

بررسی رابطه بین میزان سیستاتین C موجود در بزاق تام و پریودنتیت مزمن

محمدحسن نجفی نشلی*، مرتضی طاهری*، هوشنگ رفعت‌پناه**، امیر معین تقوی***، مجیدرضا مختاری****#

مریم محمدزاده رضایی*****، فاطمه فرازی*****

* دانشیار گروه پریودانتیکس، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد

** دانشیار گروه ایمنولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد

*** استاد گروه پریودانتیکس، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد

**** استادیار پریودانتیکس، مرکز تحقیقات بیماری‌های دهان، فک و صورت، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد

***** دستیار تخصصی گروه دندانپزشکی کودکان، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد

***** استادیار گروه بیماری‌های دهان، دانشگاه علوم پزشکی بجنورد

تاریخ ارائه مقاله: ۹۱/۶/۱۲ - تاریخ پذیرش: ۹۲/۲/۳

Evaluation of the Relationship between Cystatin C Level in Whole Saliva and Chronic Periodontitis

Mohammad Hassan Najafi Neshli*, Morteza Taheri*, Hooshang Rafatpanah**, Amir Moeintaghavi***, Majid Reza Mokhtari****#, Maryam Mohammadzade Rezae*****, Fateme Farazi*****

* Associate Professor, Dept of Periodontics, School of Dentistry, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

** Associate Professor, Dept of Immunology, School of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

*** Professor, Dept of Periodontics, School of Dentistry, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

**** Assistant Professor of Periodontics, Oral & Maxillofacial Research Center, School of Dentistry, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

***** Postgraduate Student, Dept of Pediatric Dentistry, School of Dentistry, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

***** Assistant Professor, Dept of Oral Medicine, Bojnord University of Medical Sciences, Bojnord, Iran

Received: 2 September 2012; Accepted: 23 April 2013

Introduction: Chronic periodontitis is an infectious disease resulting in inflammation in tooth supporting tissues, advanced attachment loss and bone loss. Destructive process is a result of imbalance between analyzing enzymes such as MMPs and their inhibitors. This imbalance can also occur with other enzymes such as lysosomal cysteine proteinase, Katpsyn and their inhibitor such as cystatin. Cystatin C is a protein which controls activity of extracellular cysteine proteinase in inflammatory conditions. The aim of this study was to evaluate the protective role of salivary cystatin C in periodontal disease.

Materials & Methods: Twenty six patients with chronic periodontitis examined by a periodontist and also with a minimum pocket depth of six mm and more in at least eight locations in the mouth were selected. To collect Total non-irritating saliva samples, the spit method was used. Salivary levels of cystatin C was evaluated by ELISA method. Data were analysed by SPSS version 11.5 software.

Results: The level of cystatin C in periodontally diseased subjects was higher than that of the control group, but the difference was not statistically significant ($P=0.24$). In the female group with control of age variant, the level of cystatin C was significantly higher in patients with periodontitis ($P=0.036$), whereas in male group, the difference was not significant ($P=0.086$). It seems that the lower periodontal destruction in female group is as a result of higher level of cystatin C.

Conclusion: The level of cystatin C in whole saliva could be used as a marker in chronic periodontitis.

Key word: Cystatin C, saliva, chronic periodontitis.

Corresponding Author: Mokhtarimr@mums.ac.ir

چکیده

مقدمه: پریدونتیت مزمن یک بیماری عفونی است که منجر به آماس در بافت‌های حمایت‌کننده دندان، از دست رفتن اتصالات به صورت پیشرونده و تحلیل استخوان می‌گردد. روند تخریبی در نتیجه عدم تعادل بین آنزیم‌های تجزیه‌کننده مثل MMPها (Matrix metalloproteinase) و مهارکننده‌های آنها می‌باشد. این عدم تعادل همچنین می‌تواند با آنزیم‌های تجزیه‌کننده دیگر مثل سیستین پروتئیناز لیزوزومال، کاتپسین‌ها و مهارکننده‌های آنها (سیستاتین‌ها) اتفاق بیفتد. سیستاتین C پروتئینی است که فعالیت سیستین پروتئیناز خارج سلولی را در شرایط التهابی کنترل می‌کند. از آنجا که سیستاتین C یک مهارکننده سیستین پروتئیناز است و در پریدونشیوم ملتهب می‌تواند نقش پیشگیری و محافظتی داشته باشد، در این مطالعه به بررسی میزان سیستاتین C موجود در بزاق تام در افراد سالم و افراد دارای بیماری پریدونتیت مزمن پرداخته شد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه Case-Control، تعداد ۲۶ بیمار مبتلا به پریدونتیت مزمن انتخاب شدند. تمامی بیماران دارای پاکت با عمق حداقل ۶ میلی‌متر، در حداقل ۸ محل خونریزی حین پروبینگ (BOP)، از دست رفتن چسبندگی لته (AL) و اندکس پلاک بالا بودند. گروه کنترل شامل ۲۶ نفر در همان رده سنی با پریدونشیوم سالم بودند. در تمام افراد، نمونه بزاق تام غیرتحریکی جمع‌آوری شد. میزان سیستاتین C بزاقی به روش الیزا (ELISA) اندازه‌گیری شد. برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از *t*-test و آزمون مدل خطی عمومی (General linear model) استفاده شد.

یافته‌ها: میزان سیستاتین C بزاقی در گروه بیماران، بیشتر از گروه سالم بود، اما از نظر آماری تفاوت معنی‌داری نداشت ($P=0/24$). آنالیز آماری نشان داد که علاوه بر این که سن و جنس بر میزان سیستاتین C بزاقی مؤثر بوده است، اثر متقابل نیز وجود داشت. در جنس مؤنث با کنترل متغیر سن، میزان سیستاتین C بزاقی در گروه بیمار به طور معنی‌داری بیشتر از گروه سالم بود. ($P=0/36$) در حالی که در جنس مذکر این تفاوت از نظر آماری معنی‌دار نبود.

نتیجه‌گیری: اندازه‌گیری سطوح سیستاتین C بزاقی می‌تواند بعنوان مارکری در پریدونتیت مزمن در افراد مؤنث در نظر گرفته شود.

واژه‌های کلیدی: سیستاتین C، بزاق، پریدونتیت مزمن.

مجله دانشکده دندانپزشکی مشهد / سال ۱۳۹۲ دوره ۳۷ / شماره ۳: ۵۶-۲۴۹.

مقدمه

از بین رفتن اتصالات و تحلیل استخوان با افزایش

نسبت ارگانسیم‌های گرم منفی در پلاک زیر لته‌ای و افزایش ارگانسیم‌هایی که به طور اختصاصی پاتوژن شناخته شده‌اند، ارتباط دارد.^(۱)

در پاسخ به اندوتوکسینی که از پاتوژن‌های پریدونتال ترشح می‌شود، تعدادی واسطه التهابی وابسته به استئوکلاست، بافت استخوانی و بافت همبند اطراف دندان مانند لیگامان پریدونتال را هدف قرار داده و آنها را تخریب می‌کنند. عوامل اصلی پیشبرنده این تخریب وسیع بافتی، ماتریکس متالوپروتئینازها (Matrix Metalloproteinase)، کاتپسین‌ها (Cathepsins) و دیگر

پریدونتیت مزمن یک بیماری عفونی است که منجر به آماس در بافت‌های حمایت‌کننده دندان، از دست رفتن اتصالات به صورت پیشرونده و تحلیل استخوان می‌گردد.^(۱) یافته‌های بالینی پریدونتیت مزمن درمان نشده عبارتند از: تشکیل پلاک بالای لته و زیرلته‌ای که غالباً با تشکیل جرم همراه است، آماس لته، تشکیل پاکت، از بین رفتن اتصالات و تحلیل استخوان آلوئول. این بیماری یک بیماری مختص به موضع (Site-Specific)، به شمار می‌آید و علائم بالینی به اثرات مستقیم تجمع پلاک زیرلته‌ای نسبت داده می‌شود.

آنزیم‌های وابسته به استئوکلاست هستند.^(۳)

خشکی دهان (با تایید بخش تشخیص بیماری‌های دهان دانشکده) انتخاب شدند، و توسط پرپودنتیست معاینه شدند. تمام بیماران دارای پاکت با عمق حداقل ۶ میلی‌متر، در حداقل ۸ محل در دهان بودند و نیز دارای خونریزی حین پروبینگ (BOP) در همان نواحی، از دست رفتن چسبندگی لته (AL) و پلاک اندکس بالا بودند. این گروه شامل ۱۳ مرد و ۱۳ زن بودند و همگی در رده سنی ۵۰-۴۰ سال قرار داشتند. این افراد از نظر سیستمیک کاملاً سالم بوده و مبتلا به خشکی دهان، بیماری‌های مربوط به غدد بزاقی و همچنین سایر بیماری‌های دهانی که سبب تغییر در ترکیبات بزاق می‌شوند، نبودند. همچنین سابقه مصرف دارو و سیگار نداشتند. گروه کنترل شامل ۱۳ مرد و ۱۳ زن در همان رده سنی از مراجعه‌کنندگان بخش ترمیمی دانشکده در همان بازه زمانی بودند و دارای پرپودنتیسم سالمی بودند. ابتدا نحوه انجام پژوهش برای بیماران توضیح داده شد و فرم رضایت‌نامه آگاهانه کتبی جهت ورود به مطالعه و دادن نمونه بزاق به امضای آنها رسانده شد. جمع‌آوری نمونه بزاق تام غیرتحریکی به روش Spitting^(۵) و در ساعت ۹-۱۱ صبح انجام شد. به این صورت که بیمار از ۲ ساعت قبل چیزی نخورده بود و در یک محیط آرام در حالی که سرش به جلو خم شده بود، نشانده شد. بلافاصله قبل از نمونه‌گیری از بیمار خواسته شد تا بزاق باقیمانده دهانش را قورت داده و به مدت ۵ دقیقه بزاق را در دهانش نگه دارد. سپس به آرامی بزاق جمع شده در دهان را در داخل لوله آزمایش استریل که زیر چانه وی قرار داده شده بود، جاری کند. پس از

MMPها به صورت غیرفعال ترشح می‌شوند. فعالیت آنزیمی در بافت از طریق فعال شدن آنزیم غیرفعال و میزان مهارکننده‌های آنزیم موجود در بافت کنترل می‌شود^(۲) روند تخریبی در پرپودنتیت در نتیجه عدم تعادل بین آنزیم‌های تجزیه‌کننده مثل MMPها و مهارکننده‌های آنها می‌باشد. این عدم تعادل همچنین می‌تواند با آنزیم‌های تجزیه‌کننده دیگر مثل سیستین پروتیناز لیزوزومال، کاتپسین‌ها و مهارکننده‌های آنها سیستماتین‌ها اتفاق بیفتد.^(۴) سیستماتین C نیز به عنوان پروتئینی که فعالیت سیستماتین پروتیناز خارج سلولی را در شرایط التهابی کنترل می‌کند شناخته شده است. منبع سیستماتین C در حفره دهان مونوسیت‌ها و ماکروفاژهایی هستند که در مایع شیار لته و غدد بزاقی وجود دارند. سیستماتین C در حفره دهان اهمیت ویژه‌ای دارد و سیستماتین پروتینازهای تخریب‌کننده کلاژن مانند کاتپسین B، H و L را که در جریان تخریب بافت‌های پرپودنتال آزاد می‌شوند مهار می‌کند.^(۵) هدف مطالعه حاضر بررسی میزان سیستماتین C موجود در بزاق تام در پرپودنتیت مزمن بود.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه Case-Control افراد مورد مطالعه از میان افرادی که جهت جرم‌گیری و تسطیح ریشه به بخش پرپودنتولوژی دانشکده دندانپزشکی مشهد در سال تحصیلی ۸۹-۹۰ مراجعه می‌کردند انتخاب شدند. بدین صورت که با بررسی پرونده‌های تشکیل شده برای بیماران در کلینیک، تعداد ۲۶ بیمار مبتلا به پرپودنتیت مزمن (بر اساس معیارهای آکادمی پرپودنتولوژی آمریکا^(۱)) و فاقد

جمع‌آوری، نمونه‌ها در یخچال با دمای -20°C درجه سانتی‌گراد نگهداری شده و سپس میزان سیستاتین C موجود در نمونه‌های دو گروه به روش الیزا (ELISA) با حساسیت ۹۵ درصد و با استفاده از کیت مخصوص (Betagene Co, Bender Med, Germany) اندازه‌گیری شد.

نتایج با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS با ویرایش ۱۱/۵ ثبت شده و آنالیز آماری t -test و آزمون مدل خطی عمومی (General linear model) روی متغیرهای مربوطه صورت گرفت.

یافته‌ها

هرچند دو گروه از نظر سن و جنس همسان سازی شده بود، اما از آنجا که امکان تاثیر متغیرهای مداخله‌گر سن و جنس وجود داشت، یک مدل خطی را بر میزان سیستاتین C بزاق پرازش دادیم، نتیجه نشان داد که علاوه بر این که سن و جنس بر میزان سیستاتین C بزاقی موثر بوده است، اثر متقابل نیز وجود داشته است (جدول ۱). با توجه به وجود اثر متقابل، لازم بود هر یک از دو جنس به طور جداگانه مورد بررسی قرار بگیرند.

میانگین سنی در افراد تحت مطالعه $45/6 \pm 5$ سال بود؛ که در افراد مؤنث $45/2 \pm 9/6$ سال و در افراد مذکر $46/0 \pm 5/2$ سال بود و از نظر آماری تفاوت معنی‌داری نداشت ($P=0/48$). میانگین و انحراف‌معیار میزان سیستاتین C بزاقی در گروه بیمار $76/88 \pm 12/52$ ng/ml بود که بیشتر از گروه سالم (ng/ml)

نتایج مدل خطی نشان داد که در جنس مؤنث با کنترل متغیر سن دو گروه از نظر میزان سیستاتین C تفاوت معنی‌داری داشتند (جدول ۲) ($P=0/036$). اما در جنس مذکر این تفاوت معنی‌دار نبود (جدول ۲).

جدول ۱: نتیجه آزمون مدل خطی عمومی در تاثیر متغیرهای گروه، سن و جنس بر سیستاتین C

متغیر	آماره آزمون (F)	P-value
گروه	۳/۶۶	۰/۰۶۲
سن	۱۲/۴۰	۰/۰۰۱
جنس	۱۱/۷۴	۰/۰۰۱
اثر متقابل سن و جنس	۱۸/۰۰	<۰/۰۰۱

جدول ۲: میانگین و انحراف معیار سیستاتین C به تفکیک گروه سنی و گروه‌های تحت مطالعه در جنس مذکر و مونث و نتیجه آزمون مدل خطی

عمومی				سن	گروه
مونث		مذکر			
انحراف معیار	میانگین (ng/ml)	انحراف معیار	میانگین (ng/ml)		
۱۰/۹۹	۵۲/۸۳	۱۰/۹۱	۷۷/۱۴	سال ≥ 45	سالم
۳۱/۱۱	۷۳/۰۰	۱/۵۲	۹۳/۶۶	سال ۴۶-۵۰	
۱۴/۲۴	۶۱/۴۰	۶/۲۴	۹۱/۰۰	سال ≤ 50	
۱۵/۸۹	۵۹/۲۳	۱۱/۳۷	۸۴/۱۵	کل	
۶/۸۲	۷۷/۶۲	۱۵/۳۵	۶۵/۵۰	سال ≥ 45	بیمار
۱۱/۰۷	۷۵/۸۰	۸/۱۴	۸۱/۶۶	سال ۴۶-۵۰	
۹/۸۱	۷۶/۱۳	۷/۱۶	۷۸/۲۳	سال ≤ 50	
۸/۳۰	۷۶/۹۲	۱۶/۰۶	۷۶/۸۴	کل	
۱۵/۲۸	۶۷/۰۰	۱۳/۹۴	۷۱/۷۶	سال ≥ 45	کل
۱۵/۶۵	۷۵/۰۰	۸/۴۰	۸۷/۶۶	سال ۴۶-۵۰	
۱۴/۲۴	۶۱/۴۰	۷/۰۹	۹۰/۵۷	سال ≤ 50	
۱۵/۳۵	۶۸/۰۷	۱۴/۱۳	۸۰/۵۰	کل	
F= ۵/۰۳ P=۰/۰۳۶ گروه: سن		F= ۳/۲۷ P=۰/۰۸۶ گروه: سن		نتیجه آزمون	
F= ۱/۱۳ P=۰/۰۳۴ سن: اثر متقابل:		F= ۸/۹۹ P=۰/۰۰۲ سن: اثر متقابل:			
F= ۳/۲۰ P=۰/۰۰۸ اثر متقابل:		F= ۰/۶۵ P=۰/۰۵۳ اثر متقابل:			

بحث

سالم وجود ندارد ولی غلظت سیستاتین C در بزاق پاروتید افراد دارای بیماری پریدنتال نسبت به افراد سالم بیشتر می‌باشد. با این حال تعداد نمونه‌های انتخابی در این مطالعه کم بود و ساعت ارجاع و محدوده سنی نمونه‌های انتخابی در مطالعه با مطالعه ما متفاوت می‌باشد.

با کنترل متغیر سن، در جنس مونث میزان سیستاتین C بزاقی در گروه بیمار به طور معنی‌داری بیشتر از گروه

نتایج مطالعه حاضر نشان داد میزان سیستاتین C بزاقی در گروه بیمار بیشتر از گروه سالم است، و بدون در نظر گرفتن سایر متغیرها، از نظر آماری تفاوت معنی‌داری ندارد (P=۰/۲۴)، مطالعه Henskens و همکاران نیز نشان‌دهنده همین مطلب می‌باشد.^(۵)

Blanken Voord و همکارانش^(۶) در مطالعه خود اظهار کردند که سیستاتین C در مایع شیار لثه در افراد

می‌باشد، می‌توان این گونه فرض کرد که شاید یکی از علل بالاتر بودن میزان این فاکتور بزاقی در جریان پریدنتیت مزمن در زنان، همین پاسخ ایمنی افزایش یافته آنها نسبت به مردان باشد. البته فاکتورهای دیگری نیز می‌توانند در این رابطه دخیل باشند از جمله اثر مستقیم هورمون‌های زنانه و دیگر فاکتورهای مختص زنان که نیاز به تحقیقات و مطالعات بیشتری در این زمینه جهت اثبات این فرضیات می‌باشد.

با توجه به نتایج پژوهش حاضر انتظار می‌رود افزایش سطوح سیستاتین C بزاقی در جریان پریدنتیت مزمن در زنان و شدیدتر بودن پاسخ ایمنی در آنها، به علتی برای کمتر بودن شدت تخریب پریدنتیت مزمن در آنها نسبت به گروه مذکر باشد.^(۱۰)

البته نقش عوامل اتیولوژیک اصلی پریدنتیت مزمن مانند پلاک و جرم در شدت بیماری بسیار مهم‌تر می‌باشد و به نظر می‌رسد اثر فاکتورهای دفاعی میزبان مانند سیستاتین‌ها در پاسخ علیه بیماری و تعدیل شدن شدت تخریب بافتی یک نقش فرعی و تکمیلی باشد. با این وجود با توجه به نقش سیستاتین‌ها و مهارکننده‌های پروتئینازها در تعدیل تخریب بافتی، شاید بتوان با تقویت و هدایت سیستم ایمنی و تحریک بدن برای ساخت و ترشح ترکیبات اختصاصی مهارکننده پروتئینازها مانند سیستاتین‌ها شدت تخریب بافتی را تا حدی کاهش داد که این اثر در هر دو جنس می‌تواند مفید و مؤثر باشد. البته خاطر نشان می‌شود که گروه مورد مطالعه میانگین سنی ۶/۹±۵/۲ سال داشتند و با توجه به انحراف معیار بالای

سالم بود در حالی که در جنس مذکر این تفاوت از نظر آماری معنی‌دار نبود.

از آنجایی که در مطالعات قبلی^(۵-۹) در مورد میزان و فعالیت سیستاتین C بزاقی در شرایط التهاب و سلامت پریدنتیوم، نتایج به صورت کلی و بدون تفکیک گروه‌های جنسی مذکر و مؤنث ارائه گردیده است، اثر جنس را نیز در این مطالعه مورد بررسی قرار دادیم. نتایج حاصله و معنی دار شدن افزایش سطح بزاقی سیستاتین C در گروه مؤنث به نظر می‌رسد حاکی از این باشد که جنس نیز می‌تواند نقش بسیار مهمی در این رابطه داشته باشد.

از طرف دیگر مطالعات تجربی نشان می‌دهند که پاسخ ایمنی سلولی و همورال در زنان نسبت به مردان فعال‌تر می‌باشد.^(۷) پاسخ ایمنی در زنان ممکن است با عدم حضور هورمون‌های ایمونوساپرسیو آندروژنیک مرتبط باشد یا می‌تواند در نتیجه خاصیت تحریک‌کنندگی ایمنی استروئیدهای زنانه خصوصاً استروژن باشد.^(۸)

افزایش استروژن باعث افزایش ترشح پایه هورمون رشد، پرولاکتین و هورمون‌های تیموسی می‌شود که این هورمون‌ها سبب بالغ شدن لنفوسیت‌ها و تحریک سلول‌های B و T در زنان می‌شوند. افزایش پاسخ ایمنی در زنان به آنها اجازه می‌دهد تا بتوانند در برابر شرایط استرس فیزیولوژیک برای تولیدمثل مقابله کنند.^(۹)

با توجه به این مطلب که سیستاتین C از گروه مهارکننده‌های سیستمین پروتئینازها بوده و از فاکتورهای دفاعی وابسته به میزبان در جریان بیماری پریدنتیت مزمن

دارای بیماری پریودنتال نسبت به بزاق افراد سالم کمتر می‌باشد. Yvonne و همکارانش^(۱۴)، در رابطه اثر درمان پریودنتال بر میزان پروتئین‌های موجود در بزاق به این نتیجه دست یافتند که با درمان بیماران مبتلا به پریودنتیت سیستاتین موجود در بزاق کاهش می‌یابد.

نتیجه‌گیری

میزان سیستاتین C بزاقی در جریان پریودنتیت مزمن خصوصاً در جنس مونث افزایش می‌یابد بنابراین می‌تواند به عنوان مارکری در پریودنتیت مزمن در مطالعات بعدی در نظر گرفته شود.

تشکر و قدردانی

از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مشهد جهت تصویب این طرح با شماره ۸۷۶۷۶ و پرداخت هزینه‌های آن، تقدیر و تشکر می‌گردد.

آن، حتما تعدادی از نمونه‌ها سن بالای ۵۰ سال داشته‌اند که زمان پس از یائستگی می‌باشد. بنابراین اثر مستقیم هورمون‌های زنانه می‌تواند به عنوان یکی از محدودیت‌های احتمالی این مطالعه در نظر گرفته شد.

Henskens و همکارانش^(۱۱) در مطالعه‌ای در رابطه با میزان پروتئین‌های بزاقی به این نتیجه دست یافتند که میزان سیستاتین C موجود در بزاق در افراد دارای بیماری پریودنتال بیشتر می‌باشد.

Lie و همکارانش^(۱۲) در مطالعه‌ای در رابطه با میزان سیستاتین C در افراد دارای التهاب لثه ناشی از دود سیگار و افراد دارای التهاب لثه در صورت عدم وجود سیگار به این نتیجه دست یافتند که میزان سیستاتین C افراد دارای التهاب لثه ناشی از دود سیگار نسبت به التهاب لثه ناشی از عدم وجود سیگار کمتر است.

Ito و همکارانش^(۱۳) در مطالعه‌ای به این نتیجه دست یافتند که میزان سیستاتین C موجود در بزاق در افراد

منابع

1. Flemmig TF. Periodontitis. J Ann Periodontol 1999; 4(2): 32-8.
2. Novak MJ, Novak KF. Chronic periodontitis. In: Newman M.G. Carranza's Clinical Periodontology. 11th ed. Philadelphia: W.B.Saunders Co; 2011. P. 160, 285.
3. Chronic periodontitis. Available at: <http://www.Wikipedia, the free encyclopedia.mht>. [Accessed Apr 2, 2010].
4. Elkaim R, Werner S, Kocgozlu L, Tenebaum HP. Gingivalis regulates the expression of cathepsin b and cystatin C. J Dent 2008; 87(10): 932-6.
5. Henskens YMC, Veerman ECI, Mantel MS, Van der Velden U, Nieuw Amerongen AV. Cystatins S and C in human whole saliva and in glandular salivas in periodontal health and disease. J Dent Res 1994; 73(10): 1606-14.
6. Blanken voorde MF, Van't Hof W, Walgreen-Weterings E, van Steenberg TJ, Brand HS, Veerman EC, et al. Cystatin and cystatin derived peptides have antimicrobial activity against the pathogen Porphyromonas gingivalis. Biol Chem 1998; 37(9): 1371-5.
7. Wichmann MW, Zellweger R, De Maso CM. Enhanced immune responses in females, as opposed to decreased responses in males following haemorrhagic shock and resuscitation. Cytokine 1996; 8(3): 853-63.
8. Olsen NJ, Kovacs WJ. Gonadal steroids and immunity. Endocr Rev 1996; 17(4): 369-84.
9. Grossman C. Possible underlying mechanisms of sexual dimorphism in the immune response, fact and hypothesis. J Steroid Biochem 1989; 34(6): 241-51.

10. Cutolo M, Sulli A, Seriola B. Estrogens the immune response and autoimmunity. *Clin Exp Rheumatol* 1995; 13(3): 217.
11. Henskens YM, van den Keijbus PA, Veerman EC, Van der Weijden GA, Timmerman MF, Snoek CM. Protein composition of whole and parotid saliva in healthy and periodontitis subjects. Determination of cystatins, albumin, amylase and IgA. *J Periodontal Res* 1996; 31(1): 57-65.
12. Lie MA, Loos BG, Henskens YM, Timmerman MF, Veerman EC, van der Velden U. Salivary cystatin activity and cystatin C in natural and experimental gingivitis in smokers and non-smokers. *J Clin Periodontol* 2001; 28(10): 979-84.
13. Ito T, Komiya-Ito A, Arataki T, Furuya Y, Yajima Y, Yamada S. Relationship between antimicrobial protein levels in whole saliva and periodontitis. *J Periodontol* 2008; 79(2): 316-22.
14. Yvonne MCH, Fridus A, Petra AM, Enno CI, Mark FT, Ubele V, et al. Effect of periodontal treatment on the protein composition of whole and parotid saliva. *J Periodontol* 1996; 67(3): P. 205-12.