

Kronik Periodontitisli Hastalarda Başlangıç Periodontal Tedavisine İlave Olarak Doksisisiklin Kullanımının Dişeti Oluğu Sıvısında Bulunan Matriks Metalloproteinaz-1 Seviyelerine Etkisi

The Effects of Adjunctive Doxycycline in Initial Periodontal Therapy to the Gingival Crevicular Fluid Levels of Matrix Metalloproteinase-1

Burak Ak^{1*}, Eylem Ayhan Alkan¹, Bülend İnanç²

¹Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi, Periodontoloji Anabilim Dalı, Van

²Trakya Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi, Periodontoloji Anabilim Dalı, Edirne

ÖZET

Amaç: Bu çalışmanın amacı, kronik periodontitisli hastalarda başlangıç periodontal tedaviye ilave doksisisiklin kullanımının dişeti oluğu sıvısında (DOS) matriks metalloproteinaz-1 (MMP-1) seviyesi üzerine etkisinin incelenmesidir.

Gereç ve Yöntem: Çalışmaya 19-59 yaş aralığında, 12 kadın ve 12 erkek olmak üzere, toplam 24 kronik periodontitis (KP) hastası dahil edilmiştir. 12 KP hastası test grubu (TG) ve 12 KP hastası kontrol grubu (KG)'nu oluşturmuştur. Test grubundaki hastalara tüm ağız dezenfeksiyonuna (TAD) ilave olarak doksisisiklin ilk gün 200 mg devamında ise 100 mg günde tek doz çalışma sonuna kadar reçete edilmiştir. Kontrol grubundaki hastalara sadece TAD uygulanmıştır. Plak indeksi (PI), gingival indeks (GI), sondlanabilir cep derinliği (SCD), sondlamada kanama (SK) ve klinik ataşman seviyesi (KAS) verilerini içeren klinik parametreler tedavi öncesi ve tedavi sonrası kaydedilmiştir. MMP-1 miktarları ELISA yöntemi ile değerlendirilmiştir.

Bulgular: Her iki grupta da klinik parametrelerde tedavi sonrasında tedavi öncesine göre istatistik olarak anlamlı azalma gözlenmiştir ($p=0.001$). Tedavi öncesinde test grubunda, kontrol grubuna oranla anlamlı derecede daha az MMP-1 seviyesi tespit edilmiştir ($p=0.001$). MMP-1 seviyesi test grubunda tedavi sonrasında tedavi öncesine göre istatistik olarak anlamlı artış tespit edilmiştir ($p=0.001$). Tedavi sonrası test grubu ile kontrol grubu arasında MMP-1 seviyeleri açısından istatistik olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p=0.83$).

Sonuç: Bu çalışmanın sınırları dahilinde kronik periodontitis hastalarında ilave doksisisiklin kullanımının MMP-1 seviyeleri üzerinde etkisinin olduğu belirlenmiştir. Bu konu hakkında daha fazla sayıda çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Doksisisiklin, kronik periodontitis, DOS, MMP-1, TAD

ABSTRACT

Objective: The aim of this study was to compare the effects of adjunctive use of doxycycline in chronic periodontitis patients on the GCF levels of MMP-1 during and after the periodontal treatment.

Materials and Methods: Twenty-four chronic periodontitis patients (12 female and 12 male subjects with ages ranging between 19 to 59) were included in the study and assigned to test and control groups of twelve persons each. Patients in the CG received only full mouth disinfection (FMD) treatment whilst TG patients received 200 mg/day doxycycline for the 1st day and continued with a 100 mg daily dose for the rest of the treatment period. Plaque index (PI), gingival index (GI), pocket probing depth (PPD), bleeding on probing (BI), and clinical attachment gain (CAL) measurements were recorded before and after treatment periods. Matrix Metalloproteinase-1 (MMP-1) levels in the gingival crevicular fluid (GCF) were evaluated with Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA).

Results: The clinical parameters reflecting periodontal health were significantly improved in both groups following the treatment procedures ($p=0.001$). Before the treatment, the MMP-1 levels were lower in the test group compared to the controls. There was a significant increase on the the levels of MMP-1 between pre and posttreatment levels of MMP-1 in test group ($p=0.001$). There was not statistically significant difference on the levels of MMP-1 between the groups after the treatment ($p=0.83$).

Conclusion: This study demonstrates that adjunctive use of doxycycline affects the MMP-1 levels in chronic periodontitis patients. Further studies are needed to confirm these findings.

Key Words: Doxycycline, chronic periodontitis, GCF, MMP-1, FMD

Giriş

Kronik periodontitis, periodontitisin en sık görülen türü olup (1) diş destek dokularının, birleşim epitelinin, alveoler kemiğin yavaş ilerleyen yıkımı, cep oluşumu veya diş eti çekilmesi ile sonuçlanan formudur (2).

Kronik Periodontitis vakalarının çoğunluğu sadece diş yüzeyi temizliği ve kök düzleştirilmesi ile tedavi edilebilmektedir (3,4). Bazı çalışmalarda kronik periodontitis hastalarının bir kısmının klasik periodontal tedaviye uygun cevap vermediği bildirilmiştir (3,5). Bu hastalarda istenmeyen klinik durum, eksik kök yüzeyi düzleştirilmesi, uygun olmayan plak kontrolü, sistemik rahatsızlıklar, immün sistem yetersizliği, hatalı restorasyonlar, okluzyon bozuklukları, endo-perio lezyonları, sigara, tütün ürünleri ve benzer etkenler ve idiyomatik faktörlerin önüne geçilememesi olası sebeplerdendir (3,5-7).

Klasik mekanik tedaviler, bakteriler için rezervuar görevi gören dentin kanallarından, konkavitelere, yumuşak dokuya invaze halde bulunan bakterilerden elimine etmekte yetersiz kalabilmektedir (8). Periodontal antibiyotik terapisi mekanik tedaviyi daha etkin kılmak ve konak savunmasını daha etkin hale getirmeyi amaçlamaktadır (8,9). Sistemik antibiyotikler serum vasıtası ile derin cep tabanına, furkasyon alanlarına ve derin bağ dokusuna invaze olmuş bakterilere de etkili olabilmesi sebebi ile mekanik debridmana ve lokal antiseptik kullanımına göre avantajları olduğu bildirilmiştir (6,8-11).

Matriksmetaloproteinazlar nötral pH'da ekstrasellüler matrikste bulunan tüm komponentleri parçalayabilmektedirler (12). İlk tanımlanan interstisyel matriksmetaloproteinaz (MMP) olan MMP-1 dir (13).

Çeşitli fizyolojik olaylarda görev almakla beraber patolojik yıkımlarda da rolleri bulunmaktadır (13). Sağlıklı periodontal dokularda, kollajen dengesi doku hücrelerinde ve özellikle fibroblastlarca sentezlenen MMP-1 ile düzenlenmektedir. Enflam alanlarda yüksek miktarlarda MMP salgısı meydana gelerek bu denge bozulmaktadır (14). Bu bilgiler ışığında kronik periodontitis hastalarında TAD protokolü uygulanan hastalar ile beraber TAD'a ilave doksisisiklin reçete edilen hastalarda DOS MMP-1 miktarlarının incelenmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

Bu çalışmaya Yüzüncü Yıl Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Periodontoloji Anabilim Dalı

Kliniği'ne başvuran, klinik ve radyografik muayeneleri sonucunda kronik periodontitis tanısı konulan 24 kişi dahil edilmiştir. Yaşları 19-59 arasında olan bireylerin çalışmaya dahil edilme kriterleri; sistemik hastalıklarının bulunmaması, son 6 ay içinde periodontal tedavi görmemiş olmaları, ilaç kullanmamış olmaları, radyografik olarak kemik yıkımının gözlemlendiği, en az bir periodontal bölgede SCD \geq 5 mm ve GI \geq 2 değerlerine sahip dişlerin bulunması, hamile veya emzirme döneminde olmaması, sigara kullanmaması olarak belirlenmiştir.

Araştırmaya dahil edilen hastalara Yüzüncü Yıl Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından onaylanan hasta bilgilendirme formu okutularak onayları alınmıştır.

Çalışma kriterlerine uyan bireyler kontrol grubu ve test grubu olmak üzere 2 gruba ayrılmıştır.

Kontrol grubu (KG), sadece TAD uygulanan 12 KP hastasından oluşturulmuştur.

Test grubu (TG), TAD uygulaması ile birlikte doksisisiklin reçete edilen 12 KP hastasından oluşturulmuştur.

Çalışmaya dahil edilen hastalara ağız hijyen eğitimi verilerek başlangıç periodontal tedavisi tüm ağız dezenfeksiyon protokolüne uyularak 48 saat içinde tamamlanmıştır (15,16). Hastalar, rastgele 12'şer kişilik 2 gruba ayrılmıştır.

0. günde grupların tüm ağız klinik ölçümleri yapılarak, ağız içi fotoğrafları alınmış, SCD \geq 5 mm ve GI \geq 2 olan dişlerden DOS örnekleri ve uyarılmamış tükürük örnekleri toplanmıştır. Örnek toplama işlemlerinde Periopaper® (Oraflow Inc. New York USA) kullanılmıştır. Periopaperlar içlerinde fosfat tampon solüsyonu (PBS) bulunan ependorf tüplere yerleştirilerek santrifüj edilmiş ve daha sonrasında eşit miktarlarda porsiyonlanarak -20 °C derecede saklanmıştır.

Antibiyotik kullanımının ilk günü (Antibiyotik öncesi=AÖ), antibiyotik kullanımı sonrası (Kontrol seansı=KS) klinik ve biyokimyasal verileri toplanmıştır. Araştırmada Plak indeksi (PI), Gingival İndeks (GI), Sondlamada Kanama (SK), Sondlanabilir Cep Derinliği (SCD), Klinik Ataşman Seviyesi (KAS) ölçülmüştür.

Tüm hastalardan örnekler ve ölçümler ilk gün ve 27. günlerde alınmıştır. Test grubunda 100 mg 14 tablet, ilk gün 2 doz sonrasında günde tek doz uygulanmıştır. Kontrol grubuna ise sadece TAD uygulaması yapılmıştır.

Tüm ELISA kiti malzemeleri (Shanghai Sunred Biological Technology Co., Ltd) ve hasta numuneleri kullanılmadan önce oda sıcaklığında

30 dakika bekletilmiştir. MMP-1 standartları ELISA kiti içindeki kullanma talimatında yazdığı şekilde; 40 ng/ml, 20 ng/ml, 10 ng/ml, 5 ng/ml ve 2,5 ng/ml olacak şekilde standartlar hazırlanmıştır. Boş kuyucuklara sadece kromojen A ve B ardından durdurucu solüsyon eklenmiştir. Hazırlanan standart solüsyonları, belirlenen standart kuyucuklarına 50 ul eklenmiştir. Streptavidin-HRP 50 ul (Shanghai Sunred Biological Technology Co., Ltd) kuyucuklara ilave edilmiştir. Bu aşamada standartlar biotin antikoru ile kombine olduğu için MMP-1 antikoru ilave edilmemiştir. Test kuyucuklarına ise 40 ul numune yerleştirilmiş ve 10 ul MMP-1 antikoru ve 50 ul Streptavidin HRP ilave edilmiştir. Membran ile izole edilen mikroplate hafifçe çalkalanarak 37 °C 60 dakika inkübe edilmiştir. Dikkatlice membran uzaklaştırıldıktan sonra 30 katı sulandırılan yıkama solüsyonu ile yıkama yapılmıştır. Kromojen solüsyonu A 50 ul, kromojen solüsyonu B 50 ul (Shanghai Sunred Biological Technology Co., Ltd) her kuyucuğa ilave edilmiş ve hafifçe çalkalandıktan sonra 10 dakika 37 °C derecede karanlık ortamda inkübe edilmiştir. 50 ul durdurma solüsyonu her kuyucuğa yerleştirildikten sonra 450 nm de OD (optical density) değerleri 15 dakika içerisinde alınmıştır (BioTek Instruments, Inc, ELx808 Absorbance Reader). Standartlardan alınan OD değerleri kullanılarak numunelerden alınan OD değerleri konsantrasyona çevrilmiştir.

Elde edilen bulgular SAS (Statistical Analysis Software) 9.0 (SAS Institute, NC, A.B.D.) programı kullanılarak değerlendirilmiştir. Niceliksel verilerin karşılaştırılmasında Anova Testi kullanılmıştır. Parametrelerin tedavi öncesine göre tedavi sonrası grup içi değerleri eşleştirilmiş t testi ile değerlendirilmiştir. Sonuçlar $p < 0.05$ anlamlılık düzeyinde değerlendirilmiştir.

Bulgular

Tedavi öncesi ve tedavi sonrası klinik parametre ölçümleri, MMP-1 seviyeleri, kontrol ve test grupları için Tablo 1'de ortalamaları, standart sapmaları ve p değerleri verilmiştir.

Tedavi öncesinde PI, GI, SK, SCD, KAS değerleri kontrol ve test grubunda istatistik olarak anlamlı fark bulunmamıştır. Gruplar arası MMP-1 seviyeleri değerlendirildiğinde tedavi öncesi test grubu ile kontrol grubu arasında anlamlı fark tespit edilmiştir. Test grubunda kontrol grubuna göre daha düşük MMP-1 seviyesi tespit edilmiştir. Gruplar arası MMP-1 seviyesi tedavi sonrasında ise test grubu ile kontrol grubu arasında anlamlı fark tespit edilememiştir. MMP-1 seviyesinin grup içi değerlendirildiği durumda ise test grubunda anlamlı artış gözlemlenirken kontrol grubunda düşüş gözlenmiştir. Ancak bu düşüş istatistik olarak anlamlı bulunmamıştır. Tedavi sonunda her iki grupta da MMP-1 seviyeleri arasında fark bulunmamıştır.

Tedavi öncesi ve tedavi sonrası klinik parametre olan Pİ, Gİ, SCD, SK her iki grupta da anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0.001$). Her iki grupta tedavi sonrasında daha iyi klinik sonuçlar tespit edilmiştir.

Tartışma

Bakteriler ile konak cevabı arasındaki kompleks etkileşimin bağ dokusu ve kemik metabolizmasını etkilediği ve periodontal hasar oluşmasına neden olduğu bilinmektedir (17).

Periodontal dokularda yıkım bakteri komponentlerine karşı gerçekleştiği yapılan çalışmalar ile ispatlanmıştır (18). Bu durumda Periodontal lezyondan mikroorganizmaların

Tablo 1. Klinik parametre ölçümleri, MMP-1, tedavi öncesi, tedavi sonrası, kontrol ve test grupları için ortalama ve standart sapmaları

	Test grubu		Kontrol grubu		Student t test		Eşleştirilmiş t test	
	TG TÖ	TG TS	KG TÖ	KG TS	TG TÖ-KG TÖ p	TG TS-KG TS p	TG TÖ-TS p	KG TÖ-TS p
MMP-1	15121±3480	18414±4541	20896±1604	18763±3463	0.0001*	0.83	0.0350	0.0696
SCD	2.956±0.62	1.922±0.27	2.955±0.62	2.046±0.35	0.9	0.34	0.0003*	0.0001*
SK	2.685±0.519	0.898±0.47	2.9375±0.58	1.022±0.33	0.27	0.47	0.0001*	0.0001*
Gİ	2.200±0.659	0.903±0.40	2.620±0.67	1.088±0.58	0.13	0.37	0.0001*	0.0001*
Pİ	2.456±0.770	0.845±0.31	2.657±0.91	1.126±0.42	0.56	0.07	0.0001*	0.0001*
KAS	3.227±0.32	2.483±0.32	3.361±0.59	2.637±0.33	0.06	0.95	0.0001*	0.0001*

* istatistik olarak anlamlı fark bulunmuştur.

mümkün olan en kısa zamanda uzaklaştırılması konak için daha faydalı olacaktır. Klasik periodontal tedavide bakteriler için rezervuar etkisi gösteren dil, yanak mukozası, bademcikler, eksik yapılan SRP sonucu cep içi bakteri tutulumu tedavide başarısızlığa neden olduğu bildirilmiştir (9,11).

Kronik periodontitisli hastalarda tedavi öncesi ve tedavi sonrası MMP seviyelerinin değerlendirildiği çalışmalarda tedavi öncesinde yüksek MMP-1 seviyesi tespit edilmiştir. Periodontal tedavi sonrasında MMP-1 seviyelerinde düşüş gözlemlendiği bildirilmiştir (19,20). Doku yıkım enzimlerin çeşitliliği ve periodontitis hastalarında hangisinin etkin role sahip olduğunun halen tespit edilememiş olması ve bu enzimlerin latent ve aktif hallerinin olması sebebi ile yıkımın gözlemlenmediği bölgelerde de yüksek miktarlarda tespit edilebilmesi gibi problemler bulunduğu yapılan çalışmalarda bildirilmiştir (18,21).

Yapılan bir çalışmada MMP-1, 2, 3, 8, 9, 12 ve 13 DOS seviyelerini agresif periodontitis, kronik periodontitis ve sağlıklı kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır. MMP seviyelerinin agresif periodontitis hastalarında, kronik periodontitis ve sağlıklı bireylerden daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Araştırmalar sonlanabilir cep derinliği ile MMP aktivitesi arasında pozitif korelasyon bulamamışlardır. Hastalığın şiddeti arttıkça MMP seviyelerinde de artış olduğunu ve bu artıştan dolayı mı hastalık şiddetleniyor ya da hastalık şiddetlendiği için mi MMP seviyeleri artıyor bilgisinin açık olmadığını belirtmişlerdir (22).

Yapılan bir çalışmada, 11 ileri periodontitis hastası ve 5 sağlıklı kontrol grubu hastalardan alınan dişeti biyopsisi ve DOS örneklerinde, MMP-1, 2, 3, 9 ve TIMP-1, 2 seviyeleri değerlendirilmiştir. Araştırmacılar periodontal hastalıktan etkilenmiş dokularda yaptıkları incelemede periodontitis hastalarından alınan ilk gün MMP-1, 2, 3, 9 değerlerini sağlıklı bireylere göre artmış ve TIMP-1, 2'de azalmış olarak gözlemlenmişlerdir (23).

Yapılan birçok çalışmada MMP seviyeleri tedavi öncesi ve tedavi sonrası 3. ay ve 6. ay verileri karşılaştırılmıştır (24,25). 1 ay veya daha kısa dönem takip edilen, tedavi dönemindeki MMP değişimlerinin incelendiği çalışmalara literatürde rastlanmamıştır.

Çalışmamızda tedavi öncesi MMP-1 seviyesi test grubunda tedavi sonrasında artmıştır. Bu sonuç, literatürde daha uzun aralıklarla yapılan çalışmalar ile örtüşmemektedir (24,25). Yapılan çalışmalar sıklıkla 6 hafta ve daha uzun süreli takipler şeklinde yapılmıştır (19,20). Literatürde

antibiyotığın kullanıldığı dönem gibi kısa dönem etkilerinin incelendiği çalışmalara rastlanılmamıştır. Araştırmaya katılan gönüllülerden alınan anamnezlerde hastaların eksik bilgi vermesi ya da kronik periodontitisin farklı evrelerinin bulunması sebebi ile daha çok pasif dönemde bulunan kronik periodontitis hastalarının test grubuna dahil edilmiş olması MMP-1 değişiklikleri ile ilgili farklılığı açıklayabileceğini düşünmekteyiz (26).

Doksisisiklinin MMP inhibisyonu yaptığı çeşitli çalışmalar ile gösterilmiştir (17). Doksisisiklinin DOS'da serumun 5-10 katı daha fazla miktarda olması (3), dokuda hücre içine aktif transport sistemi ile taşınması ve uzun süre kalabilme özelliği (27), günde tek doz kullanımı gibi kolay rejim olması ve yan etkilerinin çok az gözlenmesi sebebi ile (9) periodontolojide tercih edilen antibiyotik olmayı sürdürmektedir.

Sonuç olarak; doksisisiklinin test grubunda DOS MMP-1 konsantrasyonunu artırması, doksisisiklinin MMP ler üzerine etkisi olması ile açıklanabilir. Ancak MMP-1 in aktif formu ve pasif formunun olması , çalışmamızda total MMP-1 değerine bakılmış olması ve ayrıca MMP inhibitörlerinin incelenmemiş olması çalışmamızın limitasyonlarıdır. Bu sebeplerden dolayı Kronik periodontitis hastalarında MMP seviyelerinin incelendiği matriks metalloproteinaz inhibitörlerinin ve gen expressyonlarının da değerlendirildiği, daha çok kişinin takip edildiği ileri çalışmalar gerekmektedir.

Kaynaklar

1. Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Annals of periodontology / the American Academy of Periodontology* 1999; 4(1): 1-6.
2. Walchuck RE. Periodontitis: Symptoms, Treatment and Prevention (Public Health in the 21st Century) by Rosemarie E. 2010.
3. Shaddox LM, Walker CB. Treating chronic periodontitis: current status, challenges, and future directions. *Clin Cosmet Investig Dent* 2010; 2: 79-91.
4. American Academy of Periodontology--Research S, Committee T, Dentistry AAO. Treatment of plaque-induced gingivitis, chronic periodontitis, and other clinical conditions. *Pediatric dentistry* 2005; 27(7): 202-211.
5. Van der Weijden GA, Timmerman MF. A systematic review on the clinical efficacy of subgingival debridement in the treatment of chronic periodontitis. *Journal of clinical periodontology*. 2002; 29(3): 55-71; discussion 90-91.

6. Bidault P, Chandad F, Grenier D. Systemic antibiotic therapy in the treatment of periodontitis. *J Can Dent Assoc* 2007; 73(6): 515-520.
7. Herrera D, Alonso B, León R, Roldán S, Sanz M. Antimicrobial therapy in periodontitis: the use of systemic antimicrobials against the subgingival biofilm. *J Clin Periodontol* 2008; 35(8): 45-66.
8. Plessas A. Nonsurgical periodontal treatment: review of the evidence. *Oral Health Dent Manag* 2014; 13(1): 71-80.
9. Dumitrescu AL. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2011.
10. Socransky SS, Haffajee AD. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontol* 2000 2002; 28: 12-55.
11. Slots J. Selection of antimicrobial agents in periodontal therapy. *Journal of periodontal research* 2002; 37(5): 389-398.
12. Ejeil AL, Igondjo-Tchen S, Ghomrasseni S, Pellat B, Godeau G, Gogly B. Expression of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) in healthy and diseased human gingiva. *Journal of periodontology* 2003; 74(2): 188-195.
13. Shingleton WD, Hodges DJ, Brick P, Cawston TE. Collagenase: a key enzyme in collagen turnover. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire* 1996; 74(6): 759-775.
14. Newman MG, Takei H, Klokkevold PR, Carranza FA. *Carranza's Clinical Periodontology*: Elsevier Health Sciences; 2011.
15. Cionca N, Giannopoulou C, Ugolotti G, Mombelli A. Amoxicillin and metronidazole as an adjunct to full-mouth scaling and root planing of chronic periodontitis. *Journal of periodontology* 2009; 80(3): 364-371.
16. Eberhard J, Jepsen S, Jervoe-Storm PM, Needleman I, Worthington HV. Full-mouth disinfection for the treatment of adult chronic periodontitis. *The Cochrane database of systematic reviews* 2008(1): Cd004622.
17. Yucel-Lindberg T, Bage T. Inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontitis. *Expert reviews in molecular medicine* 2013; 15: 7.
18. Uitto VJ, Overall CM, McCulloch C. Proteolytic host cell enzymes in gingival crevice fluid. *Periodontology* 2000 2003; 31: 77-104.
19. Tuter G, Kurtis B, Serdar M. Effects of phase I periodontal treatment on gingival crevicular fluid levels of matrix metalloproteinase-1 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1. *Journal of periodontology* 2002; 73(5): 487-493.
20. Ghodpage PS, Kolte RA, Kolte AP, Gupta M. Influence of phase I periodontal therapy on levels of matrix metalloproteinase 1 and tissue inhibitor of metalloproteinase 1. *The Saudi Dental Journal* 2014; 26(4): 171-175.
21. Armitage GC. Analysis of gingival crevice fluid and risk of progression of periodontitis. *Periodontology* 2000 2004; 34: 109-119.
22. Alfant B, Shaddox LM, Tobler J, Magnusson I, Aukhil I, Walker C. Matrix metalloproteinase levels in children with aggressive periodontitis. *Journal of periodontology* 2008; 79(5): 819-826.
23. Soell M, Elkaim R, Tenenbaum H. Cathepsin C, matrix metalloproteinases, and their tissue inhibitors in gingiva and gingival crevicular fluid from periodontitis-affected patients. *Journal of dental research* 2002; 81(3): 174-178.
24. Goncalves PF, Huang H, McAninley S, Alfant B, Harrison P, Aukhil I, et al. Periodontal treatment reduces matrix metalloproteinase levels in localized aggressive periodontitis. *Journal of periodontology* 2013; 84(12): 1801-1808.
25. Marcaccini AM, Meschiari CA, Zuardi LR, De Sousa TS, Taba M, Teofilo JM, et al. Gingival crevicular fluid levels of MMP-8, MMP-9, TIMP-2, and MPO decrease after periodontal therapy. *Journal of clinical periodontology* 2010; 37(2): 180-190.
26. Lindhe J, Lang NP, Karring T. *Clinical Periodontology and Implant Dentistry*: Wiley 2009.
27. Yu L, Liu H, E L, Wu X, Wang D. Uptake of metronidazole by human gingival fibroblasts. *Journal of periodontology* 2009; 80(6): 993-998.