

DOI: 10.26693/jmbs05.02.112
УДК 616.314.17-008.1-07:577.1

Казеко Л. А., Захарова В. А.,
Анфиногенова Е. А., Черствый Е. Д.

РОЛЬ ХАРАКТЕРА ЭКСПРЕССИИ МАТРИКСНОЙ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗЫ 9 В ПАТОГЕНЕЗЕ И ДИАГНОСТИКЕ ПАТОЛОГИИ ПЕРИОДОНТА

Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет»,
Минск, Республика Беларусь

ip-c@yandex.ru

Цель работы – установить значение металлопротеиназы 9 для дифференциальной диагностики различных форм периодонтитов на этапе манифестации заболевания путем морфометрической оценки характера ее экспрессии в биопсийном материале.

Проанализирован биопсийный материал десен 70 пациентов: группы контроля (n=7), быстро прогрессирующего (n=19), хронического простого (n=9) и хронического сложного (n=35) периодонтитов. Морфометрический и статистический анализ экспрессии металлопротеиназы 9 выполнен с использованием AperioImageScope v 12.0 и Statistica 10.0, $p < 0,05$.

Экспрессия металлопротеиназы 9 выявлена во всех наблюдениях в виде цитоплазматического и мембранного окрашивания эпителиальных клеток, клеток воспалительного инфильтрата и очагов фибробластов собственной пластинки десны как в группе контроля, так и в группах пациентов с признаками различных форм периодонтитов. При этом установлена прямая взаимосвязь позитивности ($p=0,71$) и интенсивности ($p=0,82$) эпителиальной и стромальной экспрессии ММП9, а также с вовлеченностью эпителиального компонента в процесс воспаления, в том числе его эрозированием. Наибольшая вариабельность с максимальной позитивностью экспрессии металлопротеиназы 9 до 66% была выявлена в группе пациентов с хроническим сложным периодонтитом, снижалась до 38% и 34% – в группах быстро прогрессирующего и хронического простого периодонтита ($p < 0,001$) и не превышала 0,5% в группе контроля. При этом в группе пациентов с быстро прогрессирующим пе-

риодонтитом площадь экспрессии металлопротеиназы 9 не имела статистически значимых различий с таковой в группе хронического простого периодонтита, но была значимо меньше, чем в группе хронического сложного периодонтита. Анализ интенсивности экспрессии металлопротеиназы 9 «hot points» участков выявил значимо более высокие показатели интенсивности в группах быстро прогрессирующего и хронического сложного периодонтитов (которые по данному параметру были сопоставимы, $p=0,60$) по сравнению с хроническим простым периодонтитом ($p=0,014$ и $p=0,045$).

Наиболее информативными показателями для определения характера течения периодонтита на стадии манифестации заболевания и дифференциальной диагностики быстро прогрессирующего с хроническим сложным периодонтитом является площадь экспрессии металлопротеиназы 9 (которая в группе хронического сложного периодонтита имеет значимо большие показатели с сопоставимой интенсивностью экспрессии), а с хроническим простым периодонтитом – интенсивность экспрессии металлопротеиназы 9 (которая имеет значимо меньшие показатели в группе хронического простого периодонтита при сопоставимой площади экспрессии данного маркера).

Ключевые слова: периодонтит, матриксная металлопротеиназа 9, иммуногистохимия, экспрессия, прогноз.

Введение. Во всем мире болезни периодонта являются наиболее распространенными хроническими заболеваниями, которые поражают десну, периодонтальную связку, цемент корня зуба и

альвеолярную кость, определяя деструктивный характер заболевания. Диагностика периодонтита основана, как правило, на таких клинических признаках заболевания как кровоточивость десен, утеря прикрепления, образование периодонтальных карманов, рецессия десны, подвижность зубов и т. д. Однако стандартно используемые клинические способы диагностики описывают только историю болезни и обладают ограниченным прогностическим потенциалом. Для выбора правильной и своевременной стратегии лечения необходим поиск методов, позволяющих диагностировать патологию на ранних стадиях, не сопровождающихся выраженной деструкцией тканей и потерей зубов.

Важное значение в патогенезе воспаления, в том числе и тканей периодонта, в настоящее время придается матричным металлопротеиназам (ММП), которых описано уже более 20 [1]. Эти ферменты играют решающую роль при развитии таких физиологических процессов, как морфогенез, резорбция и ремоделирование тканей, миграция, адгезия, дифференцировка и пролиферация клеток. Установлено их значение в развитии и прогрессировании целого ряда заболеваний, таких как периодонтит, ревматоидный артрит, гломерулонефрит, дистрофические патологические процессы роговицы и др. [2, 3, 4]. Так как I тип коллагена представляет собой преобладающий компонент периодонтального внеклеточного матрикса, особое внимание при исследовании патогенеза периодонтитов уделяется коллагеназам, в частности ММП8 и ММП13, и желатиназам – ММП2 и ММП9, которые в качестве основных протеаз включаются в процесс деструкции тканей периодонта [5, 6, 7, 8]. Уровень их содержания коррелирует с тяжестью заболевания, его прогрессированием и ответом на проводимую терапию [9]. При патологии периодонта ММП играют ключевую роль в деградации экстрацеллюлярного матрикса (ЭЦМ), базальной мембраны, а также в модификации действия цитокинов и активации остеокластов. Периодонтитогенные микроорганизмы, *Porphyromonas gingivalis* и *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, вырабатывают коллагеназы, но их роль в периодической деградации коллагена ЭЦМ незначительна. Фибробласты десны и клетки периодонтальной связки, продуцируют коллагеназы, которые участвуют в физиологическом обмене тканей. При воспалительных заболеваниях, в том числе, периодонтитах [10], основным источником коллагеназ и желатиназ выступают нейтрофилы и макрофаги. Синтез этих ферментов эпителиальными клетками может способствовать апикальной миграции и последующей потере эпителиального прикрепления.

Исследование матричных металлопротеиназ выявило их влияние на различные биоактивные нематричные субстраты, такие как цитокины, хемокины, факторы роста и медиаторы иммунного ответа. Основываясь на этих биохимических и иммунологических данных, ткани и биологические жидкости полости рта стали целью исследований ММП и их регуляторов для диагностики и мониторинга заболеваний периодонта и периимплантита [2, 8]. Любой дисбаланс между ММП и их тканевыми ингибиторами вызывает разрушение коллагена десны, в том числе необратимое, что неизбежно ведет к развитию периодонтита [11, 12]. Установлено, что соотношение уровней ММП-1, -2, -3 и -9 и тканевых ингибиторов ММП (ТИМП-1 и -2) в ткани десны, ротовой жидкости, десневой жидкости может предоставить дополнительную информацию о прогрессировании заболевания, а ММП и ТИМП могут и выступать в качестве перспективных целевых молекул для терапии с целью уменьшения деструкции тканей периодонта.

ММП-9 (коллагеназа-4, желатиназа-B) может обнаруживаться в нейтрофилах, хондроцитах, макрофагах, фибробластах, одонтобластах в латентной (92 kDa) и активной форме (68-82 kDa) и гораздо эффективнее, чем ММП-2, способствует гидролизу желатина, а также коллагенов I, II, III, V, VI, X типов, эластана, агрекана, фибронектина, остео-нектинина и плазминогена [13]. В норме в тканях и биологических жидкостях обнаруживают только неактивную форму – про-ММП-9. В условиях патологии провоспалительные цитокины, такие как IL-1 β , TNF α , стимулируют избыточную продукцию, преимущественно нейтрофилами и макрофагами, активной формы ММП-9, недостаточно контролируемую ее тканевым ингибитором (ТИМП-1) [14], которая при периодонтитах выявлена в десневой жидкости (у 98% пациентов по сравнению с 11% при гингивитах), зубных отложениях и тканях десны с последующим снижением ее уровня на фоне проводимой терапии [15].

У пациентов с хроническим периодонтитом при обострении заболевания определяется более высокий уровень ММП-9, чем в состоянии ремиссии, а в группе пациентов с периодонтитами – более высокие уровни экспрессии ММП-2 и ММП-9 по сравнению со здоровыми людьми. Уровни ММП-2 и ММП-9 положительно коррелируют с признаками воспаления, неоваскуляризации и миофибробластической трансформации, что подтверждает роль ММП-2 и ММП-9 в патогенезе периодонтита [16].

Таким образом, основываясь на экспериментальных данных, ряд исследователей предлагает считать ММП-9 маркером как клинической тяжести периодонтита, так и активности воспаления в

тканях периодонта [9, 17, 18]. Баланс между ММП и их ингибиторами детерминирует целостность или разрушение соединительной матрицы периодонта матрицы соединительной ткани как при физиологических, так и при патологических состояниях.

Цель работы – установить значение MMP9 для дифференциальной диагностики различных форм периодонтитов на этапе манифестации заболевания путем морфометрической оценки характера ее экспрессии в биопсийном материале.

Материал и методы исследования. Клинико-инструментальное и лабораторное обследование и лечение пациентов с патологией периодонта выполнено на базе 1-й кафедры терапевтической стоматологии учреждения образования «Белорусский государственный медицинский университет» в ГУ «Республиканская клиническая стоматологическая поликлиника», с получением у каждого из пациентов информированного согласия. Обследование включало: оценку гигиены полости рта (ОНИ-S), тяжести воспаления десны (GI), определение глубины зондирования периодонтальных карманов и утери прикрепления (LA), рецессии десны, поражения фуркации, патологической миграции зубов, их подвижности, наличия окклюзионной травмы. Все результаты обследования регистрировали в периодонтальной карте. Кроме того, пациентам назначали выполнение общего и биохимического анализа крови, анализа крови на тиреоидные гормоны и остеоденситометрии для исключения соматической патологии, способной оказать влияние на состояние периодонта (при подозрении на быстропрогрессирующий процесс). В процессе обследования использовали методы лучевой диагностики (панорамную рентгенографию или компьютерную томографию) для оценки уровня и характера резорбции костной ткани. Всем пациентам проведена профессиональная гигиена и закрытый юретаж, во время которого выполнена биопсия десны с последующим морфологическим исследованием на базе кафедры патологической анатомии учреждения образования «Белорусский государственный медицинский университет».

Критериями включения в исследование явились клинико-рентгенологические признаки деструкции периодонта и возраст пациентов для быстропрогрессирующего периодонтита 18-35 лет, для хронического (простого и сложного) периодонтита 36-60 лет.

Исследован биопсионный материал десен 70 пациентов: группы контроля (n=7), быстропрогрессирующего (n=19), хронического простого (n=9) и хронического сложного (n=35) периодонтитов с оценкой морфологических признаков при стандартной окраске микропрепаратов гематоксилином

и эозином и морфометрическим анализом особенностей иммуногистохимического (ИГХ) окрашивания с моноклональными антителами к MMP9.

Отработка протокола ИГХ окрашивания включала подбор оптимального режима демаскировки антигена (2'30" в буфере pH=9,0 при температуре 125°C в нагреваемой барокамере Pascal), разведения первичных моноклональных антител к MMP9 (1:1600), визуализирующей системы (Biogenex Supersensitive), времени экспозиции хромогена. В качестве хромогена использовали диаминобензидин (DAKO, Дания), в качестве контрокрашивания – гематоксилин Майера. Позитивным контролем выступали ткани и органы, рекомендованные производителем, негативным – исключение первичного антитела.

Для осуществления морфометрического анализа [19] с использованием программы для морфометрии Aperio Image Scope v 12.0 [20] выполняли съемку микропрепаратов в 4-6 случайных непересекающихся полях зрения (x200), с анализом ИГХ окрашивания в поле зрения в целом (которое включало эпителиальный и стромальный компонент в равных пропорциях), а также в эпителиальном и стромальном компонентах десны отдельно. В процессе программного анализа экспрессии MMP9 в ткани десны – интенсивность ИГХ окраски измерялась Aperio Image Scope автоматически и разделялась на 4 уровня интенсивности: 0-100 (выраженная интенсивность, соответствующая очагам красного цвета), 101-175 (умеренная интенсивность, с программным окрашиванием соответствующих участков в оранжевый цвет), 176-220 (слабовыраженная интенсивность, соответствующая участкам желтого цвета) и более 220 (негативная реакция, визуализируемая в виде участков синего цвета) (рис. 1). Цифровой результат программной оценки интенсивности экспрессии имел обратную взаимосвязь с данными визуальной оценки.

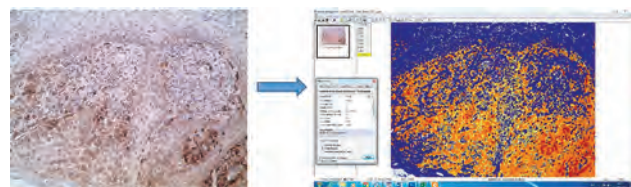


Рис. 1. Результат отработки методики ИГХ выявления экспрессии MMP9 в биопсийном материале десен (x200) и морфометрической оценки особенностей ИГХ окрашивания с помощью программы Aperio ImageScope

Для анализа исследуемых групп по характеру экспрессии MMP9 с использованием программы Aperio Image Scope рассчитывали следующие параметры (x200): позитивность (отношение числа

позитивных пикселей к общему числу позитивных и негативных пикселей $\times 100\%$); общий индекс интенсивности ИГХ реакции (отношение суммы интенсивностей негативных и позитивных пикселей к общему числу позитивных и негативных пикселей).

Исследования выполнены с соблюдением основных положений «Правил этических принципов проведения научных медицинских исследований с участием человека», утвержденных Хельсинской декларацией (1964-2013 г.), ICH GCP (1996 г.), Директивы ЕЭС № 609 (от 24.11.1986 г.) приказов МЗ Украины №690 от 23.09.2009 г., №944 от 14.12.2009 г., №616 от 03.08.2012 г. Для участия в исследовании пациенты подписывали форму «Добровольного информированного согласия пациента на участие в исследовании».

Статистический анализ данных проводили с использованием программного обеспечения STATISTICA 10.0 с вычислением медианы (Me), интерквартильного (25% и 75% процентиля) и 95% доверительного интервалов (ДИ), максимального и минимального значения. Для оценки характера распределения полученных данных использовался критерий Шапиро-Уилка (W). Сравнение независимых выборок по количественным признакам осуществляли с использованием дисперсионного анализа непараметрических данных ANOVA и определением критериев Краскела-Уоллиса (H-критерий) для 3-х и более выборок и Манна-Уитни (U-критерий) с целью парного сравнения выборок [21]. Корреляционные взаимосвязи между анализируемыми признаками вычисляли с использованием рангового коэффициента корреляции непараметрических данных Спирмена (r) [22]. Уровень статистической значимости устанавливался $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение.

При проведении морфологической оценки патогистологического материала десен пациентов с различными формами патологии периодонта анализировали признаки альтеративных изменений: 1) в эпителиальном компоненте (наличие десквамации эпителия, гидропической дистрофии, изъязвления, акантоза, межэпителиальных лейкоцитов), 2) в сосочковом и сетчатом слое десны (наличие разрушения или гипертрофии коллагеновых волокон, кровоизлияний, воспалительной инфильтрации с преобладанием сегментоядерных лейкоцитов и/или мононуклеарной инфильтрации). При этом статистически значимых различий между выделенными группами периодонтитов выявлено не было.

Экспрессия MMP9 выявлялась в виде цитоплазматического и мембранного окрашивания эпителиальных клеток, клеток воспалительного инфильтрата и фибробластов собственной пластинки десны как в группе контроля, так и в группах

пациентов с признаками различных форм периодонтитов. При этом выявлена прямая взаимосвязь позитивности ($r=0,71$) и интенсивности ($r=0,82$) эпителиальной и стромальной экспрессии MMP9 как между собой, так и вовлеченностью эпителиального компонента десны в процесс воспаления, в том числе с его эрозированием.

Согласно полученным результатам (рис. 2, 3), наибольшая вариабельность с максимальной позитивностью экспрессии MMP9 до 66% была выявлена в группе пациентов с хроническим сложным периодонтитом, уменьшалась до 38% и 34% в группах быстропрогрессирующего и хронического простого периодонтитов и не превышала 0,5% в группе контроля. Различия групп периодонтитов по позитивности экспрессии MMP9 в «hot points» были статистически незначимы. Однако комплексная оценка биопсийного материала в 4-6 случайных полях зрения в каждом наблюдении подтвердила

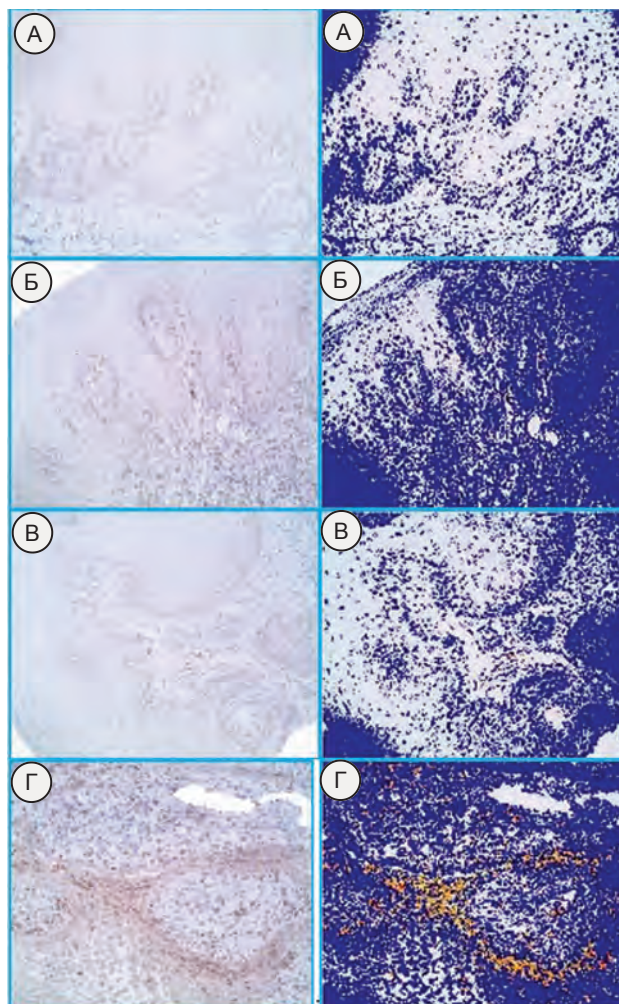


Рис. 2. Иммуногистохимическое окрашивание с антителами к MMP9, $\times 200$ (хромоген – DAB, контролокрашивание гематоксилином Майера) и результат морфометрического анализа с помощью программы Aperio ImageScope

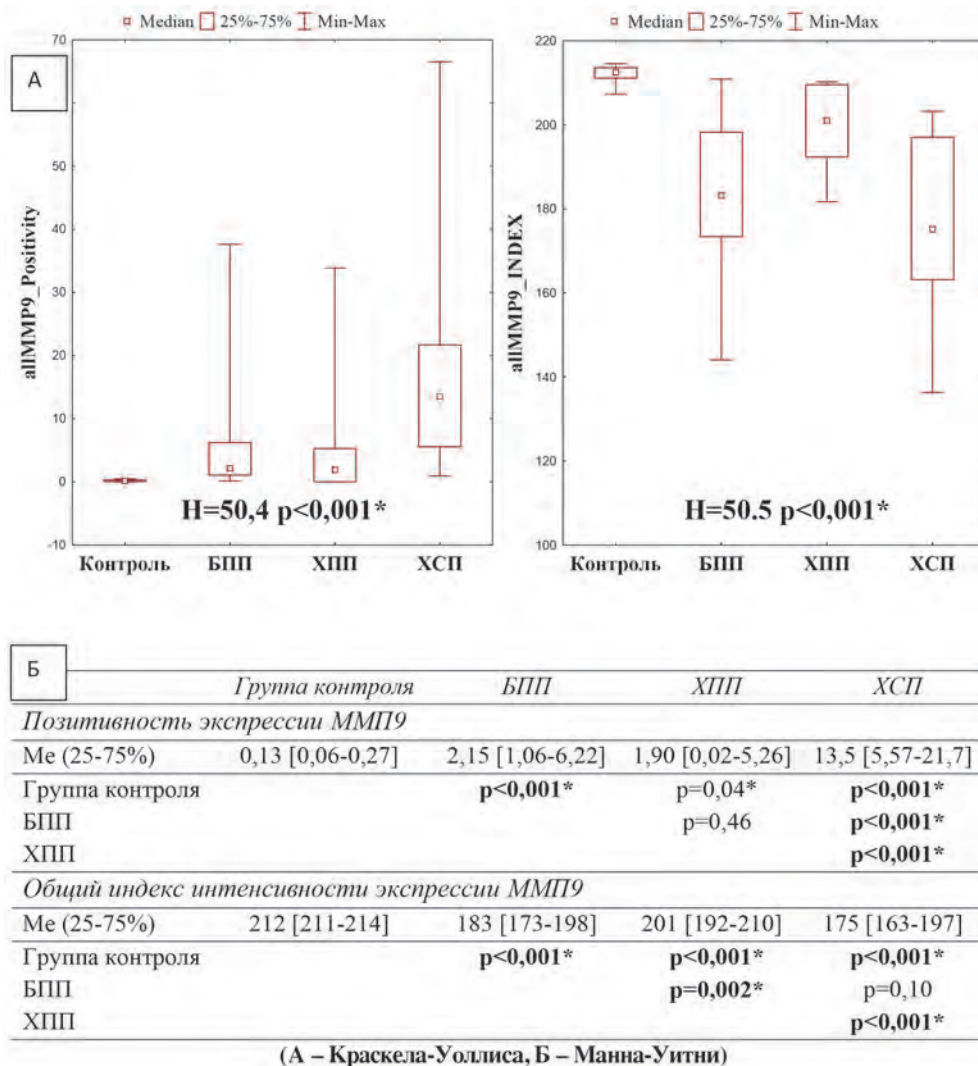


Рис. 3. Дисперсионный анализ позитивности и интенсивности экспрессии MMP9 в биопсийном материале десен в группах пациентов с различным клиническим течением периодонтитов

виявленню тенденцію (рис. 2, 3). При этом в групі пацієнтів з швидкопрогресуючим періодонтитом площа експресії MMP9 була вище, ніж в групі контролю, не мала статистически значимих відмінностей з такою в групі хронічного простого періодонтиту, але була значимо меншою, ніж в групі хронічного складного періодонтиту.

Порівняння досліджуваних груп за індексом інтенсивності експресії MMP9 виявило відсутність відмінностей інтенсивності ІГХ фарбування в імунопозитивних ділянках в групах періодонтитів, яка перевищала таку в групі контролю. Однак аналіз параметрів загальної інтенсивності «hot points» ділянок виявив значимо вищі показники інтенсивності експресії MMP9 в групах швидкопрогресуючого і хронічного складного періодонтитів (які по

даному параметру були порівнянні, $p=0,60$) порівняно з хронічним простим періодонтитом ($p=0,014$ і $p=0,045$), що також підтвердили результати аналізу загального індексу інтенсивності експресії MMP9 при комплексній оцінці 4-6 випадкових полів зору в кожному спостереженні.

Характер експресії MMP9 в біопсійному матеріалі десни в групі контролю (А), швидкопрогресуючого (Б), хронічного простого (В), хронічного складного (Г) періодонтитів показав найбільші показники як позитивності, так і інтенсивності експресії MMP9 і мала статистически значимі відмінності з швидкопрогресуючим періодонтитом не тільки за площею, але і за інтенсивністю експресії.

Отримані в ході дослідження результати за показниками позитивності та інтенсивності експресії MMP9 в біопсійному матеріалі в групах

быстро прогрессирующего и хронического сложного периодонтитов согласуются с литературными данными, в которых показана взаимосвязь уровней ММП9 с тяжестью течения периодонтита, прогрессирующим разрушением коллагеновых волокон и степенью повреждения альвеолярного отростка при периодонтитах [10, 15, 18].

Дисперсионный анализ экспрессии ММП9 в эпителиальном и стромальном компонентах десны отдельно выявил результаты подобные описанным выше (рис. 4, 5). Так определено, что экспрессия ММП9 как в эпителии, так и строме десны в группах периодонтитов значимо превышала таковую в группе контроля как по площади, так и интенсивности экспрессии. Хронический простой периодонтит при анализе только эпителиального или стромального компонентов десны так же, как и поля зрения в целом, включающем как эпителиальный, так и стромальный компоненты, характеризовался значимо меньшими показателями интенсивности при сопоставимой позитивности экс-

прессии ММП9 с быстро прогрессирующим периодонтитом.

В свою очередь, экспрессия ММП9 в эпителиальном компоненте при хроническом сложном периодонтите повторяла уже выявленную тенденцию с сопоставимой интенсивностью и более высокой площадью экспрессии по сравнению с быстро прогрессирующим периодонтитом. В стромальном же компоненте экспрессия ММП9 при хроническом сложном периодонтите.

Выводы. Выявленные особенности экспрессии ММП9 в эпителиальном и стромальном компоненте десны могут выступать в качестве дополнительных дифференциально-диагностических признаков между изученными формами периодонтитов. При этом, наиболее информативными показателями для определения характера течения периодонтита на стадии манифестации заболевания и дифференциальной диагностики быстро прогрессирующего с хроническим сложным периодонтитом является площадь экспрессии ММП9 (которая

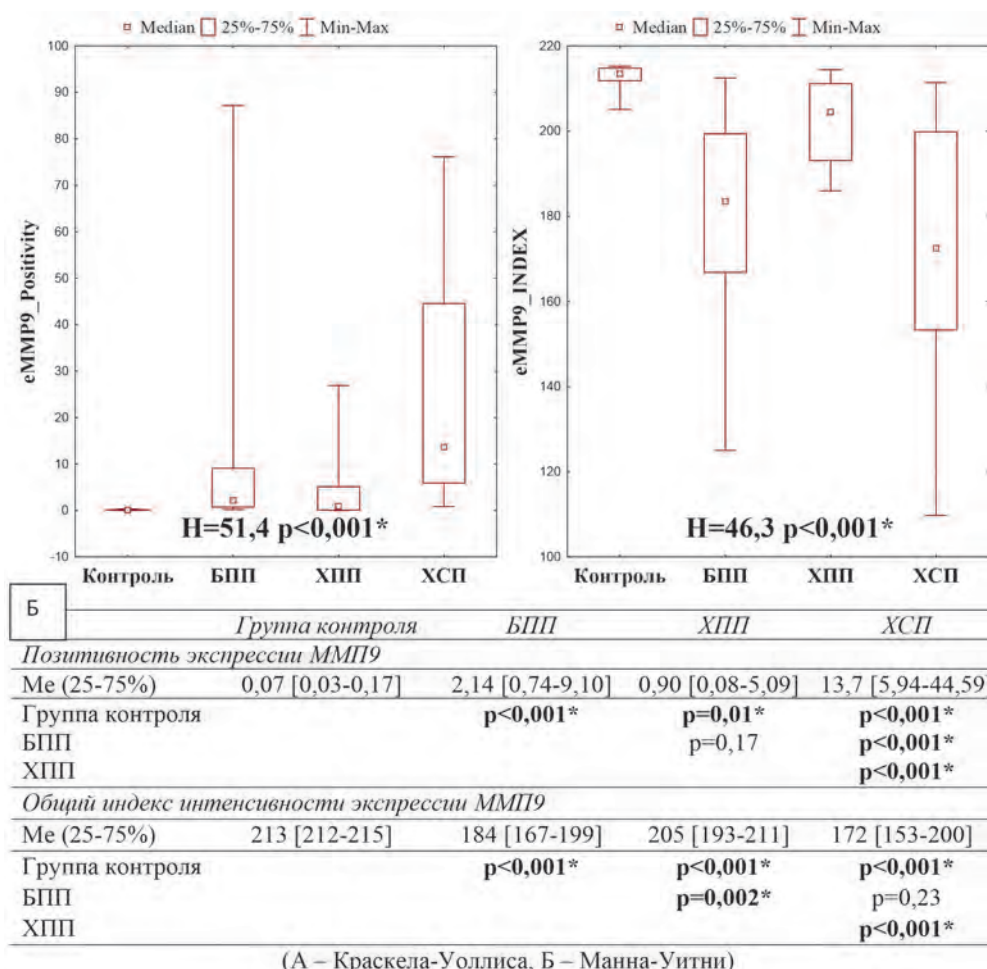
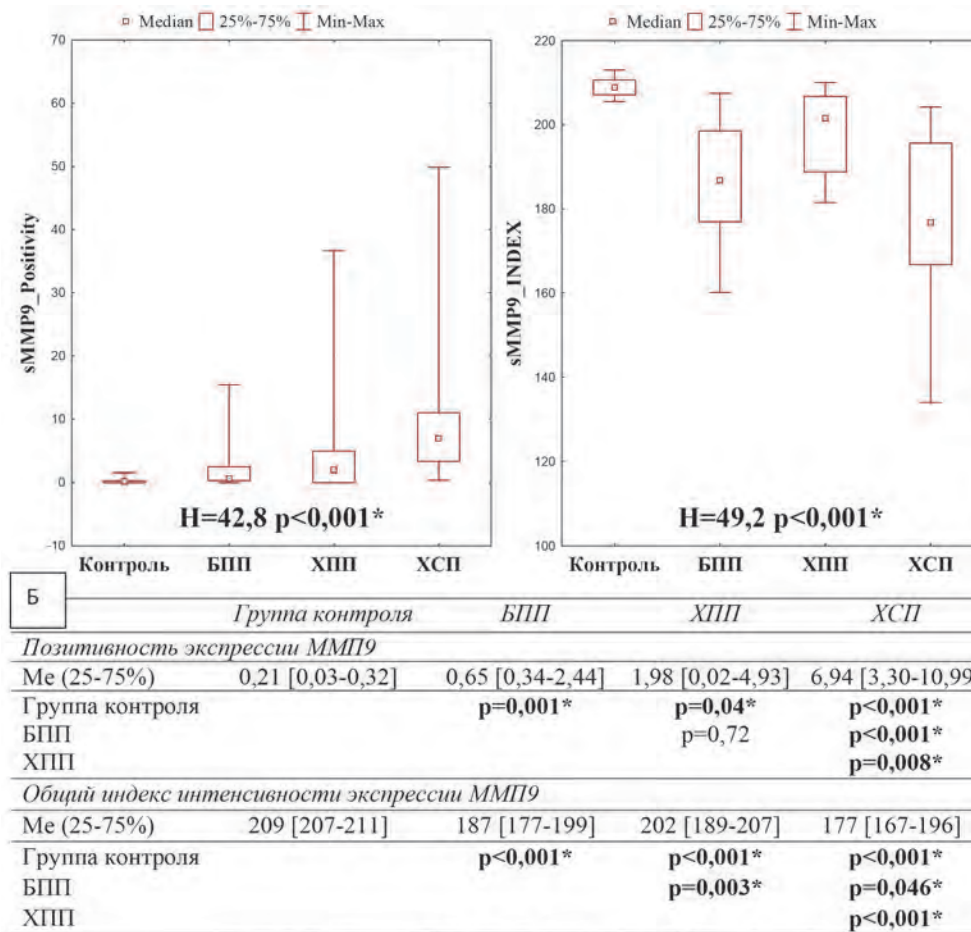


Рис. 4. Дисперсионный анализ позитивности и интенсивности экспрессии ММП9 в эпителиальном компоненте биопсийного материала десен в группах пациентов с различным клиническим течением периодонтитов



(А – Краскела-Уоллиса, Б – Манна-Уитни)

Рис. 5. Дисперсионный анализ позитивности и интенсивности экспресии MMP9 в стромальном компоненте биопсийного материала десен в группах пациентов с различным клиническим течением периодонтитов

в группе хронического сложного периодонтита имеет значимо большие показатели с сопоставимой между группами или более высокой интенсивностью экспресии), а с хроническим простым периодонтитом – интенсивность экспресии ММП9 (которая имеет значимо меньшие показатели в группе хронического простого периодонтита при сопоставимой между группами площади экспресии данного маркера).

Перспективы дальнейших исследований.

Исследование качественных и количественных характеристик ММП и их ингибиторов в ткани десны, десневой жидкости и ротовой жидкости представляет собой перспективное направление фундаментальных исследований, которое позволит разработать новые подходы к диагностике, прогнозированию течения и лечению заболеваний периодонта.

References

1. Yarmolinskaya MI, Molotkov AS, Denisova VM. Matriksnyye metalloproteinazy i ingibitory: klassifikacija, mehanizm dejstvija [Matrix metalloproteinases and inhibitors: Clasification, mechanism of action]. *J of Obstetrics and Women's Diseases*. 2012; 61(1): 113–25. [Russian]
2. Zhigulina VV, Rummyantsev VA. Matriksnyye metalloproteinazy pri parodontite [Matrix metalloproteinases in periodontal disease]. *Bull of the Tver State University. Series: Chemistry*. 2016; 3: 134–44. [Russian]
3. Buduneli N, Kinane F. Host-derived diagnostic markers related to soft tissue destruction and bone degradation in periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2011; 38(11): 85–105. PMID: 21323706. doi: 10.1111/j.1600-051X.2010.01670.x
4. Sorsa T, Mäntylä P, Tervahartiala T, Pussinen PJ, Gamonal J, Hernandez M. MMP activation in diagnostics of periodontitis and systemic inflammation. *J Clin Periodontol*. 2011; 38(9): 817–9. PMID: 21707693. doi: 10.1111/j.1600-051X.2011.01753.x
5. Cauwe B, Martens E, Proost P, Opdenakker G. Multidimensional degradomics identifies systemic autoantigens and intracellular matrix proteins as novel gelatinase B/MMP-9 substrates. *Integr Biol*. 2009; 1(5-6): 404–26. PMID: 20023747. doi: 10.1039/b904701h

6. Han YP, Yan C, Zhou L, Qin L, Tsukamoto H. (A matrix metalloproteinase-9 activation cascade by hepatic stellate cells in trans-differentiation in the three-dimensional extracellular matrix. *J Biol Chem.* 2007; 282: 12928–39. PMID: 17322299. PMCID: PMC2376818. doi: 10.1074/jbc.M700554200
7. Hernandez MJ, Valenzuela MA, Lopez-Otin C, Alvarez J, Lopez JM, Vernal R, et al. Matrix metalloproteinase-13 is highly expressed in destructive periodontal disease activity. *Periodontol.* 2006; 77(11): 1863–70. PMID: 17076612. doi: 10.1902/jop.2006.050461
8. Leppilahti JM, Hernández-Ríos PA, Gamonal JA, Tervahartiala T, Brignardello-Petersen R, Mantyla P, et al. Matrix metalloproteinases and myeloperoxidase in gingival crevicular fluid provide site-specific diagnostic value for chronic periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2014; 41(4): 348–56. PMID: 24382144. doi: 10.1111/jcpe.12223
9. Baeza M, Garrido M, Hernández-Ríos P, Dezerega A, García-Sesnich J, Strauss F, et al. Diagnostic accuracy for apical and chronic periodontitis biomarkers in gingival crevicular fluid: An exploratory study. *J Clin Periodontol.* 2016; 43: 34–45. PMID: 26556177. doi: 10.1111/jcpe.12479
10. Sorsa T, Tjäderhane L, Kontinen YT, Lauhio A, Salo T, Lee HM, et al. Matrix metalloproteinases: Contribution to pathogenesis, diagnosis and treatment of periodontal inflammation. *Ann Med.* 2006; 38(5): 306–21. PMID: 16938801. doi: 10.1080/07853890600800103
11. Kessenbrock K, Plaks V, Werb Z. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell.* 2010; 141(1): 52–67. PMID: 20371345 PMCID: PMC2862057. doi: 10.1016/j.cell.2010.03.015
12. Sorsa T, Tjäderhane L, Salo T. Matrix metalloproteinases (MMPs) in oral diseases. *J Oral Dis.* 2004; 10(6): 311–8. PMID: 15533204. doi: 10.1111/j.1601-0825.2004.01038.x
13. Yugai YuV, Golitsyna AA, Tolmachyov VE, Markelova EV. Analiz pokazatelej matriksnyh metalloproteinaz i ih inhibitorov do i posle dental'noj implantacii [The analysis of indicators of matrix metal proteinases and their inhibitors before and after the dental implantation]. *Pacific Med J.* 2014; 3: 65–7. [Russian]
14. Verstappen J, Vonden Hoff JW. Tissue Inhibitor soft Metalloproteinases (TIMPs): Their Biological Function sand Involvement in Oral Disease. *J Dent Res.* 2006; 85(12): 1074–84. PMID: 17122157. doi: 10.1177/154405910608501202
15. Navlet KP, Nisha KJ, Sanjeela G, Shyam P. Role of Matrix metalloproteinases in periodontal disease- a review. *J Sci&Tech Res.* 2018; 2(1): 2099–104. doi: 10.26717/BJSTR.2018.02.000632
16. Heikkinen AM, Sorsa T, Pitkäniemi J, Tervahartiala T, Kari K, Broms U, et al. Smoking affects diagnostic salivary periodontal disease biomarker levels in adolescents. *J Periodontol.* 2010; 81(9): 1299–307. PMID: 20450405. doi: 10.1902/jop.2010.090608
17. Peppin GJ, Weiss SJ. Activation of the endogenous metalloproteinase, gelatinase, by triggered human neutrophils. *Proc Natl Acad Sci.* 1986; 83(12): 4322–6. PMID: 3012563 PMCID: PMC323724. doi: 10.1073/pnas.83.12.4322
18. Marcaccini AM, Meschiari CA, Zuardi LR, de Sousa TS, Taba M, Teofilo JM, et al. Gingival crevicular fluid levels of MMP-8, MMP-9, TIMP-2, and MPO decrease after periodontal therapy. *J Clin Periodontol.* 2010; 37(2): 180–90. PMID: 19995403. doi: 10.1111/j.1600-051X.2009.01512.x
19. Garcia-Rojo M, Bueno G, Slodkowska J. Review of imaging solutions for integrated quantitative immunohistochemistry in the Pathology daily practice. *Folia histochemica et cytobiologica.* 2009; 47(3): 349–54. PMID: 20164017. doi: 10.2478/v10042-008-0114-4
20. Aperio image analysis user's guide. *Aperio Technologies.* Inc Part Number. Revision: MAN-0013. 2009.
21. Momeni A, Pincus M, Libien J. Comparing Sample Means. *Introduct to Stat Methods in Pathology.* 2018; 6: 121–57. doi: 10.1007/978-3-319-60543-2_6
22. Momeni A, Pincus M, Libien J. Linear correlations. *Introduct to Stat Methods in Pathology.* 2018; 4: 75–91. doi: 10.1007/978-3-319-60543-2_4

УДК 616.314.17-008.1-07:577.1

РОЛЬ ХАРАКТЕРУ ЕКСПРЕСІЇ МАТРИКСНОЇ МЕТАЛОПРОТЕЇНАЗИ 9 В ПАТОГЕНЕЗІ ТА ДІАГНОСТИЦІ ПАТОЛОГІЇ ПЕРІОДОНТА

Казеко Л. А., Захарова В. А., Анфіноженова Е. А., Черствий Е. Д.

Резюме. Мета роботи – встановити значення металопротеїнази 9 для диференціальної діагностики різних форм періодонтитів на етапі маніфестації захворювання шляхом морфометричної оцінки характеру її експресії в біопсійному матеріалі.

Проаналізовано біопсійний матеріал ясен 70 пацієнтів: групи контролю (n=7), швидкопрогресуючого (n=19), хронічного простого (n=9) та хронічного складного (n=35) періодонтитів. Морфометричний і статистичний аналіз експресії металопротеїнази 9 виконаний з використанням AperioImageScopev12. 0 і Statistica 10.0, p<0,05.

Експресія металопротеїнази 9 виявлена у всіх спостереженнях у вигляді цитоплазматичного і мембранного фарбування епітеліальних клітин, клітин запального інфільтрату і вогнищ фібробластів власної пластинки ясен як у групі контролю, так і в групах пацієнтів з ознаками різних форм періодонтитів. При цьому встановлений прямий взаємозв'язок позитивності ($\rho=0,71$) і інтенсивності ($\rho=0,82$) епітеліальної і

стромальної експресії металопротеїнази 9, а також із залученістю епітеліального компонента в процес запалення, в тому числі його ерозуванням. Найбільша варіабельність з максимальною позитивністю експресії металопротеїнази 9 до 66% була виявлена в групі пацієнтів з хронічним складним періодонтитом, знижувалася до 38% і 34% – у групах швидкопрогресуючого і хронічного простого періодонтиту ($p < 0,001$), і не перевищувала 0,5% у групі контролю. При цьому у групі пацієнтів з швидкопрогресуючим періодонтитом площа експресії металопротеїнази 99 не мала статистично значущих відмінностей з такою в групі хронічного простого періодонтиту, але була значимо меншою, ніж у групі хронічного складного періодонтиту. Аналіз інтенсивності експресії ММП9 «hot points» ділянок виявив значимо більш високі показники інтенсивності в групах швидкопрогресуючого і хронічного складного періодонтитів (які по даному параметру були порівнянні, $p = 0,60$) в порівнянні з хронічним простим періодонтитом ($p = 0,014$ і $p = 0,045$).

Найбільш інформативними показниками для визначення характеру перебігу періодонтиту на стадії маніфестації захворювання та диференціальної діагностики швидкопрогресуючого з хронічним складним періодонтитом є площа експресії металопротеїнази 9 (яка в групі хронічного складного періодонтиту має значимо більші показники з порівнянною інтенсивністю експресії), а з хронічним простим періодонтитом – інтенсивність експресії металопротеїнази 9 (яка має значимо менші показники у групі хронічного простого періодонтиту при порівнянні площі експресії цього маркера).

Ключові слова: періодонтит, матрична металопротеїназа 9, імуногістохімія, експресія, прогноз.

UDC 616.314.17-008.1-07:577.1

Role of the Character of Expression of Matrix Metalloproteinase 9 in the Pathogenesis and Diagnostics of the Periodontal Pathology

Kazeko L. A., Zakharova V. A., Anfinogenova E. A., Cherstvy E. D.

Abstract. *The purpose of the study was to determine the metalloproteinase 9 level for the differential diagnosis of periodontitis' various forms at the stage of disease manifestation by morphometric evaluation of its expression in biopsy.*

Material and methods. Biopsy material of the gums of 70 patients was analyzed. There were control groups ($n=7$), rapidly progressive ($n=19$), chronic simplex ($n=9$) and chronic complex ($n=35$) periodontitis. Morphometric and statistical analysis of metalloproteinase 9 expression were performed using AperioImageScope v12.0 and Statistica 10.0, $p < 0.05$.

Results and discussion. Metalloproteinase 9 expression was detected in all the research clinical cases like cytoplasmic and membrane staining of epithelial cells, inflammatory infiltrate cells and fibroblast of the gingival lamina in the control group such as the groups of patients with signs of periodontitis. A direct relationship was found between the positivity ($p = 0.71$) and intensity ($p = 0.82$) of the epithelial and stromal expression of metalloproteinase 9, as well as the involvement of the epithelial component into the inflammation process, including its erosion. The highest variability with a maximum positivity of metalloproteinase 9 expression up to 66% was found in the group of patients with chronic complex periodontitis, it decreased to 38% and 34% in the groups of rapidly progressive and chronic simplex periodontitis ($p < 0.001$) and did not exceed 0.5% in the control group.

Moreover, the expression area of metalloproteinase 9 did not have statistically significant differences in the group of patients with rapidly progressive periodontitis, with that in the group of chronic simplex periodontitis, but it was significantly smaller than in the group of chronic complex periodontitis. Analysis of the expression intensity of metalloproteinase 9 "hot points" of the sites revealed significantly higher intensity number in the groups of rapidly progressive and chronic complex periodontitis (which were comparabled in this parameter, $p = 0.60$) compared with chronic simplex periodontitis ($p = 0.014$ and $p = 0.045$).

Conclusion. The expression area of metalloproteinase 9 (which was in the group of chronic complex periodontitis has significantly higher rates with comparable expression intensity) is the most informative indicator for determination of the course of periodontitis at the stage of disease manifestation and for the differential diagnosis of rapidly progressive periodontitis with chronic complex periodontitis. The expression intensity of metalloproteinase 9 (which has significantly lower rates in the group of chronic simplex periodontitis with comparable expression of the marker area) is a key indicator for the chronic simplex periodontitis.

Keywords: periodontitis, matrix metalloproteinase 9, immunohistochemistry, expression, prognosis.

The authors of this study confirm that the research and publication of the results were not associated with any conflicts regarding commercial or financial relations, relations with organizations and/or individuals who may have been related to the study, and interrelations of coauthors of the article.

Стаття надійшла 03.11.2019 р.

Рекомендована до друку на засіданні редакційної колегії після рецензування