

UNIVERZITET U BEOGRADU

STOMATOLOŠKI FAKULTET

Boško M. Toljić

**UTICAJ HIV INFEKCIJE I
ANTIRETROVIRUSNIH LEKOVA NA
STARENJE PARODONTALNIH TKIVA**

doktorska disertacija

Beograd, 2018

UNIVERSITY OF BELGRADE
SCHOOL OF DENTAL MEDICINE

Boško M. Toljić

**INFLUENCE OF HIV INFECTION AND
ANTIRETROVIRAL THERAPY ON
PERIODONTAL TISSUE AGING**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2018

MENTOR

Prof. dr Jelena Milašin, Stomatološki fakultet Univerzitet u Beogradu

KOMENTOR

Prof. dr Gordana Dragović Lukić, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu

KOMISIJA ZA OCENU I ODBRANU DOKTORSKE DISERTACIJE

Prof. dr Elena Kršljak, Stomatološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

Prof. dr Zoran Aleksić, Stomatološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

Doc. dr Jelena Roganović, Stomatološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

Prof. dr Silvio De Luka, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Prof. dr Đorđe Jevtović, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu

DATUM ODBRANE

Neizmernu zahvalnost dugujem svojoj mentorki prof. dr Jeleni Milašin za posvećenost, entuzijazam i konstantnu podršku i partnerstvo na ovom naučnom putovanju. Izuzetna mi je čast što sam njen učenik.

Zahvaljujem komentorki prof. dr Gordani Dragović Lukić na nesebičnom prenošenju znanja i iskustava, kao i prof. dr Đorđu Jevtoviću na dragocnim sugestijama i plodnim razgovorima.

Zahvaljujem se i prof. dr Zoranu Aleksiću i doc. dr Jeleni Roganović na ljubaznosti, posvećenom vremenu i svesrdnoj pomoći oko oblikovanja ove doktorske disertacije.

Posebno se zahvaljujem prof. dr Eleni Kršljak na savetima i smernicama tokom izrade ove doktorske disertacije.

Ovim putem bih želeo da se zahvalim i prof. dr Aleksandru Trboviću na energiji, trudu i strpljenju koje je uneo u realizaciju ove doktorske disertacije, prof. dr Silviu De Luki na korisnim sugestijama i prof. dr Jasni Ristić-Đurović na pomoći oko statističke obrade podataka.

Profesorki dr Ani Pucar, doc. dr Nataši Nikolić-Jakoba i dr Sanji Matić Petrović zahvaljujem na stručnoj pomoći, prijateljskim savetima, prenetom iskustvu, kao i na pomoći oko prikupljanja uzoraka.

Veliku zahvalnost na pomoći oko prikupljanja i obrade uzoraka dugujem i sjajnom timu doktoranata i studenata sa Medicinskog fakulteta u Beogradu predvođenim doktorkom Božanom Obradović, a u čijem sastavu su bili i dr Milan Jovanović i oni koji će uskoro postati doktori: Branka Aleksić, Lidija Aleksić, Marko Barović i Aleksandar Babić.

Želeo bih da se zahvalim i celokupnom kolektivu Instituta Stomatološkog fakulteta na prijateljskoj atmosferi i podršci koju sam neprestano uživao.

Na ovom spisku "morali" su da se nađu i Nađa, Jeca, Simče, Di, Maja, Aleksandra, Ivanče i Laza jer su bili neiscrpni izvor energije, radosti i sreće tokom svih ovih godina.

Od srca se zahvaljujem dragim prijateljima, porodici i jednoj "Maleckoj" za strpljenje, razumevanje i безусловnu podršku i ljubav.

Za Malecku

SAŽETAK

Starenje parodontalnih tkiva, kao i čitavog organizma, je prirodan, nezaustavljiv proces koji se karakteriše nakupljanjem neželjenih promena koje dovode do poremećaja homeostaze, gubitka funkcije i većom verovatnoćom za pojavu oštećenja, bolesti i smrti jedinke. Dinamika ovog procesa se razlikuje među jedinkama, ali postoje razlike i u samom organizmu jer organi, tkiva, ćelije, pa čak i subcelularne strukture ne stare istom brzinom. Posledično, biološka starost jedinke ne mora da odgovara njenoj hronološkoj starosti. Dalje, pojedina stanja i patološki procesi mogu dovesti do ubrzanog starenja. Pokazano je da osobe zaražene virusom humane imunodeficijencije (engl. *Human Immunodeficiency Virus, HIV*) fenotipski brže stare od neinficiranih osoba što može da bude posledica same infekcije i/ili primene antiretrovirusnih lekova, koji su značajno produžili životni vek pacijentima sa HIV-om. Upotrebom različitih markera starenja moguće je razlikovati biološku od hronološke starosti individue, ali i razlikovati prerano starenje odnosno bolesti koje su u vezi sa starenjem od fiziološkog starenja.

Cilj ovog istraživanja bio je da se utvrdi veza između starenja parodontalnih tkiva i različitih bioloških markera starenja kao što su dužina telomera, parametri metabolizma gvožđa i dobno zavisna smena prisustva parodontopatogena kod HIV-om inficiranih pacijenata i neinficiranih kontrola.

Istraživanje je dizajnirano kao studija preseka. U studiju je bilo uključeno 105 HIV-om inficiranih i 100 neinficiranih ispitanika muškog pola podeljenih u dve starosne grupe: mlađu sa ispitanicima do 35 godina života i stariju sa ispitanicima koji imaju više od 50 godina. Nakon potpisanog informisanog pristanka od ispitanika su dobijeni anamnestički podaci, uzorci krvi i bris oralne sluzokože, a odrađen je i detaljan stomatološki pregled. Iz uzoraka krvi određivani su relativna dužina telomera leukocita i parametri metabolizma gvožđa, serumsko gvožđe, ukupni kapacitet transferina za vezivanje gvožđa, saturacija transferina i koncentracije transferina i feritina. Iz briseva oralne sluzokože detektovani su sledeći parodontopatogeni mikroorganizmi: *Prevotella intermedia*, *Peptostreptococcus micros*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Eikenella corrodens*, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* i *Treponema denticola*. Inspekcijom usne duplje utvrđivano je prisustvo oralnih manifestacija karakterističnih za HIV-infekciju dok je parodontološki pregled poslužio za procenu stanja potpornog aparata zuba.

Rezultati studije pokazuju da su vrednosti relativne dužine telomera veće kod mlađih u odnosu na starije ispitanike i u grupi pacijenata sa HIV-infekcijom i u grupi neinficiranih pacijenata. HIV-om inficirane osobe su imale duže telomere u odnosu na neinficirane ispitanike i u mlađoj i u starijoj ispitivanoj starosnoj grupi. Pacijenti koji nisu bili na terapiji antiretrovirusnim lekovima imali su duže telomere u odnosu na pacijente koji su bili na različitim režimima antiretrovirusne terapije. Svi parametri metabolizma gvožđa, izuzev koncentracija transferina i feritina, su bili viši kod mlađih u odnosu na starije osobe u obe ispitivane grupe. Nasuprot ovom, koncentracija transferina kod HIV-om inficiranih pacijenata bila je niža kod mlađih u odnosu na starije ispitanike što je bio slučaj i sa koncentracijama feritina posmatrano u obe ispitivane grupe. Zastupljenost parodontopatogenih mikroorganizama je bila veća kod starijih u odnosu na mlađe ispitanike u HIV-om inficiranoj grupi pacijenata, sa izuzetkom *A. actinomycetemcomitans*-a čija je zastupljenost bila podjednaka između mlađih i starijih ispitanika. Kod starijih neinficiranih pacijenata, veća zastupljenost parodontopatogena, u odnosu na mlađe ispitanike, pokazana je kod svih ispitivanih mikroorganizama izuzev *P. micros*-a i *T. forsythia*-e. Dalje, broj oralnih bakterija je bio veći kod HIV-om inficiranih u odnosu na neinficirane pacijente u obe starosne grupe, a bio je zapažen i rearanžman u zastupljenosti parodontopatogena sa starenjem. Oralne manifestacije HIV-infekcije, sem linearnog gingivalnog eritema, su bile češće zastupljene kod starijih ispitanika. Svi parodontološki parametri su bili statistički značajno veći kod starijih HIV-om inficiranih osoba u odnosu na mlađe HIV-om inficirane ispitanike, dok kod neinficiranih ispitanika nije uočena značajna razlika u vrednostima ovih parametara među starosnim grupama.

Starenje parodontalnih tkiva kod HIV-om inficiranih pacijenata se karakteriše promenom kvantitativnog i kvalitativnog sastava oralne flore i bržim propadanjem potpornog aparata zuba. Mehanizmi uključeni u ovaj proces još uvek nisu detaljno razjašnjeni pa će ovo polje istraživanja, imajući u vidu produžen životni vek i značaj očuvanja oralnog zdravlja kod HIV-om inficiranih osoba, biti izazov za modernu stomatologiju.

Ključne reči: HIV, starenje, parodontalna tkiva, oralne bakterije

Naučna oblast: Stomatološke nauke

Uža naučna oblast: Bazične stomatološke nauke

UDK broj: 616.311.2:[616.98:578.828](043.3)

SUMMARY

Aging of periodontal tissues, as well as organism as a whole, is natural, unstoppable process of accumulation of undesirable changes which lead to disturbancy of chomeostasis, loss of function and increased susceptibility to diseases and death. Dynamic of this process is often unpredictable because individuals, organs, tissues, cells, and even subcellular structures do not have the same rate of aging. Considering that, the biological aging of the individuals does not neccesarilly match their chronological aging. Furthermore, some conditions and pathological processes could increase the speed of aging. It has been shown that patients with human immunodeficiency virus (HIV) infection age faster than their non-infected counterparts. The altered aging in HIV-infected patients could be triggered by infection itself or due to usage of antiretroviral drugs, which increased life expectancy in these patients. Various biological markers of aging could be used in order to determine the difference between biological and chronological age of the patient, and to differ premature aging or aging-related diseases from physiological aging.

The aim of this research was to identify the relations between periodontal tissue aging and biomarkers of aging such as, relative telomere length, iron metabolism parameters and presence of periodontal pathogens within oral cavity.

Investigation was designed as a cross-sectional study. The study enrolled 105 HIV-infected and 100 non-infected male subjects subdivided in two age groups: younger (<35 years of age) and older (>50 years of age). After signing the informed consent, anamnestic data, blood samples and buccal swabs were collected from each patient and detailed oral examinations were performed. The blood samples were used for relative telomere length and iron metabolism parameters (serum iron, total iron binding capacity, transferrin saturation and concentrations of transferrin and ferritin) analyses. The buccal swabs were used for the identification of periodontal pathogens: *Prevotella intermedia*, *Peptostreptococcus micros*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Eikenella corrodens*, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* and *Treponema denticola*. Oral manifestations of HIV-infection were detected by inspection and periodontal parameters were determined by probing.

Results of this study indicate that relative telomere length is longer in younger patients in both, HIV-infected and non-infected group, compared to their older

counterparts. HIV-infected patients had longer telomeres compared to non-infected patients, in both age groups. Additionally, naive HIV-infected patients had longer telomeres than those treated with various forms of antiretroviral therapy. All iron metabolism parameters values, with exception of serum transferrin and ferritin concentrations, were higher in younger compared to older patients in HIV-infected and non-infected group. In contrast, transferrin concentration was higher in older compared to younger HIV-infected patients, which was the case for ferritin concentrations in infected and non-infected group, as well. The presence of periodontal pathogens was higher in older HIV-infected patients compared to younger ones, with exception of *A. actinomycetemcomitans* which had similar prevalence in both age groups. Older non-infected patients had higher prevalence of periopathogens compared to younger subjects, with exception of *P. micros* and *T. forsythia*. Furthermore, we showed a substantial increase in bacterial burden within oral cavity and certain rearrangements in bacterial composition during the course of aging. Oral manifestations characteristic for HIV-infection, were more prevalent in older HIV-infected patients with exception of linear gingival erythema that was more frequently observed in younger patients. All periodontal parameters were significantly higher in older compared to younger HIV-infected patients, whereas such a difference was inexistent in the control group.

Periodontal tissue aging in HIV-infected patients is characterized by qualitative and quantitative changes in oral flora and by rapid deterioration of periodontal tissue structures. Mechanisms involved in this process are not quietly understood. Having in mind increased life expectancy in HIV-infected patients in the era of antiretroviral therapy, this field of reaserch will be emerging and very attractive in future as well.

Key words: HIV, aging, periodontal tissues, oral bacteria

Scientific field: Dental sciences

Narrower scientific field: Basic dental sciences

UDC: 616.311.2:[616.98:578.828](043.3)

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Starenje	2
1.2. Starenje oralnih tkiva.....	2
1.3. Teorije starenja.....	4
1.4. Biomarkeri starenja.....	5
1.5. Dužina telomera kao biomarker starenja	5
1.6. Parametri metabolizma gvožđa kao biomarkeri starenja.....	8
1.6.1. Metabolizam gvožđa.....	8
1.6.2. Transferin.....	10
1.6.3. Feritin	12
1.7. Promena sastava oralne mikroflore kao biomarker starenja.....	13
1.8. Infekcija virusom humane imunodeficijencije i starenje.....	16
1.8.1. Struktura HIV-a	17
1.8.2. Mehanizam delovanja HIV-a.....	19
1.8.3. Antiretrovirusna terapija i starenje	20
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	23
3. MATERIJAL I METODE.....	25
3.1. Etički standard	26
3.2. Dizajn studije.....	26
3.3. Ispitivana populacija i kriterijumi za uključivanje i isključivanje pacijenata	26
3.4. Prikupljanje uzoraka	27
3.5. Izolacija DNK iz pune krvi.....	28

3.6. Izolacija DNK iz brisa obrazne sluzokože	29
3.7. Određivanje koncentracije i čistoće genomske DNK.....	29
3.8. Određivanje relativne dužine telomera.....	30
3.9. Određivanje vrednosti parametara metabolizma gvožđa.....	32
3.9.1. Određivanje koncentracije serumskog gvožđa	32
3.9.2. Određivanje ukupnog kapaciteta vezivanja gvožđa	33
3.9.3. Određivanje procenta saturacije transferina	33
3.9.4. Određivanje koncentracije transferina.....	33
3.9.5. Određivanje koncentracije feritina	34
3.10. Određivanje broja virusnih kopija (plasma viral load-pVL)	35
3.11. Određivanje CD4 broja (CD4 count).....	35
3.12. Određivanje kvalitativnog sastava oralne flore sa obrazne sluzokože	36
3.12.1. Umnožavanje delova bakterijske DNK PCR metodom	36
3.12.2. Gel elektroforeza	38
3.13. Određivanje kvantitativnog sastava oralne flore sa obrazne sluzokože	40
3.14. Klinički pregled	41
3.14.1. Inspekcija mekih oralnih tkiva	41
3.14.2. Procena stanja parodontalnih parametara	41
3.15. Statistička analiza podataka.....	42
4. REZULTATI	44
4.1. Opšte karakteristike ispitivanih grupa	45
4.2. Relativna dužina telomera	47
4.3. Relativna dužina telomera (RDT) i kombinovana antiretrovirusna terapija	47
4.4. Koncentracije serumskog gvožđa.....	49

4.5. Ukupni kapacitet vezivanja gvožđa.....	50
4.6. Saturacija transferina.....	51
4.7. Koncentracija transferina.....	52
4.8. Koncentracija feritina.....	53
4.9. Kvalitativni sastav oralne flore.....	54
4.10. Korelacija između pVL-a, RDT-a i parametara metabolizma gvožđa.....	61
4.11. Uticaj starosnog doba na distribucija parodontopatogena.....	62
4.12. Kvantitativni sastav oralne flore.....	63
4.13. Oralne manifestacije HIV-infekcije.....	63
4.14. Uticaj starosnog doba na parodontalni status ispitanika.....	64
5. DISKUSIJA.....	66
6. ZAKLJUČCI.....	84
7. LITERATURA.....	86
8. BIOGRAFIJA.....	106

1. UVOD

1.1. Starenje

Starenje je prirodan i nezaustavljiv biološki proces koji se karakteriše nakupljanjem neželjenih promena u organizmu koje dovode do slabljenja fizioloških funkcija, poremećaja homeostaze i povećane verovatnoće za oboljevanja i smrt (1). Proces starenja se može pratiti na nivou čitavog organizma, zatim na nivou organa, tkiva, ćelija i na kraju na nivou subcelularnih struktura. Tokom starenja dolazi do redukcije veličine tela; koža gubi elastičnost, menja boju, a dolazi i do stvaranja nabora na koži; kardiovaskularne promene obuhvataju smanjenje snage srčanog mišića kao i promene na krvnim sudovima u vidu smanjene elastičnosti; disajni kapaciteti se smanjuju; u gastrointestinalnom traktu dolazi do smanjenja apsorpcije, sekrecije i motiliteta; promene u urinarnom sistemu se ogledaju u smanjenom broju nefrona bubrega, ali i u smanjenom tonusu mišića mokraćne bešike; kod čula se redukuje broj receptora, dok promene u centralnom nervnom sistemu obuhvataju progresivan gubitak memorije kao i usporeno reagovanje na različite draži; imuni sistem pokazuje znake slabijeg odgovora na štetne agense (2-4). Promene koje se javljaju na ćelijskom nivou u toku procesa starenja uključuju uvećanje ćelije, uvećanje jedra i Goldžijevog aparata, vakuolizaciju citoplazme i povećanje broja lizozoma (5, 6). Subcelularne promene tokom starenja obuhvataju skraćivanje krajeva hromozoma – telomera, prekide u molekulu dezoksiribonukleinske kiseline (DNK), epigenetske promene naslednog materijala, promene u broju i građi hromozoma, disfunkcije mitohondrija, i rearanžiranje citoskeleta (6, 7). Promene u strukturi i funkcionisanju citoskeletnih proteina su praćene sličnim promenama proteina ekstracelularnog matriksa (8).

1.2. Starenje oralnih tkiva

Starenje organizma se u velikoj meri reflektuje i na oralnim tkivima. Oralna mukoza postaje atrofična, glatka, istanjena, smanjuje se stepen keratinizacije, epitelne gredice se zaravnjuju, dok se u vezivnom tkivu broj ćelija smanjuje, a broj kolagenih vlakana uvećava (9, 10). Vaskularizacija tkiva postaje redukovana, a kapilari fragilniji. U krvnim sudovima koji ishranjuju oralna tkiva često se uočavaju aterosklerotske promene. Nervna vlakna podležu degenerativnim procesima, reparatorni mehanizmi su usporeni, a postoje i poremećaji u imunom odgovoru (11). Značajne promene trpi i muskuloskeletni sistem: vilične kosti postaju osteoporotične i rarefikovane, dok se mišićna masa progresivno smanjuje, a pokreti u mastikatornim mišićima postaju

usporeni i zamarajući (12). U temporomandibularnim zglobovima javljaju se brojne disfunkcije usled degenerativnih promena, kako na koštanim tkivima tako i na temporomandibularnim diskusima, zglobnoj kapsuli i zglobnim vezama (13). Takođe, zapaža se i hipofunkcija svih pljuvačnih žlezda koja u najtežoj formi dovodi do kserostomije. Izostankom lubrikantnog efekta pljuvačke povećana je mogućnost povređivanja i oštećenja mekih oralnih tkiva pa se na dehidriranoj mukozi često pojavljuju fisure, abrazije i traumatske ulceracije. Broj receptora za ukus se takođe smanjuje što može dovesti do promena u ishrani kod starijih osoba (12). Promene na zubima se karakterišu izmenom boje (dominiraju sivkaste nijanse), veličine (usled atricije) i mehaničkih karakteristika tvrdih zubnih tkiva (14, 15). Povlačenje nastavaka odontoblasta iz dentinskih kanalića, sklerozacija dentinskih tubula i smanjenje veličine komore pulpe usled stvaranja sekundarnog dentina smanjuju elastičnost i otpornost zuba i povećavaju mogućnost mehaničkih oštećenja zubnih tkiva u koje spadaju abrazija, atricija i abfrakcija (15, 16). Proces starenja ne zaobilazi ni parodontalna tkiva. U ova tkiva koja čine potporni aparat zuba ubrajaju se: gingiva, periodoncijum, cement korena zuba i alveolarna kost. Na svim ovim strukturama mogu se uočiti promene koje nastaju kao posledica starenja. Promene na gingivi su identične promenama koje se javljaju i u oralnoj mukozi. Epitel gingive se istanjuje, gubi elastičnost, a redukuje se i nivo keratinizacije (10). U vezivnom tkivu gingive smanjuje se broj fibroblasta, dok se broj i stabilnost kolagenih vlakana uvećava (8). Kao posledica ovih promena smanjuje se elastičnost i otpornost gingive i dolazi do gingivalnih recesija i smanjenja širine pripojne gingive (10). Periodontalna vlakna se istanjuju, dolazi do njihovog prerasporeda i neadekvatne insercije u cement korena zuba i alveolarnu kost. Broj epitelnih ostrvaca unutar periodontalnog ligamenta se smanjuje, dok širina periodontalnog ligamenta može biti uvećana ili smanjena u zavisnosti od opterećenja koje deluje na zub u toku procesa žvakanja (17). U toku starenja dolazi i do zadebljavanja cementa korena zuba, dok njegova površina postaje neravna. Inkrementne linije cementa mogu poslužiti za određivanje hronološke starosti individue jer se cement korena zuba kontinuirano, tokom čitavog života, deponuje oko dentina korenskog dela zuba (17). U alveolarnoj kosti dolazi do povećanja koštanih šupljika, dok se koštane gredice istanjuju. Kortikalna lamina alveolarne kosti postaje tanja, a interalveolarne septe se zaravnjuju. Debljina periosta alveolarne kosti starenjem se uvećava kost (18).

1.3. Teorije starenja

Dinamika procesa starenja je često nepredvidiva i značajno varira između različitih individua, organa, tkiva, pa čak i između samih ćelija. Brojne teorije starenja su predložene kako bi se objasnili različiti aspekti ovog procesa. Moderne teorije starenja se dele u dve grupe: teorije programiranog starenja i teorije greške. Po teorijama programiranog starenja svi životni procesi se odvijaju po određenom „biološkom rasporedu“ i „biološki časovnik“ je taj koji određuje kada će se određeni životni proces zaustaviti (19). Primer ovih teorija je Hejflikov (engl. *Hayflick*) fenomen ograničene ćelijske proliferacije (20). Naime, utvrđeno je da određene ćelije u organizmu imaju predodređen broj deoba i da po završetku poslednje deobe dolazi do pokretanja mehanizma programirane ćelijske smrti – apoptoze. Glavni nedostatak ove teorije je nemogućnost primene na ćelije koje se ne dele, tj. ćelije zaustavljene u G0 fazi ćelijskog ciklusa. Za razliku od teorija programiranog starenja, koje se okreću ka „unutrašnjim“ prediktorima, teorije greške ističu uticaj faktora spoljašnje sredine na životni vek. Za sada se kao najsveobuhvatnija prihvata teorija oksidativnog stresa po kojoj reaktivni kiseonični produkti dovode do oštećenja proteina, ugljenih hidrata, lipida i nukleinskih kiselina i na taj način remete njihovu strukturu i funkciju što dovodi do senescencije čitavog organizma (21). Oštećenja ćelija i tkiva, pored nakupljanja reaktivnih kiseoničkih produkata, nastaju i zbog slabljenja zaštitnih antioksidativnih mehanizama. Drugim rečima, u tkivima dolazi do disbalansa između proizvodnje i neutralisanja štetnih kiseoničkih produkata što stvara „temelje“ za tkivna oštećenja. Pored direktnog citotoksičnog efekta, reaktivni kiseonični produkti utiču i na brojne signalne puteve unutar ćelija, gde aktiviranjem specifičnih protein kinaza podstiču procese proliferacije, diferencijacije ali i ćelijske smrti. Problemi sa teorijom oksidativnog stresa su uočeni kod organizama sa visokim stepenom metaboličkih procesa i velikom produkcijom reaktivnih kiseoničkih produkata koji ne utiču na njihov životni vek (22). Mnogi autori navode kako ni jedna od postojećih teorija starenja (programirano starenje i teorije greške) ne zadovoljava u potpunosti i da bi „novu“ teoriju starenja trebalo tražiti u kombinovanju više različitih teorija. Ova mišljenja su podstaknuta činjenicom da su kompleksni mehanizmi starenja, bilo da na njega utiču unutrašnji ili spoljašnji faktori, često isprepletani.

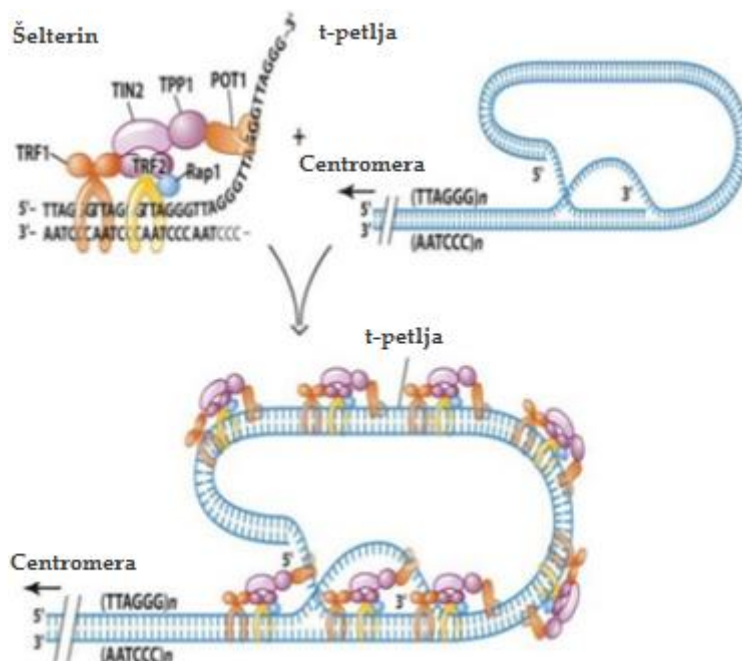
1.4. Biomarkeri starenja

Proces starenja zavisi od brojnih činilaca, između ostalih to su nasledna osnova, uticaji spoljašnje sredine, kao i način života. Kao posledica ovog multifaktorskog delovanja hronološka starost individue ne mora da bude podudarna sa njenom biološkom starošću. Da bi se utvrdio odnos između hronološke i biološke starosti individue, kao i da bi se razlikovalo normalno, fiziološko starenje od patološkog starenja organizma mogu se koristiti različiti biološki markeri. Biološki markeri starenja se mogu podeliti u fiziološke, endokrine, biohemijske i genetičke markere. Fiziološki markeri starenja obuhvataju funkcije respiratornog i kardiovaskularnog sistema, indeks telesne mase, gustinu kostiju i drugo (2, 23). Endokrini biomarkeri starenja su nivoi polnih hormona, zatim hormona štitne žlezde, hormona rasta i insulinu sličnog hormon rasta (24). Snižene koncentracije ovih hormona se pronalaze u krvi starijih osoba. U biohemijske markere starenja ubrajaju se feritin, lipidni profil, nivo glikozilovanog hemoglobina i nivoi inflamatornih peptida: interleukina 6 i 1 β (IL-6, IL-1 β), C-reaktivnog proteina (CRP) i faktora tumorske nekroze-alfa (TNF- α) (24). Više koncentracije ovih biohemijskih biomarkera starenja su povezane sa većom verovatnoćom oboljevanja i rizika od smrtnog ishoda kod starijih osoba. Genetički pokazatelji starenja su oštećenja molekula DNK, rearanžiranje hromozoma, dužina telomera, stepen metilacije DNK molekula i pojedini regulatori genske ekspresije kao što su molekuli mikroribonukleinskih kiselina (mikroRNK) (25, 26). Spisak biomarkera starenja, naravno, nije konačan jer potraga za idealnim biomarkerom još uvek nije završena.

1.5. Dužina telomera kao biomarker starenja

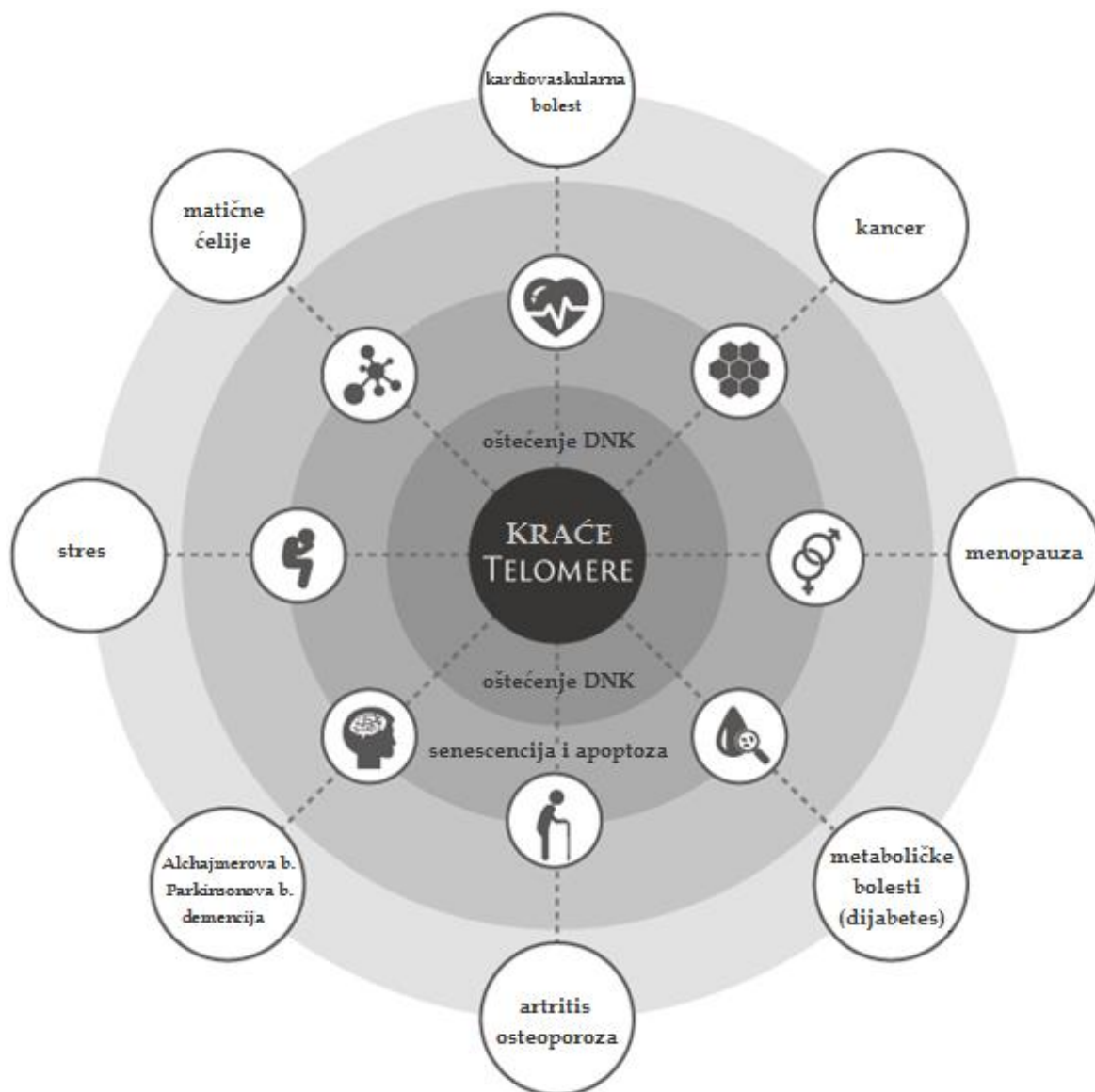
Telomere predstavljaju krajeve hromozoma koji imaju ulogu u njihovoj zaštiti od degradacije i uzajamnog splepljivanja. Sastoje se iz velikog broja ponovaka sekvence nukleotida TTAGGG (T-timin, A-adenin, G-Guanin) udruženih sa proteinskom komponentom zvanom šelterin (Slika 1.1). Uloga šelterina je da zaštiti same telomere, jer usled problema u replikaciji krajeva DNK jednostruki lanac u dužini od 300 bp “štrči” iz dvostrukog heliksa i kao takav predstavlja metu za DNK reparaturnu mašineriju koja ga može prepoznati kao strukturnu grešku i “iseći” iz molekula. Jednostruki lanac DNK se zato uvija u čvor, odnosno pravi petlju koju stabilizuju proteini šelterinskog kompleksa: TRF1 (telomere repeat factor 1), TRF2 (telomere

repeat factor 2), POT1 (protection of telomere 1), RAP1 (repressor/activator protein 1), TPP1 (tripeptidyl peptidase I) i TIN2 (TRF1 & TRF2 interacting nuclear protein 2). Sem zaštitne uloge, šelterin najverovatnije učestvuje i u regulisanju aktivnosti enzima koji održavaju dužinu telomera. U toku replikacije DNK šelterinski kompleks se odvaja od telomera što izlaže telomere delovanju nukleaza. Nakon svake ćelijske deobe dolazi do skraćanja telomera hromozoma, pa dužina telomera može poslužiti kao pokazatelj starenja ćelije. Kada dođe do graničnog skraćanja telomera, nastaje takozvani Hayflick-ov fenomen nakon koga deobe više nisu moguće i ćelija ulazi u apoptozu. Matične, progenitorske i određene tumorske ćelije imaju sposobnost da održavaju ili produžavaju dužinu telomera zahvaljujući aktivnosti enzima telomeraze. Ovaj kompleksni enzim se sastoji iz specifične telomerazne reverzne transkriptaze (TERT), RNK komponente telomeraze (TERC) i proteina koji stabilizuju čitav kompleks. RNK komponenta telomeraze služi kao matrica za sintezu telomernih ponovaka (27). Telomeraza je uglavnom “utišana” kod većine somatskih ćelija adultne osobe ali postaje izrazito aktivna u toku kancerogeneze pa se smatra da regulacija telomerazne aktivnosti može imati ulogu u nastanku kancera (28).



Slika 1.1. Građa telomera i šelterinski kompleks (preuzeto i modifikovano: <https://www.slideshare.net/ArtiGupta11/chromosome-54646725>).

Novija istraživanja dovode u vezu skraćenje telomera kod pacijenata sa hroničnim bolestima kao što su dijabetes tip 2, ateroskleroza, Alchajmerova bolest i hronični parodontitis (29-32). Promene u dužini telomera se verovatno dešavaju kao posledica povećanog broja ćelijskih deoba sa ciljem reparacije oštećenog tkiva, kao i hroničnih inflamacija i uvećanog oksidativnog stresa na koji su telomere izrazito osetljive (Slika 1.2).



Slika 1.2. Bolesti i stanja kod kojih je utvrđeno skraćivanje telomera (preuzeto i modificovano: http://defytime.jp/bc/en/about_telomere.html)

1.6. Parametri metabolizma gvožđa kao biomarkeri starenja

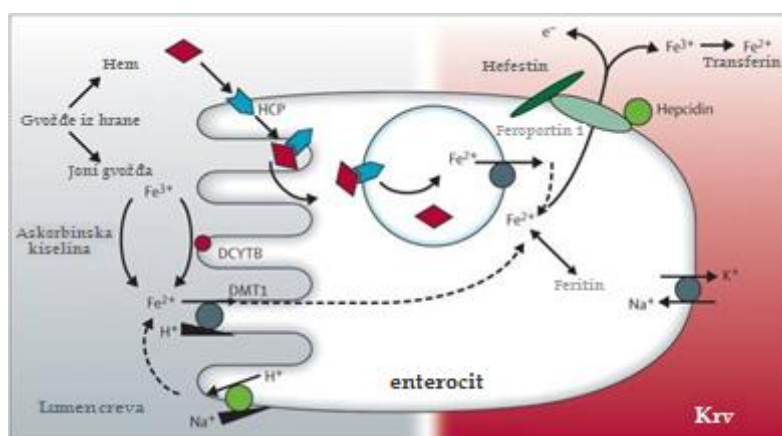
1.6.1. Metabolizam gvožđa

Gvožđe predstavlja veoma važan mikroelement za gotovo čitav živi svet jer je uključeno u brojne energetske, metaboličke, odbrambene i transportne procese u ćelijama. Neophodno je za sintezu važnih biomolekula kao što su hemoglobin, mioglobin, citohrom b i c, citohrom oksidaza, katalaza, peroksidaza, sukcinat dehidrogenaza, ksantin oksidaza i drugi. Od ukupne količine gvožđa u telu odrasle osobe (3-5 g) oko 67% se nalazi u formi hemoglobina, nešto manje od 30% u depovima – feritinu i hemosiderinu, dok ostatak ulazi u sastav mioglobina, transferina i različitih enzima. Dnevne potrebe organizma su oko 10 mg gvožđa i obezbeđuju se unosom hrane. Otprilike ista količina gvožđa se na dnevnom nivou gubi deskvamacijom intestinalnog epitela. Unos gvožđa u organizam je strogo kontrolisan jer ne postoje mehanizmi za njegovu efikasnu eliminaciju iz organizma. Prevelika količina gvožđa može promovisati generisanje slobodnih kiseoničnih radikala koji mogu dovesti do oštećenja i smrti ćelija. Zbog toga je od velikog značaja da se unos gvožđa podudara sa gubicima i da je taj unos precizno regulisan.

Apsorpcija jona gvožđa odvija se u početnom delu dvanaestopalačnog creva (Slika 3). U zavisnosti od oblika u kom se gvožđe nalazi, različiti transportni mehanizmi omogućavaju njegov unos u enterocite (33). Najveći deo gvožđa koje unosimo hranom nalazi se u jonskom feru (Fe^{3+}) obliku. Da bi se gvožđe apsorbavalo neophodno je da se redukuje do fero (Fe^{2+}) jona u kiseloj sredini želudačnog soka u prisustvu reduktaza kao što su askorbinska kiselina (vitamin C), cistein i histidin. Konverziju feru u fero jon može vršiti i enzim – duodenalni citohrom b (Dcytb) koji se nalazi na apikalnoj strani enterocita. Divalentno gvožđe se zatim unosi u enterocit preko transportera divalentnih metala tip 1 (engl. *divalent metal transporter 1*, DMT1). Nedavno je uočena i mogućnost da se i gvožđe u feru obliku unese u enterocit interakcijom sa β 3-integrinom i proteinom mobilferinom. Nakon prolaska kroz apikalnu membranu ovaj kompleks se spaja sa citoplazmatskim proteinima i nastaje paraferitin koji može da prevede gvožđe u fero oblik. Pored jonskog, gvožđe se može uneti u enterocite i u obliku hema (prostetična grupa iz mioglobina i hemoglobina), laktoferina i feritina. Pretpostavlja se da se ovi veliki molekuli unose u ćeliju posredstvom specifičnih

transportnih sistema (za hem se zna da je to proteinski nosač hema, engl. *haem carrier protein type 1*, HCP1), a da se zatim delovanjem unutarćelijskih enzima iz njih oslobađa gvožđe.

Sudbina gvožđa unutar ćelije može biti dvojaka: vezivanje za feritin, intracelularni depo gvožđa ili transport ka bazolateralnoj strani enterocita gde se posredstvom molekula feroportina izbacuje iz ćelije. Kako je životni vek enterocita dvanaestopalačnog creva 3 do 4 dana, njihovom eksfolijacijom se gubi i gvožđe koje je zadržano unutar ćelija, što može da predstavlja mehanizam kojim se organizam suprotstavlja prevelikom unosu ovog mikroelementa. Sa druge strane, izlazak jona gvožđa iz ćelije zavisi od feroportina čija se aktivnost menja u prisustvu hepcidina (feroportin se internalizuje i degraduje u prisustvu ovog proteina). Hepcidin stvaraju hepatociti kada su njihovi depoi gvožđa puni, pa verovatno predstavlja glavni regulatorni mehanizam za unos gvožđa u organizam.



Slika 1.3. *Mehanizam apsorpcije gvožđa u tankom crevu (preuzeto i modifikovano: <http://clashdot.wikidot.com/info:iron-metabolism>)*

Ukoliko je gvožđe transportovano do bazolateralne strane enterocita i putem feroportina prošlo u međuceljski prostor, pod dejstvom transmembranskog proteina hefestina se ponovo vraća u feri oblik i prebacuje u cirkulatorni sistem. U krvi se gvožđe brzo vezuje za transportni protein transferin i prebacuje do ciljnih ćelija koje će preuzeti ovaj kompleks putem receptorima posredovane endocitoze (kompleks gvožđe-transferin se vezuje za transferinski receptor na ciljnoj ćeliji). Kapacitet transferina da

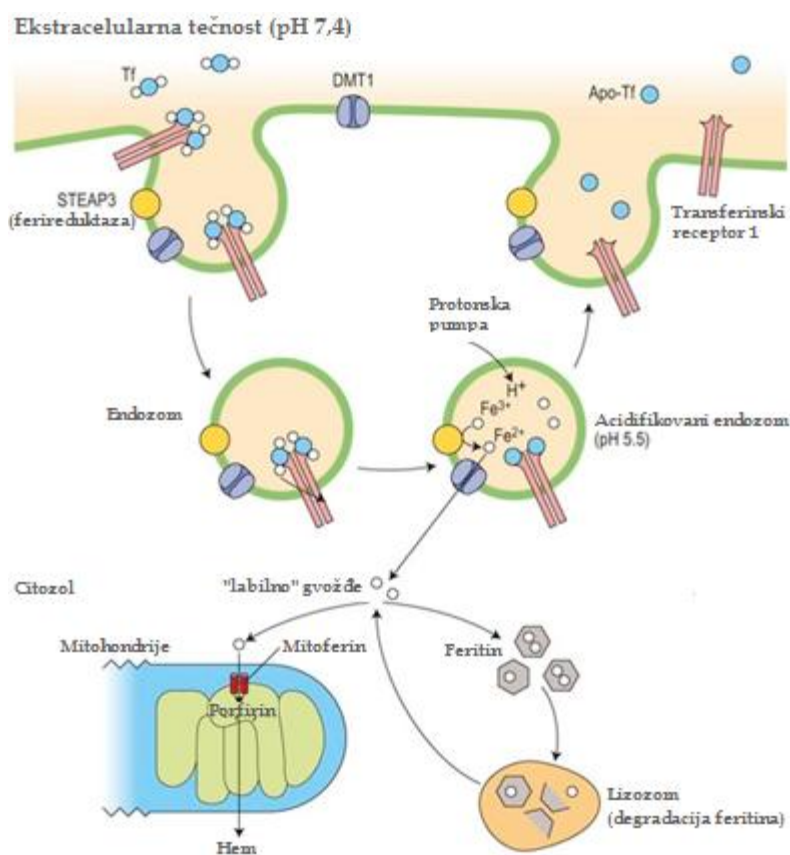
vezuje gvožđe u krvi uveliko premašuje količinu cirkulišućeg gvožđa, i obično je 25-40% transferina saturisano gvoždem. Saturacija transferina govori o količini gvožđa u cirkulatornom sistemu. Unutar ciljne ćelije gvožđe se može koristiti za sintezu različitih biomolekula ili se deponuje u formi feritina i po potrebi oslobađa i transportuje do ćelija kojima je neophodno. Koncentracija feritina u krvi je indirektni pokazatelj stanja telesnih depoa gvožđa (34).

1.6.2. Transferin

Transferin predstavlja monomerni, bilobarni (N i C lobus) glikoprotein krvne plazme molekulske mase oko 80000 Da. Koncentracija transferina u krvi iznosi od 25-50 $\mu\text{mol/l}$, odnosno oko 2,5 g/l. Sinteza ovog glikoproteina se vrši u hepatocitima, a po ispuštanju u krv on obavlja svoju ulogu u transportu jona gvožđa kroz cirkulatorni sistem. Svaki lobus molekula transferina može da veže po jedan jon gvožđa u feri obliku. Stoga su moguća četiri oblika transferina u krvi: kada su i N- i C-lobus vezali gvožđe (11-27%), kada je gvožđe vezano samo za N-lobus (21-23%), kada je gvožđe vezano samo za C-lobus (11-17%) i kada za transferin nije vezano gvožđe-apotransferin (40-51%) (35). Stabilnost veze između molekula transferina i jona gvožđa povećava se u prisustvu bikarbonatnih jona. Kompleks transferin-gvožđe dolazi putem krvi do ciljne ćelije koja na svojoj površini poseduje receptore za transferin. Broj receptora za transferin zavisi od potreba ćelija za gvoždem i u proseku je između 15 i 20% od ukupnog broja receptora integrisano u ćelijsku membranu (33). Veći zahtevi za gvoždem dovode do ugradnje novih receptora na površinu ćelije (36). U zavisnosti od "opterećenja" gvoždem, transferin se jače ili slabije vezuje za transferinski receptor (pri fiziološkom pH apotransferin se najslabije vezuje i lako se otpušta sa receptora, dok je veza sa diferičnim transferinom najjača). Po vezivanju za transferinski receptor, kompleks se vezikularnim transportom unosi u ćeliju, a zatim biva acidifikovan i konačno pri niskom pH gvožđe se oslobađa od transferina (37). Transferin se zajedno sa receptorom vraća na površinu ćelije i oslobađa za novo vezivanje gvožđa (Slika 1.4). Za 8-10 dana, koliko iznosi polu-život transferina, ovaj glikoprotein može da ponovi ciklus vezivanje-oslobađanje gvožđa oko 100 puta (33).

Koncentracija transferina u krvi se određuje imunohemijski, metodom turbidimetrije. Dobru korelaciju sa koncentracijom transferina u krvi pokazuje i

vrednost ukupnog kapaciteta vezivanja gvožđa (transferrin iron binding capacity, TIBC) preko koje se određuje i vrednost saturacije transferina. Određivanje TIBC i saturacije transferina su jednostavnije i jeftinije metode od određivanja serumskog transferina, ali njihovi nedostaci su ti što precenjuju kapacitet transferina za vezivanje gvožđa, uglavnom zbog toga što se joni gvožđa mogu vezati i za druge proteine krvne plazme, kao što su npr. albumini. Nedostaci određivanja serumskog transferina su genetički uslovljene varijacije ovog molekula što dovodi do neadekvatnog vezivanja odgovarajućih antitela. Stoga se prilikom određivanja parametara metabolizma gvožđa često paralelno vrši određivanje koncentracije i saturacije transferina (38).



Slika 1.4. *Transferrinski ciklus (preuzeto i modifikovano: <https://clinicalgate.com/iron-deficiency-anemia-anemia-of-chronic-disorders-and-iron-overload/>)*

1.6.3. Feritin

Feritin predstavlja glavni unutarćelijski depo jona gvožđa. Ovaj globularni protein sa molekulskom masom od 450000 Da ima šupljinu u svom centralnom delu. Svaki molekul feritina u centralnoj šupljini (jezgru) može da deponuje oko 4500 jona gvožđa u feri obliku (39). Unutar jezgra, gvožđe se kristalizuje pa se za oslobađanje iz depoa feritinski kompleks mora najpre razložiti. Forma feritina koja ne sadrži gvožđe naziva se apoferitin. Apoferitin se sastoji iz 24 strukturno identična polipeptidna lanca koji formiraju spoljašnji deo (ljušturu) molekula. Između ovih lanaca nalaze se kanali kojim se joni gvožđa dopremaju do unutrašnje šupljine, odnosno, jezgra molekula. Na samom ulazu kanala nalazi se kompleks dvovalentnih jona (Ca^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} , ...) koji su prikačeni na glutaminske ostatke polipeptidnih lanaca ljušture. Njihova uloga je da regulišu transport jona gvožđa u unutrašnjost feritinskog kompleksa (40). Za razliku od spoljašnje strane ljušture, unutrašnja strana je podložna izmenama u sastavu. Promena u broju karboksilnih i fosfatnih grupa određuje stepen kristalizacije jona gvožđa što dalje uslovljava kapacitativnost feritinskog depoa (40). Osim u ćelijama, feritin se može naći i u cirkulaciji i indirektni je odraz stanja naših unutarćelijskih depoa gvožđa (41). Procenjuje se da se na svakih 1 $\mu\text{g/l}$ feritina u serumu nalazi 8 mg intracelularnog feritina (42). Normalne koncentracije feritina u serumu iznose od 20-250 $\mu\text{g/l}$ kod osoba muškog pola i 20-200 $\mu\text{g/l}$ kod žena (43). Put kojim feritin dolazi do ekstraćelijske tečnosti još uvek nije detaljno razjašnjen, ali je najverovatnije da oštećenje ćelija dovodi do oslobađanja feritinskih kompleksa u krv. Ovo se potvrđuje povećanjem nivoa serumskog feritina nakon oštećenja ćelija u nekim zapaljenskim reakcijama, stoga se feritin ubraja u proteine akutne faze. Postojanje receptora za feritin je za sada potvrđeno na hepatocitima, limfoidnim i eritroidnim prekursorima, kao najvećim potrošačima gvožđa (44). Nedostatak gvožđa u ishrani, smanjena apsorpcija ili povećan gubitak krvarenjem smanjuju nivo gvožđa u organizmu što indirektno pokazuje i nizak serumski nivo feritina (45, 46). Povećane koncentracije feritina u serumu nalaze se u stanjima kada postoji višak gvožđa u organizmu, kao što su hemohromatoza i hemosideroza, česte transfuzije krvi, ali su i karakteristika velikog broja hroničnih infekcija, maligniteta i trovanja gvožđem (47, 48). Nepostojanje adekvatnih mehanizama za izbacivanje "viškova" gvožđa iz organizma vremenom može dovesti do uvećanja nivoa intra- i ekstracelularnog feritina.

1.7. Promena sastava oralne mikroflore kao biomarker starenja

Oralni mikrobiom predstavlja kompleksnu i dinamičnu zajednicu mikroorganizama koja ima važnu ulogu u održavanju zdravlja usne duplje (49). U zamenu za nutrijente i stanište, mikrobiom obezbeđuje domaćinu zaštitu od invazije patogenih mikroorganizama kao i metabolite i imunološke modulatore neophodne za pravilan razvoj i funkcionisanje orofacijalnog sistema (50, 51). Oralni mikrobiom se kvalitativno i kvantitativno menja tokom čitavog života (52). Bakterijska kolonizacija usne duplje počinje prolaskom ploda kroz porođajni kanal i od tog trenutka se dešavaju neprestane promene u ovom mikro biosistemu. Faktori bakterijske adhezije i karakteristike površine ciljne membrane ćelija domaćina omogućavaju primarnu vezu između mikroorganizma i oralne mukoze koja se vremenom usložnjava vezivanjem novih bakterija, čime nastaje visoko organizovana zajednica mikroorganizama zvana biofilm. U prvih nekoliko meseci života biofilm prekriva keratinizovanu i nekeratinizovanu oralnu mukožu, dok se nicanjem zuba broj potencijalnih „niša“ za biofilm značajno uvećava (53, 54). Gleđ zuba i gingivalni sulkus koji se formira oko tek izniklog zuba predstavljaju nova mesta za bakterijske interakcije, rast i razvoj. Stvaranje zubnog kamenca, zubni ispuni, protetske nadoknade i ortodontski aparati postavljeni u usnu duplju doprinose uvećanju broja novih mikrosredina koje pogoduju stvaranju kompleksne „mreže“ mikroorganizama u okviru biofilma (49, 55, 56). Uprkos stalnim promenama broja i sastava mikroorganizama u usnoj duplji, oralni mikrobiom je u fiziološkim uslovima adekvatno balansiran imunim sistemom domaćina i dostupnošću nutrijenata (57, 58).

Značajno mesto u okviru oralnog mikrobioma zauzimaju i parodontopatogene bakterije koje mogu dovesti do ireverzibilnog oštećenja potpornih zubnih tkiva ali i do ozbiljnih sistemskih poremećaja (59-61). Najznačajniji predstavnici ove grupe mikroorganizama su: *Prevotella intermedia*, *Peptostreptococcus micros*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Eikenella corrodens*, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* i *Treponema denticola*.

Prevotella intermedia se ubraja u gram-negativne, obligatorne anaerobe koji su česti izazivači parodontalnih oštećenja. Antigeni koji se nalaze na površini bakterije, kao i njeni produkti izazivaju snažni imuni odgovor domaćina što dovodi do oštećenja

parodontalnih tkiva (62). Interakcija fimbrija bakterije i lamelipodija epitelnih ćelija omogućava adheziju, a određuje i kapacitete za invaziju ciljnih tkiva (63). Jaka veza između bakterije i ciljne ćelije uzrokovana je stimulacijom lamelipodija mehaničkim oštećenjem, inflamacijom ili modifikacijom epitela koji nastaje kao posledica starenja oralnih tkiva (64). Ova interakcija svrstava *P. intermedia*-u u primarne kolonizatore oralnih keratinocita i predstavlja fundament za kasnije naseljavanje sekundarnih kolonizatora kao što je *P. gingivalis*. *P. intermedia* je snažan parodontalni patogen, odgovoran za agresivne forme parodontitisa, akutni ulceronekrozni gingivitis i neke ozbiljne sistemske infekcije (65-67).

Peptostreptococcus micros je anaerobni gram-pozitivni mikroorganizam koji ima važnu ulogu u patogenezi parodontalnih oštećenja (65). Pokazano je da čak i delovi ove bakterije mogu da indukuju imunološke reakcije sa usputnim destrukcijama periodontalnog vezivnog tkiva (68). *P. micros* koagregira sa *Porphyromonas gingivalis*-om i drugim bakterijama u oralnom biofilmu u cilju poboljšane adhezije i stabilnosti bakterijske suprastrukture (69).

Porphyromonas gingivalis je glavni etiološki faktor u razvoju hroničnog parodontitisa (70). Zahvaljujući brojnim faktorima virulencije, ovaj gram-negativni anaerob, zaobilazi nadzor imunog sistema domaćina i izaziva ciljanu tkivnu destrukciju (70). Fimbrijama i kapsulom *P. gingivalis* se "kači" kako na tvrda, tako i na meka oralna tkiva, ali i odoleva fagocitozi, inhibira hemotaksu i smanjuje imuni odgovor domaćina blokirajući sintezu interleukina 1, 6 i 8 od strane fibroblasta (71, 72). Sa druge strane, pronađeno je da kapsula otežava invaziju ciljnih tkiva (73). Lipopolisaharidi bakterijske membrane, aktiviranjem imunološkog odgovora, dovode do remodelovanja kosti, a proteaze do degradacije vezivnog tkiva parodontijuma (74, 75). Metabolizam *P. gingivalis*-a je nezamisliv u odsustvu gvožđa, pa ova bakterija svojim aminopeptidazama razlaže transportne proteine gvožđa i na taj način pribavlja sebi ovaj važan mikroelement (76).

Aggregatibacter actinomycetemcomitans je gram-negativni fakultativni anaerob često prisutan u teškim lezijama parodontalnih tkiva (npr. lokalizovani agresivni parodontitis), ali i u ekstra-oralnim žarištima kod ateroskleroze, endokarditisa, cerebralnih apscesa i osteomijelitisa (59, 77-79). *A. actinomycetemcomitans* efikasno

prolazi kroz epitelne barijere i inicira imuni odgovor koji zatim dovodi do značajnih destrukcija potpornog aparata zuba (80). Izražena invazivnost *A. actinomycetemcomitans*-a se može objasniti proteolizom citokeratina i fibronektina što olakšava prodor kroz meka tkiva (81). Olakšan prodor je zasluga i leukotoksina *A. actinomycetemcomitans*-a koji dovodi do uništavanja ćelija specifičnog i nespecifičnog imuniteta (82, 83).

Eikenella corrodens je jedan od predstavnika gram-negativnih parodontopatogena. Često agregira sa *A. actinomycetemcomitans*-om i *P. gingivalis*-om unutar subgingivalnog biofilma. Može da raste u sredini sa malo kiseonika, ali su mikroelementi, kao što je gvožđe, esencijalni za preživljavanje ovog mikroorganizma na oralnoj mukozi i subgingivalnom prostoru (84). Proteolitički enzimi *E. corrodens* uništavaju vezivno tkivo periodoncijuma, ali i deluju protiv imunoglobulina i komponenti komplementa (84).

Treponema denticola spada u spiralne, gram-negativne anaerobne bakterije, koje su često udružene sa različitim bakterijama subgingivalne niše. Ova bakterija je odgovorna za nastanak ranih faza parodontitisa, akutnog ulcero-nekroznog gingivitisa i akutnog perikoronitisa (85). Različiti faktori virulencije, kao što su proteaze slične tripsinu i himotripsinu, zatim, hemolitički faktori, kao i adhezini kojima se “lepe” za ciljane molekule, doprinose razarajućem efektu *T. denticola*-e na parodontalna tkiva (85, 86). Slično *E. corrodens*, i ovaj mikroorganizam zavisi od oksido-redukcionih svojstava mikroelemenata, gvožđa i mangana (87, 88).

Tannerella forsythia je anaerobni gram-negativni predstavnik familije *Bacterioides*. Glavni faktor virulencije *T. forsythia*-e, su proteaze koje učestvuju u degradaciji proteinskih nosača gvožđa čime obezbeđuju gvožđe i aminokiseline esencijalne za bakterijski rast (89). Delovanje proteaza na imunoglobuline i druge protektivne molekule domaćina, slabi njegov imuni odgovor, a ujedno dolazi i do “otkrivanja” mesta (kriptotope) pogodnih za bakterijsku adheziju (90). Dalje, otpuštanjem različitih metabolita, kao što su sukcinati, *T. forsythia* pospešuje razvoj *P. gingivalis*a i *T. denticola*-e (91). Sva tri mikroorganizma se ubrajaju u grupu bakterija “crvenog kompleksa” odgovornog za različite forme parodontitisa (92).

1.8. Infekcija virusom humane imunodeficijencije i starenje

Infekcija virusom humane imunodeficijencije (eng. *human immunodeficiency virus, HIV*) spada u hronično, infektivno oboljenje koje je, praktično, od otkrića prvog slučaja početkom osamdesetih godina prošlog veka, veoma brzo dobilo pandemijske razmere. Prema podacima Svetske zdravstvene organizacije (SZO) iz 2016. godine, širom sveta je blizu 37 miliona ljudi zaraženo ovim virusom, dok je između 35 i 43 miliona osoba umrlo od posledica HIV infekcije. Samo u toku 2016. od komplikacija povezanih sa infekcijom HIV-a umrlo je oko milion ljudi. HIV slabi imuni odgovor organizma, što može dovesti do pojave brojnih oportunističkih infekcija i tumora.

Tri najčešća načina transmisije HIV-a su: seksualni kontakt, krvni put (transfuzije krvi, davanje produkata krvi, nesterilne igle) i vertikalni prenos sa inficirane majke na plod. Heteroseksualni kontakt je danas najčešći put transmisije virusa humane imunodeficijencije u svetu, dok je homoseksualni put drugi po učestalosti. Kontrola krvi i produkata krvi smanjila je prenos HIV-a transfuzijama u razvijenim zemljama, dok je u zemljama u razvoju stopa ove vrste prenosa i dalje visoka zajedno sa zajedničkom upotrebom igala kod intravenskih narkomana. Do 35% HIV-om inficiranih majki prenese infekciju na plod, kako u toku same trudnoće kroz placentu, tako i u toku porođaja. Visoke koncentracije HIV-a u mleku dojilja mogu dovesti do transmisije virusa na plod (93). Virus se ne može preneti dodiranjem, deljenjem predmeta ili odeće sa inficiranom osobom, grljenjem, ljubljenjem, aerosolima, insektima ili fekooralnim putem. Rizik od infekcije za zdravstveno osoblje predstavlja slučajan ubod inficiranom iglom, mada je u tom slučaju rizik od prenosa virusa oko 0,3% (94). Preekspoziciona i postekspoziciona profilaksa značajno smanjuju rizik od infekcije (95).

Iako je učinjeno dosta na prevenciji i tretmanu oportunističkih infekcija i tumora kod HIV-om inficiranih osoba, ove komplikacije su najčešći uzroci smrti kod osoba sa HIV-om. Centar za kontrolu i prevenciju bolesti (Center for Disease Control and Prevention, CDC, www.cdc.gov/hiv/basics/livingwithhiv/opportunisticinfections.html) navodi sledeća stanja kao najčešće komplikacije HIV infekcije: kandidijazu disajnih puteva, pluća i jednjaka, invazivni cervikalni karcinom, kokcidiomikoze, kriptokokoze, citomegalovirusne infekcije, encefelitis prouzrokovan HIV-om, infekcije herpes simpleks virusom, histoplazmoze, Kapošijev sarkom, različite tipove limfoma,

tuberkulozu, mikobakterijske infekcije, pneumoniju *Pneumocystis carinii*, rekurentne pneumonije, progresivnu multifokalnu encefalopatiju, septikemiju izazvanu salmonelom, toksoplazmozu mozga i nagli gubitak telesne težine. Najčešće oralne komplikacije HIV-a su oralna kandidijaza, čupasta leukoplakija, linearni gingivalni eritem i akutni ulceronekrotični gingivitis i parodontitis (96, 97).

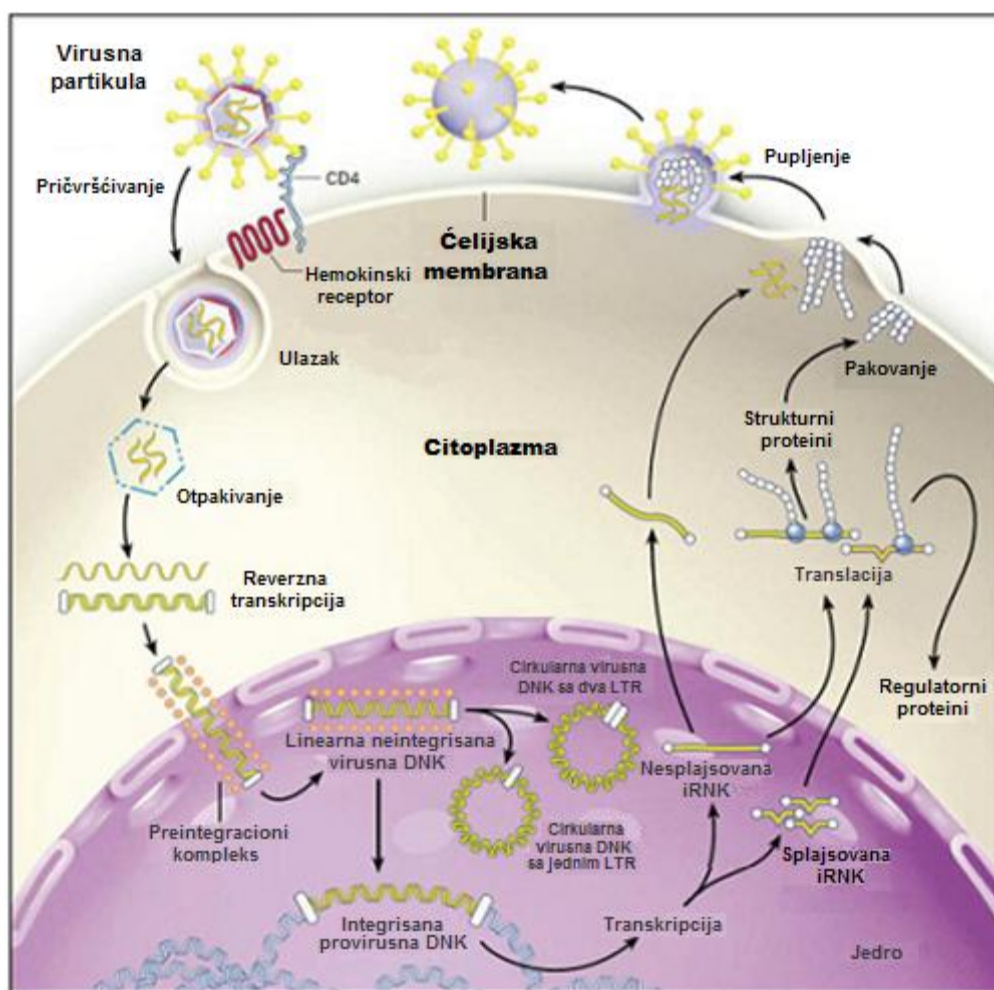
1.8.1. Struktura HIV-a

Virus humane imunodeficijencije pripada retrovirusima, grupi virusa koji imaju sposobnost da svoju jednolančanu RNK prevode u dvolančanu DNK posredstvom enzima reverzne transkriptaze (Slika 1.6). Genetički materijal virusa humane imunodeficijencije upakovan je u lipidni dvosloj u koji su uronjeni transmembranski proteini sa oznakom *gp41* na koje se sa spoljašnje strane virusne partikule nadovezuju glikoproteini *gp120*. Proteini *gp41* i *gp120* formiraju molekul *gp160*. Unutrašnju stranu lipidnog dvosloja podupire matriksni protein p17, dok protein p24 formira kapsid virusa unutar koga se pored jednolančane RNK nalaze i tri enzima neophodna za životni ciklus virusa, reverzna transkriptaza (p64), integraza (p32) i proteaza (p10).

Ribonukleinska kiselina HIV-a se sastoji iz devet gena smeštenih između dva duga terminalna ponovka (eng. *long terminal repeats*, LTR) koja imaju ulogu u ubacivanju virusnog genoma u genom domaćina (uz pomoć enzima integraze), kao i u započinjanju transkripcije HIV gena. Tri gena HIV RNK (*gag*, *pol* i *env*) kodiraju strukturne proteine i enzime virusne partikule, dok preostali geni (*tat*, *rev*, *nef*, *vif*, *vpr* i *vpu*) spadaju u regulatorne gene. HIV-2 umesto regulatornog proteina *vpu* sadrži *vpx*. *Gag* kodira četiri glavna strukturna proteina virusne partikule: p6; nukleokapsidni protein, NC (p9); i dva već spomenuta proteina, matriksni, MA (p24) i kapsidni, CA (p17). *Pol* nosi informacije za sintezu reverzne transkriptaze (RT), integraze (IN), proteaze (PR) i ribonukleaze H (RNAse H). *Env* kodira protein p160 koji zajedno sa ugljenohidratnom komponentom koju mu dodaju ćelijski enzimi čini glikoprotein *gp160*. Regulatorni gen *tat* (skraćeno od transaktivator) ubrzava proizvodnju virusnih čestica, dok *rev* i *vpr* (kodira virusni protein R) ubrzavaju stvaranje virusnih proteina. *Vpu* (kodira virusni protein U) učestvuje u stvaranju virusnih čestica i olakšava njihov izlazak iz ćelije domaćina, dok *vif* (kodira virion infektivni faktor) određuje stepen infektivnosti novostvorene virusne partikule. Gen koji vrši negativnu regulaciju sinteze

1.8.2. Mehanizam delovanja HIV-a

Ciljne ćelije HIV-a su pomažući T-limfociti (eng. *T-helper lymphocytes*), monociti i tkivni makrofagi. Ulasku HIV-a u ćeliju prethodi vezivanje *gp120* virusa za CD4 receptor kao i za hemokinske ko-receptore CXCR4 (CD184) i CCR5 (CD195) koji se nalaze na membranama ciljnih ćelija (98, 99). Ova veza aktivira *gp40* da se odvoji od *gp120* i insertuje u ciljnu ćeliju i konačno započne fuziju lipidnog dvosloja virusne čestice sa plazma membranom ćelije domaćina (100, 101). Na ovaj način se virusni kapsid ubacuje u ćeliju, a sadržaj kapsida se nakon dezintegracije celokupnog kapsidnog (CA) i dela matriksnog (MA) proteina oslobađa u citoplazmu ćelije domaćina (102). RNK virusa se u citoplazmi konvertuje u dvolančanu komplementarnu DNK (cDNK) pod dejstvom enzima reverzne transkriptaze. Ova cDNK sa preostalim proteinskim komponentama virusa (MA, IN, *vpr*) ali i citoplazmatskim proteinima ćelije sačinjava preintegracioni kompleks (eng. *pre-integration complex*, PIC). Preintegracioni kompleks se mikrotubularnim transportom prebacuje do jedarne membrane kroz čije pore ulazi u unutrašnjost jedra (102). Enzim integraza zatim ugrađuje genetski materijal virusa u genom domaćina što je potpomognuto i „lepljivim krajevima“ (eng. *sticky ends*) LTR sekvenci virusne cDNK. Mesto integracije zavisi od brojnih faktora među kojima su najznačajniji sekvenca DNK domaćina i organizacija hromatina. Najčešće se cDNK virusa ugrađuje u delove DNK molekula domaćina sa visokim sadržajem CG nukleotida i velikom gustinom CpG ostrva, kao i u regione sa povećanom deacetilacijom histona što sve ukazuje na regione sa visokom transkripcionom aktivnošću (103). Integrisana virusna DNK naziva se provirus. Regulacija ekspresije HIV gena zavisi od složene interakcije ćelijskih transkripcionih faktora i transaktivatora virusne transkripcije zvanog Tat. Transkripcija provirusa dovodi do sinteze virusnih iRNK koje će se u citoplazmi ćelije prepisati u oko 30 različitih virusnih proteina od kojih su najznačajniji Tat, Nef, Rev, Vpu, Vpr, Vif, Env i Gag-Pol poli-protein (104). Gag protein je jedan od ključnih faktora u „sklapanju“ novih virusnih čestica (105). Formirani virusi se oslobađaju iz ćelije nakon njenog pucanja. Sa druge strane, ćelijski integritet može ostati očuvan tako što će virusi da „pupe“ i izlaze iz ćelije kroz plazma membranu u ekstraćelijsku tečnost (Slika 1.7).



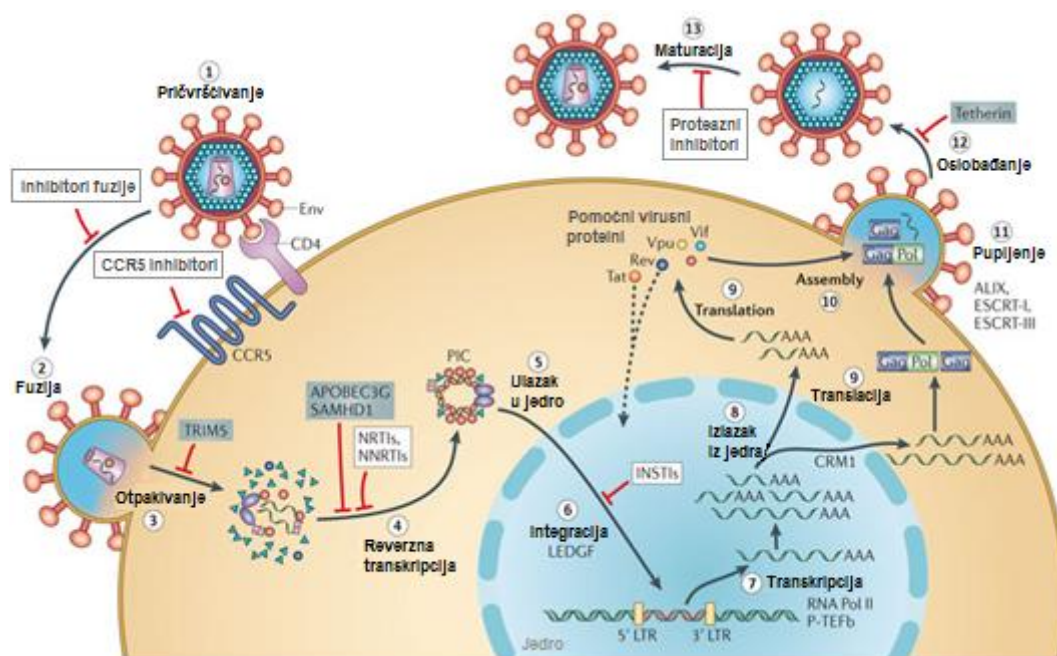
Slika 1.7. Replikacija HIV-a (preuzeto i modificirano:

<http://www.retrovirology.com/content/10/1/41>)

1.8.3. Antiretrovirusna terapija i starenje

U terapiji HIV infekcije se primenjuju tačno utvrđene kombinacije antiretrovirusnih lekova (kombinovana antiretrovirusna terapija, cART), koji se prema mehanizmu dejstva svrstavaju u pet grupa (Slika 1.8). Nukleozidni/nukleotidni inhibitori reverzne transkriptaze (NIRT) se nakon intracelularne trifosforilacije kompetitivnom inhibicijom vezuju za reverznu transkriptazu (RT), enzim koji je odgovoran za transkripciju virusne RNK u dvostruki DNK lanac (106). Na ovaj način oni blokiraju dalju sintezu DNK molekula HIV-a. Lekovi iz grupe NIRT su: zidovudin, zalcitabin, didanozin, stavudin, lamivudin i dr. Nenukleozidni inhibitori reverzne transkriptaze (NNIRT) se takođe selektivno i specifično vezuju za RT HIV-a i sprečavaju njenu aktivnost (106). Lekovi iz grupe NNIRT su: nevirapin, delaviridin, efavirenz i etravirin. Ovo je mogući način delovanja pomenutih lekova i na humanu reverznu transkriptazu, pa samim tim i na dužinu telomera hromozoma inficirane ćelije.

Treća grupa lekova predstavljena je inhibitorima HIV-proteaze, proteazni inhibitori (PI). Njihov mehanizam delovanja ogleda se u blokiranju nastanka gradivnih proteina neophodnih za formiranje zrele virusne partikule. U ovu grupu spadaju: sakvinavir, lopinavir, ritonavir, indinavir, nelfinavir i dr. Inhibitori fuzije HIV-a sprečavaju vezivanje i ulazak virusa u ćeliju domaćina onemogućavanjem konformacionih promena receptorskih molekula. U inhibitore fuzije ubrajaju se: enfuvirtid i maravirok. Peta i za sada poslednja grupa antiretrovirusnih lekova su inhibitori virusne integraze. Oni sprečavaju povezivanje virusne DNK sa domaćinovom i na taj način i širenje dalje infekcije. Glavni lek iz ove grupe je raltegravir. Zahvaljujući uspehu antiretrovirusne terapije (ART), HIV infekcija je prevedena iz nekada neizlečive i smrtonosne bolesti u hronično, progresivno oboljenje. Tako je antiretrovirusna terapija u mnogome izmenila i kliničku sliku HIV infekcije u usnoj duplji. Iako su stepen i vrsta promena u usnoj duplji u korelaciji sa stadijumom HIV infekcije, primetno je značajno smanjenje učestalosti teških oblika parodontopatija i stomatitisa, oralne kandidijaze, čupaste leukoplakije i Kapošijevog sarkoma koji su nekada bili karakteristične manifestacije kod obolelih od SIDE.



Slika 1.8. Mesta delovanja antiretrovirusnih lekova (preuzeto i modifikovano: <https://sites.google.com/site/glasgowunimedicine/home/infection>)

Iako je zahvaljujući ART-u životni vek osoba sa HIV infekcijom znatno produžen, istraživanja ukazuju da je kod ovih pacijenata proces starenja izmenjen i ubrzan u odnosu na proces starenja kod zdravih osoba (107). Tako su kod ovih pacijenata često prisutni metabolički sindrom, kardiovaskularne i cerebrovaskularne bolesti, bolesti urinarnog sistema, kao i maligniteti koji za posledicu imaju skraćenje životnog veka. Međutim, i dalje je nejasno da li i na koji način sama HIV infekcija, kao i antiretrovirusni lekovi utiču na proces starenja. Tako je jedan mali broj, međusobno kontradiktornih studija pokazao da sama HIV infekcija utiče na promenu relativne dužine telomere (108, 109). Grupe autora su pokazale da dolazi do značajnog skraćanja dužine telomere u HIV-om inficiranih osoba, što objašnjavaju uticajem inflamacije na konstantnu aktivaciju imunog sistema, čemu pridodaju i izloženost oksidativnom stresu (110, 111). Nasuprot njima, pokazan je i uticaj HIV infekcije na povećanje dužine telomere što se tumači virusnom aktivacijom telomeraze, acilacijom histona i demetilacijom promotora *TERT-a*, kao i posttranslacionom kontrolom telomerazne aktivnosti (112). Istovremeno bi i antiretrovirusni lekovi mogli da utiču na stabilnost i funkcionisanje telomeraze, što bi se takođe odrazilo na promenu dužine telomera.

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Osnovni ciljevi istraživanja:

- 1) Odrediti relativnu dužinu telomera hromozoma leukocita periferne krvi kod dve grupe ispitanika (HIV-om neinficiranih osoba i osoba sa HIV-infekcijom).
- 2) Odrediti serumske parametre metabolizma gvožđa kod obe grupe ispitanika.
- 3) Ustanoviti mikrobiološki sastav usne duplje kod obe grupe ispitanika.
- 4) Utvrditi kliničke parametre stanja parodontalnih tkiva kod obe grupe ispitanika.
- 5) Ispitati povezanost između dobijenih vrednosti dužine telomera i parametara metabolizma gvožđa sa primenom različitih antiretrovirusnih lekova, parodontalnim statusom ispitanika, kao i sa statusom bakterijske flore kod obe grupe ispitanika.

Hipoteza istraživanja

HIV infekcija i primena antiretrovirusne terapije utiču na proces starenja organizma što se posledično može odraziti i na stanje parodontalnih tkiva.

3. MATERIЈAL I METODE

3.1. Etički standard

Studija je odobrena od strane Etičkih komiteta Stomatološkog (broj odobrenja 36/9, od 13.03.2015. godine) i Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu (broj odobrenja 29/XII-1, od 01.12.2014. godine). Svi eksperimenti su izvođeni u skladu sa Edinburškom revizijom Helsinške deklaracije. Pre uključenja u studiju protokol istraživanja je detaljno objašnjen svim pacijentima i od njih je dobijena pisana saglasnost za učestvovanje u studiji. Pacijenti su mogli na sopstveni zahtev da prekinu učešće u bilo kojoj fazi studije.

3.2. Dizajn studije

Studija koja je predmet ove doktorske disertacije je bila podeljena na dva dela. U prvom delu studije, kod svakog pacijenta su određivani relativna dužina telomera i parametri metabolizma gvožđa, dok je u drugom delu studije kod istih pacijenata određivano prisustvo parodontopatogenih mikroorganizama i promena na oralnoj sluzokoži, kao i stanje parodontalnih tkiva. Pacijenti su prema zdravstvenom statusu bili podeljeni u dve grupe:

- a) neinficirane i
- b) inficirane HIV-om

Svi pacijenti su dodatno bili podeljeni u dve starosne grupe: grupu pacijenata mlađih od 35 godina i grupu pacijenata starijih od 50 godina. Pacijenti koji su inficirani HIV-om su dalje bili podeljeni prema terapijskom režimu na: one koji nisu bili na terapiji, pacijente tretirane kombinacijom nukleozidnih inhibitora (2NRTIs+NNRTI), pacijente lečene kombinacijom nukleozidnih inhibitora i proteaznog inhibitora (2NRTIs+PI), pacijente lečene inhibitorima integraze (INSTI) i pacijente lečene kombinacijom inhibitora integraze i proteaznih inhibitora (PI+INSTI).

3.3. Ispitivana populacija i kriterijumi za uključivanje i isključivanje pacijenata

U ovoj studiji učestvovalo je 105 HIV-om inficiranih pacijenata lečenih na Odeljenju za HIV i AIDS, Klinike za infektivne i tropske bolesti "Prof. dr Kosta Todorović", Kliničkog centra Srbije i 100 pacijenata, dobrovoljnih davalaca krvi sa Instituta za transfuziologiju Srbije u Beogradu. Pacijenti su uključivani u studiju po

redosledu dolaska na odgovarajući pregled. U studiju su bile uključene samo osobe muškog pola. Opšti kriterijumi za uključenje u studiju bili su starost pacijenata i dobrovoljni pristanak za učestvovanje u studiji. Dodatno, za uključenje pacijenata zaraženih HIV-om bila je potrebna potvrđena HIV-monoinfekcija odgovarajućim imunološkim testovima (ELISA – *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* i Western blot). Kriterijumi isključenja su bili zajednički za obe ispitivane grupe. Pacijenti mlađi od 18 godina i pacijenti između 35 i 50 godina starosti, nisu bili uključeni u studiju. Dodatni kriterijumi isključenja bili su: akutne ili teške hronične bolesti, koinfekcije sa virusima hepatitisa B (HBV) ili hepatitisa C (HCV), radioterapija ili terapija citotoksičnim lekovima, korišćenje alkohola i narkotika i prisustvo minimum 20 zuba.

3.4. Prikupljanje uzoraka

Za ispitivanje relativne dužine telomera kao i broja virusnih kopija i CD4 broja, prikupljani su uzorci pune krvi u 2 epruvete zapremine od 6 ml (BD Vacutainer® K₂EDTA, Franklin Lakes, NJ, USA) u kojima se kao antikoagulantno sredstvo nalazi etilendiaminotetrasirćetna kiselina (EDTA). Za određivanja parametara statusa gvožđa krv je prikupljana u epruvetu zapremine 6 ml sa serumskim separatorom (BD Vacutainer® SST, Franklin Lakes, NJ, SAD), a zatim je krv centrifugirana na 2000 g u trajanju od 10 minuta, na sobnoj temperaturi. Nakon centrifugiranja serum je prebačen u nove, sterilne, plastične tube od 1,5 ml. Za ispitivanje kvantitativnog i kvalitativnog sastava oralne flore uzimani su uzorci briseva grubim trljanjem unutrašnjih strana oba obraza. Inaktivacija virusa iz pune krvi vršena je zagrevanjem uzorka na 60 °C u trajanju od 40 minuta. Uzorci pune krvi, serumi i brisevi obrazne sluzokože su čuvani na -70 °C do daljih analiza.



Slika 3.1. Epruvete za prikupljanje uzoraka krvi i komplet za bris obrazne sluzokože

3.5. Izolacija DNK iz pune krvi

Uzorci DNK iz pune krvi su izolovani metodom iseljavanja. Pola mililitra pune krvi je prebačeno iz epruvete u sterilnu plastičnu tubu zapremine 1,5 ml. Uzorku je zatim dodato 700 μ l rastvora za liziranje eritrocita, a potom je čitava smeša resuspendovana laganim provlačenjem kroz plastični nastavak automatske pipete. Uzorak je zatim centrifugiran na 12100 g u trajanju od 30 sekundi. Nakon centrifugiranja odbačen je supernatant, a pelet je kompletno resuspendovan u 1 ml rastvora za liziranje eritrocita. Centrifugiranje uzorka je ponovljeno na istoj brzini i u jednakom trajanju. Ukoliko nakon centrifugiranja pelet nije bio bele boje koraci centrifugiranja su ponavljani. Dobijeni beli pelet je zatim resuspendovan u 300 μ l rastvora za liziranje leukocita i 20 μ l 10% natrijum-dodecil sulfata (SDS). U smešu je zatim dodato 20 μ l proteinaze K koncentracije 10 mg/ml i uzorak je lagano vorteksovan. Usledilo je inkubiranje uzorka u vodenom kupatilu na 56 °C u trajanju od sat vremena. Po završenoj inkubaciji u smešu je dodato 120 μ l 5M natrijum-hlorida i uzorak je lagano vorteksovan u trajanju od 30 sekundi. Uzorak je zatim centrifugiran na 12000 g u trajanju od 3 minuta i dobijeni supernatant, koji sadrži molekule DNK, je prebačen u novu sterilnu, plastičnu tubu od 1,5 ml. U supernatant je zatim dodat 1 ml hladnog (-20 °C), apsolutnog etanola i uzorak je promućkan u ruci 30 puta. Usledilo je centrifugiranje na 12000 g u trajanju od 2 minuta. Nakon toga supernatant je odbačen i u tubu je dodat 1 ml hladnog (-20 °C) 75% etanola. Uzorak je promućkan u ruci 30 puta, a zatim centrifugiran na 12000 g u trajanju od 2 minuta. Po centrifugiranju, supernatant je odbačen, a pelet je ostavljen u termostatu na temperaturi od 37 °C u trajanju od 10 minuta, kako bi višak etanola ispario. Pelet je rastvoren u 100 μ l destilovane vode i čuvan na -70 °C do narednih analiza.

Tabela 3.1. Rastvori za liziranje krvnih ćelija

Reagens	Sastav
Rastvor za liziranje eritrocita	10,95 g saharoze, 1 ml 1 M Tris-HCl (pH 7,5), 1 ml Triton X-100 M, 0,5 ml 1 M MgCl ₂ , destilovana voda do 100 ml
Rastvor za liziranje leukocita	1 ml 1M Tris-HCl (pH 8,0), 40 ml 1 M NaCl, 0,4 ml 0,5 M Na ₂ EDTA (pH 8,0), destilovana voda do 100 ml

3.6. Izolacija DNK iz brisa obrazne sluzokože

Izolacija bakterijske DNK iz brisa obrazne sluzokože vršena je metodom prokuvavanja. Pamučna vatica brisa je odvojena sterilnim makazicama i prebačena u sterilnu, plastičnu tubu od 1,5 ml. U tubicu je dodato 300 μ l 50 mM rastvora natrijum-hidroksida, a zatim je tubica lagano vorteksovana u trajanju od 10 sekundi. Uzorak je dalje inkubiran u termošejkeru (Biosan TS-100C®; Riga, Letonija) na 95 °C u trajanju od 5 minuta. Rastvor je zatim pažljivo prebačen u novu, sterilnu, plastičnu tubu od 1,5 ml i u njega je dodato 30 μ l 1M rastvora Tris-HCl (pH=8,0). Uzorak je zatim centrifugiran (Eppendorf MiniSpin®; Hamburg, Nemačka) na 12000 g u trajanju od 2 minuta i supernatant je prebačen u nove, sterilne, plastične tube zapremine 1,5 ml. Do daljih analiza uzorak je čuvan na -20 °C.

3.7. Određivanje koncentracije i čistoće genomske DNK

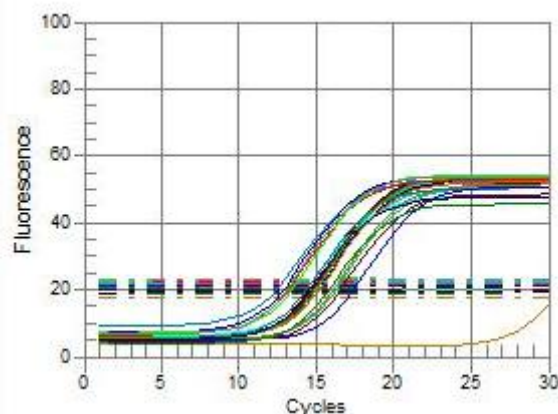
Koncentracija i čistoća genomske DNK dobijene iz uzoraka pune krvi je određivana metodom spektrofotometrije u maloj zapremini tečnosti (eng. microvolume spectrophotometry) na NanoDrop® 1000 spektrofotometru (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA). Određivanje apsorbance uzorka vršilo se postavljanjem 1 μ l uzorka na optički put dužine 0,2 mm na talasnim dužinama od 230, 260 i 280 nm monohromatske svetlosti. Apsorbanca uzorka (A) je poređena sa apsorbancom destilovane vode (blank) i softverski je određivana koncentracija DNK ispitivanog uzorka. U slučajevima kada je odnos apsorbanci uzorka na talasnim talasnim dužinama od 260 i 280 nm (OD260/280) bio veći od 1,8, a odnos apsorbanci uzorka na talasnim dužinama od 230 i 260 nm (OD230/260) bio između 2 i 2,2, uzorak se smatrao čistim i dalje je analiziran. Na osnovu izmerenih koncentracija DNK u uzorcima, pripremljeni su radni rastvori u koncentraciji od 5 ng/ μ l.



Slika 3.2. Spektrofotometar NanoDrop® 1000

3.8. Određivanje relativne dužine telomera

Određivanje relativne dužine telomera u uzorcima DNK dobijenih iz pune krvi pacijenata vršeno je metodom relativne kvantifikacije pomoću lančane reakcije polimeraze u realnom vremenu (real-time polymerase chain reaction, real-time PCR). Ovom metodom se artifičijalno umnožava genetski materijal imitirajući prirodne uslove replikacije DNK molekula kroz ciklično smenjivanje faza denaturacije, hibridizacije i elongacije na adekvatnim temperaturnim profilima. Ugrađivanjem fluorescentne boje u molekul dvolančane DNK moguće je pratiti umnožavanje molekula DNK pomoću detektorskog sistema aparata. Ciklus u kom reakcija umnožavanja ulazi u eksponencijalnu fazu naziva se Ct vrednost (Cycle threshold). Ct vrednost je obrnuto srazmerna količini genetskog materijala koji se amplifikuje. Niža Ct vrednost govori o većoj količini dela molekula DNK koji se umnožava, dok visoke Ct vrednosti govore maloj količini dela DNK koji treba umnožiti. Normalizacija rezultata postiže se oduzimanjem Ct vrednosti referentnog gena (humani beta-globin) od Ct vrednosti ispitivanog uzorka.



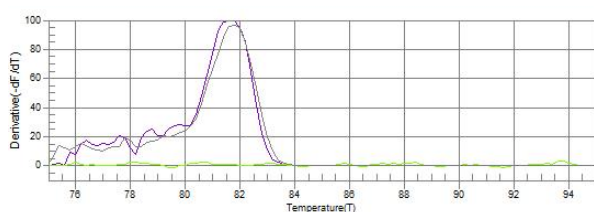
Slika 3.3. Detekcija fluorescentne boje u toku lančane reakcije polimeraze

Za određivanje relativne dužine telomera real-time PCR analiza se vršila u dve odvojene reakcije, umnožavanje telomera i umnožavanje referentnog gena - humanog beta globina (HBG). U 23 μ l reakcione smeše koju je sačinjavalo 12,5 μ l Maxima™ SYBRGreen/ROX qPCR Master Mix-a (Thermo Fisher Scientific, Vilnius, Litvanija), po 1 μ l TelF i TelR prajmera finalnih koncentracija od 100 i 900 nM, redom, odnosno HBGF i HBGR prajmera finalnih koncentracija 300 i 700 nM, redom i 8,5 μ l destilovane vode dodavano je po 10 ng DNK uzorka (2 μ l radnog rastvora DNK).

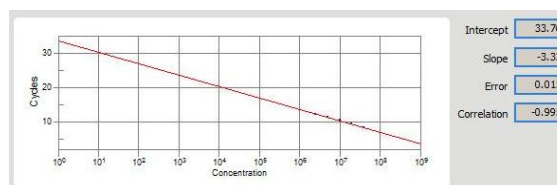
Sekvence prajmera su date u tabeli 3.2. Real-time PCR analiza je izvođena na Real-time PCR sistemu za detekciju (Line Gene-K Fluorescence PCR detection system, BIOER Technology, Šangaj, Kina). Temperaturni profil za reakciju umnožavanja telomera uključivao je početnu denaturaciju na 95 °C u trajanju od 10 minuta i 30 ciklusa denaturacije na 95 °C u trajanju od 15 sekundi i hibridizacije na 56 °C u trajanju od 60 sekundi. Amplifikacija humanog beta globina vršila se prema sledećem temperaturnom profilu: početna denaturacija na 95 °C u trajanju od 10 minuta i 40 ciklusa denaturacije na 95 °C u trajanju od 15 sekundi i hibridizacije na 54 °C u trajanju od 60 sekundi. Zasad provere specifičnosti reakcije rađena je i analiza topljenja (melting analiza) dobijenih produkata gradiranim podizanjem temperature reakcione smeše za 0,2 °C na svakih 20 sekundi. Početna temperatura analize topljenja iznosila je 75 °C, a krajnja 95 °C. Za evaluaciju uspešnosti reakcije, nagib standardne krive serijski razblažene referentne DNK (293T, koncentracije, 40, 20, 10, 5, 2,5 ng/μl) je analizirana u svakoj reakciji. Ako su R^2 vrednosti standardne krive bile veće od 0,98 podaci dobijeni iz reakcije su dalje analizirani. Relativna dužina telomera (RTL) je dalje izračunavana pomoću $\Delta\Delta C_t$ metoda opisanog od strane Cawthona (113).

Tabela 3.2. Sekvence prajmera i temperature hibridizacije (Th) za telomere i referentni gen

Prajmeri	Sekvence prajmera (5'→3')	Th (°C)
<i>Prajmeri za telomere</i>	TelF: CGGTTTGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTT TelR: GGCTTGCCTTACCCTTACCCTTACCCTTACCCTTACCCT	56
<i>Prajmeri za humani beta-globin (HBG)</i>	HBGF: GCTTCTGACACAACACTGTGTTCCTACTAGC HBGR: CACCAACTTCATCCACGTTCCACC	54



Slika 3.4. Kriva topljenja (eng. melting curve) produkata real-time PCR-a



Slika 3.5. Generisanje standardne krive reakcije

3.9. Određivanje vrednosti parametara metabolizma gvožđa

Iz uzoraka seruma su određivani sledeći parametri metabolizma gvožđa: serumsko gvožđe, ukupna saturacija transferina gvoždem (total iron binding capacity-TIBC), saturacija transferina gvoždem, koncentracija transferina i koncentracija feritina.

3.9.1. Određivanje koncentracije serumskog gvožđa

Koncentracija gvožđa vezanog za transferin u serumu određivana je pomoću ferozinskog testa (BioSystems, Barselona, Španija) prema uputstvima proizvođača. Serumsko gvožđe se u najvećem procentu nalazi u trovalentnom, feri obliku (Fe^{3+}) vezano za transportni protein transferin. Dodavanjem rastvora guanidinium-hlorida u serum, gvožđe se oslobađa od transferina, a zatim se pomoću askorbinske kiseline redukuje u dvovalentni, fero oblik (Fe^{2+}). U serum se zatim dodaje ferozin koji sa dvovalentnim gvoždem stvara obojeni kompleks. Apsorbanca rastvora je proporcionalna količini dobijenog obojenog kompleksa. Apsorbance (A) rastvora uzorka, standarda, blanka sa su merene na fotometru (ByoSystems photometer BTS-330, Barselona, Španija). Za određivanje koncentracije serumskog gvožđa u odgovarajućim kivetama su pripremljeni sledeći rastvori: rastvor guanidinium-hlorida (reagens A), rastvor askorbinske kiseline i ferozina (reagens B), radni rastvor (smeša reagenasa A i B) kao i rastvor gvožđa koji predstavlja standard. Sastav i koncentracije reagenasa su date u tabeli . Blank je dobijen mešanjem 200 μl uzorka sa 1 ml reagensa A. Uzorak je dobijen mešanjem 200 μl seruma i 1 ml radnog rastvora, a standard mešanjem 200 μl standarda sa 1 ml radnog rastvora. Nakon dobrog mešanja rastvori su inkubirani na sobnoj sobnoj temperaturi u trajanju od 5 minuta. Očitavanje apsorbanci pripremljenih rastvora vršeno je na talasnoj dužini od 560 nm.

Tabela 3.3. Reagensi za određivanje koncentracije serumskog gvožđa

Reagens	Sastav
Reagens A	1 M guanidinium hlorid, 0,4 M acetatni pufer
Reagens B	8 mM ferozin, 200 mM askorbinska kiselina
Radni rastvor	smeša reagenasa A i B u odnosu 4:1
Standard gvožđa	200 $\mu\text{g}/\text{dl}$

Koncentracija (C) serumskog gvožđa je izračunavana pomoću formule:

$$C_{\text{uzorka}} = (A_{\text{uzorka}} - A_{\text{blank}}) / A_{\text{standard}} \times C_{\text{standard}}$$

3.9.2. Određivanje ukupnog kapaciteta vezivanja gvožđa

Ukupni kapacitet vezivanja gvožđa (transferrin iron binding capacity, TIBC) je određivan nakon potpunog zasićenja serumskog transferina sa rastvorom feri jona, dodavanjem 1 ml 0,12 mM rastvora gvožđe (III)-hlorida u 500 µl seruma. Nakon inkubacije na sobnoj temperaturi u trajanju od 30 minuta, višak jona gvožđa u feri obliku je precipitiran sa prahom magnezijum-hidroksid karbonata i ostavljen na sobnoj temperaturi u trajanju od 60 minuta. U toku ove inkubacije rastvor je nekoliko puta snažno promešan. Rastvor je zatim centrifugiran na 2000 g u trajanju od 10 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon centrifugiranja, supernatant u kom se nalazi transferin za koji je vezano gvožđe pažljivo je prebačen u novu, sterilnu, plastičnu tubu od 1,5 ml. Koncentracija gvožđa koje je vezano za transferin se određuje ferozinskim testom kao što je opisano u delu određivanju koncentracije serumskog gvožđa.

3.9.3. Određivanje procenta saturacije transferina

Procentat saturacije transferina se izračunava deljenjem koncentracije serumskog gvožđa i ukupne saturacije transferina gvoždem i množenjem tog količnika sa 100.

3.9.4. Određivanje koncentracije transferina

Koncentracija transferina u serumu određivana je turbidometrijom. Za ovu proceduru pripremani su blank (destilovana voda), kalibratori (5 serijski razblaženih koncentracija rastvora kalibratora se nalazi u setu proizvođača) i uzorak (serum). Svi rastvori su najpre zagrejani na 37 °C, a zatim je 10 µl svakog rastvora (destilovana voda, kalibratori, uzorak) dodato u po 1 ml rastvora kozjeg anti-humanog antitela na transferin. Rastvori su inkubirani sa antitelom na 37 °C u trajanju od 5 minuta. Vezivanjem za ovo antitelo transferin je precipitiran, a apsorbance dobijenih antigen-antitelo kompleksa je merena fotometrom (ByoSystems photometer BTS-330, Barselona, Španija) na talasnoj dužini od 540 nm. Apsorbance rastvora kalibratora su korišćene za crtanje standardne krive. Koncentracija transferina je određivana očitavanjem apsorbance sa standardne krive.

3.9.5. Određivanje koncentracije feritina

Koncentracija feritina u serumu je takođe određivana turbidometrijom prema uputstvu proizvođača. Za ovaj postupak pripremani su blank (destilovana voda), uzorak (serum) i pet serijskih razblaženja standarda u 0,9% rastvoru natrijum-hlorida (videti u tabeli 3.4). Različite koncentracije standarda poslužile su za generisanje standardne krive. Po 30 μ l destilovane vode, seruma ili rastvora standarda su dodavani u 1 ml radnog rastvora koji sadrži čestice lateksa obložene anti-humanim antitelima na feritin. Tokom inkubiranja rastvora na temperaturi od 37 °C u trajanju od 5 minuta dolazi do povezivanja antigena i antitela i posledične precipitacije čestica lateksa. Apsorbance rastvora izmerene na fotometru (ByoSystems photometer BTS-330, Barselona, Španija) na talasnoj dužini od 540 nm proporcionalne su koncentraciji feritina u rastvorima. Koncentracija feritina je određivana interpolacijom vrednosti apsorbance sa standardne krive.

Tabela 3.4. Priprema serijskih razblaženja za standard feritina

Standard	1	2	3	4	5
Feritin standard (μ l)	30	60	120	180	240
Fiziološki rastvor (μ l)	210	180	120	60	-
Faktor razblaženja	0,125	0,25	0,5	0,75	1



Slika 3.6. Fotometar BTS 330

3.10. Određivanje broja virusnih kopija (plasma viral load-pVL)

Broj virusnih kopija je određivan kombinacijom reverzne transkripcije i lančane reakcije polimeraze u realnom vremenu (reverse transcription real-time polymerase chain reaction, RT-PCR) pomoću odgovarajućeg kita za detekciju, Ultrasensitive assay version 1,5 (Roche Molecular Systems, Branchburg, NJ, SAD) sa minimalnim nivoom detekcije od 50 virusnih kopija po mililitru. Reverznom transkripcijom se virusna RNK prevodi u komplementarnu DNK (cDNK), koja se umnožava u lančanoj reakciji polimeraze što se detektuje i softverski obrađuje COBAS TaqMan analizatoru (Roche Molecular Systems, Branchburg, NJ, SAD).

3.11. Određivanje CD4 broja (CD4 count)

CD4 broj predstavlja broj CD4 T-limfocita u uzorku pune krvi. Apsolutni broj CD4 limfocita je određivan metodom protočne citometrije korišćenjem kita BD FACSCount™ CD4 reagent (Becton Dickinson, Biosciences, San Jose, CA, SAD) sa antitelima na CD4 marker T-limfocita. Protočna citometrija je vršena na aparatu BD FACSCount™ cell analyzer (Becton Dickinson, Biosciences, San Jose, CA, USA). Detektorski sistem aparata je prikupljao signale iz laserom pobuđene fluorescentne boje koja je vezana za antitelo za CD4 marker limfocita



Slika 3.7. Analizator COBAS TaqMan



Slika 3.8. Ćelijski analizator
BD FACSCount™

3.12. Određivanje kvalitativnog sastava oralne flore sa obrazne sluzokože

3.12.1. Umnožavanje delova bakterijske DNK PCR metodom

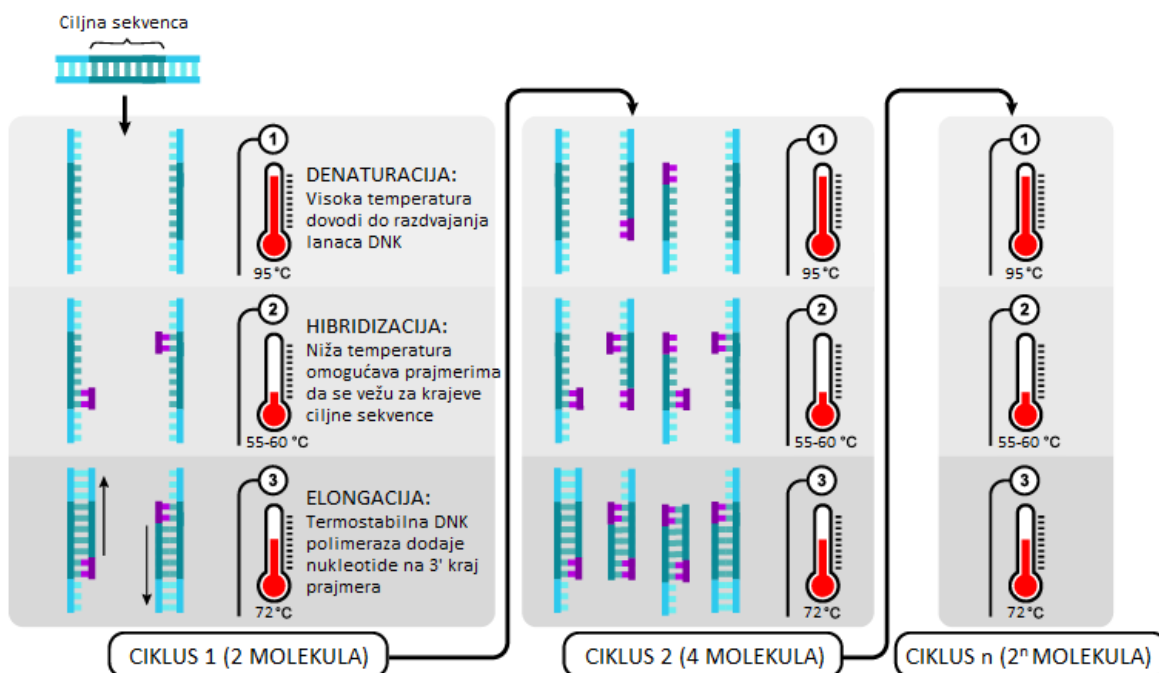
Kvalitativni sastav oralne flore obrazne sluzokože pacijenata određivan je primenom lančane reakcije polimeraze (polymerase chain reaction, PCR) uz odgovarajuće prajmere specifične za određene delove bakterijske DNK. Primenom ove metode određivano je prisustvo sedam različitih bakterija: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa), *Eikenella corrodens* (Ec), *Peptostreptococcus micros* (Pm), *Porphyromonas gingivalis* (Pg), *Prevotella intermedia* (Pi), *Tannerella forsythia* (Tf) i *Treponema denticola* (Td). Pet mikrolitara uzorka DNK izolovane iz brisa obrazne sluzokože dodavano je u reakcionu smešu ukupne zapremine 20 µl koju su sačinjavali voda za PCR, 2,5 µl pufera (10X DreamTaq Green buffer), 2,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dezoksiribonukleotidtrifosfati (dNTPs), 0,2 µM prajmera specifičnih za ispitivane bakterije i 1 jedinica (1 U) DNK polimeraze (DreamTaq DNA polymerase) (Thermo Fisher Scientific; Valtam, MA, SAD). PCR je izveden pomoću aparata za umnožavanje DNK (PiqLab PeqSTAR 2X; Erlangen, Nemačka) prema sledećem temperaturnom profilu: početna denaturacija na 95 °C u trajanju od 3 minuta; 35 ciklusa denaturacije na 95 °C u trajanju od 45 sekundi, hibridizacije na temperaturi koja je odgovorajuća za svaki par prajmera u trajanju od jednog minuta i elongacije na 72 °C u trajanju od jednog minuta; i konačne elongacije na 72 °C u trajanju od 5 minuta. Kao pozitivna kontrola u svakom PCR-u korišćena je DNK izolovana iz referentnog soja odgovarajuće bakterije, a za negativnu kontrolu umesto uzorka u reakcionu smešu je dodavana destilovana voda. Sekvence prajmera, temperature hibridizacije i veličine produkata genskog umnožavanja PCR-om su date u tabeli 3.5.



Slika 3.9. Aparat za umnožavanje DNK molekula, PeqSTAR 2X

Tabela 3.5. Spisak prajmera, temperatura hibridizacije (Th) i veličine produkata PCR-a.

Bakterije	Sekvence prajmera (5'→3')	Th (°C)	Veličina (bp)
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	Fwd: GCTAATACCGCGTAGAGTCGG Rv: ATTTACACCTCACTTAAAGGT	55	500
<i>Eikenella corrodens</i>	Fwd: CTAATACCGCATACGTCCTAAG Rv: CTACTAAGCAATCAAGTTGCC	55	688
<i>Peptostreptococcus micros</i>	Fwd: AGAGTTTGATCCTGGCTCAG Rv: ATATCATGCGATTCTGTGGTCTC	55	207
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	Fwd: AGGCAGCTTGCCATACTGCG Rv: ACTGTTAGCAACTACCGATGT	55	400
<i>Prevotella intermedia</i>	Fwd: CGTGGACCAAAGATTCATCGGTGGA Rv: CCGCTTTACTCCCCAACAAA	55	259
<i>Tannerella forsythia</i>	Fwd: GCGTATGTAACCTGCCCCGA Rv: TGCTTCAGTGTCAGTTATACCT	55	600
<i>Treponema denticola</i>	Fwd: TAATACCGAATGTGCTCATTACAT Rv: TCAAAGAAGCATTCCCTCTTCTTCTTA	60	316



Slika 3.10. Šematski prikaz lančane reakcije polimeraze (polymerase chain reaction, PCR), preuzeto i modifikovano: https://medial.shmoop.com/images/biology/biobook_dna_graphik_38.png

3.12.2. Gel elektroforeza

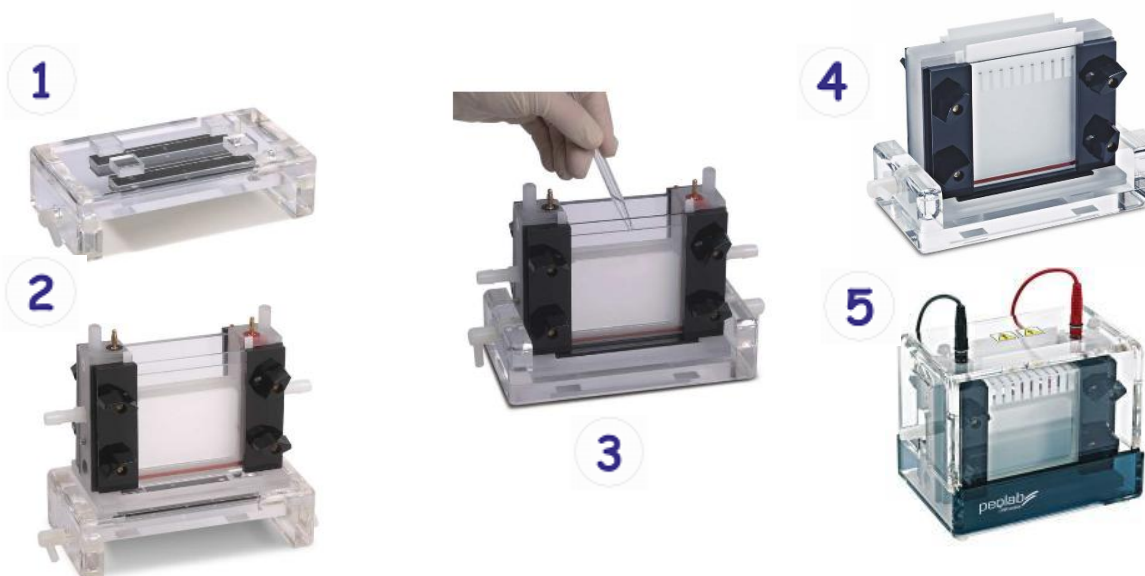
Da bi produkti genskog umnožavanja bili uočeni neophodno ih je najpre razdvojiti u električnom polju na poliakrilamidnom gelu. U tu svrhu korišćen je sistem za vertikalnu elektroforezu (PerfectBlue™ Twin S system, Peqlab, Nemačka) u kombinaciji sa uređajem za napajanje električnom strujom (250 V Electrophoresis Power Source, VWR International, PA, SAD). Negativno naelektrisani fragmenti DNK uzorka (fosfatne grupe molekula DNK su nosioci ovog naelektrisanja) se u električnom polju sistema za vertikalnu elektroforezu kreću kroz pore poliakrilamidnog gela ka pozitivno naelektrisanjoj elektrodi. Brzina kretanja DNK fragmenta kroz pore gela zavisi od veličine fragmenta, odnosno od broja baznih parova (bp) fragmenta DNK. Kraći fragmenti DNK lakše i brže prolaze kroz pore gela u odnosu na duže fragmente DNK. Trodimenzionalna mreža poliakrilamidnog gela dobija se povezivanjem molekula akrilamida i bis-akrilamida. Lančanu reakciju povezivanja ovih molekula započinje amonijum-persulfat (APS) dok je katalizator reakcije tetrametiletildiamin (TEMED). Za polimerizaciju gela potrebno je oko 30-40 minuta. Receptura za pravljenje 8% poliakrilamidnog gela data je u tabeli 3.6.

Tabela 3.6. Sastojci potrebni za pravljenje 8% poliakrilamidnog gela

Sastojak	Zapremina
Destilovana voda	3,9 ml
5X TBE pufer	1,3 ml
40% Akrilamid/bis-akrilamid	1,3 ml
10% Amonijum persulfat	46 µl
Tetraetilmetilendiamin	8,4 µl

Nakon dodavanja svih sastojaka, smeša je pažljivo nalivena u stakleni kalup unutrašnjih dimenzija $100 \times 100 \times 0,8$ mm, a onda je sa gornje strane postavljen češalj čiji zupci formiraju bunariće u koje će se nalivati uzorci. Po završenoj polimerizaciji gela, češalj je pažljivo vađen, a nastali bunarići su ispiranjem destilovanom vodom pripremani za nalivanje uzoraka. Dimenzija bunarića odgovara dimenzijama zupca češlja i iznosi $14 \times 5 \times 0,8$ mm. Kalup sa polimerizovanim gelom je postavljen u sistem

za vertikalnu elektroforezu i naliven Tris-Borna kiselina-EDTA (TBE) puferom za elektroforezu. U bunariće gela naliveni su uzorci DNK, pozitivna i negativna kontrola i DNK lestvica (videti dole) prethodno pomešani sa bojom za praćenje toka elektroforeze (1X DNA loading dye, Thermo Fisher Scientific; Valtam, MA, SAD). Boja za praćenje toka elektroforeze sadrži dve komponente: 1) bromfenol plavu boju koja se u električnom polju sistema za elektroforezu kreće kroz 8% poliakrilamidni gel kao i DNK fragment dužine 45 bp i 2) ksilen cijanol koji se pod istim uslovima elektroforeze kreće kao DNK fragment dužine 160 bp. Elektroforeza je vršena na voltaži od 230 V u trajanju od 30 minuta. Nakon završene elektroforeze, gelovi su potapani u vodeni rastvor interkalirajućeg agensa (1X SYBR Safe DNA Gel Stain solution, Life technologies, Grand Island, NY, SAD) u trajanju od 10 minuta. Kako bi se uočili fragmenti DNK, poliakrilamidni gel je posmatran pod ultravioletnim (UV) svetlom na UV-transiluminatoru (Vilber Lourmat TCX-15 MX[®]; Eberhardzell, Nemačka). Obasjan UV svetlom interkalirajući agens (umetnut u DNK) fluorescira i na taj način čini fragmente DNK vidljivim golim okom. Za procenu veličine DNK fragmenta korišćena je DNK lestvica (GeneRuler 100 bp DNA Ladder, Thermo Fisher Scientific; Valtam, MA, SAD), sastavljena od 10 hromatografski prečišćenih DNK fragmenata (traka) veličine od 100 do 1000 baznih parova (traka veličine 500 bp je podebljana i služi za lakšu orijentaciju). Svi gelovi su fotografisani, analizirani i adekvatno odloženi kao potencijalni biohazardni otpad.



Slika 3.11. Priprema sistema za vertikalnu elektroforezu

3.13. Određivanje kvantitativnog sastava oralne flore sa obrazne sluzokože

Određivanje ukupnog broja oralnih bakterija kod HIV-om inficiranih i neinficiranih ispitanika vršeno je pomoću real-time PCR metode, odnosno kvantitativnog PCR-a (qPCR). Reakciona smeša je sadržala 5 µl uzorka bakterijske DNK, 12.5 µl real-time PCR master miksa (Maxima™ SYBR Green/ROX qPCR Master Mix, Thermo Fisher Scientific, Vilnius, Litvanija), po 1 µl EuF i EuR prajmera konačne koncentracije 0.2 µM i 5.5 µl vode bez nukleaza (Nuclease free water, Thermo Fisher Scientific, Vilnius, Litvanija). EuF i EuR predstavljaju univerzalne prajmere koji se vezuju za visoko konzervirane regione 16S ribozomske DNK (rDNK). Sekvence, temperatura hibridizacije i veličina PCR produkta je data u tabeli 3.7.

Tabela 3.7. Sekvenca prajmera, temperatura hibridizacije (Th) i veličina produkta real-time PCR-a

Prajmeri	Sekvence prajmera (5'→3')	Th (°C)	Veličina (bp)
<i>Univerzalni prajmeri</i>	EuF: TCCTACGGGAGCACAGT	55	500
<i>16S ribozomske DNK</i>	EuR: GGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTT		

Real-time PCR je izvođen na aparatu za detekciju (Line Gene-K Fluorescence PCR detection system, BIOER Technology, Šangaj, Kina) u skladu sa uputstvima proizvođača hemikalija. Prvi korak u izvođenju reakcije bio je zagrevanje reakcione smeše na 95 °C u trajanju od 10 minuta. Sledeći korak u programu je ponavljanje 40 ciklusa denaturacije (95 °C, 60 sekundi), hibridizacije (60 °C, 60 sekundi) i elongacije (72 °C, 90 sekundi), a završni korak genskog umnožavanja je bila konačna elongacija na 72 °C u trajanju od 5 minuta. Deset serijski razblaženih (od 32,4 ng/µl do 32,4 fg/µl, factor razblaženja 1:10) uzoraka DNK referentnog soja *Prevotella melaninogenica* (*Prevotella melaninogenica* soj 157 ATCC® 25845) uključeno je u svaku reakciju u cilju dobijanja standardne krive. Ukupan broj genskih kopija je određivan na osnovu interpolacije sa standardne krive.

3.14. Klinički pregled

3.14.1. Inspekcija mekih oralnih tkiva

U klinički pregled usne duplje uključena je inspekcija mekih oralnih tkiva. Prisustvo oralnih promena koje upućuju na HIV infekciju (HIV-asocirani gingivitis, linearni gingivalni eritem, HIV-asocirani periodontitis, akutni ulceronekrotični gingivitis, nekrotizirajući stomatitis, oralna kandidijaza, obložen jezik, čupasta leukoplakija i Kapoši sarkom) beleženo je u specijalno dizajnirane dijagnostičke kartone.

3.14.2. Procena stanja parodontalnih parametara

Određivanje parodontalnih parametara vršeno je na svakom zubu pomoću University of North Carolina 15 (UNC 15) parodontalne sonde (Hu-Friedy, Čikago, IL, SAD) od strane kalibrisanog ispitivača. Stanje parodontalnih tkiva je procenjivano na osnovu sledećih parametara: plak indeksa (PI), dubine sondiranja (DS), nivoa pripojne gingive (NPE) i krvarenja nakon provokacije (KNP). Svi parametri su unošeni u parodontalne kartone pacijenata.

3.14.2.1. Plak indeks (*Silness-Löe*)

Prilikom procene statusa parodontalnih tkiva, kao važan parameter, određivan je plak indeks. Prisustvo ili odsustvo plaka na površini zuba detektovano je pomoću parodontalne sonde na četiri površine zuba (mezijalnoj, distalnoj, oralnoj i vestibularnoj) i izražavano brojevima od 0 do 3, pri čemu je 0 označavala nepostojanje biofilma na površini zuba; 1 – tanak sloj biofilma uz ivicu gingive; 2 – umerenu količinu biofilma u gingivalnom sulkusu ili džepu, vidljivu i golim okom; 3 – veliku količinu biofilma koja u potpunosti ispunjava gingivalni sulkus ili džep, kao i interdentalni prostor. Konačno, za dobijanje plak indeksa, zbir prosečnih vrednosti indeksa za svaki zub je deljen sa ukupnim brojem zuba ispitanika.

3.14.2.2. Dubina sondiranja

Dubina sondiranja je rastojanje od ivice gingive do dna gingivalnog sulkusa odnosno parodontalnog džepa koje se meri pomoću parodontalne sonde. Parodontalna sonda se završava zaobljenim vrhom koji prilikom merenja dolazi do spoja epitela i zuba. Radni deo sonde je graduisan od 0 do 15 mm, s tim što su delovi između 4-og i 5-

og, 9-og i 10-og i 14-og i 15-og milimetra prebojeni crno radi lakšeg očitavanja rezultata merenja. Dubina sondiranja je određivana na četiri površine zuba. Parametar dubine sondiranja se izračunava sabiranjem prosečnih vrednosti dubina sondiranja svakog zuba i deljenjem dobijenog zbira sa ukupnim brojem zuba.

3.14.2.3. Nivo pripojnog epitela

Nivo pripojnog epitela predstavlja rastojanje između gleđno-cementne granice zuba i dna gingivalnog sulkusa odnosno parodontalnog džepa. Nivo pripojnog epitela nam indirektno govori o gubitku koštane potpore zuba. Kao i kod dubine sondiranja, za merenje nivoa pripojnog epitela koristi se parodontalna sonda. Nivo pripojnog epitela se izračunava u odnosu na fiksnu poziciju na zubu, a to je gleđno-cementna granica. U slučaju da se ivica gingive nalazi u nivou gleđno-cementne granice, dubina sondiranja je jednaka nivou pripojnog epitela. U slučaju da se ivica gingive nalazi iznad gleđno-cementne granice nivo pripojnog epitela se izračunava oduzimanjem rastojanja od ivice gingive do gleđno-cementne granice od dubine sondiranja. Kada se ivica gingive nalazi ispod nivoa gleđno-cementne granice nivo pripojnog epitela se izračunava sabiranjem dubine sondiranja i rastojanja između ivice gingive i gleđno-cementne granice.

3.14.2.4. Krvarenje nakon provokacije

Krvarenje nakon provokacije je određivano nakon merenja dubine sondiranja. Po povlačenju sonde iz gingivalnog sulkusa odnosno parodontalnog džepa praćeno je da li na datom mestu dolazi do vidljivog krvarenja. Prisustvo ili odsustvo krvarenja je beleženo u odgovarajući karton, a parametar krvarenje nakon provokacije je izračunavan sabiranjem broja mesta gde je nakon sondiranja uočeno krvarenje, deljenjem tog zbira sa 4 (da bi se dobila prosečna vrednost za jedan zub jer je sondiranje vršeno na 4 površine zuba) i konačno množenjem dobijenog količnika sa 100 kako bi se dobila procentualna vrednost.

3.15. Statistička analiza podataka

Sve statističke analize su vršene pomoću statističkog softverskog paketa za društvene nauke (Statistical Package for the Social Sciences, SPSS v20.0, IBM, Čikago, IL, SAD) koji ima široku primenu i u polju biomedicine. Normalnost raspodele ispitivanih podataka vršena je pomoću Kolmogorov-Smirnov testa. Postojanje statističke značajnosti u relativnoj dužini telomera, parametrima metabolizma gvožđa,

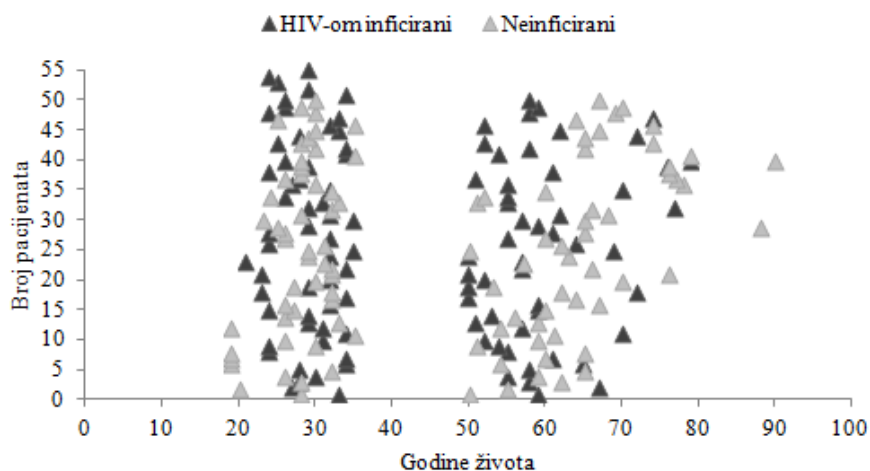
kvalitativnoj zastupljenosti oralnih mikroorganizama, učestalosti oralnih promena i parametrima parodontalnog statusa između ispitivanih grupa vršeno je pomoću T-testa za nezavisne uzorke, Mann-Whitney U testa i χ^2 - testa (Chi-square test), gde je to bilo odgovarajuće. Ispitivanje korelacija između broja virusnih kopija i relativne dužine telomere i broja virusnih kopija sa parametrima metabolizma gvožđa urađeno je pomoću Spirmanovog testa. Korelacija između relativne dužine telomera i parametara metabolizma gvožđa su utvrđivane pomoću Spirmanovog testa korelacije. Rezultati su predstavljani kao srednja vrednost \pm standardna devijacija ili srednja vrednost \pm standardna greška srednje vrednosti (standard error of mean, SEM), gde je to bilo odgovarajuće. Razlike su smatrane značajnim ukoliko je p -vrednost bila manja od 0,05. Dobno zavisno prisustvo parodontopatogenih bakterija je utvrđivano formiranjem šestogodišnjih intervala $a \pm 3$, oko određenog starosnog doba, a . Formirano je 12 takvih intervala oko sledećih godina starosti ispitanika: 26, 28, 30, 32, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65 i 67. Vrednost 32 je uzeta kao gornja granica mlade grupe, i dobijena je oduzimanjem polovine intervala od graničnog broja godina, $35 - 3$, kako bi se oko te vrednosti mogao formirati šestogodišnji interval. Na sličan način je dobijena i donja granica za stariju grupu ispitanika, 53, kao zbir $50 + 3$. Najmlađi pacijent je imao 23 godine pa je šestogodišnji interval koji obuhvata tu vrednost centriran oko broja 26, $23 + 3$. Interval oko broja 67 je obuhvatao sve pacijente starije od 64 godine, $67 - 3$. Razmak između centralnih vrednosti dobnih intervala, a , je bio 2 godine. Odnosi između parodontalnih parametara i starosti ispitanika su određivani korišćenjem najboljeg linearnog fitovanja prikupljenih podataka. Koeficijenti k i b definisali su krive najboljeg linearnog fitovanja, $PP = k*a + b$, gde je PP odgovarajući parodontalni parametar, a a starosna dob ispitanika izražena u godinama.

4. RESULTATI

4.1. Opšte karakteristike ispitivanih grupa

U studiju je bilo uključeno 205 ispitanika podeljenih u dve grupe, eksperimentalnu i kontrolnu. Eksperimentalnu grupu sačinjavalo je 105 HIV-om inficiranih pacijenata lečenih u Odeljenju za HIV i AIDS Klinike za tropske i infektivne bolesti “Prof. dr Kosta Todorović”, Kliničkog centra Srbije u Beogradu. Ispitanici kontrolne grupe bili su dobrovoljni davaoci krvi Instituta za transfuziologiju Srbije i pacijenti koji su dolazili na redovan kontrolni pregled na Klinike Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Kontrolnu grupu činilo je 100 pacijenata. Eksperimentalna grupa je podeljena na podgrupu pacijenata mlađih od 35 godina i podgrupu pacijenata starijih od 50 godina. Prosečna starost pacijenata u mlađoj podgrupi iznosila je $29,1 \pm 3,9$ godina, dok je u starijoj podgrupi iznosila $59,5 \pm 7,7$ godina. Kontrolna grupa je takođe bila podeljena na mlađu (≤ 35 godina) i stariju (≥ 50 godina) podgrupu pacijenata. U mlađoj podgrupi pacijenata iz kontrolne grupe prosečna starost je iznosila $28,1 \pm 4,3$ godine, dok je u starijoj podgrupi iznosila $64,7 \pm 9,0$ godina (Slika 4.1). Nije uočena statistički značajna razlika u starosti između mlađih, odnosno starijih ispitanika u eksperimentalnoj i kontrolnoj grupi.

Pacijenti eksperimentalne grupe podeljeni su i u odnosu na terapiju koju su primali. Osam pacijenata (7,6%) nije primalo terapiju, 65 pacijenata je lečeno sa inhibitorima reverzne transkriptaze, NRTI+NNRTI (61,9%), 30 pacijenata bilo je na tretmanu sa kombinacijom inhibitora reverzne transkriptaze i proteaznih inhibitora, INSTI+PI (28,6%), a po jedan pacijent (0,9%) je bio na terapiji inhibitorima integraze, INSTI, odnosno inhibitorima integraze i proteaznim inhibitorima, PI+INSTI (Slika 4.2B). Opšte karakteristike HIV-om inficiranih pacijenata su date u tabeli 4.1.



Slika 4.1.
Raspodela
pacijenata na
osnovu godina
života.

Tabela 4.1. Klinički parametri HIV-om inficiranih pacijenata.

	Mlađi od 35 godina n=55	Stariji od 50 godina n=50	<i>p</i> -vrednost
CD4 broj (ćelija/μl)	461,9 \pm 232,6 (10,0-984,0)	567,0 \pm 317,7 (84,0-1368,0)	0,131
pVL (kopija \times 10³/ml)	189,7 \pm 804,0 (0-3940,0)	0,1 \pm 0,5 (0-2,8)	0,418
Trajanje terapije (meseći)	28,9 \pm 32,3 (0,8-128,8)	85,6 \pm 61,1 (0,8-213,7)	<0,001
Biohemijski parametri			
BMI (kg/m ²)	25,1 \pm 2,9	25,9 \pm 4,2	0,280
AST (U/l)	25,7 \pm 9,8	25,5 \pm 11,9	0,949
ALT (U/l)	38,7 \pm 51,2	27,9 \pm 11,4	0,220
ALP (U/l)	86,8 \pm 30,1	91,5 \pm 42,3	0,647
TC (mmol/l)	5,3 \pm 1,3	6,1 \pm 1,1	0,017
TG (mmol/l)	2,5 \pm 2,3	2,6 \pm 1,9	0,860
HDL (mmol/l)	1,0 \pm 0,7	1,2 \pm 0,6	0,511
LDL (mmol/l)	2,7 \pm 0,8	3,9 \pm 1,3	0,001
Glukoza (mmol/l)	5,2 \pm 0,4	5,9 \pm 2,1	0,074
CRP (mg/l)	9,0 \pm 13,2	20,4 \pm 37,4	0,037
Način transmisije, n (%)			
Homoseksualni put	40 (72,7)	13 (26,0)	<0,001
Heteroseksualni put	6 (10,9)	24 (48,0)	<0,001
Transfuzija krvi	0 (0)	2 (4,0)	0,224
Vertikalni put	0 (0)	0 (0)	-
Nepoznato	9 (16,4)	11 (22,0)	0,313

Rezultati su navedeni kao srednja vrednost \pm SD. Opsezi za CD4 broj, broj virusnih kopija u krvnoj plazmi (engl. *plasma viral load*, pVL) i trajanje terapije su dati u zagradama. Skraćenice: BMI, engl. *body mass index*, indeks telesne mase; AST, aspartat aminotransferaza; ALT, alanin aminotransferaza; TC, engl. *total cholesterol*, ukupni holesterol; TG, engl. *total tryglicerides*, ukupni trigliceridi; HDL, engl. *high-density lipoprotein*, lipoproteini velike gustine; LDL, engl. *low-density lipoprotein*, lipoproteini male gustine; CRP, C-reaktivni protein.

4.2. Relativna dužina telomera

Relativna dužina telomera određena je kod svih ispitanika. Ukupno gledano, telomere kod mlađih ispitanika ($0,85 \pm 0,36$) su bile statistički značajno ($p=0,022$) duže u odnosu na telomere kod starijih ispitanika ($0,74 \pm 0,29$). Dalje, telomere kod HIV-om inficiranih ispitanika su bile duže ($0,83 \pm 0,34$) u odnosu na telomere neinficiranih osoba ($0,76 \pm 0,31$). Ova razlika nije bila statistički značajna ($p=0,093$). Kao što je i očekivano, telomere kod mlađih ispitanika su bile duže u odnosu na telomere starijih ispitanika i kod eksperimentalne i kod kontrolne grupe (tabela 4.2). Telomere mlađih HIV-om inficiranih pacijenata su bile duže od telomera starijih HIV-om inficiranih osoba ali bez statističke značajnosti ($p=0,216$). Mlađi, neinficirani ispitanici su imali statistički značajno ($p=0,031$) duže telomere od starijih neinficiranih osoba. Telomere HIV-om inficiranih osoba su bile duže u odnosu na telomere neinficiranih ispitanika i u mlađoj i u starijoj dobnoj grupi ali bez statističke značajnosti (tabela 4.2).

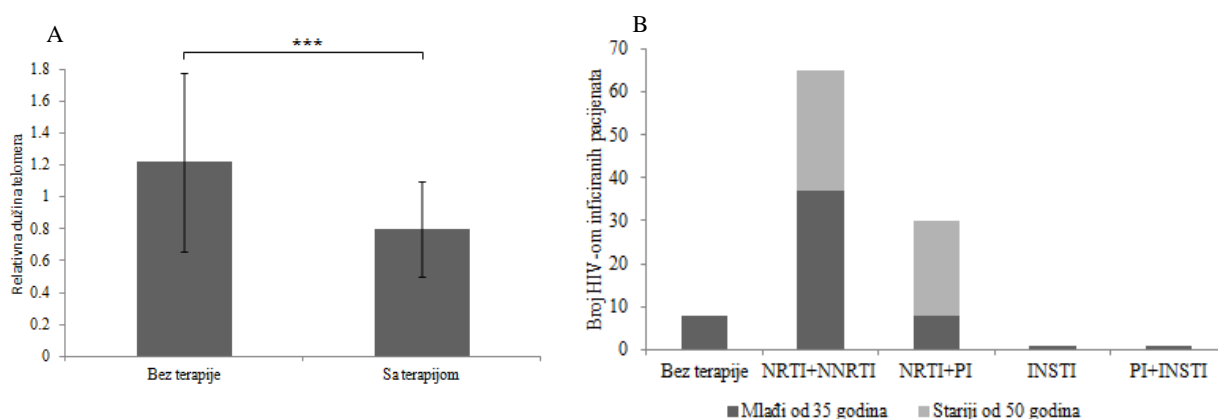
Tabela 4.2. Uporedni prikaz relativne dužine telomera (RDT) između ispitivanih grupa.

	HIV status				Starosna dob			
	HIV-om inficirani		Neinficirani		Mlađi		Stariji	
Grupa	<35	>50	<35	>50	HIV+	HIV-	HIV+	HIV-
RDT	0,87	0,79	0,83	0,69	0,87	0,83	0,79	0,69
<i>p</i> -vrednost	0,216		0,031		0,512		0,093	

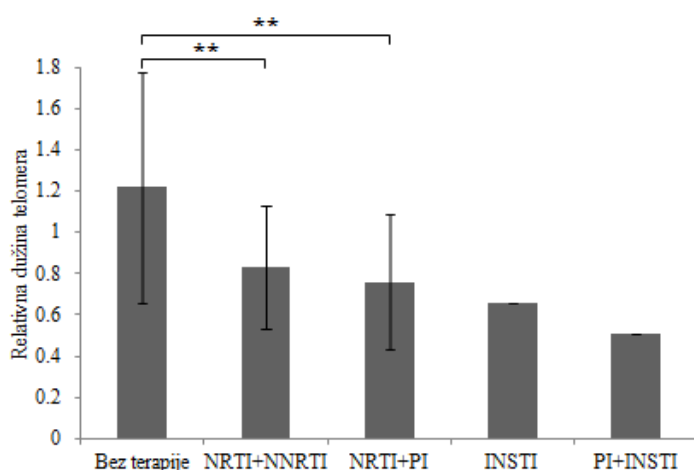
4.3. Relativna dužina telomera (RDT) i kombinovana antiretrovirusna terapija

HIV-om inficirani pacijenti koji nisu primali terapiju imali su duže telomere ($1,22 \pm 0,56$) u odnosu na pacijente koji su primali kombinovanu antiretrovirusnu terapiju ($0,80 \pm 0,30$) što je bilo statistički značajno ($p=0,001$), slika 4.2. Podeljeno po vrsti terapije najduže telomere su imali pacijenti lečeni kombinacijom inhibitora reverzne transkriptaze (NRTI+NNRTI), zatim pacijenti lečeni kombinacijom inhibitora reverzne transkriptaze i proteaznih inhibitora (NRTI+PI), inhibitorima integraze (INSTI) i kombinacijom proteaznih inhibitora i inhibitora integraze (PI+INSTI), redom. Vrednosti dužine telomera kod HIV-om inficiranih pacijenata na različitom antiretrovirusnom tretmanu i kod pacijenata koji nisu primali terapiju prikazane su na

slici 4.3. Nije bilo statistički značajne razlike između dužine telomera kod pacijenata lečenih različitim kombinovanim tretmanima.



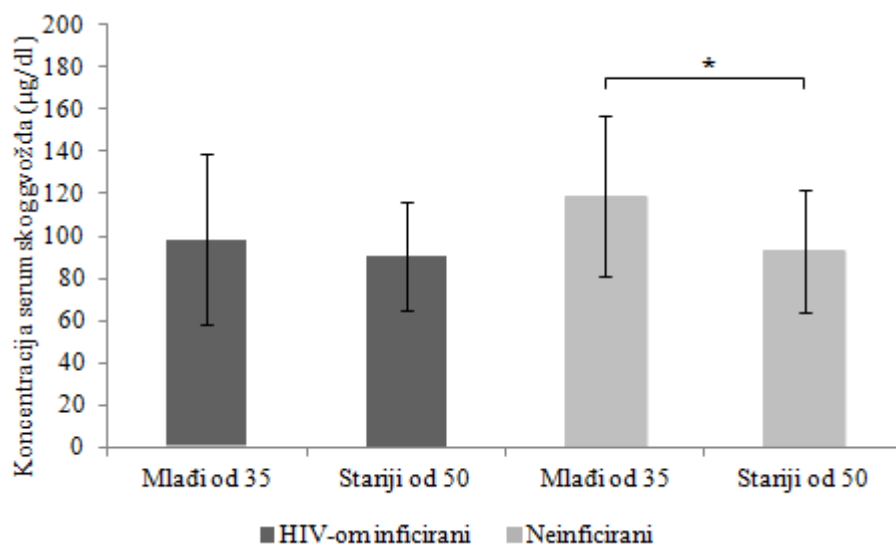
Slika 4.2. A) Relativne dužine telomera kod pacijenata sa HIV infekcijom koji ne primaju terapiju i kod pacijenata sa HIV-om koji su na kombinovanoj antiretrovirusnoj terapiji. **Slika 4.2.** B) Raspodela HIV-om inficiranih pacijenata na osnovu terapije.



Slika 4.3. Relativne dužine telomera kod pacijenata sa HIV infekcijom koji ne uzimaju antiretrovirusnu terapiju i kod pacijenata sa HIV-om koji primaju različite kombinacije antiretrovirusnih terapeutika: inhibitore reverzne transkriptaze, NRTI+NNRTI ($0,83 \pm 0,30$), kombinaciju inhibitora reverzne transkriptaze i proteaznih inhibitora, NRTI+PI ($0,76 \pm 0,33$), inhibitore integraze, INSTI (0,66) i kombinaciju proteaznih inhibitora i inhibitora integraze, PI+INSTI (0,51). Statistički značajna razlika u dužini telomera postoji između pacijenata koji ne primaju terapiju i pacijenata lečenih sa nukleozidnim inhibitorima ($p=0,002$) ili kombinacijom nukleozidnih i proteaznih inhibitora ($p=0,005$).

4.4. Koncentracije serumskog gvožđa

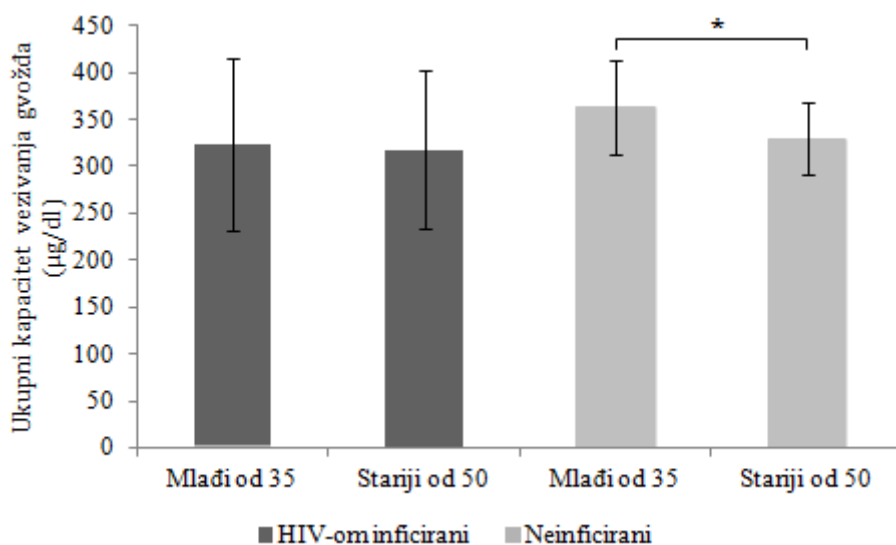
Serumsko gvožđe bilo je u višoj koncentraciji kod mlađih ispitanika ($108,67 \pm 39,94 \mu\text{g/dl}$) u odnosu na starije ($91,13 \pm 26,33 \mu\text{g/dl}$), a ova razlika je bila statistički značajna ($p=0,013$). Koncentracije serumskog gvožđa kod HIV-om inficiranih osoba ($94,20 \pm 33,01 \mu\text{g/dl}$) bile su statistički značajno niže ($p=0,029$) u odnosu koncentracije gvožđa kod neinficiranih ispitanika ($109,88 \pm 36,94 \mu\text{g/dl}$). Serumsko gvožđe kod mlađih, neinficiranih ispitanika bilo je statistički značajno ($p=0,031$) više koncentracije nego kod starijih neinficiranih osoba (slika 4.4). Koncentracija serumskog gvožđa je bila veća kod mlađih u odnosu na starije pacijente i u eksperimentalnoj grupi, ali ta razlika nije bila statistički značajna ($p=0,346$). Koncentracije gvožđa u serumu su bile niže kod HIV-om inficiranih pacijenata u odnosu na pacijente bez HIV-a u obe starosne dobi, ali bez statističke značajnosti (slika 4.4).



Slika 4.4. Uporedni prikaz koncentracija serumskog gvožđa između ispitivanih grupa. Najviše vrednosti koncentracija serumskog gvožđa imali su mlađi ispitanici, neinficirani $118,72 \pm 38,04 \mu\text{g/dl}$, inficirani $98,62 \pm 39,93 \mu\text{g/dl}$. Vrednosti koncentracija serumskog gvožđa za starije osobe iznosile su $92,82 \pm 28,80 \mu\text{g/dl}$ u kontrolnoj i $90,36 \pm 25,60 \mu\text{g/dl}$ u eksperimentalnoj grupi.

4.5. Ukupni kapacitet vezivanja gvožđa

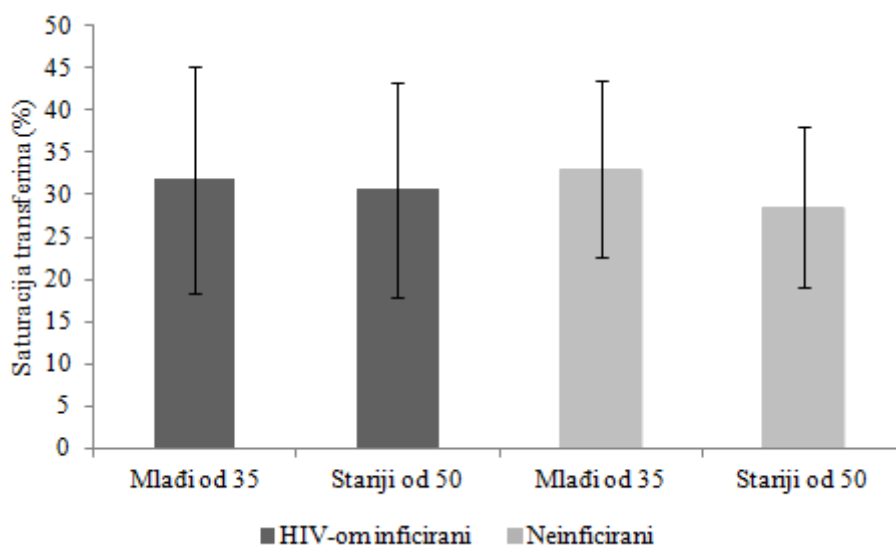
Ukupni kapacitet vezivanja gvožđa se nije statistički razlikovao ($p=0,163$) između starijih ($321,24 \pm 72,54 \mu\text{g/dl}$) i mlađih ispitanika ($342,46 \pm 75,78 \mu\text{g/dl}$). Neinficirani ispitanici su imali veći ukupni kapacitet vezivanja gvožđa ($350,80 \pm 48,90 \mu\text{g/dl}$) u odnosu na inficirane pacijente ($320,08 \pm 86,96 \mu\text{g/dl}$) i ova razlika je bila statistički značajna ($p=0,044$). Ukupni kapacitet vezivanja gvožđa je bio veći kod mlađih u odnosu na starije ispitanike i u kontrolnoj i u eksperimentalnoj grupi, s tim što je ta razlika u kontrolnoj grupi bila statistički značajna ($p=0,038$), dok u eksperimentalnoj nije bilo statistički značajne razlike ($p=0,825$). Kod ispitanika mlađih od 35 godina vrednosti ukupnog kapaciteta vezivanja gvožđa su bile više kod neinficiranih u odnosu na inficirane osobe, ali bez statističke značajnosti ($p=0,056$). Stariji neinficirani ispitanici su imali više vrednosti za ukupni kapacitet vezivanja gvožđa u odnosu na ispitanike iz eksperimentalne grupe, takođe bez statističke značajnosti (slika 4.5).



Slika 4.5. Uporedni prikaz vrednosti ukupnog kapaciteta vezivanja gvožđa između ispitivanih grupa. Najviše vrednosti ukupnog kapaciteta vezivanja gvožđa izmerene su u kontrolnoj grupi, kod mlađih ispitanika $362,12 \pm 50,44 \mu\text{g/dl}$, a kod starijih $328,97 \pm 38,58 \mu\text{g/dl}$. U eksperimentalnoj grupi ovaj kapacitet je iznosio $322,80 \pm 91,43 \mu\text{g/dl}$ kod mlađih i $317,63 \pm 84,22 \mu\text{g/dl}$ kod starijih ispitanika.

4.6. Saturacija transferina

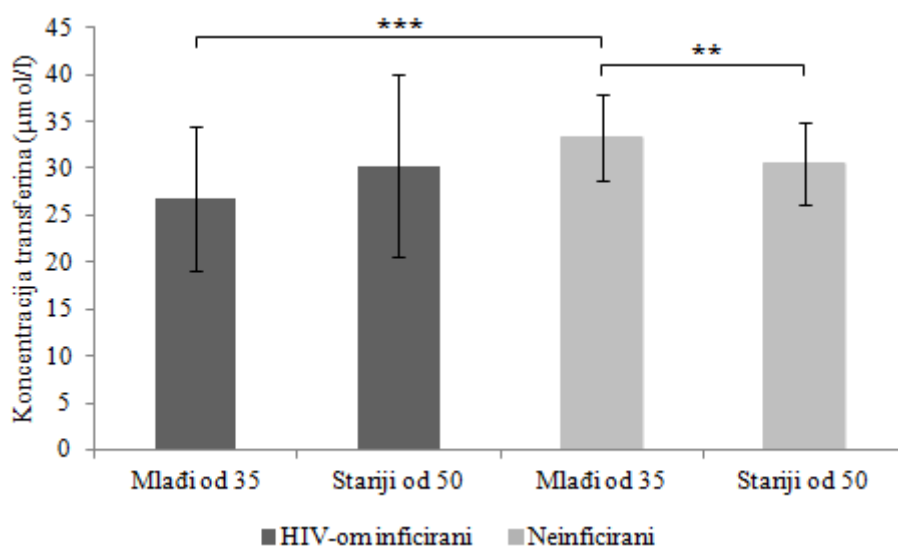
Vrednosti saturacije transferina bile su veće kod ispitanika mlađih od 35 godina ($32,40 \pm 11,97\%$) u odnosu na ispitanike starije od 50 godina ($29,95 \pm 11,68\%$). Ova razlika nije bila statistički značajna ($p=0,313$). Saturacija transferina bila je veća kontrolnoj grupi ($31,47 \pm 10,25\%$) u odnosu na eksperimentalnu ($31,18 \pm 12,96\%$), takođe bez statistički značajne razlike ($p=0,905$). Mlađi ispitanici i u kontrolnoj i u eksperimentalnoj grupi imali su više vrednosti za saturaciju transferina nego stariji ispitanici iz istih grupa ali nije bilo statističke značajnosti, p vrednost za kontrolnu grupu iznosila je 0,186, a za eksperimentalnu 0,739. Statistički značajne razlike u vrednostima saturacije transferina nisu postojale ni između inficiranih i neinficiranih pacijenata u mlađoj ($p=0,712$), odnosno starijoj ($p=0,581$) dobnoj grupi.



Slika 4.6. Uporedni prikaz vrednosti saturacije transferina između ispitivanih grupa. Saturacija transferina kod mlađih, neinficiranih osoba iznosila je $33,00 \pm 10,47\%$, kod mlađih inficiranih $31,79 \pm 13,49\%$, kod starijih inficiranih $30,63 \pm 12,67\%$, dok su najniže vrednosti zabeležene kod starijih neinficiranih ispitanika $28,51 \pm 9,47\%$.

4.7. Koncentracija transferina

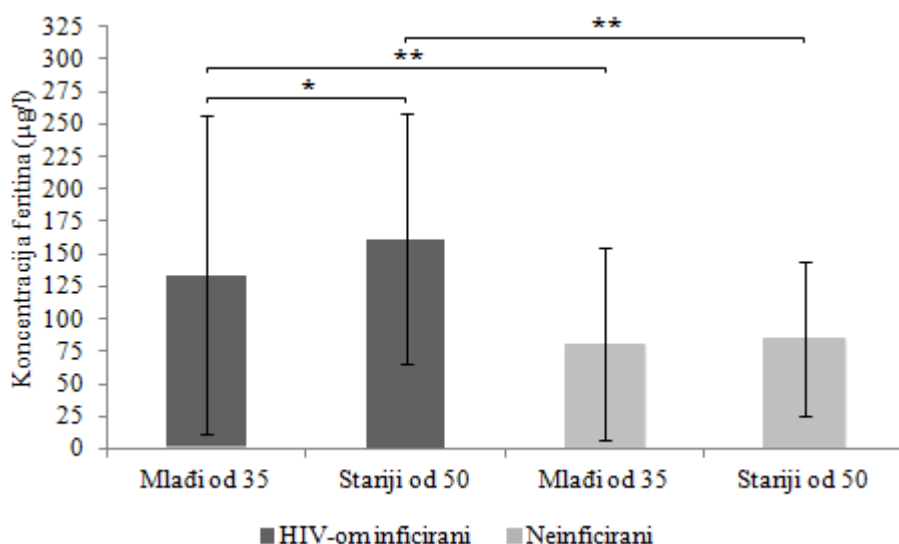
Koncentracija transferina u serumu mlađih ispitanika ($29,96 \pm 7,10 \mu\text{mol/l}$) je bila manja u odnosu na koncentraciju transferina u serumu starijih osoba ($30,31 \pm 8,43 \mu\text{mol/l}$) i ova razlika nije bila statistički značajna ($p=0,818$). Srednja vrednost koncentracija transferina kod HIV-om inficiranih osoba ($28,61 \pm 8,88 \mu\text{mol/l}$) je bila statistički značajno ($p<0,001$) manja od srednje vrednosti koncentracije transferina kod neinficiranih ispitanika ($32,42 \pm 4,66 \mu\text{mol/l}$). Mlađi neinficirani ispitanici su imali statistički značajno ($p=0,010$) veće vrednosti koncentracije transferina u odnosu na starije neinficirane ispitanike. U eksperimentalnoj grupi nije bilo statistički značajne razlike ($p=0,083$) u koncentracijama transferina između starijih i mlađih pacijenata. Među mlađim pacijentima, statistički značajno više ($p<0,001$) vrednosti koncentracije transferina imali su neinficirani ispitanici. Kod starijih pacijenata koncentracije transferina u serumu neinficiranih osoba bile su više u odnosu na koncentracije transferina kod HIV-om inficiranih ispitanika, ali to nije bilo statistički značajno različito ($p=0,666$).



Slika 4.7. Uporedni prikaz vrednosti koncentracija transferina između ispitivanih grupa. Koncentracije transferina kod ispitanika kontrolne grupe iznosile su $33,38 \pm 4,57 \mu\text{mol/l}$ za mlađe i $30,48 \pm 4,36 \mu\text{mol/l}$ za starije ispitanike. U eksperimentalnoj grupi više koncentracije transferina imali su stariji ($30,24 \pm 9,68 \mu\text{mol/l}$) u odnosu na mlađe ispitanike ($26,77 \pm 7,61 \mu\text{mol/l}$).

4.8. Koncentracija feritina

Koncentracija feritina u serumu mlađih ispitanika ($107,61 \pm 103,98 \mu\text{g/l}$) je bila statistički značajno manja ($p=0,019$) u odnosu na koncentraciju feritina kod starijih osoba ($138,73 \pm 92,98 \mu\text{g/l}$). HIV-om inficirani ispitanici su imali statistički značajno ($p<0,001$) veće koncentracije feritina u serumu ($148,72 \pm 108,79 \mu\text{g/l}$) u odnosu na neinficirane osobe ($81,74 \pm 68,76 \mu\text{g/l}$). Nije bilo statistički značajnih razlika u koncentracijama feritina između starijih i mlađih ispitanika u kontrolnoj grupi ($p=0,535$). U eksperimentalnoj grupi statistički značajno ($p=0,038$) veću koncentraciju feritina u serumu imali su starije osobe u odnosu na mlađe pacijente. Statistički značajno veće koncentracije feritina u serumu imali su inficirani u odnosu na neinficirane pacijente i u mlađoj ($p=0,008$) i starijoj ($p=0,004$) ispitivanoj grupi.

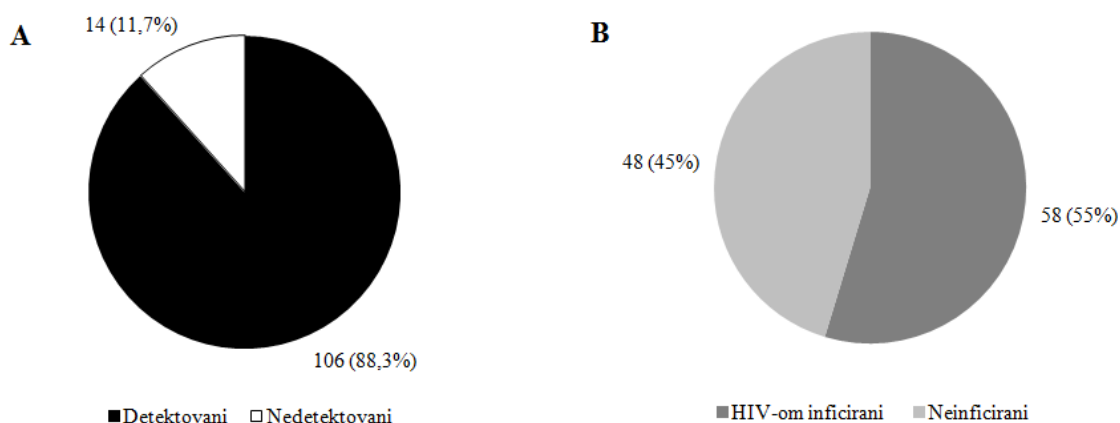


Slika 4.8. Uporedni prikaz vrednosti koncentracija feritina između ispitivanih grupa. Najviše koncentracije feritina izmerene su u eksperimentalnoj grupi: $161,64 \pm 95,89 \mu\text{g/l}$ kod starijih i $134,03 \pm 121,88 \mu\text{g/l}$ kod mlađih ispitanika. U kontrolnoj grupi više koncentracije feritina u serumu su imali stariji ispitanici $84,73 \pm 59,02 \mu\text{g/l}$ u odnosu na mlađe $80,24 \pm 74,13 \mu\text{g/l}$.

4.9. Kvalitativni sastav oralne flore

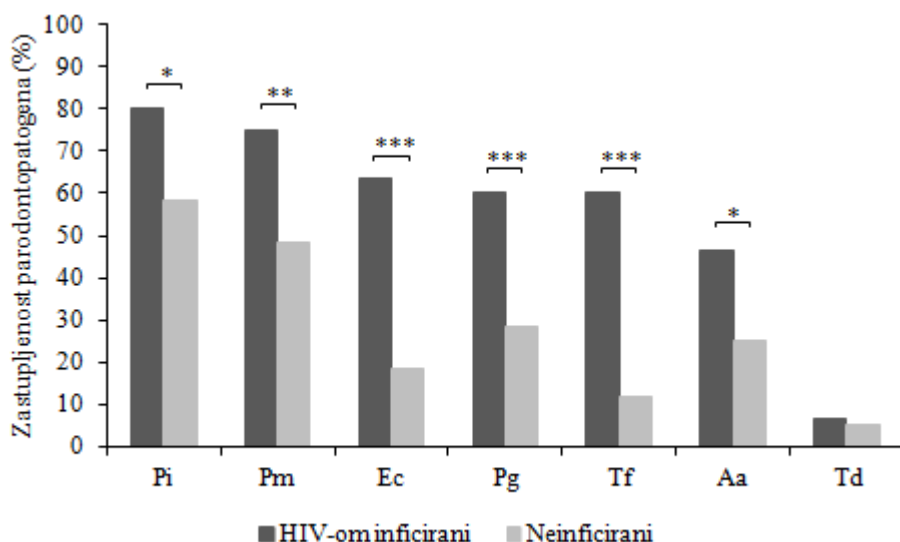
U ovom delu istraživanja učestvovalo je 60 HIV-om inficiranih i 60 neinficiranih ispitanika. Obe grupe su, prema starosti, bile podeljene u dve podgrupe, podgrupu ispitanika mlađih od 35 godina i podgrupu ispitanika starijih od 50 godina. Mlađi HIV-om inficirani pacijenti su imali prosečno $29,3 \pm 4,2$ godine, dok je prosečna starost pacijenata u starijoj HIV-om inficiranoj podgrupi iznosila je $59,0 \pm 8,2$ godina. Mlađi neinficirani ispitanici su bili prosečno stari $29,5 \pm 3,5$ godina. Stariji neinficirani ispitanici su imali prosečno $61,4 \pm 7,5$ godina. Nije uočena statistički značajna razlika u starosti između mlađih, odnosno starijih ispitanika u eksperimentalnoj i kontrolnoj grupi.

Od ukupnog broja ispitanika, PCR analizom je detektovano prisustvo parodontopatogenih mikroorganizama kod 106 osoba (88,3%) (Slika 4.9A) i to kod 58 HIV-om inficiranih osoba (55%) i kod 48 ispitanika iz neinficirane grupe (45%) (Slika 4.9B).

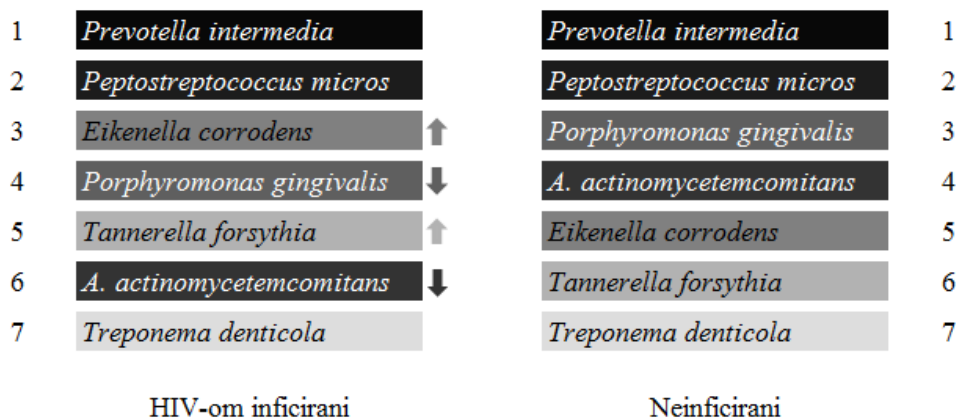


Slika 4.9. A) Broj pacijenata kod kojih su detektovani parodontopatogeni mikroorganizmi; B) Broj pacijenata iz HIV-om inficirane i neinficirane grupe kod kojih su detektovani parodontopatogeni mikroorganizmi.

Prevalenca parodontopatogena je bila statistički značajno veća kod HIV-om inficiranih pacijenata u odnosu na ispitanike kontrolne grupe, izuzev *T. denticola*-e. (Slika 4.9.3). Dalje, distribucija bakterija kod neinficiranih ispitanika je opadala od *P. intermedia*-e do *T. denticola*-e u sledećem nizu $Pi > Pm > Pg > Aa > Ec > Tf > Td$, dok je kod HIV-om inficiranih pacijenata opadajući niz bio $Pi > Pm > Ec > Pg > Tf > Aa > Td$ (Slika 4.9.4).

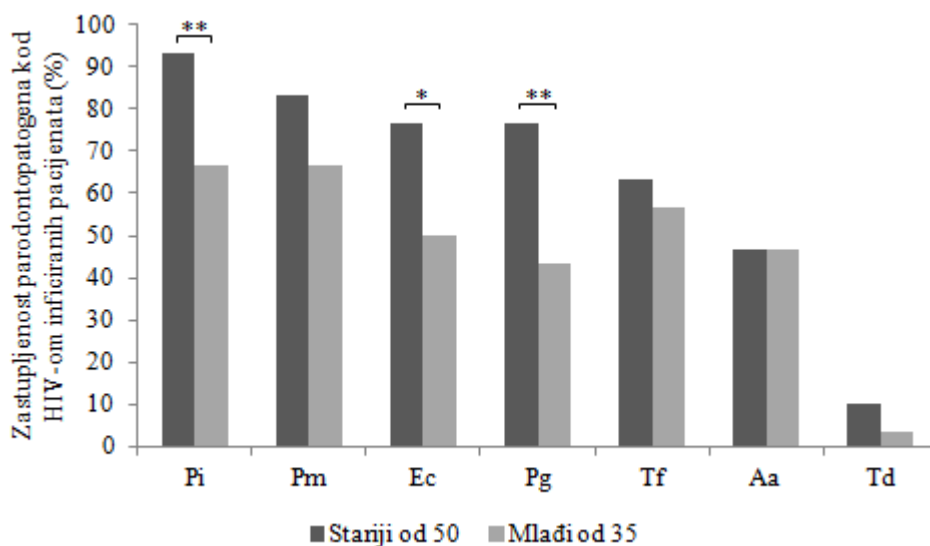


Slika 4.9.3. Distribucija parodontopatogenih mikroorganizama kod HIV-om inficiranih i neinficiranih pacijenata. Statistički značajno veće prisustvo parodontopatogena detektovano je kod HIV-om inficiranih u odnosu na neinficirane ispitanike kod sledećih mikroorganizama: *P. intermedia* ($p=0,010$), *P. micros* ($p=0,003$), *E. corrodens* ($p<0,001$), *P. gingivalis* ($p<0,001$), *A. actinomycetemcomitans* ($p=0,013$) i *T. forsythia* ($p<0,001$).

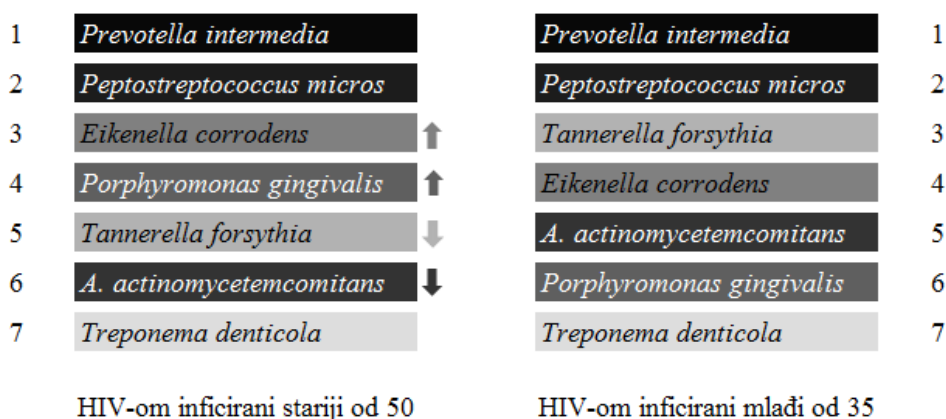


Slika 4.9.4. Distribucija parodontalnih patogena kod HIV-om inficiranih i neinficiranih pacijenata.

Prevalenca parodontopatogena kod HIV-om inficiranih pacijenata je bila veća kod starijih nego kod mlađih ispitanika. Razlika je bila statistički značajna između zastupljenosti *P. intermedia*-e, *E. corrodens*-a i *P. gingivalis*-a (Slika 4.9.5).

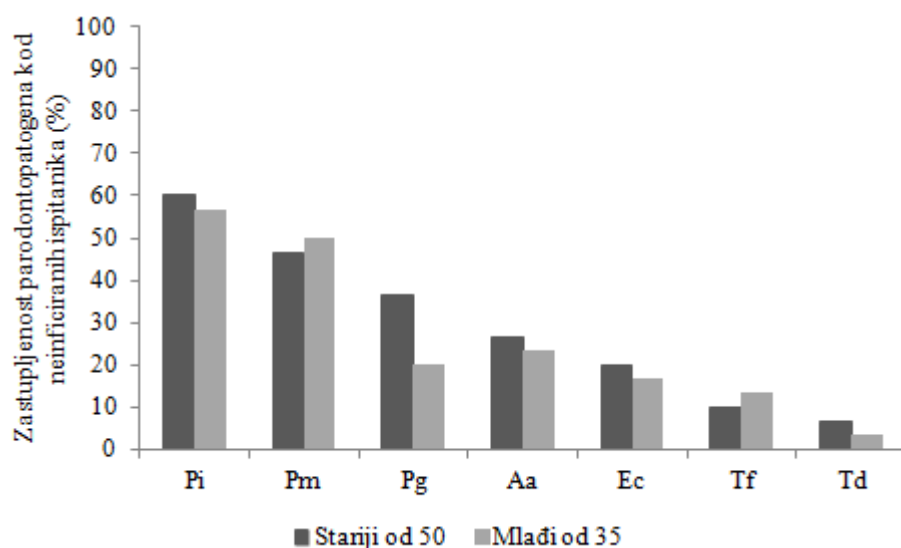


Slika 4.9.5. Prevalenca parodontopatogena kod HIV-om inficiranih pacijenata. Veća zastupljenost parodontalnih mikroorganizama detektovana je kod starijih u odnosu na mlađe ispitanike eksperimentalne grupe, sa izuzetkom *A. actinomycetemcomitans*. Statistički značajna razlika je uočena kod *P. intermedia*-e ($p=0,01$), *E. corrodens* ($p=0,032$) i *P. gingivalis*-a ($p=0,008$).

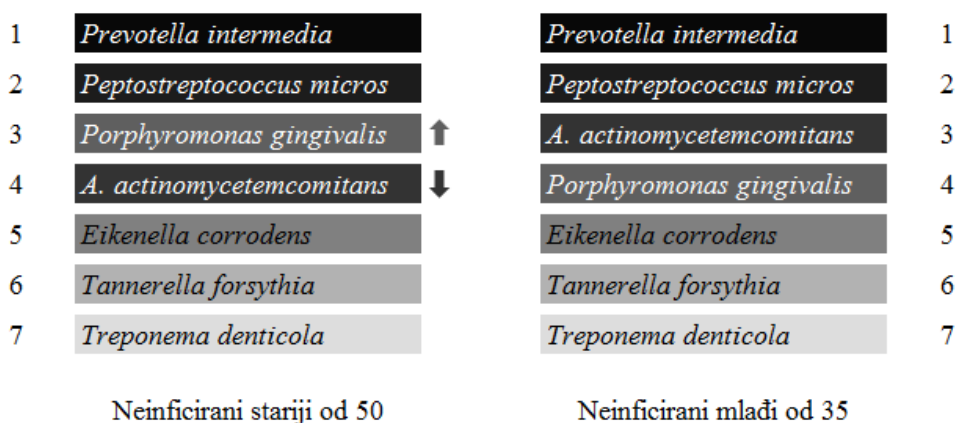


Slika 4.9.6. Distribucija parodontalnih patogena kod starijih i mlađih HIV-om inficiranih pacijenata.

U kontrolnoj grupi nije bilo statistički značajnih razlika u zastupljenosti ispitivanih parodontopatogena između starijih i mlađih osoba (Slika 4.9.7).

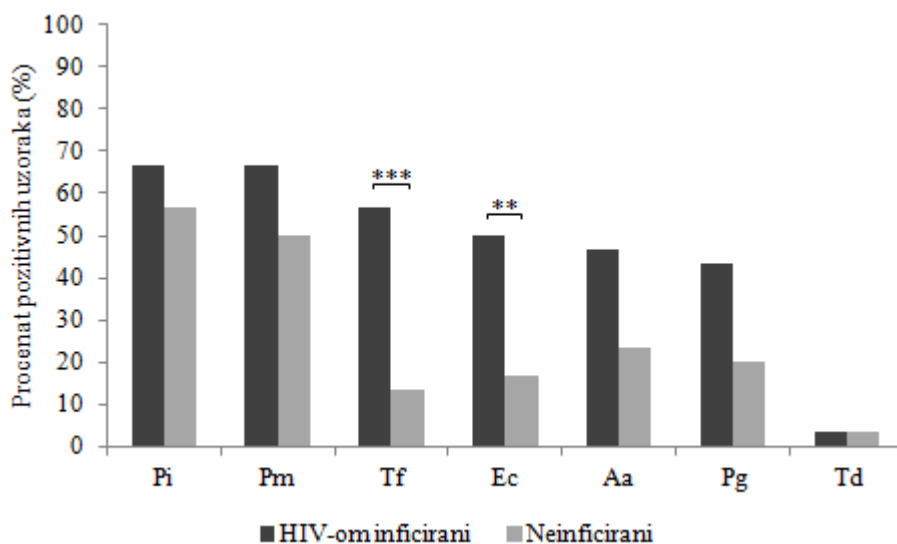


Slika 4.9.7. Zastupljenost parodontalnih mikroorganizama kod ispitanika kontrolne grupe.

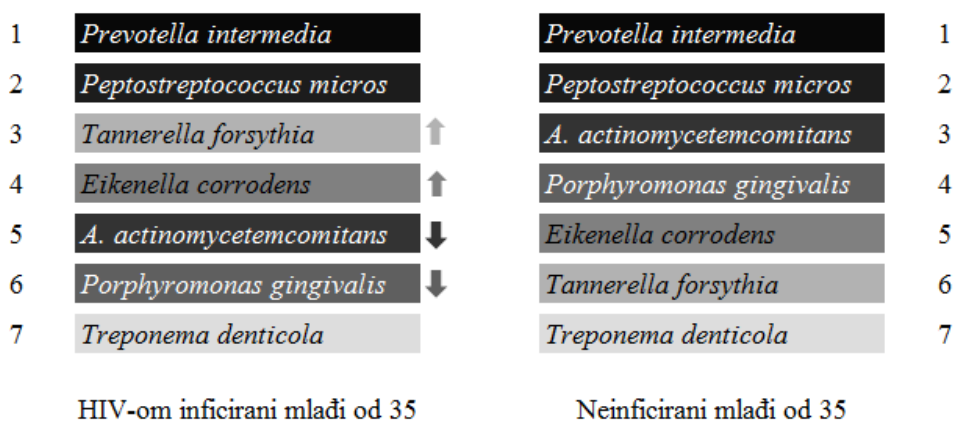


Slika 4.9.8. Distribucija parodontalnih patogena kod starijih i mlađih neinficiranih pacijenata.

Zastupljenost parodontopatogenih bakterija bila je veća kod HIV-om inficiranih u odnosu na neinficirane osobe mlađe starosne dobi, sa izuzetkom *T. denticola*-e. Statističko značajno veće prisustvo parodontopatogena detektovano je u slučaju *T. forsythia*-e i *E. corrodens* (Slika 4.9.9).

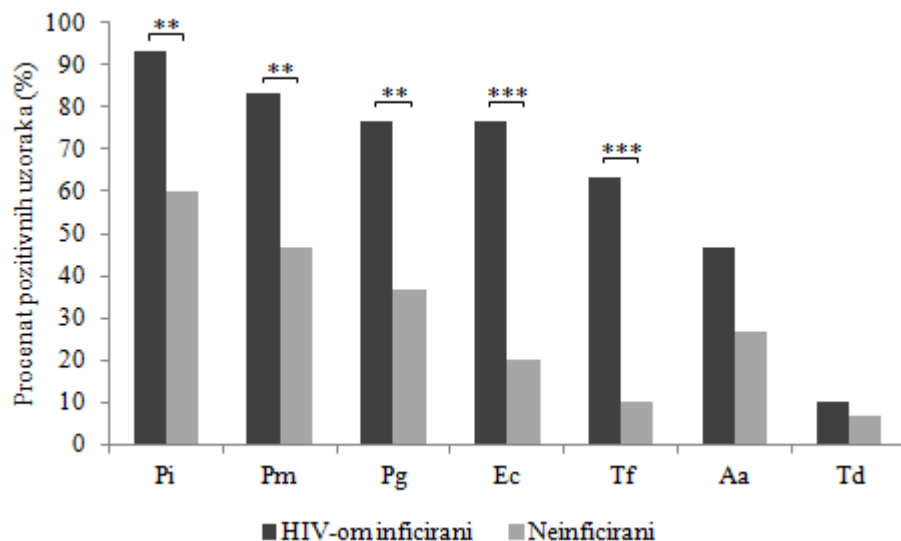


Slika 4.9.9. Distribucija parodontopatogenih mikroorganizama kod HIV-om inficiranih i neinficiranih osoba mlađih od 35 godina. Statistički značajne razlike su uočene kod *T. forsythia*-e ($p < 0,001$) i *E. corrodens* ($p = 0,006$).

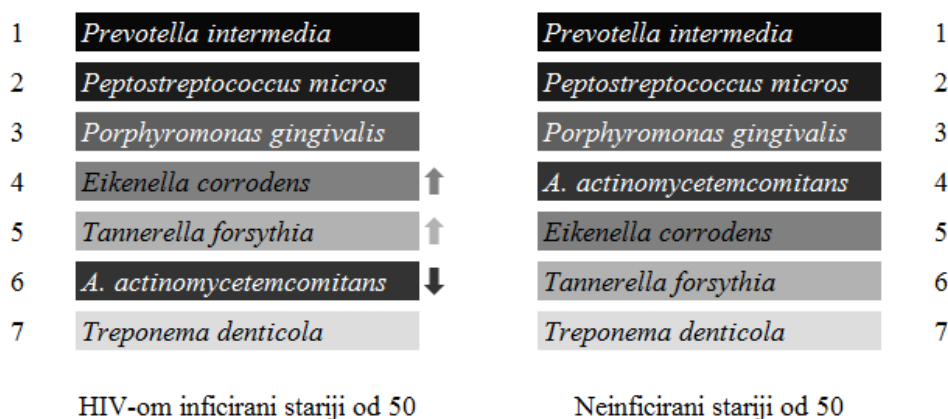


Slika 4.9.10. Distribucija parodontalnih patogena kod HIV-om inficiranih i neinficiranih pacijenata mlađih od 35 godina.

Prevalenca parodontopatogena kod starijih pacijenata je bila veća u eksperimentalnoj u odnosu na kontrolnu grupu. Razlika je bila statistički značajna kod pet od sedam parodontopatogena (Slika 4.9.11).



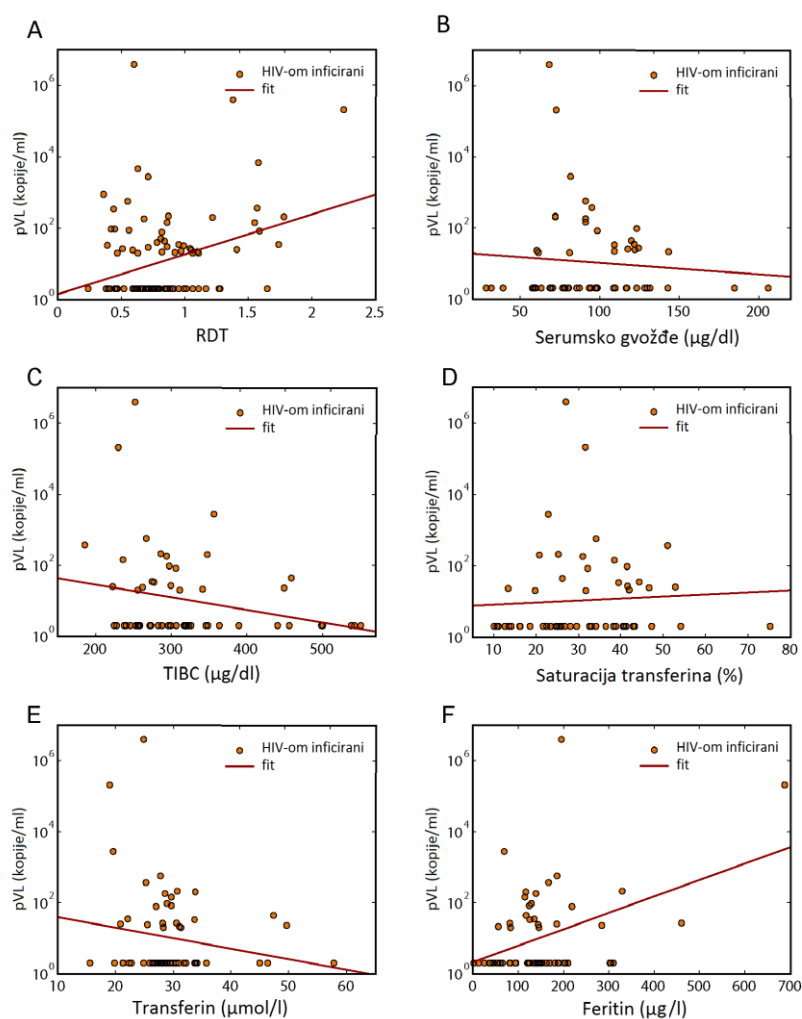
Slika 4.9.11. Distribucija parodontopatogenih bakterija kod HIV-om inficiranih i neinficiranih osoba starijih od 50 godina. Statistička značajno veća zastupljenost parodontopatogenih mikroorganizama kod HIV-om inficiranih osoba uočena je u slučaju *P. intermedia*-e ($p=0,002$), *P. micros*-a ($p=0,003$), *P. gingivalis*-a ($p=0,002$), *E. corrodens*-a ($p<0,001$) i *T. forsythia*-e ($p<0,001$).



Slika 4.9.12. Distribucija parodontalnih patogena kod HIV-om inficiranih i neinficiranih pacijenata starijih od 50 godina.

4.10. Korelacija između pVL-a, RDT-a i parametara metabolizma gvožđa

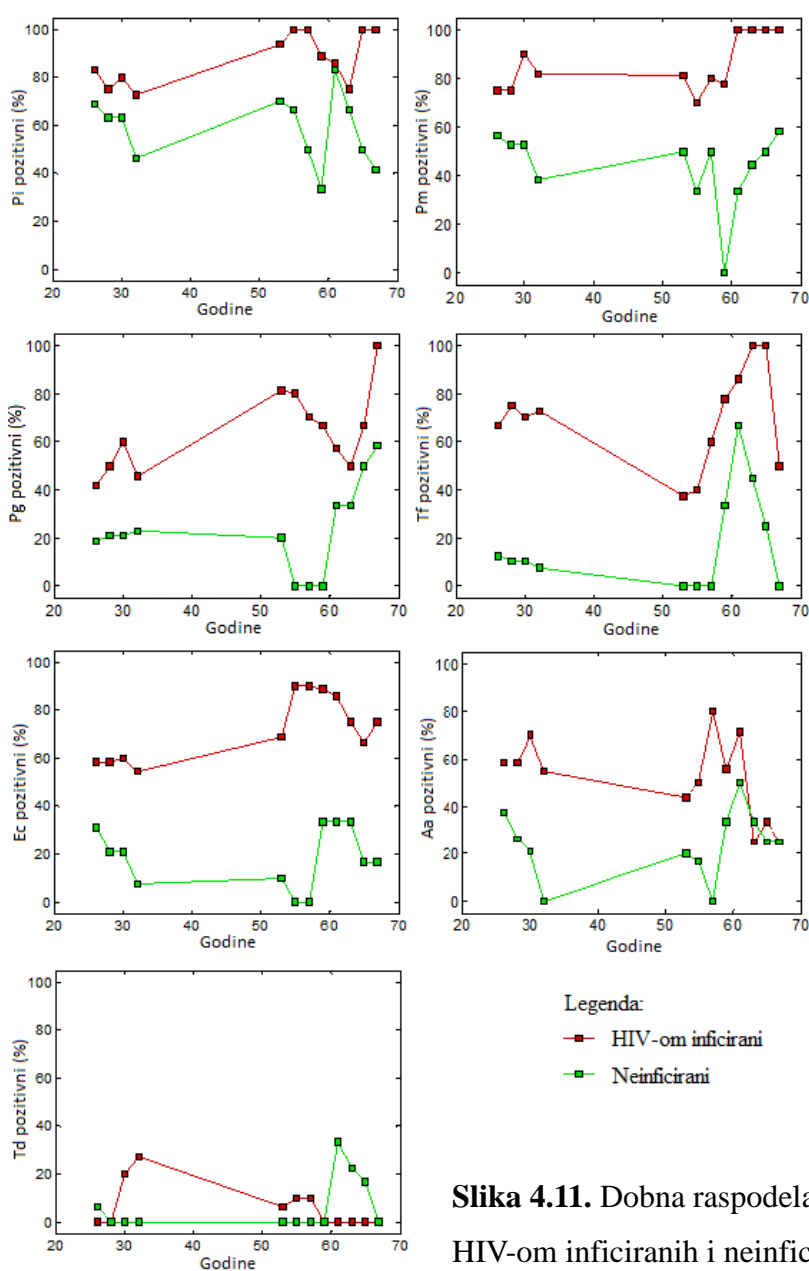
Na slici 4.10.A se vidi pozitivna korelacija između broja virusnih kopija i relativne dužine telomera ($r=0,355$, $p=0,006$). Korelacije između broja virusnih kopija i parametara metabolizma gvožđa nisu bile statistički značajne (Slika 4.10.B-F). Takođe, nije postojala ni statistički značajna korelacija između RDT i parametara metabolizma gvožđa.



Slika 4.10. Dijagram korelacije pVL-a, RDT-a i parametara metabolizma gvožđa. **A** korelacija između pVL-a i RDT-a ($p=0,006$, $n=59$); **B** Korelacija između pVL-a i serumskog gvožđa ($p=0,661$, $n=58$); **C** Korelacija između pVL-a i TIBC ($p=0,194$, $n=58$); **D** Korelacija između pVL-a i saturacije transferina ($p=0,499$, $n=58$); **E** Korelacija pVL-a i transferina ($p=0,579$, $n=56$); **F** Korelacija pVL-a i feritina ($p=0,106$, $n=41$).

4.11. Uticaj starosnog doba na distribucija parodontopatogena

Dobno zavisna distribucija parodontopatogena analizirana je i u kontrolnoj i u eksperimentalnoj grupi korišćenjem 12 šestogodišnjih dobnih podgrupa. Procenti pozitivnih testova za svaku od sedam ispitivanih bakterija su predstavljeni na slici 4.10. Uočen je trend povećavanja razlike u distribuciji određenih parodontopatogena (*E. corrodens* i *P. intermedia*), kao i raniji porast broja bakterija kod starijih HIV-om inficiranih pacijenata u odnosu na starije neinficirane ispitanike.



Slika 4.11. Dobna raspodela parodontopatogena kod HIV-om inficiranih i neinficiranih ispitanika.

4.12. Kvantitativni sastav oralne flore

Među ispitivanim grupama nije bilo statistički značajne razlike u ukupnom broju oralnih bakterija iako su HIV-om inficirani pacijenti imali četverostruko više bakterija u usnoj duplji u odnosu na neinficirane pacijente i u mlađoj i u starijoj grupi (Tabela 4.11).

Tabela 4.12. Ukupan broj oralnih bakterija kod HIV-om inficiranih i neinficiranih pacijenata.

	Broj genskih kopija / ukupan broj bakterija (srednja vrednost \pm SD) $\times 10^7$		<i>p</i> -vrednost
	≤ 35 godina	≥ 50 godina	
HIV-om inficirani	3,61 \pm 5,19	5,03 \pm 8,47	0,697
Neinficirani	0,88 \pm 0,25	1,15 \pm 0,28	0,088
<i>p</i> -vrednost	0,272	0,181	

4. 13. Oralne manifestacije HIV-infekcije

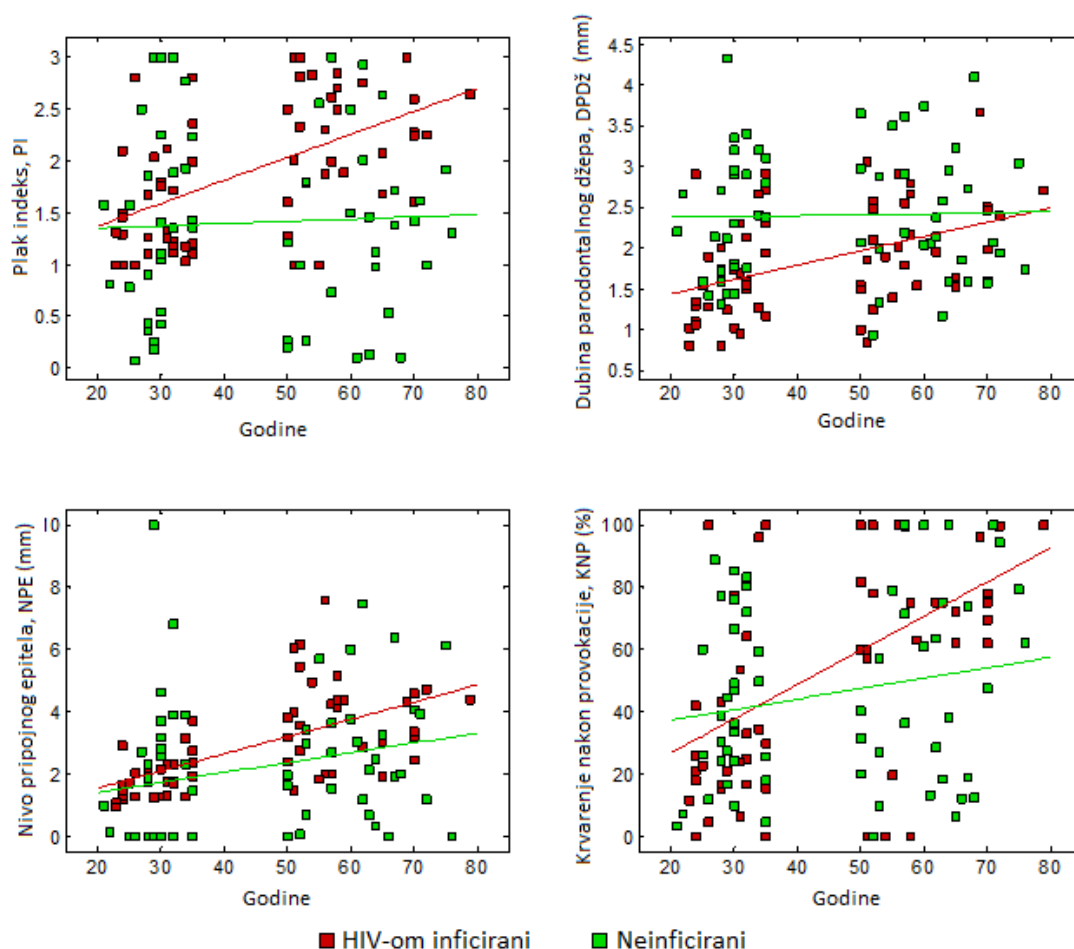
Inspekcijom usne duplje ustanovljeno je da se oralne manifestacije karakteristične za HIV infekciju, sa izuzetkom linearnog gingivalnog eritema, češće javljaju u starijoj životnoj dobi. Ulceronekrotični parodontitis i obloženi jezik su registrovani samo kod starijih osoba dok prisustvo nekrotizirajućeg stomatitisa, čupaste leukoplakije i Kapošijevog sarkoma nije uočeno (Tabela 4.12).

Tabela 4.13. Oralne manifestacije karakteristične za HIV infekciju.

Varijabla	Starosno doba		<i>p</i> -vrednost
	≤ 35 godina n=30	≥ 50 godina n=30	
HIV-asocirani gingivitis (%)	56,7	90,0	0,007
Linearni gingivalni eritem (%)	16,7	6,7	0,424
HIV-asocirani parodontitis (%)	13,3	46,7	0,010
Ulceronekrotični parodontitis (%)	0	3,3	1,000
Nekrotizirajući stomatitis (%)	0	0	/
Obloženi jezik (%)	0	6,7	0,492
Čupasta leukoplakija (%)	0	0	/
Kapoši sarkom (%)	0	0	/

4.14. Uticaj starosnog doba na parodontalni status ispitanika

Odnosi parodontalnih parametara i starosnog doba ispitanika prikazani su na slici 4.14. Sve izmerene vrednosti parodontalnih parametara, sa izuzetkom dubine parodontalnog džepa, su bile statistički značajno veće kod HIV-om inficiranih osoba u odnosu na neinficirane ispitanike. Dodatno, svi parodontalni parametri su bili statistički značajno veći kod starijih u odnosu na mlađe pacijente eksperimentalne grupe. Nije bilo statistički značajne razlike u vrednostima parodontalnih parametara između starijih i mladih ispitanika neinficirane grupe.



Slika 4.14. Starosna distribucija parodontalnih parametara. Metodom linearnog fitovanja (prava linija) predstavljene su vrednosti parodontalnih parametara. Koeficijenti linearnog fitovanja dati su u tabeli 4.15. Statistički značajno veće vrednosti svih parodontalnih parametara su uočene kod starijih u odnosu na mlađe ispitanike iz HIV-om inficirane grupe: plak indeks, PI ($p<0,001$), dubina parodontalnog džepa, DPDž ($p=0,011$), nivo pripojnog epitela, NPE ($p<0,001$) i krvarenje nakon provokacije

($p < 0,001$). Nije bilo statistički značajne razlike u vrednostima parodontalnih parametara između starijih i mlađih ispitanika kontrolne grupe.

Tabela 4.15. Koeficijenti najboljeg linearnog fitovanja vrednosti parodontalnih parametara predstavljenih na slici 4.13.

Parodontalni parametar	HIV-om inficirani		Neinficirani	
	<i>k</i>	<i>b</i>	<i>k</i>	<i>b</i>
Plak indeks	0,0222	0,9225	0,0022	1,3048
Dubina parodontalnog džepa	0,0176	1,0878	0,0011	2,3543
Nivo pripojnog epitela	0,0550	0,4564	0,0315	0,7977
Krvarenje nakon provokacije	1,0949	4,9179	0,3361	30,6500

5. DISKUSIJA

Ova studija preseka je, prema našim saznanjima, prva koja se bavi ispitivanjem relativne dužine telomera i parametara metabolizma gvožđa kao biomarkera starenja kod HIV-om inficiranih osoba koje su na različitim terapijskim režimima. Iako se brojni biomarkeri mogu koristiti za evaluaciju procesa starenja (114-116), ova studija je fokusirana na dva nezavisna biomarkera koja se mogu jednostavno odrediti iz pune krvi i koristiti za određivanje biološke starosti ispitanika. Dodatno, ovo je prva studija u kojoj se pretpostavlja da su kvalitativne i kvantitativne promene bakterijskog sastava usne duplje znaci preranog ili ubrzanog starenja kod HIV-om inficiranih osoba. U studiju su uključeni samo ispitanici muškog pola jer je procenat žena inficiranih HIV-om, starijih od 50 godina veoma nizak u našoj populaciji i adekvatna eksperimentalna grupa nije mogla biti formirana. Ovim je iz studije isključen uticaj pola, odnosno hormonskog statusa na proces starenja organizma. Naime pokazano je da ženski polni hormoni imaju uticaj na dužinu telomera što može biti jedan od razloga zašto je životni vek žena duži nego kod muškaraca (117, 118). Za potrebe studije, eksperimentalna grupa je podeljena na ispitanike dve starosne dobi. Na osnovu kliničkih karakteristika, obe starosne grupe HIV-om inficiranih ispitanika su pokazale homogenost po pitanju broja CD4 limfocita i broja virusnih kopija, kao i određenih biohemijskih parametara, dok je očekivano, dužina trajanja terapije bila različita. Lipidni profil i vrednost C-reaktivnog proteina su se razlikovali između starijih i mlađih ispitanika eksperimentalne grupe i ovi nalazi su bili u skladu sa drugim istraživanjima (119, 120). Dominantan vid transmisije HIV-a kod mlađih ispitanika je bio putem nezaštićenog homoseksualnog odnosa, što je u skladu sa literaturnim podacima, dok su stariji ispitanici, suprotno očekivanjima, najčešće inficirani HIV-om putem nezaštićenog heteroseksualnog odnosa (121-123).

Određivanje relativne dužine telomera vršeno je iz leukocita periferne krvi koji predstavljaju relativno lako dostupne ćelije za analizu. Istraživanje koje su sprovedi Daniali i saradnici pokazalo je da su telomere leukocita periferne krvi kraće u odnosu na telomere ćelija koje se dele sporijim tempom, kao što su mišićne ćelije, adipociti i keratinociti (116). Međutim, isti naučnici su pokazali da je dinamika skraćivanja telomera kod odraslih osoba u ovim ćelijama ista kao i kod leukocita i da uočene razlike u dužini telomera verovatno nastaju u doba ranog rasta i razvoja individue (116). Uzimajući u obzir prethodno navedeno, leukociti periferne krvi se, zbog manje

invazivne procedure izolacije ćelija na kojima bi se vršili eksperimenti, smatraju ćelijama izbora za određivanje relativne dužine telomera. Rezultati ove doktorske disertacije ukazali su da HIV-om inficirane osobe imaju duže telomere u odnosu na neinficirane ispitanike što je uočeno kako u mlađoj, tako i u starijoj grupi pacijenata. Ovaj nalaz je u suprotnosti sa drugim studijama koje su se bavile istraživanjem dužine telomera kod HIV-om inficiranih osoba (108, 109, 124). U istraživanjima iz 2015. (108) i 2017. godine (124), za razliku od naše studje, u dizajnu nije bila isključena koinfekcija sa virusom hepatitisa C (HCV), koji sa svoje strane može uticati na smanjenje broja telomernih ponovaka (125). Gonzalez-Serna i saradnici su upoređivali uticaj HCV i HIV infekcije na gubitak telomera i utvrdili da brzo skraćenje telomera kod osoba inficiranih HIV-om dolazi u fazi serokonverzije, dok se u slučaju HCV-infekcije to dešava u kasnijim fazama bolesti (109). Za razliku od ove studije, naši pacijenti su testirani u kasnijim fazama infekcije. Dalje, mogući odgovori za neslaganje nalaza između naše i prethodnih studija mogu biti i ti da su: a) ispitanici sa HIV-om u proseku imali duže telomere od neinficiranih ispitanika, a da se nasumičnim uključivanjem ispitanika u ovu studiju preseka ova razlika nije izbegla, ili da je b) virus doveo do produženja telomera u leukocitima periferne krvi. Mehanizmi pomoću kojih virus može dovesti do produženja telomera mogu ići preko aktiviranja enzima telomeraze i/ili preko mehanizama koji ne zavise od telomeraze, a koji se jednim imenom nazivaju alternativno produžavanje telomera (engl. *alternative telomere lengthening, ALT*) (126). Sa produžavanjem telomera ćelija domaćina virusi produžavaju i svoj opstanak u njima (127). Aktiviranje telomeraze i posledično produženje telomera već je pokazano na primeru Epštajn-Bar virusa (EBV) koji može i putem ALT-a uvećati broj telomernih ponovaka (111, 128). Pored EBV-a, pokazano je da i drugi virusi kao što su humani herpes virus 8 (HHV-8), humani papilomavirus (HPV), zatim virusi hepatitisa B i C (HBV, HCV) mogu dovesti do uvećane ekspresije telomeraze u ciljnim ćelijama, međutim to nije dovodilo do produženja telomera (111). Zhu i saradnici su primetili da se kod nekih virusa telomeraza aktivira tek kada dužina telomera “padne” na kritičnu vrednost pa bi i u slučaju gore pomenutih virusa, telomeraza samo održavala kritičnu dužinu telomera, ali ne bi dovodila do njihovog produženja (127). Moguće je da se slični mehanizmi aktiviraju i u ćelijama inficiranim virusom humane imunodeficijencije. Reynoso i saradnici su pokazali u *in vitro* uslovima da HIV aktivira

telomerazu kod makrofaga, povećava otpornost ovih ćelija na oksidativni stres i na taj način čuva svoj rezervoar u organizmu (129). Interesantno je spomenuti i studiju na monozigotnim blizancima diskordantnim za HIV-infekciju u kojoj je nađeno da su CD8 limfociti imali značajno kraće telomere kod HIV-inficiranih u odnosu na neinficirane blizance, dok su CD4 limfociti bili sa značajno dužim telomerama kod HIV-om inficiranih blizanaca (130). Autori navode i da je telomeraza u ovim CD4 i CD8 limfocitima bila skoro nedetektibilna, ali ostavljaju kao mogućnost da je njena funkcija značajno veća na mestu produkcije samih limfocita (130). Isti autori ne isključuju ni mogućnost da je razlog dužih telomera kod CD4 limfocita to što su CD4 limfociti sa kraćim telomerama ranije "stradali" u kontaktu sa virusom, dok su oni sa dužim telomerama preostali u krvi (130). Dodatno, Lichterfeld i saradnici u istraživanju iz 2008. godine navode razliku u dužini telomera kod CD8 limfocita između pacijenata koji su osetljiviji na HIV-infekciju (HIV-progresora) i pacijenata koji duže vremena uspevaju da održe broj limfocita u fiziološkom opsegu i broj virusnih kopija ispod praga detekcije, a nemaju simptome bolesti niti su na antiretrovirusnoj terapiji (HIV-kontrolora). HIV-kontrolori su imali duže telomere u CD8 limfocitima, kao i veću ekspresiju telomeraze u odnosu na iste ćelije HIV-progresora (131). I pored nehomogenosti u rezultatima po pitanju dužine telomera nakon HIV-infekcije, u svim navedenim studijama telomere su se skraćivale sa starenjem ispitanika, kao što je pronađeno i u našoj studiji.

Veliki broj istraživanja bavio se ispitivanjem uticaja antiretrovirusne terapije na dužinu telomera kod HIV-om inficiranih osoba. U našoj studiji pacijenti koji su bili na antiretrovirusnoj terapiji imali su kraće telomere u odnosu na pacijente bez terapije. Ovaj nalaz je u skladu sa istraživanjima koja navode da antiretrovirusna terapija dovodi do disfunkcija mitohondrija, oštećenja mitohondrijalne DNK i posledično uvećanja oksidativnog stresa na koje su telomere veoma osetljive (107, 110). Dalje, pojedini autori veruju da inhibitori reverzne transkriptaze blokiraju delovanje telomeraze i tako dovode do značajnijeg gubitka telomera u aktiviranim leukocitima (132). Hotchkiss i saradnici su pronašli skoro deset puta brži gubitak telomera kod HIV-om inficiranih osoba u odnosu na kontrole dve godine nakon početka primene antiretrovirusne terapije (133). Sa druge strane važno je istaći i nalaze autora koji nisu pronašli promene u dužini telomera kod pacijenata koji su na antiretrovirusnoj terapiji. Tako, Montejano i saradnici

navode da nukleozidni inhibitori reverzne transkriptaze ne dovode do značajnijeg gubitka telomera kod osoba kod kojih se virus drži pod kontrolom (ispod 50 kopija po ml krvi) i da verovatno veći uticaj na skraćenje telomera ima samo trajanje HIV-infekcije (134). Zanet i saradnici su pronašli da antiretrovirusna terapija ne utiče na promenu dužine telomera kod ispitivanih pacijenata i ističu veći značaj broja virusnih kopija, kao i koinfekciju sa HCV u tumačenju gubitka telomernih ponovaka (135). Od nedavno je posebna pažnja istraživača usmerena ka ispitivanjima dužine telomera kod dece koja su intrauterino bila izložena antiretrovirusnim lekovima. Kanadska studija iz 2018. godine je pokazala da HIV-om neinficirana deca koja su bila izložena delovanju antiretrovirusnih lekova u toku gestacijskog perioda HIV-om inficirane majke, nisu imala kraće telomere u poređenju sa vršnjacima koji nisu bili eksponirani ni HIV-u ni antiretrovirusnoj terapiji (136). Ovo je slučaj i sa studijom iz 2012. godine u kojoj nije pronađena razlika u dužini telomera između neinficirane dece koja su bila izložena lekovima i dece HIV-om neinficiranih majki (137). Suprotno su pokazali Shiau i saradnici koji su u ispitivanje uključili i HIV-om inficiranu decu koja su intrauterino bila izložena cART-u: najkraće telomere imala su deca sa HIV-om i neinficirana deca izložena lekovima, dok su neinficirana i neeksponirana deca imala značajno duže telomere (138). U ovoj studiji autori nisu pronašli razliku u dužini telomere između dece koja su bila izložena lekovima (inficirani naspram neinficirani) (138), dok Ganesin i saradnici nalaze značajne razlike u dužine telomera između sve tri ispitivane grupe (139). Najkraće telomere u ovoj studiji imala su HIV-om inficirana deca, dok su duže telomere imala redom neinficirana deca koja su bila izložena preventivnoj terapiji i deca iz kontrolne grupe (neinficirana i neeksponirana) (139). Toksično delovanje antiretrovirusnih lekova i posledično uvećanje nivoa oksidativnog stresa, kao i inhibitorno delovanje na telomerazu najčešće su navođeni razlozi za skraćenje telomera kod osoba koje su na terapiji. Ovi pomenuti mehanizmi mogli bi se iskoristiti i za objašnjenje naših rezultata. Suprotno, selektivna eliminacija ćelija sa kraćim telomerama i mehanizmi koji aktiviraju telomerazu mogli bi da budu razlozi dobijanja produženih telomera kod leukocita periferne krvi. Primenu kombinovane antiretrovirusne terapije brojni autori povezuju sa stanjima i bolestima koje se kod neinficiranih osoba obično javljaju u kasnom životnom dobu (140, 141). Dokazano je da su osobe koje su u sklopu kombinovane antiretrovirusne terapije imale proteazne

inhibitore bile u većem riziku od infarkta miokarda u odnosu na pacijente lečene nenukleozidnim inhibitorima reverzne transkriptaze i da se ovaj rizik povećavao sa godinama (140, 142). Promene na krvnim sudovima kod pacijenata na antiretrovirusnim lekovima ranije su se dovodila u vezu sa promenama u metabolizmu lipida karakterističnim za HIV-om inficirane osobe, međutim, nedavno je pokazano da sama HIV-infekcija ali i retrovirusni lekovi dovode do bržeg starenja endotelnih ćelija krvnih sudova (143). Pojava dijabetes melitusa je takođe češća kod HIV-om inficiranih pacijenata na antiretrovirusnoj terapiji što se delimično objašnjava povećanom rezistencijom na insulin nakon upotrebe proteaznih inhibitora, ali i zbog toksičnog delovanja nukleozidnih inhibitora reverzne transkriptaze na mitohondrije (106). Smanjenje koštane mase je takođe opisano kao komplikacija koja ide uz primenu antiretrovirusne terapije, pogotovo kada su u pitanju proteazni inhibitori i nukleozidni inhibitori reverzne transkriptaze (144, 145). Grupa američkih istraživača pokazala je dobnno zavisno smanjenje koštane mase kod HIV-om inficiranih pacijenata koji nisu primali antiretrovirusnu terapiju (146). Ista grupa autora pokazala je smanjenje koštane mase kod ovih pacijenata, u iznosu od 2-6%, nakon otpočinjanja terapije sa antiretrovirusnim lekovima, naročito ako je u sklopu nje išao nukleozidni inhibitor reverzne transkriptaze, tenofovir (146). Zaključili su i da zamena terapijskog režima ne dovodi do značajnijeg smanjenja gubitka koštane mase. Delovanje HIV-infekcije na smanjenje koštane mase pojedini autori objašnjavaju direktnim uticajem virusnih proteina na aktivaciju osteoklasta, preko nuklearnog faktora κ B ili remećenjem metabolizma vitamina D, važnog za homeostazu kosti (147, 148). Dalje, pokazano je i redukovano stvaranje osteoprotežerina u T-limfocitima kod osoba sa HIV-infekcijom što dovodi do povoljnijih uslova za razgradnju kosti (147). Promene slične ovima se najverovatnije dešavaju i na nivou alveolarnog nastavka vilica i uslovljavaju brže propadanje potpornih zubnih struktura. Imajući na umu nedovoljno poznatu patogenezu gubitka koštane mase kod pacijenata koji su na antiretrovirusnoj terapiji i nemogućnost izmene terapijskog režima od velike je važnosti razjašnjavanje mehanizama koji dovode do promena na koštanim strukturama pogotovo kada se radi o pacijentima starije životne dobi.

Ova studija je pokazala i da HIV-infekcija značajno povećava oralno „opterećenje“ mikroorganizmima u usnoj duplji i da utiče na obrasce po kojima se

menja sastav oralne flore tokom procesa starenja. Uočeni fenomen je verovatno posledica kompleksnih interakcija HIV-infekcije, kombinovane antiretrovirusne terapije i starenja. Takođe, važan parametar koji treba uzeti u obzir kada se razmatra sastav oralnog mikrobioma je i dostupnost mikroelemenata neophodnih za odvijanje metaboličkih procesa oralnih mikroorganizama. Jedan od najvažnijih mikroelemenata koji utiče na arhitektoniku oralnog biofilma je gvožđe (149). Raspolaganje ovim mikroelementom zavisi od starosne dobi domaćina jer se količina gvožđa u organizmu menja tokom procesa starenja.

U našoj studiji *P. intermedia* je bila najčešće detektovani oralni mikroorganizam. Ovaj nalaz je u skladu sa ranijim istraživanjima rađenim na HIV-om inficiranim i neinficiranim pacijentima (150, 151). *P. intermedia* je bila statistički značajno više zastupljena u HIV-om inficiranoj grupi u odnosu na neinficirane ispitanike, ali i kod starijih u odnosu na mlađe HIV-om inficirane ispitanike. Ovaj obligatorni anaerob je otporan na brojne antibiotike, ali je pokazano da helirajuća sredstva za gvožđe mogu biti korisni agensi u kontroli njegovog rasta (152). *P. intermedia* koristi različite izvore gvožđa za svoje metaboličke potrebe (153). Pokazano je i da ovaj mikroorganizam preko svojih proteaza efikasno vezuje i razlaže proteinske nosače gvožđa, laktoferin i transferin, kako bi došao do njihovog “dragocenog tovara” (153). Ista studija je pokazala da *A. actinomycetemcomitans*, *T. denticola* i *P. micros* ne poseduju receptore za vezivanje transferina (153). *P. intermedia* se često nalazi u uzorcima subgingivalnog biofilma kod pacijenata obolelih od akutnog ulceronekrotičnog gingivitisa i hroničnih formi parodontalne bolesti i smatra se jednim od ranih kolonizatora subgingivalnog prostora (154, 155). Osim što obezbeđuje mesta za vezivanje izrazitijih parodontopatogena, *P. intermedia* stvara i povoljan ekosistem sa odgovarajućim nutrijensima i oksido-redukcionim statusom (156). Ovaj mikroorganizam je u balansu sa imunim snagama domaćina zahvaljujući cistein proteinazi, interpainu A, koji modifikuje odbranu organizma na više nivoa. Najznačajniji uticaj na imunitet obavlja preko sistema komplementa degradirajući C3 komponentu čime se blokiraju sva tri načina njegove aktivacije ali i direktnim razaranjem imunoglobulina, pretežno klase IgG (156, 157). Često su ove akcije u sinergizmu sa gingipainom, produktom *P. gingivalis*-a. Delovanje ovih faktora virulencije na imunitet domaćina pruža zaštitu i „susedima“ čime obezbeđuju stabilnost ove visoko organizovane mikrobijalne zajednice biofilma.

Proteolitičkim delovanjem interpain A, *P. intermedia* ali i drugi mikroorganizmi biofilma, snabdevaju se hemom i slobodnim aminokiselinama neophodnim za njihov metabolizam (156).

P. micros je anaerobni mikroorganizam povezan sa različitim formama parodontalne bolesti. Bakterije „narandžastog kompleksa“ *P. micros* i *P. intermedia* sinergistički dovode do izraženih dentoalveolarnih i parodontalnih infekcija (158). Čelijski zid *P. micros*-a izaziva snažan imuni odgovor stimulacijom makrofaga pri čemu se stvaraju proinflamatorni citokini TNF- α , Il-1 β and Il-6 koji dovode do oštećenja parodontalnih tkiva (159). Mali je broj studija koje se odnose na prisustvo i potencijalno patogeni uticaj *P. micros*-a u HIV-infekciji iako ovaj mikroorganizam kod imunokompromitovanih pacijenata može biti veoma opasan. Prisustvo *P. micros*-a u subgingivalnoj niši HIV-om inficiranih pacijenata prvi put je opisano 1991 (160). U odnosu na tu studiju, mi smo pokazali veći porast u zastupljenosti *P. micros*-a u poređenju sa *P. intermedia*-om kod HIV-om inficiranih u odnosu na neinficirane pacijente. Demonstrirana je i jednaka distribucija *P. micros*-a između različitih dobnih grupa što je bilo u skladu sa našim istraživanjem (68).

P. gingivalis je Gram-negativan anaerob sa visokim potrebama za hemom i gvoždem pa je ova bakterija razvila efikasne strategije za njegovo preuzimanje, internalizaciju i skladištenje (76). Čak oko 50 proteina *P. gingivalis*-a je uključeno u korišćenje gvožđa i hema (161). Imajući ovo u vidu, dostupnost gvožđa u usnoj duplji predstavlja limitirajući faktor za opstanak i patogeni učinak ovog mikroorganizma. Ovo je u skladu sa nalazima da je prisustvo sojeva *P. gingivalis*-a sa nižim potrebama za gvoždem u korelaciji sa većim oštećenjima parodontalnih tkiva (76). Tako, dobno zavisno akumuliranje gvožđa u humanim ćelijama utiče na prevalencu *P. gingivalis*-a unutar oralnog mikrobioma. U našoj studiji je pokazano veće prisustvo bakterija “crvenog kompleksa” *P. gingivalis*-a i *T. forsythia*-e kod HIV-om inficiranih u odnosu na neinficirane ispitanike što je u skladu sa ranijim istraživanjima (162, 163). Ovo je važno jer *P. gingivalis* preko svojih metabolite može biti uključen u progresiju HIV-infekcije (164). Imajući to u vidu, rani tretman parodontalne bolesti kod HIV-om inficiranih osoba je veoma značajan. Podaci o dobno zavisnoj distribuciji ovog parodontopatogena su i dalje nepotpuni. Ranije je utvrđeno da zastupljenost *P.*

gingivalis-a raste tokom životnog veka što je pokazano i kod naših pacijenata starijih od 50 godina (165). Neadekvatan odgovor imunog sistema koji se viđa kod starijih osoba olakšava i mehanizme kojim mikroorganizmi izbegavaju imuni odgovor domaćina. Tako na primer lipopolisaharidi bakterijskog zida *P. gingivalis*-a mogu da blokiraju TLR-4 receptor i učine ga neefikasnim u prepoznavanju brojnih parodontalnih patogena (166). Sledeći faktor virulencije *P. gingivalis*-a, gingipain, blokira aktiviranje sistema komplementa degradiranjem C3 komponente (90). Dalje, enzimskim delovanjem gingipaina produkuju se velike količine C5a komponente komplementa, koja se vezuje za receptor na membrani makrofaga. Zajedničkom aktivacijom C5a receptora i vezivanjem antigena *P. gingivalis*-a za TLR-2 i CXCR4 receptore blokira se fagocitna aktivnost makrofaga (167). Treba spomenuti i da koaktivacija C5a i TLR2 receptora dovodi do značajne produkcije citokina Il-1 β , Il-6 i TNF- α koji dovode do gubitka alveolarne kosti parodontijuma (168, 169). Proteolitičkim delovanjem gingipaina može se izmeniti i površina neutrofila i tako označiti za fagocitozu od strane makrofaga (170, 171). Fimbrije *P. gingivalis*-a služe za adheziju i kolonizaciju ćelija domaćina, ali i učestvuju u gore pomenutom „utišavanju“ makrofaga vezivanjem za CXCR4 receptore (167, 172). Manipulacijom imunog sistema, *P. gingivalis* obezbeđuje ne samo svoje preživljavanje već čini korist i mikroorganizmima u okruženju, a ispuštanjem vezikula koje sadrže faktore virulencije (lipopolisaharide, gingipain i fimbrije) širi svoj uticaj na veći deo biofilma, a čak i na epitel gingive kroz koji vezikule mogu da difunduju (173, 174). Eksperimentalni zečiji model pokazuje da prisustvo *P. gingivalis*-a u oralnom biofilmu dovodi do značajnog povećanja ukupnog broja bakterija, veće zastupljenosti *P. intermedia*-e, *E. corrodens*, *P. micros*-a i pojave *A. actinomycetemcomitans*-a (175).

A. actinomycetemcomitans je bio češće detektovan kod HIV-om inficiranih u odnosu na neinficirane ispitanike, mada je po zastupljenosti pao sa četvrte pozicije (neinficirani pacijenti) na šestu (HIV-om inficirani pacijenti). Ovaj “pad” u poziciji *A. actinomycetemcomitans*-a se takođe vidi i u toku procesa starenja što je u skladu sa drugim istraživanjima (165). Ovo se može objasniti gubitkom kapaciteta za vezivanje spoljašnjeg membranskog proteina bakterije za ćelije domaćina zbog mikrostrukturnih promena epitela uzrokovanih starenjem (9, 176). *A. actinomycetemcomitans* je gram negativni kokobacil odgovoran za različite forme parodontopatija ali i za ekstraoralne infekcije kao što su endokarditis, artritis, cerebralni apsces i osteomijelitis (177-179).

Nakon adheriranja na oralnu mukozu ovaj mikroorganizam veoma brzo migrira kroz epitelni sloj ali i ulazi u epitelne ćelije aktivirajući tako imuni odgovor (80, 180). Faktori virulencije *A. actinomycetemcomitans*-a prave protivtežu odbrambenim snagama organizma, a kada nastanu povoljni uslovi, nadvladavaju ih i omogućavaju mikroorganizmu dublji prodor u tkiva. Od velikog broja ovih faktora najviše su ispitivani citoletalni distendirajući toksin (CDT) i leukotoksin. Iako iniciraju imuni odgovor podsticanjem stvaranja interleukina 1 i 18, oni imaju i mehanizme kojima *A. actinomycetemcomitans* „izmiče“ imunom odgovoru. Vezivanjem citoletalnog distendirajućeg toksina za membranske proteine monocita dolazi do blokiranja njihovog ćelijskog ciklusa mehanizmima koji remete više signalnih puteva, a Rabin i saradnici su dokazali ulogu ovog toksina i u apoptozi makrofaga (181-183). Sa druge strane, leukotoksin vrši ubijanje monocita, neutrofila i T-ćelija (83, 184). Pored invazije mekih tkiva potpornog aparata zuba, *A. actinomycetemcomitans* je odgovoran i za razgradnju alveolarne kosti uglavnom preko aktiviranja matriksnih metaloproteinaza i preko negativnog uticaja na osteogenezu (185, 186).

E. corrodens je fakultativno anaerobni mikroorganizam koji se smatra uobičajenim parodontalnim patogenom. Prevalenca *E. corrodens*-a se povećavala sa godinama sve do šeste dekade života kada je došlo do strmog pada u zastupljenosti ovog mikroorganizma u obe ispitivane grupe. Slična pojava je uočena i kod *A. actinomycetemcomitans* (ova dva mikroorganizma pripadaju takozvanoj HACEK grupi). Mikroelementi kao što je gvožđe su esencijalni za opstanak *E. corrodens*-a na oralnoj mukozu. Prethodna studija je analizirala 15 različitih medijuma za kultivisanje ove bakterije pod tri različita atmosferska uslova i saopšteno je da je aerobni rast bio moguć samo kada su u medijum dodati gvožđe ili hem (84). Ovaj nalaz je potvrdio značaj gvožđa za bakterijski rast. Brzi pad u zastupljenosti ove bakterije kod osoba starijih od 60 godina javio se najverovatnije zbog manjka gvožđa u ćelijama domaćina i slabijih mehanizama za njegovo sakupljanje u odnosu na druge oralne bakterije. *E. corrodens* je gram negativan anaerob koji se često detektuje kod uznapredovalih formi parodontalne bolesti (187). Važan faktor virulencije ovog mikroorganizma predstavlja N-acetil-D-galaktozamin specifični lektin kojim se *E. corrodens* vezuje za površinu ćelija domaćina ali i udružuje sa drugim mikroorganizmima biofilma (188, 189). Dokazano je i da se ovaj faktor virulencije može različito eksprimirati što utiče na

sposobnost adhezije ovog mikroorganizma na epitelne ćelije ali i na mogućnost invadiranja ovih ćelija (190). Dodatno, dokazano je i da N-acetil-D-galaktozamin specifični lektin učestvuje i u agregaciji eritrocita i u njihovoj hemolizi (190). Lizom eritrocita oslobađa se gvožđe koje je važno za rast i preživljavanje ovih patogenih bakterija (191).

Treponema denticola sa druge strane pokušava da prevaziđe zavisnost od gvožđa uključujući u svoj metabolizam i druge jone kao što je mangan (88). Iako ovaj mikroelement nije baš lako dostupan bakterijama njegovo nakupljanje u ćelijama tokom života predstavlja izvor jona koji može da zameni gvožđe (192). Veća zastupljenost *T. denticola*-e kod starijih neinficiranih u poređenju sa starijim HIV-om inficiranim pacijentima je verovatno posledica preuzimanja gvožđa od strane drugih bakterija ali i od samog HIV-a, ostavljajući male količine gvožđa dostupnim. Dodatno, sa poremećajima metabolizma gvožđa karakterističnim za HIV-infekciju, paralelno ide i promena u homeostazi mangana jer ova dva dvovalentna metala imaju slične metaboličke puteve (193, 194). Kompeticija za iste transportere stavlja ova dva jon na "klackalicu", gde akumulaciju gvožđa prati manjak mangana i obrnuto (194). *T. denticola* poseduje brojne faktore virulencije kojim može oštetiti integritet parodontalnih tkiva. U njih se ubrajaju metabolički produkt, vodonik sulfid, koji je toksičan i za fibroblaste i za epitelne ćelije; toksin-antitoksin (TA) sistem koji je važan u organizaciji biofilma i ima ulogu u programiranoj ćelijskoj smrti; transpozaze odgovorne za genetičku varijabilnost *T. denticola*-e; dentilizin koji vrši proteolizu ekstracelularnog matriksa, komponenti signalnih puteva ćelije domaćina i omogućava prodor u ciljnu ćeliju; proteaza slična tripsinu čija je uloga nedovoljno razjašnjena; i vezikule koje kao snažan faktor virulencije lakše od samih bakterija invadiraju dublja tkiva (195-198). Ovi faktori virulencije mogu da podstaknu snažan imuni odgovor (TNF- α , Il-1 β , Il-6, Il-10) i dovedu do izražene koštane resorpcije, međutim pokazano je da *T. denticola* poseduje i mehanizme kojima vrši supresiju i izbegavanje imunog odgovora (199, 200). Tako je pokazano da je *T. denticola* otporna na odbrambene molekule epitelnih ćelija, defenzine, kao i na fagocitozu od strane neutrofila (201, 202). Ovaj mikroorganizam vrši snažnu supresiju delovanja Il-8, degradacijom od strane dentilizina ali i blokadom genske ekspresije i tako obezbeđuje bezbednu nišu za susedne mikroorganizme (203). Još jedan od mehanizama kojim *T. denticola* izbegava imuni

odgovor je internalizacija, odnosno ulazak bakterije u epitelnu ćeliju gde može bezbedno opstati i umnožavati se stvarajući na taj način rezervoar za buduće infekcije (204).

Iako se *T. forsythia* povezuje sa uznapredovalim formama parodontalne bolesti još uvek nisu detaljno proučeni faktori virulencije kojim ovaj mikroorganizam dovodi do oštećenja potpornog aparata zuba (205). Najviše izučavana komponenta ovog parodontopatogena je spoljašnji membranski protein (engl. *outer membrane protein*) koji ima ulogu u vezivanju za proteine ekstracelularnog matriksa, adheriranju na epitelne ćelije i agregiranju *T. forsythia*-e sa jednim od prvih kolonizatora subgingivalnog prostora, *Fusobacterium nucleatum*-om (89, 206). Dalje, dokazano je da ovaj protein izaziva intenzivnu resorpciju alveolarne kosti na eksperimentalnom modelu (207). *T. forsythia* kao asaharolitički patogen, kao što je to slučaj i sa *P. gingivalis*-om, obezbeđuje metaboličke potrebe (slobodne aminokiseline, peptide i hem) delovanjem svojih proteolitičkih enzima (89). Benefit koji ova bakterija obezbeđuje drugim parodontopatogenima, a prvenstveno *P. gingivalis*-u i *T. denticola*-i se ogleda u ispuštanju metabolita koji se koriste za sintezu njihovog ćelijskog zida (89). Mehanizam kojim se *T. forsythia* bori protiv imunog odgovora domaćina najverovatnije uključuje delovanje dipeptidilpeptidaze koja sprečava akumulaciju zapaljenskih ćelija (205). Prisustvo *T. denticola*-e u sastavu biofilma izgleda da veoma zavisi od drugih članica „crvenog kompleksa“, *P. gingivalis*-a i *T. forsythia*-e (85). Više autora je pokazalo da je prisustvo *T. forsythia*-e bilo uslov za kolonizaciju subgingivalnog prostora i ostalih članica kompleksa (208, 209). Glavni faktor virulencije *T. forsythia*-e, su proteaze koje razlažu transportere gvožđa i obezbeđuju gvožđe i aminokiseline neophodne za bakterijski rast (89). Sa druge strane, adhezija ovog mikroorganizma za oralni epitel se može menjati modifikovanjem sastava površinskog sloja bakterije (89). Ovi faktori virulencije kao i dostupnost mikroelemenata dovode do najveće zastupljenosti *T. forsythia*-e kod pacijenata starih oko 60 godina. Nagli pad u prevalenci ove bakterije nakon šezdesete godine objašnjava se malnutricijom, hroničnim bolestima i delovanjem lekova na depoe gvožđa u organizmu (210-212).

Mikrobijalna raznovrsnost u usnoj duplji kod HIV-om inficiranih pacijenata je u velikoj meri uslovljena poremećajima u funkcionisanju imunog sistema, redukovanoj ili

povećanoj dostupnosti određenih mikroelemenata i međuzavisnosti bakterijskih faktora virulencije i epitela usne duplje koji se konstantno menja. Ove interakcije se često vide i u starijoj neinficiranoj populaciji kopirane kroz imunosenescencu, akumulaciju ili gubitak važnih metalnih jona i dobno zavisnim promenama oralne mukoze.

Iako je životni vek HIV-om inficiranih osoba značajno produžen u HAART eri, ovi pacijenti su pod većim rizikom od morbiditeta i mortaliteta u odnosu na opštu populaciju, a i primena kombinovane antiretrovirusne terapije dovodi do različitih poremećaja u usnoj duplji. Tako, veći stepen oralnih ulceracija, lokalnih hiperplazija epitela, oboljenja pljuvačnih žlezda i kserostomija može uticati na sastav oralnog mikrobioma (213, 214). Naša studija je pokazala da je oštećenje parodontalnog tkiva češće prisutno kod starijih HIV-om inficiranih pacijenata u odnosu na neinficirane ispitanike iste starosne grupe. Parodontalni status mlađih pacijenata, i HIV-om inficiranih i neinficiranih, bio je sličan sa izuzetkom parametra dubina parodontalnog džepa. HIV asocirani gingivitis i parodontitis bili su češći kod pacijenata starijih od 50 godina. Jedino linearni gingivalni eritem, kao rani znak oštećenja parodonticijuma, je bio češći u mlađoj grupi. Zastupljenost oralnih manifestacija HIV infekcije je u skladu sa literaturnim podacima (96, 215).

Starenje parodontalnih tkiva karakterišu brojne morfološke i funkcionalne promene koje se mogu pratiti i na kliničkom i na histološkom nivou. Starenjem dolazi atrofije epitela gingive, on postaje tanji i glatkiji, vezivno tkivo gubi elasticitet, a ishrana i senzitivnost tkiva se smanjuju (216). Histološke promene epitela se odlikuju poremećenom keratinizacijom, dok se u vezivnom tkivu odnos ćelija i međućelijske supstance menja na štetu ćelija (217). Andreescu i saradnici poredeći histološku sliku isečaka gingive mlađih i starijih ispitanika opisuju dobno zavisno uvećanje ćelija spinocelularnog sloja (akantozu) i prisustvo jedara u ćelijama površinskog sloja epitela gingive (parakeratozu), sa prisutnom vakuolizacijom i drugim distrofičnim promenama u citoplazmama ovih ćelija (10). Ove promene objašnjavaju adaptacijom tkiva na mikrotraume i nutritivnim deficitom gvožđa i vitamina B12. U vezivnom tkivu se, pored karakteristične promene odnosa ćelija i međućelijske supstance, uočava i veliki broj zapaljenskih infiltrata raspoređenih difuzno, nodularno ili perivaskularno (10). Gingiva vremenom gubi i svoje reparatorne i odbrambene kapacitete što je ukupno čini

ranjivijom na spoljašnje mehaničke, biološke i hemijske uticaje. Kliničke promene su posledica gubitka mekog i potpornog vezivnog tkiva što vremenom dovodi do pomeranja (recesije) gingive u apikalnom smeru, a dodatno dolazi i do popuštanja najosetljivijeg dela parodontijuma, pripojnog epitela, i formiranja parodontalnog džepa. Neki autori smatraju da je recesija gingive i spuštanje nivoa pripojnog epitela posledica kumulativnog oštećenja ovog tkiva tokom vremena, a ne samog starenja (218). Periodoncijum zuba starijih osoba se karakteriše smanjenim brojem vlakana međucelijske supstance i gubitkom pravilnosti njihovog rasporeda (217). O promenama broja ćelija u periodontalnom prostoru se i dalje polemše, ali je definitivno utvrđeno da njihov potencijal za proliferaciju, diferencijaciju i migraciju sa godinama slabi (219, 220). Cement korena zuba vremenom zadebljava i smanjuje širinu periodontalnog prostora što je nešto izraženije zastupljeno u apikalnim delovima korena zuba. Stvaranjem novih slojeva cementa periodontalna vlakna se ugrađuju u koren zuba, a formativne ćelije cementa postaju zarobljene i brzo odumiru zbog neadekvatnog dopremanja nutritivnih materija i eliminacije štetnih produkata metabolizma (217). Na ovaj način nastaje acelularni cement koji se dalje može remodelovati resorptivnim i apozicionim procesima (221). Celularni cement se zadržava u apeksu i furkaciji višekorenih zuba. Alveolarna kost koja čini najstabilniji deo potpornog aparata zuba takođe pokazuje dobnno zavisne promene. Održavanje integriteta koštanog tkiva zavisi od balansa aktivnosti osteoblasta i osteoklasta, a dokazano je da se njihova funkcija menja tokom starenja (217, 221). Dodatno, na funkcije ovih ćelija deluju brojni hormoni i lokalni faktori koji takođe pokazuju dinamične promene idući od mlađeg ka starijem životnom dobu (23). Aktivnosti osteoblasta kod starijih osoba su značajno redukovane usled smanjenog broja i funkcije ovih ćelija. Osteoblasti vremenom gube proliferativni i formativni potencijal (222, 223). Sa druge strane, osteoklasna aktivnost se sa godinama povećava i premašuje antagonističku delatnost osteoblasta čime dolazi do gubitka koštane mase, kako kompaktne tako i spongiozne kosti, smanjenja gustine kosti i povećane poroznosti koštanog tkiva (18, 224). Starenjem dolazi do resorpcije alveolarne kosti u apikalnom smeru što postepeno dovodi do gubitka potpore zuba (225).

Promene u parodontalnim tkivima koje nastaju tokom starenja organizma ispitivane su i na molekularnom nivou. Takahashi i saradnici su određivali dužine telomera u kulturama fibroblasta dobijenih iz gingive pacijenata sa agresivnim

parodontitisom, kao i iz gingive zdravih ispitanika (226). Agresivni parodontitis je oboljenje koje bi moglo poslužiti kao model ubrzanog starenja parodontalnih tkiva, a koje se karakteriše brзом destrukcijom parodontalnih tkiva, ranim gubitkom zuba i odsustvom drugih sistemskih oboljenja. Pretpostavka Takahashija i saradnika je bila da će kod agresivnog parodontitisa, uočiti veći stepen skraćivanja telomera u odnosu na zdrave ispitanike. Primetno je bilo da su u svakoj dobnoj grupi pacijenti sa agresivnim parodontitisom imali kraće telomere u odnosu na zdrave ispitanike (226). Rezultati Thomsona i saradnika, sa druge strane, nisu ukazali na vezu između skraćivanja telomera i gubitka potpornog aparata zuba. Nakon 12-ogodišnjeg perioda uočeno je skraćenje relativne dužine telomera ispitanika za 0,15 dok se nivo pripojnog epitela povećao za 10 procenata (227). Sanders i saradnici su u periodu od 6 godina pratili promenu dužine telomera kod pacijenata sa parodontalnom bolešću kao i kod zdravih pacijenata starijih od 50 godina. Razliku u dužini telomera pronašli su na početku, ali i na kraju studije, gde su u oba vremena, pacijenti sa oboljenjem parodonticijuma imali značajno kraće telomere u odnosu na zdrave kontrole. Step en skraćivanja telomera je bio isti u obe ispitivane grupe pa autori kao zaključak iznose da je razlika u dužini telomera nastala u ranijoj životnoj dobi ili da su osobe sa kraćim telomerama sklonije razvoju parodontalne bolesti (228).

Imuni sistem usne duplje održava balans sa velikim brojem mikroorganizama koji prekrivaju oralnu mukozu. Starenje imunog sistema (imunosenescencija) ima odraz na kvantitativni i kvalitativni sastav oralne flore. Čelije prirodnog imuniteta koje se nalaze u oralnoj mukozu prepoznaju markere patogena preko odgovarajućih receptora i predstavljaju ih dalje imunom sistemu. Često je u prepoznavanju mikroba potrebno aktiviranje više različitih receptora koji u sadejstvu dovode do odgovarajućeg antimikrobnog i inflamatornog odgovora (229). Kombinovanje više receptora u imunom odgovoru doprinosi raznovrsnosti i širini odbrane organizma. Ekspresija i funkcionalnost ovih receptora se menja tokom procesa starenja, kako kod ćelija oralne mukoze tako i kod odbrambenih ćelija imunog sistema (230, 231). Posledična redukcija prepoznavanja mikroorganizama od strane ćelija prve linije odbrane oralne sluznice pruža mikroorganizmima priliku da uspostave novu ravnotežu sa imunim snagama, često na štetu domaćina. Promena oralne flore od nepatogenih ka patogenim

mikroorganizmima inicira, a zatim i održava kliničke znake oštećenja parodontalnih tkiva.

Pored redukovanog prepoznavanja mikroorganizama, rearanžman u sastavu mikroflore koja naseljava oralni epitel se objašnjava i drugim dobno zavisnim promenama urođenog imuniteta. Starenje ćelija nespecifične imunosti, makrofaga i neutrofilnih granulocita, se karakteriše i poremećajem hemotakse, fagocitoze i reakcije na određene citokine što sve uslovljava neadekvatan odbrambeni odgovor (232, 233). Smanjena proizvodnja reaktivnih kiseoničkih produkata kod starijih ćelija nespecifičnog imuniteta uslovljava neadekvatnu fagocitozu patogenih mikroorganizama (234). Ovo se može objasniti izmenama u lipidnom sastavu ćelijskih membrana koje uslovljavaju njenu nestabilnost i bržu i prekomernu apoptozu ćelija nespecifične imunosti nakon kontakta sa patogenom (234). Citotoksična aktivnost ćelija prirodnih ubica (engl. *natural killer, NK*) takođe opada sa godinama, usled smanjenog broja i redukovane sekrecije citokina, što starije osobe čini podložnijim infekcijama i neoplastičnim promenama (235). Promene u stečenom imunom odgovoru izazvane starenjem se karakterišu smanjenjem broja naivnih T-limfocita i uvećanjem populacije citotoksičnih CD8 limfocita. Međutim, citotoksični limfociti postepeno prolaze kroz različite fenotipske forme sa redukovanim odbrambenim kapacitetima sve do pojave „iscrpljenih“ T-limfocita (236). Takođe zapažen je i redukovani odbrambeni repertoar kada je u pitanju humoralna specifična imunost starijih osoba. Pored fenotipskih promena koje se ogledaju u ekspresiji različitih ćelijskih markera i proizvodnja antitela je kvantitativno i kvalitativno izmenjena (237). Jedan od razloga za to je i neadekvatna komunikacija sa T-limfocitima koja se ogleda u tome što za aktivaciju B-limfocita nije više potreban signal koji donose T-ćelije (238). Kao i u slučaju T-limfocita, vremenom se uvećava populacija „iscrpljenih“ B-limfocita što predstavlja „slabu kariku“ odbrambenog sistema (239, 240). Precizno orkestrirana intercelularna komunikacija imunog sistema se takođe remeti tokom starenja. Zapažena je povećana ekspresija interleukina-1 (Il-1) u gingivi starijih osoba u odnosu na mlađe pacijente (241). Takođe, statistički značajno veća ekspresija Il-1 uočena je i u kulturi ćelija periodontalnog ligamenta dobijenih iz tkiva starijih osoba u odnosu na ćelije čiji su donori bili mlađi ispitanici (241). Grupa austrijskih i holandskih istraživača ispitivala je uticaj hronološkog doba pacijenta na inflamatorni odgovor kulture fibroblasta. Pokazali su da

u prisustvu lipopolisaharida fibroblasti starijih donora daju statistički značajno veću ekspresiju Il-8 u odnosu na fibroblaste dobijene od mlađih ispitanika (242). Ovi nalazi se slažu sa istraživanjima koja ukazuju na porast nivoa serumskih Il-1 i Il-8 uporedo sa starenjem pacijenata i progresijom parodontalne bolesti (243). Povećanje koncentracije ovih citokina verovatno nastaje zbog pojačanog imunog odgovora kod starijih osoba ili zbog duže izloženosti parodontalnim patogenima.

Mnogi autori ističu značaj oralne higijene u održavanju oralnog zdravlja i držanju oralnih mikroorganizama „pod kontrolom“. Zubi, dorzum jezika, mukoza, subgingivalni prostor i saliva predstavljaju značajan rezervoar bakterija u ustima. Nažalost, loša oralna higijena je čest klinički nalaz kod HIV-om inficiranih pacijenata i udružena je sa godištem, polom, socioekonomskim statusom, stepenom obrazovanja itd. Uprkos velikoj potrebi za adekvatnom oralnom negom ovim pacijentima je često uskraćen stomatološki tretman zbog stigme koja je još uvek prisutna u mnogim društvima, stavljajući ih pod veći rizik za razvoj oralnih oboljenja. Dodatno, stanja koja prate HIV-infekciju kao što su lipodistrofija, mučnina, povraćanje, dijareja, gubitak apetita i problemi sa žvakanjem i gutanjem često zahtevaju promene u tipu ishrane i navikama u ishrani koje mogu uticati na rearanžman oralne flore.

Postoje brojni dokazi koji povezuju parodontalne patogene sa ozbiljnim sistemskim oboljenjima i stanjima kao što su koronarna bolest, ateroskleroza, prevremeni porođaj, infekcije centralnog nervnog sistema i drugo (60, 61, 244). Kombinovana antiretrovirusna terapija je transformisala HIV-infekciju iz letalne u hroničnu bolest pa se u narednim decenijama očekuje značajan porast starijih HIV-om inficiranih pacijenata. Promene u sastavu oralne flore i poremećeni imuni sistem predstavlja dodatni izazov u održavanju oralnog i opšteg zdravlja kod ovih pacijenata. Mogućnost delovanja na sastav oralne flore, „mikrobijalni inženjering“, mogao bi da dovede do uspostavljanja normalnog funkcionisanja imunog sistema na nivou usne duplje.

Izmene u imunom sistemu domaćina, dostupnost mikroelemenata i disfunkcije oralnih tkiva koje se javljaju kod osoba sa HIV-infekcijom olakšavaju adheziju, agregaciju i invaziju patogenih mikroorganizama što može da dovede do aktiviranja i pogoršavanja osnovne bolesti i razvoja drugih sistemskih oboljenja. Dalje studije su

potrebne kako bi se razumela kompletna dinamika oralnog mikrobioma i postavili novi terapijski pristupi.

6. ZAKLJUČCI

Na osnovu rezultata ove doktorske disertacije izvedeni su sledeći zaključci:

- 1) Relativna dužina telomera kod pacijenata sa HIV-infekcijom je veća od relativne dužine telomera neinficiranih pacijenata što se može dovesti u vezu sa uvećanjem aktivnosti humane telomeraze pod dejstvom virusa.
- 2) U grupi HIV-om inficiranih pacijenata najveće dužine telomera su imali pacijenti koji nisu primali antiretrovirusnu terapiju što ukazuje na negativan uticaj ove terapije na dužinu telomera.
- 3) Vrednosti parametara metabolizma gvožđa: serumsko gvožđe, ukupni kapacitet za vezivanje gvožđa, saturacija transferina su bili niži kod starijih ispitanika u obe ispitivane grupe. Koncentracija transferina je takođe bila niža kod starijih ispitanika u HIV-neinficiranoj grupi ispitanika, dok je koncentracija feritina, obrnuto, bila viša kod starijih osoba u obe ispitivane grupe što govori o nakupljanju ovog elementa u organizmu tokom starenja.
- 4) Starenjem dolazi do uvećanja ukupnog broja parodontopatogena u usnoj duplji i do promene u njihovoj distribuciji kod svih ispitanika.
- 5) Do uvećanja ukupnog broja parodontopatogena i izmene njihovog kvalitativnog sastava dolazi i kod HIV pozitivnih osoba ali se u ovoj grupi promene javljaju u ranijoj životnoj dobi
- 6) Oralne manifestacije HIV-infekcije su češće kod starijih HIV-om inficiranih pacijenata što ukazuje na slabljenje odbrambenih snaga organizma tokom starenja.
- 7) Kada se uporede zdravi i HIV pozitivni ispitanici, promene parodontoloških parametara u vremenu su bile izraženije kod HIV pozitivnih osoba što govori o većoj destrukciji parodontalnih tkiva kod ovih osoba u toku starenja.

7. LITERATURA

1. Harman D. The aging process. *Basic Life Sci.* 1988;49:1057-65.
2. Boss GR, Seegmiller JE. Age-related physiological changes and their clinical significance. *West J Med.* 1981;135(6):434-40.
3. Beason-Held LL, Hohman TJ, Venkatraman V, An Y, Resnick SM. Brain network changes and memory decline in aging. *Brain Imaging Behav.* 2017;11(3):859-73.
4. Castelo-Branco C, Soveral I. The immune system and aging: a review. *Gynecol Endocrinol.* 2014;30(1):16-22.
5. Tower J. Programmed cell death in aging. *Ageing Res Rev.* 2015;23(Pt A):90-100.
6. López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. The hallmarks of aging. *Cell.* 2013;153(6):1194-217.
7. Khan SS, Singer BD, Vaughan DE. Molecular and physiological manifestations and measurement of aging in humans. *Aging Cell.* 2017;16(4):624-33.
8. Labat-Robert J, Robert L. Aging of connective tissues: experimental facts and theoretical considerations. *Interdiscip Top Gerontol.* 2014;39:108-41.
9. Abu Eid R, Sawair F, Landini G, Saku T. Age and the architecture of oral mucosa. *Age (Dordr).* 2012;34(3):651-8.
10. Andreescu CF, Mihai LL, Răescu M, Tuculină MJ, Cumpăță CN, Ghergic DL. Age influence on periodontal tissues: a histological study. *Rom J Morphol Embryol.* 2013;54(3 Suppl):811-5.
11. Martelli S, Pender SL, Larbi A. Compartmentalization of immunosenescence: a deeper look at the mucosa. *Biogerontology.* 2016;17(1):159-76.
12. Nam Y, Kim NH, Kho HS. Geriatric oral and maxillofacial dysfunctions in the context of geriatric syndrome. *Oral Dis.* 2018;24(3):317-24.
13. Touré G, Duboucher C, Vacher C. Anatomical modifications of the temporomandibular joint during ageing. *Surg Radiol Anat.* 2005;27(1):51-5.
14. Hassel AJ, Johanning M, Grill S, Schröder J, Wahl HW, Corcodel N, et al. Changes of tooth color in middle and old age: A longitudinal study over a decade. *J Esthet Restor Dent.* 2017;29(6):459-63.
15. Carvalho TS, Lussi A. Age-related morphological, histological and functional changes in teeth. *J Oral Rehabil.* 2017;44(4):291-8.

16. Kim YK, Kho HS, Lee KH. Age estimation by occlusal tooth wear. *J Forensic Sci.* 2000;45(2):303-9.
17. Severson JA, Moffett BC, Kokich V, Selipsky H. A histologic study of age changes in the adult human periodontal joint (ligament). *J Periodontol.* 1978;49(4):189-200.
18. Khosla S, Riggs BL. Pathophysiology of age-related bone loss and osteoporosis. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2005;34(4):1015-30, xi.
19. Hayflick L, Moorhead PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res.* 1961;25:585-621.
20. Hayflick L. Intracellular determinants of cell aging. *Mech Ageing Dev.* 1984;28(2-3):177-85.
21. Liu D, Xu Y. p53, oxidative stress, and aging. *Antioxid Redox Signal.* 2011;15(6):1669-78.
22. Barja G. Mitochondrial oxygen consumption and reactive oxygen species production are independently modulated: implications for aging studies. *Rejuvenation Res.* 2007;10(2):215-24.
23. Curtis E, Litwic A, Cooper C, Dennison E. Determinants of Muscle and Bone Aging. *J Cell Physiol.* 2015;230(11):2618-25.
24. Sebastiani P, Thyagarajan B, Sun F, Honig LS, Schupf N, Cosentino S, et al. Age and Sex Distributions of Age-Related Biomarker Values in Healthy Older Adults from the Long Life Family Study. *J Am Geriatr Soc.* 2016;64(11):e189-e94.
25. Bezerra SFdO, Costa LdA, Freitas PANd, Oliveira NFPd. Age-related Changes in DNA Methylation Status of hTERT Gene Promoter of Oral Epithelial Cells. *Braz arch biol technol.* 2015;58(1):82-9.
26. Son NH, Murray S, Yanovski J, Hodes RJ, Weng N. Lineage-specific telomere shortening and unaltered capacity for telomerase expression in human T and B lymphocytes with age. *J Immunol.* 2000;165(3):1191-6.
27. Greider CW, Blackburn EH. A telomeric sequence in the RNA of Tetrahymena telomerase required for telomere repeat synthesis. *Nature.* 1989;337(6205):331-7.
28. Hahn WC, Meyerson M. Telomerase activation, cellular immortalization and cancer. *Ann Med.* 2001;33(2):123-9.
29. Zee RY, Castonguay AJ, Barton NS, Germer S, Martin M. Mean leukocyte telomere length shortening and type 2 diabetes mellitus: a case-control study. *Transl Res.* 2010;155(4):166-9.

30. Samani NJ, Boulby R, Butler R, Thompson JR, Goodall AH. Telomere shortening in atherosclerosis. *Lancet*. 2001;358(9280):472-3.
31. Zhan Y, Song C, Karlsson R, Tillander A, Reynolds CA, Pedersen NL, et al. Telomere Length Shortening and Alzheimer Disease--A Mendelian Randomization Study. *JAMA Neurol*. 2015;72(10):1202-3.
32. Steffens JP, Masi S, D'Aiuto F, Spolidorio LC. Telomere length and its relationship with chronic diseases - New perspectives for periodontal research. *Arch Oral Biol*. 2012.
33. Luck AN, Mason AB. Structure and dynamics of drug carriers and their interaction with cellular receptors: focus on serum transferrin. *Adv Drug Deliv Rev*. 2013;65(8):1012-9.
34. Casale G, Bonora C, Migliavacca A, Zurita IE, de Nicola P. Serum ferritin and ageing. *Age Ageing*. 1981;10(2):119-22.
35. Williams J, Moreton K. The distribution of iron between the metal-binding sites of transferrin human serum. *Biochem J*. 1980;185(2):483-8.
36. Ajioka RS, Kaplan J. Intracellular pools of transferrin receptors result from constitutive internalization of unoccupied receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986;83(17):6445-9.
37. Dautry-Varsat A, Ciechanover A, Lodish HF. pH and the recycling of transferrin during receptor-mediated endocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1983;80(8):2258-62.
38. Kasvosve I, Delanghe J. Total iron binding capacity and transferrin concentration in the assessment of iron status. *Clin Chem Lab Med*. 2002;40(10):1014-8.
39. Andrews SC, Arosio P, Bottke W, Briat JF, von Darl M, Harrison PM, et al. Structure, function, and evolution of ferritins. *J Inorg Biochem*. 1992;47(3-4):161-74.
40. Harrison PM, Arosio P. The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation. *Biochim Biophys Acta*. 1996;1275(3):161-203.
41. Wesselius LJ, Nelson ME, Skikne BS. Increased release of ferritin and iron by iron-loaded alveolar macrophages in cigarette smokers. *Am J Respir Crit Care Med*. 1994;150(3):690-5.
42. Worwood M. Ferritin in human tissues and serum. *Clin Haematol*. 1982;11(2):275-307.
43. Wiedemann G, Jonetz-Mentzel L. Establishment of reference ranges for ferritin in neonates, infants, children and adolescents. *Eur J Clin Chem Clin Biochem*. 1993;31(7):453-7.

44. Moss D, Fargion S, Fracanzani AL, Levi S, Cappellini MD, Arosio P, et al. Functional roles of the ferritin receptors of human liver, hepatoma, lymphoid and erythroid cells. *J Inorg Biochem.* 1992;47(3-4):219-27.
45. Jacobs A, Miller F, Worwood M, Beamish MR, Wardrop CA. Ferritin in the serum of normal subjects and patients with iron deficiency and iron overload. *Br Med J.* 1972;4(5834):206-8.
46. Halliday JW, Mack U, Powell LW. Duodenal ferritin content and structure: relationship with body iron stores in man. *Arch Intern Med.* 1978;138(7):1109-13.
47. Worwood M. Ferritin. *Blood Rev.* 1990;4(4):259-69.
48. Theron JJ, Mekel RC. Ultrastructural localization of iron in the human jejunum in iron overload (Bantu siderosis). *Br J Haematol.* 1971;21(2):165-71.
49. Aas JA, Paster BJ, Stokes LN, Olsen I, Dewhirst FE. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J Clin Microbiol.* 2005;43(11):5721-32.
50. Ribet D, Cossart P. How bacterial pathogens colonize their hosts and invade deeper tissues. *Microbes Infect.* 2015;17(3):173-83.
51. Ruby J, Barbeau J. The buccale puzzle: The symbiotic nature of endogenous infections of the oral cavity. *Can J Infect Dis.* 2002;13(1):34-41.
52. Zapata HJ, Quagliarello VJ. The microbiota and microbiome in aging: potential implications in health and age-related diseases. *J Am Geriatr Soc.* 2015;63(4):776-81.
53. Carrouel F, Viennot S, Santamaria J, Veber P, Bourgeois D. Quantitative Molecular Detection of 19 Major Pathogens in the Interdental Biofilm of Periodontally Healthy Young Adults. *Front Microbiol.* 2016;7:840.
54. Könönen E. Development of oral bacterial flora in young children. *Ann Med.* 2000;32(2):107-12.
55. Simón-Soro A, Tomás I, Cabrera-Rubio R, Catalan MD, Nyvad B, Mira A. Microbial geography of the oral cavity. *J Dent Res.* 2013;92(7):616-21.
56. Andjelkovic M, Sojic LT, Lemic AM, Nikolic N, Kannosh IY, Milasin J. Does the Prevalence of Periodontal Pathogens Change in Elderly Edentulous Patients after Complete Denture Treatment? *J Prosthodont.* 2015.
57. Bartold PM, Van Dyke TE. Periodontitis: a host-mediated disruption of microbial homeostasis. *Unlearning learned concepts. Periodontol 2000.* 2013;62(1):203-17.
58. Belkaid Y, Hand TW. Role of the microbiota in immunity and inflammation. *Cell.* 2014;157(1):121-41.

59. Pucar A, Milasin J, Lekovic V, Vukadinovic M, Ristic M, Putnik S, et al. Correlation between atherosclerosis and periodontal putative pathogenic bacterial infections in coronary and internal mammary arteries. *J Periodontol*. 2007;78(4):677-82.
60. Suzuki J, Koizumi T, Hirai K, Honda T, Kubo K, Kobayashi T, et al. A fatal case of acute mediastinitis caused by periodontal infection. *Nihon Kyobu Shikkan Gakkai Zasshi*. 1992;30(10):1847-51.
61. Li X, Kolltveit KM, Tronstad L, Olsen I. Systemic diseases caused by oral infection. *Clin Microbiol Rev*. 2000;13(4):547-58.
62. Guan SM, Shu L, Fu SM, Liu B, Xu XL, Wu JZ. *Prevotella intermedia* induces matrix metalloproteinase-9 expression in human periodontal ligament cells. *FEMS Microbiol Lett*. 2008;283(1):47-53.
63. Dorn BR, Leung KL, Progulske-Fox A. Invasion of human oral epithelial cells by *Prevotella intermedia*. *Infect Immun*. 1998;66(12):6054-7.
64. Gursoy UK, Könönen E, Uitto VJ. *Prevotella intermedia* ATCC 25611 targets host cell lamellipodia in epithelial cell adhesion and invasion. *Oral Microbiol Immunol*. 2009;24(4):304-9.
65. Haffajee AD, Socransky SS. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontol 2000*. 1994;5:78-111.
66. Andrianakaja O, Trevisan M, Falkner K, Dorn J, Hovey K, Sarikonda S, et al. Association between periodontal pathogens and risk of nonfatal myocardial infarction. *Community Dent Oral Epidemiol*. 2011;39(2):177-85.
67. Hyvärinen K, Mäntylä P, Buhlin K, Paju S, Nieminen MS, Sinisalo J, et al. A common periodontal pathogen has an adverse association with both acute and stable coronary artery disease. *Atherosclerosis*. 2012;223(2):478-84.
68. Rams TE, Feik D, Listgarten MA, Slots J. *Peptostreptococcus micros* in human periodontitis. *Oral Microbiol Immunol*. 1992;7(1):1-6.
69. Kremer BH, van Steenberghe TJ. *Peptostreptococcus micros* coaggregates with *Fusobacterium nucleatum* and non-encapsulated *Porphyromonas gingivalis*. *FEMS Microbiol Lett*. 2000;182(1):57-62.
70. How KY, Song KP, Chan KG. *Porphyromonas gingivalis*: An Overview of Periodontopathic Pathogen below the Gum Line. *Front Microbiol*. 2016;7:53.
71. Brunner J, Scheres N, El Idrissi NB, Deng DM, Laine ML, van Winkelhoff AJ, et al. The capsule of *Porphyromonas gingivalis* reduces the immune response of human gingival fibroblasts. *BMC Microbiol*. 2010;10:5.

72. Singh A, Wyant T, Anaya-Bergman C, Aduse-Opoku J, Brunner J, Laine ML, et al. The capsule of *Porphyromonas gingivalis* leads to a reduction in the host inflammatory response, evasion of phagocytosis, and increase in virulence. *Infect Immun*. 2011;79(11):4533-42.
73. Irshad M, van der Reijden WA, Crielaard W, Laine ML. In vitro invasion and survival of *Porphyromonas gingivalis* in gingival fibroblasts; role of the capsule. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2012;60(6):469-76.
74. Kato H, Taguchi Y, Tominaga K, Umeda M, Tanaka A. *Porphyromonas gingivalis* LPS inhibits osteoblastic differentiation and promotes pro-inflammatory cytokine production in human periodontal ligament stem cells. *Arch Oral Biol*. 2014;59(2):167-75.
75. Andrian E, Grenier D, Rouabhia M. In vitro models of tissue penetration and destruction by *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun*. 2004;72(8):4689-98.
76. Grenier D, Goulet V, Mayrand D. The capacity of *Porphyromonas gingivalis* to multiply under iron-limiting conditions correlates with its pathogenicity in an animal model. *J Dent Res*. 2001;80(7):1678-82.
77. Stepanović S, Tosić T, Savić B, Jovanović M, K'ouas G, Carlier JP. Brain abscess due to *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *APMIS*. 2005;113(3):225-8.
78. Wang CY, Wang HC, Li JM, Wang JY, Yang KC, Ho YK, et al. Invasive infections of *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans*. *J Microbiol Immunol Infect*. 2010;43(6):491-7.
79. Sharma K, Mudgil P, Whitehall JS, Gosbell I. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* osteomyelitis in a 12 year old boy: case report emphasizing the importance of tissue culture, and review of literature. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2017;16(1):12.
80. Fives-Taylor PM, Meyer DH, Mintz KP, Brissette C. Virulence factors of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Periodontol 2000*. 1999;20:136-67.
81. Tancharoen S, Matsuyama T, Kawahara K, Tanaka K, Lee LJ, Machigashira M, et al. Cleavage of host cytokeratin-6 by lysine-specific gingipain induces gingival inflammation in periodontitis patients. *PLoS One*. 2015;10(2):e0117775.
82. Taichman NS, Dean RT, Sanderson CJ. Biochemical and morphological characterization of the killing of human monocytes by a leukotoxin derived from *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect Immun*. 1980;28(1):258-68.
83. Mangan DF, Taichman NS, Lally ET, Wahl SM. Lethal effects of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin on human T lymphocytes. *Infect Immun*. 1991;59(9):3267-72.

84. Goldstein EJ, Agyare EO, Silletti R. Comparative growth of *Eikenella corrodens* on 15 media in three atmospheres of incubation. *J Clin Microbiol.* 1981;13(5):951-3.
85. Sela MN. Role of *Treponema denticola* in periodontal diseases. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2001;12(5):399-413.
86. Dashper SG, Seers CA, Tan KH, Reynolds EC. Virulence factors of the oral spirochete *Treponema denticola*. *J Dent Res.* 2011;90(6):691-703.
87. Jakubovics NS, Jenkinson HF. Out of the iron age: new insights into the critical role of manganese homeostasis in bacteria. *Microbiology.* 2001;147(Pt 7):1709-18.
88. Brett PJ, Burtnick MN, Fenno JC, Gherardini FC. *Treponema denticola* TroR is a manganese- and iron-dependent transcriptional repressor. *Mol Microbiol.* 2008;70(2):396-409.
89. Sharma A. Virulence mechanisms of *Tannerella forsythia*. *Periodontol* 2000. 2010;54(1):106-16.
90. Potempa J, Pike RN. Corruption of innate immunity by bacterial proteases. *J Innate Immun.* 2009;1(2):70-87.
91. Grenier D. Nutritional interactions between two suspected periodontopathogens, *Treponema denticola* and *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun.* 1992;60(12):5298-301.
92. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol.* 1998;25(2):134-44.
93. Scarlatti G. Mother-to-child transmission of HIV-1: advances and controversies of the twentieth centuries. *AIDS Rev.* 2004;6(2):67-78.
94. Becker CE, Cone JE, Gerberding J. Occupational infection with human immunodeficiency virus (HIV). Risks and risk reduction. *Ann Intern Med.* 1989;110(8):653-6.
95. Iwuji CC, McGrath N, de Oliveira T, Porter K, Pillay D, Fisher M, et al. The Art of HIV Elimination: Past and Present Science. *J AIDS Clin Res.* 2015;6.
96. Pakfetrat A, Falaki F, Delavarian Z, Dalirsani Z, Sanatkhani M, Zabihi Marani M. Oral manifestations of human immunodeficiency virus-infected patients. *Iran J Otorhinolaryngol.* 2015;27(78):43-54.
97. Patton LL, Phelan JA, Ramos-Gomez FJ, Nittayananta W, Shiboski CH, Mbuguye TL. Prevalence and classification of HIV-associated oral lesions. *Oral Dis.* 2002;8 Suppl 2:98-109.

98. Dragic T, Litwin V, Allaway GP, Martin SR, Huang Y, Nagashima KA, et al. HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5. *Nature*. 1996;381(6584):667-73.
99. Moriuchi M, Moriuchi H, Turner W, Fauci AS. Cloning and analysis of the promoter region of CXCR4, a coreceptor for HIV-1 entry. *J Immunol*. 1997;159(9):4322-9.
100. Garg H, Blumenthal R. Role of HIV Gp41 mediated fusion/hemifusion in bystander apoptosis. *Cell Mol Life Sci*. 2008;65(20):3134-44.
101. Jacobs A, Garg H, Viard M, Raviv Y, Puri A, Blumenthal R. HIV-1 envelope glycoprotein-mediated fusion and pathogenesis: implications for therapy and vaccine development. *Vaccine*. 2008;26(24):3026-35.
102. Jayappa KD, Ao Z, Yao X. The HIV-1 passage from cytoplasm to nucleus: the process involving a complex exchange between the components of HIV-1 and cellular machinery to access nucleus and successful integration. *Int J Biochem Mol Biol*. 2012;3(1):70-85.
103. Lusic M, Siliciano RF. Nuclear landscape of HIV-1 infection and integration. *Nat Rev Microbiol*. 2017;15(2):69-82.
104. Wu Y. HIV-1 gene expression: lessons from provirus and non-integrated DNA. *Retrovirology*. 2004;1:13.
105. Balasubramaniam M, Freed EO. New insights into HIV assembly and trafficking. *Physiology (Bethesda)*. 2011;26(4):236-51.
106. Cossarizza A, Moyle G. Antiretroviral nucleoside and nucleotide analogues and mitochondria. *AIDS*. 2004;18(2):137-51.
107. Torres RA, Lewis W. Aging and HIV/AIDS: pathogenetic role of therapeutic side effects. *Lab Invest*. 2014;94(2):120-8.
108. Liu JC, Leung JM, Ngan DA, Nashta NF, Guillemi S, Harris M, et al. Absolute leukocyte telomere length in HIV-infected and uninfected individuals: evidence of accelerated cell senescence in HIV-associated chronic obstructive pulmonary disease. *PLoS One*. 2015;10(4):e0124426.
109. Gonzalez-Serna A, Ajaykumar A, Gadawski I, Muñoz-Fernández MA, Hayashi K, Harrigan PR, et al. Rapid Decrease in Peripheral Blood Mononucleated Cell Telomere Length After HIV Seroconversion, but Not HCV Seroconversion. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2017;76(1):e29-e32.
110. von Zglinicki T. Oxidative stress shortens telomeres. *Trends Biochem Sci*. 2002;27(7):339-44.

111. Bellon M, Nicot C. Regulation of telomerase and telomeres: human tumor viruses take control. *J Natl Cancer Inst.* 2008;100(2):98-108.
112. Guilleret I, Yan P, Grange F, Braunschweig R, Bosman FT, Benhattar J. Hypermethylation of the human telomerase catalytic subunit (hTERT) gene correlates with telomerase activity. *Int J Cancer.* 2002;101(4):335-41.
113. Cawthon RM. Telomere measurement by quantitative PCR. *Nucleic Acids Res.* 2002;30(10):e47.
114. Jylhävä J, Pedersen NL, Hägg S. Biological Age Predictors. *EBioMedicine.* 2017;21:29-36.
115. Killilea DW, Atamna H, Liao C, Ames BN. Iron accumulation during cellular senescence in human fibroblasts in vitro. *Antioxid Redox Signal.* 2003;5(5):507-16.
116. Daniali L, Benetos A, Susser E, Kark JD, Labat C, Kimura M, et al. Telomeres shorten at equivalent rates in somatic tissues of adults. *Nat Commun.* 2013;4:1597.
117. Gardner M, Bann D, Wiley L, Cooper R, Hardy R, Nitsch D, et al. Gender and telomere length: systematic review and meta-analysis. *Exp Gerontol.* 2014;51:15-27.
118. Shin YA, Lee KY. Low estrogen levels and obesity are associated with shorter telomere lengths in pre- and postmenopausal women. *J Exerc Rehabil.* 2016;12(3):238-46.
119. Fontas E, van Leth F, Sabin CA, Friis-Møller N, Rickenbach M, d'Arminio Monforte A, et al. Lipid profiles in HIV-infected patients receiving combination antiretroviral therapy: are different antiretroviral drugs associated with different lipid profiles? *J Infect Dis.* 2004;189(6):1056-74.
120. Arinola OG, Adedapo KS, Kehinde AO, Olaniyi JA, Akiibinu MO. Acute phase proteins, trace elements in asymptomatic human immunodeficiency virus infection in Nigerians. *Afr J Med Med Sci.* 2004;33(4):317-22.
121. Hoenigl M, Chaillon A, Morris SR, Little SJ. HIV Infection Rates and Risk Behavior among Young Men undergoing community-based Testing in San Diego. *Sci Rep.* 2016;6:25927.
122. Centers for Disease Control and Prevention. Estimated HIV incidence in the United States, 2007–2010. *HIV Surveillance Supplemental Report* 2012;17(No. 4). <http://www.cdc.gov/hiv/topics/surveillance/resources/reports/#supplemental>. Published December 2012.
123. Control WHOROfEaECfDPa. HIV/AIDS surveillance in Europe 2017 – 2016 data.

124. Leung JM, Fishbane N, Jones M, Morin A, Xu S, Liu JC, et al. Longitudinal study of surrogate aging measures during human immunodeficiency virus seroconversion. *Aging (Albany NY)*. 2017;9(3):687-705.
125. Kitay-Cohen Y, Goldberg-Bittman L, Hadary R, Fejgin MD, Amiel A. Telomere length in Hepatitis C. *Cancer Genet Cytogenet*. 2008;187(1):34-8.
126. Cesare AJ, Reddel RR. Alternative lengthening of telomeres: models, mechanisms and implications. *Nat Rev Genet*. 2010;11(5):319-30.
127. Zhu J, Wang H, Bishop JM, Blackburn EH. Telomerase extends the lifespan of virus-transformed human cells without net telomere lengthening. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(7):3723-8.
128. Kamranvar SA, Chen X, Masucci MG. Telomere dysfunction and activation of alternative lengthening of telomeres in B-lymphocytes infected by Epstein-Barr virus. *Oncogene*. 2013;32(49):5522-30.
129. Reynoso R, Wieser M, Ojeda D, Bönisch M, Kühnel H, Bolcic F, et al. HIV-1 induces telomerase activity in monocyte-derived macrophages, possibly safeguarding one of its reservoirs. *J Virol*. 2012;86(19):10327-37.
130. Palmer LD, Weng N, Levine BL, June CH, Lane HC, Hodes RJ. Telomere length, telomerase activity, and replicative potential in HIV infection: analysis of CD4+ and CD8+ T cells from HIV-discordant monozygotic twins. *J Exp Med*. 1997;185(7):1381-6.
131. Lichterfeld M, Mou D, Cung TD, Williams KL, Waring MT, Huang J, et al. Telomerase activity of HIV-1-specific CD8+ T cells: constitutive up-regulation in controllers and selective increase by blockade of PD ligand 1 in progressors. *Blood*. 2008;112(9):3679-87.
132. Leeansyah E, Cameron PU, Solomon A, Tennakoon S, Velayudham P, Gouillou M, et al. Inhibition of telomerase activity by human immunodeficiency virus (HIV) nucleos(t)ide reverse transcriptase inhibitors: a potential factor contributing to HIV-associated accelerated aging. *J Infect Dis*. 2013;207(7):1157-65.
133. Hotchkiss G, Pehrson PO, Larsson S, Ahrlund-Richter L, Britton S. Telomere loss in peripheral blood mononuclear cells may be moderately accelerated during highly active antiretroviral therapy (HAART). *J Acquir Immune Defic Syndr*. 1999;22(5):445-52.
134. Montejano R, Stella-Ascariz N, Monge S, Bernardino JJ, Pérez-Valero I, Montes ML, et al. Impact of Antiretroviral Treatment Containing Tenofovir Difumarate on the Telomere Length of Aviremic HIV-Infected Patients. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2017;76(1):102-9.

135. Zanet DL, Thorne A, Singer J, Maan EJ, Sattha B, Le Campion A, et al. Association between short leukocyte telomere length and HIV infection in a cohort study: No evidence of a relationship with antiretroviral therapy. *Clin Infect Dis*. 2014;58(9):1322-32.
136. Ajaykumar A, Soudeyns H, Kakkar F, Brophy J, Bitnun A, Alimenti A, et al. Leukocyte Telomere Length at Birth and During the Early Life of Children Exposed to but Uninfected With HIV After In Utero Exposure to Antiretrovirals. *J Infect Dis*. 2018;217(5):710-20.
137. Côté HC, Soudeyns H, Thorne A, Alimenti A, Lamarre V, Maan EJ, et al. Leukocyte telomere length in HIV-infected and HIV-exposed uninfected children: shorter telomeres with uncontrolled HIV viremia. *PLoS One*. 2012;7(7):e39266.
138. Shiau S, Strehlau R, Shen J, Violari A, Patel F, Liberty A, et al. Biomarkers of aging in HIV-infected children on suppressive antiretroviral therapy. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2018.
139. Ganesin K, Noguera-Julian A, Zanchetta M, Del Bianco P, Petrara MR, Freguja R, et al. Premature aging and immune senescence in HIV-infected children. *AIDS*. 2016;30(9):1363-73.
140. Currier JS, Lundgren JD, Carr A, Klein D, Sabin CA, Sax PE, et al. Epidemiological evidence for cardiovascular disease in HIV-infected patients and relationship to highly active antiretroviral therapy. *Circulation*. 2008;118(2):e29-35.
141. Winston J, Deray G, Hawkins T, Szczech L, Wyatt C, Young B. Kidney disease in patients with HIV infection and AIDS. *Clin Infect Dis*. 2008;47(11):1449-57.
142. Friis-Møller N, Reiss P, Sabin CA, Weber R, Monforte A, El-Sadr W, et al. Class of antiretroviral drugs and the risk of myocardial infarction. *N Engl J Med*. 2007;356(17):1723-35.
143. Zhan J, Qin S, Lu L, Hu X, Zhou J, Sun Y, et al. miR-34a is a common link in both HIV- and antiretroviral therapy-induced vascular aging. *Aging (Albany NY)*. 2016;8(12):3298-310.
144. Jones S, Restrepo D, Kasowitz A, Korenstein D, Wallenstein S, Schneider A, et al. Risk factors for decreased bone density and effects of HIV on bone in the elderly. *Osteoporos Int*. 2008;19(7):913-8.
145. Dolan SE, Kanter JR, Grinspoon S. Longitudinal analysis of bone density in human immunodeficiency virus-infected women. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006;91(8):2938-45.
146. McComsey GA, Tebas P, Shane E, Yin MT, Overton ET, Huang JS, et al. Bone disease in HIV infection: a practical review and recommendations for HIV care providers. *Clin Infect Dis*. 2010;51(8):937-46.

147. Titanji K, Vunnava A, Foster A, Sheth AN, Lennox JL, Knezevic A, et al. T-cell receptor activator of nuclear factor- κ B ligand/osteoprotegerin imbalance is associated with HIV-induced bone loss in patients with higher CD4+ T-cell counts. *AIDS*. 2018;32(7):885-94.
148. Fabbriani G, De Socio GV. Efavirenz and bone health. *AIDS*. 2009;23(9):1181.
149. Wang R, Kaplan A, Guo L, Shi W, Zhou X, Lux R, et al. The influence of iron availability on human salivary microbial community composition. *Microb Ecol*. 2012;64(1):152-61.
150. Brito A, Escalona LA, Correnti M, Perrone M, Bravo IM, Tovar V. Periodontal conditions and distribution of *Prevotella intermedia*, *Porphyromonas gingivalis* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in HIV-infected patients undergoing anti-retroviral therapy and in an HIV-seronegative group of the Venezuelan population. *Acta Odontol Latinoam*. 2008;21(1):89-96.
151. Li Y, Saxena D, Chen Z, Liu G, Abrams WR, Phelan JA, et al. HIV infection and microbial diversity in saliva. *J Clin Microbiol*. 2014;52(5):1400-11.
152. Moon JH, Kim C, Lee HS, Kim SW, Lee JY. Antibacterial and antibiofilm effects of iron chelators against *Prevotella intermedia*. *J Med Microbiol*. 2013;62(Pt 9):1307-16.
153. Duchesne P, Grenier D, Mayrand D. Binding and utilization of human transferrin by *Prevotella nigrescens*. *Infect Immun*. 1999;67(2):576-80.
154. Loesche WJ, Syed SA, Laughon BE, Stoll J. The bacteriology of acute necrotizing ulcerative gingivitis. *J Periodontol*. 1982;53(4):223-30.
155. Kamaguchi A, Ohyama T, Sakai E, Nakamura R, Watanabe T, Baba H, et al. Adhesins encoded by the gingipain genes of *Porphyromonas gingivalis* are responsible for co-aggregation with *Prevotella intermedia*. *Microbiology*. 2003;149(Pt 5):1257-64.
156. Potempa M, Potempa J, Kantyka T, Nguyen KA, Wawrzonek K, Manandhar SP, et al. Interpain A, a cysteine proteinase from *Prevotella intermedia*, inhibits complement by degrading complement factor C3. *PLoS Pathog*. 2009;5(2):e1000316.
157. Jansen HJ, Grenier D, Van der Hoeven JS. Characterization of immunoglobulin G-degrading proteases of *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens*. *Oral Microbiol Immunol*. 1995;10(3):138-45.
158. Peters LB, Wesselink PR, van Winkelhoff AJ. Combinations of bacterial species in endodontic infections. *Int Endod J*. 2002;35(8):698-702.
159. Tanabe S, Bodet C, Grenier D. Peptostreptococcus micros cell wall elicits a pro-inflammatory response in human macrophages. *J Endotoxin Res*. 2007;13(4):219-26.

160. Rams TE, Andriolo M, Feik D, Abel SN, McGivern TM, Slots J. Microbiological study of HIV-related periodontitis. *J Periodontol.* 1991;62(1):74-81.
161. Olczak T, Simpson W, Liu X, Genco CA. Iron and heme utilization in *Porphyromonas gingivalis*. *FEMS Microbiol Rev.* 2005;29(1):119-44.
162. John CN, Xavier Graham Stephen L, Wilma Joyce Africa C. BANA-Positive Plaque Samples Are Associated with Oral Hygiene Practices and Not CD4+ T Cell Counts in HIV-Positive Patients. *Int J Dent.* 2012;2012:157641.
163. Pereira VT, Pavan P, Souza RC, Souto R, Vettore MV, Torres SR, et al. The association between detectable plasmatic human immunodeficiency virus (HIV) viral load and different subgingival microorganisms in Brazilian adults with HIV: a multilevel analysis. *J Periodontol.* 2014;85(5):697-705.
164. Imai K, Victoriano AF, Ochiai K, Okamoto T. Microbial interaction of periodontopathic bacterium *Porphyromonas gingivalis* and HIV-possible causal link of periodontal diseases to AIDS progression-. *Curr HIV Res.* 2012;10(3):238-44.
165. Savitt ED, Kent RL. Distribution of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* by subject age. *J Periodontol.* 1991;62(8):490-4.
166. Coats SR, Jones JW, Do CT, Braham PH, Bainbridge BW, To TT, et al. Human Toll-like receptor 4 responses to *P. gingivalis* are regulated by lipid A 1- and 4'-phosphatase activities. *Cell Microbiol.* 2009;11(11):1587-99.
167. Wang M, Krauss JL, Domon H, Hosur KB, Liang S, Magotti P, et al. Microbial hijacking of complement-toll-like receptor crosstalk. *Sci Signal.* 2010;3(109):ra11.
168. Liang S, Krauss JL, Domon H, McIntosh ML, Hosur KB, Qu H, et al. The C5a receptor impairs IL-12-dependent clearance of *Porphyromonas gingivalis* and is required for induction of periodontal bone loss. *J Immunol.* 2011;186(2):869-77.
169. Graves D. Cytokines that promote periodontal tissue destruction. *J Periodontol.* 2008;79(8 Suppl):1585-91.
170. Guzik K, Potempa J. Friendly fire against neutrophils: proteolytic enzymes confuse the recognition of apoptotic cells by macrophages. *Biochimie.* 2008;90(2):405-15.
171. Guzik K, Bzowska M, Smagur J, Krupa O, Sieprawska M, Travis J, et al. A new insight into phagocytosis of apoptotic cells: proteolytic enzymes divert the recognition and clearance of polymorphonuclear leukocytes by macrophages. *Cell Death Differ.* 2007;14(1):171-82.
172. Hajishengallis G, Krauss JL, Liang S, McIntosh ML, Lambris JD. Pathogenic microbes and community service through manipulation of innate immunity. *Adv Exp Med Biol.* 2012;946:69-85.

173. Darveau RP. Periodontitis: a polymicrobial disruption of host homeostasis. *Nat Rev Microbiol.* 2010;8(7):481-90.
174. Lamont RJ, Jenkinson HF. Life below the gum line: pathogenic mechanisms of *Porphyromonas gingivalis*. *Microbiol Mol Biol Rev.* 1998;62(4):1244-63.
175. Hasturk H, Kantarci A, Goguet-Surmenian E, Blackwood A, Andry C, Serhan CN, et al. Resolvin E1 regulates inflammation at the cellular and tissue level and restores tissue homeostasis in vivo. *J Immunol.* 2007;179(10):7021-9.
176. Fine DH, Markowitz K, Furgang D, Velliyagounder K. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* as an early colonizer of oral tissues: epithelium as a reservoir? *J Clin Microbiol.* 2010;48(12):4464-73.
177. Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol.* 1999;4(1):1-6.
178. Konig MF, Abusleme L, Reinholdt J, Palmer RJ, Teles RP, Sampson K, et al. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*-induced hypercitrullination links periodontal infection to autoimmunity in rheumatoid arthritis. *Sci Transl Med.* 2016;8(369):369ra176.
179. Patel SM, Mo JH, Walker MT, Adley B, Noskin GA. Epidural abscess and osteomyelitis due to *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2004;50(4):283-5.
180. Brissette CA, Fives-Taylor PM. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* may utilize either actin-dependent or actin-independent mechanisms of invasion. *Oral Microbiol Immunol.* 1999;14(3):137-42.
181. Mise K, Akifusa S, Watarai S, Ansai T, Nishihara T, Takehara T. Involvement of ganglioside GM3 in G(2)/M cell cycle arrest of human monocytic cells induced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* cytolethal distending toxin. *Infect Immun.* 2005;73(8):4846-52.
182. Okinaga T, Ariyoshi W, Akifusa S, Nishihara T. Essential role of JAK/STAT pathway in the induction of cell cycle arrest in macrophages infected with periodontopathic bacterium *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Med Microbiol Immunol.* 2013;202(2):167-74.
183. Rabin SD, Flitton JG, Demuth DR. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* cytolethal distending toxin induces apoptosis in nonproliferating macrophages by a phosphatase-independent mechanism. *Infect Immun.* 2009;77(8):3161-9.
184. Permpanich P, Kowolik MJ, Galli DM. Resistance of fluorescent-labelled *Actinobacillus actinomycetemcomitans* strains to phagocytosis and killing by human neutrophils. *Cell Microbiol.* 2006;8(1):72-84.

185. Serra R, Al-Saidi AG, Angelov N, Nares S. Suppression of LPS-induced matrix-metalloproteinase responses in macrophages exposed to phenytoin and its metabolite, 5-(p-hydroxyphenyl-), 5-phenylhydantoin. *J Inflamm (Lond)*. 2010;7:48.
186. Li X, Zhou L, Takai H, Sasaki Y, Mezawa M, Li Z, et al. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* lipopolysaccharide regulates bone sialoprotein gene transcription. *J Cell Biochem*. 2012;113(9):2822-34.
187. Tanner AC, Haffer C, Bratthall GT, Visconti RA, Socransky SS. A study of the bacteria associated with advancing periodontitis in man. *J Clin Periodontol*. 1979;6(5):278-307.
188. Miki Y, Ebisu S, Okada H. The adherence of *Eikenella corrodens* to guinea pig macrophages in the absence and presence of anti-bacterial antibodies. *J Periodontal Res*. 1987;22(5):359-65.
189. Azakami H, Nakashima H, Akimichi H, Noiri Y, Ebisu S, Kato A. Involvement of N-acetyl-D-galactosamine-specific lectin in biofilm formation by the periodontopathogenic bacterium, *Eikenella corrodens*. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2006;70(2):441-6.
190. Matsunaga T, Nakayuki A, Saito Y, Kato A, Noiri Y, Ebisu S, et al. Genomic recombination through plasmid-encoded recombinase enhances hemolytic activity and adherence to epithelial cells in the periodontopathogenic bacterium *Eikenella corrodens*. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2011;75(4):748-51.
191. Otto BR, Verweij-van Vught AM, MacLaren DM. Transferrins and heme-compounds as iron sources for pathogenic bacteria. *Crit Rev Microbiol*. 1992;18(3):217-33.
192. Cersosimo MG, Koller WC. The diagnosis of manganese-induced parkinsonism. *Neurotoxicology*. 2006;27(3):340-6.
193. Boelaert JR, Weinberg GA, Weinberg ED. Altered iron metabolism in HIV infection: mechanisms, possible consequences, and proposals for management. *Infect Agents Dis*. 1996;5(1):36-46.
194. Fitsanakis VA, Zhang N, Garcia S, Aschner M. Manganese (Mn) and iron (Fe): interdependency of transport and regulation. *Neurotox Res*. 2010;18(2):124-31.
195. Beauchamp RO, Bus JS, Popp JA, Boreiko CJ, Andjelkovich DA. A critical review of the literature on hydrogen sulfide toxicity. *Crit Rev Toxicol*. 1984;13(1):25-97.
196. Lewis K. Programmed death in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2000;64(3):503-14.

197. Mitchell HL, Dashper SG, Catmull DV, Paolini RA, Cleal SM, Slakeski N, et al. *Treponema denticola* biofilm-induced expression of a bacteriophage, toxin-antitoxin systems and transposases. *Microbiology*. 2010;156(Pt 3):774-88.
198. Kuehn MJ, Kesty NC. Bacterial outer membrane vesicles and the host-pathogen interaction. *Genes Dev*. 2005;19(22):2645-55.
199. Lee SF, Andrian E, Rowland E, Marquez IC. Immune response and alveolar bone resorption in a mouse model of *Treponema denticola* infection. *Infect Immun*. 2009;77(2):694-8.
200. Ruby J, Martin M, Passineau MJ, Godovikova V, Fenno JC, Wu H. Activation of the Innate Immune System by *Treponema denticola* Periplasmic Flagella through Toll-Like Receptor 2. *Infect Immun*. 2018;86(1).
201. Ji S, Hyun J, Park E, Lee BL, Kim KK, Choi Y. Susceptibility of various oral bacteria to antimicrobial peptides and to phagocytosis by neutrophils. *J Periodontal Res*. 2007;42(5):410-9.
202. Brissette CA, Lukehart SA. Mechanisms of decreased susceptibility to beta-defensins by *Treponema denticola*. *Infect Immun*. 2007;75(5):2307-15.
203. Jo AR, Baek KJ, Shin JE, Choi Y. Mechanisms of IL-8 suppression by *Treponema denticola* in gingival epithelial cells. *Immunol Cell Biol*. 2014;92(2):139-47.
204. Johnson JD, Chen R, Lenton PA, Zhang G, Hinrichs JE, Rudney JD. Persistence of extracrevicular bacterial reservoirs after treatment of aggressive periodontitis. *J Periodontol*. 2008;79(12):2305-12.
205. Yoo JY, Kim HC, Zhu W, Kim SM, Sabet M, Handfield M, et al. Identification of *Tannerella forsythia* antigens specifically expressed in patients with periodontal disease. *FEMS Microbiol Lett*. 2007;275(2):344-52.
206. Sharma A, Inagaki S, Sigurdson W, Kuramitsu HK. Synergy between *Tannerella forsythia* and *Fusobacterium nucleatum* in biofilm formation. *Oral Microbiol Immunol*. 2005;20(1):39-42.
207. Sharma A, Inagaki S, Honma K, Sfintescu C, Baker PJ, Evans RT. *Tannerella forsythia*-induced alveolar bone loss in mice involves leucine-rich-repeat BspA protein. *J Dent Res*. 2005;84(5):462-7.
208. Byrne SJ, Dashper SG, Darby IB, Adams GG, Hoffmann B, Reynolds EC. Progression of chronic periodontitis can be predicted by the levels of *Porphyromonas gingivalis* and *Treponema denticola* in subgingival plaque. *Oral Microbiol Immunol*. 2009;24(6):469-77.

209. Mineoka T, Awano S, Rikimaru T, Kurata H, Yoshida A, Ansai T, et al. Site-specific development of periodontal disease is associated with increased levels of *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, and *Tannerella forsythia* in subgingival plaque. *J Periodontol*. 2008;79(4):670-6.
210. Frangos E, Trombetti A, Graf CE, Lachat V, Samaras N, Vischer UM, et al. Malnutrition in Very Old Hospitalized Patients: A New Etiologic Factor of Anemia? *J Nutr Health Aging*. 2016;20(7):705-13.
211. Lee GR. The anemia of chronic disease. *Semin Hematol*. 1983;20(2):61-80.
212. Mascitelli L, Goldstein MR. Aspirin-associated iron loss: an anticancer mechanism even in the short term? *Am J Med*. 2013;126(2):e11.
213. Navazesh M, Mulligan R, Pogoda J, Greenspan D, Alves M, Phelan J, et al. The effect of HAART on salivary microbiota in the Women's Interagency HIV Study (WIHS). *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2005;100(6):701-8.
214. Soares GM, Figueiredo LC, Faveri M, Cortelli SC, Duarte PM, Feres M. Mechanisms of action of systemic antibiotics used in periodontal treatment and mechanisms of bacterial resistance to these drugs. *J Appl Oral Sci*. 2012;20(3):295-309.
215. Leao JC, Ribeiro CM, Carvalho AA, Frezzini C, Porter S. Oral complications of HIV disease. *Clinics (Sao Paulo)*. 2009;64(5):459-70.
216. Van der Velden U. Effect of age on the periodontium. *J Clin Periodontol*. 1984;11(5):281-94.
217. Huttner EA, Machado DC, de Oliveira RB, Antunes AG, Hebling E. Effects of human aging on periodontal tissues. *Spec Care Dentist*. 2009;29(4):149-55.
218. Locker D, Slade GD, Murray H. Epidemiology of periodontal disease among older adults: a review. *Periodontol 2000*. 1998;16:16-33.
219. Du T, Liu N, Gu B, Li L, Yuan Y, Zhang W, et al. Effects of Aging on the Proliferation and Differentiation Capacity of Human Periodontal Ligament Stem Cells. *Chin Med Sci J*. 2017;32(2):83-1.
220. Zhang J, An Y, Gao LN, Zhang YJ, Jin Y, Chen FM. The effect of aging on the pluripotential capacity and regenerative potential of human periodontal ligament stem cells. *Biomaterials*. 2012;33(29):6974-86.
221. Tonna EA. Factors (aging) affecting bone and cementum. *J Periodontol*. 1976;47(5):267-80.
222. Kveiborg M, Flyvbjerg A, Eriksen EF, Kassem M. Transforming growth factor-beta1 stimulates the production of insulin-like growth factor-I and insulin-like growth

- factor-binding protein-3 in human bone marrow stromal osteoblast progenitors. *J Endocrinol.* 2001;169(3):549-61.
223. Fedarko NS, Vetter UK, Weinstein S, Robey PG. Age-related changes in hyaluronan, proteoglycan, collagen, and osteonectin synthesis by human bone cells. *J Cell Physiol.* 1992;151(2):215-27.
224. Riggs BL, Melton LJ, Robb RA, Camp JJ, Atkinson EJ, McDaniel L, et al. A population-based assessment of rates of bone loss at multiple skeletal sites: evidence for substantial trabecular bone loss in young adult women and men. *J Bone Miner Res.* 2008;23(2):205-14.
225. Sarajlić N, Topić B, Brkić H, Alajbeg IZ. Aging quantification on alveolar bone loss. *Coll Antropol.* 2009;33(4):1165-70.
226. Takahashi K, Nishida H, Takeda H, Shin K. Telomere length in leukocytes and cultured gingival fibroblasts from patients with aggressive periodontitis. *J Periodontol.* 2004;75(1):84-90.
227. Thomson WM, Zeng J, Broadbent JM, Foster Page LA, Shalev I, Moffitt TE, et al. Telomere length and periodontal attachment loss: a prospective cohort study. *J Clin Periodontol.* 2016;43(2):121-7.
228. Sanders AE, Divaris K, Naorungroj S, Heiss G, Risques RA. Telomere length attrition and chronic periodontitis: an ARIC Study nested case-control study. *J Clin Periodontol.* 2015;42(1):12-20.
229. Beutler B, Jiang Z, Georgel P, Crozat K, Croker B, Rutschmann S, et al. Genetic analysis of host resistance: Toll-like receptor signaling and immunity at large. *Annu Rev Immunol.* 2006;24:353-89.
230. Metcalf TU, Cubas RA, Ghneim K, Cartwright MJ, Grevenynghe JV, Richner JM, et al. Global analyses revealed age-related alterations in innate immune responses after stimulation of pathogen recognition receptors. *Aging Cell.* 2015;14(3):421-32.
231. Shaw AC, Goldstein DR, Montgomery RR. Age-dependent dysregulation of innate immunity. *Nat Rev Immunol.* 2013;13(12):875-87.
232. Butcher S, Chahel H, Lord JM. Review article: ageing and the neutrophil: no appetite for killing? *Immunology.* 2000;100(4):411-6.
233. Mege JL, Capo C, Michel B, Gastaut JL, Bongrand P. Phagocytic cell function in aged subjects. *Neurobiol Aging.* 1988;9(2):217-20.
234. Alvarez E, Ruiz-Gutiérrez V, Sobrino F, Santa-María C. Age-related changes in membrane lipid composition, fluidity and respiratory burst in rat peritoneal neutrophils. *Clin Exp Immunol.* 2001;124(1):95-102.

235. Fulop T, Witkowski JM, Pawelec G, Alan C, Larbi A. On the immunological theory of aging. *Interdiscip Top Gerontol.* 2014;39:163-76.
236. Larbi A, Fulop T. From "truly naïve" to "exhausted senescent" T cells: when markers predict functionality. *Cytometry A.* 2014;85(1):25-35.
237. Frasca D, Diaz A, Romero M, Landin AM, Blomberg BB. Age effects on B cells and humoral immunity in humans. *Ageing Res Rev.* 2011;10(3):330-5.
238. Eaton SM, Burns EM, Kusser K, Randall TD, Haynes L. Age-related defects in CD4 T cell cognate helper function lead to reductions in humoral responses. *J Exp Med.* 2004;200(12):1613-22.
239. Colonna-Romano G, Bulati M, Aquino A, Pellicanò M, Vitello S, Lio D, et al. A double-negative (IgD-CD27-) B cell population is increased in the peripheral blood of elderly people. *Mech Ageing Dev.* 2009;130(10):681-90.
240. Frasca D, Diaz A, Romero M, Blomberg BB. Human peripheral late/exhausted memory B cells express a senescent-associated secretory phenotype and preferentially utilize metabolic signaling pathways. *Exp Gerontol.* 2017;87(Pt A):113-20.
241. Kim S, Ahn SH, Lee JS, Song JE, Cho SH, Jung S, et al. Differential Matrix Metalloprotease (MMP) Expression Profiles Found in Aged Gingiva. *PLoS One.* 2016;11(7):e0158777.
242. Wolf J, Weinberger B, Arnold CR, Maier AB, Westendorp RG, Grubeck-Loebenstein B. The effect of chronological age on the inflammatory response of human fibroblasts. *Exp Gerontol.* 2012;47(9):749-53.
243. Tâlván E, Mohor C, Chisnoiu D, Cristea V, Câmpian RAM, 9:3. Expression of Interleukin (IL)-1 β , IL-8, IL-10 and IL-13 in Chronic Adult Periodontitis Progression. *Arch Med.* 2017;9(3).
244. Perunovic ND, Rakic MM, Nikolic LI, Jankovic SM, Aleksic ZM, Plecas DV, et al. The Association Between Periodontal Inflammation and Labor Triggers Elevated Cytokine Levels in Pre-Term Birth: A Cross-Sectional Study. *J Periodontol.* 2015:1-13.

8. BIOGRAFIJA

Boško M. Toljić rođen je 7.1.1984. godine u Prijepolju, Republika Srbija. Stomatološki fakultet Univerziteta u Beogradu upisao je 2003. godine i diplomirao u oktobru 2009. sa prosečnom ocenom 9,36. Lekarski staž obavio je u Domu zdravlja Zemun, a državni ispit je položio u januaru 2011. godine. Doktorske studije je upisao u oktobru 2010. godine i položio sve ispite predviđene nastavnim planom i programom sa prosečnom ocenom 9,68. Od decembra 2011. godine angažovan je kao istraživač pripravnik na projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Vlade Republike Srbije, pod nazivom “Genetička kontrola i molekularni mehanizmi u malignim, inflamatornim i razvojnim patologijama orofacijalne regije”, evidencioni broj 175075. Od školske 2011/2012. godine angažovan je u obavljanju praktične nastave na predmetu Opšta i oralna fiziologija, u okviru integrisanih akademskih studija Stomatološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu. Od oktobra 2016. godine radi kao asistent na predmetu Opšta i oralna fiziologija.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани БОШКО ТОЉИЋ

број индекса 4013/2010

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

„УТИЦАЈ ХИВ ИНФЕКЦИЈЕ И АНТИРЕТРОВИРУСНИХ ЛЕКОВА НА СТАРЕЊЕ
ПАРОДОНТАЛНИХ ТКИВА“

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, 30.5.2018.

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора БОШКО ТОЉИЋ

Број индекса 4013/2010

Студијски програм ДОКТОРСКЕ АКАДЕМСКЕ СТУДИЈЕ

Наслов рада „УТИЦАЈ ХИВ ИНФЕКЦИЈЕ И АНТИРЕТРОВИРУСНИХ ЛЕКОВА НА
СТАРЕЊЕ ПАРОДОНТАЛНИХ ТКИВА“

Ментор ПРОФ. ДР ЈЕЛЕНА МИЛАШИН, ПРОФ. ДР ГОРДАНА ДРАГОВИЋ ЛУКИЋ

Потписани БОШКО ТОЉИЋ

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, 30.5.2018.

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

„УТИЦАЈ ХИВ ИНФЕКЦИЈЕ И АНТИРЕТРОВИРУСНИХ ЛЕКОВА НА СТАРЕЊЕ
ПАРОДОНТАЛНИХ ТКИВА“

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 30.5.2018.

1. Ауторство - Дозвољавање умножавања, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољавање умножавања, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољавање умножавања, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољавање умножавања, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. Ауторство – без прераде. Дозвољавање умножавања, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољавање умножавања, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.