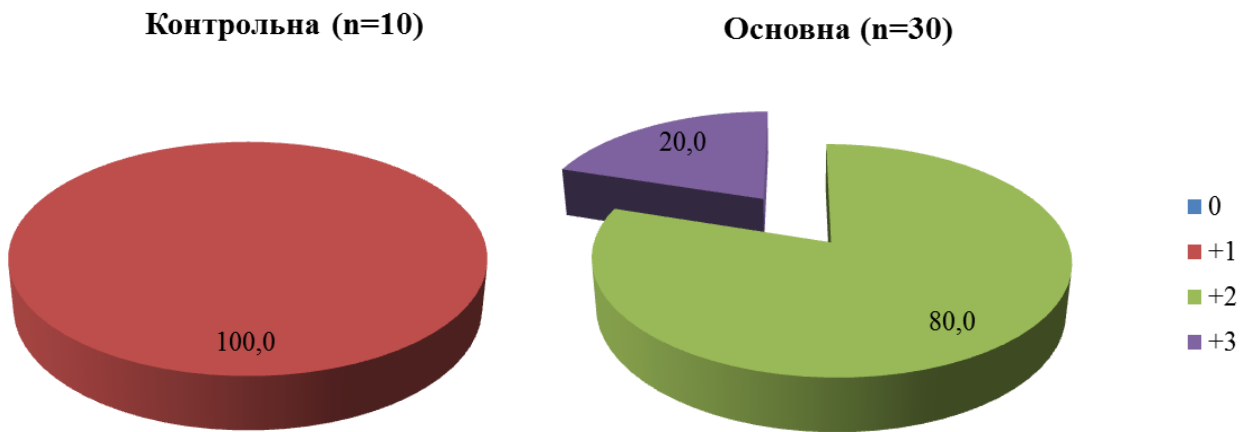


Рис. 4.4. Частка градацій для експресії маркера COX-2 у здорових та хворих на генералізований пародонтит (% ,  $p < 0,05$ )

Піроптоз – прозапальна запрограмована загибель клітин опосередкована через родину протеаз, так званих каспаз, які діляться на дві групи – ініціаторні та ефекторні. Ініціаторним каспазам -8 та -9 надають роль активаторів підпорядкованих ефекторних каспаз, таких як каспаза-3 [284]. Таким чином, каспаза-3 – це фермент-виконавець, що має відповідну каталітичну активність. Виявлення її в зразках навколорубних тканин свідчить про індукцію апоптозу [75].

Серед чинників апоптичної активності в розвитку запально-деструктивного процесу в тканинах пародонта слід виділити продукти трьох генів, які кодують білки, p 53, p 21 та Bcl-2. p 21 – важливий інгібітор клітинного циклу, експресія якого є однією з основних мішеней трансактиваційної дії онкопротеїну p 53. p 21 блокує комплекси різних циклів із необхідними кіназами, ключовими ферментами поділу клітин [75, 107].

В нашому дослідженні в зразках ясен найвищі показники експресії пов'язаних між собою маркерів апоптозу – ефекторної каспази-3 та онкопротеїну-супресору p 21 – також спостерігали в хворих на генералізований пародонтит у клітинах запального інфільтрату стріми та в епітеліоцитах багат шарового плоского епітелію (рис. 4.5 та 4.6).

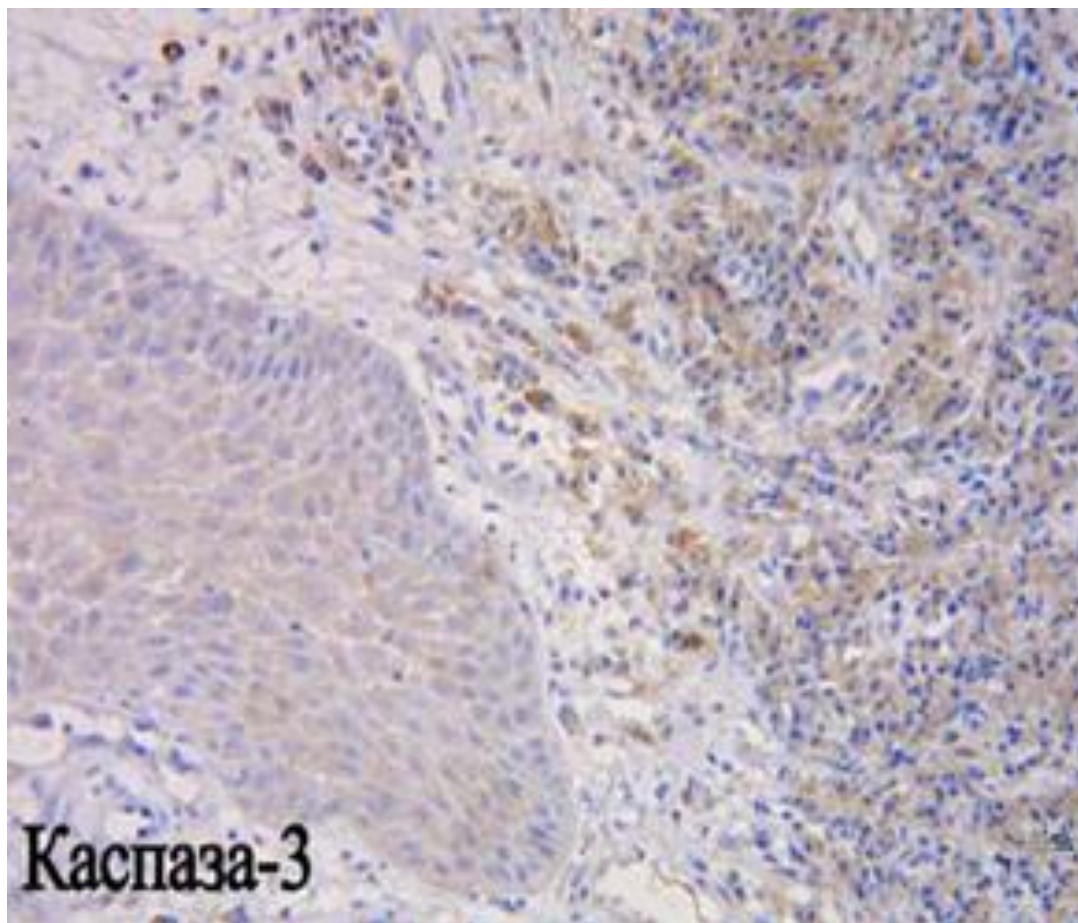


Рис. 4.5. Цитоплазматична експресія маркера каспази-3 (+1) у хворого з генералізованим пародонтитом, II ступеня, хронічного перебігу. Імуногістохімічний метод, додаткове забарвлення гематоксиліном Майєра (x400)

Контрольна група показала в усіх випадках відсутність (0) експресії маркера каспази-3 та 100 % слабку (+1) експресію для маркера p 21, що продемонстровано на рис. 4.7 та рис. 4.8.

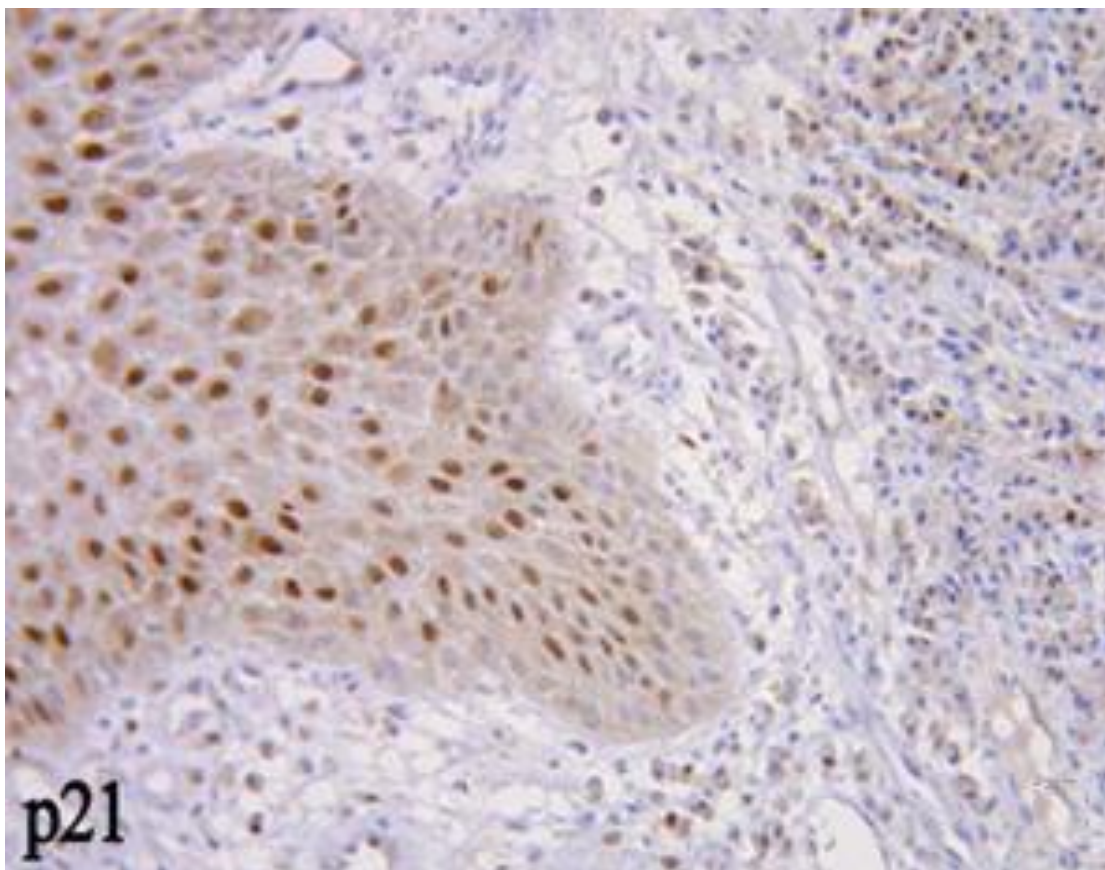


Рис. 4.6. Змішана ядерно-цитоплазматична реакція з маркером р 21 у клітинах епітелію та запального інфільтрату (+3) у хворого з генералізованим пародонтитом, II ступеня, хронічного перебігу. Імуногістохімічний метод, додаткове забарвлення гематоксиліном Майєра (x400)

У хворих на пародонтит з основної групи для каспази-3 градація цитоплазматичного маркера (0) встановлена в 46,7 % випадків, а (+1) – у 53,3 %. Для онкопротеїну-супресору р 21 у 40,0 % спостережень визначена слабка (+1) експресія, у 40,0 % – помірна (+2), решта 20,0 % – висока (+3) (див. рис. 4.7 та рис. 4.8).

Таким чином, маркери каспази-3 та р 21 виявилися показовими щодо розвитку запально-деструктивного процесу в пародонті ( $p < 0,05$ ).

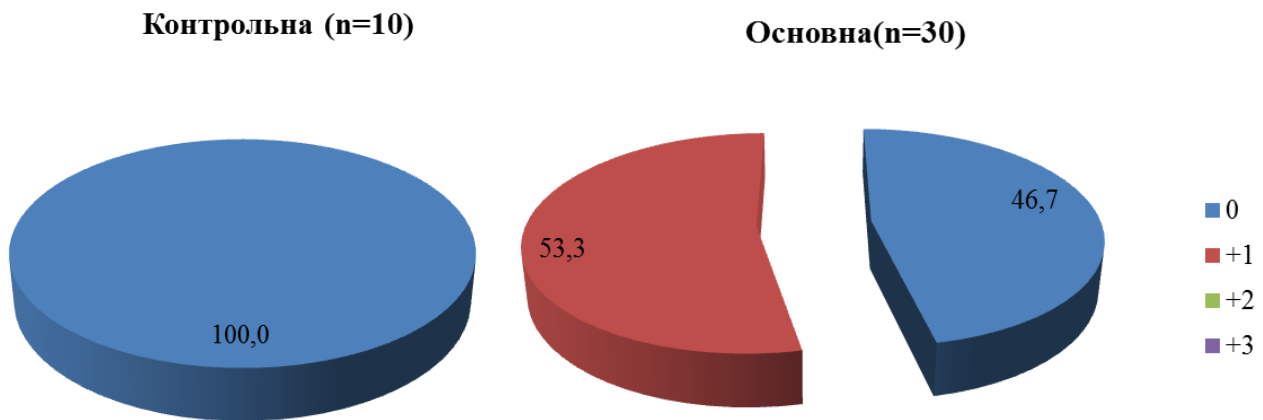


Рис. 4.7. Частка градацій для експресії маркера каспази-3 в дослідних групах (% ,  $p < 0,05$ )

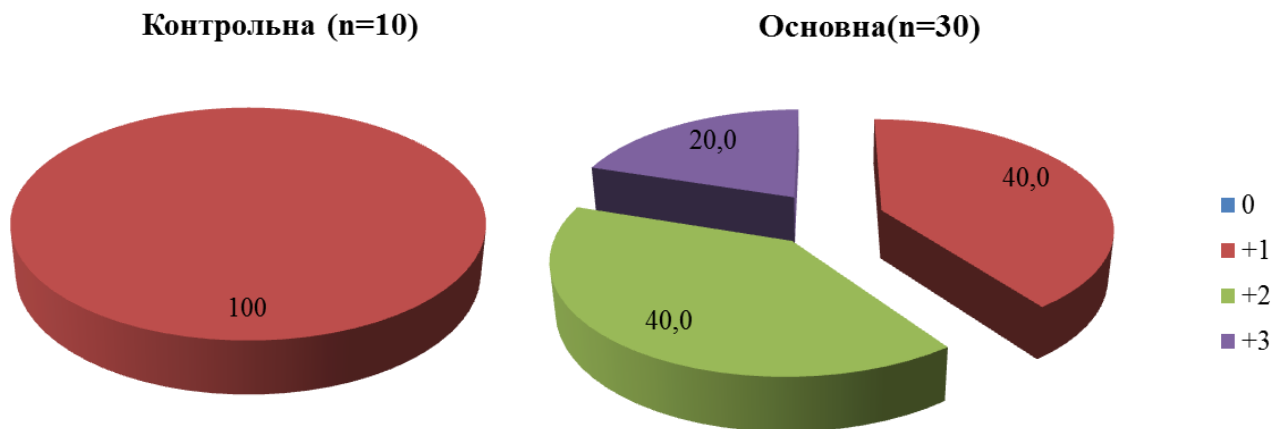


Рис. 4.8. Частка градацій для експресії маркера онкопротеїну-супресору p 21 у здорових та хворих на генералізований пародонтит (% ,  $p < 0,05$ )

Одночасно, p 53 – білковий продукт пухлинного гену-супресору, експресія якого ініціює апоптоз. Цей білок впливає на динаміку клітинного оновлення через індукцію апоптозу в термальній стадії диференціювання клітин, зокрема клітин запального інфільтрату. Навпаки, Bcl-2 – антиапоптотичний протеїн, що знижує ризик або взагалі запобігає загибелі клітин, яка провокується різними стимулами. Він здатний гальмувати процес виходу мітохондріального цитохрому, який ініціює внутрішній шлях смерті [75, 107].

На відміну від маркерів апоптозу каспази-3 та p 21, які активно виділялися клітинами запального інфільтрату, для p 53 та Bcl-2 позитивна імуногістохімічна



реакція спостерігалася переважно в базальному шарі багат шарового плоского епітелію (рис. 4.9 та рис. 4.10).

В контрольній групі в 40,0 % спостережень експресія p 53 не виявлена, а в 60,0 % встановлений її слабкий рівень (+1). В основній групі в 36,7 % хворих визначена нульова градація даного маркера, у 63,3 % – слабка (+1) (рис. 4.11).

Таким чином, достовірних відмінностей між даними маркерами для дослідних груп не зареєстровано.

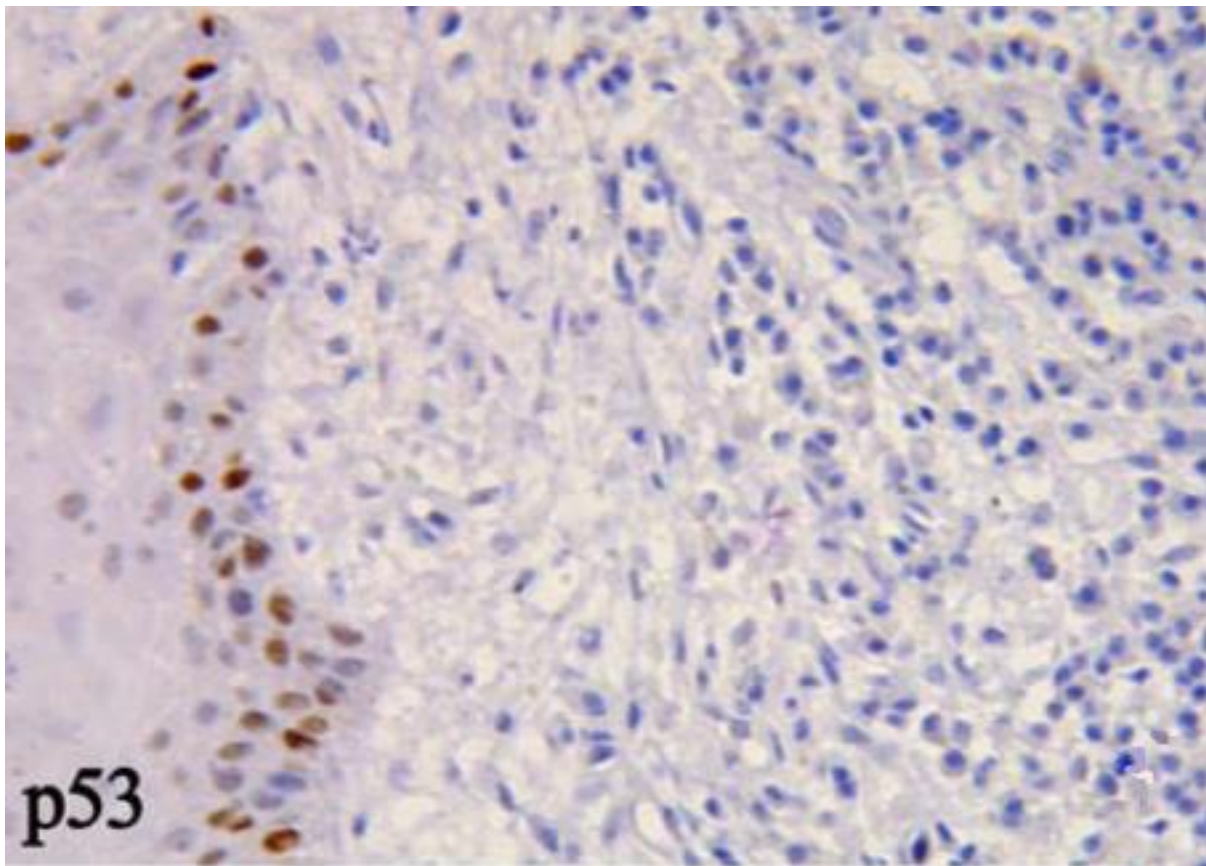


Рис. 4.9. Інтрануклеарна реакція з маркером p53 виключно в епітеліальних клітинах (+1) у хворого з генералізованим пародонтитом, II ступеня, хронічного перебігу. Імуногістохімічний метод, додаткове забарвлення гематоксиліном Майєра (x400)

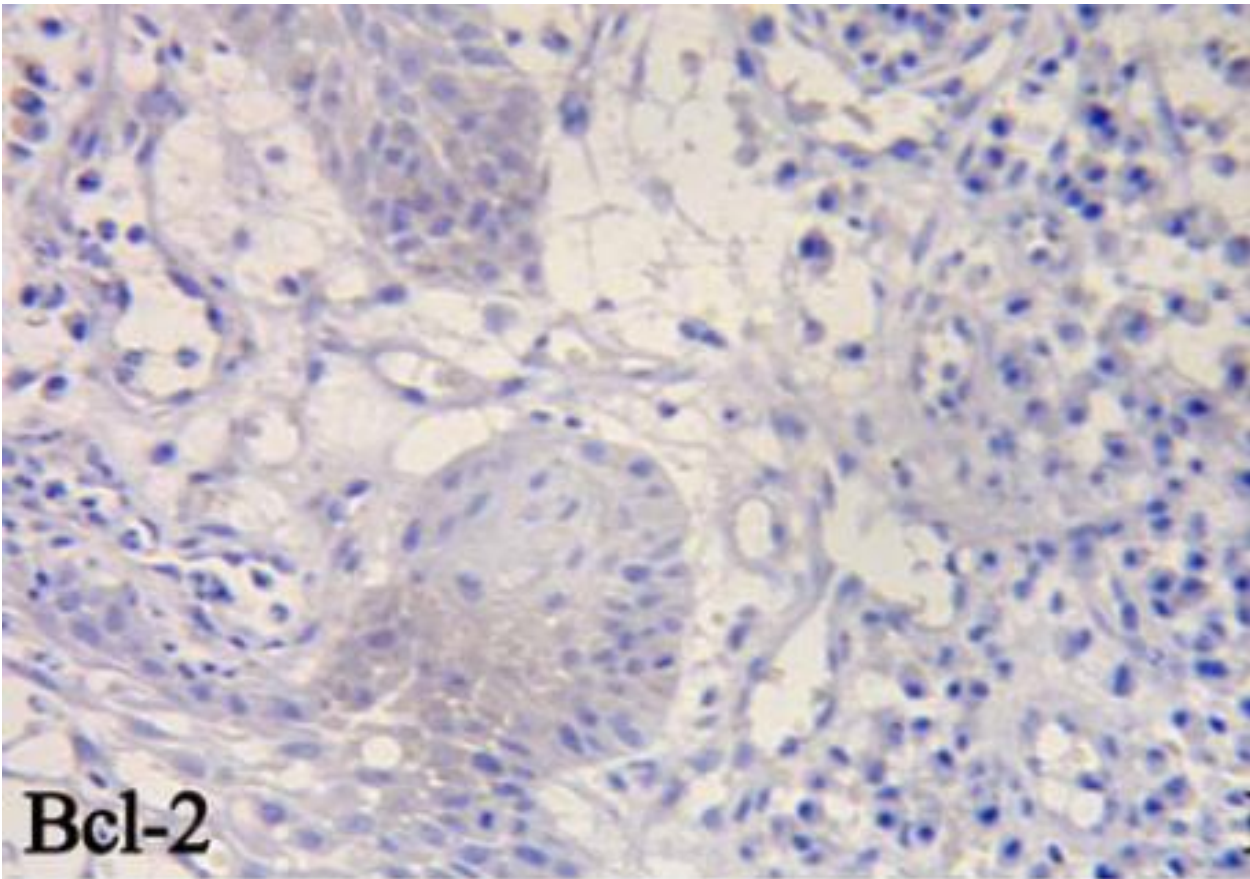


Рис. 4.10. Негативна реакція з маркером Bcl-2 в хворого з генералізованим пародонтитом, II ступеня, хронічного перебігу. Імуногістохімічний метод, додаткове забарвлення гематоксилином Майєра (x400)

Для антиапоптотичного білка Bcl-2 зареєстровано зниження експресії в хворих на пародонтит у порівнянні зі здоровими ( $p < 0,05$ ). Так, в осіб зі здоровим пародонтом нульова (0) градація встановлена в 20,0 % випадків, слабка (+1) – у решти 80,0 %. У 60,0 % хворих на генералізований пародонтит зареєстрований нульовий (0) рівень експресії маркера Bcl-2, а в 40,0 % – слабкий (+1) (рис. 4.12).

Зазначимо, що помірної та високої градації експресії маркерів p 53 та Bcl-2 в нашому дослідженні не виявлено.

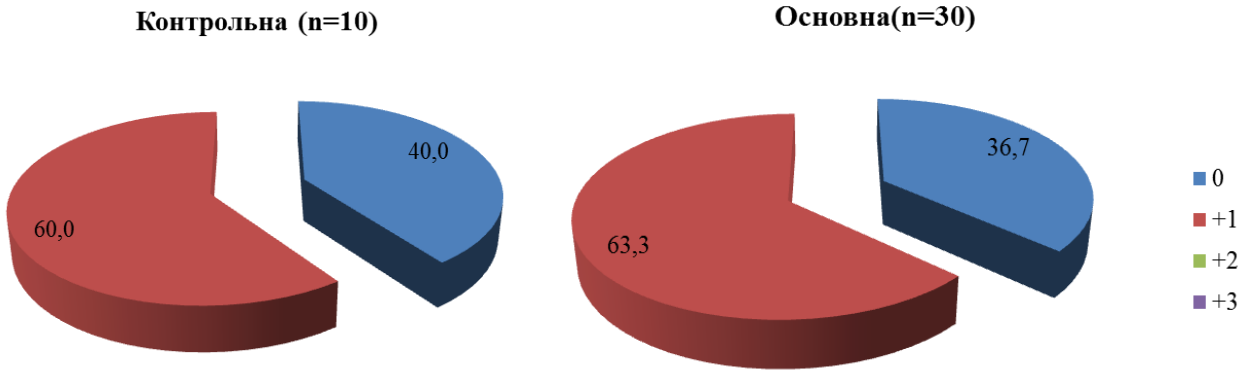


Рис. 4.11. Частка градацій для експресії маркера p 53 в дослідних групах (% ,  $p > 0,05$ )

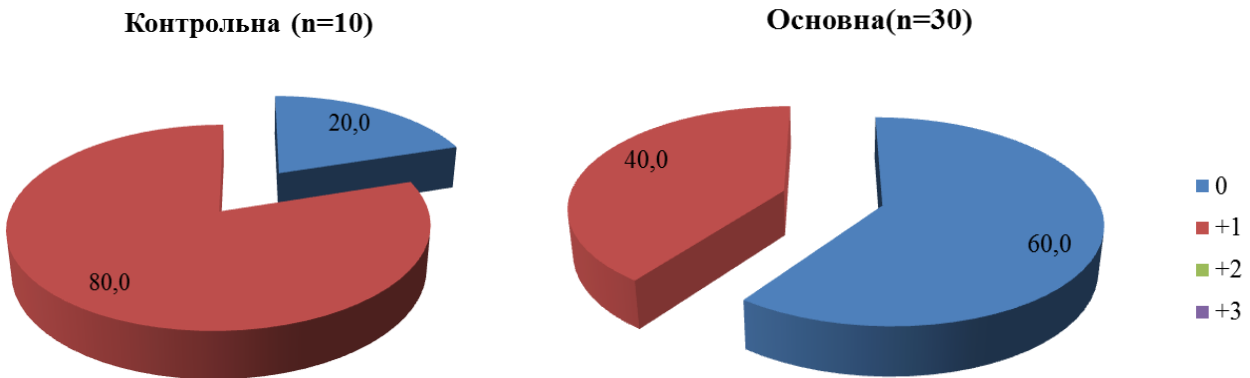


Рис. 4.12. Частка градацій для експресії маркера антиапоптотичного білка Bcl-2 в здорових та хворих на генералізований пародонтит (% ,  $p > 0,05$ )

Достовірних відмінностей між показниками чоловіків та жінок не виявлено ( $p > 0,05$ ).

Підсумовуючи результати імуногістохімічного дослідження, приведені в розділі 4, слід зазначити, що механізми апоптозу та запалення відіграють важливу роль для елімінації та оновлення клітин пародонтального комплексу. На наш погляд, імуногістохімічне вивчення маркерів запалення та апоптозу в біоптатах ясен у хворих на генералізований пародонтит порівняно з особами зі здоровим пародонтом, дозволило виявити найбільш показові характеристики перебігу запально-деструктивного процесу в навколорубних тканинах задля подальшого

створення ефективних методів діагностики та патогенетичного лікування захворювання.

Отримані нами результати імуногістохімічних досліджень показали, що найбільш інформативними щодо перебігу запально-деструктивного процесу в навкол зубних тканинах виявилися маркери запалення COX-2 та MMP-1, а також маркери апоптозу каспаза-3 та p21.

Отримані результати дозволяють широке використання зазначених імуногістохімічних маркерів у діагностичному процесі в хворих на генералізований пародонтит, а також для оцінки ефективності лікування, що здійснюється.

Результати досліджень, приведених у даному розділі, представлені в роботах [33, 36, 37, 238].

## РОЗДІЛ 5

### ЕФЕКТИВНІСТЬ КОМПЛЕКСНОГО ЛІКУВАННЯ ПАЦІЄНТІВ ІЗ ГЕНЕРАЛІЗОВАНИМ ПАРОДОНТИТОМ ПРИ ЗАСТОСУВАННІ ІНГІБІТОРІВ МАТРИКСНИХ МЕТАЛОПРОТЕЇНАЗ

#### 5.1. Результати клінічного дослідження в динаміці лікування

Здійснений нами аналіз результатів клінічного обстеження продемонстрував, що при проведенні лікування в хворих обох дослідних груп досягнений подібний терапевтичний ефект. Запальні явища в тканинах пародонта усунені приблизно в однаковий термін, що проявлялося зникненням болісних відчуттів, кровоточивості, почервоніння ясен, а також відновленням їхнього рельєфу та щільності, у випадках генералізованого пародонтиту – припиненням ексудації із зубоясенних кишень. Зазначимо, що повного усунення запальних явищ у тканинах пародонта вдалося досягти в 93,3 % пацієнтів у групі зіставлення на 12-14 день лікування та в 96,7 % – в основній групі на 10-12 день.

У випадках негативних результатів лікування, зареєстрованих при генералізованому пародонтиті II ступеня тяжкості (2 пацієнти в групі зіставлення та 1 – в основній групі), після корекції лікувальних схем теж досягнуто клініко-рентгенологічної стабілізації процесу.

Під час клінічного обстеження хворих по закінченню тримісячного курсу лікування (найближчий термін) встановлено блідо-рожевий колір слизової, щільне охоплення яснами шийок зубів, відсутність зубних відкладень та кровоточивості ясен при зондуванні. У хворих на генералізований пародонтит I-II ступеня спостерігали подібне зменшення глибини пародонтальних кишень у хворих в основній групі (з  $5,63 \pm 0,12$  мм до лікування до  $3,20 \pm 0,07$  мм після,  $p > 0,05$ ) та в групі зіставлення (з  $5,70 \pm 0,12$  мм до  $3,34 \pm 0,08$  мм,  $p > 0,05$ ).

Про позитивні зміни в стані тканин пародонта свідчила динаміка гігієнічного (ОНІ-S), ясенного (РМА) та пародонтального (СРІТN) індексів, приведена в табл. 5.1.

Таблиця 5.1

**Порівняльна динаміка індексних показників у групі зіставлення (З) (n=30) та основній (О) (n=30) внаслідок проведеного лікування (M±m<sub>p</sub>)**

Показник	Група	Стан тканин пародонта					
		Гінгівіт – генералізований пародонтит, початковий ступінь (n=30)			Генералізований пародонтит I-II ступеня (n=30)		
		до	після		до	після	
			через 1 місяць	через 1 рік		через 1 місяць	через 1 рік
ОНІ-S, бали	З	3,88± 0,23	0,30± 0,05 <sup>°°</sup>	0,45± 0,07 <sup>°°</sup>	4,00± 0,25	0,72± 0,09 <sup>°°</sup>	0,87± 0,08 <sup>°°</sup>
	О	3,80± 0,24	0,25± 0,05 <sup>°°</sup>	0,32± 0,05 <sup>°°</sup>	4,08± 0,28	0,68± 0,09 <sup>°°</sup>	0,70± 0,08 <sup>°°</sup>
РМА, бали	З	1,75± 0,16	0,35± 0,07 <sup>°°</sup>	0,62± 0,08 <sup>°°</sup>	2,45± 0,20	0,47± 0,06 <sup>°°</sup>	0,80± 0,09 <sup>°°</sup>
	О	1,88± 0,17	0,28± 0,07 <sup>°°</sup>	0,25± 0,06 <sup>°°**</sup>	2,58± 0,22	0,38± 0,07 <sup>°°</sup>	0,52± 0,07 <sup>°°*</sup>
СРІТN, бали	З	2,10± 0,16	0,50± 0,07 <sup>°°</sup>	0,92± 0,08 <sup>°</sup>	3,60± 0,28	2,58± 0,14 <sup>°</sup>	2,78± 0,14 <sup>°</sup>
	О	2,08± 0,16	0,48± 0,07 <sup>°°</sup>	0,51± 0,07 <sup>°**</sup>	3,68± 0,30	2,47± 0,12 <sup>°</sup>	2,52± 0,13 <sup>°*</sup>
ВМД, HU	З	1390,7± 42,0	–	1276,0± 46,5 <sup>°</sup>	1255,70± 38,0	–	1160,56± 31,0 <sup>°</sup>
	О	1368,2± 48,0	–	1331,2± 45,0	1208,8± 35,4	–	1185,7± 34,0

**Примітка.** \* – p < 0,05, \*\* – p < 0,001 між показниками дослідних груп; ° – p < 0,05, °° – p < 0,001 для показників у процесі лікування порівняно з вихідними значеннями.

Як видно з рис. 5.1, спрощений індекс гігієни порожнини рота (ОНІ-S), що складається з індексу зубного нальоту (DI-S) та індексу зубного каменю (CI-S), знизився в пацієнтів обох дослідних груп ( $p < 0,001$ ) і залишався на рівні, що відповідає доброму стану гігієни ротової порожнини, протягом року.

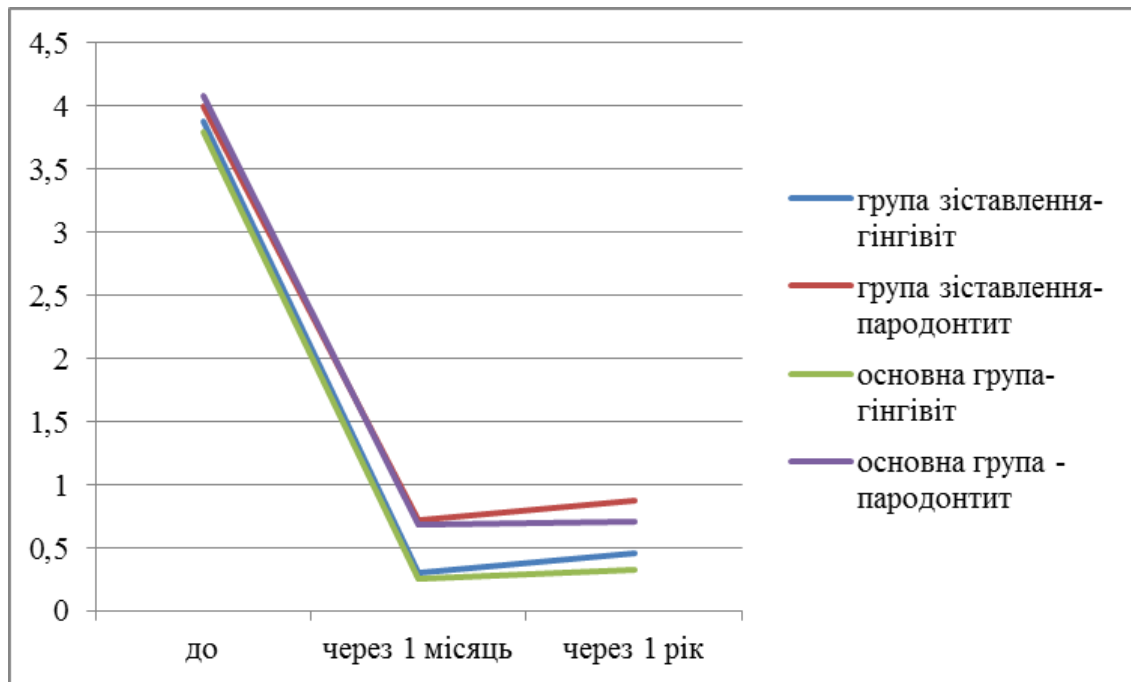


Рис. 5.1. Динаміка індексу ОНІ-S у хворих дослідних груп у процесі лікування (бали,  $p < 0,001$ )

По закінченню лікувальних курсів також встановлене зменшення рівнів гінгівального індексу в обох групах ( $p < 0,001$ ), що показано на рис. 5.2. Проте збереження отриманих значень у віддалений термін спостереження в більшій мірі спостерігалось для пацієнтів основної групи. Особливо добрих результатів вдалося досягнути для хворих основної групи із гінгівітом та початковими стадіями генералізованого пародонтиту, в яких як у найближчий, так і у віддалений термін спостереження отримані значення індексу РМА були практично однаковими, що свідчить про повне та довготривале усунення запального та пов'язаного із ним деструктивного процесів у тканинах пародонта, тобто достовірну тривалу ремісію захворювання ( $p > 0,05$ ).

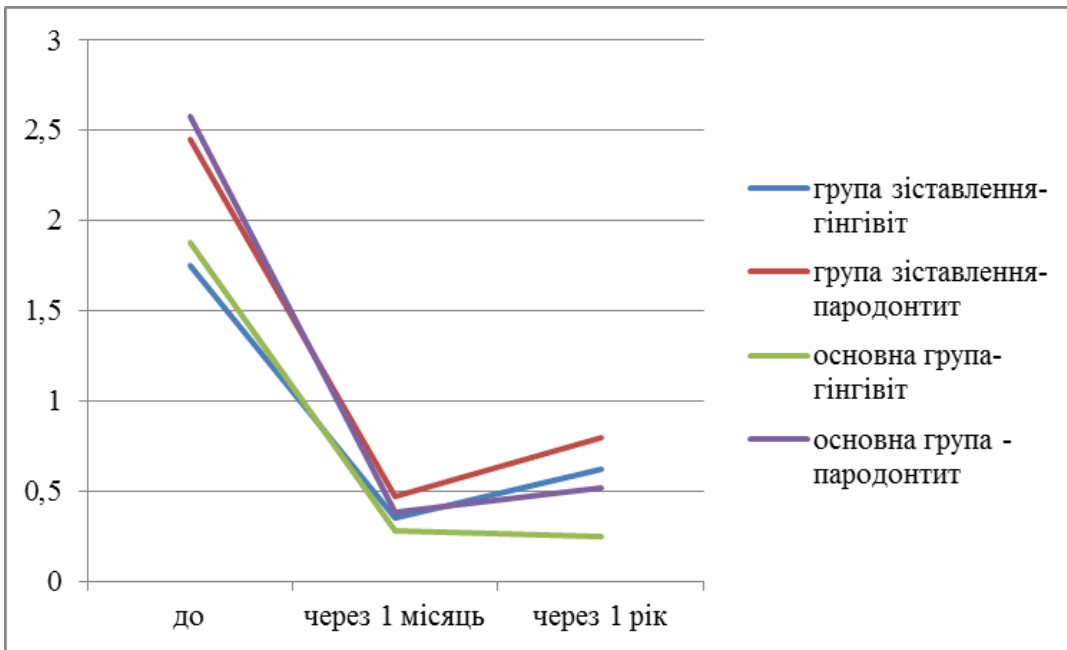


Рис. 5.2. Зміни індексу РМА у хворих дослідних груп у процесі лікування (бали,  $p < 0,05$ )

Зроблені висновки щодо динаміки гінгівального індексу в дослідних групах буди підтверджені результатами вивчення комплексного пародонтального індексу СРІТН у різний термін спостереження після проведеного лікування (рис. 5.3). Значення даного індексу достовірно зменшувалися в обох дослідних групах у найближчий термін після лікування ( $p < 0,05$ ). Тоді як через рік у хворих основної групи отримані результати зберігалися, а в групі зіставлення – знижувалися ( $p < 0,05$ ). Як видно з табл. 5.1, при порівнянні значень СРІТН для хворих основної та групи зіставлення у віддалений термін встановлена достовірна різниця (при гінгівіті та генералізованому пародонтиті початкового ступеня –  $p < 0,001$ , при генералізованому пародонтиті I-II ступеня –  $p < 0,05$ ).

Збереження запальних явищ у пародонті, зокрема набряку ясен, пов'язано з більшою глибиною пародонтальних кишень у хворих на генералізований пародонтит I-II ступеня тяжкості з групи зіставлення ( $3,52 \pm 0,09$  мм проти  $3,22 \pm 0,07$  мм основної групи,  $p < 0,05$ ).



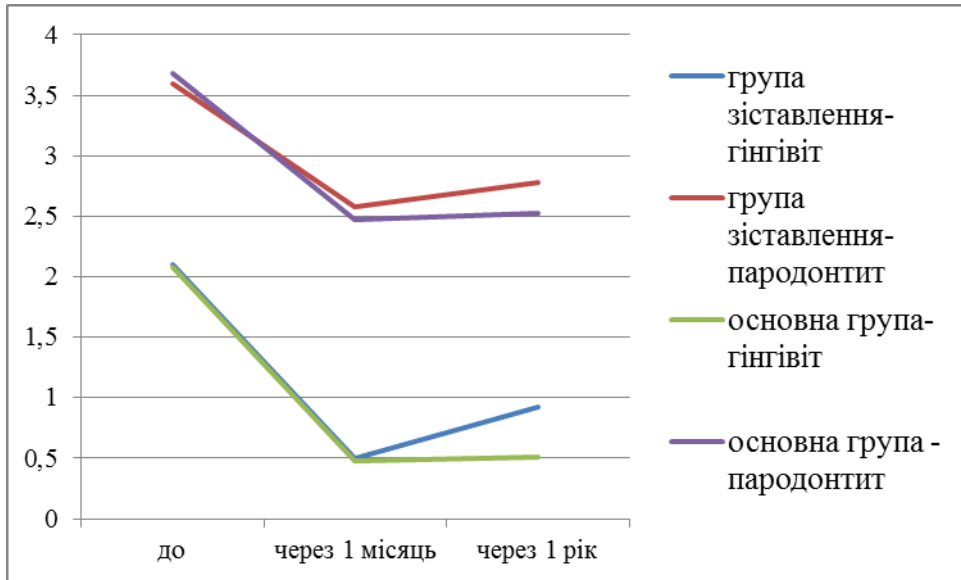


Рис. 5.3. Динаміка індексу CRITN у хворих дослідних груп у процесі лікування (бали,  $p < 0,05$ )

Суттєвим є те, що через рік після проведеного лікування також встановлені кращі результати вимірювання мінеральної щільності кісткової тканини для хворих основної групи.

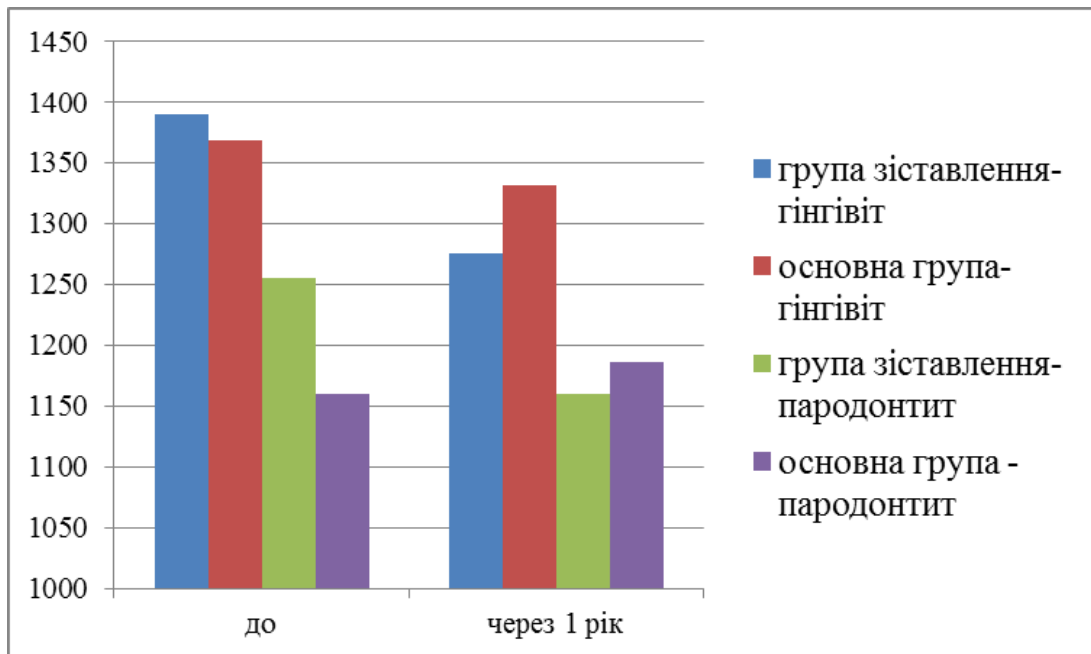


Рис. 5.4. Результати вимірювання мінеральної щільності кісткової тканини для хворих дослідних груп у процесі лікування (HU,  $p < 0,05$ ).

Отримані показники практично не змінилися від вихідних значень ( $p > 0,05$ ), тоді як достовірне їх зменшення, зареєстроване в групі зіставлення, вказує на подальше прогресування патологічного процесу в тканинах пародонта (рис. 5.4).

Таким чином, за даними клінічних спостережень у найближчий та віддалений терміни після проведеного лікування визначено достовірно більшу ефективність комплексного лікування, доповненого інгібіторами матриксних металопротеїназ, зокрема доксицикліну в субантимікробних дозах.

## 5.2. Дані лабораторних методів дослідження до та після лікування

Результати клініко-рентгенологічного обстеження хворих, представлені в підрозділі 5.1, були підтвержені даними лабораторних досліджень, наданими в табл. 5.2.

Таблиця 5.2

### Вміст ММП-8 та ММП-9 у ротовій рідині хворих із групи основної (О) та групи зіставлення (З) після проведеного лікування (нг/мл, $M \pm m_p$ )

Показник	Група	Стан тканин пародонта					
		Гінгівіт – генералізований пародонтит, початковий ступінь (n=30)			Генералізований пародонтит I-II ступня (n=30)		
		до	після		до	після	
			через 1 місяць	через 1 рік		через 1 місяць	через 1 рік
ММП-8	З	311,7± 73,3	141,0± 35,0°	230,0± 48,2	369,0± 75,0	159,6± 40,0°	244,0± 58,1
	О	337,3± 76,0	112,0± 30,5°	127,0± 28,0*°	384,1± 78,3	137,2± 33,5°	160,0± 28,0°
ММП-9	З	176,0± 41,8	85,0± 30,2°	110,2± 35,0°	210,0± 53,0	90,0± 34,5°	122,7± 36,1
	О	170,2± 40,7	63,0± 24,8°	68,02± 25,0°	211,8± 54,1	71,0± 26,0°	73,0± 25,6°

**Примітка.** \* –  $p < 0,05$  для показників дослідних груп; ° –  $p < 0,05$  – для показників у процесі лікування порівняно з вихідними значеннями.

Як видно з рис. 5.5 та рис. 5.6, у найближчий термін після проведеного лікування вдалося досягти достовірного зниження рівня ММП-8 та ММП-9 у ротовій рідині хворих обох дослідних груп.

Разом з тим, у пацієнтів основної групи доповнення схеми лікування інгібіторами матриксних металопротеїназ призвело до збереження отриманого рівня матриксних металопротеїназ у віддалений термін, чого не спостерігалось у групі зіставлення. Подібна закономірність особливо помітна для показника вмісту ММП-8 у ротовій рідині хворих без деструктивних явищ у тканинах пародонта ( $p < 0,05$ ), в яких, на підставі тривалої нормалізації біохімічних маркерів запалення, можна говорити про стійку ремісію захворювання.

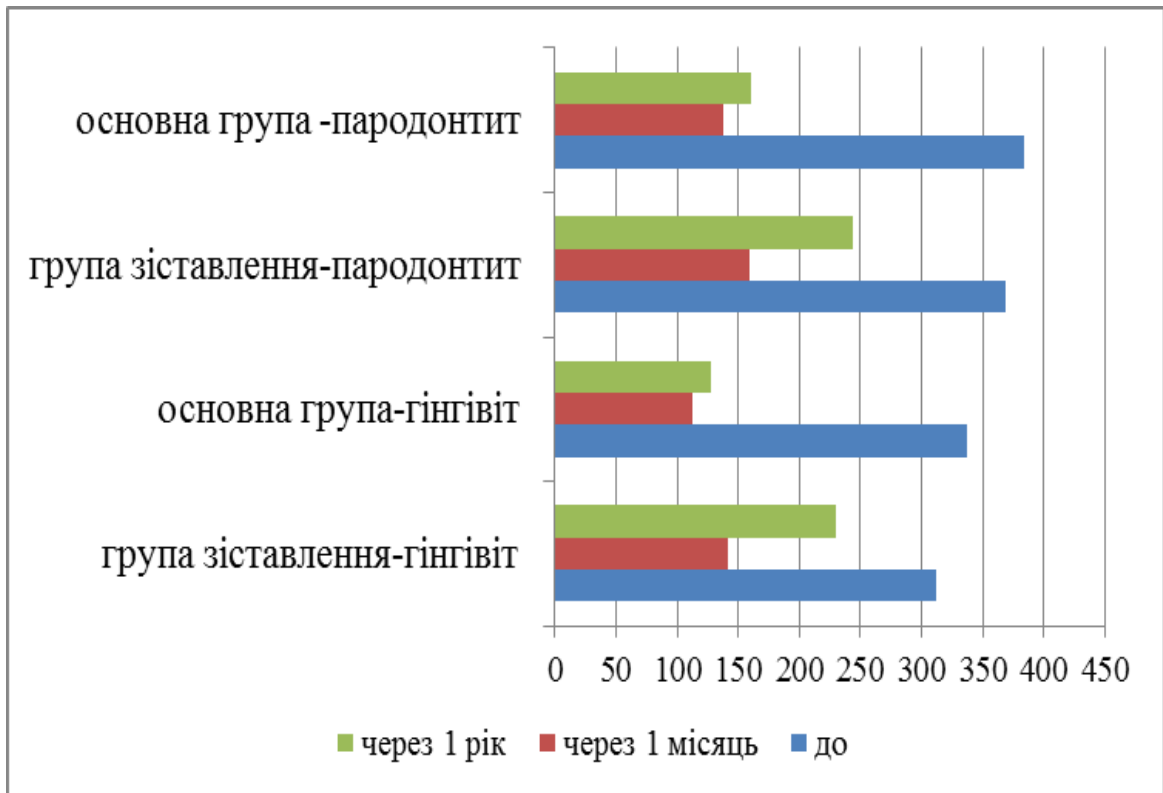


Рис. 5.5. Динаміка вмісту ММП-8 у ротовій рідині хворих дослідних груп у різний термін після проведеного лікування (нг/мл,  $p < 0,05$ )

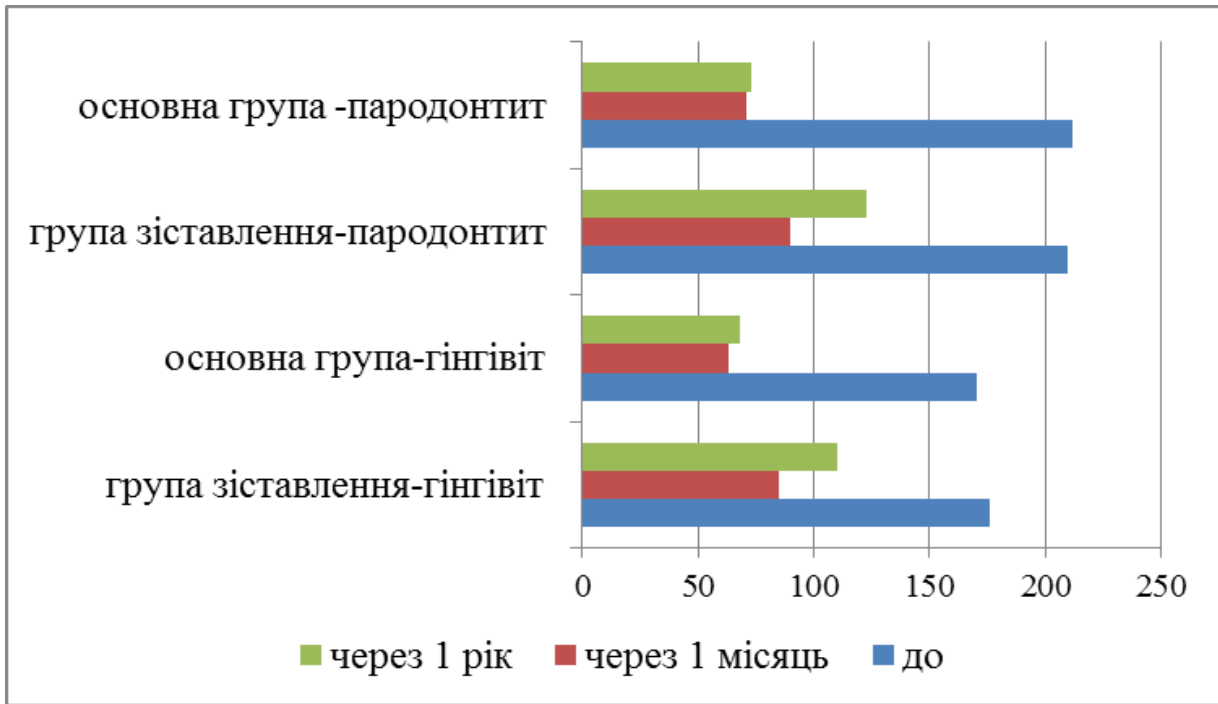


Рис. 5.6. Динаміка вмісту ММП-9 у ротовій рідині хворих із дослідних груп у різний термін після проведеного лікування (нг/мл,  $p < 0,05$ )

Для визначення ефективності запропонованого комплексного лікування із застосуванням інгібіторів ММП нами вивчено вміст ММП-1 у біоптатах ясен із застосуванням методу імуногістохімічного дослідження. При цьому рівні інтрануклеарної експресії маркера ММП-1 у запальному інфільтраті розбивали на 4 градації від 0 до +3: (0) – немає забарвлення; (+1) – забарвлених клітин до 10 %, (+2) – кількість забарвлених клітин варіює в діапазоні від 10 % до 30 %, та градація (+3), де забарвлених клітин більше 30 % (рис. 5.7).

Збільшення активності ММП-1 у біоптатах ясен відповідає розвитку запально-деструктивного процесу в тканинах пародонта. Відповідно до цього при оцінці цитоплазматичної експресії ММП-1 в епітеліальних та стромальних клітинах встановлено, що у всіх дослідних хворих спостерігалась експресія маркера ММП-1: слабка (+1) – в 23,3 % хворих, помірна (+2) – в 60,0 %, висока (+3) – в 16,7 %.

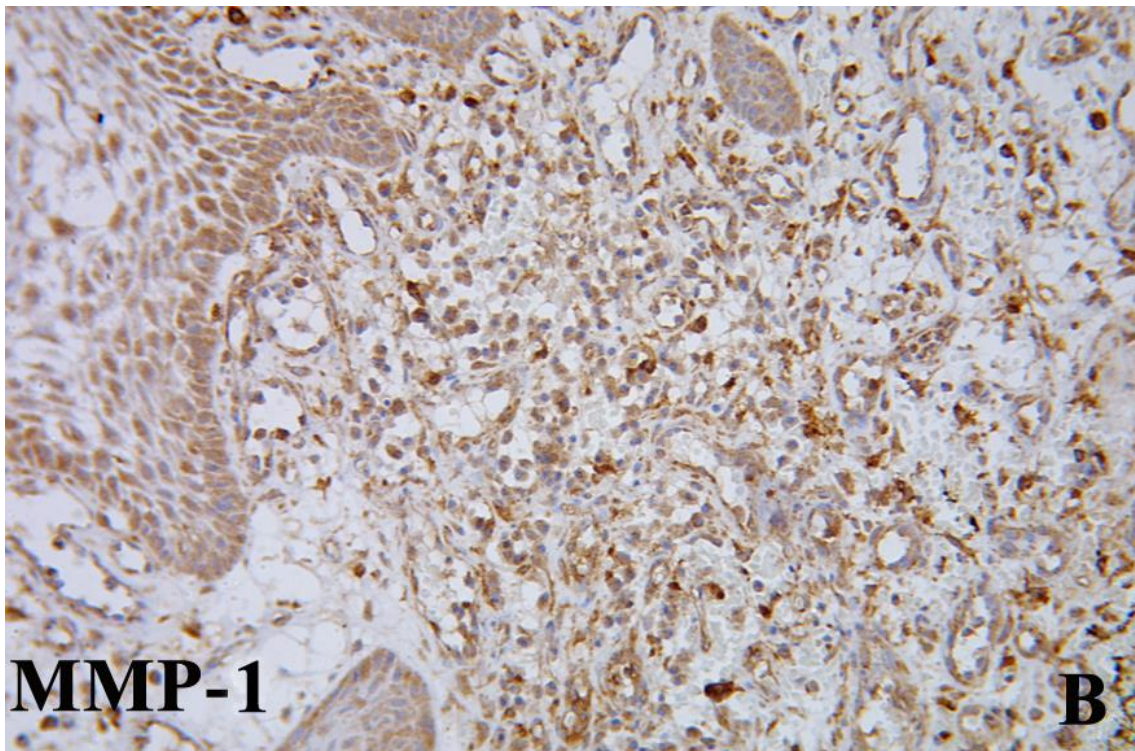
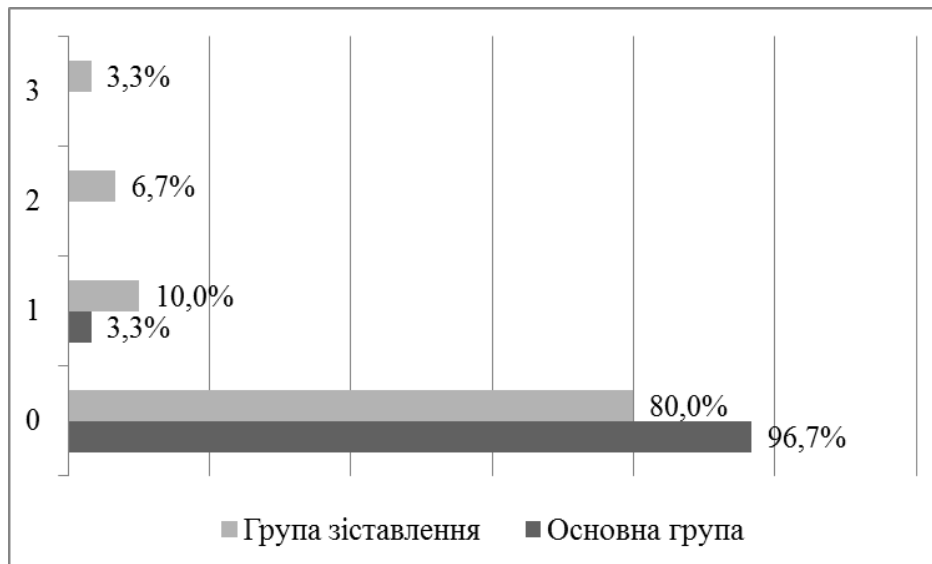


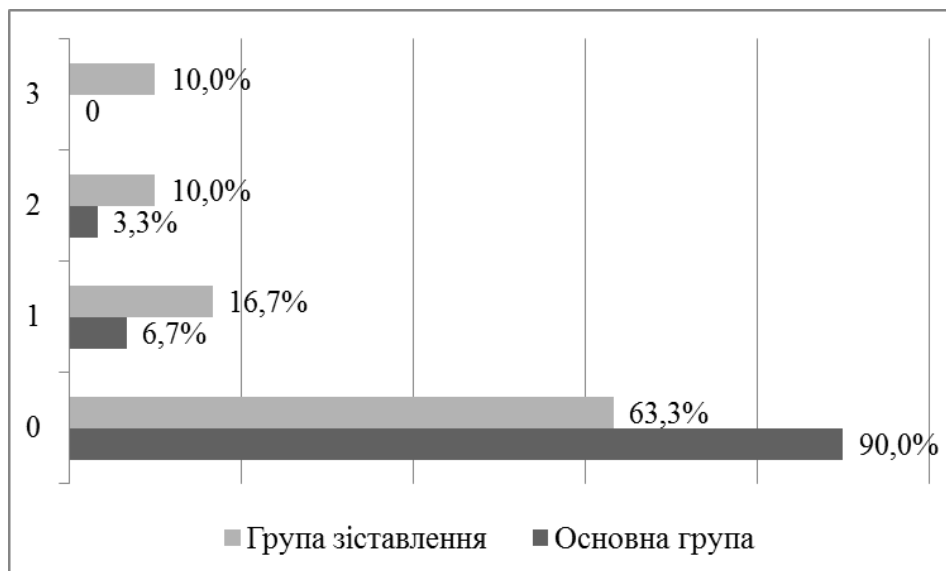
Рис. 5.7. Імуногістохімічне дослідження біоптатів ясен у дослідних хворих: змішана ядерно-цитоплазматична реакція з маркером ММП-1 у запальному інфільтраті та навколишніх епітеліальних клітинах (+2). Імуногістохімічний метод, додаткове забарвлення гематоксиліном Майєра (x400)

Тоді як після проведеного лікування нульовий результат зафіксований в 96,7 % хворих основної групи та 80,0 % – в групі зіставлення (частка випадків з різним ступенем градації (+1, +2, +3 представлена на рис. 5.8 а).

Про збереження результатів лікування серед хворих основної групи свідчить відмінність характеру цитоплазматичної експресії ММП-1 в епітеліальних та стромальних клітинах у віддалений термін спостереження порівняно з групою зіставлення, що зображено на рис. 5.8 б.



а



б

Рис. 5.8. Результати вивчення активності ММП-1 у біоптатах ясен у хворих основної та групи зіставлення після проведеного лікування (а – у найближчий термін спостереження, б – у віддалений)

Отримані дані дозволили нам зробити висновок про те, що застосування розробленого лікувального комплексу сприяло достовірно кращому результату лікування за показником вмісту ММП-1 у біоптатах ясен у різний термін спостереження.

Підсумовуючи результати клінічної апробації, зазначимо, що застосування інгібітору матриксних металопротеїназ доксицикліну в субантимікробних дозах у комплексному лікуванні генералізованого пародонтиту є ефективним для попередження прогресування запально-деструктивного процесу в тканинах пародонта, що було підтверджено даними клінічного, біохімічного та імуногістохімічного дослідження в найближчий та віддалений термін лікування. Так, нами було зареєстровано зниження активності матриксних металопротеїназ ММП-1, ММП-8 та ММП-9, найбільш показових щодо перебігу захворювання. Таким чином, можна припустити, що за рахунок дезактивації зазначених ферментів протеолізу відбувається гальмування запального процесу та розривається «хибне коло», в якому мікробний фактор провокує запалення, а продукти протеолізу, що утворюються, є поживним середовищем для нього.

Слід зазначити, що виявлені відмінності між основною та групою зіставлення найбільш прослідковуються для хворих із гінгівітом та пародонтитом початкового ступеня, які характеризуються відсутністю деструктивних явищ у тканинах пародонта ( $p < 0,05$ ), що дозволяє стверджувати про найбільшу ефективність запропонованої лікувальної схеми саме на початкових стадіях розвитку патологічного процесу.

Отримані результати роботи дозволяють рекомендувати інгібітори матриксних металопротеїназ, зокрема, доксициклін, насамперед, як превентивне патогенетичне лікування в хворих із гінгівітом та генералізованим пародонтитом початкового ступеня, коли суттєвих змін кісткової структури не відбулося, та превалює запальна компонента.

Окреслюючи перспективи подальших досліджень цього напрямку, зазначимо, що з огляду на складність етіології та патогенезу генералізованого пародонтиту збільшення ефективності його лікування потребує подальших клініко-лабораторних досліджень. Зокрема потрібно з'ясувати необхідність проведення повторних курсів інгібіторів матриксних металопротеїназ.

Основні наукові результати розділу опубліковані в статті [38].

## АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

Натепер доведено, що при генералізованому пародонтиті запальний процес в яснах (гінгівіт), спричинений пародонтопатогенною мікрофлорою, є первинним. Попри інфекційний характер гінгівіту, він не є заразним, одночасно традиційне антимікробне лікування, що включає видалення зубної бляшки, неефективне щодо профілактики подальшої стадії патологічного процесу в тканинах пародонта, генералізованого пародонтиту [95]. Так, якщо поширеність гінгівіту за даними ВООЗ серед населення віком 35-64 років складає до 85 %, то запальний процес в яснах розвивається в деструкцію кістки, характерну для пародонтиту, лише в 11,0 % населення [48]. Таким чином, задля вирішення проблеми прогнозування перебігу, вторинної профілактики та превентивного лікування захворювання особливої уваги потребують механізми розвитку гінгівіту в пародонтит.

В зв'язку з цим зазначимо, що при прогресуванні запального процесу в навкол зубних тканинах головна роль надається цитокінам, які є «першою хвилею» клітинної відповіді на дію мікробних патогенів [213]. Вважається, що генетично зумовлене порушення саме цієї ланки призводить до розвитку пародонтиту, а зміни рівня інтерлейкінів у ротовій рідині є прогностичною ознакою захворювання на ранніх стадіях [76]. У відповідь на збільшену секрецію прозапальних інтерлейкінів нейтрофіли виробляють велику кількість ферментів, серед яких матриксні металопротеїнази (ММП), що беруть участь у руйнуванні сполучної тканини пародонтального комплексу. В свою чергу, активність ММП регулюється специфічними тканинними інгібіторами TIMP (Tissue Inhibitor of Metalloproteinase), а дисбаланс між ними зв'язують із перебігом остеорезорбтивних процесів у тканинах пародонта [87].

Як виявилось з проведеного нами огляду літератури, при розвитку запально-деструктивного процесу в навкол зубних тканинах спостерігаються зміни рівнів ММП. Вони проявляються в активації протеолітичних ферментів, що відсутні у здорових осіб, у тому числі в підвищенні концентрації ММП у ротовій та ясенній рідинах. При цьому при лікуванні захворювання відзначається зниження їх



активності. Зрозуміло, що описана реакція з боку ММП може мати значення в патогенезі пародонтиту, зокрема щодо з'ясування механізмів переходу гінгівіту в пародонтит.

Однак, не дивлячись на значну актуальність проблеми, дослідження цього плану відносно не багаточисленні та значно відрізняються в методології проведення. Відсутні роботи, що вивчають декілька ММП та дозволяють обрати найбільш показові з них щодо перебігу патологічного процесу в навколозубних тканинах, які можуть бути використані як біомаркери, зокрема в ротовій рідині, що і було реалізовано в теперішній роботі.

До того ж, найбільш часто в якості матеріалу для дослідження використовуються ротова та ясенна рідина. Але враховуючи первинну локалізацію ММП у міжклітинній речовині ясен, їх вміст у цих рідинах не здатний віддзеркалювати справжніх рівнів ММП у тканинах пародонта. Звідси, для вирішення проблеми, що виникла, необхідним є застосування імуногістохімічного методу для вивчення ММП у біоптатах ясен, що теж було відтворено в даній дисертаційній роботі.

Окрім того, серед механізмів пошкодження тканин пародонта, ініційованих мікробним фактором, найменш вивченими та найбільш перспективними є прямі цитопатичні ефекти, до яких належать апоптоз та піроптоз [181, 250, 284]. Натепер встановлено, що пародонтопатогенні мікроорганізми *Treponema denticola*, *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum* та *Actinobacillus actinomycetemcomitans* здатні стимулювати запрограмовану загибель епітеліальних та сполучнотканинних клітин пародонта [117, 191, 211]. В свою чергу, піроптоз – прозапальна запрограмована загибель клітин опосередкована через родину протеаз, так званих каспаз [284]. Каспази – це ферменти-виконавці, які мають відповідну каталітичну активність, а їх виявлення в зразках тканин пародонта свідчить про індукцію апоптозу [75]. Окрім каспаз, серед чинників апоптичної активності в розвитку запально-деструктивного процесу в тканинах пародонта слід виділити продукти трьох генів, які кодують білки, p 53, p 21 та Bcl-2 [75, 107].

Таким чином, проведення біохімічних та гістохімічних досліджень щодо вивчення механізмів розвитку гінгівіту в пародонтит, дозволило нам визначити основні діагностичні та прогностичні чинники, до яких належать ММП та фактори апоптозу, що зробило можливим визначити показання та необхідний напрямок лікування захворювання.

Отже, мета представленого дисертаційного дослідження – підвищення ефективності комплексного лікування генералізованого пародонтиту шляхом застосування інгібіторів матриксних металопротеїназ.

Згідно поставленій меті та завданням дослідження на першому етапі виконання роботи обстежено 90 осіб віком 32-45 років, серед яких 30 – із інтактним пародонтом, 30 – із хронічним дифузним катаральним гінгівітом і генералізованим пародонтитом початкового ступеня та 30 – із хронічним генералізованим пародонтитом I-II ступеня тяжкості. Стан пародонта оцінювали за клінічними індексами та показником мінеральної щільності кісткової тканини щелеп за даними комп'ютерної томографії. В ротовій рідині за допомогою методу імуноферментного аналізу визначали вміст матриксних металопротеїназ ММП-2, ММП-3, ММП-8, ММП-9, ММП-13, тканинного інгібітору металопротеїназ ТІМР-1, інтерлейкінів -1 $\beta$ , -6 и -4, активність маркерів кісткового метаболізму – тартратрезистентної кислоти та кісткової лужної фосфатази, остеокальцину.

На другому етапі роботи для порівняльного вивчення імуногістохімічних показників експресії маркерів апоптозу та запалення в тканинах маргінального пародонта було залучено 40 осіб віком 32-45 років, серед яких 30 хворих із хронічним генералізованим пародонтитом I-II ступеня тяжкості та 10 осіб зі здоровим пародонтом. Для морфологічного дослідження використовували біоптати ясен, які фіксували в 4 % розчині нейтрального формаліну протягом доби і заливали в парафін. Гістологічні зрізи товщиною 4,0-6,0 мкм наносили на адгезивні предметні скельця. Після їх депарафінізації та регідратації проводили демаскування антигенів у цитратному буфері з рН 6,0 при 121°C протягом 8 хвилин. Активність ендогенної пероксидази пригнічували 3 % перекисом водню протягом 20 хвилин. Інкубацію зрізів проводили з первинними антитілами у вологих камерах при 23-25°C протягом

30 хвилин. Вивчали цитоплазматичну експресію маркерів СОХ-2, каспази-3 та інтрануклеарну експресію маркерів ММП-1 та р 21 (у запальному інфільтраті), р 53 та Vcl-2 (в ясенному епітелії).

На третьому етапі виконання дослідження проведена клінічна апробація комплексного лікування, доповненого інгібіторами матриксних металопротеїназ, серед 60 хворих із дифузним гінгівітом та генералізованим пародонтитом хронічного перебігу за даними клініко-рентгенологічного обстеження, комп'ютерної томографії, біохімічного дослідження ротової рідини на вміст матриксних металопротеїназ-8 та -9 (ММП-8, ММП -9), а також імуногістохімічного вивчення біоптатів ясен щодо цитоплазматичної експресії матриксної металопротеїнази-1 (ММП-1).

Отримані дані зазнали статистичної обробки, зокрема із застосуванням методу кореляційно-регресійного аналізу.

Так, при порівнянні результатів вивчення 90 зразків ротової рідини, встановлено, що вміст всіх ММП зростав із виникненням запалення в тканинах пародонта в хворих на гінгівіт та з початковими стадіями пародонтиту в порівнянні зі здоровими особами. Проте, зі зростанням ступеня тяжкості захворювання достовірного збільшення показників ММП не реєструвалося ( $p > 0,05$ ).

Найбільш показовою виявилася динаміка ММП-8, рівень якої в ротовій рідині хворих з початковими стадіями генералізованого пародонтиту перевищував майже в три рази значення осіб із інтактним пародонтом ( $p < 0,001$ ), але достовірно не відрізнявся від значень групи хворих із захворюванням I-II ступеня тяжкості ( $p > 0,05$ ).

Найменших змін при прогресуванні патологічного процесу в навколозубних тканинах зазнав вміст ММП-13 у ротовій рідині. Він практично не змінювався при прогресуванні запально-деструктивного процесу в навколозубних тканинах ( $p > 0,05$ ).

В свою чергу, для показників ТІМР-1 у ротовій рідині встановлена тенденція до зменшення значень при погіршанні перебігу генералізованого пародонтиту, проте достовірних відмінностей для дослідних груп не виявлено ( $p > 0,05$ ).

Враховуючи те, що прогресування захворювання пов'язане з порушенням рівноваги між ММП та TIMP, нами вивчено зміни їх співвідношень. ММП-2/TIMP-1, ММП-3/TIMP-1, ММП-13/TIMP-1 виявилися непоказовими щодо розвитку запально-деструктивного процесу в тканинах пародонта. Тоді як для показників ММП-8/TIMP-1 та ММП-9/TIMP-1 виявлена достовірна різниця між значеннями здорових та хворих на гінгівіт та пародонтит ( $p > 0,05$ ). Разом з тим, зазначені співвідношення для хворих I та II групи достовірно не різнилися, що свідчить про неможливість застосування даних показників для оцінки динаміки патологічного процесу в навкол зубних тканинах.

Очікуваним було зростання рівня прозапальних інтерлейкінів IL-1 $\beta$  та IL-6 на тлі зменшення значень показників протизапального IL-4 в ротовій рідині в хворих на пародонтит у порівнянні зі здоровими особами ( $p < 0,001$ ). Нами зареєстровані достовірні відмінності при погіршенні перебігу запально-деструктивного процесу в хворих із I-II ступенем тяжкості генералізованого пародонтиту порівняно з хворими на гінгівіт ( $p < 0,05$ ).

Навпаки, для маркерів кісткового метаболізму показовим було збереження подібності значень на початкових стадіях патологічного процесу до показників осіб зі здоровим пародонтом ( $p > 0,05$ ) та стрімке зростання в ротовій рідині рівня маркера кісткової резорбції тартратрезистентної кислоти фосфатази поряд зі зниженням показників кісткового формування (вмісту кісткової лужної фосфатази та остеокальцину) у хворих з генералізованим пародонтитом I-II ступеня тяжкості (III група) ( $p < 0,05$ ). Таким чином, маркери кісткового метаболізму виявилися показовими лише при розвинених ступенях захворювання.

Проведений нами кореляційний аналіз не дозволив виявити значущих залежностей між клінічними індексами стану пародонта та вмістом ММП у ротовій рідині. Проте, для дослідних II групи вдалося виявити суттєві прямі кореляційні зв'язки між індексами РМА та СРІТN із концентрацією ММП-8 ( $r_s = 0,75$ ;  $p < 0,05$ ) та ММП-9 ( $r_s = 0,65$ ;  $p < 0,05$ ) у ротовій рідині. На підставі цього ми дісталися висновку про діагностичне значення активності даних ММП переважно на ранніх етапах розвитку захворювання.

Для хворих на генералізований пародонтит I-II ступеня тяжкості значущі прямі кореляційні зв'язки розраховано між CRITN та BMD, а також концентрацією TRAP у ротовій рідині ( $r_s=0,71$ ;  $p<0,05$ ).

Більш того, кореляційний аналіз отриманих даних дозволив виявити значущі прямі кореляційні зв'язки між рівнем ММП та інтерлейкінів, що підтверджує пролонговану дію останніх щодо активації продукції ММП сполучнотканинними клітинами, яка супроводжується їх достовірним збільшенням у хворих на початку захворювання з подальшим уповільненням зростання значень.

Зазначимо, що статистично значущих залежностей між активністю ММП та показниками кісткового метаболізму не виявлено.

Таким чином, за результатами біохімічних досліджень нами встановлено, що розвиток запально-деструктивного процесу в тканинах пародонта характеризується зростанням у ротовій рідині рівнів ММП та прозапальних цитокінів IL-1 $\beta$  та IL-6, а також зменшенням концентрації TIMP-1 та протизапального інтерлейкіну IL-4. При цьому вміст маркерів кісткового метаболізму не змінюється.

Прогресування запального процесу в деструктивний в хворих з I-II ступенем тяжкості генералізованого пародонтиту супроводжується подальшим зростанням у ротовій рідині рівня прозапальних інтерлейкінів, а також збільшенням вмісту тартратрезистентної кислоти фосфатази на тлі зменшення кісткової лужної фосфатази та остеокальцину, тоді як достовірного зростання ММП не реєструється.

Вміст ММП у ротовій рідині найбільше корелює з показниками інтерлейкінів, особливо в хворих із гінгівітом та пародонтитом на початкових стадіях. Значущої кореляції з показниками клінічної індексної оцінки стану тканин пародонта та маркерами кісткового метаболізму не встановлено.

Таким чином, згідно наших спостережень рівень експресії ММП є прогностичною ознакою генералізованого пародонтиту на початкових стадіях розвитку запально-деструктивного процесу, проте не є показовим щодо тяжкості перебігу захворювання.

Встановлений дисбаланс між зростанням ММП та зменшенням TIMP-1 у ротовій рідині вказує на доцільність застосування інгібіторів матриксних

металопротеїназ у комплексному лікуванні захворювання на стадії гінгівіту та на початкових стадіях пародонтиту. При цьому найбільш показовими для оцінки отриманого лікувального ефекту слід вважати вміст ММП-8 та ММП-9 у ротовій рідині.

Аналізуючи надалі результати імуногістохімічних досліджень, зокрема при оцінці цитоплазматичної експресії ММП-1 в епітеліальних та стромальних клітинах, встановлено, що в здорових осіб у 30,0 % спостережень відзначалась її нульова градація (0), у 60,0 % – слабка (+1), у 10,0 % – помірна (+2). В основній групі випадків нульового результату не спостерігалось, слабка (+1) експресія маркера ММП-1 зареєстрована у 23,3 % хворих, помірна (+2) – у 60,0 %, висока (+3) – у 16,7 %. Отже, експресія маркера ММП-1 продемонструвала достовірну різницю значень у залежності від клініко-морфологічних характеристик біоптату ( $p < 0,05$ ). Таким чином, збільшення активності ММП-1 відповідає розвитку запально-деструктивних явищ у навколорубних тканинах. Також у хворих основної групи зареєстровано збільшення експресії маркера запалення COX-2 в запальному інфільтраті. Одночасно, якщо в усіх осіб з інтактним пародонтом експресія маркера запалення COX-2 визначена як слабка (+1), то в хворих на пародонтит у 80,0 % випадках виявлена помірна експресія (+2), а в 20,0 % – висока (+3).

У зразках ясен найвищі показники експресії пов'язаних між собою маркерів апоптозу – ефекторної каспази-3 та онкопротеїну-супресору p 21 – також спостерігали в хворих на генералізований пародонтит у клітинах запального інфільтрату строми та в епітеліоцитах багат шарового плоского епітелію. Контрольна група показала у всіх випадках відсутність (0) експресії маркера каспази-3 та 100 % слабку (+1) експресію для маркера p 21. У хворих на пародонтит із основної групи для каспази-3 градація цитоплазматичного маркера (0) встановлена в 46,7 % випадків, а (+1) – у 53,3%. Для онкопротеїну-супресору p 21 у 40,0 % визначена слабка (+1) експресія, у 40,0 % – помірна (+2), у решти 20,0 % – висока (+3). Таким чином, дані маркери виявилися показовими щодо розвитку запально-деструктивного процесу в пародонтальних тканинах ( $p < 0,05$ ).

На відміну від маркерів апоптозу каспази-3 та p 21, які активно виділялися клітинами запального інфільтрату, для p 53 та Vc1-2 позитивна імуногістохімічна реакція спостерігалася переважно в базальному шарі багатошарового плоского епітелію. В контрольній групі в 40,0% спостережень експресія p53 не виявлена, а в 60,0 % – встановлений її слабкий рівень (+1). В основній групі в 36,7 % хворих визначена нульова градація даного маркера, в 63,3 % – слабка (+1). Таким чином, достовірних відмінностей між даними маркерами для дослідних груп не зареєстровано.

Антиапоптотичний білок Vc1-2 продемонстрував зниження експресії в хворих на пародонтит у порівнянні зі здоровими ( $p < 0,05$ ). Так, в осіб зі здоровим пародонтом нульова (0) градація зареєстрована в 20,0 % випадків, слабка (+1) – у решти 80,0 %. У 60,0 % хворих на генералізований пародонтит зареєстрований нульовий (0) рівень експресії маркера Vc1-2, а в 40,0 % – слабкий (+1).

Таким чином, отримані результати імуногістохімічних досліджень показали, що найбільш показовими щодо перебігу запально-деструктивного процесу в тканинах пародонта виявилися маркери запалення COX-2 та MMP-1, а також маркери апоптозу каспази-3 та p 21.

Отже, отримані результати біохімічного та імуногістохімічного дослідження дозволили проведення клінічної апробації препаратів-інгібіторів матриксних металопротеїназ у комплексному лікуванні захворювання із застосуванням найбільш показових біомаркерів, до яких відносяться рівні MMP-8 та MMP-9 в ротовій рідині, а також вміст MMP-1 в біоптатах ясен.

При проведенні клінічної апробації в хворих обох дослідних груп досягнений подібний терапевтичний ефект: запальні явища в тканинах пародонта усунені приблизно в однаковий термін, що проявлялося зникненням болісних відчуттів, кровоточивості, почервоніння ясен, а також відновленням їхнього рельєфу та щільності; у випадках генералізованого пародонтиту – припиненням ексудації із зубоясенних кишень. Зазначимо, що повне усунення запальних явищ у тканинах пародонта вдалося досягти в 93,3 % пацієнтів у групі зіставлення на 12-14 день лікування та в 96,7 % – в основній групі на 10-12 день.

При клінічному обстеженні хворих по закінченню тримісячного курсу лікування (найближчий термін) визначався блідо-рожевий колір слизової, щільне охоплення яснами шийок зубів, відсутність зубних відкладень та кровоточивості ясен при зондуванні. У хворих на генералізований пародонтит I-II ступеня спостерігали подібне зменшення глибини пародонтальних кишень у хворих в основній групі (з  $5,63 \pm 0,12$  мм до лікування до  $3,20 \pm 0,07$  мм після,  $p > 0,05$ ) та в групі зіставлення (з  $5,70 \pm 0,12$  мм до  $3,34 \pm 0,08$  мм,  $p > 0,05$ ).

Спрощений індекс гігієни порожнини рота (ОHI-S), що складається з індексу зубного нальоту (DI-S) та індексу зубного каменю (CI-S), знизився в пацієнтів обох дослідних груп ( $p < 0,001$ ) і залишався на рівні, що відповідає доброму стану гігієни ротової порожнини, протягом року.

По закінченню лікувальних курсів також встановлене зменшення рівня гінгівального індексу в обох групах ( $p < 0,001$ ). Проте збереження отриманих значень у віддалений термін спостереження в більшій мірі було характерним для пацієнтів основної групи. Особливо добрих результатів вдалося досягнути для хворих основної групи із гінгівітом та початковими стадіями генералізованого пародонтиту, в яких як у найближчий, так і у віддалений термін спостереження отримані значення індексу РМА були практично однаковими, що свідчить про повне та довготривале усунення запального та пов'язаного із ним деструктивного процесів у тканинах пародонта, тобто достовірну тривалу ремісію захворювання ( $p > 0,05$ ).

Дані висновки щодо динаміки гінгівального індексу в дослідних групах були підтвержені результатами вивчення комплексного пародонтального індексу СРІТН у різний термін після проведеного лікування. Його значення достовірно зменшувалися в обох дослідних групах у найближчий термін після лікування ( $p < 0,05$ ). Тоді як через рік у хворих основної групи отримані результати зберігалися, а в групі зіставлення – знижувалися ( $p < 0,05$ ). При порівнянні значень СРІТН для хворих основної та групи зіставлення у віддалений термін спостереження встановлена достовірна різниця (при гінгівіті та генералізованому пародонтиті початкового ступеня –  $p < 0,001$ , при генералізованому пародонтиті I-II ступеня –  $p < 0,05$ ).



Збереження запальних явищ у пародонті, зокрема набряку ясен, пов'язано із більшою глибиною пародонтальних кишень у хворих на генералізований пародонтит I-II ступеня тяжкості з групи зіставлення ( $3,52 \pm 0,09$  мм проти  $3,22 \pm 0,07$  мм основної групи,  $p < 0,05$ ).

Суттєвим є те, що через рік після проведеного лікування кращі результати вимірювання мінеральної щільності кісткової тканини також встановлені для хворих основної групи. Отримані показники практично не змінилися від вихідних значень, тоді як достовірне їх зменшення, зареєстроване в групі зіставлення, вказує на подальше прогресування патологічного процесу в тканинах пародонта в цього контингенту дослідних.

Таким чином, за даними клінічних спостережень у найближчий та віддалений терміни після лікування визначено достовірно більшу ефективність комплексного лікування, доповненого інгібіторами матриксних металопротеїназ, зокрема доксицикліну в субантимікробних дозах.

Результати клініко-рентгенологічного обстеження хворих були підтверджені даними лабораторних досліджень. У найближчий термін після проведеного лікування вдалося досягти достовірного зниження рівня ММП-8 та ММП-9 у ротовій рідині хворих обох дослідних груп. Проте в пацієнтів основної групи доповнення схеми лікування інгібіторами матриксних металопротеїназ призвело до збереження отриманого рівня ММП у віддалений термін, чого не спостерігалось у групі зіставлення. Подібна закономірність особливо помітна для показника вмісту ММП-8 у ротовій рідині хворих без деструктивних явищ у тканинах пародонта ( $p < 0,05$ ), в яких, на підставі тривалої нормалізації біохімічних маркерів запалення, можна говорити про стійку ремісію захворювання.

Збільшення активності ММП-1 у біоптатах ясен відповідає розвитку запально-деструктивного процесу в тканинах пародонта. Відповідно до цього при оцінці цитоплазматичної експресії ММП-1 в епітеліальних та стромальних клітинах встановлено, що у всіх дослідних хворих спостерігалась експресія маркера ММП-1: слабка (+1) у 23,3% хворих, помірна (+2) – у 60,0 %, висока (+3) – у 16,7 %. Тоді як після проведеного лікування нульовий результат зафіксований в 96,7 % хворих

основної групи та 80,0 % – у групі зіставлення (частка випадків з різним ступенем градації. Про збереження результатів лікування серед хворих основної групи свідчить відмінність характеру цитоплазматичної експресії ММП-1 в епітеліальних та стромальних клітинах у віддалений термін порівняно з групою зіставлення. Отже, застосування розробленого лікувального комплексу сприяло достовірно кращому результату лікування за показником вмісту ММП-1 у біоптатах ясен у різний термін спостереження.

Отже, застосування інгібіторів матриксних металопротеїназ у комплексному лікуванні генералізованого пародонтиту є ефективним для попередження прогресування запально-деструктивного процесу в тканинах пародонта, що було підтверджено даними клінічного, біохімічного та імуногістохімічного дослідження в найближчий та віддалений термін після проведеного лікування. Так, нами було зареєстровано зниження активності матриксних металопротеїназ ММП-1, ММП-8 та ММП-9, найбільш показових щодо перебігу захворювання. За рахунок дезактивації зазначених ферментів протеолізу відбувається гальмування запального процесу та розривається патогенетичний ланцюжок, в якому мікробний фактор провокує запалення, а продукти протеолізу, що утворюються, є поживним середовищем для нього.

Слід зазначити, що виявлені відмінності між основною та групою зіставлення найбільш прослідковуються для хворих із гінгівітом та пародонтитом початкового ступеня, без деструктивних явищ у тканинах пародонта ( $p < 0,05$ ), що дозволяє стверджувати про найбільшу ефективність запропонованої лікувальної схеми саме на початкових стадіях розвитку патологічного процесу.

Отримані результати роблять можливим рекомендувати інгібітори матриксних металопротеїназ, зокрема доксицикліну в субантимікробних дозах, насамперед, як превентивне патогенетичне лікування в хворих із гінгівітом та генералізованим пародонтитом початкового ступеня, коли суттєвих змін кісткової структури не відбулося, та превалює запальна компонента.

## ВИСНОВКИ

В дисертаційній роботі вирішено актуальне питання щодо підвищення ефективності комплексного лікування генералізованого пародонтиту шляхом застосування інгібіторів матриксних металопротеїназ

1. Початок запально-деструктивного процесу в тканинах пародонта при гінгівіті та на ранніх стадіях пародонтиту характеризується зростанням у ротовій рідині рівнів матриксних металопротеїназ та прозапальних цитокінів IL-1 $\beta$  та IL-6, а також зменшенням концентрації TIMP-1 та протизапального інтерлейкіну IL-4 ( $p < 0,05$ ). Прогресування запального процесу в деструктивний в хворих з I-II ступенем тяжкості пародонтиту супроводжується подальшим зростанням у ротовій рідині рівня прозапальних інтерлейкінів IL-1 $\beta$  та IL-6, а також збільшенням вмісту тартратрезистентної кислоти фосфатази на тлі зменшення вмісту кісткової лужної фосфатази та остеокальцину, тоді як достовірного зростання матриксних металопротеїназ не реєструється. Вміст матриксних металопротеїназ у ротовій рідині найбільше корелює з показниками інтерлейкінів, проте значущої кореляції з маркерами кісткового метаболізму не встановлено ( $p > 0,05$ ).

2. За результатами імуногістохімічних досліджень найбільш показовими щодо перебігу генералізованого пародонтиту виявилися маркери запалення COX-2 та MMP-1, а також маркери апоптозу каспаза-3 та p 21 ( $p < 0,05$ ).

3. На підставі отриманих результатів біохімічних та імуногістохімічних досліджень комплексне лікування генералізованого пародонтиту, насамперед, у хворих із гінгівітом та генералізованим пародонтитом початкового ступеня, слід доповнити інгібіторами матриксних металопротеїназ, що дозволить гальмування запального процесу та розрив «хибного кола», в якому мікробний фактор провокує запалення, а продукти протеолізу, що утворюються, є поживним середовищем для нього.

4. У найближчий термін спостереження комплексне лікування хронічного дифузного гінгівіту та генералізованого пародонтиту хронічного перебігу із застосуванням інгібітору матриксних металопротеїназ доксицикліну в

субантимікробних дозах призводить до скорочення термінів ліквідації запальних процесів, нормалізації індексних показників стану пародонта, а також зниження активності матриксних металопротеїназ ММП-1, ММП-8 та ММП-9, найбільш показових щодо перебігу захворювання ( $p < 0,05$ ).

5. У віддалений термін після проведеного комплексного лікування хронічного дифузного гінгівіту та генералізованого пародонтиту хронічного перебігу, доповненого інгібітором матриксних металопротеїназ доксицикліном, реєструються вищі значення мінеральної щільності кісткової тканини щелеп, а також збереження рівня показників індексної оцінки стану пародонта та вмісту ММП у ротовій рідині та біоптатах ясен, що свідчить про стійку ремісію захворювання.

## ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

1. Для ранньої діагностики генералізованого пародонтиту, зокрема на початкових стадіях його розвитку, доцільно використовувати біохімічне дослідження ротової рідини на вміст ММП-8 та ММП-9.

2. Доцільним у діагностичних цілях при генералізованому пародонтиті використання гістохімічного дослідження біоптатів ясен щодо вмісту маркерів запалення СОХ-2 та ММП-1, а також маркерів апоптозу каспази-3 та р 21.

3. Хворим на хронічний катаральний гінгівіт та генералізований пародонтит, початкового ступеня, хронічного перебігу, ефективним є призначення доксицикліну по 20 мг 2 рази на день протягом 3 місяців

4. Для збільшення ефективності слід доповнювати комплексне лікування генералізованого пародонтиту I-II ступеня інгібіторами матриксних металопротеїназ, зокрема препаратом доксицикліном по 20 мг 2 рази на день протягом 3 місяців.

5. В якості критеріїв успішності лікування хронічного дифузного гінгівіту та генералізованого пародонтиту хронічного перебігу доцільно застосовувати біохімічне дослідження рівнів ММП-8 та ММП-9 у ротовій рідині, а також імуногістохімічне вивчення вмісту ММП-1 у біоптатах ясен.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Авдєєв ОВ. Ступінь активності фосфатаз при експериментальному пародонтиті та за його корекції. Клінічна стоматологія. 2013; 3-4: 13-17. doi: 10.11603/2311-9624.2013.3\_4.2464.
2. Антомонов МЮ. Математическая обработка и анализ медико-биологических данных. Киев: [б.и.], 2017. 558 с.
3. Балмасова ИП, Шестакова ИВ, Ющук НД. Современные методы лабораторной диагностики и биомаркеры инфекционно-воспалительных заболеваний полости рта на примере хронического пародонтита. Российская стоматология. 2013; 2: 35-41.
4. Борзикова НС. Маркеры воспалительных процессов при болезнях пародонта. Медицинский совет. 2015; 2: 78-80. doi:10.21518/2079-701X-2015-2-78-79.
5. Борисенко АВ, Коленко ЮГ, Тімохіна ТО. Порушення місцевого імунітету та цитокінового статусу у хворих на генералізований пародонтит. Сучасна стоматологія. 2019; 1: 34-36.
6. Васильева НА, Булгакова АИ, Имельбаева ЭА, Васильев ЭА. Оценка локального иммунитета полости рта при традиционной терапии воспалительных заболеваний пародонта. Проблемы стоматологии. 2018; 14 (3): 11-16. doi: 10.24412/2311-1623-2019-23-28-33.
7. Возна ІВ, Самойленко АВ, Павлов СВ. Вивчення вмісту біохімічних маркерів метаболізму кісткової тканини в ротовій рідині хворих на генералізований пародонтит. Український стоматологічний альманах. 2020; 4: 10-14.
8. Глазунов ОА, Крячкова ЛВ, Фесенко ДВ. Оцінка предикторів довготривалого ефекту комплексного лікування пародонтиту у хворих на ревматоїдний артрит. Вісник стоматології. 2019; 4 (109): 11–16. doi: 10.35220/2078-8916-201934-4-12-16.
9. Годована О. Сучасні аспекти ролі глікозаміногліканів екстрацелюлярного матриксу у розвитку генералізованого пародонтиту та перебігу процесів репарації. Праці Наукового товариства ім. Шевченка. Медичні науки. 2017. 2: 34-47.

10. Гударьян АА. Состояние костного метаболизма у больных с различными вариантами течения генерализованного пародонтита. Вісник проблем біології і медицини. 2020; 3: 314-317. doi: 10.29254/2077-4214-2020-3-157-314-318.
11. Гутарова НВ. Роль матриксної металопротеїнази-8 в діагностиці запальних захворювань пародонта при ортодонтичному лікуванні незнімною апаратурою. Інновації в стоматології. 2021; 1: 42-45. doi: 10.35220/2523-420X/2019.1.9
12. Данилевський МФ, Борисенко АВ, Антоненко МЮ. Терапевтична стоматологія / за ред. А. В. Борисенка. Київ: ВСВ «Медицина», 2018. Т. 3: Захворювання пародонта. 624 с.
13. Демкович АЄ. Порушення імунологічної реактивності організму в патогенезі запальних захворювань пародонта. Клінічна стоматологія. 2015; 2: 30-37.
14. Дзампаева ЖВ Особенности этиологии и патогенеза воспалительных заболеваний пародонта. Кубанский научный медицинский вестник. 2017; 5: 103-110.
15. Дзюба ЕВ, Нагаева МО, Жданова ЕВ. Роль иммунологических процессов в развитии воспалительных заболеваний пародонта и возможности их коррекции. Проблемы стоматологии. 2019; 15 (2): 25-31. doi: 10.18481/2077-7566-2019-15-2-25-31.
16. Жигулина ВВ, Румянцев ВА. Матриксные металлопротеиназы при пародонтите. Вестник ТвГУ. 2016; 3:134-144.
17. Зубачик ВМ, Федун ІР. Біохімічні показники ротової рідини у наркозалежних хворих на хронічний генералізований пародонтит. Клінічна стоматологія. 2017; 2: 9-14. doi: 10.11603/2311-9624.2017.2.7741.
18. Ігнат'єв ОМ, Єрмоленко ТО, Турчин МІ, Панюта ОІ, Прутіян ТЛ. Маркери метаболізму кісткової тканини. Вісник морської медицини. 2020; 2(87): 127-148. doi: 10.5281/zenodo.3976574.
19. Казеко ЛА, Захарова ВА, Анфиногенова ЕА, Черствый ЕД. Значение экспрессии матриксных металлопротеиназ в дифференциальной диагностике патологии пародонта. Архив патологии. 2021; 83(3): 20-29. doi: 10.17116/patol20218303120.

20. Карнаух СО. Перспективи застосування біохімічних маркерів ротової рідини для діагностики генералізованого пародонтиту. Мат. Всеукр. наук.-практ. конф. «Сучасні принципи планування стоматологічного лікування». Запоріжжя. 2016. С. 62-63.
21. Карпук ІЮ. Значение матриксных металлопротеиназ-8 и -9 в развитии алергопатологии слизистой оболочки полости рта, вызванной непереносимостью зубопротезных материалов. Вестник ВГМУ. 2015; 2: 89-96.
22. Ковалишин ХВ, Рожко ММ. Клінічні прояви захворювань тканин пародонта у хворих на ревматоїдний артрит, які мешкають на антропогенно навантажених територіях. Галицький лікарський вісник. 2020; 3: 4-8.
23. Кушлинский НЕ, Соловых ЕА, Караогланова ТБ, Баяр УС, Герштейн ЕС, Трошин АА, Максимовская ЛН, Янушевич ОО. Матриксные металлопротеиназы и их тканевые ингибиторы в ротовой жидкости больных хроническим генерализованным пародонтитом с различными конструкционными материалами реставраций зубов и зубных рядов. Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2012; 10: 47-51.
24. Мазур ІП, Білозецький ІІ. Особливості перебігу генералізованого пародонтиту при ревматоїдному артриті. Український ревматологічний журнал. 2014; 3(57): 59-63.
25. Олейник ОІ, Сущенко АВ, Кубышкина КП, Глазьев ВК. Формирование комплекса методов диагностики и прогнозирования развития воспалительных заболеваний пародонта в рамках программы индивидуальной профилактики. Вестник новых медицинских технологий. 2016; 10 (3): 200-205.
26. Островский АВ. Биохимические показатели ротовой жидкости у больных хроническим катаральным гингивитом и генерализованным пародонтитом начальной и І степени. Вісник проблем біології і медицини. 2014; 2 (108): 56-57.
27. Ошноков АК, Брагин ЕА, Барычева ЛЮ, Хараева ЗФ. Роль провоспалительных цитокинов в развитии хронического пародонтита. Медицинский вестник Северного Кавказа. 2014; 4: 380-338.



28. Потапчук АМ, Онішко ЄЛ, Сабов МЮ, Алмаші ВМ, Юрженко АВ, Стецик МО. Біомаркери в діагностиці хвороб пародонта. Клінічна стоматологія. 2019. 2; 19-25. doi: 10.11603/2311-9624.2019.2.10395.
29. Рожко ПД, Деньга ОВ, Вербицька ТГ, Шнайдер СА, Бубнов ВВ. Метилування промоторів генів IL-6 і MMP-13 у пацієнтів з метаболічним синдромом та цукровим діабетом 2 типу на фоні хронічного пародонтиту. Інновації в стоматології. 2020; 2: 59-66. doi: 10.35220/2523-420X/2020.1.13.
30. Романюк ВМ. Лікувально-діагностичне значення молекулярно-біохімічних маркерів у хворих на генералізований пародонтит I-III ступеня тяжкості та дефектами зубних рядів. Вісник проблем біології і медицини. 2022; 2 (165); 231-241. doi: 10.29254/2077-4214-2022-2-2-165-231-241.
31. Румянцев ВА, Жигулина ВВ. Матриксные металлопротеиназы, их роль в развитии пародонтита. Актуальные проблемы гуманитарных и естественных наук. 2014; 8: 321-327.
32. Самойленко АВ, Тітовська СО. Матриксні металопротеїнази в ротовій рідині як характеристика запально-деструктивного процесу в тканинах пародонта. Медичні перспективи. 2022; 3: 127-134.
33. Самойленко АВ, Шпонька ІС, Горшкова АЄ, Пославська ОВ, Карнаух СО. Імуногістохімічне дослідження маркерів апоптозу та запалення в тканинах пародонта у хворих на генералізований пародонтит. Морфологія. 2013; 3: 101-107.
34. Сидельникова ЛФ, Дикова ИГ, Захарова СМ. Обоснование и оценка эффективности системной антибактериальной терапии генерализованного пародонтита у пациентов с сахарным диабетом. Сучасна стоматологія. 2020; 3: 28–33. doi: 10.33295/1992-576X-2020-3-28.
35. Соловых ЕА, Караогланова ТБ, Кушлинский НЕ, Янушевич ОО. Матриксные металлопротеиназы и воспалительные цитокины в ротовой жидкости больных хроническим генерализованным пародонтитом с различными конструкционными материалами реставраций зубов и зубных рядов. Клиническая лабораторная диагностика. 2013; 10: 18-21.

36. Тітовська СО. Імуногістохімічне дослідження маркерів апоптозу в біоптатах ясен у хворих на генералізований пародонтит. Зб. тез VI Всеукр. наук.-практ. конф. «Стоматологія Придніпров'я 2020». Запоріжжя. 2020. С. 31-34.
37. Тітовська СО. Маркери апоптозу та запалення в діагностиці генералізованого пародонтиту. Зб. наук. праць V міжнародн. наук.-практ. конф. «Стоматологія Придніпров'я». Україна, Дніпропетровськ-Запоріжжя. 2019. С.174-176.
38. Тітовська СО. Ефективність застосування інгібіторів матриксних металопротеїназ для превентивного лікування генералізованого пародонтиту. Український стоматологічний альманах. 2022; 2: 10-15.
39. Фастовець ОО, Лукаш АЮ. Матриксна металопротеїназа-8 в ранній діагностиці генералізованого пародонтиту. Запорізький медичний журнал. 2018; 5 (110): 723-728. doi: 10.14739/23101210.2018.5.141686.
40. Фастовець ОО, Лукаш АО. Дослідження рівня матриксних металопротеїназ у хворих на генералізований пародонтит у динаміці лікування. Oral and General Health. 2021; 3:75.
41. Черемісіна ВФ, Березнякова АІ. Функціональна активність тромбоцитарної ланки гемостазу при експериментальному моделюванні гінгівіту та альвеоліту. Клінічна та експериментальна патологія. 2017; 4 (62): 97–102. doi: 10.24061/1727-4338.XVI.4.62.2017.60
42. Шадріна АС, Плиева ЯЗ, Кушлинский ДН, Морозов АА, Филипенко МЛ, Чанг ВЛ, Кушлинский НЕ. Классификация, регуляция активности, генетический полиморфизм матриксных металлопротеиназ в норме и при патологии. Альманах клинической медицины. 2017; 45 (4): 266-279. doi: 10.18786/2072-0505-2017-45-4-266-279.
43. Шинкаренко ТВ, Румянцев ВА, Егорова ЕН, Елисеева ТИ. Матриксные металлопротеиназы при заболеваниях пародонта. Стоматология 2013; 2: 77-80.
44. Шинкевич ВІ. Роль поліморфізмів матриксних металопротеїназ при системних хронічних запальних захворюваннях і хронічному пародонтиті. Проблемы экологии и медицины. 2013. 17 (1-2): 24-29.

45. Ярмолинская МИ, Молотков АС, Денисова ВМ. Матриксные металлопротеиназы и ингибиторы: классификация, механизм действия. Журнал акушерства и женских болезней. 2012; 61 (1): 113-125.
46. Яров ЮЮ. Сучасні принципи і засоби лікування медикаментозного лікування при генералізованому пародонтиті. Клінічна стоматологія. 2020; 4: 64-72. doi: 10.11603/2311-9624.2020.4.11720.
47. Abdulkareem A, Abdulbaqi H, Gul S, Milward M, Chasib N, Alhashimi R. Classic vs. novel antibacterial approaches for fradicating dental biofilm as adjunct to periodontal debridement: an evidence-based overview. *Antibiotics (Basel)*. 2021; 11 (1): 9. doi: 10.3390/antibiotics11010009.
48. Abusleme L, Hoare A, Hong BY, Diaz PI. Microbial signatures of health, gingivitis, and periodontitis. *Periodontol 2000*. 2021; 86 (1): 57-78. doi: 10.1111/prd.12362.
49. Agarwal A. Pleiotropy of chemically modified tetracycline in periodontitis. *J Pharm Bioallied Sci*. 2013; 5 (3): 242-243. doi: 10.4103/0975-7406.116831.
50. Ahmadi H, Ebrahimi A, Ahmadi F. Antibiotic therapy in dentistry. *Int J Dent*. 2021; 6667624. doi: 10.1155/2021/6667624.
51. Alassiri S, Parnanen P, Rathnayake N, Johannsen G, Heikkinen AM, Lazzara R, van der Schoor P, van der Schoor JG, Tervahartiala T, Gieselmann D, Sorsa T. The ability of quantitative, specific, and sensitive point-of-care/chair-side oral fluid immunotests for aMMP-8 to detect periodontal and peri-implant diseases. *Dis Markers*. 2018; 1306396. doi: 10.1155/2018/1306396.
52. AlJasser R, AlAqeely R, AlZahrani A, AlKenani M, AlQahtani S, AlSarhan M, AlOtaibi D, Lambarte R. Antimicrobial effect of isotretinoin therapy on periodontal pathogens: a case-control study. *Antibiotics (Basel)*. 2021; 10 (11): 1286. doi: 10.3390/antibiotics10111286.
53. AlJasser RN, Alaqeely RS, Al-Hoqail IA, Al-Haddab M, AlQahtani SS, AlKenani ME, AlZahrani AM, AlOraini S. Association between isotretinoin (Roaccutane) use and changes in periodontal clinical parameters and MMP-8 and MMP-9 salivary levels. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2021; 26 (7): 191-197. doi: 10.52586/4933.

54. Al-Majid A, Alassiri S, Rathnayake N, Tervahartiala T, Gieselmann DR, Sorsa T. Matrix metalloproteinase-8 as an inflammatory and prevention biomarker in periodontal and peri-implant diseases. *Int J Dent*. 2018; 7891323. doi: 10.1155/2018/7891323.
55. Almeahadi AH, Alghamdi F. Biomarkers of alveolar bone resorption in gingival crevicular fluid: A systematic review. *Arch Oral Biol*. 2018; 93: 12-21. doi: 10.1016/j.archoralbio.
56. Alotaibi DH, Altalhi AM, Sambawa ZM, Koppolu P, Alsinaidi AA, Krishnan P. The association of matrix metalloproteinase gene polymorphisms and periodontitis: an overview. *J Pharm Bioallied Sci*. 2020; 12 (Suppl 1): 37-42. doi: 10.4103/jpbs.JPBS\_136\_20.
57. AlQranei MS, Chellaiah MA. Osteoclastogenesis in periodontal diseases: Possible mediators and mechanisms. *J Oral Biosci*. 2020; 62 (2): 123-130. doi: 10.1016/j.job.2020.02.002.
58. Altoé LS, Alves RS, Miranda LL, Sarandy MM, Bastos DSS, Gonçalves-Santos E, Novaes RD, Gonçalves RV. Doxycycline hyclate modulates antioxidant defenses, matrix metalloproteinases, and COX-2 activity accelerating skin wound healing by secondary intention in rats. *Oxid Med Cell Longev*. 2021; 4681041. doi: 10.1155/2021/4681041.
59. Arshad R, Ismail WA, Zara B, Naseer R, Minhas S, Ansari M, Akhter F, Khokhar SA, Alqahtani AA, Abutayyem H, Alswairki HJ, Alam MK. Salivary MMP-9 levels in chronic periodontitis patients with type-II diabetes mellitus. *Molecules*. 2022; 27 (7): 2174. doi: 10.3390/molecules27072174.
60. Arweiler NB, Netuschil L. The oral microbiota. *Adv Exp Med Biol*. 2016; 902: 45-60. doi: 10.1007/978-3-319-31248-4\_4.
61. Ateia IM, Sutthiboonyapan P, Kamarajan P, Jin T, Godovikova V, Kapila YL, Fenno JC. *Treponema denticola* increases MMP-2 expression and activation in the periodontium via reversible DNA and histone modifications. *Cell Microbiol*. 2018; 20 (4): 10.1111/cmi.12815. doi: 10.1111/cmi.12815.
62. Attia MS, Alblowi JA. Effect of subantimicrobial dose doxycycline treatment on gingival crevicular fluid levels of MMP-9 and MMP-13 in periodontitis stage 2, grade B in

- subjects with type 2 diabetes mellitus. *J Immunol Res.* 2020; 20: 2807259. doi: 10.1155/2020/2807259.
63. Äyräväinen L, Heikkinen AM, Kuuliala A, Ahola K, Koivuniemi R, Moilanen E, Hämäläinen M, Tervahartiala T, Meurman JH, Leirisalo-Repo M, Sorsa T. Anti-rheumatic medication and salivary MMP-8, a biomarker for periodontal disease. *Oral Dis.* 2018; 24 (8): 1562-1571. doi: 10.1111/odi.12930.
64. Baddam H, Vivekanandan G, Kondreddy K, Peddi S, Chitnis PP, Singh YP, Tiwar RVC. Evaluation of gingival crevicular fluid and serum tartrate-resistant acid phosphatase levels in subjects with clinically healthy periodontium and chronic periodontitis - a clinico-biochemical study. *J Pharm Bioallied Sci.* 2021; 13 (Suppl 2): 1275-1279. doi: 10.4103/jpbs.jpbs\_90\_21.
65. Baeza M, Garrido M, Hernández-Ríos P, Dezerega A, García-Sesnich J, Strauss F, Aitken JP, Lesaffre E, Vanbelle S, Gamonal J, Brignardello-Petersen R, Tervahartiala T, Sorsa T, Hernández M. Diagnostic accuracy for apical and chronic periodontitis biomarkers in gingival crevicular fluid: an exploratory study. *J Clin Periodontol.* 2016; 43 (1): 34-45. doi: 10.1111/jcpe.12479.
66. Bartold PM, Brooks PM, Carter CL, Gemmell E, Marshall RI, Seymour GJ. COX-1 and COX-2 in human periodontal disease states. *Australian Dental Journal.* 2003; 48: 12-15.
67. Bates AM, Fischer CL, Abhyankar VP, Johnson GK, Guthmiller JM, Progulsk-Fox A, Brogden KA. Matrix metalloproteinase response of dendritic cell, gingival epithelial keratinocyte, and T-Cell transwell co-cultures treated with porphyromonas gingivalis hemagglutinin-B. *Int J Mol Sci.* 2018; 19 (12): 3923. doi: 10.3390/ijms19123923.
68. Beck JD, Papananou PN, Philips KH, Offenbacher S. Periodontal medicine: 100 years of progress. *J Dent Res.* 2019; 98 (10): 1053-1062. doi: 10.1177/0022034519846113.
69. Blanco-Pintos T, Regueira-Iglesias A, Balsa-Castro C, Tomás I. Update on the role of cytokines as oral biomarkers in the diagnosis of periodontitis. *Adv Exp Med Biol.* 2022; 1373: 283-302. doi: 10.1007/978-3-030-96881-6\_15.

70. Boelen GJ, Boute L, d'Hoop J, EzEldeen M, Lambrichts I, Opdenakker G. Matrix metalloproteinases and inhibitors in dentistry. *Clin Oral Investig.* 2019; 23 (7): 2823-2835. doi: 10.1007/s00784-019-02915-y.
71. Bostanci N, Mitsakakis K, Afacan B, Bao K, Johannsen B, Baumgartner D, Müller L, Kotolová H, Emingil G, Karpíšek M. Validation and verification of predictive salivary biomarkers for oral health. *Sci Rep.* 2021; 11 (1): 6406. doi: 10.1038/s41598-021-85120-w.
72. Buduneli E, Vardar S, Buduneli N, Berdeli AH, Türkoğlu O, Başkesen A, Atilla G. Effects of combined systemic administration of low-dose doxycycline and alendronate on endotoxin-induced periodontitis in rats. *J Periodontol.* 2014; 75 (11): 1516-1523. doi: 10.1902/jop.2004.75.11.1516.
73. Buduneli E, Vardar-Sengül S, Buduneli N, Atilla G, Wahlgren J, Sorsa T. Matrix metalloproteinases, tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1, and laminin-5 gamma2 chain immunolocalization in gingival tissue of endotoxin-induced periodontitis in rats: effects of low-dose doxycycline and alendronate. *J Periodontol.* 2007; 78 (1): 127-134. doi: 10.1902/jop.2007.050451.
74. Bui FQ, Almeida-da-Silva CLC, Huynh B, Trinh A, Liu J, Woodward J, Asadi H, Ojcius DM. Association between periodontal pathogens and systemic disease. *Biomed J.* 2019; 42 (1): 27-35. doi: 10.1016/j.bj.2018.12.001.
75. Bulut S, Uslu H, Ozdemir BH, Bulut O E. Expression of caspase-3, p53 and Bcl-2 in generalized aggressive periodontitis. *Head Face Med.* 2006; 2: 17. doi: 10.1186/1746-160X-2-17.
76. Cafiero C, Spagnuolo G, Marenzi G, Martuscelli R, Colamaio M, Leuci S. Predictive periodontitis: the most promising salivary biomarkers for early diagnosis of periodontitis. *J Clin Med.* 2021; 10 (7): 1488. doi: 10.3390/jcm10071488.
77. Caton J, Ryan ME. Clinical studies on the management of periodontal diseases utilizing subantimicrobial dose doxycycline (SDD). *Pharmacol Res.* 2011; 63 (2): 114-120. doi: 10.1016/j.phrs.2010.12.003.

78. Cazalis J, Bodet C, Gagnon G, Grenier D. Doxycycline reduces lipopolysaccharide-induced inflammatory mediator secretion in macrophage and ex vivo human whole blood models. *J Periodontol*. 2008; 79 (9): 1762-1768. doi: 10.1902/jop.2008.080051.
79. Cazalis J, Tanabe S, Gagnon G, Sorsa T, Grenier D. Tetracyclines and chemically modified tetracycline-3 (CMT-3) modulate cytokine secretion by lipopolysaccharide-stimulated whole blood. *Inflammation*. 2009; 32 (2): 130-137. doi: 10.1007/s10753-009-9111-9.
80. Che C, Liu J, Yang J, Ma L, Bai N, Zhang Q. Osteopontin is essential for IL-1 $\beta$  production and apoptosis in peri-implantitis. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2018; 20 (3): 384-392. doi: 10.1111/cid.12592.
81. Cekici A, Kantarci A, Hasturk H, Van Dyke TE. Inflammatory and immune pathways in the pathogenesis of periodontal disease. *Periodontol 2000*. 2014; 64 (1): 57-80. doi: 10.1111/prd.12002.
82. Checchi V, Maravic T, Bellini P, Generali L, Consolo U, Breschi L, Mazzoni A. The role of matrix metalloproteinases in periodontal disease. *Int J Environ Res Public Health*. 2020; 17 (14): 4923. doi: 10.3390/ijerph17144923.
83. Cheng R, Wu Z, Li M, Shao M, Hu T. Interleukin-1 $\beta$  is a potential therapeutic target for periodontitis: a narrative review. *Int J Oral Sci*. 2020; 12 (1): 2. doi: 10.1038/s41368-019-0068-8.
84. Cheng X, Zhou X, Liu C, Xu X. Oral osteomicrobiology: the role of oral microbiota in alveolar bone homeostasis. *Front Cell Infect Microbiol*. 2021; 11: 751503. doi: 10.3389/fcimb.2021.751503.
85. Chi M, Qi M, A L, Wang P, Weir MD, Melo MA, Sun X, Dong B, Li C, Wu J, Wang L, Xu HHK. Novel bioactive and therapeutic dental polymeric materials to inhibit periodontal pathogens and biofilms. *Int J Mol Sci*. 2019; 20 (2): 278. doi: 10.3390/ijms20020278.
86. Das AC, Das SJ, Panda S, Sharma D, Taschieri S, Fabbro MD. Adjunctive effect of doxycycline with conventional periodontal therapy on glycemic level for chronic periodontitis with type 2 diabetes mellitus subjects. *J Contemp Dent Pract*. 2019; 20 (12): 1417-1423.

87. de Brouwer P, Bikker FJ, Brand HS, Kaman WE. Is TIMP-1 a biomarker for periodontal disease? A systematic review and meta-analysis. *J Periodontal Res.* 2021. doi: 10.1111/jre.12957.
88. De Colli M, Tortorella P, Agamennone M, Campestre C, Loiodice F, Cataldi A, Zara S. Bisphosphonate matrix metalloproteinase inhibitors for the treatment of periodontitis: An in vitro study. *Int J Mol Med.* 2018; 42 (1): 651-657. doi: 10.3892/ijmm.2018.3641.
89. de Figueiredo FAT, Shimano RC, Ervolino E, Pitol DL, Gerlach RF, Issa JPM. Doxycycline reduces osteopenia in female rats. *Sci Rep.* 2019; 9 (1): 15316. doi: 10.1038/s41598-019-51702-y.
90. de Moraes EF, Pinheiro JC, Leite RB, Santos PPA, Barboza CAG, Freitas RA. Matrix metalloproteinase-8 levels in periodontal disease patients: A systematic review. *J Periodontal Res.* 2018; 53 (2): 156-163. doi: 10.1111/jre.12495.
91. de Smit MJ, Westra J, Posthumus MD, Springer G, van Winkelhoff AJ, Vissink A, Brouwer E, Bijl M. Effect of anti-rheumatic treatment on the periodontal condition of rheumatoid arthritis patients. *Int J Environ Res Public Health.* 2021; 18 (5): 2529. doi: 10.3390/ijerph18052529.
92. Deng K, Pelekos G, Jin L, Tonetti MS. Diagnostic accuracy of a point-of-care aMMP-8 test in the discrimination of periodontal health and disease. *J Clin Periodontol.* 2021; 48 (8): 1051-1065. doi: 10.1111/jcpe.13485.
93. Deng K, Wei S, Xu M, Shi J, Lai H, Tonetti MS. Diagnostic accuracy of active matrix metalloproteinase-8 point-of-care test for the discrimination of periodontal health status: comparison of saliva and oral rinse samples. *J Periodontal Res.* 2022. doi: 10.1111/jre.12999.
94. Di Stefano M, Polizzi A, Santonocito S, Romano A, Lombardi T, Isola G. Impact of oral microbiome in periodontal health and periodontitis: a critical review on prevention and treatment. *Int J Mol Sci.* 2022; 23 (9): 5142. doi: 10.3390/ijms23095142.
95. Elashiry M, Morandini AC, Cornelius Timothius CJ, Ghaly M, Cutler CW. Selective antimicrobial therapies for periodontitis: win the "battle and the war". *Int J Mol Sci.* 2021; 22 (12): 6459. doi: 10.3390/ijms22126459.



96. Emingil G, Atilla G, Sorsa T, Savolainen P, Baylas H. Effectiveness of adjunctive low-dose doxycycline therapy on clinical parameters and gingival crevicular fluid laminin-5 gamma2 chain levels in chronic periodontitis. *J Periodontol*. 2004; 75 (10): 1387-1396. doi: 10.1902/jop.2004.75.10.1387.
97. Emingil G, Gürkan A, Tervahartiala T, Hernandez M, Özgül S, Sorsa T, Alassiri S. Adjunctive effects of a sub-antimicrobial dose of doxycycline on clinical parameters and potential biomarkers of periodontal tissue catabolism. *Dent J (Basel)*. 2019; 7 (1): 9. doi: 10.3390/dj7010009.
98. Falcao A, Bullón P. A review of the influence of periodontal treatment in systemic diseases. *Periodontol 2000*. 2019; 79 (1): 117-128. doi: 10.1111/prd.12249.
99. Fastovets OO, Masheiko IV, Lucash AY. Evaluation of bone resorptive potential in the treatment of generalized periodontitis. *Wiad Lek*. 2020; 73 (11): 2396-2402. doi: 10.36740/WLek202011112.
100. Fatemi K, Rezaee SA, Banihashem SA, Keyvanfar S, Eslami M. Importance of MMP-8 in salivary and gingival crevicular fluids of periodontitis patients. *Iran J Immunol*. 2020; 17 (3): 236-243. doi: 10.22034/iji.2020.81170.1512.
101. Fatima T, Khurshid Z, Rehman A, Imran E, Srivastava KC, Shrivastava D. Gingival crevicular fluid (GCF): a diagnostic tool for the detection of periodontal health and diseases. *Molecules*. 2021; 26 (5): 1208. doi: 10.3390/molecules26051208.
102. Ferreira Junior NC, Dos Santos Pereira M, Francis N, Ramirez P, Martorell P, González-Lizarraga F, Figadère B, Chehin R, Del Bel E, Raisman-Vozari R, Michel PP. The chemically-modified tetracycline COL-3 and its parent compound doxycycline prevent microglial inflammatory responses by reducing glucose-mediated oxidative stress. *Cells*. 2021; 10 (8): 2163. doi: 10.3390/cells10082163.
103. Fischer RG, Gomes Filho IS, Cruz SSD, Oliveira VB, Lira-Junior R, Scannapieco FA, Rego RO. What is the future of periodontal medicine? *Braz Oral Res*. 2021; 35 (Supp 2): 102. doi: 10.1590/1807-3107bor-2021.vol35.0102.
104. Florou DT, Mavropoulos A, Dardiotis E, Tsimourtou V, Siokas V, Aloizou AM, Liaskos C, Tsigalou C, Katsiari C, Sakkas LI, Hadjigeorgiou G, Bogdanos DP. Tetracyclines diminish in vitro IFN- $\gamma$  and IL-17-producing adaptive and innate immune

cells in multiple sclerosis. *Front Immunol.* 2021; 12: 739186. doi: 10.3389/fimmu.2021.739186.

105. Fowlkes JL, Nyman JS, Bunn RC, Cockrell GE, Wahl EC, Rettiganti MR, Lumpkin CK Jr, Thrailkill KM. Effects of long-term doxycycline on bone quality and strength in diabetic male DBA/2J mice. *Bone Rep.* 2015; 1: 16-19. doi: 10.1016/j.bonr.2014.10.001.

106. Franco GC, Kajiya M, Nakanishi T, Ohta K, Rosalen PL, Groppo FC, Ernst CW, Boyesen JL, Bartlett JD, Stashenko P, Taubman MA, Kawai T. Inhibition of matrix metalloproteinase-9 activity by doxycycline ameliorates RANK ligand-induced osteoclast differentiation in vitro and in vivo. *Exp Cell Res.* 2011; 317 (10): 1454-1464. doi: 10.1016/j.yexcr.2011.03.014.

107. Gamonal J, Sanz M, O'Connor A, Acevedo A, Suarez I, Sanz A, Martínez B, Silva A. Delayed neutrophil apoptosis in chronic periodontitis patients. *Journal of Clinical Periodontology*, 2003; 30 (7): 616-623. doi: 10.1034/j.1600-051x.2003.00350.

108. Ganther S, Radaic A, Malone E, Kamarajan P, Chang NN, Tafolla C, Zhan L, Fenno JC, Kapila YL. *Treponema denticola* dentilisin triggered TLR2/MyD88 activation upregulates a tissue destructive program involving MMPs via Sp1 in human oral cells. *PLoS Pathog.* 2021; 17 (7): 1009311. doi: 10.1371/journal.ppat.1009311.

109. Gao J, Nanayakkara S. Host-derived salivary biomarkers demonstrate potential for the diagnosis of periodontal diseases. *J Evid Based Dent Pract.* 2022; 22 (1): 101689. doi: 10.1016/j.jebdp.2021.101689.

110. Ghalayani P, Minaiyan M, Razavi SM, Hajisadeghi S, Naghsh N, Abuie MS. Effects of diclofenac and celecoxib on osteoclastogenesis during alveolar bone healing, in vivo. *Dent Res J (Isfahan).* 2014; 11 (3): 357-363.

111. Ghallab NA. Diagnostic potential and future directions of biomarkers in gingival crevicular fluid and saliva of periodontal diseases: Review of the current evidence. *Arch Oral Biol.* 2018; 87: 115-124. doi: 10.1016/j.archoralbio.2017.12.022.

112. Ghosh P, Muthuraj TS, Bandyopadhyay P, Swarnakar S, Sarkar P, Varatharajan A. Expression of matrix metalloproteinase-9 in gingival tissue biopsy in patients with slowly/moderately and rapidly progressing periodontitis: An observational study. *J Indian Soc Periodontol.* 2021; 25 (5): 386-392. doi: 10.4103/jisp.jisp\_811\_20.

113. Gilowski L, Wiench R, Płocica I, Krzemiński TF. Amount of interleukin-1 $\beta$  and interleukin-1 receptor antagonist in periodontitis and healthy patients. *Arch Oral Biol.* 2014; 59 (7): 729-734. doi: 10.1016/j.archoralbio.2014.04.007.
114. Goetting-Minesky MP, Godovikova V, Fenno JC. Approaches to understanding mechanisms of dentilisin protease complex expression in *Treponema denticola*. *Front Cell Infect Microbiol.* 2021; 11: 668287. doi: 10.3389/fcimb.2021.668287.
115. Golub LM, Elburki MS, Walker C, Ryan M, Sorsa T, Tenenbaum H, Goldberg M, Wolff M, Gu Y. Non-antibacterial tetracycline formulations: host-modulators in the treatment of periodontitis and relevant systemic diseases. *Int Dent J.* 2016; 66 (3): 127-135. doi: 10.1111/idj.12221.
116. Golub LM, Lee HM. Periodontal therapeutics: Current host-modulation agents and future directions. *Periodontol 2000.* 2020; 82 (1): 186-204. doi: 10.1111/prd.12315.
117. Groeger S, Meyle J. Oral mucosal epithelial cells. *Front Immunology.* 2019; 10: 208. doi: 10.3389/fimmu.2019.00208.
118. Gruber R. Osteoimmunology: Inflammatory osteolysis and regeneration of the alveolar bone. *J Clin Periodontol.* 2019; 46 Suppl 21: 52-69. doi: 10.1111/jcpe.13056.
119. Gu Y, Lee HM, Simon SR, Golub LM. Chemically modified tetracycline-3 (CMT-3): a novel inhibitor of the serine proteinase, elastase. *Pharmacol Res.* 2011; 64 (6): 595-601. doi: 10.1016/j.phrs.2011.05.011.
120. Gu Y, Lee HM, Sorsa T, Salminen A, Ryan ME, Slepian MJ, Golub LM. Non-antibacterial tetracyclines modulate mediators of periodontitis and atherosclerotic cardiovascular disease: a mechanistic link between local and systemic inflammation. *Pharmacol Res.* 2011; 64 (6): 573-579. doi: 10.1016/j.phrs.2011.06.023.
121. Guimaraes-Stabili MR, de Medeiros MC, Rossi D, Camilli AC, Zanelli CF, Valentini SR, Spolidorio LC, Kirkwood KL, Rossa C Jr. Silencing matrix metalloproteinase-13 (Mmp-13) reduces inflammatory bone resorption associated with LPS-induced periodontal disease in vivo. *Clin Oral Investig.* 2021; 25 (5): 3161-3172. doi: 10.1007/s00784-020-03644-3.
122. Guízar-Mendoza JM, López-Ayuso CA, Anguiano-Flores L, Fajardo-Araujo ME, Amador-Licona N. Correlation between interleukin-1 $\beta$  and matrix metalloproteinase-1

levels in crevicular fluid with a proposed periodontal disease index in children. *J Indian Soc Periodontol.* 2018; 22 (3): 209-214. doi: 10.4103/jisp.jisp\_383\_17.

123. Gul SS, Abdulkareem AA, Sha AM, Rawlinson A. Diagnostic accuracy of oral fluids biomarker profile to determine the current and future status of periodontal and peri-implant diseases. *Diagnostics (Basel).* 2020; 10 (10): 838. doi: 10.3390/diagnostics10100838.

124. Gul SS, Zardawi FM, Abdulkareem AA, Shaikh MS, Al-Rawi NH, Zafar MS. Efficacy of MMP-8 level in gingival crevicular fluid to predict the outcome of nonsurgical periodontal treatment: a systematic review. *Int J Environ Res Public Health.* 2022; 19 (5): 3131. doi: 10.3390/ijerph19053131.

125. Guo J, Zeng X, Miao J, Liu C, Wei F, Liu D, Zheng Z, Ting K, Wang C, Liu Y. MiRNA-218 regulates osteoclast differentiation and inflammation response in periodontitis rats through MMP 9. *Cell Microbiol.* 2019; 21 (4): 12979. doi: 10.1111/cmi.12979.

126. Gupta S, Chhina S, Arora SA. A systematic review of biomarkers of gingival crevicular fluid: Their predictive role in diagnosis of periodontal disease status. *J Oral Biol Craniofac Res.* 2018; 8 (2): 98-104. doi: 10.1016/j.jobcr.2018.02.002.

127. Gürsoy UK, Könönen E, Huumonen S, Tervahartiala T. Salivary type I collagen degradation endproducts and related matrix metalloproteinases in periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2013; 40 (1): 18-25.

128. Gürsoy UK, Könönen E, Tervahartiala T, Gürsoy M, Pitkänen J, Torvi P, Suominen AL, Pussinen P, Sorsa T. Molecular forms and fragments of salivary MMP-8 in relation to periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2018; 45 (12): 1421-1428. doi: 10.1111/jcpe.13024.

129. Guru SR, Kothiwale SV, Saroch N, Guru RC. Comparative evaluation of inhibitory effect of curcumin and doxycycline on matrix metalloproteinase-9 activity in chronic periodontitis. *Indian J Dent Res.* 2017; 28 (5): 560-565. doi: 10.4103/ijdr.IJDR\_461\_16.

130. Hajishengallis G, Korostoff JM. Revisiting the Page & Schroeder model: the good, the bad and the unknowns in the periodontal host response 40 years later. *Periodontol 2000.* 2017; 75 (1): 116-151. doi: 10.1111/prd.12181.

131. Hathaway-Schrader JD, Novince CM. Maintaining homeostatic control of periodontal bone tissue. *Periodontol 2000*. 2021; 86 (1): 157-187. doi: 10.1111/prd.12368.
132. He W, You M, Wan W, Xu F, Li F, Li A. Point-of-care periodontitis testing: biomarkers, current technologies, and perspectives. *Trends Biotechnol*. 2018; 36 (11): 1127-1144. doi: 10.1016/j.tibtech.2018.05.013.
133. Hedayatyanfard K, Bagheri Khoulenjani S, Abdollahifar MA, Amani D, Habibi B, Zare F, Asadirad A, Pouriran R, Ziai SA. Chitosan/PVA/Doxycycline film and nanofiber accelerate diabetic wound healing in a rat model. *Iran J Pharm Res*. 2020; 19 (4): 225-239. doi: 10.22037/ijpr.2020.112620.13859.
134. Heikkinen AM, Räisänen IT, Tervahartiala T, Sorsa T. Cross-sectional analysis of risk factors for subclinical periodontitis; active matrix metalloproteinase-8 as a potential indicator in initial periodontitis in adolescents. *J Periodontol*. 2019; 90 (5): 484-492. doi: 10.1002/JPER.18-0450.
135. Hernández M, Baeza M, Contreras J, Sorsa T, Tervahartiala T, Valdés M, Chaparro A, Hernández-Ríos P. MMP-8, TRAP-5, and OPG Levels in GCF diagnostic potential to discriminate between healthy patients', mild and severe periodontitis sites. *Biomolecules*. 2020; 10 (11): 1500. doi: 10.3390/biom10111500.
136. Hernández M, Baeza M, Räisänen IT, Contreras J, Tervahartiala T, Chaparro A, Sorsa T, Hernández-Ríos P. Active MMP-8 quantitative test as an adjunctive tool for early diagnosis of periodontitis. *Diagnostics (Basel)*. 2021; 11 (8): 1503. doi: 10.3390/diagnostics11081503.
137. Hirschfeld J, Howait M, Movila A, Parčina M, Bekeredjian-Ding I, Deschner J, Jepsen S, Kawai T. Assessment of the involvement of the macrophage migration inhibitory factor-glucocorticoid regulatory dyad in the expression of matrix metalloproteinase-2 during periodontitis. *Eur J Oral Sci*. 2017; 125 (5): 345-354. doi: 10.1111/eos.12363.
138. Holmström SB, Lira-Junior R, Zwicker S, Majster M, Gustafsson A, Åkerman S, Klinge B, Svensson M, Boström EA. MMP-12 and S100s in saliva reflect different aspects of periodontal inflammation. *Cytokine*. 2019; 113: 155-161. doi: 10.1016/j.cyto.2018.06.036.

139. Honibald EN, Mathew S, Padmanaban J, Sundaram E, Ramamoorthy RD. Periosteal: matrix metalloproteinase inhibitor as an adjunctive therapy for inflammatory periodontal disease. *J Pharm Bioallied Sci.* 2012; 4: 417–421. doi: 10.4103/0975-7406.100315.
140. Hosn KN, Jefferson MM, Leding C, Shokouh-Amiri S, Thomas EL. Inhibitors of bacterial protease enzymes for periodontal therapy. *Clin Exp Dent Res.* 2015; 1 (1):18-25. doi: 10.1002/cre2.4.
141. Hussein RJ, Krohn R, Kaufmann-Kolle P, Willms G. Quality indicators for the use of systemic antibiotics in dentistry. *Z Evid Fortbild Qual Gesundhwes.* 2017; 122: 1-8. doi: 10.1016/j.zefq.2017.04.007.
142. Imamura T, Matsushita K, Travis J, Potempa J. Inhibition of trypsin-like cysteine proteinases (gingipains) from *Porphyromonas gingivalis* by tetracycline and its analogues. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011; 45 (10): 2871-2876. doi: 10.1128/AAC.45.10.2871-2876.2001.
143. Isola G, Polizzi A, Ronsivalle V, Alibrandi A, Palazzo G, Lo Giudice A. Impact of matrix metalloproteinase-9 during periodontitis and cardiovascular diseases. *Molecules.* 2021; 26 (6): 1777. doi: 10.3390/molecules26061777.
144. Isola G. Advances in biomarkers and diagnostics in periodontitis and oral diseases. *Int J Environ Res Public Health.* 2021; 18 (4): 1886. doi: 10.3390/ijerph18041886.
145. Isola G. Early biomarkers of periodontitis: new challenges for a personalized medicine approach. *Int J Environ Res Public Health.* 2021; 19 (1): 251. doi: 10.3390/ijerph19010251.
146. Jain P, Hassan N, Khatoun K, Mirza MA, Naseef PP, Kuruniyan MS, Iqbal Z. Periodontitis and systemic disorder – an overview of relation and novel treatment modalities. *Pharmaceutics.* 2021; 13 (8): 1175. doi: 10.3390/pharmaceutics13081175.
147. Jain P, Mirza MA, Iqbal Z. A 4-D approach for amelioration of periodontitis. *Med Hypotheses.* 2019; 133: 109392. doi: 10.1016/j.mehy.2019.109392.
148. Jakubovics NS, Goodman SD, Mashburn-Warren L, Stafford GP, Cieplik F. The dental plaque biofilm matrix. *Periodontology 2000.* 2021; 86 (1): 32-56. doi: 10.1111/prd.12361.

149. Jäsberg H, Tervahartiala T, Sorsa T, Söderling E, Haukioja A. Probiotic intervention influences the salivary levels of Matrix Metalloproteinase (MMP)-9 and Tissue Inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-1 in healthy adults. *Arch Oral Biol.* 2018; 85: 58-63. doi: 10.1016/j.archoralbio.2017.10.003.
150. Javaid M, Bi J, Biddle C, Tsai CM, Häkkinen L, Kim H. Platelet factor 4 upregulates matrix metalloproteinase-1 production in gingival fibroblasts. *J Periodontal Res.* 2017; 52 (4): 787-792. doi: 10.1111/jre.12448.
151. Johnson N, Ebersole JL, Kryscio RJ, Danaher RJ, Dawson D 3rd, Al-Sabbagh M, Miller CS. Rapid assessment of salivary MMP-8 and periodontal disease using lateral flow immunoassay. *Oral Dis.* 2016; 22 (7): 681-687. doi: 10.1111/odi.12521.
152. Kang JH, Ko HM, Moon JS, Yoo HI, Jung JY, Kim MS, Koh JT, Kim WJ, Kim SH. Osteoprotegerin expressed by osteoclasts: an autoregulator of osteoclastogenesis. *J Dent Res.* 2014; 93 (11): 1116-1123. doi: 10.1177/0022034514552677.
153. Kasnak G, Yılmaz M, Ünsal RBK, Polat NG, Fıratlı E. Evaluation of gene polymorphism and gingival crevicular fluid levels of matrix metalloproteinase-3 in a group of turkish periodontitis patients. *Pathogens.* 2021; 10 (10): 1260. doi: 10.3390/pathogens10101260.
154. Kasuma N, Oenzil F, Darwin E, Sofyan Y. The analysis of matrix metalloproteinase-8 in gingival crevicular fluid and periodontal diseases. *Indian J Dent Res.* 2018; 29 (4): 450-454. doi: 10.4103/ijdr.IJDR\_97\_15.
155. Katsiki P, Nazmi K, Loos BG, Laine ML, Schaap K, Hepdenizli E, Bikker FJ, Brand HS, Veerman ECI, Nicu EA. Comparing periodontitis biomarkers in saliva, oral rinse and gingival crevicular fluid: a pilot study. *J Clin Periodontol.* 2021; 48 (9): 1250-1259. doi: 10.1111/jcpe.13479.
156. Kaur S, Sambrook P, Goss A. Comparing antibiotic adjuncts in periodontitis. *Aust Dent J.* 2019; 64 (4): 382. doi: 10.1111/adj.12734.
157. Kc S, Wang XZ, Gallagher JE. Diagnostic sensitivity and specificity of host-derived salivary biomarkers in periodontal disease amongst adults: Systematic review. *J Clin Periodontol.* 2020; 47 (3): 289-308. doi: 10.1111/jcpe.13218.

158. Keles Yucel ZP, Afacan B, Emingil G, Tervahartiala T, Kose T, Sorsa T. Local and systemic levels of aMMP-8 in gingivitis and stage 3 grade C periodontitis. *J Periodontal Res.* 2020; 55 (6): 887-894. doi: 10.1111/jre.12781.
159. Khattri S, Kumbargere Nagraj S, Arora A, Eachempati P, Kusum CK, Bhat KG, Johnson TM, Lodi G. Adjunctive systemic antimicrobials for the non-surgical treatment of periodontitis. *Cochrane Database Syst Rev.* 2020; 11(11): CD012568. doi: 10.1002/14651858.CD012568.pub2.
160. Kigera JWM, Gichangi PB, Abdelmalek AKM, Ogeng'o JA. Age related effects of selective and non-selective COX-2 inhibitors on bone healing. *J Clin Orthop Trauma.* 2022; 25: 101763. doi: 10.1016/j.jcot.2022.101763.
161. Kim HD, Kim S, Jeon S, Kim SJ, Cho HJ, Choi YN. Diagnostic and prognostic ability of salivary MMP-9 and S100A8 for periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2020; 47 (10): 1191-1200. doi: 10.1111/jcpe.13349.
162. Kim HD, Lee CS, Cho HJ, Jeon S, Choi YN, Kim S, Kim D, Jin Lee H, Vu H, Jeong HJ, Kim B. Diagnostic ability of salivary matrix metalloproteinase-9 lateral flow test point-of-care test for periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2020; 47 (11): 1354-1361. doi: 10.1111/jcpe.13360.
163. Kim HN. Changes in salivary matrix metalloproteinase-3, -8, and -9 concentrations after 6 weeks of non-surgical periodontal therapy. *BMC Oral Health.* 2022; 22 (1): 175. doi: 10.1186/s12903-022-02185-3.
164. Kim JY, Kim HN. Changes in inflammatory cytokines in saliva after non-surgical periodontal therapy: a systematic review and meta-analysis. *Int J Environ Res Public Health.* 2020; 18 (1): 194. doi: 10.3390/ijerph18010194.
165. Kim JY, Kim KR, Kim HN. The potential impact of salivary IL-1 on the diagnosis of periodontal disease: a pilot study. *Healthcare (Basel).* 2021; 9 (6): 729. doi: 10.3390/healthcare9060729.
166. Kinane DF, Stathopoulou PG, Papapanou PN. Periodontal diseases. *Nat Rev Dis Primers.* 2017; 3: 17038. doi: 10.1038/nrdp.2017.38.
167. Koidou VP, Cavalli N, Hagi-Pavli E, Nibali L, Donos N. Expression of inflammatory biomarkers and growth factors in gingival crevicular fluid at different



- healing intervals following non-surgical periodontal treatment: A systematic review. *J Periodontal Res.* 2020; 55 (6): 801-809. doi: 10.1111/jre.12795.
168. Koyuncuoglu CZ, Aydin M, Kirmizi NI, Aydin V, Aksoy M, Isli F, Akici A. Rational use of medicine in dentistry: do dentists prescribe antibiotics in appropriate indications? *Eur J Clin Pharmacol.* 2017; 73 (8): 1027-1032. doi: 10.1007/s00228-017-2258-7.
169. Kumar PM, Reddy NR, Deepa A, Babu DS, Kumar AK, Chavan V. Comparison of matrix metalloproteinase-3 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 levels in gingival crevicular fluid in periodontal health, disease and after treatment: A clinico-biochemical study. *Dent Res J (Isfahan).* 2013; 10 (4): 434-439.
170. Kwon T, Lamster IB, Levin L. Current concepts in the management of periodontitis. *International Dental Journal.* 2021; 71 (6): 462-476. doi: 10.1111/idj.12630.
171. Lähteenmäki H, Umeizudike KA, Heikkinen AM, Räisänen IT, Rathnayake N, Johannsen G, Tervahartiala T, Nwhator SO, Sorsa T. aMMP-8 point-of-care/chairside oral fluid technology as a rapid, non-invasive tool for periodontitis and peri-implantitis screening in a medical care setting. *Diagnostics (Basel).* 2020; 10 (8): 562. doi: 10.3390/diagnostics10080562.
172. Lecio G, Ribeiro FV, Pimentel SP, Reis AA, da Silva RVC, Nociti-Jr F, Moura L, Duek E, Casati M, Casarin RCV. Novel 20% doxycycline-loaded PLGA nanospheres as adjunctive therapy in chronic periodontitis in type-2 diabetics: randomized clinical, immune and microbiological trial. *Clin Oral Investig.* 2020; 24 (3): 1269-1279. doi: 10.1007/s00784-019-03005-9.
173. Lee HM, Ciancio SG, Tüter G, Ryan ME, Komaroff E, Golub LM. Subantimicrobial dose doxycycline efficacy as a matrix metalloproteinase inhibitor in chronic periodontitis patients is enhanced when combined with a non-steroidal anti-inflammatory drug. *J Periodontol.* 2014; 75 (3): 453-463. doi: 10.1902/jop.2004.75.3.453.
174. Leppilahti JM, Harjunmaa U, Järnstedt J, Mangani C, Hernández M, Tervahartiala T, Lopez R, Ashorn U, Ashorn P, Gieselmann DR, Sorsa T. Diagnosis of newly delivered mothers for periodontitis with a novel oral-rinse aMMP-8 point-of-care test in a rural

- malawian population. *Diagnostics* (Basel). 2018; 8 (3): 67. doi: 10.3390/diagnostics8030067.
175. Leppilahti JM, Hernández-Ríos PA, Gamonal JA, Tervahartiala T, Brignardello-Petersen R, Mantyla P, Sorsa T, Hernández M. Matrix metalloproteinases and myeloperoxidase in gingival crevicular fluid provide site-specific diagnostic value for chronic periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2014; 41 (4): 348-356. doi: 10.1111/jcpe.12223. Epub 2014 Feb 17.
176. Li R, Tian C, Postlethwaite A, Jiao Y, Garcia-Godoy F, Pattanaik D, Wei D, Gu W, Li J. Rheumatoid arthritis and periodontal disease: what are the similarities and differences? *Int J Rheum Dis*. 2017; 20 (12): 1887-1901. doi: 10.1111/1756-185X.13240.
177. Li Y, Ling J, Jiang Q. Inflammasomes in alveolar bone loss. *Front Immunol*. 2021; 12: 691013. doi: 10.3389/fimmu.2021.691013.
178. Liaw A, Miller C, Nimmo A. Comparing the periodontal tissue response to non-surgical scaling and root planing alone, adjunctive azithromycin, or adjunctive amoxicillin plus metronidazole in generalized chronic moderate-to-severe periodontitis: a preliminary randomized controlled trial. *Aust Dent J*. 2019; 64 (2): 145-152. doi: 10.1111/adj.12674.
179. Lira-Junior R, Bissett SM, Preshaw PM, Taylor JJ, Boström EA. Levels of myeloid-related proteins in saliva for screening and monitoring of periodontal disease. *J Clin Periodontol*. 2021; 48 (11): 1430-1440. doi: 10.1111/jcpe.13534.
180. Lira-Junior R, Öztürk VÖ, Emingil G, Bostanci N, Boström EA. Salivary and serum markers related to innate immunity in generalized aggressive periodontitis. *J Periodontol*. 2017; 88 (12): 1339-1347. doi: 10.1902/jop.2017.170287.
181. Listyarifah D, Al-Samadi A, Salem A, Syaify A, Salo T, Tervahartiala T, Grenier D, Nordström DC, Sorsa T, Ainola M. Infection and apoptosis associated with inflammation in periodontitis: an immunohistologic study. *Oral Diseases*. 2017; 23 (8): 1144-1154. doi: 10.1111/odi.12711.
182. Liu M, Won Lee J, Jung S, Ji S, Choi Y. Ability of S100 proteins and matrix metalloproteinase-9 to identify periodontitis in a ligature-induced periodontitis dog model. *J Clin Periodontol*. 2020; 47 (2): 182-192. doi: 10.1111/jcpe.13215.

183. Liu N, Cao Y, Zhu G. Expression of matrix metalloproteinases-2, -9 and reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs in gingiva in periodontal health and disease. *Arch Oral Biol.* 2017; 75: 62-67. doi: 10.1016/j.archoralbio.2016.12.009.
184. Liu P, Tu J, Wang W, Li Z, Li Y, Yu X, Zhang Z. Effects of mechanical stress stimulation on function and expression mechanism of osteoblasts. *Front Bioeng Biotechnol.* 2022; 10: 830722. doi: 10.3389/fbioe.2022.830722.
185. Liu X, Zhang Z, Pan S, Shang S, Li C. Interaction between the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway and the EMMPRIN/MMP-2, 9 route in periodontitis. *J Periodontal Res.* 2018; 53 (5): 842-852. doi: 10.1111/jre.12574.
186. Liu Y, Duan D, Ma R, Ding Y, Xu Y, Zhou X, Zhao L, Xu X. The combined use of salivary biomarkers and clinical parameters to predict the outcome of scaling and root planing: a cohort study. *J Clin Periodontol.* 2020; 47 (11): 1379-1390. doi: 10.1111/jcpe.13367.
187. Loos BG, Van Dyke TE. The role of inflammation and genetics in periodontal disease. *Periodontol 2000.* 2020; 83 (1): 26-39. doi: 10.1111/prd.12297.
188. Lorenz K, Keller T, Noack B, Freitag A, Netuschil L, Hoffmann T. Evaluation of a novel point-of-care test for active matrix metalloproteinase-8: agreement between qualitative and quantitative measurements and relation to periodontal inflammation. *J Periodontal Res.* 2017; 52 (2): 277-284. doi: 10.1111/jre.12392.
189. Luchian I, Goriuc A, Sandu D, Covasa M. The role of matrix metalloproteinases (MMP-8, MMP-9, MMP-13) in periodontal and peri-implant pathological processes. *Int J Mol Sci.* 2022; 23 (3): 1806. doi: 10.3390/ijms23031806.
190. Luczyszyn SM, de Souza CM, Braosi AP, Dirschnabel AJ. Analysis of the association of an MMP1 promoter polymorphism and transcript levels with chronic periodontitis and end-stage renal disease in a Brazilian population. *Arch Oral Biol.* 2012; 57 (7): 954-963.
191. Ma L, Liu H, Wang X, Jiang C, Yao S, Guo Y, Wang H, Cao Z. CXXC5 orchestrates Stat3/Erk/Akt signaling networks to modulate *P. gingivalis*-elicited autophagy in cementoblasts. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* 2021; 1868 (3): 118923. doi: 10.1016/j.bbamcr.2020.118923.

192. Malone ET, Ganther S, Mena N, Radaic A, Shariati K, Kindberg A, Tafolla C, Kamarajan P, Fenno JC, Zhan L, Kapila YL. Treponema denticola-induced RASA4 upregulation mediates cytoskeletal dysfunction and MMP-2 activity in periodontal fibroblasts. *Front Cell Infect Microbiol.* 2021; 11: 671968. doi: 10.3389/fcimb.2021.671968.
193. Manresa C, Sanz-Miralles EC, Twigg J, Bravo M. Supportive periodontal therapy (SPT) for maintaining the dentition in adults treated for periodontitis. *Cochrane Database Syst Rev.* 2018; 1 (1): CD009376. doi: 10.1002/14651858.CD009376.pub2.
194. Martu MA, Maftai GA, Luchian I, Stefanescu OM, Scutariu MM, Solomon SM. The effect of acknowledged and novel anti-rheumatic therapies on periodontal tissues – a narrative review. *Pharmaceuticals (Basel).* 2021; 14 (12): 1209. doi: 10.3390/ph14121209.
195. Mauramo M, Ramseier AM, Mauramo E, Buser A, Tervahartiala T, Sorsa T, Waltimo T. Associations of oral fluid MMP-8 with periodontitis in Swiss adult subjects. *Oral Dis.* 2018; 24 (3): 449-455. doi: 10.1111/odi.12769.
196. Meng M, Chen Y, Ren H, Zhang Q, Chen S, Zhou X, Zou J. Effect of tetracyclines on pulpal and periodontal healing after tooth replantation: a systematic review of human and animal studies. *BMC Oral Health.* 2021; 21 (1): 289. doi: 10.1186/s12903-021-01615-y.
197. Miao L, Zhan S, Liu J. Interleukin-12-mediated expression of matrix metalloproteinases in human periodontal ligament fibroblasts involves in NF- $\kappa$ B activation. *Biosci Rep.* 2017; 37 (6): 20170973. doi: 10.1042/BSR20170973.
198. Mikolai C, Branitzki-Heinemann K, Ingendoh-Tsakmakidis A, Stiesch M, von Köckritz-Blickwede M, Winkel A. Neutrophils exhibit an individual response to different oral bacterial biofilms. *J Oral Microbiol.* 2020; 13 (1): 1856565. doi: 10.1080/20002297.2020.1856565.
199. Moura MF, Navarro TP, Silva TA, Cota LOM, Soares Dutra Oliveira AM, Costa FO. Periodontitis and endothelial dysfunction: periodontal clinical parameters and levels of salivary markers interleukin-1 $\beta$ , tumor necrosis factor- $\alpha$ , matrix metalloproteinase-2, tissue inhibitor of metalloproteinases-2 complex, and nitric oxide. *J Periodontol.* 2017; 88 (8): 778-787. doi: 10.1902/jop.2017.170023.

200. Nagarajan R, Miller CS, Dawson D 3rd, Al-Sabbagh M, Ebersole JL. Patient-specific variations in biomarkers across gingivitis and periodontitis. *PLoS One*. 2015; 10 (9): 0136792. doi: 10.1371/journal.pone.0136792.
201. Nagarajan R, Miller CS, Dawson D III, Ebersole JL. Biologic modelling of periodontal disease progression. *J Clin Periodontol*. 2019; 46 (2): 160-169. doi: 10.1111/jcpe.13064.
202. Naghsh N, Razavi SM, Minaiyan M, Shahabooei M, Birang R, Behfarnia P, Hajisadeghi S. Evaluation of the effects of two different bone resorption inhibitors on osteoclast numbers and activity: an animal study. *Dent Res J (Isfahan)*. 2016; 13 (6): 500-507. doi: 10.4103/1735-3327.197034.
203. Naruishi K, Nagata T. Biological effects of interleukin-6 on gingival fibroblasts: cytokine regulation in periodontitis. *Journal of Cell Physiology*. 2018; 233 (9): 6393-6400. doi: 10.1002/jcp.26521.
204. Nascimento GG, Baelum V, Sorsa T, Tervahartiala T, Skottrup PD, López R. Salivary levels of MPO, MMP-8 and TIMP-1 are associated with gingival inflammation response patterns during experimental gingivitis. *Cytokine*. 2019; 115: 135-141. doi: 10.1016/j.cyto.2018.12.002.
205. Nath S, Pulikkotil SJ, Dharmarajan L, Arunachalam M, Jing KT. Effect of locally delivered doxycycline as an adjunct to scaling and root planing in the treatment of periodontitis in smokers: A systematic review of randomized controlled trials with meta-analysis and trial sequential analysis. *Dent Res J (Isfahan)*. 2020; 17 (4): 235-243.
206. Nędzi-Góra M, Górska R, Górski B. The utility of gingival crevicular fluid matrix metalloproteinase-8 provides site-specific diagnostic value for periodontal grading. *Cent Eur J Immunol*. 2021; 46 (2): 236-243. doi: 10.5114/ceji.2021.107031.
207. Ng E, Tay JRH, Ong MMA. Minimally invasive periodontology: a treatment philosophy and suggested approach. *Int J Dent*. 2021; 2810264. doi: 10.1155/2021/2810264.
208. Noack B, Kipping T, Tervahartiala T, Sorsa T, Hoffmann T, Lorenz K. Association between serum and oral matrix metalloproteinase-8 levels and periodontal health status. *J Periodontal Res*. 2017; 52 (5): 824-831. doi: 10.1111/jre.12450.

209. Nokhbehshaim M, Nogueira AVB, Damanaki A, Dalagiorgou G, Eick S, Adamopoulos C, Piperi C, Basdra EK, Papavassiliou AG, Deschner J. Regulation of matrix metalloproteinase-1 by Filifactor alocis in human gingival and monocytic cells. *Clin Oral Investig.* 2020; 24 (6): 1987-1995. doi: 10.1007/s00784-019-03062-0.
210. Noseykina E M, Schepetkin IA, Atochin DN. Molecular mechanisms for regulation of neutrophil apoptosis under normal and pathological conditions. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology.* 2021; 57 (3): 429-450. doi: 10.1134/S0022093021030017.
211. Olsen I, Yilmaz Ö. Possible role of *Porphyromonas gingivalis* in orodigestive cancers. *Journal of Oral Microbiology.* 2019; 11 (1), 1563410. doi: 10.1080/20002297.2018.1563410.
212. Öztürk VÖ, Emingil G, Umeizudike K, Tervahartiala T, Gieselmann DR, Maier K, Köse T, Sorsa T, Alassiri S. Evaluation of active matrix metalloproteinase-8 (aMMP-8) chair-side test as a diagnostic biomarker in the staging of periodontal diseases. *Arch Oral Biol.* 2021; 124: 104955. doi: 10.1016/j.archoralbio.2020.104955.
213. Pan W, Wang Q, Chen Q. The cytokine network involved in the host immune response to periodontitis. *Int J Oral Sci.* 2019; 11: 30. doi: 10.1038/s41368-019-0064-z.
214. Papagerakis P, Zheng L, Kim D, Said R, Ehlert AA, Chung KKM, Papagerakis S. Saliva and gingival crevicular fluid (GCF) collection for biomarker screening. *Methods Mol Biol.* 2019; 1922: 549-562. doi: 10.1007/978-1-4939-9012-2\_41.
215. Park CS, Kim SH, Lee CK. Immunotherapy of autoimmune diseases with nonantibiotic properties of tetracyclines. *Immune Netw.* 2020; 20 (6): 47. doi: 10.4110/in.2020.20.e47.
216. Pavanelli ALR, de Menezes BS, Pereira EBB, de Souza Morais FA, Cirelli JA, de Molon RS. Pharmacological therapies for the management of inflammatory bone resorption in periodontal disease: a review of preclinical studies. *Biomed Res Int.* 2022; 5832009. doi: 10.1155/2022/5832009.
217. Peng X, Cheng L, You Y, Tang C, Ren B, Li Y, Xu X, Zhou X. Oral microbiota in human systematic diseases. *Int J Oral Sci.* 2022; 14 (1): 14. doi: 10.1038/s41368-022-00163-7.

218. Peniche-Palma DC, Carrillo-Avila BA, Sauri-Esquivel EA, Acosta-Viana K, Esparza-Villalpando V, Pozos-Guillen A, Hernandez-Rios M, Martinez-Aguilar VM. Levels of myeloperoxidase and metalloproteinase-9 in gingival crevicular fluid from diabetic subjects with and without stage 2, grade B periodontitis. *Biomed Res Int.* 2019; 5613514. doi: 10.1155/2019/5613514.
219. Petain S, Kasnak G, Firatli E, Tervahartiala T, Gürsoy UK, Sorsa T. Periodontitis and peri-implantitis tissue levels of *Treponema denticola*-CTLP and its MMP-8 activating ability. *Acta Histochem.* 2021; 123 (6): 151767. doi: 10.1016/j.acthis.2021.151767.
220. Phaechamud T, Chanyaboonsub N, Setthajindalert O. Doxycycline hyclate-loaded bleached shellac in situ forming microparticle for intraperiodontal pocket local delivery. *Eur J Pharm Sci.* 2016; 93: 360-370. doi: 10.1016/j.ejps.2016.08.034.
221. Phaechamud T, Jantadee T, Mahadlek J, Charoensuksai P, Pichayakorn W. Characterization of antimicrobial agent loaded eudragit RS solvent exchange-induced in situ forming gels for periodontitis treatment. *AAPS PharmSciTech.* 2017; 18 (2): 494-508. doi: 10.1208/s12249-016-0534-y.
222. Phaechamud T, Senarat S, Puyathorn N, Praphanwittaya P. Solvent exchange and drug release characteristics of doxycycline hyclate-loaded bleached shellac in situ-forming gel and -microparticle. *Int J Biol Macromol.* 2019; 135: 1261-1272. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.11.098.
223. Phaechamud T, Thurein SM, Chantadee T. Role of clove oil in solvent exchange-induced doxycycline hyclate-loaded Eudragit RS in situ forming gel. *Asian J Pharm Sci.* 2018; 13 (2): 131-142. doi: 10.1016/j.ajps.2017.09.004.
224. Preshaw PM. Host modulation therapy with anti-inflammatory agents. *Periodontol 2000.* 2018; 76 (1): 131-149. doi: 10.1111/prd.12148.
225. Räisänen IT, Heikkinen AM, Nwhator SO, Umezudike KA, Tervahartiala T, Sorsa T. On the diagnostic discrimination ability of mouthrinse and salivary aMMP-8 point-of-care testing regarding periodontal health and disease. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2019; 95 (4): 114871. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2019.114871.
226. Räisänen IT, Heikkinen AM, Pakbaznejad Esmaeili E, Tervahartiala T, Pajukanta R, Silbereisen A, Bostanci N, Sorsa T. A point-of-care test of active matrix

- metalloproteinase-8 predicts triggering receptor expressed on myeloid cells-1 (TREM-1) levels in saliva. *J Periodontol.* 2020; 91 (1): 102-109. doi: 10.1002/JPER.19-0132.
227. Räisänen IT, Heikkinen AM, Siren E, Tervahartiala T, Gieselmann DR, van der Schoor GJ, van der Schoor P, Sorsa T. Point-of-care/chairside aMMP-8 analytics of periodontal diseases' activity and episodic progression. *Diagnostics (Basel).* 2018; 8 (4): 74. doi: 10.3390/diagnostics8040074.
228. Räisänen IT, Sorsa T, Tervahartiala T, Raivisto T, Heikkinen AM. Low association between bleeding on probing propensity and the salivary aMMP-8 levels in adolescents with gingivitis and stage I periodontitis. *J Periodontal Res.* 2021; 56 (2): 289-297. doi: 10.1111/jre.12817.
229. Räisänen IT, Sorsa T, van der Schoor GJ, Tervahartiala T, van der Schoor P, Gieselmann DR, Heikkinen AM. Active matrix metalloproteinase-8 point-of-care (PoC)/chairside mouthrinse test vs. bleeding on probing in diagnosing subclinical periodontitis in adolescents. *Diagnostics (Basel).* 2019; 9 (1): 34. doi: 10.3390/diagnostics9010034.
230. Räisänen IT, Umezudike KA, Pärnänen P, Heikkilä P, Tervahartiala T, Nwhator SO, Grigoriadis A, Sakellari D, Sorsa T. Periodontal disease and targeted prevention using aMMP-8 point-of-care oral fluid analytics in the COVID-19 era. *Med Hypotheses.* 2020; 144: 110276. doi: 10.1016/j.mehy.2020.110276.
231. Ramenzoni LL, Hofer D, Solderer A, Wiedemeier D, Attin T, Schmidlin PR. Origin of MMP-8 and lactoferrin levels from gingival crevicular fluid, salivary glands and whole saliva. *BMC Oral Health.* 2021; 21 (1): 385. doi: 10.1186/s12903-021-01743-5.
232. Rathnayake N, Gieselmann DR, Heikkinen AM, Tervahartiala T, Sorsa T. Salivary Diagnostics-Point-of-Care diagnostics of MMP-8 in dentistry and medicine. *Diagnostics (Basel).* 2017; 7 (1): 7. doi: 10.3390/diagnostics7010007.
233. Reddahi S, Bouziane A, Rida S, Tligui H, Ennibi O. Salivary biomarkers in periodontitis patients: a pilot study. *Int J Dent.* 2022: 3664516. doi: 10.1155/2022/3664516.
234. Romero-Castro NS, Vázquez-Villamar M, Muñoz-Valle JF, Reyes-Fernández S, Serna-Radilla VO, García-Arellano S, Castro-Alarcón N. Relationship between TNF- $\alpha$ ,



- MMP-8, and MMP-9 levels in gingival crevicular fluid and the subgingival microbiota in periodontal disease. *Odontology*. 2020; 108 (1): 25-33. doi: 10.1007/s10266-019-00435-5.
235. Romero-Sanchez C, Rodríguez C, Santos-Moreno P, Mesa AM, Lafaurie GI, Giraldo-Q S, De-Avila J, Castillo DM, Duran M, Chalem PC, Bello Gualtero JM, Valle-Oñate R. Is the treatment with biological or non-biological DMARDS a modifier of periodontal condition in patients with rheumatoid arthritis? *Curr Rheumatol Rev*. 2017; 13 (2): 139-151. doi: 10.2174/1573397113666170407161520.
236. Roupakia E, Markopoulos GS, Kolettas E. IL-12-mediated transcriptional regulation of matrix metalloproteinases. *Biosci Rep*. 2018; 38 (3): 20171420. doi: 10.1042/BSR20171420.
237. Rusu A, Buta EL. The development of third-generation tetracycline antibiotics and new perspectives. *Pharmaceutics*. 2021; 13 (12): 2085. doi: 10.3390/pharmaceutics13122085.
238. Samoilenko AV, Titovska SO. Results of immunohistochemical study of markers of inflammation and apoptosis in gingival biotates in patients with generalized periodontitis. *Вісник стоматології*. 2022; 2 (119): 28-32. doi: 10.35220/2078-8916-2022-44-2.5.
239. Santi-Rocca J. Advances in experimental research about periodontitis: lessons from the past, ideas for the future. *Adv Exp Med Biol*. 2022; 1373: 1-15. doi: 10.1007/978-3-030-96881-6\_1.
240. Sanz M, Herrera D, Kerschull M, Chapple I, Jepsen S, Beglundh T, Sculean A, Tonetti MS. EFP workshop participants and methodological consultants. Treatment of stage I-III periodontitis-the EFP S3 level clinical practice guideline. *J Clin Periodontol*. 2020; 47 (Suppl 22): 4-60. doi: 10.1111/jcpe.13290.
241. Schmalz G, Davarpanah I, Jäger J, Mausberg RF, Krohn-Grimberghe B, Schmidt J, Haak R, Sack U, Ziebolz D. MMP-8 and TIMP-1 are associated to periodontal inflammation in patients with rheumatoid arthritis under methotrexate immunosuppression - First results of a cross-sectional study. *J Microbiol Immunol Infect*. 2019; 52 (3): 386-394. doi: 10.1016/j.jmii.2017.07.016.
242. Schmidt J, Guder U, Kreuz M, Löffler M, Kiess W, Hirsch C, Ziebolz D, Haak R. aMMP-8 in correlation to caries and periodontal condition in adolescents-results of the

- epidemiologic LIFE child study. *Clin Oral Investig.* 2018; 22 (1): 449-460. doi: 10.1007/s00784-017-2132-0.
243. Schmidt J, Weigert M, Leuschner C, Hartmann H, Raddatz D, Haak R, Mausberg RF, Kottmann T, Schmalz G, Ziebolz D. Active matrix metalloproteinase-8 and periodontal bacteria-interlink between periodontitis and inflammatory bowel disease? *J Periodontol.* 2018; 89 (6): 699-707. doi: 10.1002/JPER.17-0486.
244. Sedghi LM, Bacino M, Kapila YL. Periodontal disease: the good, the bad and the unknown. *Front Cell Infect Microbiol.* 2021; 11: 766944. doi: 10.3389/fcimb.2021.766944.
245. Senarat S, Wai Lwin W, Mahadlek J, Phaechamud T. Doxycycline hyclate-loaded in situ forming gels composed from bleached shellac, Ethocel, and Eudragit RS for periodontal pocket delivery. *Saudi Pharm J.* 2021; 29 (3): 252-263. doi: 10.1016/j.jsps.2021.01.009.
246. Shahabooei M, Razavi SM, Minaiyan M, Birang R, Behfarnia P, Yaghini J, Naghsh N, Ghalayani P, Hajisadeghi S. A histomorphometric study of the effect of doxycycline and erythromycin on bone formation in dental alveolar socket of rat. *Adv Biomed Res.* 2015; 4: 71. doi: 10.4103/2277-9175.153895.
247. Silveira GRC, de Lima DC, Cintra LTÂ, Brigagão MRPL, Ervolino E, Fernandes LA. Systemic and local effects of doxycycline and low-intensity laser treatment on periodontitis in rats. *J Periodontal Implant Sci.* 2022; 52 (1): 39-53. doi: 10.5051/jpis.2100420021.
248. Silveira GRC, de Lima DC, Cintra LTÂ, Brigagão MRPL, Ervolino E, Fernandes LA. Influence of doxycycline and InGaAlP Diode Laser at 660 nm wavelength in the treatment of periodontitis induced in rats: in vivo study. *Photochem Photobiol.* 2021; 97 (5): 1104-1115. doi: 10.1111/php.13414.
249. Skurska A, Dymicka-Piekarska V, Milewski R, Pietruska M. Dynamics of matrix metalloproteinase-1 and -8 secretion in gingival crevicular fluid after gingival recession therapy via MCAT with either subepithelial connective tissue graft or collagen matrix. *Biomolecules.* 2021; 11 (5): 731. doi: 10.3390/biom11050731.

250. Song B, Zhou T, Yang WL, Liu J, Shao LQ. Programmed cell death in periodontitis: recent advances and future perspectives. *Oral Diseases*. 2017; 23 (5): 609-619. doi: 10.1111/odi.12574.
251. Song HK, Noh EM, Kim JM, You YO, Kwon KB, Lee YR. Reversine inhibits MMP-3, IL-6 and IL-8 expression through suppression of ROS and JNK/AP-1 activation in interleukin-1 $\beta$ -stimulated human gingival fibroblasts. *Arch Oral Biol*. 2019; 108: 104530. doi: 10.1016/j.archoralbio.2019.104530.
252. Sorsa T, Alassiri S, Grigoriadis A, Räisänen IT, Pärnänen P, Nwhator SO, Gieselmann DR, Sakellari D. Active MMP-8 (aMMP-8) as a grading and staging biomarker in the periodontitis classification. *Diagnostics (Basel)*. 2020; 10 (2): 61. doi: 10.3390/diagnostics10020061.
253. Sorsa T, Grigoriadis A, Sakellari D, Gupta S, Sahni V, Tervahartiala T, Räisänen IT. On the accuracy, sensitivity, and grading of mouthrinse active matrix metalloproteinase-8 (aMMP-8) point-of-care testing (POCT). *J Clin Periodontol*. 2021; 48 (11): 1495-1498. doi: 10.1111/jcpe.13521.
254. Sorsa T, Gursoy UK, Nwhator S, Hernandez M, Tervahartiala T, Leppilahti J, Gursoy M, Könönen E, Emingil G, Pussinen PJ, Mäntylä P. Analysis of matrix metalloproteinases, especially MMP-8, in gingival crevicular fluid, mouthrinse and saliva for monitoring periodontal diseases. *Periodontol 2000*. 2016; 70 (1): 142-163. doi: 10.1111/prd.12101.
255. Sorsa T, Sahni V, Buduneli N, Gupta S, Räisänen IT, Golub LM, Lee HM, Pätilä T, Bostanci N, Meurman J, Pärnänen P, Nwhator SO, Singla M, Gauba K. Active matrix metalloproteinase-8 (aMMP-8) point-of-care test (POCT) in the COVID-19 pandemic. *Expert Rev Proteomics*. 2021; 18 (8): 707-717. doi: 10.1080/14789450.2021.1976151.
256. Spasovski S, Belazelkoska Z, Popovska M, Atanasovska-Stojanovska A, Radojkova-Nikolovska V, Muratovska I, Toseska-Spasova N, Dzipunova B, Nikolovski B. Clinical therapeutic effects of the application of doxycycline in the treatment of periodontal disease. *Open Access Maced J Med Sci*. 2016; 4 (1): 152-157. doi: 10.3889/oamjms.2016.021.

257. Srivastava N, Nayak PA, Rana S. Point of care – a novel approach to periodontal diagnosis – A review. *J Clin Diagn Res.* 2017; 11 (8): 1-6. doi: 10.7860/JCDR/2017/26626.10411.
258. Srivastava RK, Sapra L. The rising era of "immunoporosis": role of immune system in the pathophysiology of osteoporosis. *J Inflamm Res.* 2022; 15: 1667-1698. doi: 10.2147/JIR.S351918.
259. Stone SJ, Kumar PS, Offenbacher S, Heasman PA, McCracken GI. Exploring a temporal relationship between biofilm microbiota and inflammatory mediators during resolution of naturally occurring gingivitis. *J Periodontol.* 2019; 90 (6): 627-636. doi: 10.1002/JPER.18-0156.
260. Swanson BA, Carson MD, Hathaway-Schrader JD, Warner AJ, Kirkpatrick JE, Corker A, Alekseyenko AV, Westwater C, Aguirre JI, Novince CM. Antimicrobial-induced oral dysbiosis exacerbates naturally occurring alveolar bone loss. *FASEB J.* 2021; 35 (11): 22015. doi: 10.1096/fj.202101169R.
261. Tan OL, Safii SH, Razali M. Commercial local pharmacotherapeutics and adjunctive agents for nonsurgical treatment of periodontitis: a contemporary review of clinical efficacies and challenges. *Antibiotics (Basel).* 2019; 9 (1): 11. doi: 10.3390/antibiotics9010011.
262. Tanabe S, Yoshioka M, Hinode D, Grenier D. Subinhibitory concentrations of tetracyclines induce lipopolysaccharide shedding by *Porphyromonas gingivalis* and modulate the host inflammatory response. *J Periodontal Res.* 2014; 49 (5): 603-608. doi: 10.1111/jre.12140.
263. Tayman MA, Koyuncu İ, Köklü NÖ. Expression levels of a disintegrin-like metalloproteinase with thrombospondin motifs-4 and -5 (ADAMTS-4 and ADAMTS-5) in inflamed and healthy gingival tissues. *Comb Chem High Throughput Screen.* 2020; 23 (2): 168-176. doi: 10.2174/1386207323666200218113000.
264. Thomas C, Minty M, Vinel A, Canceill T, Loubières P, Burcelin R, Kaddech M, Blasco-Baque V, Laurencin-Dalicioux S. Oral microbiota: a major player in the diagnosis of systemic diseases. *Diagnostics (Basel).* 2021; 11 (8): 1376. doi: 10.3390/diagnostics11081376.

265. Tihan GT, Rău I, Zgârian RG, Ungureanu C, Barbaresso RC, Kaya MGA, Dinu-Pîrvu C, Ghica MV. Oxytetracycline versus doxycycline collagen sponges designed as potential carrier supports in biomedical applications. *Pharmaceutics*. 2019; 11 (8): 363. doi: 10.3390/pharmaceutics11080363.
266. Toker H, Yuce HB, Yildirim A, Tekin MB, Gevrek F. The effect of colchicine on alveolar bone loss in ligature-induced periodontitis. *Braz Oral Res*. 2019; 33: 1-15. doi: 10.1590/1807-3107bor-2019.vol33.0001.
267. Tompkins KA. The osteoimmunology of alveolar bone loss. *Connect Tissue Res*. 2016; 57 (2): 69-90. doi: 10.3109/03008207.2016.1140152.
268. Tonetti MS, Greenwell H, Kornman KS. Staging and grading of periodontitis: Framework and proposal of a new classification and case definition. *J Periodontol*. 2018; 89 Suppl 1: 159-172. doi: 10.1002/JPER.18-0006.
269. Tsagareli ZG, Shishniashvili TE, Gogiashvili LE, Kvachadze TI. The level of matrix metalloproteinases and type IV collagen in the gingival mucosa under different clinical forms of periodontitis in pre-and pubertal periods and their prognostic value. *Georgian Med News*. 2012; 206: 25-29.
270. Tüter G, Serdar M, Kurtiş B, Walker SG, Atak A, Toyman U, Pinar S, Aykan T. Effects of scaling and root planing and subantimicrobial dose doxycycline on gingival crevicular fluid levels of matrix metalloproteinase-8, -13 and serum levels of HsCRP in patients with chronic periodontitis. *J Periodontol*. 2010; 81 (8): 1132-1139. doi: 10.1902/jop.2010.090694.
271. Uchida H, Ovitt CE. Novel impacts of saliva with regard to oral health. *J Prosthet Dent*. 2022; 127 (3): 383-391. doi: 10.1016/j.prosdent.2021.05.009.
272. Umezudike K, Räisänen I, Gupta S, Nwhator S, Grigoriadis A, Sakellari D, Sorsa T. Active matrix metalloproteinase-8: a potential biomarker of oral systemic link. *Clin Exp Dent Res*. 2022; 8 (1): 359-365. doi: 10.1002/cre2.516.
273. Umezudike KA, Lähteenmäki H, Räisänen IT, Taylor JJ, Preshaw PM, Bissett SM, Tervahartiala T, O Nwhator S, Pärnänen P, Sorsa T. Ability of matrix metalloproteinase-8 biosensor, IFMA, and ELISA immunoassays to differentiate between periodontal health,

- gingivitis, and periodontitis. *J Periodontal Res.* 2022; 57 (3): 558-567. doi: 10.1111/jre.12985.
274. Usui M, Onizuka S, Sato T, Kokabu S, Ariyoshi W, Nakashima K. Mechanism of alveolar bone destruction in periodontitis - Periodontal bacteria and inflammation. *Jpn Dent Sci Rev.* 2021; 57: 201-208. doi: 10.1016/j.jdsr.2021.09.005.
275. Van Dyke TE. Pro-resolving mediators in the regulation of periodontal disease. *Molecular Aspects of Medicine.* 2017; 58: 21-36. doi: 10.1016/j.mam.2017.04.006.
276. Vieira GM, Falcao DP, de Queiroz SBF, de Lima VN, Bentes de Azevedo R, Tiziane V, Moreno H, Amorim R. A Novel analysis via Micro-CT imaging indicates that chemically modified tetracycline-3 (CMT-3) inhibits tooth relapse after orthodontic movement: a pilot experimental study. *Int J Dent.* 2019; 3524207. doi: 10.1155/2019/3524207.
277. Vinel A, Al Halabi A, Roumi S, Le Neindre H, Millavet P, Simon M, Cuny C, Barthet JS, Barthet P, Laurencin-Dalicious S. Non-surgical periodontal treatment: SRP and innovative therapeutic approaches. *Adv Exp Med Biol.* 2022; 1373: 303-327. doi: 10.1007/978-3-030-96881-6\_16.
278. Virtanen E, Yakob M, Tervahartiala T, Söder PÖ, Andersson LC, Sorsa T, Meurman JH, Söder B. Salivary MMP-13 gender differences in periodontitis: A cross-sectional study from Sweden. *Clin Exp Dent Res.* 2017; 3 (5): 165-170. doi: 10.1002/cre2.76.
279. Vitkov L, Minnich B, Knopf J, Schauer C, Hannig M, Herrmann M. NETs are double-edged swords with the potential to aggravate or resolve periodontal inflammation. *Cells.* 2020; 9 (12): 2614. doi: 10.3390/cells9122614.
280. Wang F, Guan M, Wei L, Yan H. IL-18 promotes the secretion of matrix metalloproteinases in human periodontal ligament fibroblasts by activating NF- $\kappa$ B signaling. *Mol Med Rep.* 2019; 19 (1): 703-710. doi: 10.3892/mmr.2018.9697.
281. Warner AJ, Hathaway-Schrader JD, Lubker R, Davies C, Novince CM. Tetracyclines and bone: Unclear actions with potentially lasting effects. *Bone.* 2022; 159: 116377. doi: 10.1016/j.bone.2022.116377.

282. Wu Q, Zhou X, Huang D, Ji Y, Kang F. IL-6 enhances osteocyte-mediated osteoclastogenesis by promoting JAK2 and RANKL activity in vitro. *Cell Physiol Biochem*. 2017; 41 (4): 1360-1369. doi: 10.1159/000465455.
283. Yadalam PK, Kalaivani V, Fageeh HI, Ibraheem W, Al-Ahmari MM, Khan SS, Ahmed ZH, Abdulkarim HH, Baeshen HA, Balaji TM, Bhandi S, Raj AT, Patil S. Future drug targets in periodontal personalised medicine – a narrative review. *J Pers Med*. 2022; 12 (3): 371. doi: 10.3390/jpm12030371.
284. Yang M X, Ding PH, Kang S, Dong Y. Advances in research of pyroptosis in the mechanism of periodontal disease. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi*. 2021; 56 (9): 945-950. doi:10.3760/cma.j.cn121094-20190419-00158.
285. Yang S, Gu B, Zhao L, Shi Q, Xu J, Wen N. Meta-analysis of the association between serum and gingival crevicular fluid matrix metalloproteinase-9 and periodontitis. *J Am Dent Assoc*. 2019; 150 (1): 34-41. doi: 10.1016/j.adaj.2018.08.025.
286. Yap KCH, Pulikkotil SJ. Systemic doxycycline as an adjunct to scaling and root planing in diabetic patients with periodontitis: a systematic review and meta-analysis. *BMC Oral Health*. 2019; 19 (1): 209. doi: 10.1186/s12903-019-0873-7.
287. Yee EH, Lathwal S, Shah PP, Sikes HD. Detection of biomarkers of periodontal disease in human saliva using stabilized, vertical flow immunoassays. *ACS Sens*. 2017; 2 (11): 1589-1593. doi: 10.1021/acssensors.7b00745.
288. Yuan C, Liu X, Zheng S. Matrix metalloproteinase-8 levels in oral samples as a biomarker for periodontitis in the Chinese population: an observational study. *BMC Oral Health*. 2018; 18 (1): 51. doi: 10.1186/s12903-018-0512-8.
289. Zaharescu A, Mârțu I, Luchian AI, Mârțu MA, Șufaru IG, Mârțu C, Solomon SM. Role of adjunctive therapy with subantimicrobial doses of doxycycline in glycemic control (HbA1c) in patients with diabetes and endo-periodontal lesions to prevent sinus complications. *Exp Ther Med*. 2021; 21 (3): 277. doi: 10.3892/etm.2021.9708.
290. Zeidán-Chuliá F, Yilmaz D, Häkkinen L, Könönen E, Neves de Oliveira BH, Güncü G, Uitto VJ, Caglayan F, Gürsoy UK. Matrix metalloproteinase-7 in periodontitis with type 2 diabetes mellitus. *J Periodontal Res*. 2018; 53 (5): 916-923. doi: 10.1111/jre.12583.

291. Zhang F, Liu E, Radaic A, Yu X, Yang S, Yu C, Xiao S, Ye C. Diagnostic potential and future directions of matrix metalloproteinases as biomarkers in gingival crevicular fluid of oral and systemic diseases. *Int J Biol Macromol.* 2021; 188: 180-196. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2021.07.165.
292. Zhang L, Li X, Yan H, Huang L. Salivary matrix metalloproteinase (MMP)-8 as a biomarker for periodontitis: A PRISMA-compliant systematic review and meta-analysis. *Medicine (Baltimore).* 2018; 97 (3): 9642. doi: 10.1097/MD.00000000000009642.
293. Zhang Y, Huang L, Zhang J, De Souza Rastelli AN, Yang J, Deng D. Anti-inflammatory efficacy of curcumin as an adjunct to non-surgical periodontal treatment: a systematic review and meta-analysis. *Front Pharmacol.* 2022; 13: 808460. doi: 10.3389/fphar.2022.808460.
294. Zhang Y, Kang N, Xue F, Qiao J, Duan J, Chen F, Cai Y. Evaluation of salivary biomarkers for the diagnosis of periodontitis. *BMC Oral Health.* 2021; 21 (1): 266. doi: 10.1186/s12903-021-01600-5.
295. Zhang Y, Wang X, Li H, Ni C, Du Z, Yan F. Human oral microbiota and its modulation for oral health. *Biomed Pharmacother.* 2018; 99: 883-893. doi: 10.1016/j.biopha.2018.01.146.
296. Zhang Z, Yang X, Zhang H, Liu X, Pan S, Li C. The role of extracellular matrix metalloproteinase inducer glycosylation in regulating matrix metalloproteinases in periodontitis. *J Periodontal Res.* 2018; 53 (3): 391-402. doi: 10.1111/jre.12524.
297. Zhao Y, Jin Y, Ren YS, Song LM, Li J, Lin XP. [Expression of matrix metalloproteinase-3 in patients with rheumatoid arthritis and its correlation with chronic periodontitis and rheumatoid arthritis]. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi.* 2019; 54 (3): 164-169. doi: 10.3760/cma.j.issn.1002-0098.2019.03.004.
298. Zhou J, Yao Y, Jiao K, Zhang J, Zheng X, Wu F, Hu X, Li J, Yu Z, Zhang G, Jiang N, Li Z. Relationship between gingival crevicular fluid microbiota and cytokine profile in periodontal host homeostasis. *Front Microbiol.* 2017; 8: 2144. doi: 10.3389/fmicb.2017.02144.



**ДОДАТКИ***Додаток А***Акти впровадження****ЗАТВЕРДЖУЮ**

Проректор з наукової роботи  
Дніпровського державного  
медичного університету,  
д. мед. н., професор  
Олександр Гудар'ян

«    »  2022 р.

**АКТ ПРОВАДЖЕННЯ**

1. **Найменування пропозиції для впровадження:** превентивне лікування генералізованого пародонтиту із застосуванням інгібіторів металопротеїназ.

2. **Ким та коли запропонований:** Дніпровський державний медичний університет, кафедра терапевтичної стоматології, асистент Тітовська С.О.

3. **Джерело інформації:** Тітовська С.О. Ефективність застосування інгібіторів матриксних металопротеїназ для превентивного лікування генералізованого пародонтиту. Український стоматологічний альманах. 2022; 2: 10-15.

4. **Базова установа, яка проводить впровадження:** кафедра терапевтичної стоматології Дніпровського державного медичного університету.

5. **Термін впровадження:** 2021/2022 н. р.

6. **Форма впровадження:** у навчально-педагогічний процес зі студентами 3-5 курсів стоматологічного факультету та лікарями-інтернами.

7. **Ефективність впровадження:** матеріали використовуються при проведенні практичних занять, присвячених питанням комплексного лікування хворих па генералізований пародонтит, що дозволяє підвищити рівень оволодіння практичними навичками з даного розділу терапевтичної стоматології.

8. **Зауваження та пропозиції:** немає.

**Відповідальна за впровадження особа:**  
Відповідальний за навчальний процес  
на кафедрі терапевтичної стоматології,  
доцент, к. мед. н.



Вадим Орищенко

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор з науково-педагогічної роботи  
Запорізького державного медичного  
університету,



професор

В. А. Візір

2022 р.

### АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Найменування пропозиції для впровадження:** превентивне лікування генералізованого пародонтиту із застосуванням інгібіторів металопротеїназ.
2. **Ким та коли запропонований:** Дніпровський державний медичний університет, кафедра терапевтичної стоматології, асистент Тітовська С. О.
3. **Джерело інформації:** Тітовська С.О. Ефективність застосування інгібіторів матричних металопротеїназ для превентивного лікування генералізованого пародонтиту. Український стоматологічний альманах. 2022; 2:10-15.
4. **Базова установа, яка проводить впровадження:** кафедра пропедевтичної та хірургічної стоматології Запорізького державного медичного університету.
5. **Термін впровадження:** 2021/2022 н. р.
6. **Форма впровадження:** у навчально-педагогічний процес зі студентами 3-5 курсів стоматологічного факультету та лікарями-інтернами.
7. **Ефективність впровадження:** матеріали використовуються при проведенні практичних занять, присвячених питанням комплексного лікування хворих на генералізований пародонтит, що дозволяє підвищити рівень оволодіння практичними навичками з даного розділу терапевтичної стоматології.
8. **Зауваження та пропозиції:** немає.

**Відповідальна за впровадження особа:**

Завідувач кафедри пропедевтичної  
та хірургічної стоматології,  
доцент, к. мед. н.

Сергій ЧЕРТОВ

«ЗАТВЕРДЖУЮ»  
Головний лікар  
ВСП «Університетська  
клініка» ДДМУ

Барсуков В. М.  
« 31 » 2022 р.



### АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Назва впровадження: превентивне лікування генералізованого пародонтиту із застосуванням інгібіторів металопротеїназ
2. Установа-розробник: Дніпровський державний медичний університет, кафедра терапевтичної стоматології
3. Джерело інформації: Тітовська СО. Ефективність застосування інгібіторів матричних металопротеїназ для превентивного лікування генералізованого пародонтиту. Український стоматологічний альманах. 2022; 2: 10-15.
4. Автор: Тітовська С. О.
5. Впроваджено в стоматологічному відділенні ВСП «Університетська клініка» ДДМУ
6. Термін впровадження: 2022 р.
7. Загальна кількість спостережень: 37.
8. Ефективність впровадження відповідно до критеріїв, викладених у джерелі інформації про впровадження:

Показники	За даними	
	авторів, які пропонують впровадження	організації, що впровадила
Зменшення кількості випадків прогресування захворювання	на 26,7%	на 32,4 %

9. Зауваження та пропозиції : - .

Відповідальний за впровадження:

Олексій Кривчук



**МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ**  
**КОМУНАЛЬНЕ ПІДПРИЄМСТВО**  
**«НОВОМОСКОВСЬКА МІСЬКА СТОМАТОЛОГІЧНА ПОЛІКЛІНІКА»**  
**НОВОМОСКОВСЬКОЇ МІСЬКОЇ РАДИ»**

51200 Дніпропетровська обл., м. Новомосковськ, вул. В.Ковалівка 26, код-05494656, т. 0930770203,  
 E-mail: [kznmsp@ukr.net](mailto:kznmsp@ukr.net)

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Директор

КП «Новомосковська міська  
 стоматологічна поліклініка»  
 Новомосковської міської ради»

Гузарова Н.В.

2022 р.

**АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ**

1. Назва впровадження: превентивне лікування генералізованого пародонтиту із застосуванням інгібіторів металопротеїназ.
2. Установа-розробник: Дніпровський державний медичний університет, кафедра терапевтичної стоматології.
3. Джерело інформації: Тітовська С.О. Ефективність застосування інгібіторів матриксних металопротеїназ для превентивного лікування генералізованого пародонтиту. Український стоматологічний альманах. 2022; 2: 10-15.
4. Автор: Тітовська С.О.
5. Впроваджено в стоматологічному відділенні ВСП «Університетська клініка» ДДМУ.
6. Термін впровадження: 2022 р.
7. Загальна кількість спостережень: 37.
8. Ефективність впровадження відповідно до критеріїв, викладених у джерелі інформації про впровадження:

ПОКАЗНИКН	За даними	
	авторів, які пропонують впровадження	організації, що впровадила
Зменшення кількості випадків прогресування захворювання	на 27,2%	на 33,5 %

9. Зауваження та пропозиції :

Відповідальний за впровадження:

Олександр Задорожний





ЦЕНТР СТОМАТОЛОГІЧНОЇ ІМПЛАНТАЦІЇ «КЛІНІКА ЧЕРТОВА»

ул. Гагаріна, 8 пр. Моторобудівників, 22  
 (063) 973 92 88 (061) 220 24 36  
 (050) 085 25 50 (068) 452 08 96  
 (095) 314 22 81

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Головний лікар

Центру стоматологічної  
 імплантації «Клініка Чертова»

Чертов С.О.

« 20 » 08 2022 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Назва впровадження: превентивне лікування генералізованого пародонтиту із застосуванням інгібіторів металопротеїназ.
2. Установа-розробник: Дніпровський державний медичний університет, кафедра терапевтичної стоматології.
3. Джерело інформації: Тітовська С.О. Ефективність застосування інгібіторів матричних металопротеїназ для превентивного лікування генералізованого пародонтиту. Український стоматологічний альманах. 2022; 2: 10-15.
4. Автор: Тітовська С.О.
5. Впроваджено в центрі стоматологічної імплантації «Клініка Чертова».
6. Термін впровадження: 2022 р.
7. Загальна кількість спостережень: 37.
8. Ефективність впровадження відповідно до критеріїв, викладених у джерелі інформації про впровадження:

ПОКАЗНИКИ	За даними	
	авторів, які пропонують впровадження	організації, що впровадила
Зменшення кількості випадків прогресування захворювання	на 27,2%	на 33,5 %

9. Зауваження та пропозиції :

Відповідальний за впровадження:



Чертов С.О.

## СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА

*Список наукових праць, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації:*

1. Самойленко АВ, Шпонька ІС, Горшкова АЄ, Пославська ОВ, Карнаух СО. Імуногістохімічне дослідження маркерів апоптозу та запалення в тканинах пародонта у хворих на генералізований пародонтит. Морфологія. 2013; 3: 101-107.
2. Самойленко АВ, Тітовська СО. Матриксні металопротеїнази в ротовій рідині як характеристика запально-деструктивного процесу в тканинах пародонта. Медичні перспективи. 2022; 3: 127-134
3. Samoilenko AV, Titovska SO. Results of immunohistochemical study of markers of inflammation and apoptosis in gingival bioplates in patients with generalized periodontitis. Вісник стоматології. 2022; 2 (119): 28-32. doi: 10.35220/2078-8916-2022-44-2.5.
4. Тітовська СО. Ефективність застосування інгібіторів матриксних металопротеїназ для превентивного лікування генералізованого пародонтиту. Український стоматологічний альманах. 2022; 2: 10-15.

*Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:*

5. Карнаух СО. Перспективи застосування біохімічних маркерів ротової рідини для діагностики генералізованого пародонтиту. Мат. Всеукр. наук.-практ. конф. «Сучасні принципи планування стоматологічного лікування». Запоріжжя. 2016. С. 62-63.
6. Тітовська СО. Маркери апоптозу та запалення в діагностиці генералізованого пародонтиту. Зб. наук. праць V міжнародн. наук.-практ. конф. «Стоматологія Придніпров'я». Україна, Дніпропетровськ-Запоріжжя. 2019. С.174-176.
7. Тітовська СО. Імуногістохімічне дослідження маркерів апоптозу в біоптатах ясен у хворих на генералізований пародонтит. Зб. тез VI Всеукр. наук.-практ. конф. «Стоматологія Придніпров'я 2020». Запоріжжя. 2020. С. 31-34.