

# Procjena povezanosti parodontitisa i idopatske neplodnosti u žena detekcijom matriksne metaloproteinaze 8 iz sline

---

Šumilin, Iada

Doctoral thesis / Disertacija

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Dental Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Stomatološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:127:803807>

Rights / Prava: [Attribution-NonCommercial 4.0 International](#)/[Imenovanje-Nekomercijalno 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-25**



Repository / Repozitorij:

[University of Zagreb School of Dental Medicine Repository](#)





Sveučilište u Zagrebu

Stomatološki fakultet

Lada Šumilin

**PROCJENA POVEZANOSTI  
PARODONTITISA I IDIOPATSKE  
NEPLODNOSTI U ŽENA DETEKCIJOM  
MATRIKSNE METALOPROTEINAZE 8 IZ  
SLINE**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2022.



Sveučilište u Zagrebu

Stomatološki fakultet

Lada Šumilin

**PROCJENA POVEZANOSTI  
PARODONTITISA I IDIOPATSKE  
NEPLODNOSTI U ŽENA DETEKCIJOM  
MATRIKSNE METALOPROTEINAZE 8 IZ  
SLINE**

DOKTORSKI RAD

Mentori:

Izv.prof.dr.sc. Božana Lončar Brzak

prof.dr.sc. Krunoslav Kuna

Zagreb, 2022.



University of Zagreb  
School of Dental Medicine

Lada Šumilin

**ASSESSMENT OF THE ASSOCIATION  
BETWEEN PERIODONTITIS AND  
IDIOPATHIC INFERTILITY IN WOMEN BY  
DETECTION OF SALIVARY MATRIX  
METALLOPROTEINASE 8**

DOCTORAL DISSERTATION

Zagreb, 2022.

Rad je izrađen na Zavodu za oralnu medicinu Stomatološkog fakulteta u suradnji s Klinikom za ginekologiju Kliničkog bolničkog centra Sestre milosrdnice u Zagrebu.

Mentori: Izv.prof.dr.sc.Božana Lončar Brzak, specijalist oralne medicine  
Prof.dr.sc. Krunoslav Kuna, specijalist ginekologije

**Lektor hrvatskog jezika:** Dora Jelačić Bužimski, lektor za hrvatski jezik

**Lektor engleskog jezika:** Ana Dumančić Acar, sudski tumač za engleski, hrvatski i španjolski jezik

**Sastav Povjerenstva za ocjenu doktorskog rada:**

1. Prof.dr.sc. Vlaho Brailo, Sveučilište u Zagrebu, Stomatološki fakultet, Republika Hrvatska (predsjednik Povjerenstva)
2. Prof.dr.sc.Ivan Alajbeg, Sveučilište u Zagrebu, Stomatološki fakultet, Republika Hrvatska (član)
3. Prof.dr.sc. Dinka Pavičić Baldani, Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet, Republika Hrvatska (član)

**Sastav Povjerenstva za obranu doktorskog rada:**

1. Prof.dr.sc. Vlaho Brailo, Sveučilište u Zagrebu, Stomatološki fakultet, Republika Hrvatska (predsjednik Povjerenstva)
2. Prof.dr.sc. Ivan Alajbeg, Sveučilište u Zagrebu, Stomatološki fakultet, Republika Hrvatska (član)
3. Prof.dr.sc. Dinka Pavičić Baldani, Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet, Republika Hrvatska (član)
4. Izv.prof.dr.sc. Ana Badovinac, Sveučilište u Zagrebu, Stomatološki fakultet, Republika Hrvatska (zamjenski član)

**Datum obrane rada:** \_\_\_\_\_ (upisuje se naknadno rukom)

Rad sadrži: 72 stranice  
7 tablica  
7 slika

Rad je vlastito autorsko djelo, koje je u potpunosti samostalno napisano uz naznaku izvora drugih autora i dokumenata korištenih u radu. Sve ilustracije (tablice, slike i dr.) u radu su izvorni doprinos autora poslijediplomskog doktorskog rada. Autor je odgovoran za pribavljanje dopuštenja za korištenje ilustracija koje nisu njegov izvorni doprinos, kao i za sve eventualne posljedice koje mogu nastati zbog nedopuštenog preuzimanja ilustracija odnosno propusta u navođenju njihovog podrijetla.

Hvala mojim mentorima izv.prof.dr.sc. Božani Lončar Brzak i prof.dr.sc. Krunoslavu Kuni na uloženom vremenu, korisnim savjetima i nesebičnoj pomoći prilikom izrade doktorske disertacije.

Hvala prim.dr.sc. Ivanu Bolanči na trudu, podršci i strpljenju, kao i osoblju Zavoda za humanu reprodukciju Klinike za ginekologiju i porodništvo KBC-a Sestre milosrdnice što su, unatoč zahtjevnim svakodnevnim obavezama, našli vremena za prikupljanje podataka za izradu rada.

Hvala dr.sc. Larisi Musić i izv.prof.dr.sc. Ivanu Puharu na trudu, velikoj pomoći i izdvojenom vremenu kod obrade ispitanica uključenih u studiju.

Hvala ravnateljstvu Poliklinike Aviva i osoblju medicinsko biokemijskog laboratorija Poliklinike Aviva na susretljivosti i pomoći prilikom dobivanja podataka potrebnih za izradu rezultata ovog istraživanja.

Doktorsku disertaciju posvećujem majci i ocu, bez čije bezuvjetne ljubavi i podrške ne bih postigla ono što danas jesam.

## Sažetak

### **PROCJENA POVEZANOSTI PARODONTITISA I IDIOPATSKE NEPLODNOSTI U ŽENA DETEKCIJOM MATRIKSNE METALOPROTEINAZA 8 IZ SLINE**

Literaturni podaci upućuju na to da neplodne pacijentice imaju lošiji parodontni status, što može biti uzrok komplikacijama začeca. Matriksna metaloproteinaza 8 (MMP-8) je enzim u slini koji je izravno povezan s parodontnom upalom. Cilj ove studije bio je validacija ordinacijskog testa koji detektira aktivni oblik MMP8 (aMMP8) iz ispirka usne šupljine u populaciji žena s neobjašnjivom neplodnošću u usporedbi s plodnim ženama odgovarajuće dobi s i bez parodontitisa. Pretpostavljali smo da će neplodne žene imati lošiji parodontni status i veći broj pozitivnih aMMP-8 testova u usporedbi s plodnim ženama.

Istraživanje je uključilo 50 zdravih žena s urednim ovulacijskim ciklusima u dobi od 25-45 godina i strogo definiranom neobjašnjivom (idiopatskom) neplodnošću i 50 zdravih žena s urednim ovulacijskim ciklusima iste dobi koje su zatrudnjele i rodile prirodnim putem. Svim sudionicama napravljen je klinički parodontološki pregled i ordinacijski test na aMMP-8 iz ispirka usne šupljine. Polovici pacijentica u svakoj skupini dijagnosticiran je parodontitis, dok je druga polovica bila bez parodontitisa.

Osjetljivost i specifičnost testa za otkrivanje parodontitisa iznosila je 84% i 72% u skupini neplodnih, 88% i 68% u skupini plodnih pacijentica te 86% i 70% u ukupnoj populaciji pacijentica. Neplodne pacijentice s parodontitisom imale su manje uznapredovali parodontitis od kontrolne skupine, iako ta razlika nije bila statistički značajna.

Rezultati su pokazali da su neplodne bolesnice imale bolji parodontni status i manje uznapredovali parodontitis od plodnih žena iste dobi te da osjetljivost i specifičnost testa rastu sa stupnjem uznapredovalosti parodontitisa. Testom se može razmjerno dobro identificirati pacijentice s parodontitisom, ali je, s obzirom na naše rezultate, korist od tog testiranja u obradi i liječenju idiopatske neplodnosti upitna.

**Ključne riječi:** parodontitis; neplodnost; matriksna metaloproteinaza 8



## **Summary**

### **Assessment of the association between periodontitis and idiopathic infertility in women by detection of salivary matrix metalloproteinase 8**

**Aim:** Literature data suggest that infertile patients present worse periodontal status, which may be a factor that complicates conception. Matrix metalloproteinase 8 (MMP-8) is an enzyme in saliva that is directly related to periodontal inflammation. The aim of our study was to validate a chairside mouth rinse test for detection of active form of MMP8 (aMMP8) in a population of women with unexplained infertility compared to age-matched fertile women, with and without periodontitis. Our hypothesis was that infertile women will have worse periodontal health and more positive MMP8 tests, compared to fertile women.

**Materials and methods:** The study included 50 healthy norm-ovulatory females ages 25-45 with strictly defined unexplained infertility, and 50 healthy norm-ovulatory women at the same age who have conceived and delivered naturally. All participants underwent clinical periodontal examination and a chairside aMMP-8 oral rinse test. One half of the participants in each group was diagnosed with periodontitis, while the other half was without periodontitis.

**Results:** The sensitivity and specificity of the test for the detection of periodontitis in the group of infertile patients was 88% and 68%, in the group of fertile patients 84% and 72% and 86% and 70% in the total patient population. Infertile patients with periodontitis had less advanced periodontitis than the control group, although the difference was not statistically significant.

**Conclusion:** Our results have shown that infertile patients had better periodontal status and less advanced periodontitis than fertile women of the same age. Sensitivity and specificity of the test increase with the degree of progression of periodontitis. Patients with periodontitis can be relatively well identified, but based on our results, the benefit of this test in the treatment of idiopathic infertility is questionable.

**Keywords:** Key words (MeSH terms): periodontitis; infertility; Matrix Metalloproteinase 8

## SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
1.1. Definicija i incidencija neplodnosti .....	2
1.2. Idiopatska neplodnost .....	3
1.3. Liječenje neplodnosti .....	5
1.3.1. Liječenje idiopatske neplodnosti .....	6
1.4. Parodontitis i reproduktivno zdravlje .....	7
1.4.1. Parodontitis i trudnoća .....	8
1.4.2. Utjecaj parodontitisa na plodnost muškaraca i žena .....	9
1.4.3. Utjecaj parodontitisa na uspješnost IVF-a .....	11
1.5. Anti Müllerov hormon (AMH) - biomarker ovarijske rezerve .....	12
1.6. Matriksne metaloproteinaze .....	15
1.6.1. Općenito o matriksnim metaloproteinazama .....	15
1.6.2. Uloga matriksnih metaloproteinaza u ženskom reproduktivnom sustavu .....	17
1.6.2.1. MMP-e i TIMP-i u menstrualnom ciklusu .....	17
1.6.2.2. MMP-e u trudnoći .....	18
1.6.2.3. MMP-e i ponavljajući neuspjeh implantacije .....	19
1.6.2.4. MMP-e u drugim patološkim stanjima ženskog reproduktivnog sustava ..	19
1.7. Matriksne metaloproteinaze i parodontitis .....	20
1.7.1. MMP-8 “point of care” imunotest iz sline (Periosafe) .....	23
2. HIPOTEZE I CILJEVI ISTRAŽIVANJA .....	27
3. ISPITANICE I POSTUPCI .....	29
3.1. Ispitanice .....	30
3.2. Uključni i isključni kriteriji .....	30
3.3. Postupci s ispitanicama .....	31
3.4. Statistička analiza .....	32
4. REZULTATI .....	34

5. RASPRAVA .....	48
6. ZAKLJUČAK .....	54
7. LITERATURA.....	56
8. ŽIVOTOPIS .....	70

## Popis kratica

<b>AFC</b>	broj antralnih folikula (eng. <i>antral follicle count</i> )
<b>AMH</b>	anti Müllerov hormon (eng. <i>anti-Müllerian hormone</i> )
<b>BMI</b>	indeks tjelesne mase (eng. <i>body mass index</i> )
<b>BOP</b>	krvarenje pri sondiranju (eng. <i>bleeding on probing</i> )
<b>CAL</b>	zbrojena razina pričvrstka (eng. <i>clinical attachment level</i> )
<b>CIPTN</b>	parodontološki indeks dobiven bazičnim parodontološkim pregledom (eng. <i>community periodontal index of treatment needs</i> )
<b>ECM</b>	ekstracelularni matriks (eng. <i>extracellular matrix</i> )
<b>ELISA</b>	enzimski povezani imunosorbentni test (eng. <i>enzyme linked immunosorbent assay</i> )
<b>FMBS</b>	iznos krvarenja na razini cijelih usta (eng. <i>full mouth bleeding score</i> )
<b>FMPS</b>	iznos plaka na razini cijelih usta (eng. <i>full mouth plaque score</i> )
<b>GI</b>	gingivalni indeks (eng. <i>gingival index</i> )
<b>IFMA</b>	imunofluorometrijska analiza (eng. <i>immunofluorometric assay</i> )
<b>IL</b>	interleukin (eng. <i>interleukin</i> )
<b>IVF</b>	umjetna oplodnja (eng. <i>in vitro fertilization</i> )
<b>MMP</b>	matriksna metaloproteinaza (eng. <i>matrix metalloproteinase</i> )
<b>PD</b>	dubina sondiranja (eng. <i>probing depth</i> )
<b>PESA</b>	površina epitela parodonta (eng. <i>periodontal epithelial surface area</i> )
<b>PI</b>	plak indeks (eng. <i>plaque index</i> )
<b>PISA</b>	površina parodontne upale (eng. <i>periodontal inflamed surface area</i> )
<b>PoC test</b>	kućni test ( <i>point of care test</i> )

<b>RANKL</b>	receptor nuklearnog čimbenika $\kappa\beta$ liganda (eng. <i>receptor activator of nuclear factor kappa-<math>\beta</math> ligand</i> )
<b>RIF</b>	ponavljajući neuspjeh implantacije (eng. <i>recurrent implantation failure</i> )
<b>RT-PCR</b>	polimerazna lančana reakcija reverzne transkriptaze (eng. <i>reverse transcription-polymerase chain reaction</i> )
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	čimbenik tumorskog rasta beta (eng. <i>tumor growth factor <math>\beta</math></i> )
<b>TGF-<math>\beta</math>2</b>	transformirajući čimbenik rasta beta 2 (eng. <i>transforming growth factor-<math>\beta</math>2</i> )
<b>TIMP</b>	tkivni inhibitor metaloproteinaza (eng. <i>tissue inhibitor of metalloproteinases</i> )
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	čimbenik tumorske nekroze $\alpha$ (eng. <i>tumor necrosis factor <math>\alpha</math></i> )
<b>VEGF</b>	čimbenik rasta vaskularnog endotela (eng. <i>vascular endothelial growth factor</i> )

## 1. UVOD

## 1.1. Definicija i incidencija neplodnosti

Infertilitet ili neplodnost obuhvaća 10-15 % parova reproduktivne dobi (1). Definira se kao nemogućnost ostvarivanja trudnoće nakon godinu dana od nezaštićenih spolnih odnosa. Fekunditet je kapacitet parova da ostvari trudnoću u jednom mjesecu ili ciklusu. Prosječni mjesečni fekunditet čovjeka je 20% što govori o maloj plodnosti ljudske vrste (2). Glavni razlog neuspješnih implantacija kod spontanih, i kod izvantjelesnih (lat. *in vitro*) oplodnja je visoka incidencija kromosomalnih abnormalnosti. Citogenetske studije su dokazale mejozom nastale aneuploidije kod 25% oplođenih jajnih stanica, te kromosomalne aberacije kod čak 50% preimplantacijskih embrija (3). Ostali razlozi umanjene reproduktivne sposobnosti čovjeka, čak i kad se radi o zdravom mladom paru su monoovulacije, osjetljivost spermatogeneze, složen i nesavršen mehanizam selekcije gameta, oplodnje i razvoja zametka, osjetljiva receptivnost endometrija i implantacije te brojni epigenetski učinci. Plodnost čovjeka je u blagom, ali trajnom opadanju, naročito u razvijenim zemljama. Žene u Europi rađaju prvo dijete četiri do pet godina kasnije nego prije 20 godina. Dvadeset posto žena ostvaruje prvu trudnoću nakon 35. godine. U Hrvatskoj žene rađaju prvo dijete prosječno u dobi od 29.2 godine, a 31% porođaja se odvija u periodu između 30.-te i 35.-te godine. Na umanjenu plodnost ukazuju i podaci o stalnom porastu liječenja medicinski potpomognutom oplodnjom od 10% godišnje. Posljedice takve odgode su niži mjesečni fekunditet i porast učestalosti neplodnosti. U Hrvatskoj neplodnost ili umanjena plodnost postoji kod približno 80 000 parova. U posljednjih 30 godina učestalost neplodnosti porasla je za oko 5% (2). Odgađanje rađanja umanjuje plodnost. Uz trend odgađanja rađanja postoje i drugi faktori koji dokazano umanjuju plodnost: debljina, pušenje, konzumacija alkohola te izloženost okolišnim štetnim faktorima najčešće iz prehrane, koji izazivaju epigenetske mutacije sa svim štetnim posljedicama na reproduktivno zdravlje (2). Problemi i bolesti kod žena ubrajaju se u 30-40% uzroka neplodnosti. Isti udio pripisuje se muškim faktorima (4,5). Jedan od najčešćih poznatih razloga neplodnosti kod žena je kronična anovulacija. Prema revidiranoj WHO klasifikaciji žena sa amenorejom, u tu skupinu pripadaju žene s hipotalamičkom disfunkcijom, hiperprolaktinemijom, prijevremenim zatajenjem jajnika i žene sa sindromom policističnih jajnika (6). Drugi uzroci neplodnosti su upale spolnog



sustava žena s posljedičnim oštećenjima jajovoda, endometrioza, abnormalnosti maternice, cervikalni faktor te kirurški zahvati. Upale genitalnog sustava muškaraca mogu uzrokovati opstruktivne promjene i tako umanjiti plodnost. Budući da neplodnost po svojoj definiciji označava definitivnu ili konačnu nemogućnost postizanja trudnoće, sve više se teži zamjeni pojma u subfertilnost ili umanjenu plodnost, jer će mnogi od ovih parova ipak postići spontanu trudnoću. To su pokazali Evers JL i sur. u svojem istraživanju. Nakon prvih godinu dana nezaštićenih odnosa, 93% parova normalne fertiliteti ostvarilo je trudnoću, kao i 11% parova umanjene plodnosti (7).

### **1.2. Idiopatska neplodnost**

Kod 25% neplodnih parova, uzrok neplodnosti ili umanjene plodnosti nije poznat (1), tj. kod njih se radi o idiopatskoj neplodnosti. U literaturi za sada ne postoji uniformna definicija idiopatske neplodnosti. Varijacije se u prvom redu odnose na trajanje neplodnosti i dob ženskog partnera, dok se dob muškog partnera, zanimanje i učestalost odnosa ne uzimaju obzir (8). S druge strane istraživači se slažu da se dijagnoza idiopatske neplodnosti postavlja kod parova kod kojih su uredni rezultati standardnih istraživanja, poput testova za dokazivanje ovulacija, prohodnosti jajovoda te analiza spermograma. Dijagnoza idiopatske neplodnosti zvuči izrazito frustrirajuće, jer parovi postovjećuju nepostojanje dijagnoze s nemogućnošću liječenja. Potencijalni razlozi idiopatskog steriliteta ipak se opisuju u obliku postojanja endokrinološkog disbalansa, imunoloških i genetskih faktora, kao i promjena na razini reproduktivne psihologije (9). Posljednjih godina postignut je veliki napredak u razumijevanju idiopatske neplodnosti putem identifikacije genskih mutacija i molekularnih mehanizama koji su uključeni u centralnu i perifernu kontrolu reprodukcije (10). Suptilni defekti u reproduktivnom procesu često su nedostupni postojećim metodama detekcije, poput analize cervikalne sluzi, kapacitacije tj. sposobnosti spermija da prođu uterotubarni spoj i penetriraju zonu pellucidu. Nadalje, za sada ne postoje tako precizni testovi koji sa sigurnošću mogu osigurati točan fertilizirajući profil spermatozoida. Slična ograničenja prisutna su kada je riječ o procjeni ženske fertiliteti. Defektne oocite, naročito kod starijih pacijentica i bidirekcijski tubarni motiliet neophodan za transport embrija važni su uzroci

nemogućnosti postizanja trudnoće, što nije lako procijeniti postojećim metodama. Također treba uzeti u obzir da je kod određenog broja parova kašnjenje ili izostanak koncepcije slučajan jer je fekunditet tih parova na nižoj strani prosječne normalne distribucije (11). Nerazjašnjenu uzročno posljedičnu vezu između abnormalnog rezultata pojedinog testa u obradi neplodnog para i uzroka infertiliteta istraživali su Guzik i sur. 1994.g. Analizirajući fertilitet populacije pronašli su barem jedan od faktora koji upućuje na umanjenu plodnost, u dvije trećine normalno fertilnih parova. Obrada neplodnog para koja je korištena u istraživanju uključivala je analizu spermograma, hormona lutealne faze ciklusa, postkoitalni test, imunološka testiranja te analizu anomalija uterusa, no nije bila dovoljna za jasno razlikovanje plodnih od neplodnih parova (12).

Pregledne studije su pokazale da se, zbog povećanja broja dostupnih dijagnostičkih testova, udio parova sa idiopatskim sterilitetom ipak smanjio tijekom vremena, s 22% u studijama prije 1960.-te na 14% u istraživanjima nakon 1980.-te (13). Još uvijek kod određenog broja parova izostaje točna dijagnoza zbog nepostojanja usko specifičnih testova koji bi uočili postojanje razloga neplodnosti, poput blagih stupnjeva tubarne neprohodnosti, subkliničkih stupnjeva endometrioze, prijevremene ovarijske insuficijencije i imunoloških razloga. Iako navedeni razlozi mogu biti odgovorni za idiopatsku neplodnost, osim ispunjenja znatiželje kliničara, nije u interesu pacijenta izlagati invazivnim pretragama da bi se dokazali ovi suptilni razlozi. Idealna definicija idiopatske neplodnosti zato bi se mogla odnositi na parove sa stvarnim, ali nedetektabilnim defektom koji uzrokuje prolongiranu ili trajnu infertilitet (11). Gleicher i sur. 2006. u svojoj studiji sugeriraju čak potpuno napustiti termin idiopatska neplodnost, jer on implicira velik broj dijagnostičkih testova koji su nerijetko skupi i invazivni, a u konačnici ne doprinose poboljšanju prognoze (14).

Stopa mjesečnog fekunditeta smanjuje se s trajanjem idiopatskog steriliteta. Vjerojatnost spontane trudnoće kod neliječenih parova sa idiopatskim sterilitetom nakon tri godine smanjuje se na 40%, nakon 5 godina na samo 20% (15). Osim duljine trajanja infertiliteta, prognostički faktori koji se povezuju s višom kumulativnom stopom trudnoća su dob žene manja od 30 godina i postojanje prethodne trudnoće (16). U slučaju postojanja nepovoljnih prognostičkih faktora, Gnoth sugerira da bi obradu neplodnosti takvi parovi trebali započeti

već nakon 6 mjeseci nezaštićenih odnosa bez postizanja trudnoće. Liječnik koji savjetuje parove koji se liječe zbog neplodnosti mora biti upoznat sa svim mogućim uzrocima nepostizanja trudnoće, kao i mogućnostima liječenja. Parovi trebaju dobiti realnu informaciju o vjerojatnosti uspješne koncepcije, kao i o rizicima i troškovima liječenja. Praćenje znanstveno utemeljenih protokola obrade neplodnog para osigurat će adekvatnu podlogu za pravovremeno započinjanje liječenja uz najpovoljniju financijsku potporu i izbjegavanje nepotrebnih invazivnih procedura. Oni u prvom redu uključuju detaljno ciljano uzimanje anamneze i klinički pregled oba partnera. Početak obrade i provođenje određenih pretraga obično se savjetuju nakon 12 mjeseci nezaštićenih odnosa bez postizanja trudnoće, ili nakon 6 mjeseci ukoliko se radi o ženama starijim od 35 godina. Budući da su najčešći razlozi infertiliteta abnormalnosti u spermogramu, izostanak ovulacije, neprohodnost jajovoda, standardna obrada uključuje analizu spermograma, analizu hormona rane folikularne i sredine lutealne faze te evaluaciju prohodnosti jajovoda histersalpingografijom. Prema potrebi, tj. ovisno o rezultatima osnovnih pretraga te podacima iz anamneze, obrada se nadopunjuje invazivnijim pretragama, poput histersalpingografije, laparoskopije i drugih (17).

### **1.3. Liječenje neplodnosti**

Zahvaljujući napretku u području reproduktivne medicine i iskustvu dobivenom liječenjem neplodnosti, danas je parovima dostupna šira mogućnost izbora terapijskih opcija. Postoje tri glavna oblika liječenja neplodnosti: medikamentozna terapija, kirurško liječenje i različiti oblici metoda potpomognute oplodnje. U nekim zemljama kultura, religija te razni pravni aspekti ograničavaju sve dostupne metode liječenja, poput donacije sperme i jajnih stanica. Izbor oblika liječenja ovisi u prvom redu o trajanju neplodnosti, dobi žene, postojećem patološkom uzroku same neplodnosti, ali i o cijeni tj. dostupnosti pojedine terapijske metode. Većina parova je preko raznih medija upoznata sa mogućnostima liječenja, što je često razlog nerealno visokih očekivanja (18). Šansa za uspješnu trudnoću nakon metoda potpomognute oplodnje prema istraživanjima seže i do 50%, ali rezultati značajno variraju ovisno o dobi, indeksu tjelesne težine žene (eng. *body mass index*, BMI), te vještini i iskustvu medicinskog

osoblja (19). Oko 25% parova koji zahtijevaju metode potpomogute oplodnje imaju sve uredne nalaze tijekom kliničke evaluacije. Očekivana stopa trudnoća u ovoj skupini je 5% nakon tempiranog odnosa, 10% nakon indukcije ovulacije i 15-25% nakon različitih tehnika asistirane reprodukcije (20). Ove vrijednosti su dakako manje kod starijih žena sa duljim trajanjem infertiliteta (8).

### **1.3.1. Liječenje idiopatske neplodnosti**

Liječenje neplodnosti predstavlja medicinski izazov ne samo zbog poteškoća u dijagnostici i terapiji reproduktivnih poremećaja te u nekim slučajevima nediferenciranoj interakciji između potencijala plodnosti oba partnera, već i zbog činjenice da je efekt liječenja jasno vidljiv entitet - postignuće trudnoće (17). Liječenje idiopatske neplodnosti je empirijsko. Liječnici subspecijalisti humane reprodukcije svakodnevno se susreću sa izazovom i dilemom koju vrstu terapije odabrati: empirijsku indukciju ovulacije, s ili bez arteficijelne inseminacije ili empirijsku in vitro fertilizaciju (IVF) sa embriotransferom.

Gunn i Bates su u važnom sustavnom pregledu dosadašnje literature prikazali procjenu djelotvornosti različitih metoda liječenja parova s idiopatskim sterilitetom, s osvrtom na rezultate poput stopa kliničkih trudnoća ili stopa živorođene djece po paru. Studija je pokazala dobiti ekspektativnog postupka čiji su rezultati usporedivi s liječenjem indukcijom ovulacije klomifenom i sa intrauterinom inseminacijom. Treba uzeti u obzir da s ovakvim načinom liječenja nisu zadovoljni parovi čije je strpljenje već narušeno. Potrebno je još randomiziranih kontroliranih studija koje bi procijenile opravdanost ekspektativnog postupka u odnosu na ostale metode liječenja poput peroralne stimulacije ovulacije, stimulacije sa gonadotropinima i IVF-a. Visoka stopa živorođene djece pokazana je kod parova kod kojih su žene dobivale velike doze gonadotropina, ali uz znatan rizik multiplih gestacija. Unatoč cijeni i rasprostranjenosti upotrebi, IVF se nije pokazao učinkovitiji u odnosu na terapiju gonadotropinima u kombinaciji sa intrauterinom inseminacijom, ali čini se da je djelotvoran u skraćivanju vremena do postizanja kliničkih trudnoća (21). Još uvijek ne postoji jasan odgovor na pitanje koji je najbolji pristup liječenju parova sa idiopatskom neplodnošću. Raspoloživost i poznavanje potencijalnih uzroka, dob i trajanje neplodnosti dakako moraju

biti razmotrene prije započinjanja bilo kojeg postupka. Prema preglednoj studiji Ray A i sur. 2012., IVF je vjerojatno najbolja opcija za žene starije od 40 godina, kojoj eventualno mogu prethoditi dva ciklusa stimulacije gonadotropinima u kombinaciji sa intrauterinom inseminacijom (11). U mlađih žena terapijski protokol bi trebao uključivati postupno sve korake- od ekspektativnog pristupa, preko stimulirane inseminacije, do IVF-a, ali tek na kraju, kad se iscrpe sve terapijske mogućnosti (11). Nedostatak dosadašnjih sustavnih preglednih studija jest uključivanje opsežnih grupa pacijenata bez uzimanja u obzir različitih genetskih i epigenetskih karakteristika, kao i utjecaja brojnih okolišnih i drugih faktora kod muških i ženskih partnera. Individualni pristup svakom paru, koji uzima u obzir sve navedene različitosti i okolnosti, svakako će pozitivno utjecati na uspješnost i pozitivne rezultate primijenjenih metoda liječenja (22).

#### **1.4. Parodontitis i reproduktivno zdravlje**

Parodontna bolest ili parodontitis je kronična upalna bolest gingive i potpornih tkiva zuba koja nerijetko rezultira progresivnom destrukcijom parodontnog ligamenta i alveolarne kosti, povlačenjem zubnog mesa i/ili formiranjem parodontnih džepova (23). Brojna istraživanja dokazala su povezanost između kroničnog parodontitisa i nekoliko sustavnih bolesti poput šećerne bolesti, kardiovaskularnih bolesti, kao i veću učestalost prijevremenih poroda i rađanja djece niže porođajne težine. Rezultati manjeg broja novijih studija ukazuju na povezanost reproduktivnog zdravlja tj. plodnosti i oralnog statusa žena. Značajna stopa neuspjeha metoda potpomognute oplodnje, unatoč impresivnom napretku u stjecanju novih znanja i uvođenju modernih tehnika, potaknula su istraživanja potencijalnih faktora koji negativno djeluju na nastanak trudnoće, a jedan od njih je parodontitis. Fokus interesa je na utjecaju parodontne bolesti i posljedične bakterijemije na nastanak spontane trudnoće ili na uspješnost metoda potpomognute oplodnje, uključujući IVF (24).

Okruženje parodontnih tkiva čovjeka mjesto je kompleksne interakcije mikroflore sa preko 200 različitih vrsta mikroorganizama u apikalnim dijelovima i više od 500 vrsta na

marginama. Broj bakterija u dentalnom plaku premašuje  $10^{11}$  mikroorganizama po miligramu dentalnog plaka (25). Populacije koje dominiraju su anaerobi i to najčešće gram-negativni mikroorganizmi. Sustavni rasap produkata bakterijemije i imunološki odgovor domaćina olakšan je anatomskom blizinom mikroflore i cirkulacije. Otpuštanje endotoksina i bakterijskih produkata u cirkulaciju može uzrokovati bakterijemiju na nivou uterusa, endometrija i na taj način otežati nastanak trudnoće (26).

#### **1.4.1. Parodontitis i trudnoća**

Dobro je poznato da hormonalne promjene u trudnoći imaju znatan učinak na tkivo gingive i da tako mogu pogoršati postojeći parodontitis. Izraženi afinitet estrogena i progesterona kod trudnica za receptore u gingivi sa posljedičnom većom metaboličkom aktivnosti hormona rezultiraju promjenama u mikrocirkulaciji, propusnosti krvožilnog sustava i pojačanim upalnim odgovorom, supresijom stanično-posredovanog imuniteta te kvalitativnim i kvantitativnim promjenama mikrobijalne flore (27). Iako sve navedene mikrobiološke, vaskularne i imunološke promjene u trudnoći mogu utjecati na preegzistirajući parodontitis, pravi mehanizam uzročno posljedične veze nije do kraja razjašnjen.

Parodontitis, kronična bakterijska infekcija, poput drugih akutnih ili supkliničkih upala kao što su: apendicitis, pneumonija ili upala urogenitalnog trakta smatra se potencijalnim rizičnim faktorom za različite negativne ishode trudnoće. Sposobnost gram negativnih bakterija i njihovih toksina da prođu placentarnu barijeru, i na taj način utječu na razvoj fetusa, dokazana je identifikacijom bakterija parodontnog porijekla i visokih koncentracija upalnih medijatora u amnijskoj tekućini žena sa prijevremenim porodima (28, 29). Offenbacher i sur. su u studiji na 126 žena prvi pokazali da parodontitis predstavlja, do tada neprepoznat, značajan faktor rizika za rađanje djece sa niskom porođajnom težinom kao rezultata prijevremenih porođaja i/ili prijevremene rupture plodnih ovoja (30).

#### **1.4.2. Utjecaj parodontitisa na plodnost muškaraca i žena**

Pitanje koje se nametnulo na osnovu rezultata istraživanja o utjecaju parodontitisa na ishode trudnoće glasi: može li oralni status muškarca i žene, u prvom redu status parodontnih tkiva, može utjecati na njihovu plodnost. Odgovor na ovo pitanje nije jednostavan, s obzirom na vrlo složen i jedinstven reprodukcijski proces u kojem su brojni faktori svojim međusobnim odnosima zaslužni za uspješno postizanje trudnoće. Do sada postoji tek ograničeni broj istraživanja koja su pokušala dokazati povezanost parodontitisa i nemogućnosti nastanka trudnoće.

Prva informacija o mogućem međusobnom utjecaju je studija Bienieka i Riedela (31). Istraživanje je uključivalo 36 muškaraca sa bakteriospermijom, rezistentnom na antibiotsku terapiju, kod kojih su provedeni detaljni stomatološki pregledi i otkrivena visoka učestalost dentalnih infekcija. Kod polovice ispitanika provedena je adekvatna terapija sa ciljem eliminacija žarišta infekcije. Nakon 6 mjeseci u dvije trećine ispitanika eksperimentalne grupe spermogrami su bili sterilni. Također je pokazano znatno poboljšanje parametara poput pokretljivosti, koncentracije i morfologije spermija. Zaključak studije prvi put naglašava važnost održavanja oralnog zdravlja, kao i pravovremenog liječenja dentalnih infekcija kod muškaraca sa problemom plodnosti. Dokazana direktna uzročno- posljedična veza između bakterijskih kolonija u dentalnim džepovima i bakteriospermije rezistentne na terapiju, na taj način objašnjava smanjenu plodnost tih muškaraca (31).

Klinger i sur. 2011.g. objavili su zanimljivo istraživanje kojim su utvrđivali moguću povezanost između različitih parametara u spermogramu i parodontnog statusa muškaraca koji su uključeni kao partneri u postupak IVF-a. Rezultati njihovog istraživanja, koje je uključilo 75 muškaraca, pokazali su pozitivnu korelaciju većeg broja mjesta sa dubokim parodontnim džepovima i slabe pokretljivosti spermija, iako statistički neznačajnu te statistički značajnu povezanost između gubitka zbrojene razine pričvrstka i razine pokretljivosti spermija (32). Slične rezultate prikazali su Nwhator i sur. 2013.g. u svojem istraživanju, tj. potvrdili su značajnu povezanost između težine parodontne bolesti i manjeg

broja spermija (33). Zaključci navedenih studija ukazuju na utjecaj parodontne infekcije na kvalitetu sperme koja, na taj način, vjerojatno umanjuje plodnost muškaraca.

Endometrijoza, kao kronično upalno stanje nepoznatog uzroka, također je mogući uzrok neplodnosti te se kao i parodontitis može smatrati posljedicom imunološke disregulacije (34,35). Kavoussi i sur. u svojoj presječnoj studiji istraživali su povezanost parodontitisa i endometrijoze. U istraživanju je sudjelovalo 4136 žena dobi od 18 do 50 godina koje su bile uključene u veliku multicentričnu studiju National Health and Nutrition Examination Survey u periodu od 1994. do 2004.g. Postojanje endometrijoze verificirano je na osnovu podataka iz vlastitog izvješća, dok su kriteriji za dijagnozu parodontitisa uključivali analizu dubine sondiranja (eng. *probing depth*, PD), zbrojene razine gubitka pričvrstka (eng. *clinical attachment loss*, CAL) i krvarenja pri sondiranju (eng. *bleeding on probing*, BOP). Dijagnoza gingivitisa podrazumijevala je postojanje krvarenja iz gingiva na jednom ili više kvadranta. Dijagnoza parodontitisa se postavljala kod prisustva dubine džepa (eng. *pocket depth*, PD) veće ili jednake 4 mm, i kod iznosa  $CAL \geq 2$  mm. Ovisno o parodontnom statusu ispitanice su podijeljene u dvije glavne skupine, one sa zdravim parodontom (1466 ispitanica) i pacijentice sa parodontnom bolesti (1865 ispitanica) od kojih je kod 1154 dijagnosticiran gingivitis, kod 168 parodontitis, a kod 543 bili su prisutni gingivitis i parodontitis. Studija je pokazala značajno veću učestalost (57%) gingivitisa i parodontitisa kod žena koje su navele postojanje endometrijoze u anamnezi u usporedbi sa ženama bez prisutne parodontne bolesti (36).

Neka istraživanja pokazala su povezanost parodontitisa i bakterijske vaginoze te posljedične neplodnosti, ali samo kod žena mlađih od 35 godina (37).

Istraživanje Harta i sur. iz 2012.godine po prvi je puta dokazalo povezanost parodontitisa i neplodnosti žena, tj. vremena koje je potrebno za postizanje trudnoće. Analizirajući skupinu od 3416 žena koje su spontano zatrudnjele pokazano je da je učestalost parodontitisa veća u trudnica drugih rasa u odnosu na trudnice bijele rase. Nadalje, studija je pokazala da žene sa parodontitisom koje nisu bijele rase trebaju dulje vrijeme za postizanje trudnoće u odnosu na bjelkinje bez parodontitisa. Ovo je prva studija koja prepoznaje parodontitis kao jedan od



mogućih uzroka neplodnosti nepoznatog uzroka. Pretpostavlja se da je za negativan utjecaj parodontitisa na začeće odgovoran učinak medijatora upale na nivou endometrija i mjesta implantacije zametka. Drugi potencijalni razlog je intenzivan sistemski upalni odgovor koji se razvija u nekih žena s parodontitisom i na taj način rezultira ponavljanim pobačajima, nemogućnošću implantacije i neplodnošću (38).

Paju i sur., u istraživanju koje je uključilo 256 žena, utvrdili su da žene koje imaju povećanu koncentraciju parodontnih patogena u slini (*Porphyromonas gingivalis*) i povišenu koncentraciju antitijela protiv parodontnih patogena u slini imaju značajno povećan rizik od neuspješnog začeća (39). Telatar i sur. (40) te Machado i sur. (41) prilikom pregleda žena s idiopatskom neplodnošću utvrdili su lošije parodontno i oralno zdravlje u usporedbi s kontrolnom skupinom te su posumnjali da bi parodontitis mogao izazivati sustavni upalni odgovor koji ometa začeće.

### **1.4.3. Utjecaj parodontitisa na uspješnost IVF-a**

IVF je zadnja u nizu terapijskih opcija liječenja neplodnosti. Uspješnost ove izuzetno kompleksne i osjetljive metode ovisi o nizu faktora, u prvom redu o dobi partnera, ovarijskoj rezervi i nalazu spermograma. Iako je poznato da bi prije započinjanja postupka IVF-a, bilo poželjno sanirati sve potencijalne izvore infekcije, prava povezanost između majčine parodontne bolesti i uspješnosti IVF postupka još uvijek je neistraženo polje. Pavlatou (44) je u svojoj prvoj studiji 2003.g. analizirao utjecaj upale gingive na uspješnost IVF-a, preciznije na broj oplođenih jajnih stanica koje su se umjetno implantirale u maternicu. Studija je uključivala 19 žena reproduktivne dobi koje do tada nisu bile uključene u nijedan IVF postupak, i nisu provodile nikakvu parodontološku terapiju u zadnjih pola godine. Nakon završenog postupka IVF-a kod ispitanica je pokazan blagi porast srednje vrijednosti gingivalnog indeksa (eng. *gingival index*, GI), ( $p=0.154$ ) (42) koji nije bio povezan s odgovarajućim promjenama vrijednosti indeksa plaka (eng. *plaque index*, PI) i nije bio statistički značajan ( $p=0.911$ ) (43). Nadalje, povećanje GI-a značajno je koreliralo s dozom primijenjenih gonadotropina. Ova studija pokazala je kako hormoni koji se koriste prema protokolima IVF-a, uzrokuju pogoršanje postojeće upale gingive, što u konačnici može

utjecati na broj oplodjenih jajnih stanica. Glavni nedostatak studije je nedostatak klasifikacije ispitanica na osnovu njihovog inicijalnog parodontnog statusa, u prvom redu zbog male veličine samog uzorka (44). Desetak godina kasnije Pavlatou i sur. proveli su novo istraživanje o utjecaju parodontnog statusa žena na uspješnost IVF-a, poput razvoja više folikula, transfera embrija te na nastanak i ishode trudnoće. Skupina od 60 ispitanica podijeljena je u podgrupe ovisno o preegzistirajućem stanju parodonta- 20 žena sa zdravim parodontom, 19 s gingivitisom i 21 žena sa srednje teškim oblikom parodontitisa. Pokazano je statistički značajno pogoršanje GI-a nakon IVF-a kod svih ispitanica. U skupini žena s parodontitisom primijećen je značajan porast vrijednosti BOP-a. Studija je pokazala trend negativne korelacije broja folikula, tj. punkcijom dobivenih oocita i broja embrija pogodnih za implantaciju u odnosu na GI prije i poslije IVF postupka kod svih ispitanica. Sličan trend bio je prisutan i kod BOP-a u skupini žena s parodontitisom. Rezultati mikrobioloških analiza ukazali su na promjene sastava subgingivalne flore, tj. porast koncentracije parodontnih patogena u svih žena, a naročito kod ispitanica s parodontitisom. U skupini žena s parodontitisom dokazana je sklonost povezanosti ukupnog sastava subgingivalne flore sa vrijednostima estradiola izmjerenim prije započinjanja IVF postupka. Pokazan je negativan utjecaj sastava oralnih patogena na broj punkcijom dobivenih oocita i jajnih stanica pogodnih za implantaciju. Unatoč ograničenjima studije, poput malog broja ispitanica podijeljenih u grupe ovisno inicijalnom parodontnom statusu, ova studija pokazala da zdravlje parodonta budućih majki može biti oštećeno davanjem hormonalnih medikamenata tijekom IVF postupka i kao takvo utjecati na djelotvornost terapije. S druge strane, lošiji preegzistirajući parodontni status izgleda da je povezan s lošijim ishodima liječenja neplodnosti IVF postupcima (45).

### **1.5. Anti Müllerov hormon (AMH) - biomarker ovarijske rezerve**

Unatoč nedostatku znanstvenih dokaza o stvarnoj djelotvornosti, biomarkeri ovarijske rezerve promovirani su u potencijalne markere reproduktivnog potencijala ili testove plodnosti. Antimüllerov hormon (AMH) je glikoprotein koji pripada porodici

transformirajućeg faktora rasta  $\beta$ . Proizvode ga granulosa stanice u preantralnim i malim antralnim folikulima, pa na taj način odražava broj primordijalnih folikula (46). Budući da su rani folikuli neovisni o gonadotropinima, AMH ima minimalnu varijabilnost, te se može mjeriti u bilo kojoj fazi menstrualnog ciklusa. Budući da AMH dobro korelira sa dobi žene, brojem antralnih folikula (eng. *antral follicle count*, AFC) i s rezultatima metoda potpomognute oplodnje, smatra se markerom ovarijske rezerve (47, 48). Pokazana je dobra korelacija AMH s ovarijskom rezervom i s brojem oocita dobivenih ovarijskom stimulacijom (49).

Rezultati studija koji govore o povezanosti AMH i stope kliničkih trudnoća, tj. fekunditeta kao i utjecaja AMH na broj živorođene djece su proturječni. Dok neke studije pokazuju pozitivnu korelaciju (50, 51), iznenađujuće, kod većeg broja studija nije nađena povezanost ili je povezanost mala (52-54). Uzrok za tako slabu prediktivnu vrijednost AMH-a u odnosu na stopu kliničkih trudnoća je vjerojatno u pretpostavci da AMH reflektira broj, ali ne i kvalitetu jajnih stanica (55). S druge strane, moguće je i da niže vrijednosti AMH kod nekih žena omogućuju većem broju preostalih folikula da se aktiviraju i postanu vodeći folikuli. Povišen FSH koji prati niže vrijednosti AMH kod žena sa smanjenom ovarijskom rezervom nerijetko rezultira superovulacijom, ili multifolikularnom ovulacijom, povećavajući tako šansu za trudnoću. To objašnjava i veću incidenciju blizanačkih trudnoća kod žena kasnije reproduktivne dobi (56).

Nadalje, varijacije u rezultatima studija mogu se objasniti različitostima u samom dizajnu studija, metodologiji AMH testiranja, sociodemografskim karakteristikama ispitivane populacije i različitim metodama protokola stimulacije. Na tržištu su dostupni brojni AMH testovi. Diagnostics Systems Lab (DSL) i Immunotech Beckman Coulter (IBC) koji su jedni od originalnih testova, zbog korištenja dvaju različitih antitijela za AMH pokazuju međusobno različite vrijednosti (46). Uspoređujući rezultate različitih laboratorija koji su koristili iste Beckman Gen II testove pokazano je da rezultati nisu konzistentni u čak 40% slučajeva. Nadalje, neprikladna pohrana i rukovanje uzorcima može utjecati na porast vrijednosti AMH, stoga o svemu navedenom treba razmišljati prilikom interpretacije rezultata (46, 48).

Steiner i sur. u svojoj studiji istraživali su do koje mjere su biomarkeri ovarijske rezerve povezani s reproduktivnim potencijalom kod 750 žena, u dobi između 30 i 44 godine koje su pokušavale zatrudnjeti kroz tri mjeseca ili manje. Studija na velikom uzorku, dovoljnom za detekciju malih efekata, prospektivnog karaktera, sa standariziranim mjerenjima ishoda pokazala je da vrijednosti biomarkera koje su upućivale na smanjenu ovarijsku rezervu u usporedbi sa normalnom ovarijskom rezervom nisu bile povezane sa reduciranom plodnošću tih ispitanica. Rezultati ove studije, dakle, ne podupiru korištenje FSH ili AMH-a za procjenu plodnosti kod žena sa navedenim karakteristikama (57).

Hagen i sur. otkrili su da mlade žene s visokim vrijednostima AMH imaju smanjeni fekunditet (HR 0.62; 95% CI: 0.39–0.99). Zaključili su da AMH kod tih žena može biti potencijalni marker za sindrom policističnih jajnika (54). Previsok AMH smanjuje osjetljivost folikula na folikul stimulirajući hormon (FSH). Na taj način sprječava ovulaciju (58). Poznato je da žene sa kliničkim simptomima PCO-a imaju različite rezultate IVF-a zbog kompromitirane kvalitete jajnih stanica pa unatoč velikom broju folikula imaju lošiju kvalitetu embrija i višu stopu spontanih pobačaja (59).

Goswami i sur. u studiji na 200 IVF ciklusa pokazali su da AMH neovisno o dobi ima ograničenu prediktivnu vrijednost za nastanak kliničkih trudnoća ili živorođene djece nakon IVF postupaka. Prediktabilnost AMH ovisna o dobi vjerojatno se odnosi na, s dobi povezanim, opadanje kvalitete i kvantitete jajnih stanica. Kod mlađih žena postoji zaliha kompetentnih stanica dobre kvalitete, pa tako ukoliko i postoji mala ovarijska rezerva ona nije ograničavajući faktor za uspješnost IVF-a. Suprotno, kod starijih žena sa smanjenom ovarijskom rezervom, kvalitetne jajne stanice čine mali udio u ukupnoj proporciji jajnih stanica. Starije žene s većom ovarijskom rezervom i posljedično većim AMH omogućit će selekciju najboljih jajnih stanica i tako povećati šansu za nastanak trudnoće nakon IVF-a (60).

Greenwood i sur. u svom su istraživanju testirali hipotezu da li žene s idiopatskom neplodnošću imaju smanjenu ovarijsku rezervu. Studija je uključivala 277 žena s jasno definiranim idiopatskim sterilitetom i kontrolnu skupinu 266 reproduktivno zdravih žena,

koristeći pri tom analizu AMH, AFC i omjer AMH/AFC. Uzimajući u obzir faktore koji bi mogli smanjiti vjerodostojnost rezultata, poput dobi, rasne pripadnosti, BMI, pušenja u anamnezi, rezultati su pokazali da trenutno korišteni prediktori ovarijske rezerve ne razlikuju žene s idiopatskom neplodnošću od zdravih žena sličnih demografskih karakteristika. Testiranje zalihe jajnika dakle nije prediktor za trudnoću kod žena s idiopatskim sterilitetom (61).

## **1.6. Matriksne metaloproteinaze**

### **1.6.1. Općenito o matriksnim metaloproteinazama**

Matriksne metaloproteinaze (eng. *matrix metalloproteinases*, MMPs) pripadaju skupini enzima koja je odgovorna za degradaciju ekstracelularnih proteina i adekvatnu interakciju individualne stanice s neposrednom okolinom. Na taj način MMP-e omogućuju višestaničnim organizmima pravilan rast i razvoj. MMP-e čine skupinu endopeptidaza koje su podijeljene u 6 grupa, ovisno o afinitetu za specifične substrate: kolagenaze (MMP-1, 8 i 13), gelatinaze (MMP-2 i 9), stromelizini (MMP-3, 10 i 11) matrilizini (MMP-7), metaloelastaze (MMP-12) i membranski tip MMP-e koje su dobile naziv po karakterističnoj transmembranskoj domeni (62, 63).

Aktivnost MMP-a regulirana je s nekoliko grupa inhibitora od kojih su najvažniji tkivni inhibitori matriksnih proteinaza (eng. *tissue inhibitors of metalloproteinases*, TIMPs). Za normalna fiziološka zbivanja u stanicama i tkivima neophodna je usklađena, uravnotežena aktivnost MMP-e i TIMP-a. Regulacija aktivnosti MMP-a odvija se na transkripcijskom i postranskripcijskim nivoima. Transkripcijski geni reguliraju sintezu MMPs kontrolirajući intracelularnu proizvodnju proenzima, ekskreciju enzima i ekstracelularnu aktivaciju. Regulacija ekspresije ovih gena ovisi o brojnim stimulacijskim ili supresivnim faktorima i stanjima poput staničnog stresa, spolnih hormona, različitih citokina i faktora rasta koji uključuju interleukine, interferone, čimbenik rasta vaskularnog endotela (eng. *vascular*

*endothelial growth factor*, VEGF), faktor nekroze tumora alfa (eng. tumor necrosis factor  $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ), faktor rasta tumora beta (eng. *tumor growth factor*  $\beta$ , TGF- $\beta$ ), i brojne druge (64).

Novija istraživanja pokazala su da MMP-e, osim svoje sposobnosti za razgradnju proteina izvanstaničnog matriksa (eng. *extracellular matrix*, ECM), imaju i druge uloge poput alteracije stanica matriksa, međustaničnih interakcija, aktivacije i inaktivacije autokrinih i parakrinih signalnih molekula i staničnih receptora. Mijenjajući kompoziciju i strukturalnu organizaciju ECM-a i signala unutar matriksa, MMP-e utječu na reguliranje bazičnih staničnih procesa poput rasta, razvoja, diferencijacije, adhezije i preživljenja stanice (65). Na taj način MMP-e su uključene u brojne fiziološke i patološke procese poput rasta i razvoja embrija, koštane pregradnje, remodeliranja krvnih žila, cijeljenja rane, upalnih procesa i zloćudnih bolesti. Nadalje, polimorfizmi unutar gena za MMP-e povezuju se i s individualnom sklonosti za kardiovaskularne bolesti, reumatoidni artritis i za karcinom (66-69).

Belkin i sur. u svojoj su studiji istraživali ponašanje MMP-a u procesima nastanka i razvoja tumora (70). Razgradnja ECM posredovana matriksnim metaloproteinazama omogućava stanicama karcinoma penetraciju kroz barijere matriksa. Drugi načini putem kojih MMPs utječu na ponašanje tumora su otpuštanje faktora rasta i različitih citokina, kojima obiluje ECM, te razgradnja adhezijskih proteina i molekula na površinama stanica koje provode signale iz međustanične okoline poput E kaderina (71). Na taj način MMP-e sudjeluju u regulaciji migracije tumorskih stanica, potičući ili spriječavajući njihovo širenje, ovisno o tipu MMP-a kojeg stanice sadrže.

MMP-e također sudjeluju u aktivaciji, ali i smirivanju upalnih procesa, djelujući na metabolizam interleukina 1 (eng. *interleukin 1*, IL-1). IL-1 je potentni aktivator sinteze MMP-a iz vezivnih stanica. Prekomjerna proizvodnja MMP-a negativnom povratnom spregom dovodi do inaktivacije i razgradnje upalnih citokina poput interleukina 1 beta (eng. interleukin 1  $\beta$ , IL-1 $\beta$ ) i na taj način usporava daljnji razvoj upale (72).

## 1.6.2. Uloga matriksnih metaloproteinaza u ženskom reproduktivnom sustavu

Istraživanja su pokazala važnu ulogu MMP-a u fiziološkim i u patološkim stanjima ženskog reproduktivnog sustava kao što su menstruacijski ciklus, trudnoća, endometrioza, ponavljajući neuspjeh implantacije, genitourinarne infekcije i ginekološki tumori. Rezultati su heterogeni, a ovisе o uzorku, primijenjenim tehnikama analize ispitanica i brojnim drugim faktorima koji utječu na relevantnost rezultata statističke obrade.

### 1.6.2.1. MMP-e i TIMP-i u menstrualnom ciklusu

MMP-e sudjeluju u održavanju hemostaze i razvoju krvnih žila endometrija. Promjene kroz koje prolazi endometrij za vrijeme menstrualnog ciklusa, od proliferativne i sekrecijske faze do faze ljuštenja i reepitelizacije, ovisе o pravilnoj regulaciji matriksnih metaloproteinaza i njihovih inhibitora (73,74). Na aktivnost MMP-a utječu razine estradiola i progesterona (75). Lučenje pojedine vrste MMP-a karakteristično je za određene faze ciklusa.

MMP-e s najintezivnijom stromalnom i periarterijskom aktivnosti za vrijeme menstrualnog krvarenja su MMP-1, -3, -8, -9 i -12. Ekspresija MMP-1, -2, -3, -7, -9 i TIMP-1 i -2 iz endometralnih stanica dokazana je imunohistokemijskim analizama i “in situ” hibridizacijom (76-78). Goffin i sur. prvi su pokazali pojačanu ekspresiju MMP-2 i MMP-8 za vrijeme menstruacije metodom reverzne transkripcije i lančane reakcije polimerazom (eng. *reverse transcription-polymerase chain reaction*, RT-PCR) (79). Dokazana ekspresija podudara se s infiltracijom upalnih stanica, naročito neutrofila, eozinofila i makrofaga (80). MMP-e i TIMP-i u vaskularnim strukturama imaju suprotna djelovanja u različitim fazama ciklusa. Dok se ekspresija MMP-2 i MMP-9 u krvnim žilama endometrija za vrijeme proliferativne i sekrecijske faze povezuje sa rastom krvnih žila i angiogenezom, pojačana aktivnost MMP-3 u površinskom sloju endometrija za vrijeme menstruacije sugerira njegovu ulogu u oštećenju stijenke krvnih žila i započinjanju krvarenja. Nadalje, snažna ekspresija TIMP-1 i -2 u krvnim žilama za vrijeme menstruacije odgovorna je za ograničavanje ljuštenje endometrija, reduciranje oštećenja tkiva i omogućavanje regeneracije endometrija (81).

### 1.6.2.2. MMP-e u trudnoći

U ranoj trudnoći MMPs igraju važnu ulogu u kontroli diferencijacije i decidualne transformacije, ključnim faktorima za implantaciju i pravilan razvoj placente (73,74). Pojačana aktivnost MMP-3, MMP-10 i TIMP-1 dokazana je animalnim studijama u tkivima i organima koji prolaze kroz procese aktivnog remodeliranja, poput uterusa gravidnih ženki miševa (82). MMP-9 smatra se ključnom vaginalnom elastazom. Oliphant i sur. pokazali su da visoka koncentracija MMP-9 u obrisku vagine u prvom trimestru trudnoće pozitivno korelira s vaginalnim porođajima bez komplikacija (83). Isti autori pokazali su da žene s većom aktivnosti MMP-9 nakon porođaja imaju bolji oporavak i bržu uspostavu vaginalne angulacije u odnosu na mišiće dna zdjelice (84).

Rezultati brojnih istraživanja o utjecaju polimorfizama gena za MMP-e i TIMP-e na porođajne komplikacije poput prijevremene rupture plodovih ovoja, su različiti. Prema jednim autorima, polimorfizmi MMP-9 (85,86), MMP-1 i MMP-2 (87) povećavaju rizik za prijevremeni porod. Druge studije, naprotiv, nisu našle povezanost genskih polimorfizama za MMP-1 i -9 (88), kao ni koncentracije MMP-2 u amnijskoj tekućini u drugom tromjesečju (89) s negativnim ishodima trudnoće.

Povišena razina MMP-8 u amnijskoj tekućini pokazala se važnim biomarkerom intraamnijske infekcije, bilo da se radi o asimptomatskim ženama u srednjem tromjesečju koje obavljaju genetska testiranja, ili o trudnicama s prijevremenim kontrakcijama sa ili bez ruptur fetalnih membrana (90-92). Kod tih žena postoji povećani rizik za prijevremeni porod i veći perinatalni morbiditet. Uvođenje brzih kvalitativnih MMP-8 testova na bazi imunokromatografije moglo bi znatno pojednostavniti uočavanje rizika za razvoj infekcije sa svim intra i postpartalnim komplikacijama. To je ujedno i temelj za intervencijske studije koje bi mogle pokazati može li pravovremeno protupalno liječenje ovih trudnica smanjiti stopu prijevremenih poroda i poboljšati ishode trudnoće.



### 1.6.2.3. MMP-e i ponavljajući neuspjeh implantacije

MMP-9 je najistraživanija matriksna metaloproteinaza u procesu implantacije embrija. Vu i sur. u “in vitro” studiji pokazali su da je MMP-9 ključni regulator invazije citotrofoblasta (93). Trofoblast luči brojne metaloproteinaze uglavnom proMMP-2 i proMMP-9 i tako omogućava migraciju i napredovanje svojih stanica kroz matriks. Decidualne stanice, kao odgovor na invaziju, proizvode veće količine TIMP-a za inhibiciju aktivnosti MMP-a. Za kontroliranu invaziju i pravilnu implantaciju neophodna je uravnotežena aktivnost MMP-a i njihovih inhibitora (94).

Budući da je ponavljajući neuspjeh implantacije (eng. *recurrent implantation failure*, RIF) jedan od glavnih razloga neplodnosti u postupcima potpomognute oplodnje, više studija fokusiralo se na povezanost MMP-a i RIF-a. Rezultati studije Pereza i sur. ukazuju na mogući utjecaj genskih polimorfizama za MMP-2 i MMP-9 sa idiopatskim RIF-om (95). Druge studije nisu našle korelaciju između MMP-9 polimorfizma i RIF-a (96). Yoshii i sur. pokazali su da žene sa RIF-om, kod kojih su pronađene povišene razine aktivnosti MMP-2 i MMP-9 u ispirku uterusa, nakon terapije antibioticima i kortikosteroidima, imaju veći udio uspješnih implantacija od kontrolne skupine žena istih karakteristika koje nisu dobile terapiju (97). S druge strane, rezultati studije Konac i sur. pokazuju značajno smanjenje endometralne ekspresije MMP-2 i TIMP-3 u sekrecijskoj fazi ciklusa kod žena sa idiopatskom neplodnošću u odnosu na plodne žene (98).

### 1.6.2.4. MMP-e u drugim patološkim stanjima ženskog reproduktivnog sustava

Više studija pokazalo je povezanost MMP-9 i razvoja endometrioze, dokazavši visoke razine MMP-9 u plazmi i peritonealnoj tekućini kod žena s endometriozom u odnosu na kontrolnu skupinu (99-102). S druge strane, Syzmanowski i sur. u svom istraživanju nisu našli statistički značajnu razliku u ekspresiji MMP-2, MMP-9, TIMP-1 i transformirajućeg faktora rasta beta 2 (eng. *transforming growth factor-β2*, TGF-β2) između žena sa endometriozom i žena bez detektabilnih znakova bolesti (103).

Rezultati istraživanja Singh i sur. pokazali su značajno povišenu ekspresiju MMP-2 i MMP-9 te značajno sniženu razinu TIMP-1 i TIMP-3 kod žena koje imaju infekciju *Chlamydom trachomatis* i učestale spontane pobačaje (104). Drugi autori su istraživali ekspresiju različitih MMP-a u jajovodima inficiranim *Neisseriom gonorrhoeae*. Juica i sur. su primijetili značajan porast ekspresije MMP-8, bez značajnih promjena razina MMP-3, MMP-9 i TIMP-1 (105), dok su Rodas i sur. pronašli povišenu razinu MMP-9 u jajovodima s gonokoknom infekcijom (106).

Poznato je da MMP-e razgrađuju ECM koji predstavlja barijeru metastatskom širenju tumora. Na taj način MMP-e imaju važnu ulogu u invaziji i širenju različitih vrsta tumora, pa i karcinoma endometrija i jajnika (107,108)). Povećanu ekspresiju MMP-2 kod karcinoma jajnika pokazali su Davidson i sur. koristeći pri tom metode imunohistometrije i "in situ" hibridizacije (109). U istraživanju Ziyi i sur. ekspresija MMP-2 u stanicama karcinoma jajnika značila je značajno smanjenje ukupne stope preživljenja kod tih žena, dok ekspresija MMP-2 u stromalnim stanicama nije imala utjecaj na dugoročne negativne ishode (110). Procjena aktivnosti MMP-2 u stanicama karcinoma mogla bi na taj način biti važan podatak za terapijske i prognostičke svrhe, kao i za utvrđivanje proširenosti bolesti.

### **1.7.Matriksne metaloproteinaze i parodontitis**

Slina je tjelesna tekućina složenog sastava koja obavlja raznolike funkcije. Ukupna slina nastaje miješanjem sline iz žlijezda slinovnica s ostalim tekućinama i supstratima koji dospiju u usnu šupljinu, a to su sulkusna tekućina, sekreti iz dišnih putova, bakterije i njihovi metaboliti, virusi, gljivice, odljuštene epitelne stanice i brojni drugi derivati. Slina iz slinovnica je izlučevina velikih i malih žlijezda slinovnica čijim lučenjem upravlja autonomni živčani sustav. Nasuprot slini iz slinovnica, koju proizvode specijalizirane stanice i koja uz to prolazi dodatnu obradu u izvodnim kanalićima, sulkusna tekućina je svojim sastavom puno sličnija krvnoj plazmi. Ona je transudat koji nastaje ultrafiltracijom iz kapilarnog pleksusa u području sulkusa, ili eksudat u slučaju jače upale i posljedične povećane permeabilnosti kapilara. Dakle, slina iz slinovnica, kao i sulkusna tekućina derivati su krvne plazme. Zbog svojeg porijekla, obje tekućine u većoj ili manjoj mjeri sadržavaju

komponente krvne plazme – elektrolite, hormone, proteine plazme, imunoglobuline, citokine i brojne druge medijatore. Najveći dio komponenata plazme u slinu dospije putem sulkusne tekućine jer su kapilare u sulkusu za njih puno propusnije nego stanice acinusa iz žlijezda slinovnica (111).

Upalni medijatori identificirani u slini poput IL-1  $\beta$ , -6, -8, TNF, MMP-8, MMP-9, TIMP-1 povezuju se s brojnim oralnim i sistemskim bolestima (112). Na taj način slina predstavlja potentni medij, tj. alternativu plazmi ili serumu. Zajedno s usvajanjem novih spoznaja i metoda s područja molekularne biologije u posljednjih dvadesetak godina izuzetno je poraslo zanimanje za korištenje sline u neinvazivnim metodama probira u dijagnostici, prognozi bolesti kao i praćenju rezultata terapije.

Parodontitis, šesta po učestalosti kronična upalna bolest u svijetu, predstavlja multifaktorijalno stanje sa kompleksnim interakcijama između parodontnih bakterija, upalnog odgovora domaćina te genetskih, okolišnih i bihevioralnih faktora rizika (113). Podatci iz literature navode varijabilnu prevalenciju parodontitisa, ovisno o promatranoj populaciji, dobi i stupnju parodontitisa. Sheiham i Netuveli navode da je učestalost umjerenog parodontitisa (s džepovima dubine 3,5-5,5 mm) kod Europljana u dobi od 35-44 godine 13-54% te da je srednja vrijednost učestalosti ovog stupnja parodontitisa u Zapadnoj Europi 36%, a u Istočnoj Europi 45%. Prema istim autorima, učestalost uznapredovalog parodontitisa (s džepovima dubljim od 5,5 mm) kod odraslih iznosila je 10% u Zapadnoj Europi te čak 30-40% u nekim zemljama Istočne Europe (114). Brojne epidemiološke i kliničke studije pokazale su da neliječena perzistirajuća parodontna infekcija oslabljuje obrambene mehanizme domaćina i može ozbiljno ugroziti opće zdravstveno stanje povećavajući rizik za kardiovaskularne bolesti, plućne bolesti i opstetričke komplikacije poput prijevremenog poroda i rađanja djece sa malom porođajnom težinom (115). Najčešći oblik bolesti je plakom inducirani parodontitis kojeg karakterizira upala gingive, otpuštanje različitih upalnih citokina i destrukcija tkiva. Kronični parodontitis je sporo progredirajuća bolest, ali može imati periode rapidnog napredovanja. Degeneracija podležećeg kolagena parodonta, resorpcija alveolarne kosti, migracija epitela gingive preko površine zuba dovode do konačnog formiranja parodontne lezije i gubitka zuba (116). Tradicionalna dijagnoza

parodontitisa se bazira prvenstveno na temelju kliničkog nalaza koji uključuje mjerenja PD, BOP i CAL. Nadalje, tu su i radiološka ispitivanja i po potrebi mikrobiološke analize odnosno identifikacija parodontnih bakterija. Navedene metode zahtijevaju vrijeme, visoko kvalificirano osoblje, skupu opremu, a njihov rezultat je utvrđivanje već postojeće bolesti, ali ne i prepoznavanje rizika za razvoj parodontitisa bez postojanja kliničkih simptoma (117-119). Zadnjih godina pokušava se otkriti brze testove za detekciju parodontitisa *inter alia* kako bi se izbjeglo nepotrebno izlaganje pacijenata radiološkom snimanju. Ispitivani su brojni biljezi u slini i čini se kako određivanje matriksnih metaloproteinaza daje važne informacije o razlici između gingivitisa, parodontitisa i zdravog parodonta. Posebno se u tom smislu ističe MMP-8 koja se pokazala prilično dobrim biljegom.

MMP-8 u gingivalnoj sulkusnoj tekućini je proteaza s visokim destruktivnim potencijalom uslijed svoje sposobnosti da degradira kolagen u bolesnika koji imaju parodontitis. Brojna istraživanja pokazuju kako je MMP-8 povišena u gingivalnoj sulkusnoj tekućini pacijenata s parodontitisom. MMP-8 moguće je detektirati u različitim supstratima (slina, ispirak usta, gingivalna sulkusna tekućina, periimplantatna sulkusna tekućina). Razina MMP-8 naročito je povišena u osoba koje pate od teških oblika parodontitisa (120-124). Poznato je kako pušenje neovisno povećava razinu MMP-8 što je dokazano u istraživanju parodontnih patogena u bronhijalnom sekretu osoba (125). Razina MMP-8 u gingivalnoj tekućini je povišena i u drugih bolesnika kao npr. oboljelih od reumatoidnog artritisa (126). Aktivacija osteoklastične aktivnosti uslijed aktivacije receptora nuklearnog čimbenika  $\kappa\beta$  liganda (eng. *receptor activator of nuclear factor kappa- $\beta$  ligand*, RANKL) i otpuštanje enzima poput MMP-8 su jedni od čimbenika koji su uključeni u raspad parodonta. Ipak mehanizmi u podlozi ovog stanja su slabo poznati (127). Kronični parodontitis je okidač za imunološke upalne procese. Upalom aktivirani neutrofili otpuštaju brojne enzime u ekstracelularni matriks, među njima i MMP-8. Na taj način je MMP-8 uključena u degradaciju komponenti ekstracelularnog matriksa i može se otkriti u gingivalnoj sulkusnoj tekućini. Nekoliko istraživanja pokazalo je da povišena razina MMP-8 u slini pozitivno korelira s progresivnim gubitkom CAL (128,129). Dakle, određivanje MMP8 u sulkusnoj gingivalnoj tekućini ili

slini može biti važan čimbenik u dijagnostici parodontitisa, progresiji bolesti i odgovora na liječenje parodontitisa.

U traganju za najrelevantnijim rezultatima studije su uspoređivale različite laboratorijske i ordinacijske (“chair-side”) metode određivanja razine MMP-8 u parodontitisom zahvaćenoj gingivalnoj sulkusnoj tekućini ili u uzorcima sline (130, 131). To su imunofluorometrijska analiza (eng. *immunofluorometric assay*, IFMA), MMP-8 ordinacijski test (eng. *chair-side dip-stick test*, ili *point of care test*, PoC test), enzimski povezani imunosorbentni test (eng. *enzyme-linked immunosorbent assay*, ELISA): dentoELISA i tradicionalna AmershamELISA kit. Postupci provođenja IFMA, dentoELISA i AmershamELISA detaljno su opisani u studijama Leppilahti J. i sur. 2011.g. i Hanemaaijer R. i sur. 1997.g. (131, 132). IFMA, MMP-8 point of care test i dentoELISA koriste ista monoklonalna antitijela na MMP-8 i s većom točnošću od tradicionalne ELISA metode mogu razlikovati ispitanike sa žarištima parodontitisa u odnosu na zdrave kontrole. Razlog veće osjetljivosti ovih testova je u sposobnosti antitijela za identifikaciju neutrofilnog fibroblast tipa MMP-8 izotopa, tj. njegove aktivne forme (131,132). Upravo je aktivna forma MMP-8 uglavnom prisutna u žarištima s aktivnom parodontisom, dok se latentna forma više pojavljuje kod gingivitisa (130). AmershamELISA metoda detektira sve oblike MMPs (131).

### **1.7.1. MMP-8 “point of care” imunotest iz sline (Periosafe)**

U posljednje vrijeme velika se pozornost polaže takozvanim “point of care” testovima iz sline koji na jednostavan i brz način, u svega 5 minuta, mogu identificirati, tj. raditi skrining kroničnog i početnog parodontitisa kod kojeg još nije došlo do pojave kliničkih simptoma. Radi se o kvalitativnom testu koji kao osnovnu metodu koristi imunokromatografiju za određivanje specifičnog antigena ili protutijela u uzorku tj. slini ili gingivalnoj sulkusnoj tekućini ispitanika na principu enzimskog imunotesta. U literaturi se susreće još nekoliko naziva za ovakvu vrstu testova poput “near patient testing”, “bed side testing”, “chair side dip stick test”. PoC testiranje provodi se uz bolesnika. Ispitivani supstrat transportira se kroz

porozni mikrostrukturirani sloj ili sintetske polimere testa. Tu dolazi do kemijske reakcije između ciljane molekule ili antigena iz substrata sa kemijskim partnerom tj. antitijelom koje je imobilizirano na površini čestice matriksa. S prolaskom sve više supstrata kroz podlogu intezitet kemijske reakcije mijenja boju podloge i daje jasno vidljiv rezultat. Test sadrži dvije podloge ili zone, kontrolnu koja reagira sa svim česticama iz supstrata, bez selekcije i pokazuje valjanost testa i drugu sa specifičnim monoklonalnim antitijelima na aktivnu formu MMP-8 koja reagira samo sa ciljnim molekulama. MMP-8 PoC test osim što identificira mjesta početnog i kroničnog parodontitisa, može razlikovati aktivna od zdravih mjesta, predvidjeti širenje bolesti i služiti za monitoriranje tj. praćenje efikasnosti terapije (133-137). Test također može prepoznati genetski predisponirane adolescente (138).

MMP-8 PoC test u dobroj je korelaciji sa kvantitativnom metodom IFMA. Sa pragom od 1mg/l MMP-8 u gingivalnoj sulkusnoj tekućini test osigurava senzitivnost od 0.83 i specifičnost od 0.96 (139).

Johnson i sur. u svom radu zaključili su da brzi MMP-8 imunotest dobro korelira s laboratorijskim imunološkim testom za određivanje MMP-8 koji se smatra zlatnim standardom. Naveli su i određena ograničenja, kao npr. da se brzim testom ne može procijeniti opseg niti točna lokalizacija bolesti te da test kojeg su koristili ne razlikuje gingivitis od parodontitisa (140). Raniji radovi pokazali su da je kao potencijalni biomarker za dijagnozu parodontitisa i periimplantitisa važan aktivni oblik MMP-8, aMMP-8, a ne ukupna koncentracija MMP-8 u supstratu (130, 141-145) Rad Raisanena i sur. koji je objavljen 2019.g. pokazao je da je za detekciju aMMP-8 brzim testom preciznije koristiti ispirak usne šupljine nego slinu (145).

Heikkinen i sur. uspoređivali su šest različitih cut-off vrijednosti MMP8 kod 130 pacijenata sa kroničnim parodontitisom i pri tome za uzorak koristili ispirak usne šupljine. Pokazano je da je cut-of vrijednost od 25ng/ml filtrata dobivenog od 5ml ispirka usne šupljine najmjerodavnija u razgraničavanju pozitivnih od negativnih nalaza (136). Dobivena senzitivnost testa od 76.5% kod prisutnih više od dva mjesta sa dubokim parodontalnim džepovima nešto je niža u odnosu na senzitivnost od 83% u studiji Mäntylä i sur. s GFC

MMP8 stick testom, dok je specifičnost od 96.7% jednaka u obje studije (139). Razlog je vjerojatno u tome što su za uzorke koristili slinu umjesto gingivalne sulkusne tekućine. U našem istraživanju koristit će se Periosafe test iz sline u prvom redu zbog jednostavnosti dobivanja uzorka i zbog planiranja uvođenja ovog testa u ginekološke ambulante za skrining osoba koje imaju potencijalni rizik za parodontitis.

Budući da je znanje o povezanosti salivarnih biomarkera i dijagnoze određenih bolesti ograničeno, istraživanja koja u svojoj metodologiji koriste MMP-8 *point-of-care* test sam ili u kombinaciji sa drugim laboratorijskim metodama mogla bi imati veliki potencijal za prepoznavanje MMP-8 PoC testa kao dijagnostičkog mosta između usne šupljine i sistemskih stanja.

Kao što je gore obrazloženo, velik broj studija istraživao je vezu između parodontitisa i neplodnosti kod muškaraca i žena, no mali broj je u svojim analizama koristio MMP-8 PoC test za validaciju i procjenu rizika za parodontitis, poput studije Nwhatora i sur. iz 2014 (146). Oni su na uzorku od 86 muškaraca analizirali da li prisustvo rizika za parodontitis može utjecati na kvalitetu spermograma. Rizik za parodontitis procijenili su koristeći rezultate MMP-8 PoC testa i parodontološkog indexa dobivenog bazičnim parodontološkim pregledom (eng. *Community Periodontal Index of treatment needs*, CPITN) (147). Nadalje, kod svakog ispitanika analiziran je stupanj ili indeks oralne higijene. Za razliku od studije Klinger i sur. iz 2011.g., nije pokazana povezanost između kroničnog parodontitisa i smanjene pokretljivosti spermija (32). Mogući razlog je što su Klinger i sur. koristili CAL koji predstavlja mjeru trenutnog parodontalnog statusa, dok je MMP-8 oralni test indikator rizika za parodontitis i prije pojave kliničkih simptoma. Analiza CPITN sekstanata korištena u ovoj studiji rezultirala je značajnom povezanošću samo u trećoj kategoriji (broj sekstanata s parodontnim džepovima) u jednoj dobnoj skupini. Druge dvije kategorije, broj zdravih sekstanata i broj sekstanata s krvarenjem i /ili kamencem nije se značajno razlikovao između ispitanika s lošim spermogramom i kontrolne skupine. S druge strane istraživači su pokazali povezanost između loše oralne higijene i subnormalnog broja spermija. Moguća povezanost loše oralne higijene i parodontitisa je pokazana preko TNF-a za kojeg se pokazalo da je preko TNF povezanog liganda indukcije apoptoze (eng. *TNF-related apoptosis-inducing ligand*)

razlog varikocelom induciranom testikularnom disfunkcijom. Vjerojatnija povezanost higijene usne šupljine i kvalitete spermograma je u sličnosti oralne mikroflore i mikroorganizama u spermi (31). Loša oralna higijena i visoka koncentracija bakterija u usnoj šupljini mogu rezultirati bakterijemijom. Poznata je sposobnost određenih oralnih mikroorganizama poput *Fusobacterium nucleatum* da zajedno s MMP-8 “otvaraju put” drugim parodontnim patogenima u sistemsku cirkulaciju (148). To znači da faktor inhibicije spermija kojeg luči *E. coli* (149,150) ne bi imao efekta bez pomoći *F. nucleatum* i MMP-8. Studija Nwhatora i sur. pokazala je da korištenje CPTIN ima ograničenja koja se mogu savladati analizom pojedinih sekstanata. Upotreba MMP-8 PoC testa nadilazi i druge nedostatke CPTIN s osjetljivošću od 96% za lošu oralnu higijenu, s osjetljivošću od 95%- za kronični parodontitis i s osjetljivošću od 82.6% za BOP (146).

Iako dio objavljene literature upućuje na moguće lošije parodontno zdravlje neplodnih pacijenata, dokazi su ograničeni te su potrebna daljnja istraživanja. Također, u trenutku prijave ovog istraživanja, bio je dostupan mali broj rezultata primjene brzog aMMP-8 testa iz ispirka usne šupljine za postavljanje dijagnoze parodontitisa.



## **2. HIPOTEZE I CILJEVI ISTRAŽIVANJA**

### Svrha rada

Svrha rada je validacija ordinacijskog MMP-8 testa za dijagnosticiranje parodontne bolesti te utvrđivanje parodontnog statusa neplodnih pacijentica, u odnosu na plodne. Ranom dijagnozom parodontitisa pacijentice bi pravovremeno bile upućene na parodontološko liječenje i eliminaciju mogućeg čimbenika rizika za neuspjeh postupka medicinski potpomognute oplodnje.

### Cilj istraživanja

Cilj istraživanja je ispitati primjenu brzog MMP-8 testa za dijagnosticiranje parodontne bolesti iz ispirka usne šupljine kod žena koje se liječe zbog neplodnosti nepoznatog uzroka.

### Hipoteza

Hipoteza istraživanja je da će pacijentice koje se liječe od idiopatske neplodnosti imati veći broj pozitivnih testova u odnosu na plodne žene.

### **3. ISPITANICE I POSTUPCI**

### 3.1. Ispitanice

Istraživanje se provodilo u periodu od veljače 2018. do prosinca 2020. godine u Klinici za ženske bolesti i porodništvo, Zavodu za humanu reprodukciju i ginekološku endokrinologiju Kliničkog bolničkog centra Sestre milosrdnice, Zavodu za oralnu medicinu i Zavodu za parodontologiju Stomatološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i u medicinsko-biokemijskom laboratoriju u Poliklinici Aviva u Zagrebu. Istraživanje su odobrili Etički odbor Stomatološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (broj odobrenja: 05-PA-15-11/2017.) i Etičko povjerenstvo Kliničkog bolničkog centra "Sestre milosrdnice" u Zagrebu te je registrirano u američkom Nacionalnom institutu za zdravlje (clinicaltrials.gov) (identifikator istraživanja: NCT03542630). Svaki pacijent je potpisao informirani pristanak prema Helsinškoj deklaraciji. U istraživanju je sudjelovalo ukupno 100 žena. Ciljana skupina ispitanica uključivala je 50 žena u dobi između 25 i 45 godina, koje su zadovoljavale kriterije za neplodnost nepoznatog uzroka (idiopatska neplodnost) i koje su se liječile u Klinici za ženske bolesti i porodništvo, Zavodu za humanu reprodukciju i ginekološku endokrinologiju Kliničkog bolničkog centra Sestre milosrdnice. Kontrolnu skupinu predstavljale su žene iste dobne skupine koje su spontano zatrudnjele i liječile se na Zavodu za oralnu medicinu i Zavodu za parodontologiju Stomatološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, ovisno o parodontološkom statusu. Ispitanice iz ciljane i kontrolne skupine koje su zadovoljile uključujuće kriterije, a nisu imali niti jedan od isključujućih kriterija, uključene su u istraživanje nakon pojašnjenja dizajna studije, potpisanog informiranog pristanka, kliničkog parodontološkog pregleda i izvođenja MMP8 testa iz sline.

Istraživanje je bilo presječnog tipa i uključilo je uzimanje anamneze (ginekološke i dentalne, stomatološke), standardni parodontološki pregled specijalista parodontologa i izvođenje aMMP-8 brzog testa iz sline svim sudionicama.

### 3.2. Uključni i isključni kriteriji

Uključni kriteriji za ciljanu skupinu ispitanica s idiopatskom neplodnošću:

- dob između 25 i 45 godina
- nezaštićeni odnosi dulje od godinu dana bez postizanja trudnoće
- uredni ovulacijski ciklusi
- uredna prohodnost jajovoda
- uredan nalaz spermiograma
- vrijednost Anti-Möllerovog hormona (AMH) između 15 i 48 pmol/l

Isključni kriteriji za ciljanu skupinu ispitanica s idiopatskim sterilitetom:

- postojanje poznatih razloga neplodnosti (anovulacija, neprohodnost jajovoda, muški faktor)
- prisutnost metaboličkih, autoimunih bolesti i šećerne bolesti
- uzimanje kontraceptiva, antibiotika i sistemska ili lokalna protuupalna terapija (kortikosteroidi, nesteroidni antireumatici, kemoterapeutici) zadnjih 6 mjeseci prije uključivanja u studiju zbog mogućeg utjecaja na stanje parodonta.

Uključni kriteriji za kontrolnu skupinu ispitanica:

- dob između 25 i 45 godina
- uredna spontana trudnoća i porod u anamnezi

Isključni kriteriji za kontrolnu skupinu:

- dob ispod 25 i iznad 45 godina
- prisutnost metaboličkih, autoimunih bolesti i šećerne bolesti
- uzimanje kontraceptiva, antibiotika i sistemska ili lokalna protuupalna terapija (kortikosteroidi, nesteroidni antireumatici, kemoterapeutici) zadnjih 6 mjeseci prije uključivanja u studiju zbog mogućeg utjecaja na stanje parodonta.

### 3.3. Postupci s ispitanicama

Svim sudionicama istraživanja MMP-8 se određivala iz sline, pomoću brzog MMP-8 testa (PerioSafe). Koristeći metodu imunokromatografije, MMP-8 test na brz i jednostavan način identificira pacijente sa ranim znakovima parodontitisa. Osim u dijagnostici koristi se i u praćenju rezultata liječenja parodontne bolesti. Radi se o kvalitativnom testu čija je granična vrijednost za pozitivan nalaz 25ng MMP8/ml. Osjetljivost testa iznosi 76.5%, a specifičnost 96.7% prilikom prisutnosti upale parodonta i parodontnih džepova, tj. kliničke dubine sondiranja više od 4 mm, na više od dva mjesta sondiranja (136). Uzorak testa se dobiva jednostavnim metodom ispljuvka u za to predviđenu kasetu prema preporukama proizvođača. Nakon ispiranja usne šupljine, posebnom tekućinom kroz 30 sekundi, iz čašice sa ispljuvkom kapaljkom se uzme 3 do 4 kapi ispljuvka i nanese u za to predviđeni otvor na testnoj pločici. Rezultat testa se očitava nakon 5 minuta i može biti negativan ili pozitivan. Jedna linija na testu znači da je test ispravno izveden i da je negativan. Dvije linije govore za pozitivan nalaz i označavaju povećani rizik za parodontitis u ispitanice. Prema uputama proizvođača, test se smatrao pozitivnim i u slučajevima kad je druga linija bila manjeg inteziteta od kontrolne.

Sve sudionice istraživanja obavile se specijalistički parodontološki pregled kako bi se standardnim kliničkim pregledom utvrdilo postoje li znakovi parodontne bolesti. Parodontološki pregled obavila su dva međusobno kalibrirana parodontologa koristeći pri tom stomatološko ogledalo i standardnu parodontnu sondu (UNC-15, Hu-Friedy Chicago, IL, USA). Svako ispitanici određivan je plak indeks (engl. plaque index, PI) (151) i indeks krvarenja (engl. bleeding on probing, BOP) sa šest mjesta oko svakog zuba (meziobukalno, srednje bukalno, distobukalno, meziolingvalno, srednje lingvalno i distolingvalno), isključujući treće kutnjake (152). PD i CAL ispitivala se na šest mjesta oko svakog zuba (meziobukalno, srednje bukalno, distobukalno, meziolingvalno, srednje lingvalno i distolingvalno), isključujući treće kutnjake. Nakon toga određen je stupanj tj. stadij parodontitisa prema posljednjoj klasifikaciji parodontitisa iz 2017. godine (153). Stadij parodontitisa definiran je težinom prema razini interdentalnog CAL-a, radiološkom gubitku

kosti i gubitku zuba. Nova klasifikacija razlikuje četiri stadija parodontitisa, stadij I (inicijalni parodontitis kod kojeg je interdentalni gubitak kliničkog pričvrstka na mjestu najvećeg gubitka 1-2 mm), stadij II (umjereni parodontitis kod kojeg je interdentalni gubitak kliničkog pričvrstka na mjestu najvećeg gubitka 3-4 mm), stadij III (uznapredovali parodontitis s vjerojatnošću dodatnog gubitka zuba; interdentalni gubitak kliničkog pričvrstka na mjestu najvećeg gubitka jest  $\geq 5$  mm te postoji gubitak  $\leq$  četiri zuba uslijed parodontitisa) i stadij IV (uznapredovali parodontitis s vjerojatnošću gubitka denticije; interdentalni gubitak kliničkog pričvrstka na mjestu najvećeg gubitka jest  $\geq 5$  mm te postoji gubitak  $\geq 5$  zuba uslijed parodontitisa). Prisutnost plaka na razini cijelih usta (engl. full mouth plaque score, FMPS) i krvarenje na razini cijelih usta (engl. full mouth bleeding score, FMBS) izračunati su kao postotak, dijeljenjem zbroja ukupno pozitivnih mjesta s ukupnim brojem mjesta na kojima se mjerilo. Klinički parametri uspoređeni su za sve pacijentice s pozitivnim i negativnim rezultatom MMP-8 testa kako bi se napravila validacija testa.

### **3.4. Statistička analiza**

Podatci su prikupljeni u MS Excel tablicama, a statistička analiza rađena je u Medcalc (v11.4) programu. Podatci su sumirano prikazani sa srednjom vrijednošću (+- standardna devijacija SD) ili medijanom i interkvartilnim rasponom (IQR) ovisno o normalnosti distribucije. Normalnost distribucije prikupljenih podataka određena je Kolmogorov-Smirnovljevim testom s ili bez logaritamske transformacije podataka. Kontinuirane varijable normalne distribucije uspoređivane su između dvije grupe t-testom. Kontinuirani podatci nenormalne distribucije uspoređivani su Mann-Whitneyevim testom među dvije grupe. Kategoričke varijable su uspoređivane Chi-square ili Fischers testom, a vrijednosti sumirane brojem i postotkom. Korelacije među varijablama ispitivane su Spearmanovim testom.

#### **4. REZULTATI**



Karakteristike neplodnih i plodnih pacijentica na temelju parodontnog nalaza prikazane su u Tablici 1.

Tablica 1. Karakteristike neplodnih i plodnih pacijentica na temelju parodontnog nalaza.

	Neplodne (N=50) Srednja vrijednost ±SD/medijan(IQR)	Plodne (N=50) Srednja vrijednost ±SD /medijan (IQR)	P-vrijednost
Dob	36,1 ± 3,7	37 ± 2,9	*ns
Broj zubi	27 (26-28)	27 (25-28)	*ns
FMBS	38,9 ± 19,7	37,9 ± 19,2	*ns
FMPS	41,6 ± 21,5	36 ± 19	*ns
PISA	645,0 ± 368,0	700,9 ± 420,3	*ns
PESA	1473,9 ± 304,5	1575,7 ± 269,9	*ns
MMP8	28 (56%)	30 (60%)	*ns
Parodontna dijagnoza			*ns
Bez parodontitisa	25 (50%)	25 (50%)	
S1 stupanj parodontitisa	7 (14%)	0 (0%)	
S2 stupanj parodontitisa	10 (20%)	10 (20%)	
S3 stupanj parodontitisa	8 (16%)	15 (30%)	
Broj džepova ≥4 mm	16 (3-29)	22 (6-38)	*ns
Broj džepova ≥6 mm	0 (0-1)	0 (0-6)	*ns

\*ns- non-significant; nije značajno

U skupini neplodnih pacijentica ukupno je bilo 28 pozitivnih testova, dok je u skupini plodnih pacijentica ukupno bilo 30 pozitivnih testova čime je odbačena hipoteza našeg istraživanja da će neplodne pacijentice imati veći broj pozitivnih testova u odnosu na plodne pacijentice.

Neplodne pacijentice s parodontitisom imale su nešto bolji parodontološki status nego plodne pacijentice s parodontitisom, odnosno imale su manje uznapredovali parodontitis nego kontrolna skupina. Imale su manju površinu parodontne upale (eng. periodontal inflamed

surface area, PISA) i manji broj džepova dubljih od 4 i od 6 mm, iako razlika nije bila statistički značajna.

Ishodi aMMP-8 testa uspoređeni su s različitim kliničkim parametrima i dijagnozama. Osjetljivost i specifičnost testa za detekciju parodontitisa u skupini neplodnih pacijentica iznosila je 84% i 72%, u skupini plodnih pacijentica 88% i 68% te 86% i 70% u ukupnoj populaciji pacijentica (Tablica 2).

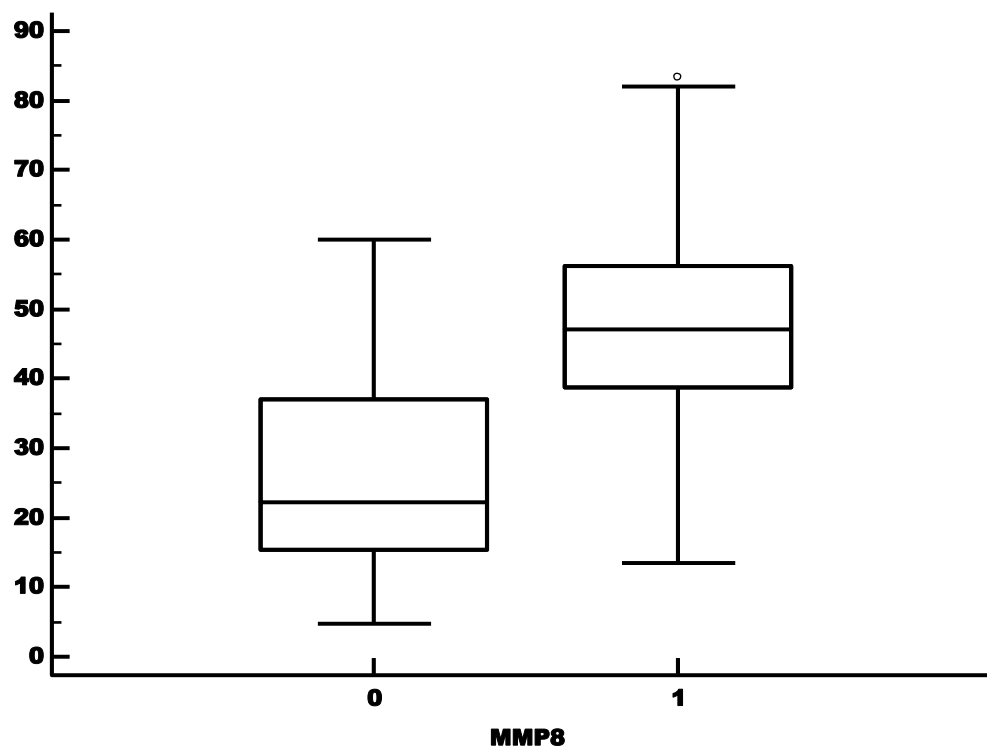
Tablica 2. Osjetljivost i specifičnost MMP-8 testa u skupini neplodnih i plodnih pacijentica u odnosu na prisutnost parodontnih džepova  $\geq 4$ mm,  $\geq 6$ mm, indeksa krvarenja na razini cijelih usta  $\geq 15\%$ , parodontne bolesti (gingivitisa ili parodontitisa) i parodontitisa.

Parodontni nalaz		Neplodne (N=50)	Plodne (N=50)	Ukupno (N=100)
Parodontni džep $\geq 4$ mm	Osjetljivost	65	61,4	63,3
	Specifičnost	100	83,3	90
Parodontni džep $\geq 6$ mm	Osjetljivost	85,5	85	85,3
	Specifičnost	55,6	56,7	56
FMBS $\geq 15\%$	Osjetljivost	62,2	65,1	53,6
	Specifičnost	100	71,4	83,3
Parodontna bolest	Osjetljivost	74,3	87,1	80,3
	Specifičnost	86,7	84,2	85,3
Parodontitis	Osjetljivost	84%	88%	86%
	Specifičnost	72%	68%	70%

Pozitivan brzi MMP-8 značajno je korelirao s iznosom krvarenja na razini cijelih usta (eng. full-mouth bleeding score, FMBS), iznosom plaka na razini cijelih usta (eng. full-mouth plaque score, FMPS), površinom parodontne upale (eng. periodontal inflamed surface area, PISA) te prisutnošću džepova jednakih ili dubljih od 4 i od 6 mm (Tablica 3). Korelacija je bila najsnažnija s iznosom krvarenja na razini cijelih usta te površinom parodontne upale, a nešto niža s prisutnošću džepova jednakih ili dubljih od 4 mm, iznosom plaka na razini cijelih usta te prisutnošću džepova jednakih ili dubljih od 6 mm.

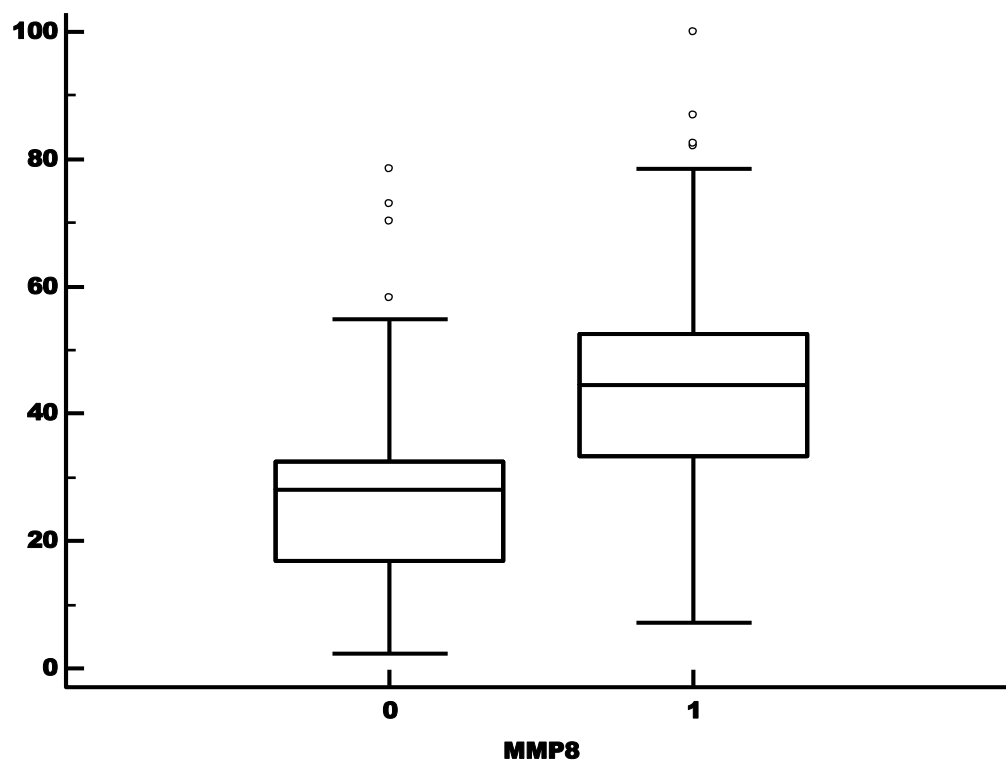
Tablica 3. Korelacija MMP-8 s kliničkim parodontnim parametrima.

		<b>FMBS</b>	<b>FMPS</b>	<b>PISA</b>	<b>Džepovi ≥4mm</b>	<b>Džepovi ≥6mm</b>
<b>MMP-8</b>	<b>Spearmanov koeficijent korelacije</b>	0,605	0,494	0,578	0,513	0,389
	<b>Razina značajnosti P</b>	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0001
	<b>N</b>	100	100	100	100	100



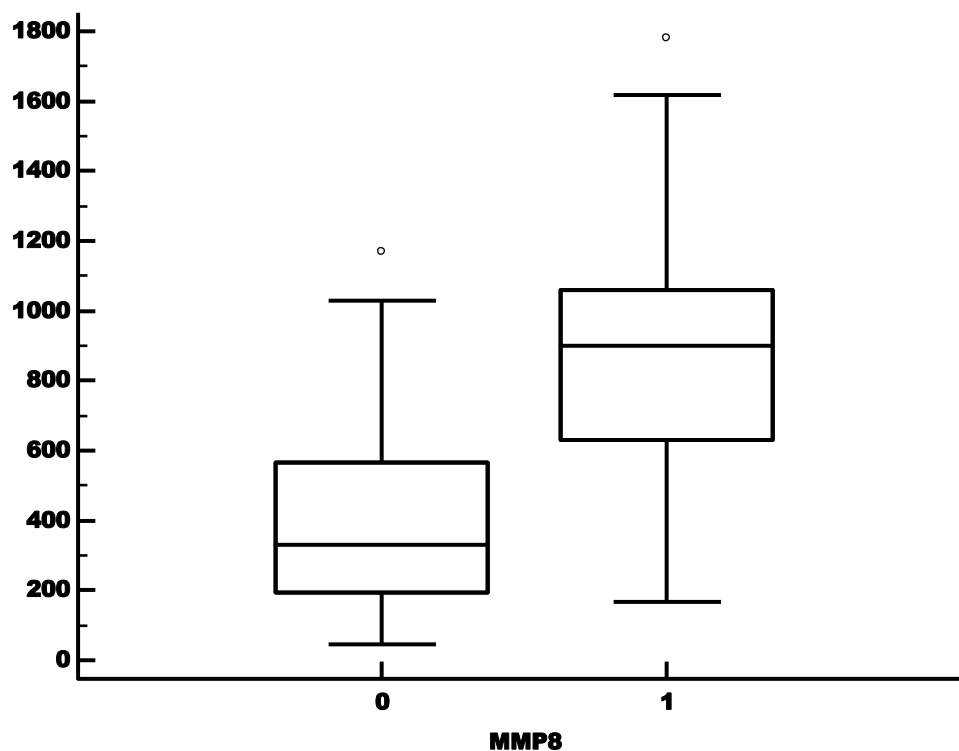
Slika 1. Grafički prikaz odnosa MMP8 testa i iznosa krvarenja na razini cijelih usta (FMBS) ( $p < 0,0001$ , t-test).

Na y-osi prikazan je iznos krvarenja na razini cijelih usta, FMBS, u postotku, a na x-osi nalaz MMP-8 testa (0-negativan, 1-pozitivan). Područje unutar kutije prikazuje interkvartilni raspon vrijednosti FMBS pacijentica s pozitivnim nalazom testa. Linija unutar kutije označava medijan. Brkovi grafa i pojedine oznake označavaju mjerenja izvan interkvartilnog raspona. Osobe pozitivne na MMP8 testu imale su značajno viši iznos krvarenja na razini cijelih usta (FMBS, t-test,  $p < 0,0001$ ), a Spearmanov koeficijent korelacije bio je 0,605 ( $p < 0,0001$ ).



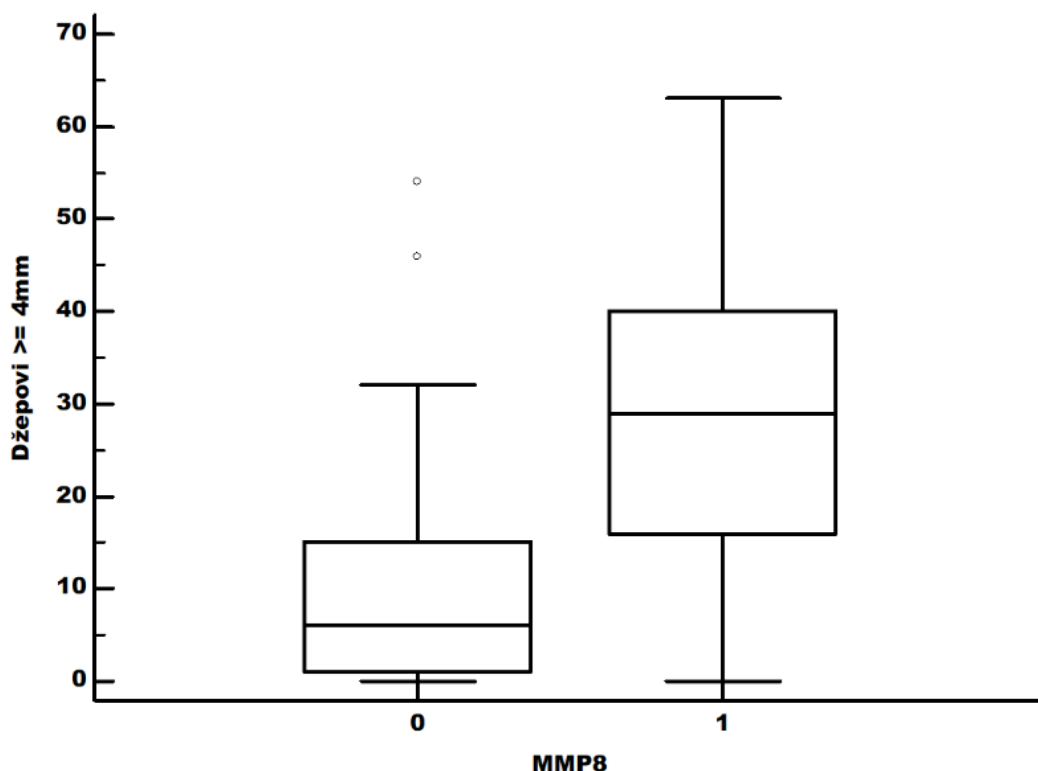
Slika 2. Grafički prikaz odnosa MMP8 testa i iznosa plaka na razini cijelih usta (FMPS) ( $p < 0,0001$ , t-test).

Na y-osi prikazan je iznos plaka na razini cijelih usta, FMPS, u postotku, a na x-osi nalaz MMP-8 testa (0-negativan, 1-pozitivan). Područje unutar kutije prikazuje interkvartilni raspon vrijednosti FMPS pacijentica s pozitivnim nalazom testa. Linija unutar kutije označava medijan. Brkovi grafa i pojedine oznake označavaju mjerenja izvan interkvartilnog raspona. Osobe pozitivne na MMP8 testu imale su značajno viši iznos plakana razini cijelih usta (FMPS, t-test,  $p < 0,0001$ ), a Spearmanov koeficijent korelacije bio je 0,494 ( $p < 0,0001$ ).



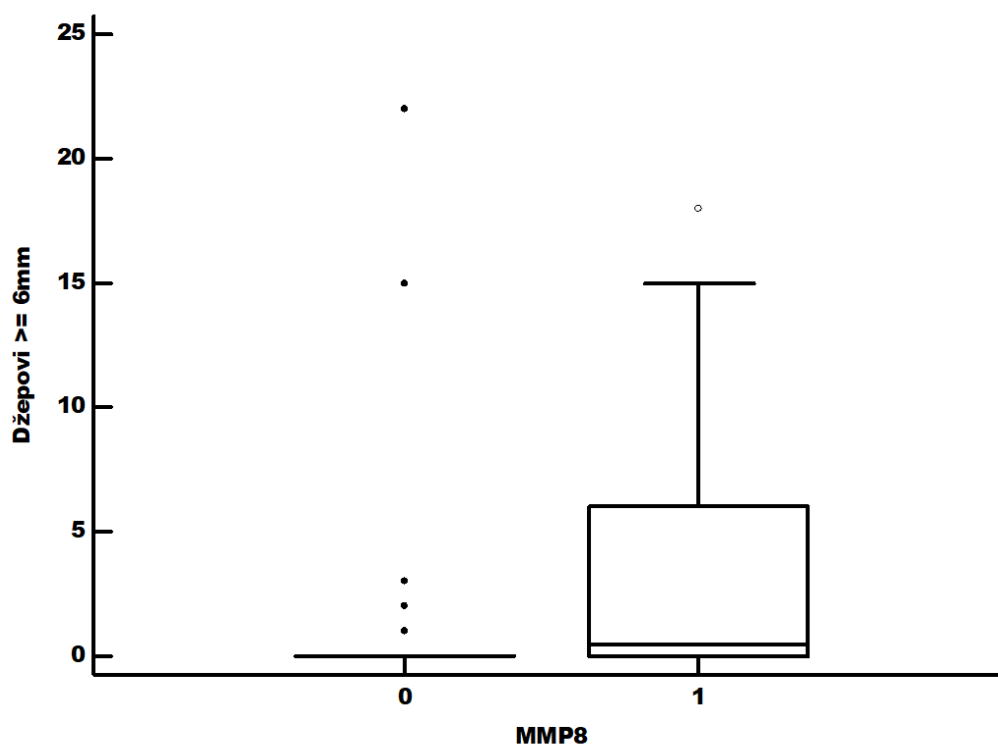
Slika 3. Grafički prikaz odnosa MMP-8 testa i površine parodontne upale (PISA) ( $p < 0,0001$ , t-test).

Na y-osi prikazana je ukupna površina parodontne upale (PISA), u mm<sup>2</sup>, a na x-osi nalaz MMP-8 testa (0-negativan, 1-pozitivan). Područje unutar kutije prikazuje interkvartilni raspon vrijednosti PISA-e kod pacijentica s pozitivnim nalazom testa. Linija unutar kutije označava medijan. Brkovi grafa i pojedine oznake označavaju mjerenja izvan interkvartilnog raspona. Osobe pozitivne na MMP8 testu imale su značajno veću površinu parodontne upale (PISA, t-test,  $p < 0,0001$ ), a Spearmanov koeficijent korelacije bio je 0,578 ( $p < 0,0001$ ).



Slika 4. Grafički prikaz odnosa MMP-8 testa i prisutnosti džepova jednakih ili dubljih od 4 mm ( $p < 0,0001$ , Mann-Whitney test).

Na y-osi prikazan je postotak džepova  $\geq 4$ mm, a na x-osi nalaz MMP-8 testa (0-negativan, 1-pozitivan). Područje unutar kutije prikazuje interkvartilni raspon broja džepova  $\geq 4$ mm kod pacijentica s pozitivnim nalazom testa. Linija unutar kutije označava medijan. Brkovi grafa i pojedine oznake označavaju mjerenja izvan interkvartilnog raspona. Osobe pozitivne na MMP8 testu imale su značajno veći broj džepova  $\geq 4$ mm, Mann-Whitneyev test,  $p < 0,0001$ ), a Spearmanov koeficijent korelacije bio je 0,513 ( $p < 0,0001$ ).



Slika 5. Grafički prikaz odnosa MMP-8 testa i prisutnosti džepova jednakih ili dubljih od 6 mm ( $p=0,0001$ , Mann-Whitney test).

Na y-osi prikazan je postotak džepova  $\geq 6$ mm, a na x-osi nalaz MMP-8 testa (0-negativan, 1-pozitivan). Područje unutar kutije prikazuje interkvartilni raspon interkvartilni raspon broja džepova  $\geq 6$ mm kod pacijentica s pozitivnim nalazom testa. Linija unutar kutije označava medijan. Brkovi grafa i pojedine oznake označavaju mjerenja izvan interkvartilnog raspona. Osobe pozitivne na MMP8 testu imale su značajno veći broj džepova  $\geq 6$ mm, Mann-Whitneyev test,  $p<0,0001$ ), a Spearmanov koeficijent korelacije bio je 0,389 ( $p<0,0001$ ).

Zanimalo nas je i kakva je osjetljivost i specifičnost testa ovisno o stupnju parodontitisa te pozitivna i negativna prediktivna vrijednost testa. Pozitivna prediktivna vrijednost označava vjerojatnost da je testirana pacijentica bolesna ukoliko joj je nalaz pozitivan, a negativna



prediktivna vrijednost označava vjerojatnost da je testirana pacijentica zdrava pod uvjetom da je negativna. Rezultati su prikazani u tablicama 4-7.

Tablica 4. Dijagnostička pouzdanost testa na ukupnom uzorku pacijentica (N=100).

<b>Dijagnoza</b>	<b>Pozitivan brzi MMP8 test</b>	<b>Negativan brzi MMP8 test</b>	<b>Ukupno</b>
<b>Parodontitis (N=50)</b>	43	7	50
<b>Bez parodontitisa (N=50)</b>	15	35	50
		95% interval pouzdanosti (engl.confidence interval, CI)	
<b>Osjetljivost testa</b>	86,00%	73,26% - 94,18	
<b>Specifičnost testa</b>	70,00%	55,39% - 82,14%	
<b>Pozitivna prediktivna vrijednost</b>	74,14%	60,96% - 84,74%	
<b>Negativna prediktivna vrijednost</b>	83,33%	68,64% - 93,03%	

Tablica 5. Osjetljivost i specifičnost MMP-8 testa u razlikovanju osoba bez parodontitisa i blagog parodontitisa.

<b>Dijagnoza</b>	<b>Pozitivan brzi MMP8 test</b>	<b>Negativan brzi MMP8 test</b>	<b>Ukupno</b>
<b>S1 stupanj parodontitisa</b>	7	0	7
<b>Bez parodontitisa (N=50)</b>	15	35	50
		95% interval pouzdanosti (engl.confidence interval, CI)	
<b>Osjetljivost testa</b>	100,00%	59,04% - 100,00	
<b>Specifičnost testa</b>	70,00%	55,39% - 82,14%	
<b>Pozitivna prediktivna vrijednost</b>	31,82%	13,86% - 54,87%	
<b>Negativna prediktivna vrijednost</b>	100,00%	90,00% - 100,00%	

Tablica 6. Osjetljivost i specifičnost MMP-8 testa u razlikovanju osoba bez parodontitisa i s umjerenim parodontitisom.

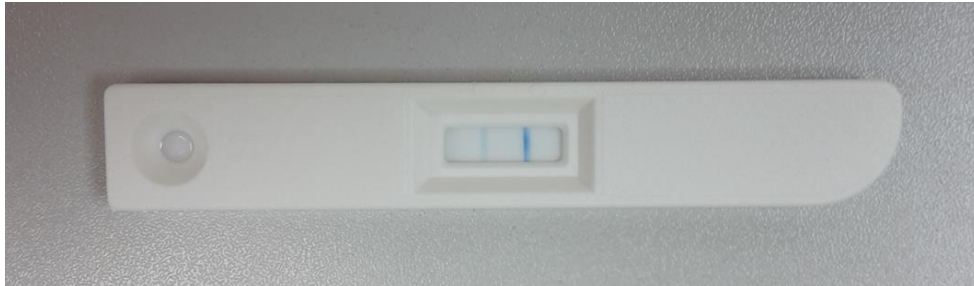
<b>Dijagnoza</b>	<b>Pozitivan brzi MMP8 test</b>	<b>Negativan brzi MMP8 test</b>	<b>Ukupno</b>
<b>S2 stupanj parodontitisa</b>	15	5	20
<b>Bez parodontitisa (N=50)</b>	15	35	50
		95% interval pouzdanosti (engl.confidence interval, CI)	
<b>Osjetljivost testa</b>	75,00%	50,90% - 91,34%	
<b>Specifičnost testa</b>	70,00%	55,39% - 82,14%	
<b>Pozitivna prediktivna vrijednost</b>	50,00 %	31,30% - 68,70%	
<b>Negativna prediktivna vrijednost</b>	87,50 %	73,20% - 95,81%	

Tablica 7. Osjetljivost i specifičnost MMP-8 testa u razlikovanju osoba bez parodontitisa i s uznapredovalim parodontitisom.

Dijagnoza	Pozitivan brzi MMP8 test	Negativan brzi MMP8 test	Ukupno
S3 stupanj parodontitisa	21	2	23
Bez parodontitisa (N=50)	15	35	50
		95% interval pouzdanosti (engl.confidence interval, CI)	
Osjetljivost testa	91,30%	71,96% - 98,93%	
Specifičnost testa	70,00%	55,39% - 82,14%	
Pozitivna prediktivna vrijednost	58,33%	40,76% - 74,49%	
Negativna prediktivna vrijednost	94,59%	81,81% - 99,34%	

Prilikom procjene osoba bez parodontitisa i s umjerenim stupnjem parodontitisa, osjetljivost testa pokazala se najnižom (75% u usporedbi s 91,30% za uznapredovali parodontitis te 100% za početni parodontitis), vjerojatno zbog premalog broja ispitanica koje su imale ovaj stadij parodontitisa.

Slika 6. Primjer pozitivnog MMP-8 testa.



Slika 7. Primjer negativnog MMP-8 testa.



## **5. RASPRAVA**

Povezanost općeg i oralnog zdravlja je neosporna. Parodontitis, kao kronična upalna bolest potpornih tkiva zuba, u literaturi se povezuje s kardiovaskularnim bolestima, dijabetesom tipa 2, respiratornim bolestima, bolestima bubrega, Alzheimerovom bolešću te lošijim ishodom trudnoće (38). Pokazalo se da majke s parodontitisom rađaju djecu niže porođajne težine, u ranijem terminu te imaju povećani rizik od preeklampsije (28-30). Objavljeni su i rezultati koji povezuju parodontitis s kasnijim začećem te problemima s muškom i ženskom plodnošću (32, 33, 38). Pojedini autori pokazali su lošiji parodontni status kod neplodnih pacijentica te posumnjali da je to čimbenik koji otežava začeće (36, 38, 39). Za razliku od njih, Khalife i sur., u istraživanju koje je uključilo 34 žene koje su bile na IVF oplodnji pokazali su da parodontni status nije utjecao na ishod trudnoće (154). Za postavljanje dijagnoze parodontitisa, procjenu ishoda liječenja i praćenje pacijenata primjenjuju se različiti dijagnostički postupci i klinički parodontološki parametri što otežava mogućnost brzog probira pacijenata. Od 2018.g. u primjeni je nova klasifikacija parodontitisa koju smo i mi koristili (153). Radovi objavljeni nakon toga predložili su brzi test za aktivni oblik MMP-8 iz ispirka usne šupljine kao ključni marker za ranu dijagnozu i praćenje aktivnosti bolesti koja je sukladna novoj klasifikaciji (155,156). Na tržištu su dostupni različiti komercijalni testovi od kojih neki detektiraju ukupnu količinu MMP-8 koja ne može detektirati progresiju parodontitisa kao što to može aktivni oblik MMP-8 (155).

Podatci iz literature o značaju brzog MMP-8 testa u dijagnostici parodontitisa navode da je brzi MMP-8 test pomoću štapića u dobroj korelaciji sa kvantitativnom metodom imunofluorescencije te da ima osjetljivost od 83% i specifičnost od 96% (139). Ova vrsta brzog testa detektira MMP-8 u gingivalnoj sulkusnoj tekućini, za razliku od brzog aMMP-8 testa koji koristi ispirak usne šupljine kao supstrat i kojeg smo mi koristili u našem istraživanju. Rezultati Heikkinena i suradnika (136), koji su također koristili brzi test za MMP-8 iz ispirka, pokazali su nešto nižu osjetljivost testa, 76.5% kod prisutnih više od dva mjesta sa dubokim parodontalnim džepovima dok je specifičnost bila 96.7 %, što se podudara s rezultatima Mantyla i sur. koji su primjenjivali brzi test pomoću štapića (139). Malobrojni su objavljeni rezultati primjene brzog testa za detekciju aMMP8 iz ispirka usne šupljine s

kojima možemo usporediti naše rezultate jer su ga autori koristili u različite svrhe (131,136, 138, 157-162).

Noack i suradnici određivali su razinu MMP-8 u cirkulaciji i u slini te radili parodontološki pregled kod 19 parodontno zdravih pacijenata, 20 osoba s gingivitisom te 20 osoba s parodontitisom (158). Zaključili su da razine MMP-8 u serumu značajno koreliraju s razinama MMP-8 u slini te da je razina oralnog MMP-8 značajno veća kod pacijenata s parodontitisom u usporedbi s pacijentima s gingivitisom i parodontno zdravim pacijentima. Razina MMP-8 u serumu može biti značajno povišena kod pacijenata s parodontitisom, ali i kod različitih drugih upalnih bolesti, kao što je kronična opstruktivna bolest pluća, te kod ateroskleroze, metaboličkog sindroma, moždanog udara, infarkta miokarda, angine pectoris, pušenja, a čak i kod povišenog indeksa tjelesne mase (163-170). Sva ova stanja (potencijalno) se povezuju i s parodontitisom. MMP-8 se otpušta u cirkulaciju iz endotelnih stanica, glatkih mišićnih stanica ili fagocita te iz neutrofila na mjestima bakterijske infekcije te aktivira proupalnu kaskadu. Stoga rezultati njihovog istraživanja podupiru stav da parodontitis, kao i druge infekcije, može izazvati porast upalnih serumskih markera (158).

Ipak, test ima i određena ograničenja. Nwhator i sur., u istraživanju koje je uključilo 76 pacijenata, pokazali su direktnu povezanost pozitivnog testa i loše oralne higijene, krvarenja nakon sondiranja i parodontitisa (157). Osjetljivost testa od 95% koju su naveli u radu odnosi se samo na pojedince s lošom oralnom higijenom, dok u slučaju umjereno dobre oralne higijene osjetljivost testa iznosi 60,5%, a u slučaju dobre oralne higijene 38,5%. Također, osjetljivost testa da detektira parodontitis iznosila je 95% u slučaju prisutnih minimalno dva parodontna džepa, 59,6% u slučaju prisutnog jednog parodontnog džepa te 86,5% u slučaju krvarenja nakon sondiranja na barem dva mjesta. Zaključili su da osjetljivost testa opada prilikom detekcije parodontitisa, ozbiljnosti parodontitisa i progresije parodontitisa jer test detektira već niske koncentracije aktivne MMP-8. Prema autorima, prednost testa je i u tome što detektira pojedince s povećanim rizikom za razvoj parodontitisa, čak i u slučaju kada nema kliničkih znakova bolesti. Moguće objašnjenje za to leži u karakteru parodontitisa koji ima aktivne faze i faze mirovanja, a pacijenti su pregledani dok još nije došlo do destrukcije potpornih tkiva (171).



Naši rezultati su u skladu s dijelom rezultata Nwhatora i sur. (157). Naša studija je pokazala također značajnu korelaciju brzog testa za MMP-8 s iznosom krvarenja na razini cijelih usta (eng. FMBS, *full-mouth bleeding score*), iznosom plaka na razini cijelih usta (eng. FMPS, *full-mouth plaque score*), površinom parodontne upale (eng. PISA, *periodontal inflamed surface area*) te prisutnošću džepova jednakih ili dubljih od 4 i od 6 mm (Tablica 3).

Korelacija je bila naj snažnija s iznosom krvarenja na razini cijelih usta (FMBS) te površinom parodontne upale (PISA), a nešto niža s prisutnošću džepova jednakih ili dubljih od 4 mm, iznosom plaka na razini cijelih usta (FMPS) te prisutnošću džepova jednakih ili dubljih od 6 mm (Tablica 3).

Što se tiče osjetljivosti testa u odnosu na stupanj parodontitisa, očekivano bi bilo da osjetljivost testa raste s porastom stupnja parodontitisa, no dio naših rezultata odstupa od te pretpostavke. Naime, naši rezultati su pokazali osjetljivost testa od 100 % za detekciju blagog stupnja parodontitisa, od 75% za detekciju umjerenog stupnja parodontitisa i od 91,30% prilikom detekcije teškog stupnja parodontitisa. Razlog za ove rezultate vjerojatno leži u malom broju pacijenata s blagim stupnjem parodontitisa (sedam).

Heikkinen i sur. u svom drugom istraživanju procjenjivali su osjetljivost i specifičnost testa prilikom detekcije oralnog upalnog odgovora, parodontitisa i karijesa (136). Ranije istraživanje navelo je da karijesne lezije mogu dovesti do porasta salivarnog MMP8 (172). Rezultati Heikkinena i sur. pokazali su da osjetljivost testa ovisi o intenzitetu/opsegu bolesti te da iznosi 76,5% u slučaju više od dva prisutna mjesta s dubinom džepa od 4 ili više mm, a ista osjetljivost navedena je i za detekciju jedne ili više karijesnih lezija. Specifičnost testa u ovom istraživanju, za obje dijagnoze (parodontitis i karijes), iznosila je 96,7%. Öztürk i sur. u svom istraživanju željeli su ispitati potencijal brzog MMP-8 testa za probir pacijenata i prevenciju parodontne bolesti te su uključili 80 pacijenata s različitim parodontnim statusom. Dobivena osjetljivost testa bila je 83,9%, a specifičnost 79,2% (161).

U usporedbi s ovim autorima, naši rezultati prilikom detekcije parodontitisa na ukupnoj populaciji pacijentica pokazali su nešto višu osjetljivost testa koja je iznosila 86% te nižu specifičnost od 70%. Rezultati našeg istraživanja podudaraju se s objavljenim rezultatima

Izadi-Borujeni i sur., koji su u istraživanju na 60 pacijenata pokazali osjetljivost testa od 87% te specifičnost testa od 60% prilikom detekcije kroničnog parodontitisa (159). Isti autori izračunali su i osjetljivost i specifičnost testa u odnosu na opseg parodontitisa pa je u slučaju generaliziranog umjerenog parodontitisa osjetljivost iznosila 80%, a specifičnost 60%, dok je u slučaju generaliziranog uznapredovalog parodontitisa osjetljivost testa iznosila 93%, uz istu specifičnost. Ovo je sukladno našim rezultatima koji su pokazali osjetljivost testa od 91,3% i specifičnost od 70% prilikom detekcije teškog stupnja parodontitisa.

Rad Leppilathi i sur., objavljen 2018.g., procjenjivao je pouzdanost brzog aMMP8 testa za postavljanje dijagnoze parodontitisa kod majki nakon poroda. U istraživanje je uključena ukupno 461 žena koje su testirane unutar 48h od poroda te im je učinjena panoramska slika zubi kako bi se procijenio gubitak alveolarne kosti. Na temelju toga izračunata je osjetljivost testa od 80%, specifičnost testa od 48%, pozitivna prediktivna vrijednost od 34% (31-37%) i negativna prediktivna vrijednost od 88% (83-91%). Zaključili su da test slabo korelira s nalazom panoramske slike zuba (160).

Za razliku od njih, Deng i sur. dobili su puno nižu vrijednost osjetljivosti i višu specifičnost testa prilikom detekcije parodontitisa. Njihov test pokazao je osjetljivost od 33,2% i specifičnost od 93,0% prilikom detekcije parodontitisa. Nakon prilagodbe razine MMP-8 (radili su i kvantifikaciju) s obzirom na broj zubi u ustima, osjetljivost je porasla, a specifičnost se snizila te je osjetljivost iznosila 67,1%, a specifičnost 68,8%. Pouzdanost testa rasla je sa stupnjem parodontitisa. Zaključili su da je prilikom izvođenja testa važno uzeti u obzir i broj zubi u ustima jer se kod manjeg broja zubi smanjuje i koncentracija MMP-8 te testu opada pouzdanost. Također, test zbog toga može biti manje pouzdan kod uznapredovalog parodontitisa jer je došlo do gubitka većeg broja zubi (162). U našem istraživanju uključili smo pacijentice s minimalno 20 zuba u čeljustima.

Zanimljivo je da je nedavni rad Sorse i sur. pokazao da nema statistički značajne razlike u razini aMMP-8 između parodontno zdravih i I. stupnja parodontitisa te da je razina aMMP-8 povišena kod umjerenog i uznapredovalog parodontitisa (155).

Rad Grigoriadis A. i sur. objavljen 2019. pokazao je značajnu povezanost brzog testa na MMP-8 i predijabetesa, definiranog kao razina HbA1c viša ili jednaka 5,7% te zaključio da bi oralni test mogao služiti kao brzi probir pacijenata s predijabetesom (173).

Rautava i sur. pokazali su nižu osjetljivost i specifičnost testa kod pacijenata s dijagnozom Crohnove bolesti, u usporedbi s kontrolnom skupinom (skupina s Crohnovom bolesti osjetljivost 60%, specifičnost 75%; kontrolna skupina osjetljivost 90%, specifičnost 80%). Zaključili su da dijagnostička pouzdanost testa može biti kompromitirana kod osoba s dodatnim upalnim stanjima, zbog sličnih mehanizama u podlozi razvoja bolesti. Ovo je i jedini članak koji je objavljen, a koji je uspoređivao dijagnostičku pouzdanost testa kod pacijenata s prisutnim drugim upalnim stanjem i/ili narušenim imunološkim odgovorom (174).

Hipoteza našeg istraživanja bila je da ćemo kod pacijentica s idiopatskom neplodnošću imati veći broj pozitivnih testova što će biti posljedica a) lošijeg parodontnog stanja i/ili b) pojačanog upalnog odgovora u organizmu. Na temelju naših rezultata moramo odbaciti tu hipotezu jer su rezultati pokazali da su pacijentice s idiopatskom neplodnošću imale blaži stupanj parodontitisa nego kontrolna skupina te time možemo objasniti manji broj pozitivnih testova. Ovo je proturječno objavljenim istraživanjima koja su pokazala lošiji parodontni status kod pacijentica s idiopatskom neplodnošću (36, 38-40). Moguće objašnjenje naših rezultata moglo bi biti da su neplodne žene uključene u naše istraživanje svjesnije svog oralnog zdravlja ili da imaju različitu ekonomsku ili obrazovnu pozadinu što bi također moglo utjecati na njihovo oralno zdravlje i nije uzeto u obzir prilikom provođenja istraživanja. Također, ograničenje našeg istraživanja je što prilikom uključivanja u istraživanje pacijentica kontrolne skupine nismo imali unaprijed definirani rok kada je ostvarena trudnoća te je moguće da je parodontni status pacijentica prilikom pregleda bio drugačiji od statusa u vrijeme ostvarivanja trudnoće.

## **6. ZAKLJUČAK**

Na temelju rezultata ovog istraživanja može se zaključiti sljedeće:

1. Neplodne pacijentice imale su bolji parodontni status u usporedbi s kontrolnom skupinom.
2. Rezultati ne upućuju na to da bi parodontitis mogao biti povezan s idiopatskom neplodnošću.
3. Test može razmjerno dobro identificirati pacijente s parodontitisom, ali je upitno kolika je korist od tog testiranja u obradi i liječenju idiopatske neplodnosti.
4. Osjetljivost i specifičnost testa bila je različita kod neplodnih i plodnih pacijentica.

## **7. LITERATURA**

1. NICE- National Collaborating Centre for Women's and Children's Health (UK). Fertility: Assessment and treatment for people with fertility problems. NICE Clinical Guidelines, No 156. London, Royal College of Obstetricians and Gynaecologists, 2013.
2. Šimunić V. Reprodukcijska endokrinologija i neplodnost: Medicinski potpomognuta oplodnja IVF. Šimunić V. Zagreb: Hrvatski liječnički zbor-Hrvatsko društvo za ginekološku endokrinologiju i humanu reprodukciju; 2012. 710p.
3. Delhanty JDA. Preimplantation genetics: an explanation for poor human fertility? *Ann Hum Genet.* 2001; 65:331-38.
4. Hann MC, Lau PE, Tempest HG. Meiotic recombination and male infertility: from basic science to clinical reality. *Asian J Androl.* 2011; 13:212-18.
5. Esteves SC, Hamada A, Kondray V, Pitchika A, Agarwal A. What every gynecologist should know about male infertility: an update. *Arch Gynecol Obstet.* 2012; 286:217-29.
6. Dhont M. WHO-classification of anovulation: background, evidence and problems. *Int Congr Ser.* 2005; 1279:3-9.
7. Evers JL, Te Velde ER. Vruchtbaarheidsstoornissen. In: Heineman MJ, Bleker OP, Evers JL, Heintz AP, eds. *Obstetrie en Gynaecologie, de voortplanting van de mens.* Elsevier Science, Maarssen; 2001: 435-471.
8. Collins JA, Crosignani, PG. Unexplained infertility: a review of diagnosis, prognosis, treatment efficacy and management. *Int. J. Obstet. Gynaecol.* 1992; 39: 267-75.
9. Pellicer A, Albert C, Mercader A, Bonilla-Musoles F, Remohi J, Simon C. The follicular and endocrine environment in women with endometriosis; local and systematic cytokine production. *Fertil. Steril.* 1998; 70: 425-31.
10. Rudolph LM, Bentley GE, Calandra RS, Paredes AH, Tesone M, Wu TJ, i sur. Peripheral and central mechanisms involved in the hormonal control of male and female reproduction. *J Neuroendocrinol.* 2016; 28(7): 1-22.
11. Ray A, Shah A, Gudi A, Homburg R. Unexplained infertility: an update and review of practice. *Reprod Biomed Online.* 2012; 24(6):591-602.
12. Guzick DS, Grefenstette I, Baffone K. Infertility evaluation in fertile women: a model for assessing the efficacy of infertility testing. *Hum Reprod.* 1994; 9: 2306- 10.
13. Evers LH. Female subfertility. *Lancet* 2002;360: 151-9.
14. Gleicher N. and Barad, D. Unexplained infertility: does it really exist? *Hum. Reprod.* 2006; 21: 1951-5.
15. Taylor PJ, Collins JA. *Unexplained infertility.* Oxford University Press, New York; 1992: 153-69.
16. Gnoth C, Frank-Herrmann P, Freundl G, Godehardt D, Godehardt E. Time to pregnancy: results of the German prospective study and impact on the management of infertility. *Hum. Reprod.* 2003;18: 1959-66.
17. Kamel RM. Management of the infertile couple: an evidence-based protocol. *Reprod Biol Endocrinol.* 2010, 8:21.

18. Cahill DJ, Wardle PG. Management of infertility: Clinical review. *BMJ*. 2002; 325:28–32.
19. Jose-Miller AB, Boyden JW, Frey KA. Infertility. *Am Fam Physician*. 2007; 75:849–56.
20. Verkauf BS. The incidence and outcome of single factor, multifactorial, and unexplained infertility. *Am J Obstet Gynecol*. 1983; 147:175–81.
21. Gunn DD, Bates GW. Evidence-based approach to unexplained infertility: a systematic review. *Fertil Steril*. 2016;105(6):1566-74.
22. Diamond MP. Future evaluation and treatment of unexplained infertility. *Fertil Steril*. 2016;105(6):1457-8.
23. Newman MG, Takei H, Klokkevold PR, et al. Carranza's clinical periodontology. 11th ed. California: Elsevier; 2011. p. 151–2.
24. Pavlatou A, Dokou P, Tsami A. Periodontal disease, infertility treatment and in vitro fertilization (IVF). *J Fertil In Vitro IVF Worldw Reprod Med Genet Stem Cell*. 2015;3(2):148–54.
25. Hajishengallis G, Lamont RJ. Beyond the red complex and into more complexity: the polymicrobial synergy and dysbiosis (PSD) model of periodontal disease etiology. *Mol Oral Microbiol*. 2012;27(6):409–19.
26. Khanna SS, Dhaimade PA, Malhotra S. Oral Health Status and Fertility Treatment Including IVF. *J Obstet India*. 2017;67(6):400-404.
27. Otenio CC, Fonseca I, Martins MF, Ribeiro LC, Assis NMSP, Ferreira AP, i sur. Expression of IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , and iNOS in pregnant women with periodontal disease. *Genet Mol Res*. 2012;11(4):4468–78.
28. Goldenberg RL, Culhane JF. Preterm birth and periodontal disease. *N Engl J Med*. 2006;355(18):1925-7.
29. Gibbs RS. The relationship between infections and adverse pregnancy outcomes: an overview. *Ann Periodontol*. 2001; 6: 153-63.
30. Offenbacher S, Katz V, Fertik G, Collins J, Boyd D, Maynor G, i sur. Periodontal Infection as a Possible Risk Factor for Preterm Low Birth Weight. *J Periodontol*. 1996;67(10):1103-13.
31. Bieniek KW, Riedel HH. Bacterial foci in the teeth, oral cavity, and jaw-secondary effects (remote action) of bacterial colonies with respect to bacteriospermia and subfertility in males. *Andrologia*. 1993;25(3):159-62.
32. Klinger A, Hain B, Yaffe H, Schonberger O. Periodontal status of males attending an in vitro fertilization clinic. *J Clin Periodontol*. 2011;38(6):542-6.
33. Nwhator SO, Umeizudike KA, Ayanbadejo PO, Opeodu OI, Olamijulo JA, Sorsa T. Another reason for impeccable oral hygiene: oral hygiene-sperm count link. *J Contemp Dent Pract*. 2013;15(3):352–8.
34. Lebovic DI, Mueller MD, Taylor RN. Immunobiology of endometriosis. *Fertil Steril*. 2001; 75:1-10.



35. Yucel-Lindberg T, Båge T. Inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontitis. *Expert Rev Molecular Med.* 2013;15: e7
36. Kavoussi SK, West BT, Taylor GW, Lebovic DI. Periodontal disease and endometriosis: analysis of the National Health and Nutrition Examination Survey. *Fertil Steril.* 2009;91(2):335-42.
37. Pretorius C, Jagatt A, Lamont RF. The relationship between periodontal disease, bacterial vaginosis, and preterm birth. *J Perinat Med.* 2007;35(2):93-9.
38. Hart R, Doherty DA, Pennell CE, Newnham IA, Newnham JP. Periodontal disease: a potential modifiable risk factor limiting conception. *Hum Reprod.* 2012; 27(5):1332-42.
39. Paju S, Oittinen J, Haapala H, Asikainen S, Paavonen J, Pussinen PJ. *Porphyromonas gingivalis* may interfere with conception in women. *J Oral Microbiol.* 2017;9(1):1330644.
40. Telatar GY, Gürlek B, Telatar BC. Periodontal and caries status in unexplained female infertility: A case-control study. *J Periodontol.* 2021;92(3):446-54.
41. Machado V, Botelho J, Proença L, Mendes JJ. Comparisons of periodontal status between females referenced for fertility treatment and fertile counterparts: A pilot case–control study. *Int J Environ Res Public Health.* 2020;17(15):5281.
42. Løe H, Silness J. Periodontal disease in pregnancy. I. Prevalence and severity. *Acta Odontol Scand.* 1963; 21:533-51.
43. Silness J, Løe H. Periodontal disease in pregnancy. II. Correlation between oral hygiene and periodontal condition. *Acta Odontol Scand.* 1964; 22:121-35.
44. Pavlatou A. Gingival alterations of women during In Vitro fertilization: clinical study. Master's thesis. University of Athens. 2003
45. Pavlatou A, Tsami A, Vlahos N, Mantzavinos T, Vrotsos I. The effect of In Vitro fertilization on gingival inflammation according to women's periodontal status: clinical data. *J Int Acad Periodontol.* 2013; 15: 36-42.
46. Tobler KJ, Shoham G, Christianson MS, Zhao Y, Leong M, Shoham Z. Use of anti-mullerian hormone for testing ovarian reserve: A survey of 796 infertility clinics worldwide. *J Assist Reprod Genet.* 2015; 32:1441–8.
47. Fanchin R, Schonauer L, Righini C, Guibourdenche J, Frydman R, Taieb J. Serum anti-Mullerian hormone is more strongly related to ovarian follicular status than serum inhibin-B, estradiol, FSH and LH on day 3. *Hum Reprod.* 2003; 18:323–7.
48. Tal R, Tal O, Seifer BJ, Seifer DB. Antimullerian hormone as predictor of implantation and clinical pregnancy after assisted conception: A systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril.* 2015; 103:119–30.
49. Broer SL, Dolleman M, Opmeer BC, Fauser BC, Mol BW, Broekmans FJ. AMH and AFC as predictors of excessive response in controlled ovarian hyperstimulation: A meta-analysis. *Hum Reprod Update.* 2011; 17:46–54.

50. Honnma H, Baba T, Sasaki M, Hashiba Y, Oguri H, Fukunaga T, i sur. Serum anti-Mullerian hormone levels affect the rate of ongoing pregnancy after in vitro fertilization. *Reprod Sci.* 2013; 20:51–9.
51. Wang JG, Douglas NC, Nakhuda GS, Choi JM, Park SJ, Thornton MH, i sur. The association between anti-Mullerian hormone and IVF pregnancy outcomes is influenced by age. *Reprod Biomed Online.* 2010; 21:757–61.
52. Fanchin R, Mendez Lozano DH, Frydman N, Gougeon A, di Clemente N, Frydman R, i sur. Anti-Mullerian hormone concentrations in the follicular fluid of the preovulatory follicle are predictive of the implantation potential of the ensuing embryo obtained by in vitro fertilization. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007; 92:1796–802.
53. Iliodromiti S, Kelsey TW, Wu O, Anderson RA, Nelson SM. The predictive accuracy of anti-Müllerian hormone for live birth after assisted conception: A systematic review and meta-analysis of the literature. *Hum Reprod Update.* 2014; 20:560–70.
54. Hagen CP, Vestergaard S, Juul A, Skakkebaek NR, Andersson AM, Main KM i sur. Low concentration of circulating antimullerian hormone is not predictive of reduced fecundability in young healthy women: a prospective cohort study. *Fertil Steril.* 2012;98(6):1602–8.
55. Nikolaou D. How old are your eggs? *Curr Opin. Obstet Gynecol.* 2008; 20:540–4.
56. Depmann M, Broer SL, Eijkemans MJC, van Rooij IAJ, Scheffer GJ, Heimensem J, i sur. Anti-Müllerian hormone does not predict time to pregnancy: results of a prospective cohort study. *Gynecol Endocrinol.* 2017;33(8):644-8.
57. Steiner AZ, Pritchard D, Stanczyk FZ, Kesner JS, Meadows JW, Herring AH, i sur. Association Between Biomarkers of Ovarian Reserve and Infertility Among Older Women of Reproductive Age. *JAMA.* 2017;318(14):1367-76.
58. Pellatt L, Rice S, Dilaver N, Heshri A, Galea R, Brincat M, i sur. Anti-Mullerian hormone reduces follicle sensitivity to follicle-stimulating hormone in human granulosa cells. *Fertil Steril.* 2011;96(5):1246–51.
59. Nikolaou D, Gilling-Smith C. Early ovarian ageing: Are women with polycystic ovaries protected? *Debate – Continued. Hum Reprod.* 2004; 19:2175–9.
60. Goswami M, Nikolaou D. Is AMH Level, Independent of Age, a Predictor of Live Birth in IVF? *J Hum Reprod Sci.* 2017; 10(1): 24–30.
61. Greenwood EA, Cedars MI, Santoro N, Eisenberg E, Kao CN, Haisenleder DJ, i sur. Antimüllerian hormone levels and antral follicle counts are not reduced compared with community controls in patients with rigorously defined unexplained infertility. *Fertil Steril.* 2017;108(6): 1070-7.
62. Kleine DE, Stetler-Stevenson W.G. Structural biochemistry and activation of matrix metalloproteinases. *Curr Opin Cell Biol.* 1993, 5:891-7.
63. Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res.* 2003;92(8):827-39.

64. Fini ME, Cook JR, Mohan R, Brinckerhoff, CE. Regulation of matrix metalloproteinase gene expression. In: Parks, WC.; Mecham, RP., editors. *Matrix Metalloproteinases*. New York: Academic; 1998. p. 299-356
65. Lukashev ME, Werb Z. ECM signalling: orchestrating cell behaviour and misbehaviour. *Trends Cell Biol.* 1998; 8(11):437-41.
66. Abilleira S, Bevan S, Markus HS. The role of genetic variants of matrix metalloproteinases in coronary and carotid atherosclerosis. *J Med Genet* 2006;43 (12):897–901.
67. Ye S, Patodi N, Walker-Bone K, Reading I, Cooper C, Dennison E. Variation in the matrix metalloproteinase-3, -7, -12 and -13 genes is associated with functional status in rheumatoid arthritis. *Int J Immunogenet* 2007;34 (2):81–5.
68. Egeblad M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer* 2002;2 (3):161–74.
69. Noël A, Jost M, Maquoi E. Matrix metalloproteinases at cancer tumor-host interface. *Semin Cell Dev Biol.* 2008;19(1):52-60.
70. Belkin AM, Akimov SS, Zaritskaya LS, Ratnikov BI, Deryugina EI, Strongin AY. Matrix-dependent proteolysis of surface transglutaminase by membrane-type metalloproteinase regulates cancer cell adhesion and locomotion. *J Biol Chem.* 2001; 276(21):18415-22.
71. Noë V, Fingleton B, Jacobs K, Crawford HC, Vermeulen S, Steelant W, i sur. Release of an invasion promoter E-cadherin fragment by matrilysin and stromelysin-1. *J Cell Sci.* 2001;114(1):111-8.
72. Ito A, Mukaiyama A, Itoh Y, Nagase H, Thogersen IB, Enghild JJ, i sur. Degradation of interleukin 1beta by matrix metalloproteinases. *J Biol Chem.* 1996;271(25):14657-60.
73. Werb Z. ECM and cell surface proteolysis: regulating cellular ecology. *Cell* 1997; 91:439–42.
74. Henriët P, Cornet PB, Lemoine P, Galant C, Singer CF, Courtoy PJ, i sur. Circulating ovarian steroids and endometrial matrix metalloproteinases (MMPs). *Ann N Y Acad Sci* 2002; 955: 119 -38.
75. Grzechocińska B, Dąbrowski F, Cyganek A, Panek G, Wielgoś M. The role of metalloproteinases in endometrial remodelling during menstrual cycle. *Ginekol Pol.* 2017;88(6):337-42.
76. Martelli M, Campana A and Bischof P. Secretion of matrix metalloproteinases by human endometrial cells in vitro. *J Reprod Infert.* 1993; 98:67–76.
77. Rodgers WH, Osteen KG, Matrisciann LM, Navre M, Giudice LC, Gorstein F. Expression and localization of matrilysin, a matrix metalloproteinase, in human endometrium during the reproductive cycle *Am J Obstet Gynecol.*1993; 168: 253–60.

78. Hampton AL, Salamonsen LA. Expression of messenger ribonucleic acid encoding matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors is related to menstruation. *Journal of Endocrinol* 1994;141:1-3.
79. Goffin F, Munaut C, Frankenne F, Perrier D'Hauterive S, Béliard A, Fridman V, i sur. Expression pattern of metalloproteinases and tissue inhibitors of matrix-metalloproteinases in cycling human endometrium. *Biol Reprod*. 2003;69(3):976-84.
80. Salamonsen LA, Lathbury LJ. Endometrial leukocytes and menstruation. *Hum Reprod Update* 2000; 6:16–27.
81. Freitas S, Meduri G, Le Nestour E, Bausero P, Perrot-Appianat M. Expression of metalloproteinases and their inhibitors in blood vessels in human endometrium *Biol Reprod*.1999; 61(4):1070–82.
82. Lombardi A, Makieva S, Rinaldi SF, Arcuri F, Petraglia F, Norman JE. Expression of Matrix Metalloproteinases in the Mouse Uterus and Human Myometrium During Pregnancy, Labor, and Preterm Labor. *Reprod Sci*. 2018;25(6):938-49.
83. Oliphant S, Nygaard NE, Zong W, Canavan TP, Moalli PA. Maternal adaptations in preparation for parturition predict uncomplicated spontaneous delivery outcome. *Am J Obstet Gynecol*. 2014; 211: 630.
84. Oliphant S, Canavan T, Palcsey Stacy, Meyn L, Moalli P. Pregnancy and parturition negatively impact vaginal angle and alter expression of vaginal MMP-9. *Am J Obstet Gynecol*. 2018; 218: (2):242.e1-242.e7.
85. Jones NM, Holzman C, Tian Y, Witkin SS, Genc M, Friderici K, i sur. Innate immune system gene polymorphisms in maternal and child genotype and risk of preterm delivery. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2012; 25:240-7.
86. Fang X, Li H, Diao Y, Shan R, Dong J, Li H, i sur. Polymorphisms in the MTHFR, VDR, MMP-9 and IL-genes and the risk of premature rupture of membranes. *Gynecol Obstet Investig*. 2010; 70: 206-14.
87. Frey HA, Stout MJ, Pearson LN, Tuuli MG, Cahill AG, Strauss 3rd RF, i sur. Genetic variation associated with preterm birth in African-American women. *Am J Obstet Gynecol Scand*. 2016;215(2): 235.e1-8.
88. Pereza N, Plesa I, Peterlin A, Jan Z, Tul N, Kapovic M, i sur. Functional polymorphisms of matrix metalloproteinases 1 and 9 genes in women with spontaneous preterm birth. *Dis Markers*. 2014; 171036
89. Erzincan SG, Varol FG, Inan C, Sayin NC. Relationship between second-trimester amniotic fluid levels of Prokineticin-1 and Matrix Metalloproteinase-2 with adverse pregnancy outcome. *Placenta*. 2018; 62:25-7.
90. Kim KW, Romero R, Park HS, Park CW, Shim SS, Jun JK, i sur. A rapid matrix metalloproteinase-8 bedside test for the detection of intraamniotic inflammation in women with preterm premature rupture of membranes. *Am J Obstet Gynecol*. 2007 Sep;197(3): 292.e1-5.

91. Nien JK, Yoon BH, Espinoza J, Kusanovic JP, Erez O, Soto E i sur. A rapid MMP-8 bedside test for the detection of intra-amniotic inflammation identifies patients at risk for imminent preterm delivery. *Am J Obstet Gynecol.* 2006;195(4):1025-30.
92. Kim SM, Romero R, Lee J, Chaemsaitong P, Lee MW, Chaiyasit N, i sur. About one-half of early spontaneous preterm deliveries can be identified by a rapid matrix metalloproteinase-8 (MMP-8) bedside test at the time of mid-trimester genetic amniocentesis. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2016;29(15):2414-22.
93. Vu TH, Shipley JM, Bergers G, Berger JE, Helms JA, Hanahan D, i sur. MMP-9/gelatinase B is a key regulator of growth plate angiogenesis and apoptosis of hypertrophic chondrocytes. *Cell.* 1998;93(3):411-22.
94. Cohen M, Meisser A, Haenggeli L, Bischof P. Involvement of MAPK pathway in TNF- $\alpha$ -induced MMP-9 expression in human trophoblastic cells. *Mol Hum Reprod.* 2006;12(4):225-32.
95. Pereza N, Ostojic S, Volk M, Kapovic M, Peterlin B. Matrix metalloproteinases 1, 2, 3 and 9 functional single-nucleotide polymorphisms in idiopathic recurrent spontaneous abortion. *Reprod Biomed Online.* 2012; 24: 567-75.
96. Singh K, Nair RR, Khanna A. Functional SNP-1562C/T in the promoter region of MMP9 and recurrent early pregnancy loss. *Reprod Biomed Online.* 2016; 24:61-5.
97. Yoshii N, Hamatani T, Inagaki N, Hosaka T, Inoue O, Yamada M, i sur. Successful implantation after reducing matrix metalloproteinase activity in the uterine cavity. *Reprod Biol Endocrinol.* 2013;11:37.
98. Konac E, Alp E, Onen HI, Korucuoglu U, Biri AA, Menevse S. Endometrial mRNA expression of matrix metalloproteinases, their tissue inhibitors and cell adhesion molecules in unexplained infertility and implantation failure patients. *Reprod Biomed Online.* 2009;19(3):391-7.
99. Sillem M, Prifti S, Neher M, Runnebaum B. Extracellular matrix remodelling in the endometrium and its possible relevance to the pathogenesis of endometriosis. *Hum Reprod Update.* 1998; 4(5):730– 5.
100. Liu H, Wang J, Wang H, Tang N, Li Y, Zhang Y, i sur. Correlation between matrix metalloproteinase-9 and endometriosis. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015; 8(10):13399–404.
101. Yang M, Jiang C, Chen H, Nian Y, Bai Z, Ha C. The involvement of osteopontin and matrix metalloproteinase- 9 in the migration of endometrial epithelial cells in patients with endometriosis. *Reprod Biol Endocrinol.* 2015; 13:95.
102. Liu H, Wang J, Wang H, Tang N, Li Y, Zhang Y, i sur. The plasma and peritoneal fluid concentrations of matrix metalloproteinase-9 are elevated in patients with endometriosis. *Ann Clin Biochem.* 2016; 53(5):599–605.
103. Szymanowski K, Mikołajczyk M, Wirstlein P, Dera-Szymanowska A. Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2), MMP-9, tissue inhibitor of matrix metalloproteinases (TIMP-1) and transforming growth factor- $\beta$ 2 (TGF- $\beta$ 2) expression in eutopic

- endometrium of women with peritoneal endometriosis. *Ann Agric Environ Med.* 2016; 23(4): 649–53.
104. Singh N, Prasad P, Das B, Rastogi S. Involvement of matrix metalloproteinases and their inhibitors in endometrial extracellular matrix turnover in Chlamydia trachomatis-infected recurrent spontaneous aborters. *Pathog Dis.* 2017;75(1). doi: 10.1093/femspd/ftx007.
105. Juica NE, Rodas PI, Solar P, Borda P, Vargas R, Muñoz C, i sur. Neisseria gonorrhoeae Challenge Increases Matrix Metalloproteinase-8 Expression in Fallopian Tube Explants. *Front Cell Infect Microbiol.* 2017; 7:399.
106. Rodas PI, Perez D, Jaffret C, Gonzalez Y, Carreño C, Tapia C, i sur. Modified profile of matrix metalloproteinase-2 and -9 production by human fallopian tube epithelial cells infection in vitro with Neisseria gonorrhoeae. *J Infect Dis.* 2017; 215:452–5.
107. Fu Z, Xu S, Xu Y, Ma J, Li J, Xu P. The expression of tumor-derived and stromal-derived matrix metalloproteinase 2 predicted prognosis of ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer* 2015; 25:356–62.
108. Cymbaluk-Ploska A, Chudecka-Glaz A, Pius-Sadowska E, Sompolska-Rzechuła A, Machaliński B, Surowiec A, i sur. Clinical importance of serum HE4 and MMP2 levels in endometrial cancer patients. *Onco Targets Ther* 2017; 10:3169–75.
109. Davidson B, Goldberg I, Berner A, Nesland JM, Givant-Horwitz V, Bryne M, i sur. Expression of membrane-type 1, 2, and 3 matrix metalloproteinases messenger RNA in ovarian carcinoma cells in serous effusions. *Am J Clin Pathol.* 2001;115(4):517-24.
110. Ziyi F, Sujuan X, Ye X, Jiehua M, Jingyun L, Pengfei X. The expression of Tumor-Derived and Stromal-Derived Matrix Metalloproteinase 2 Predicted Prognosis of Ovarian Cancer. *Int J Gynecol Cancer* 2015;25: 356-62.
111. Goodson JM. Gingival cervicular fluid flow. *Periodontol* 2000. 2003; 31:43-54.
112. Seymour, G.J.; Gemmell, E. Cytokines in periodontal disease: Where to from here? *Acta Odontol. Scand.* 2001; 59: 167–73.
113. Armitage GC. Development of a classification system for periodontal disease and conditions. *Ann. Periodontol* 1999;4: 1-6.
114. Sheiham A, Netuveli GS. Periodontal diseases in Europe. *Periodontol* 2000. 2002; 29:104-21.
115. Pussinen PJ, Paju S, Mäntylä P, Sorsa T. Serum microbial- and host-derived markers of periodontal diseases: a review. *Curr Med Chem.* 2007;14(22):2402-12.
116. Pihlstrom, B.L.; Michalowicz, B.S.; Johnson, N.W. Periodontal diseases. *Lancet* 2005; 19,1809-20.
117. Armitage GC. The complete periodontal examination. *Periodontol* 2000. 2004; 34:22-33.
118. Listgarten MA, Loomer PM. Microbial identification in the management of periodontal diseases. A systematic review. *Ann Periodontol.* 2003;8(1):182-92.
119. Kinney JS, Ramseier CA, Giannobile WV. Oral fluid-based biomarkers of alveolar bone loss in periodontitis. *Ann N Y Acad Sci.* 2007; 1098:230-51.

120. Kraft-Neumärker M, Lorenz K, Koch R, Hoffmann T, Mäntylä P, Sorsa T, i sur. Full-mouth profile of active MMP-8 in periodontitis patients. *J Periodontal Res.* 2012;47(1):121-8.
121. Suomalainen K, Sorsa T, Saxén L, Vauhkonen M, Uitto VJ. Collagenase activity in gingival crevicular fluid of patients with juvenile periodontitis. *Oral Microbiol Immunol.* 1991;6(1):24-9.
122. Birkedal-Hansen H. Role of Matrix Metalloproteinases in Human Periodontal Diseases. *J Periodontol.* 1993;64(5):474-84.
123. McCulloch CA. Host enzymes in gingival crevicular fluid as diagnostic indicators of periodontitis. *J Clin Periodontol.* 1994;21(7):497-506.
124. Sorsa T, Tjäderhane L, Salo T. Matrix metalloproteinases (MMPs) in oral diseases. *Oral Dis.* 2004;10(6):311-8.
125. Bernasconi L, Ramenzoni LL, Al-Majid A, Tini GM, Graber SM, Schmidlin PR, i sur. Elevated Matrix Metalloproteinase Levels in Bronchi Infected with Periodontopathogenic Bacteria. *PLoS One.* 2015;10(12): e0144461.
126. Biyikoğlu B, Buduneli N, Kardeşler L, Aksu K, Pitkala M, Sorsa T. Gingival crevicular fluid MMP-8 and -13 and TIMP-1 levels in patients with rheumatoid arthritis and inflammatory periodontal disease. *J Periodontol.* 2009;80(8):1307-14.
127. Ruest LB, Ranjbaran H, Tong EJ, Svoboda KK, Feng JQ. Activation of Receptor Activator of Nuclear Factor- $\kappa$ B Ligand and Matrix Metalloproteinase Production in Periodontal Fibroblasts by Endothelial Signaling. *J Periodontol.* 2016;87(1):e1-8.
128. Sorsa T, Tjäderhane L, Konttinen YT, Lauhio A, Salo T, Lee HM, i sur. Matrix metalloproteinases: Contribution to pathogenesis, diagnosis and treatment of periodontal inflammation. *Ann Med.* 2006; 38(5):306–321.
129. Ingman T, Tervahartiala T, Ding Y, Tschesche H, Haerian A, Kinane DF, i sur. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in gingival crevicular fluid and saliva of periodontitis patients. *J Clin Periodontol.* 1996;23(12): 1127–32.
130. Sorsa T, Hernández M, Leppilähti J, Munjal S, Netuschil L, Mäntylä P. Detection of gingival crevicular fluid MMP-8 levels with different laboratory and chair-side methods. *Oral Dis.* 2010;16(1):39-45.
131. Leppilähti JM, Ahonen MM, Hernández M, Munjal S, Netuschil L, Uitto VJ, i sur. Oral rinse MMP-8 point-of-care immuno test identifies patients with strong periodontal inflammatory burden. *Oral Dis.* 2011;17(1):115-22.
132. Hanemaaijer R, Sorsa T, Konttinen YT, Ding Y, Sutinen M, Visser H, i sur. Matrix metalloproteinase-8 is expressed in rheumatoid synovial fibroblasts and endothelial cells. *J Biol Chem.* 1997;272(50):31504-9.
133. Leppilähti JM, Kallio MA, Tervahartiala T, Sorsa T, Mäntylä P. Gingival crevicular fluid matrix metalloproteinase-8 levels predict treatment outcome among smokers with chronic periodontitis. *J. Periodontol.* 2014; 85:250–60.

134. Leppilähti JM, Hernandez-Rios PA, Gamonal JA, Tervahartiala T, Brignardello-Petersen R, Mäntylä P, i sur. Matrix metalloproteinases and myeloperoxidase in gingival crevicular fluid provide site-specific diagnostic value for chronic periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2014; 41:348–56.
135. Leppilähti JM, Sorsa T, Kallio MA, Tervahartiala T, Emingil G, Han B, i sur. The utility of gingival crevicular fluid matrix metalloproteinase-8 response patterns in prediction of site-level clinical treatment outcome. *J Periodontol.* 2015; 86:777–87.
136. Heikkinen AM, Nwhator SO, Rathnayake N, Mäntylä P, Vatanen P, Sorsa T. Pilot Study on Oral Health Status as Assessed by an Active Matrix Metalloproteinase-8 Chairside Mouthrinse Test in Adolescents. *J Periodontol.* 2016; 87:36–40.
137. Hernández-Ríos P, Hernández M, Tervahartiala T, Leppilähti J, Kuula H, Heikkinen AM, i sur. Oral fluid MMP-8 as a diagnostic tool in chronic periodontitis. *Metalloproteinases Med.* 2016; 2016:11–18.
138. Heikkinen AM, Raivisto T, Kettunen K, Kovanen L, Haukka J, Esmaili EP, i sur. Pilot Study on the Genetic Background of an Active Matrix Metalloproteinase (aMMP-8) Test in Finnish Adolescents. *J. Periodontol.* 2017;88(5):464-72.
139. Mäntylä P, Stenman M, Kinane DF, Tikanoja S, Luoto H, Salo T, i sur. Gingival crevicular fluid collagenase-2 (MMP-8) test stick for chair-side monitoring of periodontitis. *J Periodontal Res.* 2003;38(4):436-9.
140. Johnson N, Ebersole JL, Kryscio RJ, Danaher RJ, Dawson D, Al-Sabbagh M, i sur. Rapid assessment of oral salivary MMP-8 and periodontal disease using lateral flow immunoassay. *Oral Dis.* 2016;22(7):681-7.
141. Sorsa T, Sahni V, Buduneli N, Gupta S, Räisänen IT, Golub LM, i sur. Active matrix metalloproteinase-8 (aMMP-8) point-of-care test (POCT) in the COVID-19 pandemic. *Expert Rev Proteom.* 2021;18(8):707-17.
142. Lee W, Aitken S, Sodek J. Evidence of a direct relationship between neutrophil collagenase activity and periodontal tissue destruction in vivo: role of active enzyme in human periodontitis. *J Periodontal Res.* 1995;30(1):23-33-
143. Hoffmann T, Lorenz K, Netuschil L, i sur. The methodological evaluation of a novel qualitative aMMP-8 chairside test as an early indicator of tissue destructive inflammatory periodontal diseases. Evaluation of agreement between qualitative aMMP-8 chairside test scores and quantitative aMMP-8 ELISA measurements. [master's thesis]. Department of Periodontology, University of Dresden; 2009.
144. Kivelä-Rajamäki M, Maisi P, Srinivas R, Tervahartiala T, Teronen O, Husa V, i sur. Levels and molecular forms of MMP-7 (matrilysin-1) and MMP-8 (collagenase-2) in diseased human peri-implant sulcular fluid. *J Periodontal Res.* 2003;38(6):583-90.
145. Räisänen IT, Heikkinen AM, Nwhator SO, Umeizudike 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.
146. Nwhator SO, Umeizudike KA, Ayanbadejo PO, Opeodu OI, Olamijulo JA, Sorsa T. Another reason for impeccable oral hygiene: oral hygiene-sperm count link. *J Contemp Dent Pract*. 2014 May 1;15(3):352-8.
147. Ainamo J, Barmes D, Beagrie G, Cutress T, Martin J, Sardo-Infirri J. Development of the World Health Organization (WHO) community periodontal index of treatment needs (CPITN). *Int Dent J*. 1982 Sep;32(3):281-91.
148. Fardini Y, Wang X, Témoïn S, Nithianantham S, Lee D, Shoham M, i sur. Fusobacterium nucleatum adhesin FadA binds vascular endothelial cadherin and alters endothelial integrity. *Mol Microbiol*. 2011 Dec;82(6):1468-80.
149. Prabha V, Sandhu R, Kaur S, Kaur K, Sarwal A, Mavuduru RS, i sur. Mechanism of sperm immobilization by Escherichia coli. *Adv Urol*. 2010; 2010:240268.
150. Paulson JD, Polakoski KL. Isolation of a spermatozoal immobilization factor from Escherichia coli filtrates. *Fertil Steril*. 1977;28(2):182-5.
151. Loe H, Silness J. Periodontal disease in pregnancy. I. Prevalence and severity. *Acta Odontol Scand*. 1963; 21:533-51.
152. Ainamo J, Bay I. Problems and proposals for recording gingivitis and plaque. *Int Dent J*. 1975; 25(4):229-35.
153. 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(1): 159-72.
154. Khalife D, Khalil A, Itani MN, Khalifeh F, Faour S, Salame A, i sur. No association between the presence of periodontal disease and poor IVF outcomes: a pilot study. *Int J Womens Health*. 2019;11: 363-70.
155. Sorsa T, Alassiri S, Grigoriadis A, Räisänen IT, Pärnänen P, Nwhator SO, i sur. Active MMP-8 (aMMP-8) as a Grading and Staging Biomarker in the Periodontitis Classification. *Diagnostics (Basel)*. 2020;10(2):61.
156. Sorsa T, Grigoriadis A, Sakellari D, Gupta S, Sahni V, Tervahartiala T, i sur. 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):1495-8.
157. Nwhator SO, Ayanbadejo PO, Umeizudike KA, Opeodu OI, Agbelusi GA, Olamijulo JA, i sur. Clinical correlates of a lateral-flow immunoassay oral risk indicator. *J Periodontol*. 2014;85(1):188-94.
158. 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 Periodontol Res*. 2017;52(5):824-31.

159. Izadi Borujeni S, Mayer M, Eickholz P. Activated matrix metalloproteinase-8 in saliva as diagnostic test for periodontal disease? A case-control study. *Med Microbiol Immunol.* 2015;204(6):665-72.
160. Leppilahti JM, Harjunmaa U, Järnstedt J, Mangani C, Hernandez M, Tervahartiala T, i sur. 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.
161. Öztürk VO, Emingil G, Umeizudike K. Tervahartiala T, Gieselmann DR, Maier K, i sur. 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.
162. 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):1051–65.
163. Hu H, Cai C, Xue M, Luo J, Liao C, Huang H, i sur. Increased MMP8 Levels in Atopic Chronic Obstructive Pulmonary Disease: A Study Testing Multiple Immune Factors in Atopic and Non-Atopic Patients. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis.* 2020;15:1839-48.
164. Laxton RC, Hu Y, Duchene J, Zhang F, Zhang Z, Leung KY, i sur. A role of matrix metalloproteinase-8 in atherosclerosis. *Circ Res.* 2009 Oct;105(9):921-9.
165. Gonçalves FM, Jacob-Ferreira AL, Gomes VA, Casella-Filho A, Chagas AC, Marcaccini AM, i sur. Increased circulating levels of matrix metalloproteinase (MMP)-8, MMP-9, and pro-inflammatory markers in patients with metabolic syndrome. *Clin Chim Acta.* 2009;403(1-2):173-7.
166. Han JE, Lee EJ, Moon E, Ryu JH, Choi JW, Kim HS. Matrix Metalloproteinase-8 is a Novel Pathogenetic Factor in Focal Cerebral Ischemia. *Mol Neurobiol.* 2016;53(1):231-9.
167. Tuomainen AM, Kormi I, Havulinna AS, Tervahartiala T, Salomaa V, Sorsa T, i sur. Serum tissue-degrading proteinases and incident cardiovascular disease events. *Eur J Prev Cardiol.* 2014;21(7):806-12.
168. Momiyama Y, Ohmori R, Tanaka N, Kato R, Taniguchi H, Adachi T, i sur. High plasma levels of matrix metalloproteinase-8 in patients with unstable angina. *Atherosclerosis.* 2010;209(1):206-10
169. Lahdentausta L, Paju S, Mäntylä P, Buhlin K, Pietiäinen M, Tervahartiala T, i sur. Smoking confounds the periodontal diagnostics using saliva biomarkers. *J Periodontol.* 2019;90(5):475-83.
170. Lauhio A, Färkkilä E, Pietiläinen KH, Åström P, Winkelmann A, Tervahartiala T, i sur. Association of MMP-8 with obesity, smoking and insulin resistance. *Eur J Clin Invest.* 2016; 46(9):757-65.
171. Socransky SS, Haffajee AD, Goodson JM, Lindhe J. New concepts of destructive periodontal disease. *J Clin Periodontol* 1984;11(1):21-32.

172. Hedenbjörk-Lager A, Bjørndal L, Gustafsson A, Sorsa T, Tjäderhane L, Åkerman S, i sur. Caries correlates strongly to salivary levels of matrix metalloproteinase-8. *Caries Res.* 2015;49(1):1-8.
173. Grigoriadis A, Sorsa T, Räisänen I, Pärnänen P, Tervahartiala T, Sakellari D. Prediabetes/Diabetes Can Be Screened at the Dental Office by a Low-Cost and Fast Chair-Side/Point-of-Care aMMP-8 Immunotest. *Diagnostics (Basel)*. 2019 17;9(4):151.
174. Rautava J, Gürsoy UK, Kullström A, Könönen E, Sorsa T, Tervahartiala T, i sur. An Oral Rinse Active Matrix Metalloproteinase-8 Point-of-Care Immunotest May Be Less Accurate in Patients with Crohn's Disease. *Biomolecules* 2020; 10(3): 395.

## **8. ŽIVOTOPIS**

Lada Šumilin rođena je 12. travnja 1972. u Splitu. 1990. godine završila je srednju kemijsko tehnološku školu u Splitu. 1996.g. diplomirala je u redovnom roku na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Nakon završenog fakulteta obavila je pripravnički staž u Kliničkoj bolnici Split. Državni ispit položila je 1997.g. Od 1997. do 2002.g. radila je na zamjeni u ambulantama opće prakse u Splitsko-dalmatinskoj županiji. Dvije godine je radila u Ustanovi za Hitnu medicinsku pomoć, Split. Od 2002. do 2007.g. odradila je specijalizantski staž u Klinici za ženske bolesti i porode KBC-a Split tijekom kojeg je završila poslijediplomski studij “Ultrazvuk u kliničkoj medicini”, smjer ginekologija i porodništvo. 2007.g. položila je specijalistički ispit iz ginekologije i opstetricije. Od 2007. do 2012.g. radila je u Poliklinici Medikul u Zagrebu. Od 2012.g. zaposlena je u Poliklinici Aviva u Zagrebu. 2020.g. dobila je status specijalista uže specijalizacije iz fetalne medicine i opstetricije.

Popis objavljenih radova:

1. Šumilin L, Musić L, Puhar I, Sabol I, Japirko I, Kuna K, Lončar Brzak B. Diagnostic accuracy of salivary aMMP-8 test in infertile women and blood finding analysis: Periodontal status in infertile women. *Acta Stomatol Croat.* 2022;56(2):98-108. WoSCC, Q2  
(rad s objavljenim rezultatima iz doktorata)
2. Lončar-Brzak B, Škrinjar I, Brailo V, Vidović-Juras D, Šumilin L, Andabak-Rogulj A. Burning Mouth Syndrome (BMS)—Treatment with Verbal and Written Information, B Vitamins, Probiotics, and Low-Level Laser Therapy: A Randomized Clinical Trial. *Dent J.* 2022; 10(3): 1-12. WoSCC, Q2
3. Vuković A, Kuna K, Lončar Brzak B, Vučićević Boras †V, Šeparović R, Šekerija M, Šumilin L, Vidranski V. The Role of Salivary and Serum Ca125 and Routine Blood Tests in Patients with Ovarian Malignancies. *Acta Clin Croat.* 2021; 6(1): 55-62. SCIE, Q4
4. Šumilin L, Vuković A, Škrinjar I, Kuna K, Todorčić Laidlaw I, Lončar Brzak B. The Role of Matrix Metalloproteinases (MMPS) In the Female Reproductive System - Review Article. *Res J Pharm Biol Chem Sci.* 2019;10(2): 1-7.  
(ostali međunarodni indeksi)

5. Lončar Brzak B, Škrinjar I, Šumilin L, Žužul I, Špiljak B, Brailo V, Andabak Rogulj A. Oral Lichen Planus and Thyroid Disease: Is There a Possible Connection? Res J Pharm Biol Chem Sci. 2020;11(6): 70-74.  
(ostali međunarodni indeksi)
6. Gabrić D, Lončar Brzak B, Vučićević Boras V, Šumilin L, Škrinjar I. Angioedema Of Lower Lip and Gingiva Due To Oral Hormonal Therapy: A Case Report. Res J Pharm Biol Chem Sci. 2019; 10(3): 194-197.  
(ostali međunarodni indeksi)
7. Šumilin L, Vuković A, Lončar Brzak B, Terlević D, Kuna K, Vučićević Boras V. Male and Female Infertility and Periodontal Disease: Letter to The Editor. Res J Pharm Biol Chem Sci. 2018; 9(1): 61-63.  
ESCI (rad vezan uz temu doktorata)
8. Šumilin L, Žužul I, Muhaxheri G, Andabak Rogulj A, Vidović Juras D, Lončar Brzak B. Palatal Foreign Body - A Case Report. J Adv Med Med Res. 2018; 28(9): 1-4.  
(ostali međunarodni indeksi)