

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم الاستاز در مایع شیار لتهای بیماران پریودنتال

دکتر دردی قوجق* - دکتر بابک عمویان** - دکتر پریسا ذبیحی***

* دانشیار گروه آموزشی بیوشیمی و بیوفیزیک، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی بابل

** استادیار گروه آموزشی پریودنتیکس، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی بابل

*** دندانپزشک

Title: An evaluation on elastase enzyme activity in gingival crevicular fluid in periodontitis

Authors: Qujeq D. Associate Professor*, Amoeian B. Assistant Professor**, Zabihi P. Dentist

Address: *Dept. of Biochemistry, Faculty of Medicine, Babol University of Medical Sciences

**Dept. of Periodontics, Faculty of Dentistry, Babol University of Medical Sciences

Statement of Problem: Changes in protein levels, host calls enzymes and inflammatory mediators in gingival crevicular Fluid (GCF) are considered as diagnostic indicators of Periodontitis.

Purpose: the aim of the present study was to measure the elastase enzyme activity in gingival crevicular Fluid among patients with periodontitis.

Material and Methods: In this study, 52 periodontitis patients (experimental group) and 51 healthy subjects without any gingival inflammation (control group) were participated. Subjects of the periodontitis group showed pockets of 4-5 mm depth without gingival enlargement and recession or pockets of 1-2 mm depth with gingival recession. For enzyme activity measurement, 100 μ l of gingival fluid of each sample was mixed with 100 μ l of enzyme substrate on the tube. The mixture was incubated at 34 $^{\circ}$ C for 1h with a buffer solution of 1ml volume and absorbance was read at 410nm with spectrophotometer. The enzyme activity differences between two groups were analyzed by student t test.

Results: The elastase enzyme activity in gingival crevicular fluid in subjects with periodontium destruction and control subjects was 153 \pm 11.3 and 52.7 \pm 10.4 enzyme unit in ml per minute, respectively. The difference between groups was statistically significant ($P < 0.05$).

Conclusion: Based on the findings of this study, the measurement of elastase enzyme activity could be a useful indication of tissue changes that may ultimately manifest clinically as periodontitis.

Keywords: Gingival crevicular fluid; Elastase; Periodontal disease

Journal of Dentistry. Tehran University of Medical Sciences (Vol. 16; No.1; 2003)

چکیده

بیان مسأله: تغییرات میزان پروتئین‌ها، آنزیم‌های سلول‌های میزبان و مدیاتورهای التهابی در مایع شیار لتهای از شاخصهای تشخیصی پریودنتیت هستند.

هدف: مطالعه حاضر با هدف اندازه‌گیری فعالیت آنزیم الاستاز در مایع شیار لتهای بیماران پریودنتال انجام شد.

روش بررسی: در این مطالعه شاهد-موردی، ۵۲ بیمار مبتلا به پریودنتیت (گروه مورد) با عمق پاکت ۴-۵ میلی‌متر بدون افزایش حجم یا تحلیل لته و یا عمق پاکت ۱-۲ میلی‌متر همراه با تحلیل لته به اندازه ۳-۴ میلی‌متر و ۵۱ نفر بدون التهاب لته (گروه شاهد) مورد مطالعه قرار گرفتند و از شیار لتهای هر دو گروه نمونه‌برداری شد. برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم الاستاز مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از هر نمونه تهیه شده از شیار لتهای با مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از سوبسترای آنزیم مخلوط گردید و به لوله آزمایش انتقال داده شد. مخلوط بدست آمده به

همراه بافر به حجم ۱ میلی لیتر در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت یک ساعت انکوبه شد و جذب نوری هر یک در طول ۴۱۰ نانومتر توسط اسپکتروفوتومتر قرائت شد. پس از به دست آوردن مقادیر فعالیت آنزیمی، اختلاف بین دو گروه با استفاده از آزمون آماری Student t تحلیل گردید.

یافته‌ها: فعالیت آنزیم الاستاز در مایع شیار لته‌ای در افرادی که تخریب پرپودنشیم داشتند برابر با $153/8 \pm 11/3$ و در گروه شاهد برابر با $52/7 \pm 10/4$ واحد آنزیمی در میلی‌لیتر در دقیقه بود و اختلاف نتایج دو گروه از نظر آماری معنی‌دار بود ($P < 0/05$).

نتیجه‌گیری: با توجه به یافته‌های این مطالعه می‌توان چنین نتیجه گرفت که اندازه‌گیری فعالیت الاستاز می‌تواند شاخص خوبی برای بررسی پرپودنتیت باشد.

کلید واژه‌ها: مایع شیار لته‌ای؛ الاستاز؛ بیماری پرپودنتیت

مجله دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی تهران (دوره ۱۶، شماره ۳، سال ۱۳۸۲)

مقدمه

اکسیژن و پروتئازها افزایش یابد، ممکن است آلفا یک آنتی‌تریپسین غیر فعال گردد و در نتیجه به مدت طولانی در مایع شیار لته‌ای پایدار باقی بماند (۳،۲،۱). طبق مطالعات انجام‌شده توسط محققان، افزایش فعالیت الاستاز در مایع شیار لته‌ای نشانگر پیشرفت پرپودنتیت است (۴،۲،۱). از جمله روش‌های موجود برای تشخیص پرپودنتیت می‌توان به رادیوگرافی و میزان تخریب بافت پرپودنشیم اشاره کرد. این دو روش گذشته‌نگر و غیرحساس می‌باشند؛ زیرا زمانی توانایی تشخیص دارد که حداقل چند میلی‌متر ارتباط بین بافت و دندان تخریب شده و از بین رفته باشد. بررسی کمی ترکیبات در مایع شیار لته‌ای (GCF) برای شناسایی محل‌هایی که احتمالاً ارتباط بین لته و دندان از بین رفته است، مناسب‌تر می‌باشد (۲-۶). یکی از این ترکیبات که در سال‌های اخیر مورد توجه بسیاری قرار گرفته، آنزیم الاستاز است. نتایج مطالعات مختلف نشان داده است که فعالیت الاستاز در پرپودنتیت تغییر می‌یابد (۱۰-۶)؛ در طول التهاب لته‌ای یا ژنژیویت تجربی نیز فعالیت الاستاز افزایش می‌یابد (۱۱). علاوه بر این، کاهش در فعالیت الاستاز مایع شیار لته‌ای بعد از درمان بیماران با التهاب لته‌ای مشاهده شده است (۱۲). نتایج مطالعه گذشته‌نگر بیماران با ژنژیویت درمان نشده نشان داده است که الاستاز مایع شیار لته‌ای در محل‌هایی که از دست دادن پیوستگی بین

التهاب بافت‌های اطراف دندان، اختلالی است که به بررسی میزان تخریب بافت پرپودنشیم مربوط می‌شود. معمولاً تخریب بافت پرپودنشیم توسط رادیکال‌های آزاد اکسیژن و پروتئازهای فعال در طی واکنش بین باکتری و سیستم دفاعی بدن ایجاد می‌شود (۲،۱). آنزیم الاستاز یک سرین پروتئاز است که در گرانول‌های گرانولوسیت‌های نوتروفیلی ذخیره می‌شود؛ این آنزیم، الاستین و برخی پروتئین‌های مهم ساختمانی را در بافت‌های پوشاننده، نگهدارنده دندان، بافت پرپودنشیم، لته و استخوان فک تجزیه می‌نماید؛ همچنین الاستاز می‌تواند کلاژن و پروتوگلیکان‌های غشای پایه را نیز تجزیه نماید. به طور کلی الاستاز فعال، در طی مراحل فاگوسیتوز پس از نکروز سلولی آزاد می‌شود. رها شدن مقدار زیاد الاستاز، سبب تخریب بافت می‌گردد. الاستاز آزاد شده در داخل بافت توسط دو مهارکننده به نام آلفا- یک آنتی‌تریپسین و آلفا- دو - ماکروگلوبین مهار می‌گردد. آلفا- یک آنتی‌تریپسین، پروتئازی است که به مقدار زیاد در مایع شیار لته‌ای وجود دارد و نقش آن کنترل فعالیت آنزیم الاستاز نوتروفیلی است. مقدار آلفا- یک آنتی‌تریپسین معمولاً برای کنترل فعالیت پروتئاز آزاد در افراد نرمال کافی است. در شرایطی که در مایع شیار لته‌ای مقدار رادیکال‌های آزاد

دندان و لته بیش از ۶ ماه بوده، به مقدار زیاد افزایش می‌یابد. این محققان پیشنهاد کرده‌اند که اندازه‌گیری الاستاز در پریدنتیت برای بررسی و ارزیابی پیوستگی بین لته و دندان بسیار مفید است (۱۳). از طرفی مایع شیار لته‌ای، یک ماده تراوش یافته التهابی است و حاوی ترکیبات تجزیه شده از بافت پریدنتال است که در اثر پیشرفت پریدنتیت حاصل می‌شود (۱۴، ۱۵). مواد زیادی در مایع شیار لته‌ای قابل اندازه‌گیری است که شامل پروتئین‌ها، آنزیم‌های سلول‌های میزبان و مدیاتورهای التهابی که آنها برای تشخیص پریدنتیت قابل استفاده می‌باشند (۱۶، ۱۷).

اندازه‌گیری پروتئاز مایع شیار لته‌ای بسیار مناسب است؛ زیرا ارزش کافی برای پیش بینی تشخیص پریدنتیت را دارد (۱۸). مطالعه حاضر با هدف بررسی توزیع و اندازه‌گیری فعالیت آنزیم الاستاز در مایع شیار لته‌ای در بیماران پریدنتال مراجعه‌کننده به بخش پریدنتولوژی دانشکده دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی بابل انجام شد.

روش بررسی

در این مطالعه شاهد-موردی نمونه‌برداری از دو گروه افراد بیمار و سالم انجام شد. معیار ورود افراد به گروه مورد داشتن عمق پاکت در حدود ۴-۵ میلی‌متر بدون افزایش حجم یا تحلیل لته یا با عمق پاکت ۲-۱ میلی‌متر همراه با تحلیل لته به اندازه ۳-۴ میلی‌متر بود. ۸۰٪ بیماران از بهداشت دهانی ضعیفی برخوردار بودند. تقریباً ۹۲٪ از افراد مورد مطالعه مبتلا به پریدنتیت مزمن و ۸٪ باقیمانده مبتلا به پریدنتیت تهاجمی بودند. در پرونده ۷۰٪ از بیماران علاوه بر درمانهای پرئو، سایر درمانهای دهان و دندان از قبیل ترمیمی، اندو، پروتز نیز درج شده بود. در ۶۵٪ از بیماران عوامل مستعدکننده به بیماری پریدنتال مثل مصرف سیگار وجود داشت. تنها یک نفر مبتلا به تالاسمی‌ماژور و HBS-Ag مثبت بود و بقیه افراد مشکل سیستمیک نداشتند یا داروی

خاصی مصرف نمی‌کردند. میانگین پلاک ایندکس بیماران حدود ۸۰-۷۰٪ بود. افرادی که داروهای خاص مصرف می‌کردند و یا مبتلا به بیماری سیستمیک بودند، از مطالعه حذف می‌شدند. لازم به ذکر است نمونه‌برداری در ۷۰٪ از افراد، قبل از شروع درمان و طی جلسات اول، دوم و سوم انجام شد. نمونه‌برداری از افراد گروه مورد طی مدت دوازده هفته انجام شد؛ سپس برای انجام آزمایش بعدی مورد استفاده قرار گرفت. تعداد بیماران در گروه مورد ۵۲ نفر (۳۸ نفر مرد با متوسط سنی $31/4 \pm 6/2$ سال و ۱۴ نفر زن با متوسط سنی $34/5 \pm 7/9$ سال) بود.

در افراد گروه شاهد نشانه‌هایی از التهاب و تحلیل لته مشاهده نشد؛ همچنین از لحاظ سن و جنس مشابه گروه مورد بودند. نمونه‌برداری طی مدت دوازده هفته انجام شد؛ سپس برای انجام آزمایش بعدی مورد استفاده قرار گرفت. تعداد افراد این گروه ۵۱ نفر (۲۸ مرد با متوسط سنی $29/7 \pm 8/3$ سال و ۲۳ زن با متوسط سنی $32/4 \pm 5/6$ سال) بود. در این افراد از ۲-۴ محل، نمونه‌برداری شد.

در مشاهدات رادیوگرافی این بیماران علاوه بر یافته‌های کلینیکی، علائم خاصی مشاهده نشد. این افراد بیماری سیستمیک خاصی نداشتند و داروی خاصی مصرف نمی‌کردند. در پرونده آنها انجام معالجات پرئو جز در حد جرمگیری ساده درج نشده بود؛ هر چند به سایر درمانهای دهان و دندان نیاز داشتند. این افراد از بهداشت دهانی در حد متوسط تا خوب برخوردار بودند.

برای نمونه‌برداری از مخروطهای کاغذی مورد استفاده در درمانهای اندو به اندازه ۳۰ و ۳۵ درجه، لوله‌های آزمایش دورهام به حجم ۰/۳ میلی لیتر، آینه دندانپزشکی و پروب پریدنتال استفاده شد.

نمونه‌برداری با استفاده از نوارهای جاذب کاغذی به روش بریل انجام شد؛ ابتدا عمیق‌ترین و مناسب‌ترین پاکت در

بیماران پرپودنتال با کنار زدن گونه از طریق آزمایش پروب انتخاب شد. سپس با آینه دندانپزشکی، محل نمونه‌گیری با استفاده از پنبه استریل جدا شد و سرنگ هوا خشک گردید. هر پاکت ۳ بار با بافر فسفات شسته شد؛ سپس نوک فیلتر توسط پنس وارد پاکت شد؛ به نحوی که حداقل فیلتر با یکی از دیواره‌های پاکت در تماس باشد؛ سپس به همان حالت به مدت ۲-۱ دقیقه ثابت نگه داشته شد؛ به نحوی که حداقل ۱ میلی متر طول کاغذ در پاکت قرار داشت؛ بعد به آرامی فیلتر از پاکت جدا شد؛ در حالی که مایع شیار لته‌ای حاصل حدود ۲ میلی لیتر از انتهای کاغذ به حجم تقریبی ۱۰ میلی مولار آغشته شده بود وارد لوله آزمایش گردید. نمونه‌ها با دقت به لوله‌های آزمایش انتقال داده شد؛ به طوری که نوک کاغذ که به نمونه آغشته بود، در ته لوله قرار گرفت؛ سپس در ظرف نمونه با پارافیلیم بسته شد و از نمونه‌ها در دمای ۴ درجه در یخچال تا روز انجام آزمایش نگهداری شد.

همه نمونه‌ها و نیز نمونه استاندارد با استفاده از بافر فسفات ۱۰ میلی مولار با $\text{pH}=7/5$ تهیه شدند؛ همچنین بافر بیکربنات ۲۰ میلی مولار با $\text{pH}=9/5$ مورد استفاده قرار گرفت.

سوبسترا الاستاز (ال- پیروگلوتامیل- ال- پرولیل- ال- والین- پ- نیترو آنیلین با وزن مولکولی ۴۴۵/۵ دالتون) دردی متیل سولفاید در غلظت ۱۰ میلی مول در لیتر تهیه شد و در هنگام آزمایش تا غلظت ۱ میلی مول در لیتر در بافر فسفات رقیق گردید. سوبسترای آلکالین فسفاتاز (پارا- نیترو- فنل فسفات) تا ۵ میلی مول در لیتر در بافر دی اتانل آمین با $\text{pH}=9/8$ رقیق شد. مقدار پارا- نیترو آنیلین آزاد شده با مقدار پارانیتر آنیلین استاندارد مقایسه گردید. هر یک از نمونه‌های تهیه شده از هر شخص (در هر دو گروه کنترل و بیمار) با بافر فسفات تا حجم ۱ میلی لیتر رقیق شد.

نمونه‌های تهیه‌شده پس از جمع‌آوری در دور ۳۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شدند و محلول رویی جهت انجام

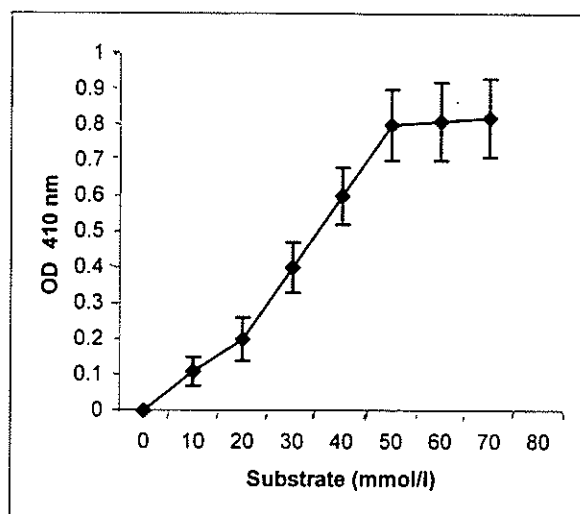
مقادیر فعالیت آنزیمی بر حسب میانگین و انحراف معیار به دست آمد و اختلاف بین دو گروه مورد و شاهد با استفاده از آزمون آماری Student t و با اطمینان ۹۵٪ بررسی گردید.

یافته‌ها

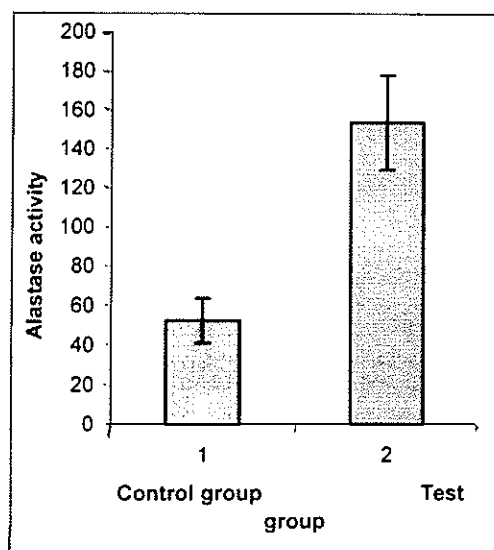
در تصویر ۱ منحنی استاندارد اندازه‌گیری فعالیت الاستاز مایع شیار لته‌ای نشان داده شده است. مقدار فعالیت الاستاز در مایع شیار لته‌ای در نمونه‌های افراد مبتلا به پرپودنتیت نسبت به افراد شاهد (بدون پرپودنتیت) بالاتر بود؛ همچنین فعالیت آنزیم الاستاز در مایع شیار لته‌ای در افرادی که تخریب پرپودنشیما داشتند $153/8 \pm 11/3$ واحد آنزیمی در میلی‌لیتر در دقیقه نسبت به افراد دیگر گروه شاهد $52/7 \pm 10/4$ واحد آنزیمی در میلی‌لیتر در دقیقه بود که این

جدول ۲- فعالیت آنزیم الاستاز توتال، الاستاز آزاد و الاستاز مهارشده با آلفا- یک آنتی تریپسین در مایع شیار لته‌ای

مقدار فعالیت آنزیمی (واحد آنزیمی در میلی لیتر در دقیقه)	متغیرها
۹۶/۳ ± ۸/۴	الاستاز توتال
۲۱/۴ ± ۴/۹	الاستاز آزاد
۵۶/۹ ± ۵/۶	الاستاز مهارشده با آلفا-یک آنتی تریپسین



تصویر ۱- منحنی استاندارد اندازه‌گیری فعالیت آنزیم الاستاز مایع شیار لته‌ای



تصویر ۲- مقایسه فعالیت آنزیم الاستاز مایع شیار لته‌ای در افراد گروه شاهد

اختلاف از نظر آماری معنی‌دار بود ($P < 0.05$) (تصویر ۲). در جدول ۱، بررسی کلینیکی و تعیین فعالیت آنزیم الاستاز در محل‌هایی از نمونه‌های گروه مورد و شاهد و در جدول ۲، فعالیت آنزیم الاستاز توتال، الاستاز آزاد و الاستاز مهارشده با آلفا- یک آنتی تریپسین در مایع شیار لته‌ای نشان داده شده است.

بحث

در گذشته پرودنتیت بر اساس بررسی‌های رادیوگرافیکی، از دست دادن آلوئولار استخوان، بررسی‌های مدت زمان ضایعه و بررسی‌های کلینیکی شامل عمق پاکت و میزان از دست دادن چسبندگی، گسترش التهاب، رسوب میکروبی و حضور آگزودا تشخیص داده می‌شد و بر آن اساس نیز درمان می‌گردید. مطالعات طولانی مدت و پیگیری آن و نیز بازنگری این بیماران در سال‌های اخیر نشان داده است که این روشها برای تشخیص پرودنتیت و همچنین برای درمان آن مناسب نمی‌باشد و پاکت‌های پرودنتال از نظر بیماری، می‌تواند فعال و یا غیرفعال باشد. این روشها نمی‌توانند محل‌های فعال و غیرفعال را از هم افتراق دهند؛ به همین دلیل روشی بهتر برای تشخیص محل‌های فعال و غیرفعال از نظر بیماری مورد نیاز است. محققان نشان داده‌اند که بررسی کمی تغییر ترکیبات در مایع شیار لته‌ای برای شناسایی محل‌هایی که ارتباط بین لته و دندان از بین رفته است، مناسب‌تر است (۲-۶).

جدول ۱- بررسی کلینیکی و تعیین فعالیت الاستاز در نمونه‌های گروه مورد و شاهد

متغیرها	گروه کنترل	گروه بیمار
فعالیت الاستاز	۵۲/۷ ± ۱۰/۴	۱۵۳/۸ ± ۱۱/۳
عمق پروب (میلی متر)	۳/۴ ± ۰/۶۲	۷/۲ ± ۰/۶۵

برحسب واحد آنزیمی در میلی لیتر در دقیقه است.

همراه با تخریب بافت بالا است و این آنزیم در این محل فعالیت بیشتری دارد؛ بنابراین می‌تواند سبب تخریب پروتئین‌های مهم بافتهای بدن از جمله سبب تخریب کلاژن و الاستین شود. این یافته‌ها با نتایج سایر محققان منطبق و قابل مقایسه است (۳، ۱۷۶)؛ طبق نتایج این تحقیق افزایش فعالیت آنزیم الاستاز با افزایش اندازه عمق مطلق پاکت و میزان پرپودنشیم هماهنگی دارد؛ بنابراین با توجه به محدودیتهای این مطالعه، می‌توان چنین نتیجه گرفت که افزایش فعالیت آنزیم الاستاز مایع شیار لتهای با پیشرفت بیماری پرپودنتال همراه و هماهنگ است.

تشکر و قدردانی

این تحقیق با حمایت معاونت پژوهشی دانشکده دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی بابل در قالب پایان نامه به انجام رسید که بدین وسیله تشکر و قدردانی می‌گردد. همچنین از مدیریت و کارکنان محترم بخش بیوشیمی-بیوفیزیک دانشگاه به دلیل فراهم کردن امکانات و تجهیزات لازم برای انجام آزمایشها سپاسگزاری می‌گردد.

یکی از عواملی که در سالهای اخیر خیلی مورد توجه قرار گرفته، آنزیم الاستاز است؛ پروتئازی که در مایع شیار لتهای وجود دارد و در داخل پاکت‌های پرپودنتال قرار می‌گیرد. یافته‌های مطالعه حاضر نشان داد که مقدار فعالیت الاستاز در محل‌های همراه با تخریب بافت، بالا و مقدار زیادی از این الاستاز به صورت آزاد است. بر خلاف این یافته برخی از محققان، وجود الاستاز آزاد را در مایع شیار لتهای گزارش نداده‌اند؛ این اختلاف نظر شاید به دلیل اختلاف روش اندازه‌گیری و تفاوت در حساسیت و دقت در روش اندازه‌گیری فعالیت آنزیم الاستاز و یا مربوط به شرایط استخراج و خالص‌سازی آن آنزیم باشد (۱۹). از طرفی نفوذ پلازما به مایع شیار لتهای فعالیت آنزیم الاستاز را در مایع شیار لتهای مهار می‌نماید؛ بنابراین ممکن است روش تهیه نمونه نیز دلیل دیگر اختلاف یافته‌های مطالعه حاضر با نتایج سایر محققان باشد. اگر چه ممکن است الاستاز اثرات مفیدی بر تغییرات طبیعی بافتها داشته باشد و بر علیه عفونتها فعال باشد، اما مقدار زیاد آن می‌تواند سبب تخریب بافت شود. یافته‌های مطالعه حاضر نشان داد که فعالیت آنزیم الاستاز در محل‌هایی

منابع:

- 1 - Figueredo C, Gustafsson A. Activity and inhibition of elastase in GCF. *J Clin Periodontol* 1998; 25: 531-35.
- 2 - Armitay GC. Diagnosing periodontal disease and monitoring the response to periodontal therapy. In perspective of oral antimicrobial therapeutics Littleton, MA: PSG; 1987: 47-60.
- 3 - Johnson NW. Crevicular fluid- based diagnostic tests *Curr. Opin Dent* 1991; 1: 52-65.
- 4- Ranney RR. Diagnosis of periodontal disease. *Adv Dent Res* 1991; 1: 25-36.
- 5 - Lamster IB, Karabin SD. Periodontal disease activity. *Curr Opin Dent* 1992; 2: 39-53.
- 6- Armitage CC. Diagnostic test for periodontal disease. *Curr Opin Dent* 1992; 2: 53-62.
- 7 - Kunimatsu K, Chimaru E, Kato L. Granulocyte medullasin levels in gingival -crevicular fluid from chronic adult periodontitis patients and experimental gingivitis subjects. *J Periodont Res* 1990; 25: 352-57.
- 8- Zafirovlos GK, Flores- de- Jacoby L, Todt G, Kolb G, Havemeann K, Tatakis DN. Gingival crevicular fluid elastase- inhibitor complex: Correlation with clinical indices and subgingival flora. *J Periodont Res* 1991; 26: 24-32.
- 9- Eley BM, Cox SW. Cathepsin B/L elastase, trypsin, trypsin- and dipeptidyl peptidase IV- like activities in gingival crevicular fluid: Correlation with clinical parameters in untreated chronic periodontitis patients. *J Periodont Res* 1992; 27:62-69.
- 10- Gustafson A, Asman B, Bergstrom K, Soder P. Granulocyte elastase in gingival crevicular fluid. A possible

discriminator between gingivitis and periodontitis. *J Clin Periodontol* 1992; 19: 535-40.

11- Darany DG, Beck FM, Walters JD. The relationship of gingival fluid leukocyte elastase activity to gingival fluid flow rate. *J Periodontol* 1992; 63: 743-47.

12- Giannopoulou C, Andersen E, Demeurisse C, Cimasoni G. Neutrophil elastase and its inhibitors in human gingival crevicular fluid during experimental gingivitis. *J Dent Res* 1992; 71: 359-63.

13- Eley BM, Con SW, Gathpsin BL. Elastase trypsin and dipeptidyl peptidase IV-like activities in gingival crevicular fluid: A comparison of levels before and after periodontal surgery in chronic periodontitis patients. *J Periodontol* 1992; 63: 412-17.

14- Loe H, Holm-Pederson P. Absence and presence of fluid from normal and inflamed gingiva. *Periodontics* 1965; 3: 171-75.

15- Cimasoni G. Crevicular fluid updated. *Monogr Oral Sci.* 1983; 12: III-VII, 1-152.

16- Last KS, Stanburg JB, Embery G. Glycosaminoglycans in human gingival crevicular as indicators of active periodontal disease. *Arch Oral Biol* 1985; 30: 275-78.

17- Offenbacher S, Odle BM, Van Dyke TE. The use of crevicular fluid prostaglandin E2 level as a predictor of periodontal attachment loss. *J Periodont Res* 1986; 21: 101-12.

18- MC Culloch C. Host enzymes in gingival crevicular fluid as diagnostic indicators of periodontitis. *J Clin Periodontol* 1994; 21: 497-506.

19- Giannopoulou C, Andersen E, Demeurisse S, Cimasoni G. Neutrophil elastase and its inhibitors in human gingival crevicular fluid during experimental gingivitis. *J Dent Res* 1992; 71: 359-63.