

Л.А. Казеко<sup>1</sup>, В.А. Захарова<sup>2</sup>,  
Ю.Д. Бенеш<sup>1</sup>, Е.Д. Черствый<sup>1</sup>



<sup>1</sup>Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Республика Беларусь

<sup>2</sup>Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова, пос. Лесной Минского р-на Минской области, Республика Беларусь

# Роль экспрессии тканевых ингибиторов матриксных металлопротеиназ в патогенезе и дифференциальной диагностике патологии пародонта

**Обоснование.** Баланс металлопротеиназ (ММПs) и их тканевых ингибиторов (ТИМPs) имеет решающее значение для манифестации и прогрессирования заболеваний пародонта и является одним из перспективных направлений научных исследований в части разработки способов селективного ингибирования ММПs. **Цель исследования** — установить значение параметров экспрессии ТИМР1 и ТИМР2 в биопсийном материале десны для определения характера течения пародонтита на этапе манифестации заболевания. **Методы.** Проведено проспективное исследование с параллельным включением пациентов с различными формами пародонтита в сравниваемые группы. Патоморфологическое исследование с морфометрическим анализом экспрессии ТИМPs и последующим статистическим анализом данных выполнено с использованием AperioImageScope v. 12.4.0.5043, Statistica 10.0, MedCalc 19.6. **Результаты.** В исследование включено 67 пациентов с быстро прогрессирующим (БПП, агрессивный, грейд С, n = 19), хроническим простым (ХПП, грейд В, n = 10), хроническим сложным (ХСП при наличии окклюзионной травмы, грейд В, n = 38) пародонтитом и 15 условно здоровых пациентов (группа сравнения). Экспрессия ТИМР1 и ТИМР2 выявлялась с переменной позитивностью и интенсивностью как в эпителии, так и в строме десны и значимо превышала в различных группах пародонтитов таковую группы сравнения ( $Me_{ТИМР1/2} = 32\%/70\%$ ),  $p < 0,05$ . Параметры экспрессии ТИМР1 и ТИМР2 не имели значимых различий в группах с БПП ( $Me_{ТИМР1/2} = 84\%/98\%$ ) и ХСП ( $Me_{ТИМР1/2} = 83\%/94\%$ ), за исключением более высокой позитивности эпителиальной экспрессии ТИМР2 ( $U = 61\ 372$ ;  $p < 0,05$ ) и более низкой интенсивности его экспрессии при БПП ( $Me_{БПП/ХСП} = 180/171$ ;  $U = 56\ 491$ ;  $p < 0,001$ ). Корреляционный анализ выявил обратную взаимосвязь параметров экспрессии ТИМPs с таковыми ММПs, в том числе с наиболее значимыми для развития БПП ММП1 ( $\rho = -0,40$ ), ММП8 ( $\rho = -0,34$ ) и ММП14 ( $\rho = -0,24$ ). ROC-анализ подтвердил приемлемую информативность всех изученных параметров общей экспрессии и позитивности эпителиальной экспрессии ТИМР1, а также позитивности общей экспрессии и интенсивности эпителиальной экспрессии ТИМР2 для дифференциальной диагностики быстро и медленно прогрессирующих форм пародонтита на стадии манифестации заболевания. **Заключение.** Полученные нами результаты показывают повышение экспрессии ТИМР1 и ТИМР2 при различных формах пародонтита и обратную взаимосвязь с ингибируемыми ими ММПs. Это дополняет фундаментальные знания о развитии и прогрессировании патологии пародонта и может обладать прикладным значением в части использования изученных критериев экспрессии ТИМР1 и ТИМР2 для установления быстро прогрессирующего характера течения пародонтита уже на стадии манифестации заболевания, что позволит индивидуализировать лечение, предупредить или замедлить потерю зубов с целью сохранения и/или улучшения качества жизни данной группы пациентов. **Ключевые слова:** пародонтит, тканевый ингибитор матриксной металлопротеиназы, иммуногистохимия, биопсия десны. **Для цитирования:** Казеко Л.А., Захарова В.А., Бенеш Ю.Д., Черствый Е.Д. Роль экспрессии тканевых ингибиторов матриксных металлопротеиназ в патогенезе и дифференциальной диагностике патологии пародонта. Вестник РАМН. 2023;78(3):213–226. doi: <https://doi.org/10.15690/vramn2041>

213

## Обоснование

Основная роль в деградации соединительной ткани и альвеолярного отростка кости при пародонтите принадлежит активированным ферментам клеток-хозяев [1], среди которых наиболее значимую группу представляют матриксные металлопротеиназы (ММПs). Выделяют два основных пути регуляции активности ММПs: протеолитическую активацию неактивных ферментов (pro-MMP) и взаимодействие с ингибиторами матриксных металлопротеиназ (ТИМPs).

ТИМPs представляют собой тканеспецифические эндогенные ингибиторы ММПs, дезинтегрин и металлопротеиназ с мотивами тромбоспондина (ADAMTS) [2], которые образуют прочные нековалентные комплексы с активным центром ММПs и снижают их активность в соотношении 1:1 [3]. ТИМPs объединены в семейство, состоящее из четырех гомогенных ферментов с при-

близительно сопоставимым потенциалом [3–5]. В последовательности генов всех четырех ТИМPs не выявлено большого сходства, что свидетельствует об уникальной биологической роли каждого из них. Все ТИМPs представлены двумя доменами, связанными между собой шестью дисульфидными связями: малым С-концевым и большим N-концевым, представляющим собой остаток Cys, который связывается с активным Zn<sup>2+</sup>-связывающим центром ММП в эквимолярном соотношении, вследствие чего и наблюдается ингибирование. С-концевой домен задействован в активации pro-MMP [3, 6].

ТИМР1 впервые был выделен на культуре человеческих фибробластов. ТИМР1 связывается с неактивным pro-MMP9, образуя комплекс, в котором ТИМР1 сохраняет способность ингибировать активность другого активного ММП через его N-концевой домен [7]. ТИМР1 широко синтезируется многими клетками и тканями организма, а транскрипция гена ТИМР1 индуцируется

провоспалительными цитокинами (IL-1, IL-6, OSM, LIF и TNF-α), TGF-β [7, 8]. TIMP1 играет важную роль в активации незрелых клеток пульпы для нормального дентиногенеза, его экспрессия повышается при воспалении и онкогенезе.

TIMP2 был впервые обнаружен при разработке техники обратной зимографии [9]. Y. De Clerck et al. [10] выделили этот белок из бычьей эндотелиальной клеточной культуры. TIMP2 ингибирует все MMPs, однако наиболее сильное ингибирующее действие он оказывает на MMP8 [11].

В 1990 г. N. Pavloff et al. идентифицировали TIMP3 [12]. Клоны TIMP3 человека и мыши были секвенированы S. Arpe et al. в 1992 г. [13]. TIMP3 является уникальным среди TIMPs млекопитающих по ингибированию более широкого ряда MMPs, включая несколько членов семейств ADAM и ADAMTS [9].

TIMP4 впервые был идентифицирован при клонировании [14], мРНК обнаружена в тканях сердца, в более низких концентрациях — в почках, плаценте, толстой кишке. TIMP4 сопоставим с TIMP2 в его способности связываться с pro-MMP2 [15] и способен ингибировать MMP1, 2, 3, 7, 9.

Все TIMPs не специфичны и способны ингибировать все известные MMPs, хотя наблюдается определенная предпочтительность связывания (табл. 1) [16].

Разрушение пародонтальной связки и альвеолярной кости при пародонтите отражает относительную сверхэкспрессию MMPs по отношению к TIMPs и может быть

уменьшено при восстановлении этого баланса. Показано, что ингибирование экспрессии или активности MMPs или увеличение экспрессии TIMPs может снизить скорость разрушения тканей при пародонтите [17]. Согласно данным E. Mouzakiti et al. [18], на фоне лечения пародонтита значительно увеличивалась экспрессия TIMP1 и уменьшилось соотношение MMPs/TIMP1. Экспрессия TIMP1 у пациентов с болезнями пародонта сразу после лечения была выше таковой у здоровых пациентов [18], и уровни TIMP1, TIMP2 постепенно снижались после терапии болезней пародонта [19].

Научными исследованиями доказано, что TIMP1, 2 и 3 участвуют в формировании эмбриональной кости [20, 21], а TIMP1 и 2 [22] — и в постнатальном развитии костей. Установлено, что остеобласты и остециты экспрессируют TIMP1, 2 и 3 [20–22]. Согласно данным K. Hatori et al. [23], MMPs и TIMPs могут играть ключевую роль в постнатальном аппозиционном формировании кости и созревании костного матрикса посредством ремоделирования молекул внеклеточного матрикса. Дальнейшее изучение этого вопроса актуально для понимания биологической интеграции искусственного материала с костью для клинических целей, например восстановления костных дефектов искусственными заменителями, в том числе при патологии пародонта и установке дентальных имплантатов.

Баланс MMPs и TIMPs имеет решающее значение для разрушения соединительнотканного матрикса как при физиологических, так и при патологических со-

L.A. Kazeko<sup>1</sup>, V.A. Zakharava<sup>2</sup>, J.D. Benesh<sup>1</sup>, E.D. Cherstvoy<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

<sup>2</sup>N.N. Alexandrov National Cancer Centre of Belarus, Lesnoy, Minsk District, Minsk Region, Republic of Belarus

## Significance of Tissue Inhibitors of Matrix Metalloproteinases Expression in Pathogenesis and Differential Diagnosis of Periodontal Pathology

**Background.** The balance of metalloproteinases (MMPs) and their tissue inhibitors (TIMPs) is crucial for the manifestation and progression of periodontal diseases and is one of the promising areas of scientific research in terms of developing methods for selective inhibition of MMPs.

**Aims** — to determine the significance of TIMP1 and TIMP2 expression parameters in gingival biopsies to identify the type of periodontitis at the stage of disease manifestation. **Methods.** A prospective study with parallel inclusion of patients with different forms of periodontitis in the compared groups was performed. The object of this study were patients with various forms of periodontitis. Pathological examination with morphometric analysis of TIMPs expression and subsequent statistical data analysis was performed using AperioImageScope v12.4.0.5043, Statistica 10.0, MedCalc19.6. **Results.** The study included 67 patients with aggressive (AgP, Grade C, n = 19), chronic simplex (CSP, Grade B, n = 10) and chronic complex (CCP, in the presence of occlusal trauma, Grade B, n = 38) periodontitis and 15 conditionally healthy patients (control group). The expression of TIMP1 and TIMP2 was detected with variable intensity both in the epithelium and in the stroma of the gingiva, and was significantly higher in periodontitis groups compared with the control group ( $Me_{TIMP1/2} = 32\%/70\%$ ). Parameters of TIMP1 and TIMP2 expression had no significant differences in the groups with AgP ( $Me_{TIMP1/2} = 84\%/98\%$ ) and CCP ( $Me_{TIMP1/2} = 83\%/94\%$ ), except for higher parameters of the positivity of epithelial expression of TIMP2 ( $U = 61\ 372; p < 0.05$ ) and lower levels of intensity of its expression in AgP ( $Me_{AgP/CCP} = 180/171; U = 56\ 491; p < 0.001$ ). Correlation analysis revealed an inverse relationship of TIMPs expression parameters with those MMPs, including those most significant for the development of AgP — MMP1 ( $\rho = -0.40$ ), MMP8 ( $\rho = -0.34$ ), and MMP14 ( $\rho = -0.24$ ). ROC analysis established acceptable informativeness of all studied parameters of total expression and positivity of epithelial expression of TIMP1, as well as positivity of total expression and intensity of epithelial expression of TIMP2 to distinguish between aggressive and chronic forms of periodontitis at the stage of disease manifestation. **Conclusion.** Our results show an increase in the expression of TIMP1 and TIMP2 in various forms of periodontitis and an inverse relationship with the MMPs inhibited by them. This complements both the fundamental knowledge of the development and progression of periodontal pathology and may have applied significance in terms of using the studied TIMP1 and TIMP2 expression criteria to establish the aggressive course of periodontitis already at the stage of disease manifestation, which will allow to individualize treatment, prevent or slow down tooth loss in order to preserve and/or improve the quality of life of this patient group.

**Keywords:** periodontitis, tissue inhibitor of metalloproteinases, immunohistochemistry, gingival biopsies

**For citation:** Kazeko LA, Zakharava VA, Benesh JD, Cherstvoy ED. Significance of Tissue Inhibitors of Matrix Metalloproteinases Expression in Pathogenesis and Differential Diagnosis of Periodontal Pathology. *Annals of the Russian Academy of Medical Sciences.* 2023;78(3):213–226. doi: <https://doi.org/10.15690/vramn2041>

Таблица 1. Предпочтительное ингибирование MMPs известными TIMPs

MMPs	TIMPs	Источник [16]
MMP1	TIMP4	Radomski et al. (2002)
MMP2	TIMP2, TIMP3, TIMP4	Chowdhury et al. (2015); Suomela et al. (2001); Radomski et al. (2002)
MMP7	TIMP1, TIMP4	Bourbouliа, Stetler-Stevenson (2010); Radomski et al. (2002)
MMP8	TIMP1	Hästbacka et al. (2015)
MMP9	TIMP1, TIMP3, TIMP4	Mittal et al. (2016); Suomela et al. (2001); Radomski et al. (2002)
MMP12	TIMP1	Suomela, et al. (2001)
MMP13	TIMP3	Suomela, et al. (2001)
MMP14	TIMP2, TIMP4	Itoh (2015); Radomski, et al. (2002)

стояниях. Поэтому по-прежнему сохраняет актуальность изучение взаимосвязи между MMPs и TIMPs как отражение особенностей течения и прогрессирования заболеваний пародонта. Дальнейшие научные исследования по разработке способов регулирования активности ферментов с селективным ингибирующим действием на MMPs и других членов семейства металлопротеиназ [6] могут помочь предупредить или замедлить частичную или полную потерю зубов и сохранить качество жизни пациентов с патологией пародонта.

**Цель исследования** — установить значение параметров экспрессии TIMP1 и TIMP2 в биопсийном материале десны для определения характера течения пародонтита на этапе манифестации заболевания.

## Методы

### Дизайн исследования

Проведено проспективное исследование с параллельным включением в сравниваемые группы пациентов с различными формами пародонтита.

### Критерии соответствия

При формировании групп исследования использовались критерии классификаций пародонтитов, приведенные в табл. 2.

#### Критерии включения:

- наличие быстро прогрессирующего (БПП, грейд С), хронического простого (ХПП, грейд В) и сложного (ХСП с окклюзионной травмой, грейд В) пародонтита;

- возраст — 18–60 лет (18–35 лет — для быстро прогрессирующего, 36–60 лет — для хронического простого и сложного пародонтита);
- лица мужского и женского пола;
- информированное согласие пациентов для проведения исследования.

#### Критерии исключения:

- отказ пациента от исследования;
- возраст пациентов до 18 лет и старше 60 лет;
- беременность или лактация (женщины);
- медицинский или психиатрический риск, нарушающий получение анамнестической информации;
- наличие острого инфекционного процесса челюстно-лицевой области;
- наличие тяжелой сопутствующей соматической и инфекционной патологии;
- остеопороз и хронические заболевания, связанные с риском его развития;
- прием медикаментов, влияющих на минеральную плотность костной ткани (при подозрении на быстро прогрессирующее течение пародонтита).

### Условия проведения

Клинико-инструментальное исследование и обследование пациентов с использованием лучевых методов диагностики проведено на 1-й кафедре терапевтической стоматологии УО «Белорусский государственный медицинский университет» на базе ГУ «Республиканская клиническая стоматологическая поликлиника» и включало: оценку гигиены полости рта (ОНИ-S), тяжести воспаления десны (GI); определение глубины зондирования пародонтальных карманов и утери прикрепления (LA), рецессии

Таблица 2. Международные и региональные классификации пародонтитов, действующие в период формирования групп и проведения исследования

1999 Classification of Periodontitis	Клиническая классификация (региональная) 2002–2019	МКБ-10	2018 AAP Periodontal Classification
Chronic periodontitis	Хронический пародонтит (K05.3): сложный (с деструкцией периодонтальной связки и межальвеолярной кости с наличием вертикальной резорбции и окклюзионной травмы); простой (с деструкцией периодонтальной связки и межальвеолярной кости с наличием горизонтальной резорбции)	K05.3 Хронический пародонтит: БДУ; сложный; простой	Periodontitis Grade B
Aggressive periodontitis	Быстро прогрессирующий пародонтит (K05.4)	В МКБ-10 форма быстро прогрессирующего пародонтита взрослых ошибочно не учтена	Periodontitis Grade C

десны, поражения фуркации, патологической миграции зубов, их подвижности, наличия окклюзионной травмы с регистрацией всех результатов обследования в пародонтальной карте; выполнение общего и биохимического анализа крови, анализа крови на тиреоидные гормоны и остеоденситометрии для исключения соматической патологии, влияющей на состояние пародонта; обследование с применением методов лучевой диагностики (панорамной рентгенографии или компьютерной томографии) для оценки уровня и характера резорбции костной ткани. Морфологический раздел выполнен на базе кафедры патологической анатомии УО «Белорусский государственный медицинский университет».

**Продолжительность исследования**

Исследовался биопсийный материал десен пациентов с патологией пародонта, обратившихся за медицинской помощью в период 2018–2020 гг.

**Описание медицинского вмешательства**

Полость рта в области поражения и планируемой биопсии обрабатывалась антисептическим лекарственным средством с проведением инфильтрационной анестезии. Далее выполнялся кюретаж пародонтальных карманов с взятием инцизионной биопсии краевой десны в области медиального или дистального сосочков в участках максимального клинически определяемого поражения пародонта, включая боковую стенку пародонтального кармана, с использованием острых хирургических ножниц или скальпеля малого брюшистого № 15. Оптимальный размер биоптата не должен был быть менее 1,5 мм в толщину и 2–3 мм в высоту. Иссеченный участок десны переносился на полоску фильтровальной бумаги размером 2,0 × 5,0 см, которая складывалась в 3–4 слоя и перевязывалась 2–3 узлами шовного материала для удержания биоптата в расправленном состоянии с целью исключения его пространственной деформации и получения правильно ориентированных срезов для патогистологического исследования с погружением биопсийного материала в емкость с 10%-м раствором нейтрального формалина. Послеоперационная рана промывалась антисептическим лекарственным средством с последующим гемостазом компрессией и контрольным осмотром на следующий день.

**Исходы исследования**

Определение параметров экспрессии TIMP1 и TIMP2 с использованием программы AperioImageScope в биопсийном материале десен пациентов с различными формами пародонтита:

- позитивность (Positivity) — отношение числа позитивных пикселей к общему числу позитивных и негативных пикселей × 100%;

- доля пикселей с высокой и умеренной интенсивностью (Nsg+р) — отношение числа позитивных пикселей с высокой и умеренной интенсивностью к общему числу позитивных и негативных пикселей × 100%;
- индекс интенсивности в иммунопозитивных участках (TIMPs\_index) — отношение суммы интенсивностей пикселей с высокой, средней и низкой интенсивностью к числу позитивных пикселей;
- общий индекс интенсивности ИГХ-реакции (TIMPs\_INDEX) — отношение суммы интенсивностей негативных и позитивных пикселей к общему числу позитивных и негативных пикселей.

**Методы регистрации исходов**

Биопсийный материал десен дегидратировался в спиртах восходящей концентрации при помощи тканевого процессора, заключался в парафин с ориентацией плоскости биопсийного среза перпендикулярно плоскости среза парафинового блока с использованием заливочного центра с наличием «холодной точки» для правильной его ориентации. Из блоков изготавливались гистологические срезы толщиной 2,5 мкм, которые окрашивались гематоксилином и эозином и заключались в «канадский бальзам» или аналогичную среду, покрывались покровным стеклом.

Оценке подлежали выраженность и состав воспалительной инфильтрации в сосочковом и сетчатом слоях десны, наличие межэпителиальных лейкоцитов, наличие некроза или гипертрофии коллагеновых волокон, кровоизлияний, наличие и характер дистрофии в эпителиальном компоненте десны, ее эрозирование, десквамация эпителия, акантоз.

С парафиновых блоков наиболее информативных гистологических препаратов изготавливались срезы толщиной 2,5 мкм, которые после депарафинизации окрашивались с использованием иммуногистохимического метода (ИГХМ). Протоколы иммуногистохимического окрашивания с моноклональными антителами к TIMP1 и TIMP2 и характеристика выявленной экспрессии указаны в табл. 3.

В последующем выполнялось сканирование иммуногистохимических препаратов цифровым слайд-сканером MoticEasyScan с анализом полученных изображений при помощи AperioImageScope v. 12.4.0.5043. Проводилось выделение 9 случайных непересекающихся полей зрения (цифровое увеличение — ×20) с анализом иммуногистохимического окрашивания отдельно в эпителиальном и стромальном компоненте десны, а также полей, включающих в равной пропорции как эпителиальный, так и стромальный компонент (по 3 поля зрения). В рамках программного анализа экспрессии TIMPs в ткани десны интенсивность продуктов реакции диамибензидаина измерялась AperioImageScope автоматически и разделя-

**Таблица 3.** Ключевые особенности иммуногистохимического метода для выявления TIMP1 и TIMP2 в биопсийном материале десен пациентов с различными формами пародонтита

Первичное антитело	TIMP1	TIMP2
Происхождение антител	Rabbit	Mouse
Демаскировочный буфер, рН	рН = 9,0 125о 2'30''	рН = 9,0 125о 2'30''
Разведение	1:50	1:800
Время экспозиции хромогена, мин	4	5
Позитивный контроль	Предстательная железа	Почка
Характер экспрессии	Гомогенное цитоплазматическое и мембранное окрашивание в коричневый цвет различной интенсивности лейкоцитов/гистиоцитов, эпителия десны, фибробластов, эндотелиоцитов (TIMP2)	

лась на три уровня интенсивности и негативную реакцию. Результат программной оценки параметров позитивности и доли пикселей с высокой и умеренной экспрессией имел прямую взаимосвязь, а интенсивность экспрессии — обратную взаимосвязь с данными визуальной оценки.

### Этическая экспертиза

Этическая экспертиза проведена на заседании комитета по биомедицинской этике Белорусского государственного медицинского университета (протокол № 13 от 28 июня 2018 г.) с одобрением плана проведения и дизайна настоящего исследования и необходимости получения информированного согласия на обследование и лечение от каждого тематического пациента.

### Статистический анализ

**Принципы расчета размера выборки.** Размер выборки предварительно не рассчитывался, а определялся количеством пациентов, соответствующих установленным критериям включения и исключения.

**Методы статистического анализа данных.** Статистический анализ данных проводился с использованием программного обеспечения Statistica 10.0, MedCalc 19.6. Поскольку распределение данных с использованием критерия Шапиро–Уилка ( $W$ ) в некоторых из групп отличалось от нормального, для анализа данных применены методы непараметрической статистики с вычислением медианы ( $Me$ ), интерквартильного ( $IQR$ ) и 95%-го доверительного интервалов, максимального и минимального значений. Сравнение независимых выборок по количественным признакам осуществляли с использованием дисперсионного анализа непараметрических данных ANOVA и определении критериев Краскела–Уоллиса ( $H$ ), Манна–Уитни ( $U$ -критерий) и хи-квадрат ( $\chi^2$ ). Анализ взаимосвязи исследуемых параметров выполнен с использованием критерия Спирмена ( $\rho$ ). С целью решения задачи классификации пародонитов и оценки ее диагностической эффективности выполнен ROC-анализ с определением пороговых

значений и их операционных характеристик — диагностической чувствительности (ДЧ) и специфичности (ДС).

## Результаты

### Объекты (участники) исследования

Объектом исследования явились 67 пациентов с быстропрогрессирующим (грейд С,  $n = 19$ ), хроническим простым (грейд В,  $n = 10$ ) и хроническим сложным (при наличии окклюзионной травмы, грейд В,  $n = 38$ ) пародонитом и 15 условно здоровых пациентов (предимплантационные биопсии — группа контроля), которым было проведено клинико-инструментальное обследование и лечение с получением у каждого пациента информированного согласия. Патогистологическое исследование биопсийного материала десен пациентов с различными формами пародонтита не выявило статистически значимых различий между исследуемыми группами по оцениваемым признакам дистрофических изменений эпителия и собственной пластинки десны, состоянию коллагеновых волокон, наличию кровоизлияний, выраженности и составу воспалительной инфильтрации. Группы исследования были также сопоставимы по основным клинико-рентгенологическим параметрам за исключением данных панорамной и/или компьютерной томографии, при которой в группах быстропрогрессирующего и хронического сложного пародонтита статистически значимо чаще выявлялась вертикальная резорбция костной ткани I–II степени ( $p \leq 0,005$ ), а в группе хронического простого пародонтита преобладала горизонтальная резорбция I–II степени ( $p \leq 0,05$ ) (табл. 4).

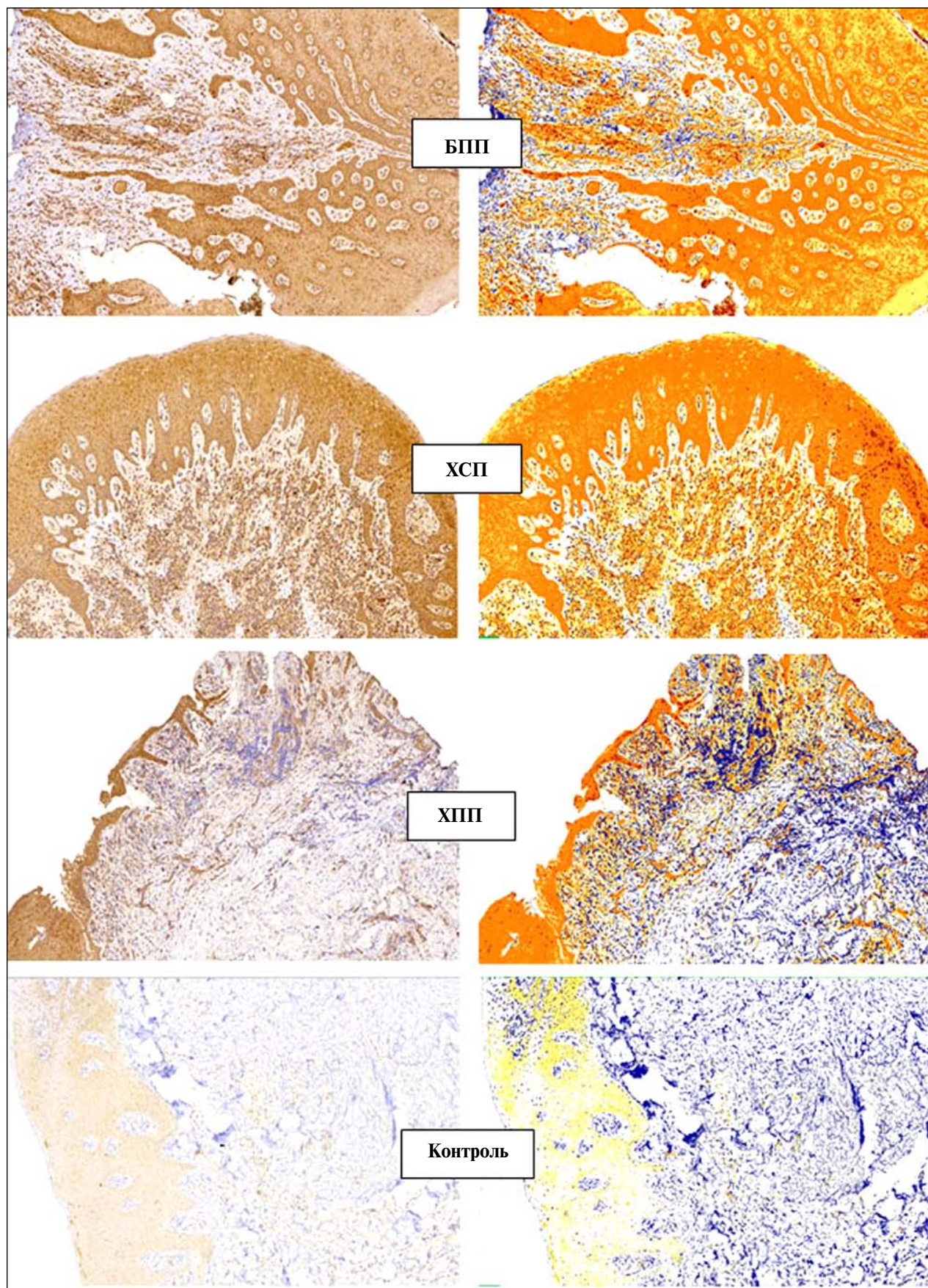
### Основные результаты исследования

Экспрессия TIMP1 и TIMP2 выявлялась с вариабельной позитивностью и интенсивностью в как в эпителии, так и в строме десны при различных формах пародонтита и в группе предимплантационных биопсий (рис. 1, 2, табл. 5).

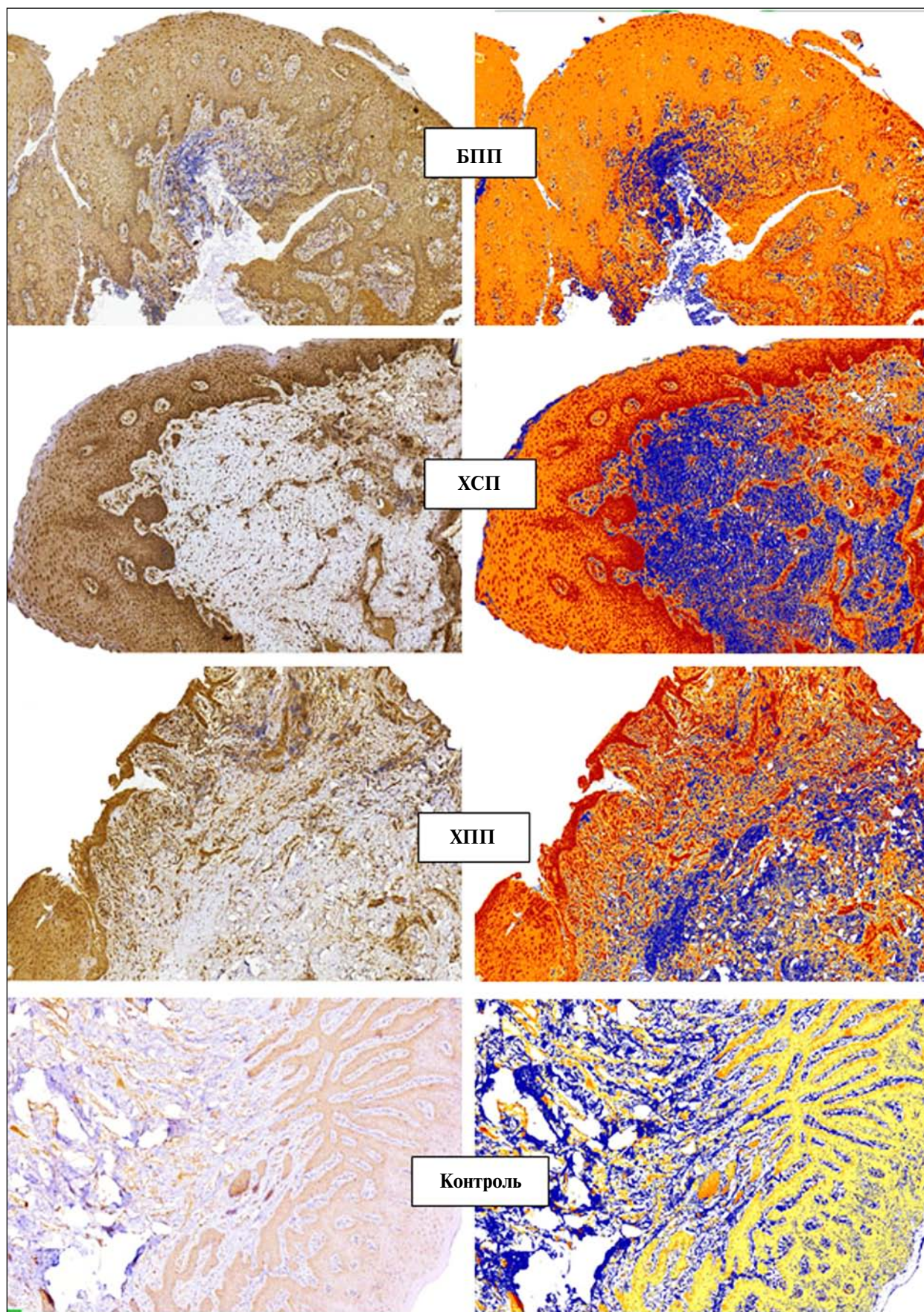
Таблица 4. Общая клинико-рентгенологическая характеристика обследуемых групп пациентов с патологией пародонта

Признак*	БПП <sub>1</sub> , грейд С	ХПП <sub>2</sub> , грейд В	ХСП <sub>3</sub> , грейд В	$p$ ( $\chi^2$ )
Число пациентов	19/67 (28)	10/67 (15)	38/67 (57)	
<i>Клинические признаки</i>				
Пародонтальные карманы, мм:				
• 4–5	12/19 (63)	6/10 (60)	25/38 (66)	NA
• $\geq 6$	7/19 (37)	4/10 (40)	13/38 (34)	NA
Утрата прикрепления:				
• LA I	13/19 (68)	6/10 (60)	26/38 (68)	NA
• LA II	6/19 (32)	4/10 (40)	12/38 (32)	NA
Рецессия десны	10/19 (53)	6/10 (60)	23/38 (61)	NA
Поражение фуркации I–II степени	3/19 (16)	2/10 (20)	7/38 (18)	NA
Подвижность зубов I–II степени	2/19 (11)	1/10 (10)	5/38 (13)	NA
<i>Данные панорамной рентгенографии и/или компьютерной томографии</i>				
Резорбция костной ткани I–II степени:				
• горизонтальная	5/19 (26)	7/10 (70)	8/38 (21)	$p_{1-2} = 0,046$
• вертикальная	13/19 (68)	1/10 (10)	28/38 (74)	$p_{2-3} = 0,006$ $p_{1-2} = 0,005$ $p_{2-3} = 0,0004$

Примечание. БПП — быстропрогрессирующий пародонтит; ХПП — хронический простой пародонтит; ХСП — хронический сложный пародонтит; \* — показатели (номинативные данные — абсолютные числа и доли, %).



**Рис. 1.** Иммуногистохимическое окрашивание с антителами к TIMP1 в биопсийном материале десен пациентов с различными формами пародонтита (×200) (хромоген — DAB, контролокрашивание гематоксилином Майера) и результат работы алгоритма positive pixel count программы ArgeoImageScore: БПП — быстро прогрессирующий пародонтит; ХСП — хронический сложный пародонтит; ХПП — хронический простой пародонтит



**Рис. 2.** Иммуногистохимическое окрашивание с антителами к TIMP2 в биопсийном материале десен пациентов с различными формами пародонтита (×200) (хромоген — DAB, контролокрашивание гематоксилином Майера) и результат работы алгоритма positive pixel count программы AperioImageScore: БПП — быстропрогрессирующий пародонтит; ХСП — хронический сложный пародонтит; ХПП — хронический простой пародонтит

**Таблица 5.** Параметры экспрессии TIMP1 и TIMP2 в биопсийном материале десен пациентов с различными формами пародонтита

	Контроль	БПП, грейд С	ХПП, грейд В	ХСП, грейд В
<b>TIMP1 — Me (IQR)</b>				
eTIMP1_Positivity	32 (8:57)	84 (55:97)	61 (38:82)	83 (61:95)
eTIMP1_Nsr+p	0,4 (0,1:1)	7,9 (0,9:88)	2,16 (0,37:11,3)	14 (2:53)
eTIMP1_index	210 (207:213)	188 (144:208)	198 (188:213)	185 (167:200)
eTIMP1_INDEX	207 (205:211)	188 (147:208)	201 (185:210)	185 (167:202)
sTIMP1_Positivity	5 (3:7)	15 (6:44)	4,5 (3:11,5)	16 (8:31)
sTIMP1_Nsr+p	0,25 (0,1:0,5)	4 (0,5:24)	0,6 (0,07:2,99)	3,5 (1,39:10,8)
sTIMP1_index	205 (202:207)	188 (164:201)	200 (188:208)	187 (178:196)
sTIMP1_INDEX	201 (198:203)	191 (169:199)	197 (190:202)	186 (177:196,5)
allTIMP1_Positivity	20 (5:32)	49 (21:77,5)	20,7 (12:26)	42 (26:59)
allTIMP1_Nsr+p	0,6 (0,2:0,5)	26 (0,5:60,1)	1,66 (0,3:2,9)	13 (1,1:13,8)
allTIMP1_index	209 (206:212)	178 (141:207)	204 (194:212)	187 (179:203)
allTIMP1_INDEX	204 (201:206)	178 (151:204)	197 (188:205)	186 (178:200)
<b>TIMP2 — Me (IQR)</b>				
eTIMP2_Positivity	70 (35:87,5)	98 (69,5:100)	99 (96:100)	94 (50:99)
eTIMP2_Nsr+p	5,1 (1,0:17,5)	89,6 (4:98,8)	97,8 (87:99,2)	89,8 (27,4:98,7)
eTIMP2_index	196 (186:201)	151 (127:200)	129 (118:141)	142 (120:165)
eTIMP2_INDEX	196 (188:202)	151 (127:203)	130 (118:141)	143 (120:170)
sTIMP2_Positivity	15 (10:22)	29,5 (10:57)	42,5 (28,5:58,5)	28,5 (9:53,5)
sTIMP2_Nsr+p	4 (1,7:7,2)	15,2 (1,7:30,5)	21,7 (12,6:34,1)	14,1 (3,5:31,2)
sTIMP2_index	189 (182:193)	169 (156:195)	166 (154:175)	167 (156:180)
sTIMP2_INDEX	193 (189:195)	180 (167:198)	175 (166:184)	171 (161:179)
allTIMP1_Positivity	42 (16,5:59,5)	60,3 (48:82)	77 (73:82)	54 (29,5:76,5)
allTIMP1_Nsr+p	10 (1,5:15,2)	42,5 (2,9:69,2)	64,8 (60:68)	43,7 (20:66,7)
allTIMP1_index	192 (187:199)	159 (131:201)	134 (128:138)	148 (131:162)
allTIMP1_INDEX	193 (188:199)	165 (144:201)	145 (140:149)	153 (139:167)

Имела место тенденция к повышению позитивности и интенсивности эпителиальной экспрессии TIMP1, а также интенсивности стромальной экспрессии данного маркера в направлении от предимплантационных биопсий (группы контроля) к хроническому простому пародонтиту (грейд В) с наибольшей экспрессией данного маркера в группах быстро прогрессирующего (грейд С) и хронического сложного (грейд В) пародонтита. Параметры общей экспрессии, а также позитивности стромальной экспрессии TIMP1 не имели отличий в группах контроля и хронического простого пародонтита (грейд В) и статистически значимо возрастали в группах быстро прогрессирующего (грейд С) и хронического сложного (грейд В) пародонтита. Характер экспрессии TIMP1 в группах с быстро прогрессирующим течением (грейд С) и хроническим сложным (грейд В) пародонтитом не имел значимых различий ни по одному из изученных параметров экспрессии TIMP1 (рис. 3, см. табл. 5).

Результаты анализа экспрессии TIMP2 выявили похожие тенденции. Так, в группах пациентов с различным характером течения пародонтита отмечались значимо более высокие параметры позитивности и интенсивности экспрессии TIMP2 по сравнению с группой контроля (рис. 4, см. табл. 5). При этом уровни экспрессии возрастали в направлении от предимплантационных биопсий к быстро-

прогрессирующему (грейд С) и хроническому сложному (грейд В) пародонтиту и были наивысшими в группе пациентов с хроническим простым пародонтитом (грейд В), что подтверждается результатами парного сравнения групп.

Характер экспрессии TIMP2 в группах пациентов с быстро прогрессирующим (грейд С) и хроническим сложным (грейд В) пародонтитом не имел статистически значимых отличий по параметрам общей и стромальной позитивности экспрессии маркера. Одновременно в группе быстро прогрессирующего пародонтита (грейд С) отмечались более высокие параметры позитивности эпителиальной экспрессии TIMP2 и более низкие уровни интенсивности его общей, эпителиальной и стромальной экспрессии.

Выполненный ROC-анализ показал, что наиболее информативными параметрами экспрессии TIMP1 и TIMP2 в дифференциальной диагностике пародонтита, особенно на стадии манифестации заболевания, явились показатели общей и эпителиальной экспрессии:

- TIMP1 — позитивность и доля пикселей с высокой и умеренной интенсивностью общей экспрессии, позитивность эпителиальной экспрессии, общий индекс интенсивности и индекс общей интенсивности иммуногистохимической реакции в иммунопозитивных участках (рис. 5);



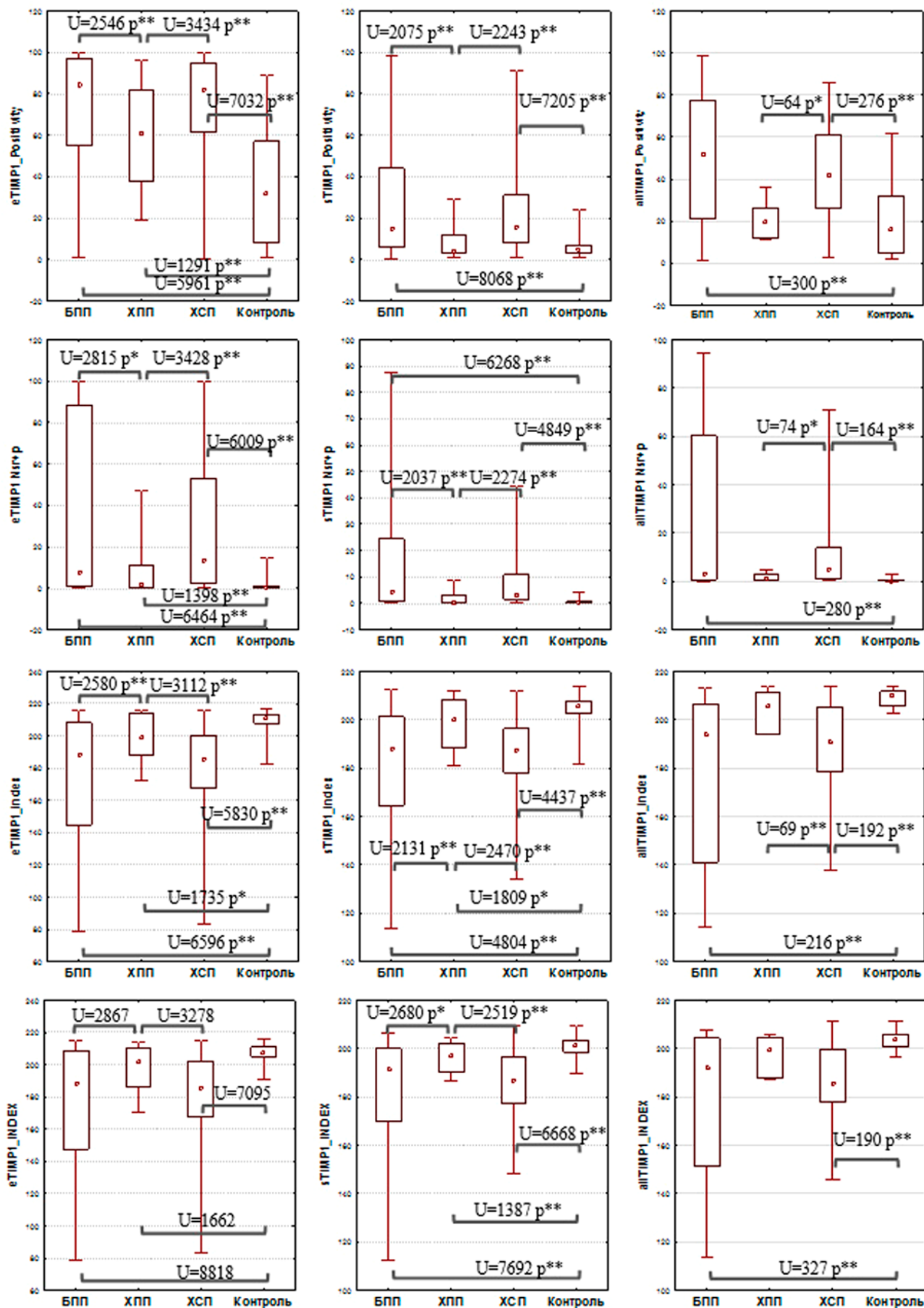


Рис. 3. Характер экспрессии TIMP1 в биопсийном материале десен пациентов с различными формами пародонтита

Примечание. Медиана — круг; □ 25–75% — I Мин–Макс; \* —  $p < 0,05$ ; \*\* —  $p < 0,001$ .

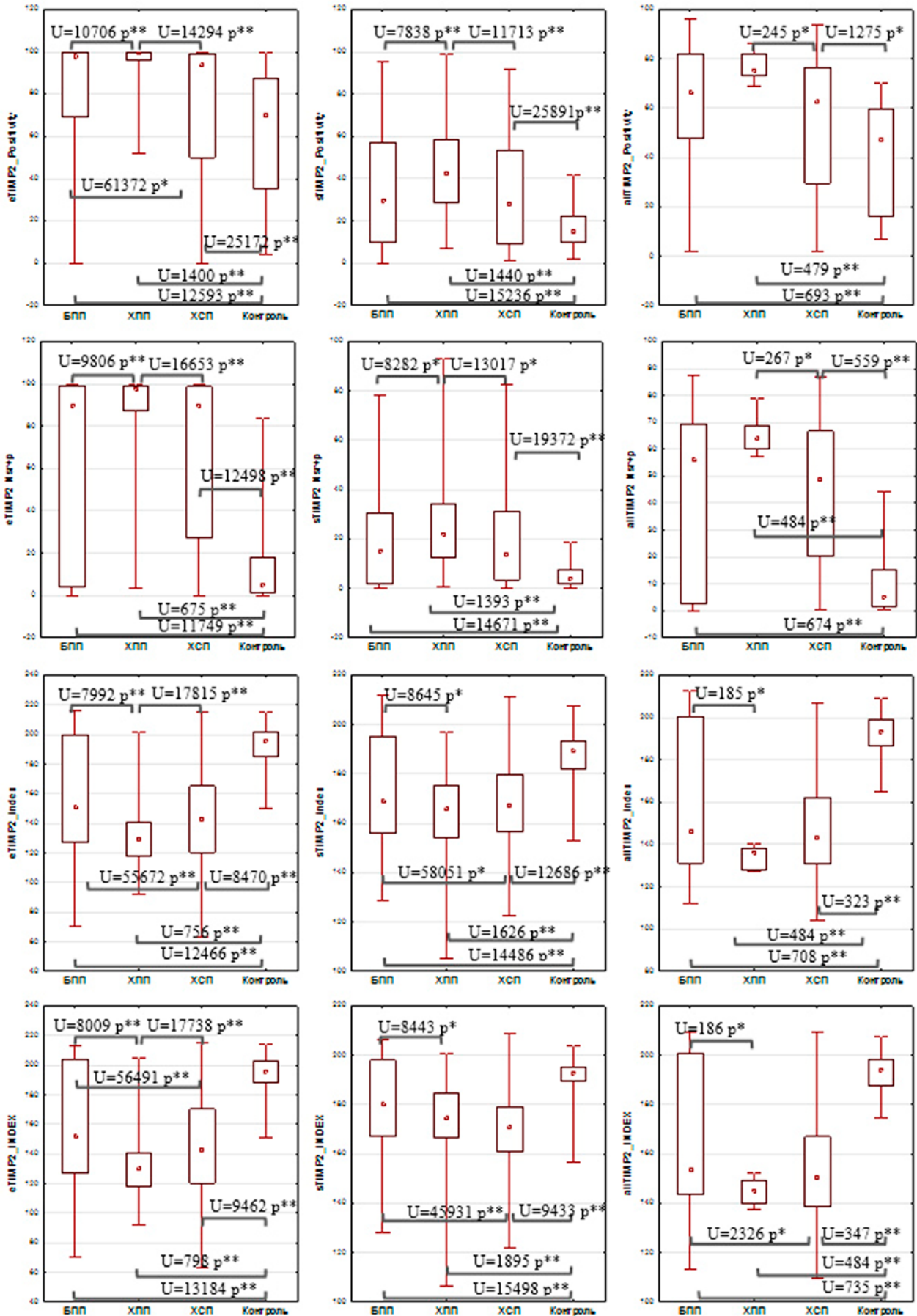


Рис. 4. Характер экспрессии TIMP2 в биопсийном материале десен пациентов с различными формами пародонтита

Примечание. Медиана – круг; □ 25–75% – I Мин–Макс; \* –  $p < 0,05$ ; \*\* –  $p < 0,001$ .

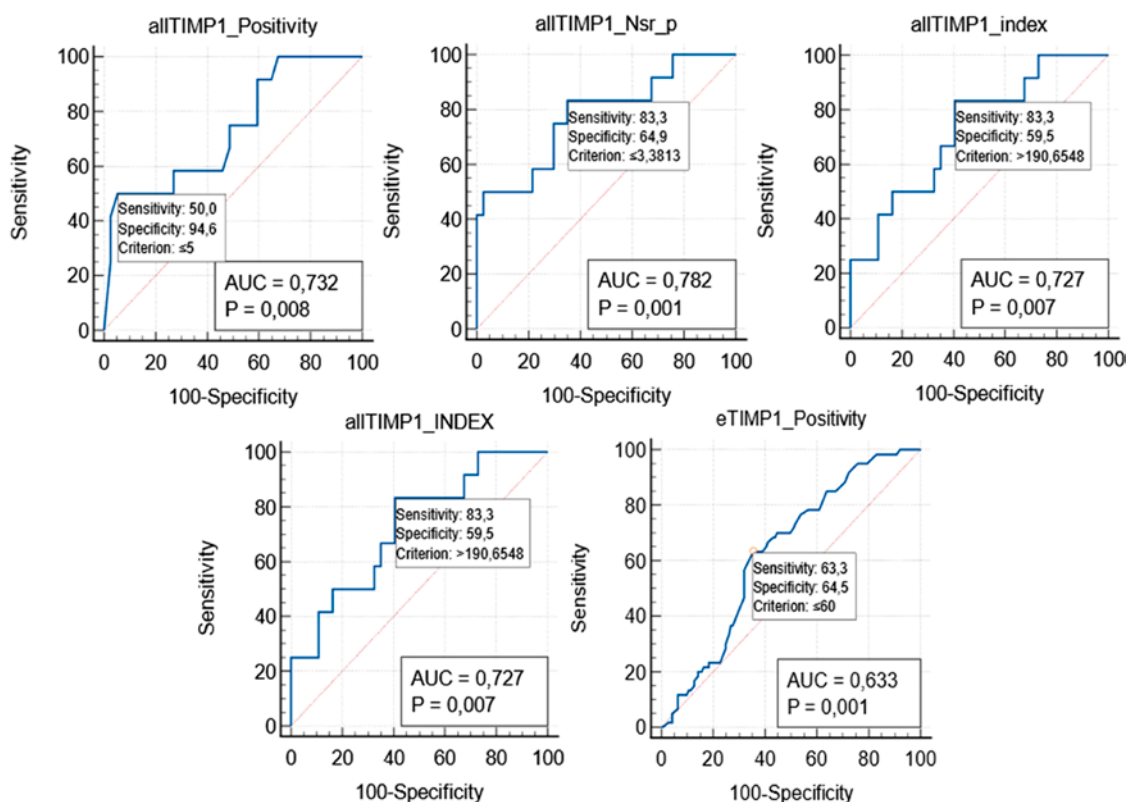


Рис. 5. Информативность показателей TIMP1 для дифференциальной диагностики быстро прогрессирующего (грейд С) с хронически-ми формами (грейд В) пародонтита

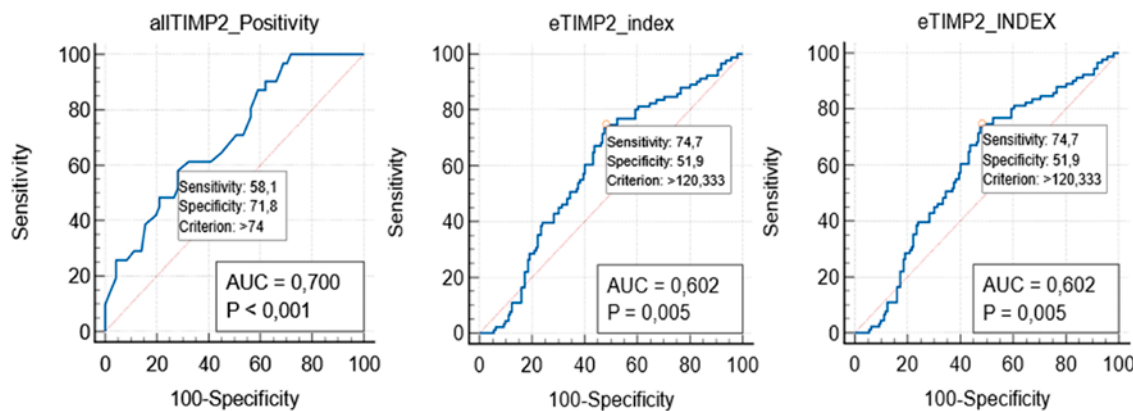


Рис. 6. Информативность показателей TIMP2 для дифференциальной диагностики быстро прогрессирующего (грейд С) с хронически-ми формами (грейд В) пародонтита

- TIMP2 — позитивность общей экспрессии, общий индекс интенсивности эпителиальной экспрессии и индекс интенсивности эпителиальной экспрессии в иммунопозитивных участках (рис. 6).

Проведенный корреляционный анализ параметров экспрессии TIMPs и изученных нами ранее MMPs [24] выявил обратную взаимосвязь параметров экспрессии TIMP1 с наиболее значимыми для быстро прогрессирующего течения пародонтита (грейд С) MMP1 ( $\rho = -0,40$ ), MMP8 ( $\rho = -0,34$ ), MMP13 ( $\rho = -0,46$ ), MMP14 ( $\rho = -0,24$ ) и прямую взаимосвязь с MMP9 ( $\rho = 0,37$ ). Характер экспрессии TIMP2 также обратно коррелировал с таковым MMP8 ( $\rho = -0,41$ ), MMP9 ( $\rho = -0,32$ ) и имел прямую взаимосвязь с экспрессией MMP1 ( $\rho = 0,32$ ), MMP2 ( $\rho = 0,37$ ), MMP13 ( $\rho = 0,39$ ), MMP14 ( $\rho = 0,36$ ),  $p < 0,05$ .

**Нежелательные явления**

Нежелательные явления в ходе проведения исследования не отмечены.

**Обсуждение**

Несмотря на то что основной функцией TIMPs является ингибирование MMPs, они могут принимать участие в транспортировке и стабилизации MMPs, а экспрессия самих TIMPs может зависеть от спектра и уровней экспрессии MMPs, образуя очень сложную многоуровневую систему регуляции [12]. Увеличение при воспалении экспрессии MMPs и относительно более низкие уровни экспрессии TIMPs инициируют деградацию коллагена соединительной ткани пародонта

и альвеолярного отростка кости. Большинство современных исследований в пародонтологии сконцентрировано на изучении MMPs и TIMPs в биологических жидкостях. Так, показано, что появление MMPs и TIMPs в слюне, десневой жидкости или сыворотке крови может свидетельствовать о прогрессировании заболевания [25], а избыточное количество продуктов распада коллагена в десневой жидкости и слюне может быть использовано для прогнозирования потери альвеолярной кости при пародонтите [26]. Преимуществом исследования биологических жидкостей является относительная простота и неизвзависность методов, а недостатком — невозможность с уверенностью исключить влияние на уровни MMPs и TIMPs системных заболеваний и некоторых нозологий местных заболеваний полости рта. В нашем исследовании анализ MMPs и TIMPs в биопсийном материале десны показывает истинные уровни их экспрессии и исключает неоднозначность трактовки полученных результатов.

**Резюме основного результата исследования**

В рамках проведенного исследования показаны особенности экспрессии TIMP1 и TIMP2 и их взаимосвязь с уровнями экспрессии MMPs в биопсийном материале десен пациентов с различными формами пародонтита, а также установлены диапазоны с «точками отсечения» параметров экспрессии изученных TIMPs для выделения группы пациентов с быстро прогрессирующим течением пародонтита уже на стадии манифестации заболевания.

**Обсуждение основного результата исследования**

Повышение уровней экспрессии TIMP1 и TIMP2 в биопсийном материале десен пациентов с патологией пародонта на фоне вариабельной экспрессии ингибируемых ими MMPs подтверждает роль данных биомолекулярных маркеров в развитии и скорости прогрессирования воспаления с дезорганизацией экстрацеллюлярного матрикса как тканей пародонта, так и альвеолярного отростка кости. При этом наиболее трудно дифференцируемый по клинко-рентгенологическим данным быстро прогрессирующий (грейд С) и хронический сложный (грейд В) пародонтит характеризовался практически сопоставимыми уровнями экспрессии изученных TIMPs, за исключением более высоких параметров позитивности эпителиальной экспрессии и более низкой интенсивности ее экспрессии TIMP2.

Аналогичных по дизайну исследований в литературе не обнаружено. Большинство из них касается в основном определения TIMPs в биологических жидкостях и имеет достаточно противоречивые результаты, в том числе об отсутствии различий [27, 28] и, наоборот, о более низких уровнях TIMP1 в слюне пациентов с пародонтитом (в целом или только хроническими формами) по сравнению со здоровыми людьми [29]. Результаты проведенного корреляционного анализа показали обратную взаимосвязь параметров экспрессии TIMPs с таковыми MMPs, в том числе с наиболее значимыми для развития быстро прогрессирующего характера течения пародонтита (грейд С) MMP1, MMP8 и MMP14, и согласуются с представлениями о патогенезе воспаления пародонта и данными других исследователей [30].

Также по-своему уникальными с точки зрения практического использования являются полученные параметры экспрессии TIMP1 и TIMP2 с целью классификации и определения скорости прогрессирования пародонтита на стадии первичной диагностики, среди которых наи-

более информативны все изученные параметры общей экспрессии и позитивность эпителиальной экспрессии TIMP1, а также позитивность общей экспрессии и интенсивность эпителиальной экспрессии TIMP2.

**Ограничения исследования**

Немногочисленность групп обследования связана с относительно низкой частотой выявления отдельных форм патологии пародонта (в частности, быстро прогрессирующего пародонтита, грейд С), трудоемкостью и временными затратами на выполнение клинко-рентгенологических и морфологических исследований, а также стоимостью морфологического и иммуногистохимического исследования.

**Заключение**

Полученные нами результаты позволяют уточнить некоторые аспекты патогенеза различных форм пародонтита, что дополняет фундаментальные знания в данной области медицины и может способствовать совершенствованию подходов к таргетной регуляции активности изученных молекул, а также обладают прикладным значением в части использования параметра экспрессии TIMP1 и TIMP2 для выделения группы пациентов с быстро прогрессирующим характером течения пародонтита (грейд С) уже на стадии манифестации заболевания. Все это может способствовать максимально ранней индивидуализации лечения пациентов, особенно молодого возраста с быстро прогрессирующим течением пародонтита (грейд С), с целью предупреждения или замедления потери зубов, а также сохранения и/или улучшения качества жизни данной группы пациентов.

**Дополнительная информация**

**Источник финансирования.** Исследование выполнено в рамках проекта «Разработать и внедрить метод диагностики быстро прогрессирующего периодонтита, основанный на определении в тканях пародонта матриксных металлопротеиназ» 2018–2020 № ГР 20180436 подпрограммы «Внутренние болезни» государственной научно-технической программы «Новые методы оказания медицинской помощи» 2016–2020.

**Конфликт интересов.** Авторы данной статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.

**Участие авторов.** Л.А. Казеко — разработка цели, концепции и дизайна исследования, набор пациентов в группы, их обследование и лечение, написание текста и утверждение финальной версии рукописи; В.А. Захарова — согласование концепции и дизайна исследования, статистическая обработка, обобщение данных, критический анализ и корректировка текста рукописи, формата представления полученных результатов; Ю.Д. Бенеш — поиск публикаций по теме, перевод их на русский язык, морфометрический анализ гистологических изображений, написание текста рукописи; Е.Д. Черствый — согласование и утверждение концепции и дизайна исследования, критический анализ и корректировка текста рукописи, формата представления полученных результатов. Все авторы внесли существенный вклад в проведение поисково-аналитической работы и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию до публикации.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Tatakis D, Kumar P. Etiology and Pathogenesis of Periodontal Diseases. *Dent Clin North Am.* 2005;49(3):491–516. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cden.2005.03.001>
2. Verma R, Hansch C. Matrix metalloproteinases (MMPs): Chemical–biological functions and (Q)SARs. *Bioorg Med Chem.* 2007;15(6):2223–2268. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2007.01.011>
3. Григорьевич О.С., Мокров Г.В., Косова Л.Ю. Матриксные металлопротеиназы и их ингибиторы // *Фармакокинетика и фармакодинамика.* — 2019. — № 2. — С. 3–16. [Grigorkevich OS, Mokrov GV, Kosova LYu. Matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Pharmacokinetics and Pharmacodynamics.* 2019;2:3–16. (In Russ.)] doi: <https://doi.org/10.24411/2587-7836-2019-10040>
4. Gupta S. Quantitative structure-activity relationship studies on zinc-containing metalloproteinase inhibitors. *Chem Rev.* 2007;107(7):3042–3087. doi: <https://doi.org/10.1021/cr030448t>
5. Maskos K. Crystal structures of MMPs in complex with physiological and pharmacological inhibitors. *Biochimie.* 2005;87(3–4):249–263. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2004.11.019>
6. Cathcart JM, Cao J. MMP Inhibitors Past present and future. *Front Biosci (Landmark Ed).* 2015;20(7):1164–1178. doi: <https://doi.org/10.2741/4365>
7. Whittaker M, Ayscough A. Matrix metalloproteinases and their inhibitors – current status and future challenges. *Cell Transmissions.* 2001;17(1):3–14.
8. Gomez DE, Alonso DF, Yoshiji H, et al. Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur J Cell Biol.* 1997;74(2):111–122.
9. Herron GS, Banda MJ, Clark EJ et al. Secretion of metalloproteinases by stimulated capillary endothelial cells. II. Expression of collagenase and stromelysin activities is regulated by endogenous inhibitors. *J Biol Chem.* 1986;261(6):2814–2818.
10. De Clerck Y, Yean TD, Ratzkin BJ, et al. Purification and characterization of two related but distinct metalloproteinase inhibitors secreted by bovine aortic endothelial cells. *J Biol Chem.* 1989;264(29):17445–17453.
11. Kubota T, Matsuki Y, Nomura T, et al. In situ hybridization study on tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) mRNA-expressing cells in human inflamed gingival tissue. *J Periodontol Res.* 1997;32(5):467–472. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.1997.tb00559.x>
12. Pavloff N, Staskus PW, Kishnani NS, et al. A new inhibitor of metalloproteinases from chicken: ChIMP-3. A third member of the TIMP family. *J Biol Chem.* 1992;267(24):17321–17326.
13. Apte S, Hayashi K, Seldin M, et al. Gene encoding a novel murine tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP), TIMP-3, is expressed in developing mouse epithelia, cartilage, and muscle, and is located on mouse chromosome 10. *Dev Dyn.* 1994;200(3):177–197. doi: <https://doi.org/10.1002/aja.1002000302>
14. Greene J, Wang M, Liu YE, et al. Molecular cloning and characterization of human tissue inhibitor of metalloproteinase 4. *J Biol Chem.* 1996;271(48):30375–30380. doi: <https://doi.org/10.1074/jbc.271.48.30375>
15. Bigg H, Shi Y, Liu Y, et al. Specific, high affinity binding of tissue inhibitor of metalloproteinases-4 (TIMP-4) to the COOH-terminal hemopexin-like domain of human gelatinase A. *J Biol Chem.* 1997;272(24):15496–15500. doi: <https://doi.org/10.1074/jbc.272.24.15496>
16. Tokuhara C, Santesso M, Oliveira G, et al. Updating the role of matrix metalloproteinases in mineralized tissue and related diseases. *J Appl Oral Sci.* 2019;27:e20180596. doi: <https://doi.org/10.1590/1678-7757-2018-0596>
17. Chang Y-Ch, Yang S-F, Lai Ch-Ch, et al. Regulation of matrix metalloproteinase production by cytokines, pharmacological agents and periodontal pathogens in human periodontal ligament fibroblast cultures. *J Periodontol Res.* 2002;37(3):196–203. doi: <https://doi.org/10.1034/j.1600-0765.2002.00663.x>
18. Mouzakiti E, Pepelassi E, Fanourakis G, et al. Expression of MMPs and TIMP-1 in smoker and nonsmoker chronic periodontitis patients before and after periodontal treatment. *J Periodontol Res.* 2012;47(4):532–542. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.2011.01465.x>
19. Rathnayake N, Åkerman S, Klinge B, et al. Salivary biomarkers of oral health – a cross-sectional study. *J Clin Periodontol.* 2012;40(2):140–147. doi: <https://doi.org/10.1111/jcpe.12038>
20. Mattot V, Raes MB, Henriët P, et al. Expression of interstitial collagenase is restricted to skeletal tissue during mouse embryogenesis. *J Cell Sci.* 1995;108(2):529–535. doi: <https://doi.org/10.1242/jcs.108.2.529>
21. Chin JR, Werb Z. Matrix metalloproteinases regulate morphogenesis, migration and remodeling of epithelium, tongue skeletal muscle and cartilage in the mandibular arch. *Development.* 1997;124(8):1519–1530. doi: <https://doi.org/10.1242/dev.124.8.1519>
22. Dew G, Murphy G, Stanton H, et al. Localisation of matrix metalloproteinases and TIMP-2 in resorbing mouse bone. *Cell Tissue Res.* 2000;299(3):385–394. doi: <https://doi.org/10.1007/s004419900166>
23. Hatori K, Sasano Y, Takahashi I, et al. Osteoblasts and osteocytes express MMP2 and -8 and TIMP1, -2, and -3 along with extracellular matrix molecules during appositional bone formation. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol.* 2004;277(2):262–271. doi: <https://doi.org/10.1002/ar.a.20007>
24. Казеко Л.А., Захарова В.А., Анфиногенова Е.А., и др. Значение экспрессии матриксных металлопротеиназ в дифференциальной диагностике патологии пародонта // *Архив патологии.* — 2021. — Т. 83. — № 3. — С. 20–29. [Kazeko LA, Zakharava VA, Anfinogenova EA, et al. The significance of the expression of matrix metalloproteinases in the differential diagnosis of periodontal diseases. *Arkhiv Patologii.* 2021;83(3):20–29. (In Russ.)] doi: <https://doi.org/10.17116/patol20218303120>
25. Soell M, Elkaim R, Tenenbaum H. Cathepsin C, matrix metalloproteinases, and their tissue inhibitors in gingiva and gingival crevicular fluid from periodontitis-affected patients. *J Dent Res.* 2002;81(3):174–178.
26. Taba M, Kinney J, Kim A, et al. Diagnostic biomarkers for oral and periodontal diseases. *Dent Clin North Am.* 2005;49(3):551–571. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cden.2005.03.009>
27. Balogun AO, Taiwo JO, Opeodu OI, et al. Impact of Non-Surgical Periodontal Therapy on the Salivary Levels of Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1 (TIMP-1) in Patients with Chronic Periodontitis: A Third World Experience. *Open Journal of Stomatology.* 2021;11:197–207. doi: <https://doi.org/10.4236/ojst.2021.115017>
28. de Brouwer P, Bikker FJ, Brand HS, et al. Is TIMP-1 a biomarker for periodontal disease? A systematic review and meta-analysis. *J Periodont Res.* 2021;57(2):235–245. doi: <https://doi.org/10.1111/jre.12957>
29. Bostanci N., Mitsakakis K., Afacan B, et al. Validation and verification of predictive salivary biomarkers for oral health. *Sci Rep.* 2021;11(1):6406. doi: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-85120-w>
30. Pozo P, Valenzuela MA, Melej C, et al. Longitudinal analysis of metalloproteinases, tissue inhibitors of metalloproteinases and clinical parameters in gingival crevicular fluid from periodontitis-affected patients. *J Periodontol Res.* 2005;40(3):199–207. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.2005.00786.x>

## КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

**Захарова Виктория Алексеевна**, к.м.н., доцент [*Viktoryia A. Zakharava*, MD, PhD, Associate Professor];  
адрес: Республика Беларусь, 223040, аг. Лесной, Минский район, Минской области [address: 223040, Lesnoy, Minsk District, Minsk Region, Republic of Belarus]; e-mail: zakharava.vikt@gmail.com, SPIN-код: 6638-7980,  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2050-9800>

**Казеко Людмила Анатольевна**, к.м.н., доцент [*Ludmila A. Kazeko*, MD, PhD, Associate Professor];  
e-mail: lkaf.terstom@gmail.com, SPIN-код: 7607-7910, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0821-0366>

**Бенеш Юлия Дмитриевна**, ассистент [*Julia D. Benesh*, assistant]; e-mail: julia.benesh@gmail.com, SPIN-код: 8744-8970,  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3207-9203>

**Черствый Евгений Давыдович**, д.м.н., профессор [*Eugeny D. Cherstvoy*, MD, PhD, Professor];  
e-mail: patanat@bsmu.by, SPIN-код: 1350-0976, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2554-1431>