



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

Владан М. Ковачевић

**ЕФИКАСНОСТ РАСТВОРА ЈОНА СРЕБРА НА
ПРОМЕНЕ ОКСИДО - НИТРОЗАТИВНИХ
ПАРАМЕТАРА У ТЕРАПИЈИ БОЛЕСНИКА СА
ХРОНИЧНИМ ОБЛИКОМ ПАРОДОНТОПАТИЈЕ**

докторска дисертација

Крагујевац, 2021



UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC
FACULTY OF MEDICAL SCIENCES

Vladan M. Kovacevic

**EFFECT OF COLLOIDAL SOLUTION SILVER IONS ON
THE VALUES OF OXIDATIVE AND NITROSATIVE
STATUS PARAMETERS IN THE TREATMENT OF
CHRONIC PERIODONTITIS**

Doctoral Dissertation

Kragujevac, 2021

Аутор
Име и презиме: Владан Ковачевић
Датум и место рођења: 25.10.1970.
Садашње запослење: Клиника за стоматологију ВМА, Црнотравска 17, Београд
Докторска дисертација
Наслов: Ефикасност расвора јона сребра на промене оксидо-нитрозативних параметара у терапији болесника са хроничним обликом пародонтопатије
Број страница: 113
Број слика: 19 слика, 16 табела, 3 схеме
Број библиографских података: 305
Установа и место где је рад израђен: Клиника за стоматологију ВМА, Институт за медицинска истраживања ВМА, Црнотравска 17, Београд
Научна област (УДК): Стоматологија, медицина
Ментор: Проф. др Зоран Лазић, Медицински факултет Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду за ужу научну област Орална медицина
Оцена и одбрана
Датум пријаве теме:
Број одлуке и датум прихватања докторске дисертације: IV-03-209/11 од 11.03.2020.
Комисија за оцену научне заснованости теме и испуњеност услова кандидата: 1. Проф. др Владимир Живковић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Физиологија, председник. 2. Проф. др Александра Лукић, редовни професор Факултета медицинских наука у Крагујевцу за ужу научну област Болести зуба и ендодонција, члан. 3. Проф. др Драгана Даковић, ванредни професор Медицинског факултета Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду за ужу научну област Пародонтологија и орална медицина, члан. 4. 5.
Комисија за оцену и одбране докторске дисертације: 1. титула, име и презиме, звање, назив факултета/ института и универзитета 2. титула, име и презиме, звање, назив факултета/ института и универзитета 3. титула, име и презиме, звање, назив факултета/ института и универзитета 4. титула, име и презиме, звање, назив факултета/ института и универзитета 5. титула, име и презиме, звање, назив факултета/ института и универзитета
Датум одбране дисертације:

ЗАХВАЛНИЦА

Клинички део ове докторске дисертације урађен је на Одељењу за имплантологију, Одсеку за пародонтологију и оралну медицину Клинике за стоматологију Војномедицинске академије у Београду, док су се маркери осидативно-нитрозативних параметара у узорцима саливе и гингивалне течности одређивали у Институту за медицинска истраживања Војномедицинске академије у Београду.

Захваљујем свим људима који су ме мотивисали и подржали да истрајем у напорима које је захтевао овај, за мене изузетно важан и тежак подухват. То су заиста изузетни људи, велике ширине у приступу спремни да се несебично дају својим знањем и научним искуством у сваком тренутку када је то било неопходно. Унапред се извињавам свима које овде не могу појединачно поменути, али добро знам колико су ми помогли и колико су срећни што смо све ово успешно привели до краја.

Захвалност дугујем:

Ментору овог рада, Пук. Проф. др Зорану Лазићу, на веома великом оптимизму, корисним саветима, лакоћи у комуникацији. Његовим личним ангажманом помогао је да овај рад добије своју коначну верзију.

Члановима комисије са којима сам имао неопходну комуникацију на изузетно високом нивоу професионалности

Проф. др Владимиру Живковићу, на изузетној ангажованости и великој ажурности током преласка овог рада из радне у дефинитивну верзију. Комуникација са професором и савети које сам добијао су ми били изузетно битни и мотивишући.

Доц. Ивани Стевановић, чији је допринос овом раду изузетан. Она је своју неисцрпну енергију, ентузијазам, несебично посветила комплетној процедури одређивања осидативно-нитрозативних параметара, практично све од момента када сам јој однео узорке до момента када сам добио гомилу статистички обрађених резултата, презентованих у табелама и схемама. Она нам је свима који смо радили на овој докторској дисертацији помогла да схватимо и закључимо оно што смо само предпостављали.

Проф. др Александри Лукић на изузетној лакоћи у комуникацији, чију сам подршку и веру у овај рад увек осећао.

Проф. др Драгани Даковић, на подршци, стручној и научној помоћи током изузетно напорних фаза које смо пролазили радећи на овом раду, од првог пацијента до последње референце.

Проф. др Дубравку Бокоњићу захваљујем на статистичкој обради клиничких резултата, и веома великој пажњи коју је посветио конципирању овог рада.

У сећању ће ми увек остати лик и ведрина људи који, нажалост нису дочекали завршетак овог подухвата, а представљали су изузетно важне тачке ослонца. То су:

Проф. др Богдан Бошковић идејни творац овог рада, светски познато име у области фармакологије и токсикологије. Сарађивати са њим је била изузетна привилегија. Енергија, дух, вера и оптимизам, пажња, знање је нешто што нам је давало велику инспирацију од самог почетка. Данас би вероватно скромно рекао, да то што смо

завршили данас је заправо само наш дневни успех, и да већ морамо размишљати шта ћемо почети сутра.

Душан Илић, данас нажалост није са нама, а њему дугујем изузетну захвалност за техничку подршку у виду неопходне количине раствора колоидног сребра које нам је уступио током клиничког испитивања. Веровали смо у оно што је раствор и показао, а надамо се да ће још већи успех тек уследити.

Захваљујем се колегама и целокупном особљу Одељења за имплантологију Клинике за стоматологију Војномедицинске академије који су ми помогли када је било потребно, и имали разумевања за моје физичко одсуство у тренуцима израде овог рада.

На крају, али за мене- најважније, морам да истакнем велику захвалност за подршку мојим члановима породице: сину Матији, ћерки Зари, супрузи Наташи. Њихово разумевање за оно чиме сам се бавио током овог рада ми је дало мотив да истрајем до краја.

Данас су такође срећни мој отац Мирослав, мајка Живана и мој брат Дарко. Хвала им што су увек уз мене.

САЖЕТАК

Циљ овог истраживања био је испитивање утицаја воденог раствора јона сребра (*JS*) као локалног адјувантног антисептика у оквиру каузалне терапије пародонтопатије у поређењу са раствором хлорхексидина (*CHX*). У истраживању је праћен утицај воденог раствора јона сребра на вредности параметара оксидативног и нитрозативног статуса у саливи и гингивалној цревикуларној течности (*GCF*), као што су: концентрација супстанци које реагују са тиобарбитурном киселином (*TBARS*), концентрација нитрита и нитрата (NO_2+NO_3), стварање супероксидног анјона (O_2^-), одређивање укупног антиоксидативног капацитета (*TAS*), активност укупне супероксид дизмутазе (*tSOD*), каталазе (*CAT*), глутатион пероксидазе (*GPx*) и садржај укупног глутатиона (*tGSH*).

У проспективној кохортној студији узело је учешће 90 испитаника (50 болесника и 40 контролних субјеката), оба пола, доби од 25-65 година, подељених у четири групе. Прву групу (B_{JS} , $n=25$) чинили су испитаници оболели од генерализоване хроничне пародонтопатије, који су били третирани у оквиру каузалне терапије вишесансном методом киретаже пародонталних цепова и полирањем површине корена зуба, уз испирање пародонталних цепова воденим раствором јона сребра концентрације 5мг/мл (*JS*). Ова група је била праћена пре ($B_{JS\ pre}$) и после ($B_{JS\ posle}$) терапије овим антисептиком. Друга група испитаника (B_{CHX} , $n=25$) је поред обраде пародонталних цепова била третирана 0,2% раствором хлорхексидина (*CHX*) и такође праћена пре ($B_{CHX\ pre}$) и после ($B_{CHX\ posle}$) терапије. Контролну групу чинили су системски здрави испитаници, подељени у две групе. Једна група је добијала раствор јона сребра (Z_{JS} , $n=20$), а друга раствор хлорхексидина (Z_{CHX} , $n=20$) за испирање усне дупље.

Параметри који су праћени односили су се на испитивање гингиве и пародонцијума (плак индекс, гингивални индекс, ниво припојног епитела, дубина пародонталног цепа), као и степен оксидативних, односно нитрозативних активности у саливи и *GCF* пре и након пародонталне терапије.

Резултати спроведене студије су показали да је водени раствор сребрних јона једнако ефикасан као хлорхексидин, а обзиром на његову бољу подношљивост интезивна примена сребрних јона код болесника са хроничном генерализованом пародонтопатијом показује велики напредак у терапији.

Кључне речи: пародонтопатија; оксидативни стрес; нитрозативни статус; локална терапија; антисептичка средства

ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the effect of an colloidal silver ions solution as a local adjuvant antiseptic in the treatment of chronic periodontitis compared with a chlorhexidine solution. The study monitored the effect of an colloidal silver ions solution on the values of oxidative and nitrosative status parameters in saliva and gingival crevicular fluid (GCF), such as: concentration of substances that reacts with thiobarbituric acid (TBARS), concentration of nitrite and nitrate ($NO_2 + NO_3$), superoxide anion formation ($O_2^{\cdot-}$), determination of total antioxidant capacity (TAS), total superoxide dismutase (tSOD) activity, catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) and total glutathione (tGSH) content.

The prospective cohort study was encompassed 90 subjects (50 patients and 40 control subjects), of both sexes, aged 25-65 years, divided into four groups. The first group (B_{JS}, n = 25) consisted of subjects with generalized chronic periodontitis, who were treated with a 5mg/ml of colloidal silver ions solution after scaling and root planing of periodontal pockets. This group was monitored before and after the therapy with this antiseptic. The second group of subjects (B_{CHX}, n = 25) were treated with 0.2% chlorhexidine solution and also monitored before and after the therapy. The control group consisted of systemically healthy subjects, divided into two groups. One group received a colloidal silver ions solution (Z_{JS}, n = 20), and the other a solution of chlorhexidine (Z_{CHX}, n = 20) due to oral cavity rinsing.

The monitored parameters related to the examination of the gingiva and periodontium (plaque index, gingival index, the clinical attachment level, the periodontal pocket depth), as well as the degree of oxidative and nitrosative activities in the saliva and GCF before and after periodontal therapy.

The results of the study showed that a colloidal silver ions solution was at least equally effective as a chlorhexidine solution. Intensive use of silver ions solution in chronic generalized periodontitis patients showed great progress in causal therapy, because of its better tolerability

Key words: periodontitis; oxidative stress; nitrosative status; scaling and root planing; antiseptics

Садржај:

1. УВОД.....	1
1.1. Пародонтопатија.....	1
1.2. Епидемиолошки аспекти пародонтопатије.....	2
1.3. Етиологија и патогенеза пародонтопатије.....	3
1.4. Остали етиолошки фактори у настанку пародонтопатије.....	4
1.5. Дијагностички потенцијал биомаркера у саливи и GCF код пацијената са пародонтопатијом.....	6
1.6. Салива као извор биомаркера за пародонтопатију.....	8
1.7. GCF као извор биомаркера за пародонтопатију.....	9
1.8. Биомаркери оралне течности у дијагностици пародонталне болести.....	10
1.9. Слободни радикали и механизам оксидативног стреса.....	11
1.9.1. Липидна пероксидација.....	14
1.9.2. Реактивне врсте кисеоника.....	14
1.9.3. Реактивне врсте азота.....	15
1.10. Систем заштите од оксидативних оштећења.....	16
1.10.1. Ензимска антиоксидативна заштита.....	17
1.10.2. Неензимски антиоксидативни систем.....	18
1.11. Улога слободних радикала (CP) у физиолошким и патофизиолошким механизмима.....	20
1.12. Терапија пародонтопатије.....	21
1.12.1. Адјувантна терапија пародонтопатије.....	22
1.12.2. Хлорхексидин.....	22
1.12.3. Колоидни раствор јона сребра.....	23
2. ХИПОТЕЗЕ И ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА.....	25
3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ.....	27
3.1. Врста студије.....	27
3.2. Испитаници.....	27
3.3. Узорци.....	28
3.3.1. Варијабле.....	28
3.3.2. Узорковање.....	29
3.4. Методе.....	29
3.4.1. Одређивање клиничких параметара.....	29
3.4.2. Одређивање параметара оксидативног/ нитрозативног стреса и антиоксидативне заштите у саливи и GCF пацијената.....	31
3.4.2.1. Одређивање садржаја протеина у саливи и GCF.....	31
3.4.2.2. Одређивање концентрације (TBA)-реагујућих супстанци (TBARS) у саливи и GCF.....	32
3.4.2.3. Одређивање производње супероксидног анјон радикала ($O_2^{\bullet-}$) у саливи и GCF.....	32
3.4.2.4. Одређивање концентрације NO_2+NO_3 у саливи и GCF.....	33
3.4.2.5. Одређивање укупног антиоксидативног статуса (TAS) у саливи и GCF.....	33
3.4.2.6. Одређивање активности укупне супероксид дизмутазе (tSOD) у саливи и GCF.....	34

3.4.2.7. Одређивање активности каталазе (CAT) у саливи и GCF.....	34
3.4.2.8. Одређивање активности глутатион пероксидазе (GPx) у саливи и GCF.....	34
3.4.2.9. Одређивање концентрације укупног глутатиона (tGSH) у саливи и GCF.....	35
3.5. Величина узорка и статистичка обрада резултата.....	35

4. РЕЗУЛТАТИ

4.1. Промене испитиваних клиничких параметара пре и након примене различитих антисептика (JS, CHX) код оболелих од пародонтопатије.....	37
4.1.1. Општи клинички параметри испитаника са пародонтопатијом укључених у студију пре примене различитих антисептика (JS, CHX).....	37
4.1.2. Промене испитиваних клиничких параметара (PI, GI, IKG, DPDZ, NPE) пре и након примене различитих антисептика (JS, CHX) код болесника са пародонтопатијом.....	39
4.2. Промене испитиваних биохемијских параметара (TBARS, O ₂ ⁻ , NO, TAS, tSOD, CAT, GPx, tGSH) пре и након примене JS и CHX у саливи болесника са пародонтопатијом.....	46
4.2.1. Ефекат JS и CHX на концентрацију TBARS у саливи болесника са пародонтопатијом.....	47
4.2.2. Ефекат JS и CHX на стварање O ₂ ⁻ у саливи болесника са пародонтопатијом.....	48
4.2.3. Ефекат JS и CHX на концентрацију NO у саливи болесника са пародонтопатијом.....	49
4.2.4. Ефекат JS и CHX на вредност TAS у саливи болесника са пародонтопатијом.....	50
4.2.5. Ефекат JS и CHX на активност tSOD у саливи болесника са пародонтопатијом.....	51
4.2.6. Ефекат JS и CHX на активност CAT у саливи болесника са пародонтопатијом.....	52
4.2.7. Ефекат JS и CHX на активност GPx у саливи болесника са пародонтопатијом.....	53
4.2.8. Ефекат JS и CHX на садржај tGSH у саливи болесника са пародонтопатијом.....	54
4.3. Промене испитиваних биохемијских параметара (TBARS, NO, TAS, tSOD, tGSH) пре и након примене JS и CHX у GCF болесника са пародонтопатијом.....	55
4.3.1. Ефекат JS и CHX на концентрацију TBARS у GCF пацијената болесника са пародонтопатијом.....	55
4.3.2. Ефекат JS и CHX на концентрацију NO у GCF болесника са пародонтопатијом.....	57
4.3.3. Ефекат JS и CHX на вредност TAS у GCF болесника са пародонтопатијом.....	58
4.3.4. Ефекат JS и CHX на активност tSOD у GCF болесника са пародонтопатијом.....	59
4.3.5. Ефекат JS и CHX на концентрацију tGSH у GCF болесника са пародонтопатијом.....	60

4.4. Корелативне промене између испитиваних параметара у саливи болесника са хроничним обликом пародонтопатије пре и након терапије антисептицима (JS, CHX).....	61
4.4.1. Spearman-ова корелативна анализа између PI и биохемијских параметара након терапије антисептицима (JS, CHX) у саливи оболелих од пародонтопатије.....	61
4.4.2. Spearman-ова корелативна анализа између GI и биохемијских параметара након терапије антисептицима (JS, CHX) у саливи оболелих од пародонтопатије.....	62
4.4.3. Spearman-ова корелативна анализа између IKG и биохемијских параметара након терапије антисептицима (JS, CHX) у саливи оболелих од пародонтопатије.....	63
4.4.4. Spearman-ова корелативна анализа између DPDZ и биохемијских параметара након терапије антисептицима (JS, CHX) у саливи оболелих од пародонтопатије.....	64
4.4.5. Spearman-ова корелативна анализа између NPE и биохемијских параметара након терапије антисептицима (JS, CHX) у саливи оболелих од пародонтопатије.....	65
4.5. Корелативне промене између испитиваних параметара у GCF болесника са хроничним обликом пародонтопатије пре и након терапије антисептицима (JS, CHX)	66
4.5.1. Spearman-ова корелативна анализа између PI и биохемијских параметара након терапије антисептицима (JS, CHX) у GCF оболелих од пародонтопатије.....	66
4.5.2. Spearman-ова корелативна анализа између GI и биохемијских параметара након терапије антисептицима (JS, CHX) у GCF оболелих од пародонтопатије.....	67
4.5.3. Spearman-ова корелативна анализа између IKG и биохемијских параметара након терапије антисептицима (JS, CHX) у GCF оболелих од пародонтопатије.....	68
4.5.4. Spearman-ова корелативна анализа између DPDZ и биохемијских параметара након терапије антисептицима (JS, CHX) у GCF оболелих од пародонтопатије.....	69
4.5.5. Spearman-ова корелативна анализа између NPE и биохемијских параметара након терапије антисептицима (JS, CHX) у GCF оболелих од пародонтопатије.....	70
5. ДИСКУСИЈА	71
5.1. Значај примене воденог раствора јона сребра и хлорхексидина на клиничке параметре код болесника са пародонтопатијом.....	72

5.2. Значај примене воденог раствора јона сребра на параметре оксидативног/ нитрозативног статуса код болесника са пародонтопатијом.....	75
5.2.1. Утицај воденог раствора јона сребра на параметре оксидативног/ нитрозативног статуса у саливи болесника са пародонтопатијом.....	75
5.2.2. Утицај воденог раствора јона сребра на параметре оксидативног/ нитрозативног статуса у GCF пацијената са пародонтопатијом.....	79
5.3. Значај примене хлорхексидина на параметре оксидативног/ нитрозативног статуса код пацијената са пародонтопатијом.....	81
5.3.1. Утицај хлорхексидина на параметре оксидативног/ нитрозативног статуса у саливи пацијената са пародонтопатијом.....	81
5.3.2. Утицај хлорхексидина на параметре оксидативног/ нитрозативног статуса у GCF пацијената са пародонтопатијом.....	85
5.4. Нови терапијски ефекат примене JS и СНХ у саливи и GCF код болесника са пародонтопатијом	87
6. ЗАКЉУЧЦИ	91
7. ЛИТЕРАТУРА	92

1. УВОД

Charles Mayo је давне 1922. године рекао да ће први следећи велики корак у превентивној медицини почети од стоматолога (*Charles H. Mayo, Rochester, Minnesota*). У историји пародонтологије непрестано се смењују стални напредак и заобилазни путеви, као и широк спектар концепата који се односе на патобиологију и лечење ове болести. Преваленција пародонтитиса у већини земаља премашује 50%, док је преваленца тешког облика пародонтопатије у свету процењена на 11,2%. Ова болест у свом току пролази кроз деструктивне („активне“ - фаза егзацербације) и индолентне („латентне“ - фаза ремисије) фазе, при чему доминира индолентна болест код одраслих пацијената (*Slots, 2019*).

1.1. Пародонтопатија

Пародонтопатија је хронична бактеријска инфекција која се карактерише инфламацијом, оштећењем ткива и деструкцијом алвеоларне кости (*Zhang u cap., 2009*). Процес иницијације и прогресије болести зависи од присуства вирулентних микроорганизама који делују преко својих продуката (киселине, ендотоксини, антигени) и изазивају бројне промене у пародонцијуму (од гингивитиса, преласка запаљења на алвеоларну кост и формирања пародонталних џепова, до терминалних разарања алвеоларне кости и губитка зуба). Иако су микроорганизми иницијални фактор у настанку пародонтопатије, одговор домаћина на инфекцију је критичан моменат за прогресију болести (*Craig u cap., 2003*).

Дефиниција пародонтопатије посматрана кроз призму времена је трпела мање или нешто веће корекције које су се углавном односиле на редослед етиолошких фактора у самој композицији реченице, а у зависности од тога ком фактору сам аутор поклања примат. Са данашње тачке посматрања, времена је било на претек - више од сто година! Супростављене парадигме су се углавном односиле на фаворизовање локалних етиолошких фактора пореклом из усне шупљине, односно на манифестацију системских дисфункционалних стања. Ипак, ова вековна дебата у другој половини XX века, донела је сазнања која су заступала став да се узрок пародонтопатије налази у устима (*Hujoel u cap., 2012*). Тако да данас, на почетку треће декаде XXI века постоје дефиниције које произилазе из најсавременијих научно истраживачких процедура, а које хроничну пародонтопатију представљају као запаљенско обољење узроковано инфекцијом пародонталним бактеријама што резултира прогресивним уништавањем зубних потпорних ткива и на крају губитком зуба (*Ren u cap., 2017*).

За неке ауторе пародонтопатија представља општи појам који обухвата неколико патолошких стања која утичу на зубне потпорне структуре (*Kaplish u cap., 2013.*). Ова стања карактеришу уништавање пародонталног лигамента, ресорпцију алвеоларне кости и миграцију припојног епитела дуж површине зуба (*American Academy of Periodontology, 2000*). По неким ауторима то је локализовани инфламаторни одговор изазван бактеријском инфекцијом пародонталног џепа повезаном са субгингивалним плаком (*Haffajee u Socransky, 1986*). Иако су бактерије денталног плака примарни узрок пародонталне болести, по мишљењу других аутора сам утицај микробних патогених фактора није довољан да изазове пародонтопатију (*Vyas u cap., 2005*). Пародонтални патогени ослобађају штетне нуспроизводе и ензиме који разбијају ванћелијске матрице, као и ћелијске мембране пародонталног ткива да би произвели хранљиве састојке за свој раст, при чему започињу оштећење директно или индиректно-покретањем имуног одговора који доводи до аутодеструкције ткива домаћина.

1.2. Епидемиолошки аспекти пародонтопатије

Епидемиолошка истраживања стања пародонцијума укључују клиничке процене запаљења пародонталних ткива, записивање резултата мерења дубине сондирања и нивоа припојног епитела, као и рендгенолошке процене потпорне алвеоларне кости. Током низа година развио се различит број система индекса за мерење тих параметара, који има значаја у разумевању одређених вредности добијених од разних аутора, а тичу се стања пародонцијума и могу изгледати прецењено, нарочито када се ради о високим процентуалним вредностима (*Lindhe, 2004*).

Пародонтопатија је једна од два водећа орална обољења која утиче на људску популацију широм света високом стопом преваленције (*Papapanou, 1999; Petersen 2003*). Ово обољење има последично негативан утицај на говор, исхрану, квалитет живота и самопоштовања, а такође може имати утицај на настанак неких системских обољења (*Lang u cap., 2009; Axelsson, 2014*). У исто време нека системска обољења могу додатно компликовати терапију и погоршати клиничку слику ове болести (*Taylor u cap., 1998*). Број оболелих од пародонтопатије је у сталном порасту (*Jepsen u cap., 2017*). У анкетама о популацији неких развијених земаља, као и земаља у развоју, испитиване су преваленција и тежина пародонталне болести. Ове студије су спроведене за широк спектар циљева, дизајна и мерних критеријума (*Kingman и Albandar, 2002*). Пародонталне болести су распрострањене широм света. Познато је да више од 15% одраслих у САД-у има напредни облик пародонтопатије, док већина одраслих поседује неки облик пародонталне болести - од гингивитиса до умерене пародонтопатије (*American Academy of Periodontology Research, 2005*). Према подацима Светске здравствене организације (СЗО), унапредовала болест са дубоким пародонталним џеповима (≥ 6 мм) погађа приближно 10 до 15% одрасле популације широм света (*Petersen и Ogawa, 2012*).

Са стоматолошког аспекта, највећи значај пародонтопатије, представља чињеница да нелечена пародонтопатија јесте водећи узрок губитка зуба. Тако је установљено да је код особа старијих од 35 година, већи број зуба извађен услед пародонтопатије, у односу на каријес. У САД, 50 % свих сталних зуба буде изгубљено због пародонтопатије. Тај проценат је у Индији око 89 % код особа узраста од 30 година. Посматрајући географску заступљеност пародонтопатије може се установити већа заступљеност у Израелу, Јемену, северно-афричком региону, југо-азијском, као и земљама Медитерана, где је већа преваленца у односу на остатак Европе. У земљама источне Азије, као што су Јапан и Јужна Кореја инциденца пародонтопатије је најнижа у свету (*Lindhe, 2004*).

У нашој земљи је највећа епидемиолошка студија, позната под називом „Београдска студија“ (*Djajic u cap., 1988*) вршена у периоду од 1982-1985. године, у којој је прегледано 45056 особа свих узраста, од којих је 43143 било са зубима. Ова студија обухватила је распрострањеност, карактеристике и специфичности обољења уста и зуба. Посебно је испитивана учесталост обољења пародонцијума. Испитивања учесталости обољења према полу су показала да су обољења пародонцијума подједнако заступљена у оба пола и да постоје безначајне статистичке разлике. Од укупног броја жена, 59,8 % је имало неко обољење пародонцијума, а у случају мушкараца, тај проценат је износио 60,2. Испитивања учесталости обољења према узрасту показала су да је учесталост растућа пропорционално годинама старости. Последњих година најобимнија епидемиолошка студија која се односи на процену пародонталног здравља почела је са објављивањем података који указују на значај превентиве пародонталних обољења, као и на велике потребе за лечењем изузетно нарушеног пародонталног здравља.

У проспективној студији пресека (*Dakovic u cap., 2021*) која је изведена у периоду 2017. до 2019. године на узорку од 1411 професионалних војника припадника Војске Србије, старосне доби 19-64 година, праћено је пародонтално здравље и потребе за

лечењем пародонцијума. Добијен је податак да само 3% укупно испитиване популације има здрав пародонцијум, а највећи проценат испитаника (42,7%) имао је зубни каменац.

Сви ови подаци указују на изузетно високе потребе за лечењем пародонцијума како на глобалном нивоу, тако и код нас. Буџетска оптерећења ће се са годинама повећавати, док се не имплементирају озбиљни превентивни програми и националне стратегије, јер треба имати на уму чињеницу да се код пацијената са гингивитом не развија увек пародонтопатија и да се третман гингивитиса сматра примарном стратегијом превенције пародонтопатије и секундарном за рекурентну пародонтопатију (*Chapple u cap., 2015*).

1.3. Етиологија и патогенеза пародонтопатије

Напредак у разумевању етиологије, епидемиологије и микробиологије флоре пародонталног џепа, револуционарно је променио терапијске стратегије за управљање прогресијом пародонталне болести. У раној фази болести (гингивитис) инфламација је ограничена на гингиву, али се у пародонтопатији, током развоја болести шири на дубља ткива, што доводи до отока гингиве, крварења и неугодног задаха. У касној фази болести, потпорни колаген пародонцијума је дегенерисан, алвеоларна кост почиње да се ресорбује и гингивални епител мигрира дуж површине зуба формирајући пародонтални џеп. Ова последица пародонтопатије представља њен идентитет и сигуран знак њеног постојања (*Haffajee u Socransky 1986*).

Пародонтални џеп као патогномични знак пародонтопатије, у зависности од тока напредовања болести ограничен је са једне стране кореном зуба, а са остале четири стране меким ткивом. Оваква средина пружа идеалне услове за пролиферацију микроорганизама: пре свега Грам негативне, факултативне анаеробне врсте (*Vyas u cap., 2005*). Погодни услови за опстанак пародонталног џепа и самог садржаја који се односи на бактерије повезане са болешћу, погодују јачем потенцијалу за наставак деструктивне фазе. У овој фази неопходно је опсежно лечење, јер у противном зуби могу бити изгубљени. Стога се уклањање субгингивалне инфекције и уклањање пародонталног џепа сматра приоритетом у лечењу пародонтопатије (*Kaplish u cap., 2013*).

Chapple је са својим тимом истраживача дошао до података који се односе на чињеницу да најважнији фактор ризика за настанак пародонтопатије представља накупљање бактеријског биофилма на ивици и испод ивице гингиве, што је касније повезано са непримереним и деструктивним запаљенским имуним одговором домаћина (*Chapple u cap., 2015*).

Симбиотске бактерије су присутне у сваком тренутку у конфигурацији биофилма, али се ова бактеријска асоцијација временом мења увођењем вирулентнијих сојева. Грам негативне анаеробне бактерије и други патогени се постепено бројчано повећавају и почињу да мењају природу биофилма. Супрагингивални плак садржи више аеробних сојева, а такође делује и као бактеријски резервоар за субгингивални плак (*American Academy of Periodontology Research, 2005*). Субгингивални биофилм се може развити у заједници у којој је бактеријска популација у могућности да мигрира од сулкусне регије у правцу пародонталних ткива, формирајући на тај начин биофилм ткива. Три до дванаест недеља након што започне формирање биофилма, субгингивни биофилм постаје добро диференцирана, структурирана заједница, која садржи углавном Грам-негативне анаеробне бактерије (*Lovegrove, 2004*). Више од 300 врста микроорганизама идентификовано је у пародонталним џеповима, од којих је између 30-40 врста повезано са пародонтопатијом. Три бактерије *P. gingivalis*, *T. forsythensis* и *T. denticola* су најчешће установљене на оболелим местима и оне представљају такозвани „црвени комплекс“, јер њихово присуство у пародонталним просторима сигнализира да се ради о веома озбиљном, прогресијентном облику болести (*Socransky u cap., 1998*).

Ризик од настанка болести може се проценити мерењем броја бактерија за ове високо вирулентне бактерије, савременим методама *RT-PCR* (engl. *real time - polymerase chain reaction*) (*Yoshida u cap., 2005*). Ова метода практично представља и скрининг тест за рано откривање и потврду настале пародонтопатије. У цревикуларној (гингивалној) течности (*GCF - gingival crevicular fluid*), која се налази у простору пародонталног цепа, долази до перманентног ослобађања бројних бактеријских производа (*Yoshida u cap., 2012*). То су пре свега хистиолитички ензими, ендо- и егзотоксини који ометају нормално функционисање ћелија. Од њих су колагеназа и друге протеазе које бактерије ослобађају у пародонталном цепа повезане са основним карактеристикама пародонтопатије, као што је опсежно уништавање колагена и везивног матрикса (*Kuramitsu, 1998*).

Бактеријски липополисахариди такође могу да индукују уништавање алвеоларне кости (*Myata u cap., 1997*). Оралне бактерије ослобађају метаболите ниско-молекуларне тежине, попут сулфида, који се сматрају цитотоксичним молекулима у пародонцијуму (*Socransky u cap. 1998*). С друге стране, неке бактерије могу да инактивирају одређено антитело, што им омогућава да спрече сопствену смрт узроковану фагоцитозом. *A. actinomycetemcomitans* производи леукотоксин који специфично убија хумане леукоците (*McArthur u cap., 1981*). Дакле, неке бактерије могу инхибирати нормални имунолошки одбрамбени систем домаћина, и управо је етиолошка важност у чињеници да бактерије индукују механизме имуног одговора који уништавају пародонтално ткиво (*Yoshida u cap., 2012*).

1.4. Остали етиолошки фактори у настанку пародонтопатије

Kinane и сарадници су 2009. године представили пародонтопатију као мултифакторну болест са микробијалним зубним плаком као покретачем пародонталних тегоба (*Kinane u cap., 2009*). Међутим, на манифестацију и напредовање пародонтитиса утиче широк спектар одредница и фактора, укључујући субјективне карактеристике, социјалне факторе и факторе понашања, системске факторе, генетске факторе, факторе положаја зуба, микробну композицију зубних наслага и друге факторе ризика у настајању (*Nunn, 2003*). Проучавање утицаја старосне доби на настанак и развој пародонтопатије у развијеним земљама, чини се занемарљивим у односу на улогу денталног плака (*Abdellatif u Burt, 1987*). Међутим, у већини епидемиолошких студија спроведених на глобалном нивоу, забележени су значајни односи између социоекономског статуса и пародонталне болести који се односе на чињеницу да ниска примања или ниско образовање у популацији доприносе лошем статусу и настанку пародонталне болести (*Borrell u cap., 2004*).

Распрострањеност пародонталних обољења у земљама такође се разликује у зависности од расе или етничке групе у погледу преваленције и тежине (*Borrell u cap., 2002*). *Beck* и сарадници су 1990. године показали да групе припадника црне расе имају три пута већи ризик за настанак узнапредовалих облика пародонталних оштећења од припадника беле расе (*Beck u cap., 1990*). Описано је да веома важну улогу на имуни одговор домаћина током настанка пародонтопатије има генетски фактор у току пародонталне болести (*Mark u cap., 2000*). Код пацијената са Дауновим синдромом који имају измењен имунолошки одговор, показана је повећана производња простагландина и *ММР*- матрикс металопроотеиназе, што апсолутно подржава значај генетске компоненте у напредовању пародонталне болести (*Tsiligardis u cap., 2003*). Такође, у генетским истраживањима су идентификовани специфични генотипови који се доводе у везу са пародонталном деструкцијом (*Heunig u cap., 1999*). Полиморфизам *IL-1 α* , *IL-1 β* , и *IL-1RN* генотипова може бити потанцијални фактор ризика за настанак пародонтопатије. *Soscolne* и сарадници су 2002. године показали да полиморфизам *TNF- α* (*Tumor necrosis factor*) - гена, може такође бити фактор ризика за пародонтопатију (*Soscolne u cap., 2002*). Везу са

настанком пародонтопатије у јапанској популацији показао је функционални полиморфизам имуноглобулина G (IgG) Fc γ рецептора (*Kobayashi u cap., 2001*).

Дистрибуција пародонтопатије у односу на пол у вези је са променама у нивоима полних хормона, који могу појачати одговор на бактеријски плак и појаву гингивитиса. *Koreeda* и сарадници су 2005. године проучавали утицај полних хормона и закључили да хормони модификују одговор домаћина. Експериментално истраживање показује да повећани нивои естрогена могу утицати на развој упале гингиве, губитак припојног епитела, остеопеничне и остеопоротичне процесе код жена (*Koreeda u cap., 2005*).

Посматрајући утицај системских обољења показано је да особе са дијабетес мелитусом имају већи ризик за оболевање од пародонталне болести, која се сматра шестом компликацијом дијабетеса (*Taylor u cap., 2001*). Разлог повећаног ризика од пародонталне болести код ових пацијената је у васкуларној абнормалности (микроангиопатија), као и променама у гингивалној течности, односно абнормалној активности колагена. Све ово може довести до губитка припојног епитела (*Genco, 1996*). Инсулин зависни и инсулин независни пацијенти оболели од дијабетеса имају подједнак ризик да оболе од пародонтопатије. У ком обиму и тежини ће се појавити оштећења пародонцијума код ових пацијената, зависи директно од метаболичке контроле основне болести (*Tervonen u cap., 1993*). Ризик за напредовање пародонтопатије је већи у случају лоше гликемичке контроле која доводи до значајно већег губитка алвеоларне кости у поређењу са добро контролисаном гликемијом (*Taylor u cap., 1998*). Студија *Thorstensson* и сарадника из 1995. године показала је да се добра и ефикасна терапија пародонтопатије позитивно одражава и на контролу дијабетес мелитуса (*Thorstensson u cap., 1995*).

Постојање системских болести доводи до употребе лекова који могу увећањем гингиве утицати на развој пародонталне болести (*Nunn, 2003*). Највећи фактор ризика за прекомерни раст гингиве изазван применом антиепилептика фенитоина је плак, који се у таквом окружењу дуже задржава на површинама око зуба, подвлачећи се под већ увећану гингиву. Циклоспорин са имуносупресивном активношћу представља фактор ризика за прекомерни раст гингиве који подсећа на повећање гингиве изазвано фенитоином (*Krall 2001*). Терапија стероидима повезана са остеопорозом представља компромитујући фактор за алвеоларну кост (*Wactawski-Wende, 2001*).

Оралне манифестације код ХИВ инфицираних пацијената такође могу довести до појаве или погоршања пародонталног статуса (*Winkler u cap., 1989*). Студија *Beck* и *Offenbacher* из 2001. године указује на значајну повезаност кардиоваскуларних болести и пародонтопатије. Истраживана је присутност оралних бактерија у атероматозном плаку и добијен је позитиван налаз за *P. gingivalis* и *Str.sanguis* у неколико узорака ткива каротидне артерије (*Lindhe, 2004*).

Студије показују и повезаност пародонтопатије са реуматоидним артритисом (*Mercado u cap., 2001*). У неколико студија о примени вишефакторских аналитичких модела (*Taylor, 2001; Grossi, 1996*) установљено је да нездрави животни стилови имају значајније ефекте на ризике за настанак, али и терапију пародонтопатије од неких хроничних болести. Пародонтопатија има факторе ризика неуобичајене за друге незаразне болести. У том смислу, фокусирање на уобичајене факторе ризика у понашању и животној средини могло би бити од кључне важности за ефикасну превенцију пародонталних болести (*Petersen и Ogawa, 2005*).

Студије су показале да код одраслих у САД пушење чини више од половине пародонталних случајева (*Tomar и Asma, 2000*). Пушачи чине већину случајева рефракторне, упорне пародонтопатије и пушење као јак фактор ризика за пародонталне болести, представља лош прогностички аспект за лечење ове болести (*Palmer u cap., 1999*).

Нека опсежна истраживања такође указују да је прекомерна конзумација алкохола повезана са повећаном озбиљношћу како за настанак, тако и за терапију пародонталне болести (*Tezal u cap., 2001; Pithipat u cap., 2003*).

Студија спроведена у Јапану 2001. године показала је да гојазност, као и исхрана богата засићеним масним киселинама и немлечним шећерним киселинама, односно исхрана са ниским садржајем полнезасићених киселина, влакана и витамина А, Ц и Е, тешким дефицитом витамина Ц и неухрањеност могу погоршати стање пародонталне болести (*Saito u cap., 2001; Moynihan u Petersen, 2004*). Стрес, животне околности и животни догађаји повезани су са пародонтопатијом покретањем физиолошких одговора који повећавају осетљивост на пародонталне болести (*Croucher u cap., 1997*). Фактори који такође могу утицати на развој пародонтопатије могу се односити на анатомију алвеоларне кости, анатомију зуба (*Hou u Tsai, 1987*), позицију зуба (*Eismann u Prusas, 1990*), као и на јатрогене факторе (маргинални завршеци пломби, круница, разни ортодонтски радови) (*Lang u cap., 1983*).

Новооткривени фактори ризика доводе у везу кардиоваскуларна обољења и појаву пародонтопатије. С-реактивни протеин (*CRP*), који је присутан код оболелих од кардиоваскуларних обољења, је такође присутан у повишеним концентрацијама код оболелих од пародонтопатије у односу на здраве особе (*Noack и Genco, 2001*).

Истраживања *Cutler* и сарадника из 1999. године показала су значајно повишен ниво липида у серуму (холестерол, триглицериди, *HDL, LDL*) пацијената са пародонтопатијом и указала на његову корелацију са овом болешћу.

1.5. Дијагностички потенцијал биомаркера у саливи и *GCF* код пацијената са пародонтопатијом

Пародонтална болест обухвата читаву групу биолошких појава које се јављају у гингивалном сулкусу, пукотини између гингиве и зуба. Она се развија као резултат деловања бактерија и квалитативне промене у њиховој флори. Иницирање, активност и сама тежина деструкције ткива код пацијената са пародонтопатијом је у корелацији са динамичким променама и интра-оралном транслокацијом различитих патогена. Салива се сматра микробиолошким резервоаром који учествује у преносу бактерија (*Greenstein и Lamster, 1997*). Показана је корелација између саливарне бактеријске флоре и другим флорама усне дупље (*Aas u cap., 2005*). *Paster* и сарадници су показали да откривање одређених бактеријских врста у саливи одражава њихово присуство на језику, унутар зубних наслага, као и унутар пародонталних цепова (*Paster u cap., 2006*).

Пародонтопатија је болест са веома дефинисаним и јасним знацима, која се може добро дијагностиковати визуелно и пародонталним сондирањем и рентгенограмом. Многе студије су описале корелацију између присуства пародонталне болести и маркера саливе повезаних са тим стањем. Међутим, веома мали број стоматолога жели да их уврсти у своје ординације, јер клиничару не говоре много више од конвенционалних дијагностичких алата који се тренутно користе за преглед пацијената са пародонтитисом. Оно што недостаје дијагностици пародонталне болести јесу биомаркери који предвиђају почетак и прогресију болести. Ако би маркер (или маркери) из саливе (било једноставним присуством или на одређеном прагу концентрације) могао да се идентификује пре почетка активне болести, тада би потенцијално постојао дијагностички алат који би могао да постане стандард неге у пружању пародонталног лечења. До сада је најбољи предиктор крварење приликом сондирања. Међутим, ова процедура је праћена са више лажних позитивних резултата.

Идентификација маркера који карактеришу прелаз између гингивитиса и пародонтитиса била би велико откриће у смислу откривања случајева гингивитиса код којих постоји ризик од преласка у пародонтитис. Комбинована анализа протеинских,

геномских, микробних и других индикатора је неопходна у идентификацији читавог сета биомаркера, који поседују најповољнију комбинацију осетљивости, поновљивости и корелације са утврђеним дијагностичким критеријумима. Као апсолутно неинвазивна технологија, дијагностичке методе из сливе се сматрају изузетно атрактивним, јер су ови биомаркери веома осетљиви молекули који се могу користити у вршењу контроле над оболелима (*Zhang u cap., 2009*).

Традиционални дијагностички поступци за пародонталне болести су ограничени за процену тренутног стања болести (*Taba u cap., 2005*). У циљу побољшања клиничког стања код особа са пародонтопатијом постоји потреба за развојем нових дијагностичких тестова који могу открити присуство активне болести, будуће напредовање болести и проценити одговор на пародонталну терапију. Напредак у оралном и пародонталном дијагностичком истраживању креће се ка методама помоћу којих се пародонтални ризик може идентификовати и квантификовати објективним мерама као што су биомаркери (*de Souza u Taba, 2004*). Биомаркери обољења играју важну улогу у дијагнози, процени исхода лечења и откривању лекова. Да би се разумела њихова улога у рутинској пракси, мора се разумети њихов однос према механизму прогресије болести и терапијској интервенцији.

Пародонтне дијагностичке методе су данас ограничене само на параметаре који процењују пародонталну деструкцију. Упркос једноставности употребе, ови параметри не пружају процену болести у реалном времену и нуде веома малу и ограничену прогностичку вредност (*Giannobile u cap., 2009*).

Тестови засновани на оралној течности открили су присуство пародонтопатогена и њихових ензима, медијатора запаљења и производе разградње ткива (*Kinney u cap., 2011*). Међутим, с обзиром на сложену природу пародонталне болести, мало је вероватно да постоји јединствени биомаркер за откривање и предвиђање болести (*Loo u cap., 2010*).

Zhang (Zhang u cap., 2016) је 2016. године описао пародонтитис као локалну инфламаторну болест мултифакторског карактера, са флукуацијама у бактеријском оптерећењу, системским имунолошким одговором домаћина и уништавањем ткива. У сливи се могу открити различити фактори пародонтитиса изведени од домаћина, који пружају важне информације у вези са статусом пародонталних ткива.

Већина студија фокусира се на биомаркере, који имају потенцијални дијагностички значај (*Miller u cap., 2010*) релевантан за три важне биолошке фазе пародонталне болести:

1. добро познати маркери: C-реактивни протеин, *IL-1 β* , *IL-6*, *TNF- α* - укључени у упалну фазу;
2. матриксне металопроотеиназе: *MMP-8* и *MMP-9* - укључене у фази разградње везивног ткива и
3. алкална фосфатаза, активатор рецептора *NF- κ B* лиганда и остеопротегерин - укључени у фази обнављања коштаног ткива.

Међутим, бројна истраживања показују и укљученост других биомолекула попут хистамина, хромогранина А, мелатонина и деривата *NO* који су повезани са периодонталним бактеријским оптерећењем и тежином пародонтитиса, као и да се неки од њих обнављају нехируршком интервенцијом (*Bertl u cap., 2012; Bertl u cap., 2013; Andrukhov u cap., 2013*).

У самој пародонталној дијагностици гледишта су се мењала како би се задовољио напредак постигнут у микробиологији, биохемији, имунологији, молекуларној биологији, генетици и биологији везивног ткива (*Armitage, 2000*). Биолошки медији за откривање биомаркера пародонталне болести су *GCF*, слива, серум, субгингивни плак и биопсија ткива.

1.6. Салива као извор биомаркера за пародонтопатију

Салива је јединствена орална течност коју чине продукти смеше главних и малих пљувачних жлезда, али укључује и састојке изведене из *GCF*, бронхијалне секреције, серум, крвне ћелије из оралних рана, као и бактерије и бактеријске производе, вирусе и гљивице, десквамиране епителне ћелије и остатке хране (*Tsuchida u cap., 2012*). Поред тога, салива као огледало оралног и системског здравља представља дијагностичку течност за болести повезане са усном дупљом због многих предности у односу на друге дијагностичке телесне течности. Иако *GCF* има више дијагностичких предности, тестови за пародонталну болест на основу узорака из гингивалне пукотине нису добили широко одобрење клиничара. Разлози за то су дуготрајно и вишеструко узимање узорака, контаминација крви и нереална очекивања у погледу тачности тестова. Са друге стране, прикупљање и анализа биомаркера саливе нуди решење неких проблема својствених узорковању *GCF*. Саливарна течност је лакше доступна, обилна, узоркује се у много већој количини без потребе за клиничким објектима и за правилно узорковање нису потребне сложене вештине. Поред тога, салива поседује елементе који одражавају активност свих пародонталних места, па стога њен садржај представља консензусни статус запаљења усне дупље, а не само активних оболелих места као код *GCF* анализе (*Jaedicke u cap., 2016*). На основу свега наведеног, дијагностика саливе нуди једноставан, брз и сигуран приступ откривању болести, што такође олакшава укључивање у клиничка испитивања. Додатно, дијагностика саливе је неинвазивни, осетљиви, специфични и корисни тест који помаже у скринингу велике популације и нуди потенцијал за предвиђање напредовања или стабилности пародонталне болести.

Обзиром да представља производ лучења пљувачних и мукозних жлезда, салива има веома важну улогу у одржавању свеукупног здравља и оралне хигијене (*Edgar, 1992*). Поред чињенице да је саливарна течност веома лако доступна, сакупља се неинвазивном методом и садржи локалне производе медијатора микроорганизама и одговора домаћина. Током последње три деценије, салива се све чешће користи као дијагностичка течност за детекцију ризика од каријеса (*Bratthall u cap., 2005*), периодонтитиса (*Christodoulides u cap., 2007*), карцинома усне дупље (*Li u cap., 2004*), карцинома дојке (*Streckfus u cap., 2000*), болести пљувачних жлезда (*Hu u cap., 2009*) и системских поремећаја, као што су хепатитис и присуство хуманог вируса имуно-дефицијенције (ХИВ) или вируса хепатитиса Ц (*Yaari u cap., 2006*). Због присуства високо обогаћеног садржаја протеина, генетских молекула и локално и системски изведених биомаркера пародонталне болести који се могу анализирати у саливи, она представља кључни дијагностички медијум за дефинисање и праћење пародонталне болести.

Thomas и сарадници су 2009. године лонгитудинално пратили профиле биомаркера саливе код пацијената у односу на пародонтални статус и утврдили да ови биомаркери представљају статус пародонталне болести у току времена. Један од најперспективних кандидата за дијагнозу и предвиђање напредовања пародонталне болести у саливи је *MMP-8*. Такође, *IL-1 β* и фактор раста хепатоцита су најснажнији саливарни биомаркери за пародонталне болести који су проучавани до сада. Много су испитивани и маркери оксидативног стреса, тако да су *Novakovic* и сарадници 2014. године показали да нехируршка пародонтална терапија утиче на укупан антиоксидативни капацитет у саливи.

Несумњива је чињеница да је биохемијска анализа саливе посебно важна у стоматологији. Конституенти пљувачке који су проучавани као потенцијални дијагностички биомаркери за пародонталну болест укључују локално продуковане протеине домаћина и бактеријске продукте (*Kaufman u Lamster, 2000*). Ензими, протеини и други инфламаторни медијатори који потичу из домаћина или бактерија имају велики потенцијал као биомаркери саливе у дијагностици пародонталне болести.

У саливарној течности су идентификовани специфични биолошки маркери за три кључна патогена процеса у пародонталној болести, као што су инфламација, деградација колагена и оштећење коштаног ткива. Финални резултат је скупљање неутрофилних полиморфонуклеарних леукоцита, моноцита и активираних макрофага, као и ослобађање бројних цитокина који даље покрећу процесе запаљења. Као последица ових процеса активирају се *MMP* које уништавају колаген, док се остеокалцин ослобађа у околно ткиво и транспортује кроз *GCF* у пародонтални џеп (*Taubman u cap., 2005*). Показало се да су вишеструки медијатори у овом процесу у корелацији са појавом болести, тако да би могли имати дијагностичку вредност. Међу овим медијаторима, *MMP* су кључни покретачи деградације екстрацелуларног матрикса повезаног са пародонталном болешћу. Промена концентрације *MMP-8* је директно повезана са пародонталним статусом и користи се као индикатор пародонтопатије (*Miller u cap., 2006*).

Пре нешто више од 10 година, конзорцијум од три истраживачке групе (*Denny u cap., 2008*) објавио је студију о укупно 1166 идентификованих хуманих протеина у саливи, који су укључени у бројне молекуларне процесе - од структурних функција до ензимских/ каталитичких активности. Идентификација ових протеина пружа информативну базу за транслациона и клиничка истраживања саливе.

Потенцијални биомаркери саливарне течности могу пружити веома важне корисне дијагностичке информације и користити се као тестови за скрининг дијагнозе, прогнозе и предвиђања прогресије пародонталне болести.

1.7. *GCF* као извор биомаркера за пародонтопатију

Познато је да у *GCF* постоји више од 90 различитих компоненти које су истражене као дијагностички и прогностички маркери прогресије пародонталне болести: инфламаторни медијатори, маркери оксидативног стреса, ензими изведени од домаћина, производи разградње ткива, медијатори коштане хомеостазе и фактори раста.

Међу биомаркерима у *GCF* као дијагностичких и прогностичких маркера прогресије пародонталне болести су и алкална фосфатаза, бета-глюкоронидаза и катепсин Б, који чине више од 77% тачности дијагностике у предвиђању активности пародонталне болести. Студије су показале да су *MMP-8* и *-9*, неутрофилна еластаза и дипептидил пептидазе у корелацији са идентификацијом и активношћу пародонталне болести (*Loos u Tjoa, 2005*).

Састав *GCF* је познат више од 100 година као јединствени прозор за анализу пародонталног стања и представља физиолошку течност и инфламаторни ексудат. Потиче из крвних судова у гингивалном везивном ткиву, суседних епителних ћелија слузнице дентогингивалног простора који продире кроз оштећено меко ткиво пародонталног џепа (*Griffiths, 2003*). У састав *GCF* улази сложена комбинација молекула који потичу из крви, ткива домаћина и субгингивалног биофилма, укључујући: леукоците, протеине, ензиме, производе разградње ткива, запаљенске медијаторе и цитокине произведене локално као одговор на бактеријски биофилм (*Armitage, 2000*). Сходно томе, *GCF* се сматра најперспективнијим извором показатеља биохемијских болести, јер нуди велики потенцијал који одражава одговор ћелија и ткива пародонцијума. *Zelko, Mariani* и *Folz* су 2002. године пронашли укупно 327 *GCF* протеина код пародонтално здравих особа. Касније студије су показале да је у узорцима *GCF* идентификовано до 432 различитих протеина (*Silva-Boghossian u cap., 2013*).

Количина *GCF* се повећава са повећањем запаљења пародонцијума, тако да је запремина *GCF* општи показатељ упалног процеса. Запремина *GCF* је важна и за процес израчунавања нивоа концентрације биомаркера у узорку *GCF*. Главна улога *GCF* као извора биолошких маркера је специфична природа узорка и садржи широк спектар

молекула изведених од домаћина који чине релевантне показатеље ризика настанка болести.

1.8. Биомаркери оралне течности у дијагностици пародонталне болести

Биомаркери из различитих биолошких медијума представљају стандард за лечење пародонталног обољења. Радови показују да се у основи оштећења пародонталног ткива налази оксидативни стрес дефинисан повећањем реактивних врста кисеоника и смањењем нивоа антиоксиданата у *GCF* (*Chapple u cap., 2017*). *Ghallab* и сарадници су 2016. године потврдили присуство маркера оксидативног стреса у *GCF* пацијената са хроничним пародонтитисом. Резултати спроведене студије показују да су вредности *TAS* снижене у *GCF*, а повишене у саливи пацијената са пародонтопатијом у односу на здраве испитанике. Разлика у вредностима тоталних антиоксиданаса у различитом медијуму (салива, *GCF*) може бити један од маркера за појаву и ток болести код ових пацијената. *Hendek* и сарадници су 2015. године показали значајно побољшање редокс равнотеже након примене нехируршке пародонталне терапије код оболелих.

Друга група аутора (*Sakallioğlu u cap., 2015*) бавила се испитивањем фактора раста у *GCF* код пацијената са пародонталном болешћу. Сугерисано је да би промене нивоа *TGFβ* у *GCF* могле корисно утицати на праћење регенерације пародонта, али и предвидети ток и напредовање пародонтитиса. Са друге стране, васкуларни ендотелни фактор раста привукао је велику пажњу као потенцијални индуктор ангиогенезе који се може сматрати биомаркером прогресије пародонталне болести. Фактор раста хепатоцита има такође важну улогу у напредовању пародонтитиса стимулишући раст епителних ћелија и спречавајући регенерацију везивног ткива, због чега се може сматрати још једним биомаркером за активност пародонталне болести.

Персонализована медицина у пародонтологији представља медицински модел који користи генетска, геномска, еколошка и клиничка дијагностичка испитивања за индивидуализацију неге пацијента. Комбинована анализа је потребна да би се идентификовао скуп биомаркера са најповољнијом комбинацијом осетљивости, специфичности, поновљивости и корелације са утврђеним дијагностичким критеријумима. Коришћење овог модела у оралној здравственој заштити, посебно у пародонтологији, има потенцијал да пружи дискриминишуће моделе стратификације пацијената за развијање високо индивидуализоване дијагнозе, прогнозе и персонализованог лечења (*Giannobile, 2012*).

Несумњиво је да ће у скоријој будућности бити откривен персонализовани лек за пародонталне болести који ће анализом саливе добити одговарајуће клиничке одлуке у вези са осетљивошћу на болести, специфичним ризиком од прогресије болести и модалитетима лечења. Такође, предвиђа се и присуство дијагностике у кућним условима која се дефинише као медицинско тестирање у коме пацијенти сами из саливе могу лако дијагностиковати пародонтопатију и у складу с тим посетити свог пародонтолога (*Ji u Choi, 2015*). Ови тестови који се сами изводе треба да убрзају клиничко доношење одлука и праћење напредовања пародонталне болести (*Kaufman u Lamster, 2000*). Тренутно је доступан *MMP-8* имунотест за бочни проток као недавно развијено комерцијално средство за испирање уста. Ово средство се показало као веома практично, погодно и јефтино, траје само 5 минута и користи се за откривање, предвиђање и праћење тока и лечења пародонтопатије.

Анализа протеома подразумева директно проучавање кључних функционалних компоненти биохемијских система, односно протеина. Протеом је протеински комплемент генома, а вредност биомаркера је препозната и доста истражена помоћу протеомских метода. Напредак у технологији протеомике заснован на анализи *GCF*

протеома могао би имати коначну прогностичку и дијагностичку вредност која доводи до идентификације нових биомаркера пародонталног здравља или болести. Протеомска анализа *GCF* у различитим пародонталним условима показује значајне разлике према профилу болести. Узимајући у обзир да би протеински састав *GCF* могао одражавати патофизиологију прогресије пародонталне болести, профили *GCF* протеина добијени од здравих особа могу служити као стандардни *GCF* протеомски обрасци, који би представљали референцу за идентификацију биомаркера пародонталних болести протеомским анализама. Ове студије су показале да би напредак технологије протеомике за анализу и предвиђање биомаркера могао значајно да помогне у стварању поузданих метода у пољу пародонталне дијагностике.

1.9. Слободни радикали и механизам оксидативног стреса

У дијагностици пародонталне болести кључни фактор јесу биомаркери из различитих биолошких медијума. Скорашњи радови *Chapple* и сарадника (2017) су показали да се у основи оштећења пародонталног ткива налази оксидативни стрес дефинисан повећањем реактивних врста кисеоника и смањењем нивоа антиоксиданата у *GCF*, док су *Ghallab* и сарадници 2016. године потврдили присуство маркера оксидативног стреса у *GCF* пацијената са хроничним пародонтитисом.

Оксидативни стрес представља поремећај равнотеже оксидоредукционих процеса у организму који настаје због прекомерног стварања слободних кисеоникових радикала (РОС), које ћелијски хомеостатски механизми нису у стању да неутралишу. Висока реактивност молекулског кисеоника омогућава његово учешће у високо енергетским процесима који се одигравају у ћелијама које садрже митохондрије као месту одвијања процеса оксидативне фосфорилације. Управо способност еукариота да користе кисеоник у својим метаболичким процесима омогућава им релативно ефикасно конвертовање органских супстрата у хемијску енергију. Међутим, употреба кисеоника у метаболичким процесима захтева и оптимално функционисање заштитних механизма против његове токсичности. Слободни кисеоникови радикали и њихова контрола од стране антиоксиданаса (АО), укључени су и у физиолошке процесе и патолошке појаве у току пародонтопатије. Неравнотежа између антиоксиданаса и стварања РОС (оксидативни стрес), сматра се одговорним за развој компликација код пацијената са пародонтопатијом.

Слободни радикали су атоми, јони или молекули који поседују један или више неспарених електрона у својој структури, што их чини веома реактивним. У том смислу, они могу реаговати или међусобно или са другим мање реактивним врстама и покренути низ ланчаних реакција (*Dorđević u cap., 2000*). Као споредни продукти метаболизма у малим количинама се континуирано стварају у ћелијама током различитих физиолошких процеса, између осталих и у процесу апсорпције зрачења, као производи ензимских реакција које катализују оксидазе или у процесима оксидо-редукције у присуству метала променљиве валенце. Такође, стварање слободних радикала се дешава у процесима фагоцитозе, синтезе еикосаноида, биотрансформације супстрата у ендоплазматском ретикулуму, процесима оксидативне фосфорилације у митохондријама, као и липидне пероксидације (ЛПО) незасићених масних киселина.

Новије студије указују на везу између слободних радикала, антиоксиданаса и пародонтопатије (*Sree i Sethupathy, 2014*). Оксидативни стрес као дисбаланс између про-оксиданата и антиоксиданата је стални пратилац пародонтопатије и може бити повезан са почетком и/ или прогресијом деструкције пародонталног ткива и системском инфламацијом (*Asad u cap., 2017*). Ослобађање РОС као што су супероксидни анјон ($O_2^{\cdot-}$), хидроксилни радикал ($\cdot OH$) и водоник пероксид (H_2O_2) доводи до стимулације полиморфонуклеарних (ПМН) леукоцита који индукују стварање супероксидних

радикала путем "респираторног праска". Међутим, повезаност оксидативног стреса и ових компликација још увек није разјашњена, тако да недостају фундаментална схватања у погледу ћелијских, биохемијских и молекуларних адаптивних одговора и у физиолошким и патофизиолошким стањима пародонтопатије.

Постоји неколико предложених механизма могућег оштећења пародонталног ткива који укључују сложени низ фактора изведених из имунолошког одговора, директног бактеријског утицаја и система домаћина као одговора на повреду. Најважнији приступ би био да је у уништавању пародонталних ткива примарни етиолошки утицај ангажовање ензима бактерија и домаћина, укључујући протезе, металопротеиназе и гликозидазе (*Lamont u Jenkinson, 1998*). Поред овог главног узрочног ефекта, важан је и утицај других штетних метаболичких врста, попут РОС-а. Познато је да РОС, посебно активни $\bullet\text{OH}$ радикал, може да разгради низ структурно и метаболички функционалних макромолекула у настојању да уравни своје неспарено електронско стање. *Halliwell* је давне 1978. године показао да су овим процесом нарочито погођени макромолекули као што су слободни и кођуговани протеини, липиди и угљени хидрати, што финално узрокује оштећење саме ћелије. Веома богати извор РОС су ПМН, што поред смањења АО доводи до оштећења ткива.

РОС	Извор	Ефекти
O_2^-	<i>NADPH</i> оксидаза $\text{NADPH} + 2\text{O}_2 \rightarrow \text{NADP}^+ + \text{H}^+ + 2\text{O}_2^-$	Након стимулације бактеријским антигеном, ПМН производе O_2^- у току процеса фагоцитозе
H_2O_2	Реакција дизмутације Спонтана или ензимска, <i>SOD</i> $2\text{O}_2^- + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$	Присуство једног или више неспарених електрона у спољашњој орбитали кисеоника ствара високо токсичне врсте (посебно $\bullet\text{OH}$)
$\bullet\text{OH}$	<i>Haber-Weiss</i> -ова реакција $\text{Fe}^{2+}/\text{Cu}^{2+}$ $\text{O}_2^- + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \bullet\text{OH} + \text{OH}^- + \text{O}_2$ <i>Fenton</i> -ова реакција $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \bullet\text{OH} + \text{OH}^- + \text{Fe}^{3+}$	Неравнотежа између оксидативних/антиоксидативних концентрација удружена са присуством <i>Fe</i> и <i>Cu</i> потенцира стварање високореактивних $\bullet\text{OH}$ што одговара тежем облику пародонталног оштећења ткива
HOCl	Мијелопероксидаза $2\text{Cl}^- + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{HCl}$	Нерадикалска врста, HOCl је веома снажно антимикубно средство и синтетише се преко мијелопероксидазе у току процеса дегранулације
ONOO^-	<i>NOS</i> $\text{L-arginin} + \text{NADPH} + \text{O}_2 \rightarrow \text{N-hidroksi-L-arginin} + \text{H}_2\text{O} + \text{NADP}^+ + \text{H}^+$ $\text{N-hidroksi-L-arginin} + 1/2\text{NADPH} + \text{O}_2 \rightarrow \text{L-citrulin} + \text{NO}^\bullet + \text{H}_2\text{O}$ $\text{NO}^\bullet + \text{O}_2^- \rightarrow \text{ONOO}^- + \text{H}^+ \rightarrow \bullet\text{OH} + \text{NO}_2$	NO^\bullet стварају макрофаги преко <i>NO</i> синтазе у току акутног процеса инфламације преко васкуларног ендотелијума

Слика 1.1. Механизми стварања РОС *in vivo* (модификовано по *Waddington u cap., 2000*)

Екстрацелуларни матрикс се претежно састоји од фибрознних колагених и неколагених мрежа које окружују ћелије и везивним ткивима пружају механичку чврстоћу и физичку потпору. Разградња компонената везивног ткива у току пародонталне болести може довести до губитка структурног интегритета пародонталних ткива.

Прве студије из 1984. године (*Bartold u cap.*) су показале да РОС узрокује деградацију пародонталног екстрацелуларног матрикса. РОС су узроковале смањење специфичне вискозности и молекуларне величине молекула. Касније студије (*Moseley u cap., 1998*) бележе детаљна испитивања разградње гликозаминогликана и протеогликана повезаних са минерализованим и неминерализованим пародонталним ткивима. У оквиру ових *in vitro* студија, протеоглигани и гликозаминоглигани били су изложени широком спектру РОС врста различите реактивности у другачијим временским периодима, у покушају да се открића повежу са *in vivo* ослобађањем РОС од стране ПМН како у иницијалној фази болести, тако и након кумулативног ефекта у периоду активне болести. Студија је показала да сви гликозаминоглигани пролазе деполимеризацију ланца и модификацију остатака у различитом степену, посебно у присуству високо реактивног •ОН (*Moseley u cap., 1997*). Исти аутори су годину дана касније потврдили да ове високо реактивне врсте врше најштетније деградативне ефекте на мале протеоглигане хондроитин сулфата из алвеоларне кости, у поређењу са другим РОС (*Moseley u cap., 1998*). Деградативни ефекти су се манифестовали као модификација аминокиселинских функционалних група, са најочљивијим губитком пролина, леуцина, тирозина и фенилаланина, уз раскидање пептидних веза и деполимеризацију ланца гликозаминогликана. Након излагања протеогликана из ткива гингиве РОС-у потврђени су слични ефекти, што значи да су протеоглигани алвеоларне кости и гингивалног ткива на деловање РОС подложни оштећењу преко истог механизма као и протеоглигани хрскавица.

Иако постоји велики број могућих механизма који доводе до оштећења пародонталних ткива, ипак РОС имају значајну улогу у патологији пародонталних болести. У том смислу, РОС могу имати улогу у директној деградацији компонената везивног ткива и проузроковати промене у њиховој структури, што доводи до губитка функције пародонталних ткива. Такође, РОС могу довести до измењене метаболичке активности везивног ткива, појачавањем или деактивирањем протеолитичке активности, односно изменом активности ћелије (*Waddington u cap., 2000*).

Укљученост РОС-а у формирање и регулацију остеокласта је још један од веома важних фактора у ресорпцији алвеоларне кости током хроничне пародонтопатије (*Silverton u cap., 1999*). Због микроваскуларног снабдевања крвљу пародонталних ткива, поставља се питање способности ПМН да генерише РОС унутар пародонтних цепова.

Студије показују да РОС продукују остеокласти на ивици кости и могу имати улогу у ресорпцији (*Silverton u cap., 1999*). Међутим, студије ресорпције костију сугеришу да одређени РОС, попут О₂•- и Н₂О₂ пре имају улогу у активацији остеокласта, него у директној деградацији коштаног матрикса (*Hall u cap., 1995*), док NO инхибира ресорпцију костију (*Silverton u cap., 1999*). Стварање РОС од стране фагоцитних ћелија током активне пародонталне болести може, према њиховој бактерицидној функцији, имати улогу у стимулацији остеокласта.

Студија *Marton* и сарадника (1993) је показала да су унутар ткивних хомогената повезаних са хроничним апикалним пародонтитисом откривени повећани нивои крајњих производа који су резултат РОС индуковане пероксидације липида у поређењу са узорцима здравих ткива. *Schmidt* и сарадници (1996) су предложили модел у коме пародонтитис повезан са оболелима од дијабетеса има РОС као основни механизам оштећења ткива, услед оксидације компонената ткива и формирања напредних гликационих крајњих производа (AGE) у току хипергликемије. Наиме, ови AGE су били укључени у стварање РОС од стране макрофага.

1.9.1. Липидна пероксидација

Липидна пероксидација (ЛПО) настаје као последица деловања слободних радикала на полинезасићене масне киселине липида, а у мањој мери присутна је у свим ћелијама и ткивима. Бројне ћелијске органеле које садрже мембране чији су саставни део управо липиди, изложене су оштећењима узрокованим неконтролисаним липидном пероксидацијом. На тај начин, доводи се у питање не само функционисање ћелије, већ и њено преживљавање.

Процес ЛПО одвија се у три фазе: иницијација, пропација и терминација, током кога се мења флуидитет и пермеабилност ћелијске мембране, долази до поремећаја транспорта електролита кроз мембрану, смањења електричног отпора и мобилности мембранских протеина.

Са друге стране, познато је да најизраженији негативни ефекат деловања слободних радикала представља управо оксидација вишеструко незасићених масних киселина садржаних у ћелијским мембранама (ЛПО) током које долази до оштећења плазма мембране чији је крајњи производ малондиалдехид (*MDA*) (*Ayala i sar., 2014*). Код пацијената са пародонтопатијом, паралелно са тежином инфламације долази до повећања концентрације *MDA*, односно супстанци које реагују са тиобарбитурном киселином (*TBARS*) и служе као биомаркер пероксидације липопротеина ћелијске мембране (*Tüter u cap., 2001*).

У процесу оксидације липида, незасићене масне киселине подлежу оксидативном оштећењу, при чему су слободни радикали иницијатори и терминатори процеса ЛПО (нарочито $O_2^{\cdot-}$) (*McCord i Frinovich, 1969*). Полинезасићене масне киселине фосфолипидног двослоја ћелијских мембрана су главни циљни молекули за реактивне врсте кисеоника. Процес ЛПО започиње OH^{\cdot} , који се затим наставља низом ланчаних реакција до формирања липидних хидропероксида и алдехида. Акумулација хидропероксида у плазма мембрани и мембранама органела мења флуидност мембране чиме директно утиче на активност мембранских протеина. Као крајњи резултат ЛПО дешава се промена пропустљивости мембране, што доводи до поремећаја метаболизма ћелије, нарушавања њене хомеостазе и финално до ћелијске смрти (*Kruidenier i Verspaget, 2002*).

1.9.2. Реактивне врсте кисеоника

Слободни кисеоникови радикали као секундарни гласници у многим ћелијским сигналним процесима, омогућавају ћелијску хомеостазу, а своју велику реактивност показују просупством једног или више неспарених електрона. Иако је релативно нереактиван у молекулском облику, молекуларни кисеоник (O_2) омогућава развој аеробног живота (*Scandalios, 2005*). Оксидативну моћ O_2 ограничава постојање два неспарена електрона са паралелним спином и могућност везивања само за структуре које поседују електроне са антипаралелним спином. Уклањање спинске рестрикције и повећање реактивности кисеоника омогућено је додавањем електрона или трансфером енергије на O_2 . На тај начин долази до стварања реактивних врста кисеоника (*RVK*). За реактивност свих радикалских врста кисеоника одговорни су неспарени електрони у спољашњој орбитали (*Halliwell и Gutteridge, 1999*). Структуре које садрже флавин и фотосензитивна једињења могу да предају енергију молекулу O_2 , када он прелази на више енергетско стање и настаје нерадикалска форма синглет кисеоник (1O_2), која може

директно пренети енергију на циљне молекуле (ДНК, протеини, липиди) и довести до њихове оксидације (*Scandalios, 2005*).

Кисеоник као крајњи акцептор електрона у респираторном ланцу митохондрија користе сви аеробни организми, при чему настаје основни енергетски молекул аденозин трифосфат (АТФ) (*Buonocore u cap., 2010*). У току процеса респирације, O_2 се комплетно редукује до воде додавањем четири електрона, што се може дешавати поступно уз формирање делимично редукованих интермедијера. Том приликом, једноелектронском редукијом O_2 настаје супероксид анјон радикал ($O_2^{\bullet-}$), двоелектронском водоник пероксид (H_2O_2), а троелектронском хидроксилни радикал (OH^{\bullet}).

Главно место стварања $O_2^{\bullet-}$ у ћелији су комплекс I (*NADH* дехидрогеназа) и комплекс III (цитохром *c* редуктаза) респираторног ланца митохондрија (*Andreyev u cap., 2005*). Знатне количине $O_2^{\bullet-}$ могу да настану и под дејством различитих ензимских система као што су пероксизомална ксантин-оксидаза и мембрански везана *NADPH*-оксидаза (*Buonocore u cap., 2010*). Упркос високом потенцијалу стварања, $O_2^{\bullet-}$ је као примарна РВК веома умерено реактиван, али може додатно да реагује са другим врстама и да ствара секундарне много реактивније врсте. На овај начин, реакцијом између $O_2^{\bullet-}$ и азот оксида (NO^{\bullet}) настаје изразито реактиван пероксинитрит ($ONOO^{\bullet}$) (*Kruidenier u Verspaget, 2002*).

Водоник пероксид (H_2O_2) је слабо реактивни нерадикалски молекул који лако дифундује кроз мембране (*Kruidenier u Verspaget, 2002*). Његово стварање у ћелији омогућено је спонтаном или катализованом дисмутацијом $O_2^{\bullet-}$, или двовалентном редукијом O_2 што је катализовано неким ензимима. У *Fenton*-овој и *Haber-Weiss*-овој реакцији H_2O_2 може реаговати са делимично редукованим јонима метала (Fe^{2+} или Cu^+) (*Valko u cap., 2007*), при чему настаје најреактивнији радикал кисеоника OH^{\bullet} . Овај изузетно реактиван радикал може настати и интеракцијом $O_2^{\bullet-}$ и $HOCl$, Fe^{2+} и $HOCl$, као и реакцијом између H_2O_2 и NO^{\bullet} (*Kruidenier u Verspaget, 2002*). Полуживот OH^{\bullet} је око 10 секунди и он реагује само близу места формирања са другим молекулима, узрокујући велика оштећења ћелија.

У свим ћелијским органелама и компартманима присутне су различите РВК као последица нормалне метаболичке активности које и при ниским концентрацијама имају веома важну улогу у ћелији. Међутим, повећано стварање РВК уз смањену АОХ може довести до оксидативних оштећења ћелијских конституената и тиме узроковати стање оксидативног стреса.

1.9.3. Реактивне врсте азота

Нитрозативни стрес има веома важну улогу у патогенези пародонтопатије и може представљати рани маркер у детекцији инфламације пародонцијума, при чему се улога азот оксида (*NO*) у процесу деструкције периодонталног ткива може пратити мерењем концентрације нитрита и нитрата (NO_2+NO_3) у узорцима саливе и *GCF* пацијената са пародонтопатијом (*Торси u cap., 2014; Вејех-Мир u cap., 2014*).

Азот моноксид је важан сигнални молекул у бројним физиолошким процесима. Синтетише се из *L-arginina* дејством три различите изоформе азот моноксид синтазе и медијатор је бројних физиолошких функција: посредује у регулацији тонуса крвних судова и међућелијској комуникацији. Међутим, као слободни радикал, *NO* може изазвати оштећење ћелије покретањем нитрозативног стреса, што може имати значајне импликације у оштећењу пародонталног ткива. Мада је механизам пародонтопатије посредоване азот моноксидом још увек неразјашњен, бројне студије указују на његову кључну улогу у модификацији функције протеина кроз процесе *C-nitrozilacije* и нитровања тирозина. Он доприноси глутаматној ексцитотоксичности, учествује у фрагментацији органела, инхибише митохондријалне респираторне комплексе и

мобише цинк из унутрашњих депоа. Недавно је указано да може бити медијатор епигенетске генске експресије и промена хроматина. Поред тога, *NO* је кључни посредник у регулацији инфламаторног и имуног одговора ћелије. Са једне стране, *NO* учествује у нисходној регулацији неких аспеката инфламације, али такође испољава и дуалистичке ефекте у запаљенским реакцијама.

NO је слободни радикал који настаје конверзијом *L*-аргинина у *L*-цитрулин уз деловање *NO*-синтазе (*NOS*) (*Torci u cap., 2014*). Као релативно нестабилан у присуству кисеоника, *NO* веома брзо аутооксидаира дајући азотне оксиде. Због реактивности *NO* и његовог кратког полуживота, директна мерења *NO* у ћелијама и ткивима су веома тешка (*Jenkins u cap., 1995*). Нитрати и нитрити су релативно стабилни крајњи производи оксидације *NO* и укупни нивои нитрита и нитрата у биолошким течностима обично се користе за адекватно праћење синтезе *NO* (*Moshage u cap., 1995*).

Описане су три различите изоформе *NOS*, ендотелна *NOS* (*eNOS*), неуронска *NOS* (*nNOS*) и индуцибилна *NOS* (*iNOS*). *eNOS* и *nNOS* ослобађају мале количине *NO* у кратком временском периоду након стимулације рецептора, док *iNOS* производи велику количину *NO* и синтетише се као одговор на бактеријске ендотоксине и цитокине, као што су *IL-1β* и *TNF-α* (*Forstermann u cap., 1994*). За разлику од *eNOS* и *nNOS*, индуцибилна форма ензима делује у патолошким стањима и има оштећујућу улогу у регулацији инфламаторних реакција. Ови штетни ефекти посредовани преко *NO* јављају се у комбинацији са металопротеиназама и колагеназама, које производе активирани макрофаги, полиморфонуклеарне ћелије и фибробласти (*Kendall u cap., 2001*).

Индуцибилну *NO* синтазу (*iNOS*) производе ћелије имуног система попут макрофага индукованих присуством бактерија. *iNOS* је укључена у регулацију инфламаторних реакција (*Nussler u Billiar, 1993*). Познато је да *NO* регулише многе физиолошке ћелијске функције, укључујући агрегацију тромбоцита, имунолошку регулацију и васкуларну релаксацију (*Brennan u cap., 2003*). Показана је повећана активација *iNOS* (медијатора запаљења у ћелијама и нитрозативног стреса) у запаљенским пародонталним ткивима (*Nishikawa u cap., 2012*). Прекомерна производња *NO* може проузроковати уништавање пародонталних ткива (*Batista u cap., 2002*). Као веома важан медијатор запаљења, *NO* показује директне и индиректне ефекте. Директни ефекти укључују хемијске реакције на његов биолошки циљ, док у индиректне ефекте спада дејство *NO* метаболита, односно реактивних врста азота (РНС). Индиректни ефекти се тако могу поделити на нитрозативни стрес и оксидативни стрес (*Pârvu u cap., 2013*). Вишак РОС и смањење нивоа антиоксиданата у ткивима резултирају оксидативним стресом. За индиректне ефекте је одговоран *NO* активиран супероксидом ($O_2^{\cdot-}$) или кисеоником да би се формирале РНС, које затим пролазе узастопне реакције са сродним биолошким циљевима. Нитрозативни стрес такође укључује интермедијере, произведене из нитрозованих тиолних, хидрокси и аминских група (*Caton u Ryan, 2011*).

Баланс редокс потенцијала у живој ћелији представља императив одржавања здравог фенотипа, односно њеног преживљавања. Нитрозативни стрес може озбиљно нарушити ћелијску редокс хомеостазу и, у комбинацији са оксидативним стресом, утицати на ћелијску пролиферацију и диференцијацију. Ефекти *NO* зависе од патолошких стања, његове релативне концентрације, као и окружења у којем настаје. Бројна су испитивања могућности директне трансформације *NO* у редокс активне врсте, као што су нитрозоанијон катјон (NO^+) и нитроксил анијон (NO^-), односно њихових директних ефеката у ћелији.

1.10. Систем заштите од оксидативних оштећења

Повећање концентрације РОС доводи до оксидативног оштећења периодонталног ткива са пратећим антиоксидативним дисбалансом, који се огледа у промени редокс

статуса (укупни антиоксидативни капацитет – *TAS*), као и оштећењу ензимске (супероксид дизмутаза – *SOD*, каталаза – *CAT*, глутатион пероксидаза – *GPx*) и неензимске (глутатион – *GSH*) антиоксидативне заштите (*АОЗ*) (*Begum u cap., 2018; Chang u cap., 2018*).

Досадашњи резултати истраживања показују да су оболели од пародонтопатије много осетљивији на промену равнотеже између оксиданаса и антиоксиданаса (*Brock u cap., 2004; Tsai u cap., 2005*). Такође, на веома значајну улогу оксидативног статуса у патологији пародонтопатије указују и студије које повезују оксидативно/ нитрозативни статус са периодонталним статусом (*Wei u cap., 2010*).

Обзиром да су све структуре ћелије потенцијална мета за оксидативна оштећења, у ћелији су се развили различити механизми заштите од повећане акумулације РОС (*Buonocore u cap., 2010*). Када се наруши равнотежа са антиоксидативним системом, што може бити последица високе концентрације РОС, долази до озбиљних оштећења биолошких молекула. Последица покренутих реакција је читав низ патофизиолошких и патолошких промена, односно финална смрт ћелије. Због тога оксидативни стрес има значајну улогу у патогенези многих компликација које могу настати у току процеса пародонтопатије, а одређивање укупне антиоксидантне активности саливе, односно *GCF* пружа податке о антиоксидативном одговору након присуства оксидативног стреса у пародонталном ткиву. *TAS* као маркер свеобухватне антиоксидативне заштите показује значајно више вредности код пацијената са пародонтопатијом (*Almerich-Silla u cap., 2015*). Мора се имати у виду чињеница да *TAS* рефлектује активност свих антиоксиданаса у саливи, односно у *GCF*.

Антиоксидативна одбрана подразумева ангажовање система у условима нормалног и појачаног стварања слободних радикала (СР) који се према природи и начину деловања могу поделити на ензимске и неензимске антиоксидансе. Ензимске компоненте примарне антиоксидативне заштите где се убрајају ензими супероксид дисмутаза (*SOD*), каталаза (*CAT*), глутатион редуктаза (*GR*) и глутатион-пероксидаза (*GPx*) чине прву линију антиоксидативне заштите – линију фронта, док неензимски антиоксиданси представљају секундарну линију одбране (*Van der Oost u cap., 2003*).

1.10.1. Ензимска антиоксидативна заштита

а) *Супероксид-дизмутаза* (*SOD*, ЕС 1.15.1.1) представља прву линију одбране од РОС и има кључну улогу у заштити ћелије од оксидативних оштећења. То је металопротеин (са редокс активним металом) који преводи високо реактивни радикал $O_2^{\cdot-}$ у мање реактивну врсту кисеоника H_2O_2 и молекуларни O_2 (*Zelko i sar., 2002*). На основу метала који је присутан у активном центру ензима, као и локације у ћелији, разликују се три изоензимске форме:

- *SOD* која садржи бакар цинк (*Cu, Zn SOD*) - превасходно је цитосолни ензим; у малим количинама налази се и у ћелијској мембрани, једру, митохондријама и липозомима;
- *SOD* која садржи манган (*Mn SOD*) - локализована у матриксу митохондрија и
- екстрацелуларна *SOD* (*EC SOD*) - локализована у интерцелуларном простору и екстрацелуларној течности (плазма, лимфа, синовија, ликвор, асцит).

б) *Каталаза* (*CAT*, ЕС 1.11.1.6) је један од најефикаснијих ензима који у живом свету разлаже нерадикалски H_2O_2 до H_2O , чиме се спречава његова дифузија у друге делове ћелије. Каталаза у активном центру има гвожђе Fe^{3+} везано за порфирин хем групу ензима (*Scandalios, 2005*). При концентрацијама нижим од 1 μM , *CAT* показује пероксидазну реакцију и користећи различите доноре водоника (алкохоли, аскорбинска киселина) редукује H_2O_2 . Међутим, при високим

концентрацијама супстрата ($> 1 \mu\text{M}$) *CAT* брзо уклања H_2O_2 кроз каталазну реакцију, при чему је H_2O_2 и дозор и акцептор водоника. У еукариотским ћелијама *CAT* се доминантно налази у пероксизомима, а присутна је и у цитосолу и митохондријама (*Scandalios, 2005*). Улога *CAT* је у пероксизомима од пресудног значаја за заштиту ћелије од оксидативних оштећења јер многи пероксизомални ензими, као и ензимски систем за β -оксидацију масних киселина доводе до стварања велике количине H_2O_2 (*Fidaleo, 2010*).

в) *Глутатион пероксидаза (GPx, EC 1.11.1.9)* је веома важан ензим у систему заштите од оксидативних оштећења. Код еукариотских организама налази се у различитим одељцима ћелије (цитосолу, митохондријама, пероксизомима, интермембранском простору). Као кофактор, *GPx* користи глутатион када катализује редукцију H_2O_2 у H_2O и органских хидропероксида (ROOH) у алкоhole (ROH). Има кључну улогу у примарној одбрани при ниским концентрацијама H_2O_2 јер показује већи афинитет за H_2O_2 у односу на *CAT*, која је значајнији ензим у условима изразитог оксидативног стреса (*Kruidenier i Verspaget, 2002*). То је једини ензим који редукује мембранске фосфолипидне хидропероксиде, прекида процес ЛПО и тако има кључну улогу у ћелијском систему заштите од РОС (*Andreyev i sar., 2005*). Описане су три форме *GPx*:

- селен-зависна глутатион пероксидаза (*Se GPx*),
- селен-независна глутатион-пероксидаза и
- фосфолипид хидропероксид глутатион-пероксидаза (*PH GPx*).

1.10.2. Неензимски антиоксидативни систем

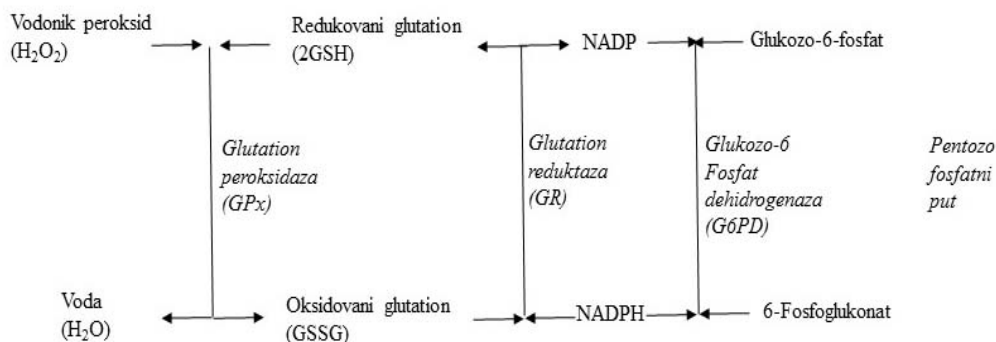
У неензимске компоненте система заштите од оксидативних оштећења убрајају се различита хидросолубилна и липосолубилна једињења. У хидросолубилне неензимске компоненте система антиоксидативне заштите спадају глутатион, *L*-аскорбинска киселина (витамин *C*), мокраћна киселина, албумин, трансферин, билирубин и полиамини, док су липосолубилне компоненте ретинол (витамин *A*), β -каротен (провитамин *A*), α -токоферол (витамин *E*) и убихинон (коензим *Q*).

Међу неензимским антиоксидантима, значајно место припада и металотионеинима (*MT*) који представљају протеине мале молекулске масе укључене у регенерацију ткива и регулацију експресије гена (*Cherian u Kang, 2006*). Показано је да *MT* имају изражену способност уклањања OH^\bullet радикала, као и да остварују антиоксидативну улогу у неутралисању реактивних врста азота (*RNS*) које се везују за цистеин-тиолатне групе *MT* и дају *S*-нитрозо-тиоле (*Misra u cap., 1996*).

Трипептид глутатион (*L-γ-glutamyl-L-cistenil-glicin*) као нискомолекулско тиолно једињење чини 90 % укупних непротеинских сулфхидрилних једињења ћелије и укључен је у бројне метаболичке активности ћелије, између осталих у АОЗ, детоксификацију ксенобиотика, одржавање протеинске структуре и функције, регулацију синтезе и деградације протеина, метаболизам леукотриена и простагландина, редукцију рибонуклеотида, регулацију ћелијског циклуса и генску експресију (*Parris u Kidd, 1997; Dickinson u Forman, 2002*).

У патогенези пародонталне болести, оксидативни стрес је резултат промене редокс равнотеже ћелија и ткива урођеног имуног система, при чему се *глутатион* јавља као главни антиоксиданс, најважнији регулатор у контроли запаљенских процеса и оштећења пародонцијума. Глутатион се синтетише унутарћелијски, деловањем ензима глутамат-цистеин-лигазе (*GCL*) или γ -глутамат-цистеинил-синтетазе (*GCS*) који је ограничавајући фактор у синтези глутатиона и регенерише се каталитичким дејством више ензима у γ -глутамилском циклусу (*Chapple u cap., 1996*). *Глутатион* настаје комбинацијом три

аминокиселине: цистеина, глутаминске киселине и глицина, при чему сулфидрилна или тиолна (*SH*) група у цистеину служи као донор протона и представља ограничавајући фактор у синтези глутатиона.



Слика 12. Оксидација и редуција глутатиона (модификовано по *Bains u Bains, 2015*)

Улога редукованог садржаја *GSH* у регулацији про-инфламаторних цитокина је од велике важности код пародонталне болести (*Bains u Bains, 2015*). Студије су показале да повећање концентрације цитоцолног цистеина блокира H_2O_2 посредовану активацију *NF-kB*, а тиме и проинфламаторне цитокине (*TNF α* , *IL1 β* , *IL-6*) који су директно повезани са активацијом процеса ресорпције костију (*Chapple, 1996*).

Глутатион постоји у две форме, редукованој тиолној *GSH* форми и оксидованој дисулфидној *GSSG* форми (*Parris u Kidd, 1997*). Кључни функционални елемент молекула глутатиона је аминокиселина цистеин, која поседује реактивну *SH* групу и одговорна је за многе функције глутатиона. При нормалним физиолошким условима, више од 98 % интрацелуларног глутатиона је у редукованом стању, док је остатак присутан у ћелији у виду дисулфидне форме *GSSG*, мешаних дисулфида (углавном *GSS*-протеин) и тиоестара (*Wang i Ballatori, 1998*). Оксидовани глутатион у нормалним околностима чини мање од 1 % укупног глутатиона, док у стању оксидативног стреса долази до повећања концентрације *GSSG* (*Brigelius-Flohe, 1999*). Однос *GSH* и *GSSG* одражава редокс статус ћелије од којег зависи смер многих ћелијских реакција (*Buonocore u sar., 2010*). Равнотежа *GSH* и *GSSG* у ћелији регулише одређене метаболичке путеве преко активације или инактивације важних ензима који поседују функционалне *SH* групе (*Valko u cap., 2007*).

Антиоксидативна својства *GSH* су посредована редокс-активном тиолном групом која постаје оксидована када глутатион редукује циљне молекуле. У присуству електрофилних супстанци, као што су слободни радикали и РОС/PHС, глутатион лако оксидује неензимски у глутатион дисулфид (*GSSG*) (*Wu u cap., 2004*). Како глутатион делује као носач електрона, губитком електрона оксидацијом, он постаје оксидован (GS^-), а два таква молекула димеризују преко дисулфидних мостова и формирају глутатион дисулфид или оксидовани глутатион (*GSSG*). Укупни глутатион се састоји од 90% „редукованог облика (*GSH*)“, а нешто мање од 10% постоји у „дисулфидном или оксидованом облику (*GSSG*)“ у здравим ћелијама и ткивима (*Dhivya, 2012*), док значајна количина (15%) укупног глутатиона у ћелијама (*GSH+2GSSG*) може бити везана за протеин (*Wu u cap., 2004*). У нормалним физиолошким условима, однос *GSH/GSSG* који представља показатељ редокс стања ћелије је већи од 10.

У АОЗ, глутатион функционише на више нивоа. Поред тога што је кофактор појединих антиоксидативних ензима, глутатион директно уклања слободне радикалске врсте $\text{O}_2^{\cdot-}$, OH^{\cdot} и ONOO^- , као и липидне радикале и хидропероксиде, регенерише важне неензимске антиоксиданте (аскорбинску киселину, α -токоферол) до њихових активних форми, укључује се у директну поправку оксидативних оштећења молекула ДНК и спречава апоптозу изазвану РВК и цитокинима (*Kruidenier u Verspaget, 2002*). Додатно,

глутатион може да учествује у АОЗ у неензимским реакцијама, захваљујући способности да реагује са органским радикалима (R^{\bullet}) и тако заједно са *SOD* спречава оксидативна оштећења. Најважнија улога глутатиона да као тиолно једињење делује као антиоксидант остварује се директним уклањањем CP кроз неензимску реакцију, глутатион зависном редукијом H_2O_2 и других хидропероксида уз GPx и детоксикацијом ксенобиотика и електрофила уз глутатион S-трансферазу (*Parke u Sapota, 1996*).

Студије показују да се глутатион сматра главним антиоксидансом, веома важним редокс регулатором у контроли упалних процеса, а тиме и оштећења пародонцијума. Код пацијената са пародонтопатијом је потврђено смањење укупног капацитета антиоксидативне заштите у саливи, а регистроване су и ниже концентрације редукованог *GSH* у серуму и *GCT* (*Bains u Bains, 2015*). Терапијска разматрања укључености глутатиона у процесу пародонтопатије, у ограничавању оштећења ткива повезаног са оксидативним стресом, и јачању зарастања рана се не може потценити, али морају бити праћени мулти-центричним рандомизованим контролисаним студијама.

1.11. Улога слободних радикала (CP) у физиолошким и патофизиолошким механизмима

При процени оксидативног/ нитрозативног статуса код хроничне генерализоване пародонтопатије, могу се користити методе директног мерења слободних радикала, али и индиректне методе, које обухватају мерење ензимских и неензимских параметара антиоксидативне заштите, мерење продуката нитрозијације и одређивања CP азота, као и одређивање укупног антиоксидативног капацитета. Сматра се да је за објашњење укључености CP и оксидативних оштећења пародонталног ткива у процесу пародонтопатије, неопходно пратити више различитих параметара уз обавезну анализу ензимских и неензимских антиоксиданаса (*Dotan u cap, 2004*).

Слободни радикали имају способност оштећења готово свих биомолекула у ћелији, нарушавања међумолекулских веза, поремећаја флуидности и пропустљивости ћелијске мембране. У реакцијама са протеинима, липидима или нуклеинским киселинама долази до промена у структури и функцији ових једињења, што доводи до оштећења и смрти ћелије (*Akanmu u cap., 1991*).

Оксидативни стрес је резултат метаболичких процеса у којима се користи кисеоник и представља нарушену равнотежу између прооксидативних и антиоксидативних реакција. РВК могу да интерагују са протеинима, липидима и нуклеинским киселинама и тако доведу до оштећења ових молекула и инхибиције њихове функције. Иако је кисеоник есенцијалан за аеробни живот, може се сматрати и веома токсичним (*Scandalios, 2005*). Познато је да окидачи процеса оксидативног стреса могу бити наследни или индуковани генски дефекти, фактори животне средине, као и метаболичке флукуације (*Andreyev u cap., 2005*).

Оксидативни стрес и продукти ЛПО укључени су у механизам токсичности различитих једињења, као и у патофизиологију многих болести. У умереним концентрацијама, РВК имају бројне физиолошке улоге у ћелији. Међутим, у току покретања инфламаторних процеса у ћелији долази до формирања РВК и уништавања инвазивних патогена. Повећано стварање РВК у фагоцитима представља одбрану од микроорганизама. У интеракцији са цитокинима и бактеријским агенсима долази до активације *NAD(P)H* оксидаза у плазма мембрани неутрофила и макрофага, што доводи до ослобађања велике количине РВК. Формирање $O_2^{\bullet -}$ у фагоцитима има кључну улогу у заштити организма од бактеријских инфекција, док прекомерно стварање РВК у току инфламаторних процеса доводи до оштећења ткива (*Valko u cap., 2007; Buonocore u cap., 2010*).

Са друге стране, РВК имају важну улогу у ћелијској сигнализацији преноса информације из ћелијског окружења до различитих функционалних елемената у ћелији. Окидачи сигналне трансдукције су екстрацелуларни сигнали (хормони, фактори раста, цитокини и неуротрансмитери), који доводе до активације протеин киназа и транскрипционих фактора чија је регулација редокс зависна. Транскрипциони фактори индукују експресију гена укључених у активацију имунског система, као и процесима пролиферације, диференцијације и репарације ћелије, додатно у покретању апоптотичке смрти ћелије и АОЗ (*Valko u cap., 2007*).

РВК имају важну физиолошку улогу као секундарни гласници у ћелији јер су као сигнални молекули укључени у интраћелијску трансдукциону каскаду. Познато је да РВК могу контролисати ниво респираторне вентилације, релаксацију мускулатуре, имунолошку функцију и одговор ћелије на оксидативни стрес (*Dröge, 2002*).

1.12. Терапија пародонтопатије

У терапијском аспекту пародонтопатије током наредног представљања широких могућности, циљано се нећемо освртати на једну од данас широко заступљених, а то је – хируршка терапија пародонтопатије. Разлог за то је што нисмо желели да у тексту презентујемо било какву пластичну поделу терапије, већ што је током овог рада и методолошки акценат био на нехируршкој, каузалној терапији пародонтопатије.

Упркос досадашњим ажурирањима, основни циљеви лечења пародонтопатије остају непромењени: заустављање прогресије болести, очување здравих, стабилних и одрживих пародонталних услова и ако је могуће, обнављање изгубљених ткива. Према концепту терапије узроком, глачање и полирање корена зуба- СРП (*SRP - eng. scaling and root planing*), или по клинички најчешће коришћеном изразу - обрада (киретажа) пародонталног џепа представља “камен темељац” пародонталне терапије (*Graziani u cap., 2017*). Примарни циљ ове терапијске процедуре је уклањање меких и чврстих микробиолошких наслага са патолошки изложених површина корена, чинећи га тако биолошки погодним за поновно спајање са алвеоларном кости, што је основа терапије (*Teles u cap., 2006*). Прихватљива терапијска мера обично се постиже када се усклади лична контрола наслага заједно са професионалним уклањањем наслага, каменца и других локалних фактора (*Rusu u cap. 2015*). У идеалном случају, пародонтална терапија такође треба да смањи или елиминише патогене врсте и њихове продукте који узрокују и/или одржавају пародонтопатију.

Одавно је познато да је обрада пародонталног џепа ефикасна нехируршка пародонтална терапија хроничне пародонтопатије у својој раној фази (*Isidor u cap., 1984*). То је најчешће коришћен пародонтални третман и његови клинички ефекти су добро документовани (*Faveri u cap., 2006*). Многобројне студије су показале да је обрада пародонталног џепа корисна у смислу смањења дубине пародонталног џепа (ДПЦ) нивоа припојног епитела (НПЕ) (*Morrison u cap., 1980; Baderstein u cap., 1984; Lindhe u cap., 1983; Philstrom u cap., 1983; Ramfjord u cap., 1987; Kaldahl u cap., 1993; Haffajee u cap., 1997; Carvalho u cap., 2004, 2005; Colombo u cap., 2005*). Обрада пародонталног џепа је праћена “радом на слепо”, по осећају клиничара у затвореном окружењу, што може онемогућити прецизно уклањање субгингивног биофилма, субгингивалних конкремената и бактеријског дебриса са површина корена и суседног меког ткива. Током СРП, клиничару можда неће бити доступно да адекватно инструментира основу дубоких џепова у 75% површина корена, пре свега због физичке тешкоће коју намеће морфологија пародонталног џепа (*Rateitschak-Pluss u cap., 1992*). Доказано је да се на тим нивоима пародонталних џепова налазе веће количине микроорганизама (*Socransky u cap., 1998*). Изазови након механичког третмана укључују задржавање плака и микроба и у денталним

жлебовима и џеповима као унутар дентиналних тубула и присуство бактерија дифузно у меком ткиву (*Deshpande u cap., 1999*). Неке од студија сугеришу да је и смањење субгингивалног плака клинички кључно у лечењу, док уклањање субгингивалних конкремената није од значаја (*Johnson u cap., 2002*). Међутим, субгингивални конкременти управо обезбеђују места за адхезију бактерија и задржавање плака (*Page, 2004*). Перзистентност пародонталних патогена, попут *Aggregatibacter actinomycetemcomitans (A.a)* и *Porphyromonas gingivalis (P.g)*, који су често пронађени након СРП-а, могу да резултирају поновном колонизацијом микроба и последичним уништавањем пародонталног ткива (*Mombelli u cap., 2000*). Ова ограничења правилне инструментације у неприступачним областима угрожавају ефикасност СРП (*Rateitschak-Pluss u cap., 1992*), довела су до употребе додатних антимикуробних хемотерапеутских средстава као додатак СРП-у, под претпоставком да би такви агенси помогли у лечењу дисбиозе код неприступачних подручја и помогли у спречавању колонизације микроба, промовишући клиничка побољшања (*Barca u cap., 2015*).

1.12.1. Адјувантна терапија пародонтопатије

Утврђено је да је антимикуробна терапија ефикасна у лечењу пародонталне болести и од великог значаја као додатак у лечењу агресивне пародонтопатије, упорне пародонтопатије или где је клинички исход лечења потенцијално угрожен системским здрављем болесника. Постоји научна оправданост употребе локалних антисептика која се огледа у потпори механичкој обради пародонталних простора (киретажа џепова и глачање површине корена зуба), смањењу броја бактерија проузроковача пародонтопатије и смањењу негативних ефеката који могу бити удружени са системском употребом антимикуробних препарата. Систематски прегледи показују значајно боље резултате након комбиноване употребе локалних антисептика и каузалне процедуре, у односу на примену само каузалне терапије (*Hanes i Purvis, 2003*).

Употреба системских антибиотика у лечењу пародонталне болести је углавном започела са пеницилинским препаратима. Остали антибиотици који се користе укључују тетрациклине (тетрацилин, доксицилин и миноциклин) (*Golub u cap., 2001*) еритромицин и клиндамицин и метронидазол (*Palmer u cap., 1999*).

Скорашњи радови показују да упркос брзом развоју додатних локалних формулација пародонталном третману, као што су метформин, антиоксиданти, фотодинамички третман (*Akram u cap. 2018; Castro u cap. 2019; Azaripour u cap. 2018*), хлорхексидин (СНХ) остаје као једно од најефикаснијих локалних антимикуробних средстава и широко се користи за локално лечење пародонтопатије (*Lecic u cap., 2016; Faramarzi u cap., 2017*). У оквиру неких метаанализа, такође су истраживани ефекти употребе локалних антимикуробних препарата на одређене клиничке параметре здравља гингиве и пародонцијума пре и после терапије (*Matesanz-Perez u cap. 2013; Saglam u cap., 2013; Eick u cap., 2013*). Те студије обједињују и међусобно упоређују ефекте азитромицина, хлорхексидина, доксицилина, метронидазола, миноциклина, борне киселине, физиолошког раствора и хијалуронске киселине.

1.12.2. Хлорхексидин

Хлорхексидин глуконат (СНХ) се сматра једним од најчешће коришћених једињења; од 1950. године користи се као снажно антисептично средство широког спектра у медицини са израженим антимикуробним дејством и на Грам негативне и Грам позитивне бактерије, као и на гљивице и неке вирусе. Штавише, способност СНХ да неколико сати инхибира стварање и развој бактеријског плака доказана је 1970-их година због високог афинитета за оралне површине (*Jain u cap., 2015; Aghilli u cap., 2015*). Поред

тога, *CHX* је позитивно наелектрисани катјонски бисбигванид који се може адсорбовати на мноштво негативно наелектрисаних места, укључујући слузокоже, пљувачну пеликулу на зубима, као и неколико компонената биофилма на површини зуба, нпр. бактерије, ванћелијске полисахариде и гликопротеине (*Bidar u cap., 2012; Singh u cap., 2014*). *In vitro* студије су показале да у ниским концентрацијама, *CHX* узрокује уништавање ћелијске мембране, дезинтеграцију ћелијских састојака и последично ћелијску смрт (*Siqueira u cap., 2007*).

С друге стране, већа концентрација *CHX* узрокује преципитацију и коагулацију протеина у цитоплазми изложених микроба. Ова својства ометају стварање биофилма и спречавају његов раст (*Fernandez u cap., 2015*). Употреба *CHX* течности за испирање уста је уобичајена током послехируршког периода зарастања да се побољша контрола плака; након оралнохируршке процедуре, када механичка контрола плака постаје теже изводљива и неадекватна због бола и нелагодности (*Addy u Morgan, 1997*). Међутим, *CHX* као златни стандард антисептика и средстава против плака има и неке конкретне недостатке, као што су појава мрља на зубима и рестаурацијама у боји зуба, измењени осећај укуса и непријатан укус. Сугерисано је да се тежина бојења повећава са већим *CHX* концентрацијама, али само до 0,1% (*Chye u cap., 2019*). Други много ређи нежељени ефекти укључују десквamacију оралне слузнице и оток паротидне жлезде (*James u cap., 2017*). Из ових разлога се саветује да употреба средстава за испирање уста на бази хлорхексидин глуконата не траје дуже од 2 недеље. Међутим, у неким ситуацијама је неизбежна продужена употреба *CHX*, посебно код пацијената са менталним и физичким инвалидитетом (*Chye u cap., 2019*).

Хемотерапеутски раствори за испирање уста имају дејство до 12 сати и уколико се испирање не врши редовно, нема дуготрајног ефекта од њихове употребе (*Zaura-Arite u cap., 2001*). Истраживање раствора хлорхексидин глуконата је показало да је након испирања уста једном дневно, током четири дана микробни састав идентичан као и пре испирања (*Sekino u Ramberg, 2005*). Хемотерапеутик ће током испирања продрети у спољне слојеве зрелог биофилма, док у унутрашњем делу биофилма где је највећа живост бактеријског екосистема то неће бити од утицаја (*Auschill u cap., 2001*). Поред тога, у дубљим пародонталним џеповима се налази највише грам-негативних анаеробних пародонталних патогена и познато је да средство за испирање уста можда неће доћи дубоко у пародонталне џепове (*Eakle u cap., 1986*). Употреба тупе каниле или шприцева са иглом могу побољшати способност хемотерапеутског агенса да продре дубље у место апликације у плитким до умерено дубоким пародонталним џеповима. Поред тога што представљају корисне додатке, хемотерапијска испирања подлежу физичким и биохемијским ограничењима која ограничавају њихову примену у лечењу пародонта. Запремина цревикуларног протока се мења приближно 40 пута за један сат, представљајући ограничење за локално пласиране лекове. Ова стопа се повећава у присуству инфекције, што резултира даљим разблажењем локално испоручених хемотерапеутика (*Eakle u cap., 1986*). Поред тога, *CHX* има висок клиренс из пародонталног џепа, што доводи до субтерапијских концентрација уколико се препарат краткорочно користи, а то резултира недовољном ефикасношћу лечења (*Cosyn u Sabzevar, 2005*).

1.12.3. Колоидни раствор јона сребра

Јони сребра (*JS*) су познати као раствор са јаким инхибиторим и бактерицидним ефектом, као и широким спектром антимикуробних активности, које је доказано у редукацији адхезије бактерија и превенцији формирања биофилма (*El Rafie u cap., 2010; Monteiro u cap., 2009*). Употреба препарата сребра као снажног антисептика је данас врло актуелна. Сребро-нитрат у облику 0,5 % воденог раствора је адстригенс и антибактерик

који је примењен у облику влажних компреса у лечењу инфективних екцема, гравитацијских улкуса и других регија коже инфицираних Грам-позитивним или Грам-негативним бактеријама (*Burkhart u Katz, 2012*). Дуготрајни бактериостатски ефекат сребро нитрата обезбеђује сребро, које се везује за беланчевине ткива и хлориде, тако да формирана једињења постепено ослобађају јоне сребра. У већим концентрацијама може деловати каустички таложењем беланчевина (*Rotenoy i Pain, 2011*). Истраживања указују на позитивне ефекте примене раствора сребро- нитрата у терапији афтозног стоматитиса (*Alidaee i sar., 2005*), док је у *in vitro* истраживањима у концентрацији од 0,5 µg/mL описана његова снажна антимикуробна активност против микроорганизама изазивача пародонтопатије (*Spacciapoli i sar., 2001*). *Straub* и сарадници (2001) су указали на дуготрајно отпуштање јона сребра, преко локално постављених ресорптивних периодонталних нано-носача садржаних у 12 % сребро нитратом у пародонталне џепове.

Будући развој ткивног инжењерства, генске терапије и биофармацеутских производа отвориће пут новим терапијским могућностима у пародонталним обољењима (*Ghallab, 2018*).

Предложена студија ће пратити ефекте примене локалних антисептика (*CHX* и *JS*) на клиничке параметре испитивања гингиве и пародонцијума, као што су плак индекс (*PI*), гингивални индекс (*GI*), индекс крварења гингиве (*IKG*), ниво припојног епитела (*NPE*) и дубина пародонталног џепа (*DPDZ*), као и промене параметара оксидативног и нитрозативног статуса пре и након пародонталне терапије. У пољу пародонталне дијагностике ефекти *CHX* и *JS* биће праћени преко маркера оксидативно/ нитрозативног статуса у биолошким флуидима веома значајним за одређивање степена оштећења пародонталног ткива, као што су салива и *GCF* (*Christodoulides u cap., 2007; Ghallab, 2018*). Према досадашњим сазнањима, нема података из литературе о ефектима воденог раствора *JS* на оксидативно/ нитрозативне параметре у току каузалне фазе терапије хроничне генерализоване пародонтопатије.

2. ХИПОТЕЗЕ И ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА

Имунопатогенетски механизми пародонтопатије су недовољно познати, а о локалном дејству антисептика у оквиру каузалне терапије овог обољења зна се још мање. У овој докторској дисертацији испитивани су потенцијални протективни ефекти воденог раствора јона сребра у поређењу са раствором хлорхексидина. Стога је било неопходно доказати да се у основи оштећења ткива код пацијената са пародонтопатијом налазе оксидативни/ нитрозативни стрес, а да су њихови показатељи били у корелацији са клиничким симптомима пародонтопатије. У складу са тим испитано је да ли је примена воденог раствора сребрних јона једнако ефикасна као хлорхексидин, јер би обзиром на његову бољу подношљивост, примена сребрних јона код болесника са хроничном генерализованом пародонтопатијом показала велики напредак у терапији.

На основу дефинисаног научног проблема постављене су и следеће:

РАДНЕ ХИПОТЕЗЕ

Постоји разлика између болесника који су у оквиру каузалне терапије пародонтопатије користили као адјувантни антисептик јоне сребра, болесника који су користили раствор хлорхексидина и здравих испитаника у:

1. Вредностима клиничких параметара оралне хигијене и стања гингиве пре и након каузалне терапије пародонтопатије изражено кроз плак индекс (*PI*), гингивални индекс (*GI*) и индекс крварења гингиве (*IKG*);
2. Вредностима клиничких параметара здравља пародонцијума пре и након каузалне терапије пародонтопатије изражено кроз ниво припојног епитела (*NPE*) и дубину пародонталног џепа (*DPDZ*);
3. Вредностима параметара оксидативног и нитрозативног статуса у саливи болесника са пародонтопатијом пре и после терапије у односу на здраве испитанике;
4. Вредностима параметара оксидативног и нитрозативног статуса у гингивалној течности болесника са пародонтопатијом пре и после терапије у односу на здраве испитанике.

У циљу расветљавања патогенетских механизма пародонтопатије, као и потенцијалног бољег протективног ефекта воденог раствора јона сребра у поређењу са раствором хлорхексидина на испитивање гингиве и пародонцијума, као и степен оксидативних/ нитрозативних активности у саливи и гингивалној течности пре и након пародонталне терапије, а на основу изложених хипотеза, постављени су следећи:

ЦИЉЕВИ СТУДИЈЕ

Основни циљ студије:

- 1) Утврдити ефикасност раствора јона сребра као адјувантног антисептика на успех каузалне терапије хроничне генерализоване пародонтопатије;
- 2) Утврдити утицај воденог раствора јона сребра као локалног адјувантног антисептика на вредности параметара оксидативног и нитрозативног статуса (концентрација *TBARS*, стварање $O_2^{\cdot-}$, концентрација NO_2+NO_3 , одређивање вредности *TAS*, активност *tSOD*, *CAT* и *GPx*, садржај *tGSH*) у саливи болесника са

пародонтопатијом пре и после каузалне терапије у односу на примењивани раствор хлорхексидина;

- 3) Утврдити утицај воденог раствора јона сребра као локалног адјувантног антисептика на вредности параметара оксидативног и нитрозативног статуса (концентрација *TBARS*, концентрација NO_2+NO_3 , одређивање вредности *TAS*, активност *tSOD*, садржај *tGSH*) у гингивалној течности болесника са пародонтопатијом пре и после каузалне терапије у односу на примењивани раствор хлорхексидина;
- 4) Утврдити корелацију између клиничких параметара оралне хигијене, стања гингиве и пародонцијума са вредностима оксидативног/ нитрозативног статуса у саливи и гингивалном флуиду пацијената са пародонтопатијом пре и после терапије воденим раствором јона сребра, односно раствором хлорхексидина.

3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

3.1. Врста студије

Опсервациона кохортна студија (проспективна).

3.2. Испитаници

Спроведено истраживање представља опсервациону кохортну проспективну студију у коју су укључене особе оболеле од хроничне генерализоване пародонтопатије, као и здрави испитаници старости између 25 до 65 година.

Критеријуми за укључивање испитаника у истраживање били су следећи:

- клиничка дијагноза генерализоване хроничне пародонтопатије уз рендгенолошку потврду о присуству ресорпције алвеоларне кости ($\geq 30\%$);
- испитаници који имају довољан број зуба у горњој и доњој вилици (≥ 20);
- испитаници који имају ≥ 5 страна зуба са пародонталним џеповима чија је дубина $\geq 5\text{mm}$.

Критеријуми за искључење испитаника из истраживања били су следећи:

- испитаници код којих је лечење пародонтопатије спроведено пре више од 12 месеци;
- системска обољења која могу да утичу на терапију пародонтопатије;
- употреба антибиотика и антиинфламаторних лекова у последњих 6 месеци;
- трудноћа, лактација и употреба лекова за контрацепцију;
- системске инфекције усне дупље.

У студију је било укључено укупно 90 испитаника, оба пола, старости од 25-65 година, подељених у следеће групе:

- Здрави испитаници који ће добијати раствор јона сребра (Z_{JS} , $n=20$)
- Здрави испитаници који ће добијати раствор хлорхексидина (Z_{CHX} , $n=20$)
- Пацијенти са парадонтопатијом који ће добијати раствор јона сребра (B_{JS} , $n=25$), а биће праћени на нивоу пре и после терапије (B_{JSpre} , $B_{JSposle}$)
- Пацијенти са парадонтопатијом који ће добијати раствор хлорхексидина (B_{CHX} , $n=25$), а биће праћени на нивоу пре и после терапије (B_{CHXpre} , $B_{CHXposle}$)

Након узимања анамнестичких података и постављања дијагнозе и индикације за терапију пародонтопатије, испитаницима је понуђен формулар о добровољном престанку у учешћу у студији, за коју је претходно добијена сагласност Етичког Одбора Војномедицинске академије (Одлука сед. 13.03.2014. инт. 03/14). Такође, били су праћени следећи клинички параметри: пол, доб, медицинска и стоматолошка анамнеза. Преглед су

обавила два стоматолога, специјалиста пародонтологије и оралне медицине, који су били међусобно усаглашени (ВК и ДД).

Извршено је мерење на свим зубима (трећи молари нису бити укључени) помоћу градуисане сонде (СРITN: US, Williams; Pro – Dentec, Batesville, Ark).

У узорцима саливе и *GCF* одређивани су параметари оксидативног и нитрозативног статуса пре и након пародонталне терапије. У сврху праћења оштећења ћелијских мембрана (липидне пероксидације) одређивана је концентрација *MDA*, односно супстанци које реагују са тиобарбитурном киселином (*TBARS*). Оштећење ћелије индуковано азот оксидом преко покретања нитрозативног стреса било је праћено мерењем концентрације NO_2+NO_3 у узорцима саливе и *GCF*. Такође, у свим узорцима је одређиван *TAS* (*Randox laboratories, Total antioxidant status*), као и садржај укупног *GSH* и активност укупне *SOD*. Поред тога, у узорцима саливе мерено је стварање $O_2^{\cdot-}$, као и активност *GPx* (*Randox Reagents, Glutathione peroxidase*) и *CAT*. Добијени резултати мерења параметара оксидативног/ нитрозативног статуса у узорцима саливе и *GCF* изражавани су на милиграм протеина, тако да је у свим узорцима најпре измерена концентрација протеина методом по *Lowry*-ју.

3.3. Узорци

3.3.1. Варијабле

Независне варијабле у спроведеном истраживању биле су:

- демографске карактеристике испитаника (пол, старост);
- водени раствор јона сребра у концентрацији од $5\text{ mg/ml} - 5\text{ ppm}$ (*Nano Silver Water*[®] наведени препарат сребра је у Републици Србији регистрован за употребу као хигијенско-дијететски суплемент - Институт за хигијену, Завод за превентивну медицину ВМА Београд, бр: 769/06 *Di Lab - Trade doo*, Крушевац, Србија);
- раствор хлоркексидина у концентрацији од 0,2 % (*Curasept ADS 220, 200 ml, Curaden international AG CH*).

Зависне варијабле које су контролисане у спроведеном истраживању биле су следеће:

- Укупна количина меких наслага помоћу Плак индекса по *Silness-Loe*-у пре и после каузалне терапије. Овим индексом је помоћу стоматолошке сонде одређивана дебљина денталног плака на гингивалним трећинама: вестибуларне, оралне, и вестибуларног дела мезијалне и дисталне површине круница свих присутних зуба. Бодовање је вршено скором од 0 – 3 (*Silness and Loe, 1964*).
- Гингивални индекс по *Loe-Silness*-у је коришћен за утврђивање стања гингиве пре и после каузалне терапије. Помоћу њега је оцењивано стање гингиве са вестибуларне, мезијалне, оралне и дисталне стране сваког присутног зуба. Процена је базирана на промени боје, отоку и крварењу гингиве скором од 0 – 3 (*Loe and Silness, 1963*).
- За процену степена крварења гингиве коришћен је индекс крварења гингиве, који је изведен из гингивалног индекса по *Loe-Silness*-у.
- Вредност дубине пародонталног џепа (растојање од ивице слободне гингиве до коронарног дела припојног епитела) пре и после каузалне терапије. Мерење је вршено пародонталном сондом на шест страна зуба (мезио-вестибуларно, вестибуларно, дисто-вестибуларно, мезио-орално, орално, дисто-орално). Вредности су изражене у милиметрима.
- Вредност нивоа припојног епитела пре и после каузалне терапије представља растојање од цементно-глеђне границе до дна пародонталног џепа. Мерено је

пародонталном сондом на шест страна зуба (мезио-вестибуларно, вестибуларно, дисто-вестибуларно, мезио-орално, орално, дисто-орално). Вредности су изражене у милиметрима. Утврђивањем ове вредности добијена је реална представа о степену и величини разарања пародонталног ткива.

- Вредности оксидативно-нитрозативних параметара у саливи пре и после каузалне терапије.
- Вредности оксидативно-нитрозативних параметара у гингивалној течности пре и после каузалне терапије.

У студији су строго контролисани и други фактори, као што су збуњујуће варијабле који могу утицати на ефекат (исход, зависну варијаблу) истраживања. У том смислу, вршена је контрола примене помоћних лековитих средстава, хомеопатских лекова или антибиотика кроз искључивање појединих субјеката из студије како би се њихов утицај елиминисао у спроведеном истраживању.

3.3.2. Узорковање

На самом почетку истраживања, већ првог дана испитаницима су детаљно уклоњене супрагингивалне чврсте и меке зубне насlage, као и обука о одржавању оралне хигијене. Затим су узети узорци нестимулисанае саливе и *GCF*. Узорци нестимулисанае саливе скупљени су помоћу стерилних бризгалица, у количини од 1 ml и центрифугирани 15 минута на 3000 x g због уклањања ћелијских елемената, а након тога чувани на -80 °C. Узорци *GCF* узимани су помоћу стерилних папирних поена из простора пародонталних џепова дубине ≥ 5 mm у трајању од 30 секунди. Папирни поени су уроњени у 50 μ l пуферованог физиолошког раствора, вортексирали 10 секунди и центрифугирани на 3000 x g током 5 минута због уклањања плака и ћелијских елемената, а након тога замрзавани на температури од -80 °C до момента одређивања лабораторијских параметара (*Guentsch и сар., 2011*).

По узимању узорака саливе и *GCF* у наредних пар дана спроведена је вишесеансна механичка обрада пародонталних џепова по квадрантима. Уз ову терапију, једној групи испитаника пародонтални џепоци су испирани воденим раствором *JS*, концентрације 5 mg/ml, док су другој групи болесника пародонтални џепоци испирани 0,2 % раствором *CHX*. Такође, пацијенти су могли да изаберу да у току 10 дана након започете терапије користе један од два понуђена антисептика за испирање усне шупљине. Тридесетог дана по завршетку терапије поново су измерени гингивални и пародонтални параметри, након чега су скупљени узорци нестимулисанае саливе и *GCF*. У контролној групи, као и код системски здравих испитаника који немају пародонтопатију, али су добијали један од антисептика (*JS*, *CHX*), узорак нестимулисанае саливе и *GCF* био је узет из гингивалног сулкуса.

3.4. Методе

3.4.1. Одређивање клиничких параметара

За процену стања оралне хигијене коришћени су следећи индекси: Плак индекс (*PI*) мерен је на четири стране (мезио-вестибуларно, вестибуларно, дисто-вестибуларно, орално), чији је скор означен са 0-3; Гингивални индекс (*GI*) мерен је на четири стране (мезио-вестибуларно, вестибуларно, дисто-вестибуларно, орално), чији је скор такође обележен са 0-3. У овом индексу скор *GI* од 2 и 3 означава стране које крваре (*IKG*). За

процену стања пародонцијума мерен је ниво припојног епитела (*NPE*) у *mm* (растојање од цементноглеђне границе до дна пародонталног џепа), и дубина пародонталног џепа (*DPDZ*) у *mm* (растојање од ивице слободне гингиве од дна пародонталног џепа).

Клиничко испитивање комплетно је обављено на Клиници за стоматологију Војномедицинске академије у Београду, док су маркери оксидативно/ нитрозативног стреса у узорцима саливе и *GCF* одређивани у Институту за медицинска истраживања Војномедицинске академије.

Код свих испитаника нејпре је урађен клинички преглед усне дупље и пародонтални преглед. Пародонтално испитивање извршено је мерењем на свим зубима (трећи молари нису били укључени) помоћу градуисане пародонталне сонде (*CPITN: US, Williams; Pro – Dentec, Batesville, Ark*). За сваког болесника утврђено је стање пародонталног ткива коришћењем различитих индекса:

1. Количина меких наслага на зубима одређивана је **Плак индексом** по *Silness – Loe-у*. Овим индексом одређивана је дебљина денталног плака на гингивалним трећинама: вестибуларне, оралне, и вестибуларног дела мезијалне и дисталне површине крунице свих присутних зуба. При томе коришћена је стоматолошка сонда. Бодовање је вршено од 0 – 3 према скали индекса:

0 - Нема денталног плака на гингивалној трећини крунице зуба.

1 - Дентални плак се налази у танком слоју на ивици гингиве и суседној површини зуба. Не може се открити голим оком, већ само помоћу сонде на чијем се врху задржи у малој количини. Може се открити и бојењем.

2 - Умерена количина денталног плака у гингивалном сулкусу или гингивалном џепу као и на ивици гингиве и суседној површини зуба. Дентални плак се може открити и голим оком.

3 - Велика количина денталног плака која потпуно испуњава гингивални сулкус или гингивални џеп и потпуно прекрива ивицу гингиве и суседну површину зуба. Интердентални простор је такође испуњен денталним плаком.

2. За утврђивање присуства инфламације гингиве коришћен је **Гингивални индекс** по *Loe-Silness-у*. Стање здравља гингиве оцењивано је са вестибуларне, мезијалне, оралне и дисталне стране сваког присутног зуба. Процена је базирана на промени боје, отока и крварења гингиве:

0 - Здрава гингива - гингива је бледоружичаста, чврста и ситнозрнасте површине. Папиле су у интерденталном простору и не проминирају ван њега. Облик папиле зависи од положаја зуба.

1 - Блага инфламација – ивица гингиве је нешто црвенија од нормалне. Постоји благ едем. Повећано је излучивање гингивалног ексудата. Гингива не крвари на благу провокацију тупом сондом.

2 - Умерена инфламација – гингива је црвена. Изражен је едем и увећање слободне гингиве. Постоји крварење на благ притисак сондом.

3 - Јака инфламација – гингива је изразито црвена и увећана. Изражена је тенденција ка спонтаном крварењу. Постоје улцерације на гингиви.

3. У овом индексу скор *GI* од 2 и 3 означава стране које крваре, па се за такво стање користи **Индекс крварења гингиве – IKG**, који је изведен из Гингивалног индекса. Уколико је вредност гингивалног индекса - 0 и 1 (нема крварења на провокацију) онда је индекс крварења гингиве - 0. Уколико је гингивални индекс 2 и више (гингива крвари на провокацију), онда је индекс крварења гингиве -1.

Овим индексом региструје се присуство крварења гингиве које може бити провоцирано пародонталном сондом током прегледа. Сондира се прво дистални, а затим и мезијални део гингивалног сулкуса и то од базе папиле па све до њеног врха.

4. За процену стања пародонцијума мерен је **ниво припојног епитела- NPE** у *mm* (растојање од цементноглеђне границе до дна пародонталног џепа), и **дубина пародонталног џепа- DPDZ** у *mm* (растојање од ивице слободне гингиве од дна пародонталног џепа). Утврђивањем ове вредности добијена је реална представа о степену и величини разарања пародонталног ткива. Зуби су изоловани ватеролном, посушени ваздухом током 2 секунде и извршено је мерење градуисаном сондом са минималном траумом гингивалног сулкуса до најближег милиметра на пародонталној сонди. Утврђене вредности изражаване су у милиметрима. Растојање је сматрано за невалидно када је цементно-глеђна граница била нејасна због зубних испуна или није могла да се идентификује. Сваки губитак припојног епитела представљао је деструкцију пародонталног ткива. Обзиром да не постоји универзална дефиниција степена/ тежине губитка припојног епитела који је неопходан за клиничко означавање пародонталне деструкције, за дефинисање пародонтопатије коришћена је дефиниција као присуство губитка припојног епитела $>1,5mm$ на најмање једној страни на два несуседна зуба. Сваки испитаник је обучен и мотивисан у одржавању оралне хигијене. Сваком болеснику је детаљно објашњено начин употребе одговарајућих раствора које је користио код куће.

3.4.2. Одређивање параметара оксидативног/ нитрозативног стреса и антиоксидативне заштите у саливи и GCF пацијената

При процени оксидативног и нитрозативног статуса у пракси, као и у сврхе научних истраживања могуће је коришћење метода директног мерења слободних радикала. Међутим, много чешће се користе индиректне методе које обухватају мерење ензимских и неензимских параметара антиоксидативне заштите, мерење продуката оксидативне модификације липида, протеина и ДНК, затим мерење продуката нитрозилације и одређивање слободних радикала азота, као и одређивање укупног антиоксидативног капацитета.

У том смислу, неопходно је било праћење више различитих параметара за објашњење укључености слободних радикала и оксидативних оштећења биомолекула у току процеса пародонтопатије. Такође, била је потребна и анализа антиоксиданаса (ензимских и неензимских), одређивање садржаја биоелемената, праћење оксидативних продуката липида, протеина и ДНК, као и испитивање метаболизма гвожђа (*Dotan и сар., 2004*).

У спроведеном истраживању одређивани су параметри који се могу довести у везу са пародонтопатијом: у узорцима саливе је мерена продукција супероксидног анјон радикала, док је за процену ЛПО код пацијената са пародонтопатијом одређивана концентрација *TBARS*. Од ензимских антиоксиданаса у саливи је мерена активност укупне *SOD*, *GPx* и *CAT*, док је од неензимских антиоксиданаса праћен садржај укупног глутатиона (*tGSH*). За укљученост *NO* у току болести одређиван је садржај нитрита у узорцима саливе пацијената са пародонтопатијом. Такође, у *GCF* пацијената мерена је концентрација *TBARS* и нитрита, као и активност ензимског (*tSOD*) и неензимског (*tGSH*) антиоксиданса. Укупни антиоксидативни капацитет (*TAS*) одређиван је како у узорцима саливе, тако и у *GCF* пацијената са пародонтопатијом.

3.4.2.1. Одређивање садржаја протеина у саливи и GCF

Пре мерења параметара оксидативног/ нитрозативног стреса и антиоксидативне заштите у узорцима саливе и GCF пацијената са пародонтопатијом било је неопходно одредити садржај протеина методом по Lowry-ју, имајући у виду да се активност ензима, као и других параметара изражава по *mg* протеина (Lowry *u cap.*, 1951).

Метода одређивања концентрације протеина заснива се на биуретској реакцији пептидних веза и јона бакра у алкалној средини и реакцији фосфомолибденско-фосфоволфрамског реагенса са ароматичним аминокиселинама (тирозин и триптофан) у полипептидним ланцима. Као стандард је коришћен кристализовани серумски албумин говечета (*BSA - bovine serum albumin*). У реакцији настаје комплексно једињење плаве боје, чији је интензитет пропорционалан концентрацији протеина.

Реакција је започета додавањем 10 μL узорка у 1 mL реакционе смеше која се прави са 2 ml 0,5 % CuSO_4 у 100 mL Stock Lowry реагенса који се састоји од 10 g Na_2CO_3 , 10 mL 5 mol/L NaOH , 100 mg *K-Na* тартарата и H_2O до 500 mL . Све је инкубирано 10 минута на собној температури, укључујући и слепу пробу (1 mL реакционе смеше) и стандарде (10, 20, 30, 40, 50 μL *BSA*, познате концентрација протеина 1 mg/mL , уз додатак реакционе смеше до 1 mL). Након инкубације, у све анализе (узорци, слепа проба, стандарди) је додато по 100 μL *Follin*-реагенса и поново је вршена инкубација 30 минута на собној температури. Интензитет плаве боје мерен је спектрофотометријски на 575 nm . Концентрација протеина у узорку изражена је у $\mu\text{g/mL}$ саливе, односно GCF.

3.4.2.2. Одређивање концентрације (TBA)-реагујућих супстанци (TBARS) у саливи и GCF

Одређивање *TBARS* у узорцима саливе и GCF пацијената са пародонтопатијом заснива се на реакцији малондиалдехида (*MDA*) са тиобарбитурном киселином (*TBA*) у киселој средини у току 15 минута на 95 °C у воденом купатилу. У овој реакцији се стварају комплексна једињења бледожуте до љубичасте боје чији се интензитет мери спектрофотометријски (*Girotti u cap.*, 1991).

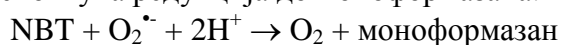
Реакциона смеша *TBA* реагенса састоји се од 15 % трихлорсирћетне киселине, 0,375 % тиобарбитурне киселине и 0,25 mol/L хлороводоничне киселине. Реакција је започета додавањем 200 μL узорка у 400 μL *TBA* реагенса и загревањем 5 минута на 95 °C, након чега су узорци охлађени и центрифугирани 1 минут на 3000 \times g . У плочу је разливено по 300 μL супернатанта и при мерној таласној дужини од 492 nm и референтној таласној дужини од 650 nm на *ELISA* спектрофотометру очитана је вредност апсорбације која је изражена у $\mu\text{mol/mg}$ протеина.

3.4.2.3. Одређивање производње супероксидног анјон радикала ($\text{O}_2^{\cdot-}$) у саливи и GCF

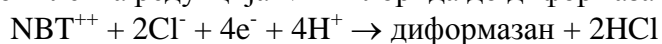
Као мера стварања $\text{O}_2^{\cdot-}$ у хемијским и биолошким системима користи се редукција нитроблу тетразолијума (*NBT*) до нитроблу-формаза (*Auclair u Voisin*, 1985).

Редукција *NBT*-а се одвија у два корака:

- Као непотпуна редукција до моноформаза:



- Као комплетна редукција *NBT*-хлорида до диформаза:



У оксидаованој форми *NBT* је растворљив у води жуте боје, док је његова редукција у диформазама праћена смањењем растворљивости и променом боје у изразиту плаву нијансу. Моларни екстинкциони коефицијент на таласној дужини од 550 nm износи за моноформазама $15\ 000\ M^{-1}cm^{-1}$, а за диформазама $30\ 000\ M^{-1}cm^{-1}$ у пуферизованом воденом раствору блиском неутралном *pH*. Реакције које стварају $O_2^{\cdot-}$ у воденим растворима доводе до непотпуне редукције *NBT* до моноформазама. Реакциона смеша која се састоји од *NBT*-а и желатина одржава *NBT*-формазама у раствору. За смањење напона кисеоника у медијуму, раствор *NBT*-а је један сат био изложен дејству азота под притиском.

Реакција започиње додавањем 0,05 mL узорка у 1 mL реакционе смеше (1 mmol *NBT* је растворен у 0,05 mol фосфатног пуфера, *pH* 8,6 са 0,1 mmol EDTA и 0,1 mg/mL желатина). Промена екстинкције је праћена у току 5 минута на таласној дужини од 550 nm и изражена као μmol редукваног *NBT*/min/mg протеина.

3.4.2.4. Одређивање концентрације NO_2+NO_3 у саливи и GCF

Нитрити су у узорцима саливе и GCF код пацијената са пародонтопатијом одређивани *Griss*-овом методом по процедури *Navarro-González* (1998) у којој *Griss*-ов реагенс са нитритима ствара пурпурну азо боју, па је могуће на основу интензитета створене боје, спектрофотометријски одредити концентрацију нитрита. Обзиром да нитрати и нитрити настају оксидацијом ендогено створеног азот монооксида, њихова концентрација се у физиолошким течностима узима као индикатор стварања *NO*. Пошто *Griss*-ов реагенс не реагује са нитратима, а како су они у биолошким течностима квантитативно доминантнији у односу на нитрите, неопходно је нитрате елементарним кадмијумом редукovati до нитрита.

За спектрофотометријско одређивање концентрације NO_2+NO_3 користи се реакција између сулфанилне киселине (*Griess I* реагенс) и нитритног јона у јако киселој средини, при чему овако створено диазонијум-једињење реагује при *pH* 2,0-2,5 са α -нафтиламином (*Griess II* реагенс) стварајући азо-једињење црвенкасто љубичасте боје, чија је апсорбанција мерена на 492 nm.

Депротеинизација узорака саливе и GCF вршена је додавањем 260 μL $ZnSO_4$ (75 mM/L) и 360 μL $NaOH$ (55 mmol/L) у епрувете за центрифугирање са 300 μL узорка. Када се за 10 минута заврши преципитација протеина, узорци се центрифугирају 15 минута на 8 000 обртаја/мин. Грануле кадмијума су активирани држањем пар минута у 5 mmol/L раствору $CuSO_4$ у глицин- $NaOH$ пуферу, док плава боја бакра постепено не избледи.

Припрема узорака за анализу:

1. Слепа проба (150 μL воде + 27 μL глицин- $NaOH$ пуфера);
2. Стандарди (5-50 $\mu mol/L$ $NaNO_3$ у 10 mmol/L $Na_2B_4O_7$ + вода до 150 μL + 27 μL глицин- $NaOH$ пуфера);
3. Узорцима (150 μL супернатанта + 27 μL глицин- $NaOH$ пуфера) је додата по једна активирани гранула кадмијума, а затим је све остављено 15 минута на собној температури како би се ефикасно извршила редукција нитрата. Из сваке епрувете је по 100 μL раствора пребачено на плочу *ELISA* спектрофотометра и у сваку пробу додато по 100 μL 0,346 mol/L сулфанилне киселине (*Griess I*) и 100 μL 2,1 mmol/L α -нафтиламина (*Griess II*). Након 30 минута на *ELISA* спектрофотометру је при таласној дужини од 492/650 nm очитана апсорбанција стандарда и узорака према слепој проби. Конструисана је стандардна крива и из једначине добијене калибрационе криве израчуната је концентрација NO_2+NO_3 у узорцима саливе и GCF која је изражена у $\mu mol/mg$ протеина.

3.4.2.5. Одређивање укупног антиоксидативног статуса (TAS) у саливи и GCF

Укупан антиоксидативни статус у узорцима саливе или GCF код пацијената са пародонтопатијом одређиван је преко комерцијалног "Randox" теста на аутоматском биохемијском анализатору AXON Technicon. Принцип реакције заснован је на *in vitro* редукцији плавог ABTS [2,2-azino-di-(3-ethylbenziazonil sulfonate)] катјонског радикала (ABTS^{•+}) ендогеним антиоксидантима у његов безбојни молекуларни облик (ABTS). Интензитет плаве боје у реакцији се смањује са повећањем вредности TAS. Укупни антиоксидативни капацитет изражен је у *mmol/mg* протеина.

3.4.2.6. Одређивање активности укупне супероксид дизмутазе (tSOD) у саливи и GCF

Активност tSOD (супероксид дизмутаза, SOD, EC 1.15.1.1.) у саливи и GCF пацијената са пародонтопатијом је одређивана по методи Sun и Zigman (1978) која се заснива на способности SOD да инхибира спонтану аутооксидацију адреналина у базној средини на *pH* 10,2. Укупна SOD кализује реакцију неутралисања супероксидног ањона:



и на тај начин уклања $\text{O}_2^{\bullet -}$ и инхибира спонтану аутооксидацију адреналина. Активност tSOD одређивана је кинетички, као промена апсорбанције у времену (у трајању од 10 минута) на таласној дужини од 480 *nm*.

У реакциону смешу најпре је додато 50 μL узорка саливе или GCF пацијената са пародонтопатијом, односно 50 μL воде за слепу пробу. Након тога, у све епрувете додато је 2,85 *mL* Na-бикарбонатног пуфера (50 *mmol/L* Na-бикарбонатног пуфера *pH* 10,2 са 1 *mmol/L* EDTA). Кинетичка реакција је отпочела додавањем 100 μL адреналина и инкубацијом 6 минута на 25 °C. Промена апсорбанције праћена је на 480 *nm* у трајању од 5-8 минута када је реакција линеарна. Количина ензима која доводи до 50% инхибиције аутооксидације адреналина у линеарном делу промене апсорбанце у минути дефинише се као јединица активности SOD која се изражава у интернационалним јединицама по *mg* протеина (*IJ/mg* протеина).

3.4.2.7. Одређивање активности каталазе (CAT) у саливи и GCF

Активност CAT одређивана је спектрофотометријски на 405 *nm*. Метода се заснива на чињеници да амонијум молибдат формира комплекс жуте боје са H_2O_2 како у узорцима саливе, тако и у GCF пацијената са пародонтопатијом (Góth, 1991).

Реакција започиње инкубацијом 0,1 *mL* узорка у трајању од једног минута са 0,5 *mL* 65 μM H_2O_2 у Na-K фосфатном пуферу на *pH* 7,2. Контролна реакција је припремљена са 0,1 *mL* Na-K фосфатног пуфера, *pH* 7,2 и 0,5 *mL* 65 μM H_2O_2 . Реакција се зауставља додавањем 0,5 *mL* 32,4 *mmol* амонијум молибдата у све епрувете (узорке и контроле). Абсорбанција између жућкастог молибдата и H_2O_2 комплекса у односу на бланк чита се на спектрофотометру при $\lambda=405$ *nm*. Јединица активности CAT се дефинише као број μmol H_2O_2 редукованих у минути (μmol $\text{H}_2\text{O}_2/\text{min}$). Активност ензима се изражава у интернационалним јединицама по *mg* протеина (*IJ/mg* протеина).

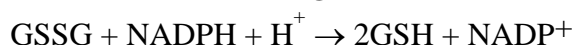
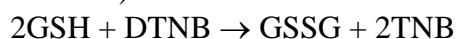
3.4.2.8. Одређивање активности глутатион пероксидазе (GPx) у саливи и GCF

За индиректно мерење активности GPx у узорцима саливе и GCF код пацијената са пародонтопатијом коришћен је Ransel kit (Randox Laboratories Ltd.) (Randox, 1996). Принцип методе заснива се на редукцији органских пероксида, при чему се ствара GSSG преко цитоплазматске GPx, који прелази у редуковано стање уз искоришћавање NADPH у

реакцији коју катализује ензим *GR*. Оксидација *NADPH* у *NADP⁺* региструје се спектрофотометријски и повезана је са смањењем апсорбанције на 340 *nm*, што представља меру активности *GPx* у везаној реакцији у којој учествује и *GR*. Јединица ензимске активности *GPx* се дефинише као број μmol оксидованог *NADPH* у минути ($\mu\text{mol NADPH}/\text{min}$). Активност *GPx* у узорцима саливе и *GCF* изражава се у интернационалним јединицама по *mg* протеина (*IJ/mg* протеина).

3.4.2.9. Одређивање концентрације укупног глутатиона (*tGSH*) у саливи и *GCF*

За одређивање концентрације *tGSH* коришћена је *DTNB-GSSG* рециклирајућа метода. У овој реакцији се комбинује колориметријска реакција *DTNB* са специфичношћу *GR* због чега је метода веома сензитивна за одређивање *tGSH* (*GSH* + $1/2\text{GSSG}$, у *GSH* еквивалентима):



Ниво стварања 5-тио-2-нитробензоичне киселине (*TNB*), који је пропорционалан укупној концентрацији глутатиона, прати се у току 6 минута спектрофотометријски на 412 *nm* (Anderson, 1986).

Метода започиње додавањем 25 μL узорка у реакциону смешу која се састоји од 700 μL радног пуфера (211 $\times 10^{-6}$ *g NADH* у 0,143 *mol Na*-фосфатном пуферу, *pH* 7,5, 6,3 *mmol EDTA*), 100 $\mu\text{L DTNB}$ (6 *mmol* у 0,143 *mol Na*-фосфатном пуферу, *pH* 7,5, 6,3 *mmol EDTA*) и 175 μL воде. Реакција је започета додавањем 10 $\mu\text{L GR}$ (266 *IJ/mL* 0,143 *mol Na*-фосфатног пуфера, *pH* 7,5; 6,3 *mmol EDTA*). Као стандард је коришћен 50 *mmol GSSG*, од кога су прављена одговарајућа разблажења. Стандардна крива је направљена у распону концентрација од 0,2-1 *nmol/25* $\times 10^{-6}$ *mL* (8-40 *nmol/mL*). Линеарност стандардне криве је остварена у датом опсегу концентрација, а на основу једначине те праве израчунат је садржај *tGSH* који се изражава у *nmol/mg* протеина саливе или *GCF*.

3.5. Величина узорка и статистичка обрада резултата

Тип студије према коме је спроведено истраживање у целини је проспективна кохортна студија.

Клиничке студије које су спроведене на нашој популацији код болесника са хроничним обликом пародонтопатије, указују да се просечна вредност гингивалног индекса (*GI*) креће у распону од 1,4 до 1,8. У савременој студији у којој је испитивана терапијска ефикасност оралних формулација хлорхексидина на релативно малом узорку, статистички значајни ефекти су добијени регистровањем разлике од 15% између третмана (*Li и сар.*, 2014).

Величина група у спроведеној студији је одређена на основу познатих почетних параметара да је очекивана разлика просечних вредности *GI* (30. дана студије) између третираних група 0,3 уз стандардну девијацију од 30%. Применом т-теста за независне групе, уз снагу студије од 80% и вероватноћу грешке првог типа (α) од 0,05, израчунато је да је минимални број испитаника у свакој групи 20.

Све добијене вредности су презентоване као средња вредност \pm стандардна девијација. Након тестирања нормалности расподеле варијабли по групама, за утврђивање статистичке значајности коришћени су следећи тестови: анализа варијансе (*ANOVA*) и

независни т тест за обележја са нормалном расподелом, као и *Kruscal-Wallis* и *Mann-Whitney* тестови за непараметарска обележја.

За испитивање евентуалног постојања корелације између различитих клиничких параметара пре и после примене једне врсте терапије, као и корелације између клиничких параметара пре и после две различите врсте терапије коришћена је метода *Spearman*-ове непараметарске корелације. Такође, тестирање *Spearman*-овог коефицијента корелације је коришћено за испитивање постојања корелације између параметара оксидативног/ нитрозативног статуса у саливи и *GCF*, као и између клиничких параметара и параметара оксидативног/ нитрозативног статуса у узорку саливе и *GI* пацијената са хроничним обликом пародонтопатије.

За статистичку обраду добијених резултата коришћен је комерцијални програмски пакет *SPSS 17.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)*. Статистичка значајност одређена је на $p < 0,05$.

4. РЕЗУЛТАТИ

4.1. Промене испитиваних клиничких параметара пре и након примене различитих антисептика (*JS*, *CHX*) код оболелих од пародонтопатије

4.1.1. Општи клинички параметри испитаника са пародонтопатијом укључених у студију пре примене различитих антисептика (*JS*, *CHX*)

Клинички је прегледано 50 особа оболелих од пародонтопатије, чији су подаци затим укључени у анализу. Сви болесници имали су између 38 и 65 година, при чему је просечна старост износила 50.52 ± 8.89 година. Мушкарци су статистички значајно више били укључени у студију у односу на особе женског пола (47.85 ± 7.77 vs 60.00 ± 7.07 ; $p < 0.05$).

Процентуална заступљеност социодемографских података приказана је у Табели 4.1.

Табела 4.1. Социодемографски подаци испитаника укључени у студију

Подаци испитаника	Вредност %	
	<i>JS</i>	<i>CHX</i>
Пол		
Мушки	92.9	86.7
Женски	7.1	13.3
Занимање		
Активна војна лица	42.9	53.3
Војни осигураници	7.1	6.7
Пензионери	50.0	40.0

Вредности су изражене у %; *JS* – јони сребра; *CHX* – хлорхексидин

Свим испитаницима постављена су питања која се односе на одржавање оралне хигијене. Више од половине оболелих од пародонтопатије у обе групе (испитаници који су користили колоидни раствор јона сребра и хлорхексидина) праи су зубе четкицом више пута дневно, али су ретко користили помоћна средства у одржавању оралне хигијене. Крварење десни приликом прања зуба потврдила је половина (50% у групи JS) и више од половине (66.7% у групи CHX) оболелих од пародонтопатије (Табела 4.2).

Табела 4.2. Утицај различитих фактора на орално здравље испитиваних субјеката

Фактори	Вредност %	
	JS	CHX
Прање зуба четкицом		
Једном дневно	7.1	6.7
Два пута дневно	57.1	60.0
Три пута дневно	35.7	33.3
Употреба коначца за зубе или интерденталне четкице		
Ниједно од понуђеног	14.3	33.3
Зубни коначца	7.1	20.0
Интерденталне четкице	78.6	46.7
Прање са Voter Pick-ом		
Да	7.1	0.0
Не	92.9	100.0
Употреба раствора за испирање усне дупље		
Да	50.0	60.0
Не	50.0	40.0
Крварење десни приликом прања зуба		
Да	50.0	66.7
Не	50.0	33.3
Посете стоматологу- годишње		
Мање од 1 - годишње	28.6	26.7
1 - годишње	28.6	26.7
2 – годишње	21.4	20.0
3 - годишње	0.0	6.7
4 - годишње	14.3	0.0
5 и више пута годишње	7.1	20.0

Вредности су изражене у %; JS – јони сребра; CHX – хлорхексидин

4.1.2. Промене испитиваних клиничких параметара (*PI, GI, IKG, DPDZ, NPE*) пре и након примене различитих антисептика (*JS, CHX*) код болесника са пародонтопатијом

У Табелама 4.3 и 4.4 приказана је дескриптивна статистика испитиваних клиничких параметара за колоидни раствор јона сребра и раствор хлорхексидина.

Табела 4.3. Дескриптивна статистика континуалних клиничких параметара за различите примењене антисептике (*JS, CHX*)

Параметар	95% Confidence interval		Median	Min	Max	Interquartile range
	доња граница	горња граница				
Група						
<i>PI</i> пре						
<i>JS</i>	1.0225	1.4204	1.2050	0.64	2.05	0.36
<i>CHX</i>	0.8115	0.9019	0.8700	0.60	0.94	0.08
<i>PI</i> после						
<i>JS</i>	0.2953	0.7232	0.4100	0.13	1.48	0.40
<i>CHX</i>	0.3950	0.7010	0.5300	0.06	1.00	0.36
<i>GI</i> пре						
<i>JS</i>	1.1926	1.5888	1.3050	0.91	2.07	0.58
<i>CHX</i>	0.8859	1.4034	1.1300	0.28	1.77	0.72
<i>GI</i> после						
<i>JS</i>	0.3107	0.7307	0.4800	0.09	1.57	0.40
<i>CHX</i>	0.3246	0.6554	0.5400	0.00	0.84	0.57
<i>IKG</i> пре						
<i>JS</i>	0.2926	0.6003	0.3800	0.16	1.02	0.48
<i>CHX</i>	0.2341	0.5046	0.3676	0.00	0.77	0.48
<i>IKG</i> после						
<i>JS</i>	0.0162	0.2081	0.0650	0.00	0.61	0.12
<i>CHX</i>	0.0267	0.1079	0.0700	0.00	0.21	0.10
<i>DPDZ</i> пре						
<i>JS</i>	3.3128	4.1686	3.6500	2.47	4.98	1.37
<i>CHX</i>	3.0195	3.7725	3.3200	2.43	4.71	1.24
<i>DPDZ</i> после						
<i>JS</i>	2.1773	3.3655	2.8250	0.86	4.46	1.51
<i>CHX</i>	2.1838	3.3029	2.8900	0.95	4.61	1.88
<i>NPE</i> пре						
<i>JS</i>	3.0686	4.2471	3.4800	2.45	5.43	1.84
<i>CHX</i>	2.8550	4.4410	3.6400	1.96	7.52	1.47
<i>NPE</i> после						
<i>JS</i>	2.7336	4.0535	3.2900	1.31	5.40	1.87
<i>CHX</i>	2.5918	4.1189	3.4300	1.53	7.35	1.24

JS – јони сребра; *CHX* – хлорхексидин; *PI* пре/после - плак индекс мерен пре/после третмана; *GI* пре/после - гингивални индекс мерен пре/после третмана; *IKG* пре/после - индекс крварења гингиве пре/после третмана; *DPDZ* пре/после - дубина пародонталног џепа пре/после третмана; *NPE* пре/после - ниво припојног епитела пре/после третмана

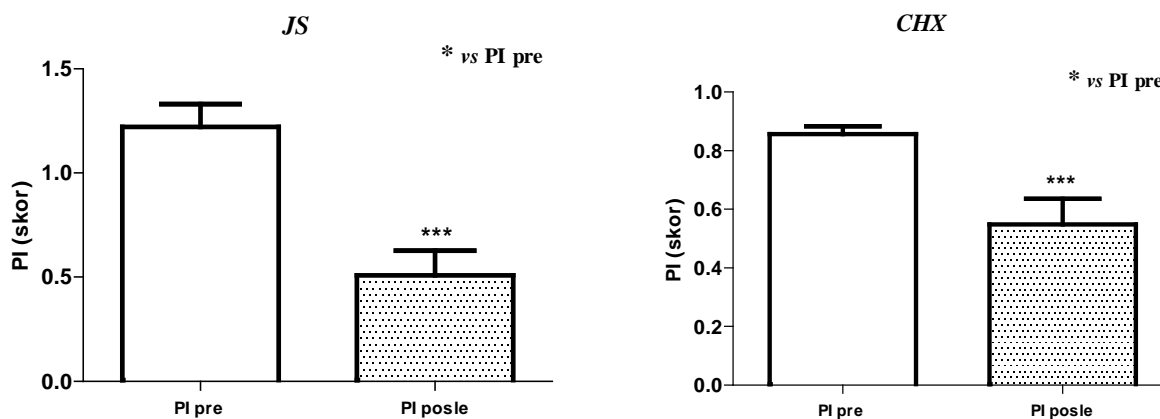
Табела 4.4. Приказ средње вредности и стандардне девијације ($CB \pm CD$) клиничких параметара за различите антисептике (*JS*, *CHX*) урађене дескриптивном статистиком континуалних параметара

Параметар	<i>JS</i>	<i>CHX</i>
<i>PI</i>		
Пре	1.221±0.345	0.857±0.082
После	0.509±0.371***	0.548±0.276***
<i>GI</i>		
Пре	1.391±0.343	1.145±0.467
После	0.520±0.360***	0.490±0.300***
<i>IKG</i>		
Пре	0.446±0.266	0.369±0.244
После	0.112±0.166***	0.067±0.073***
<i>DPDZ</i>		
Пре	3.741±0.741	3.396±0.679
После	2.771±1.028**	2.743±1.010*
<i>NPE</i>		
Пре	3.658±1.020	3.648±1.432
После	3.394±1.143	3.355±1.379

JS – јони сребра; *CHX* – хлорхексидин; *PI* пре/после - плак индекс мерен пре/после третмана; *GI* пре/после - гингивални индекс мерен пре/после третмана; *IKG* пре/после - индекс крварења гингиве пре/после третмана; *DPDZ* пре/после - дубина пародонталног џепа пре/после третмана; *NPE* пре/после - ниво припојног епитела пре/после третмана

Дескриптивном статистичком анализом утврђено је да стандардна девијација није већа од 10%, што значи да су одступања мала и да је могуће у складу са овим применити друге тестове.

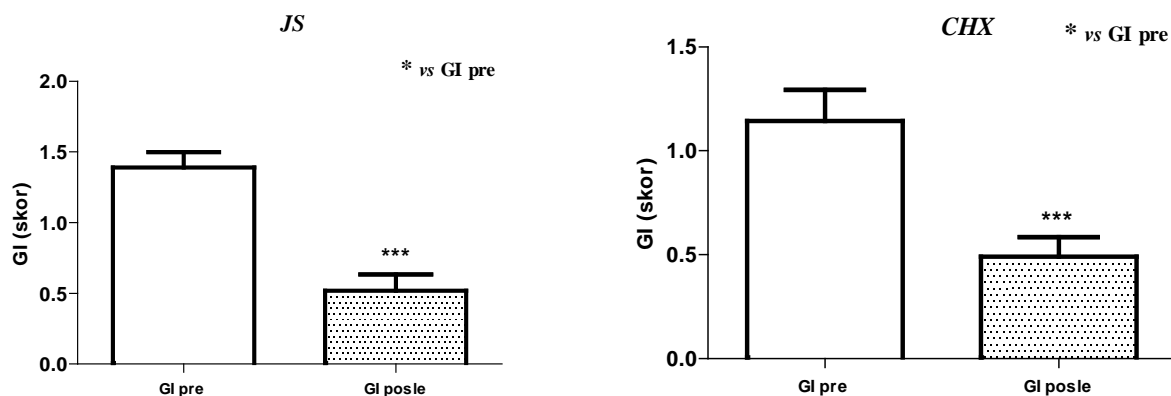
На слици 4.1 приказане су средње вредности (СВ ± СД) *PI* пре и након примене антисептика код болесника са пародонтопатијом. Примена *JS* ($p < 0.001$) и *CHX* ($p < 0.001$) код ових болесника довела је до редукције *PI* у односу на исту групу болесника пре одговарајућег третмана.



* Симбол означава статистички значајну разлику у односу на исту групу болесника пре третмана *JS* или *CHX*; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; *JS* – јони сребра; *CHX* – хлорхексидин; *PI* - плак индекс

Слика 4.1. Ефекат примене раствора *JS* и *CHX* на промену *PI* код болесника са пародонтопатијом

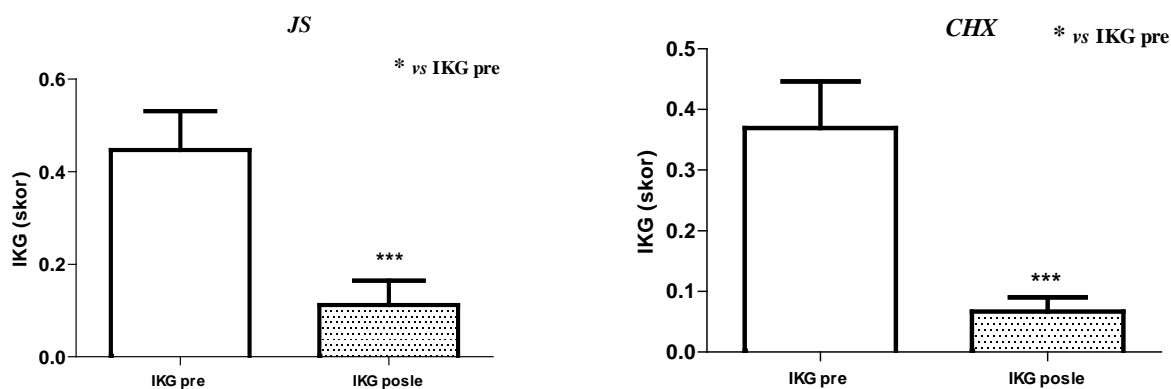
На слици 4.2 приказане су средње вредности *GI* пре и након примене антисептика код особа са пародонтопатијом. Примена раствора *JS* ($p < 0.001$) и *CHX* ($p < 0.001$) код ових болесника довела је до редукције *GI* у односу на исту групу испитаника пре одговарајућег третмана.



* Симбол означава статистички значајну разлику у односу на исту групу болесника пре третмана *JS* или *CHX*; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; *JS* – јони сребра; *CHX* – хлорхексидин; *GI* - гингивални индекс

Слика 4.2. Ефекат примене раствора *JS* и *CHX* на промену *GI* код болесника са пародонтопатијом

На слици 4.3 приказани су резултати *IKG* пре и након примене антисептика код болесника са пародонтопатијом. Применом *JS* ($p < 0.001$) и *CHX* ($p < 0.001$) код ових болесника дошло је до значајне редукције *IKG* у односу на исту групу испитиваних пре одговарајућег третмана.

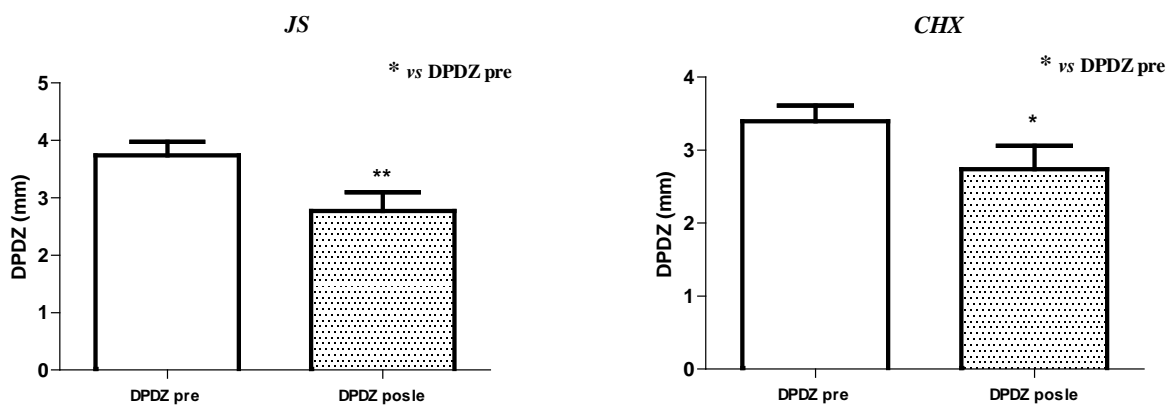


* Симбол означава статистички значајну разлику у односу на исту групу болесника пре третмана *JS* или *CHX*; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

JS – јони сребра; *CHX* – хлорхексидин; *IKG* - индекс крварења гингиве

Слика 4.3. Ефекат примене раствора *JS* и *CHX* на промену *IKG* код болесника са пародонтопатијом

На слици 4.4 приказани су резултати *DPDZ* пре и након примене антисептика код болесника са пародонтопатијом. Примена *JS* ($p < 0.01$) и *CHX* ($p < 0.5$) код ових болесника доводи до редукције *DPDZ* у односу на исту групу испитаника пре одговарајућег третмана.

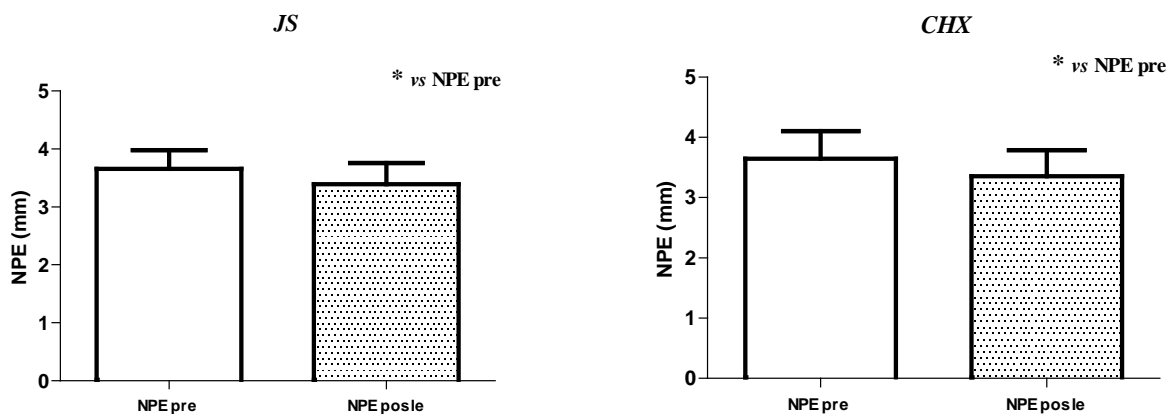


Слика 4.4. Ефекат *JS* и *CHX* на промену *DPDZ* код болесника са пародонтопатијом

Вредности су изражене као средња вредност \pm *SD*. * Символ означава статистички значајну разлику у односу на исту групу болесника пре третмана *JS* или *CHX*; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

JS – јони сребра; *CHX* – хлорхексидин; *DPDZ* - дубина пародонталног џепа

На слици 4.5 приказани су резултати *NPE* пре и након примене антисептика код болесника са пародонтопатијом. Примена *JS* и *CHX* код ових болесника није довела до значајних промена вредности *NPE* у односу на исту групу испитаника пре одговарајућег третмана.



Слика 4.5. Ефекат *JS* и *CHX* на промену *NPE* код болесника са пародонтопатијом

Вредности су изражене као средња вредност \pm *SD*. * Символ означава статистички значајну разлику у односу на исту групу болесника пре третмана *JS* или *CHX*; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

JS – јони сребра; *CHX* – хлорхексидин; *NPE* - ниво припојног епитела

4.2 Промене испитиваних биохемијских параметара (*TBARS*, $O_2^{\cdot-}$, *NO*, *TAS*, *tSOD*, *CAT*, *GPx*, *tGSH*) пре и након примене *JS* и *CHX* у сливи болесника са пародонтопатијом

У студији су праћени параметри оксидативних/ нитрозативних промена, као и антиоксидативних активности у сливи болесника пре и након пародонталне терапије *JS* или *CHX*.

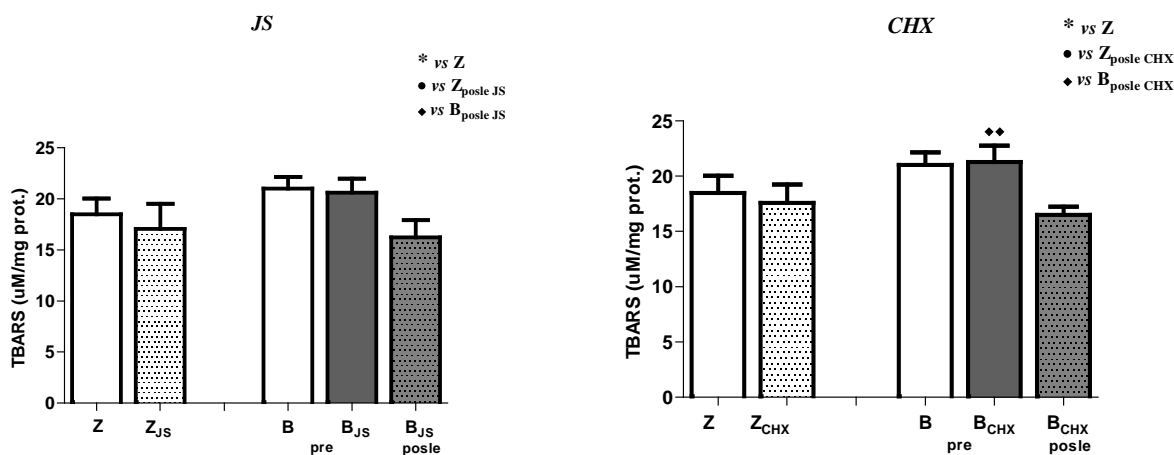
Табела 4.5. Просечне вредности ($CV \pm SD$) биохемијских параметара (*TBARS*, $O_2^{\cdot-}$, *NO*, *TAS*, *tSOD*, *CAT*, *GPx*, *tGSH*) пре и након примене *JS* и *CHX* у сливи болесника са пародонтопатијом

Параметар	САЛИВА			
	<i>JS</i>	Z_{JS}	<i>CHX</i>	Z_{CHX}
<i>TBARS</i>				
Пре	20.623±4.260	18.487±6.920	21.281±4.703	18.487±6.920
После	16.209±5.407	17.051±7.871	16.514±2.317	17.051±7.871
$O_2^{\cdot-}$				
Пре	7.322±1.496 ^{•♦♦}	5.055±1.839	6.715±1.888 ^{♦♦}	5.055±1.839
После	5.137±1.345	5.467±1.406	4.631±1.009	5.467±1.406
<i>NO</i>				
Пре	114.31±39.389 ^{•♦♦}	62.199±28.400	97.988±28.737 ^{•♦♦♦}	62.199±28.400
После	76.011±18.116	70.588±25.486	66.480±19.963	70.588±25.486
<i>TAS</i>				
Пре	5.584±1.356 ^{•♦♦♦}	2.987±1.795	5.726±1.552 ^{•♦♦♦}	2.987±1.795
После	2.868±1.125	3.247±1.688	3.629±1.914	3.247±1.688
<i>tSOD</i>				
Пре	464.08±87.31 ^{•♦♦♦}	297.55±105.21	422.38±99.45	297.55±105.21
После	320.05±41.71	312.66±93.45	339.42±119.24	312.66±93.45
<i>CAT</i>				
Пре	13.192±3.337 ^{•♦♦♦}	7.329±3.301	14.58±4.636 ^{•♦♦}	7.329±3.301
После	9.970±3.898 [•]	6.650±2.495	9.837±3.980 [•]	6.650±2.495
<i>GPx</i>				
Пре	71.556±19.433 ^{•♦♦♦}	41.781±18.359	69.832±23.804 ^{•♦♦♦}	41.781±18.359
После	43.230±12.881	48.066±8.410	44.086±10.904	48.066±8.410
<i>tGSH</i>				
Пре	12.743±2.977 ^{•♦}	43.774±15.425	15.151±6.740 ^{•♦♦}	43.774±15.425
После	17.226±6.660 ^{***•}	36.003±19.109	24.335±8.032 ^{***•}	36.003±19.109

JS – јони сребра; *CHX* – хлорхексидин; Z_{JS} – здрави испитаници који су добијали водени раствор јона сребра (*JS*); *JS* – болесници са пародонтопатијом пре и после терапије *JS*; *CHX* – болесници са пародонтопатијом пре и после терапије *CHX*; вредности су изражене као средња вредност $\pm SD$. *TBARS* – супстанце које реагују са тиобарбитурном киселином; $O_2^{\cdot-}$ – супероксидни анјон радикал; *NO* – нитрити и нитрати; *TAS* – укупни антиоксидативни капацитет; *tSOD* – укупна супероксид димутаза; *CAT* – каталаза; *GPx* – глутатион пероксидаза; *tGSH* – укупни глутатион

4.2.1. Ефекат *JS* и *CHX* на концентрацију *TBARS* у саливи болесника са пародонтопатијом

Концентрација *TBARS* у саливи болесника са пародонтопатијом пре и након терапије антисептицима (*JS*, *CHX*) приказана је на слици 4.6. Резултати студије показују да није постојала статистичка значајност концентрације *TBARS* код свих испитаника у групи која је третирана раствором *JS*, док је у групи која је третирана раствором *CHX* постојала статистичка значајност само између оболелих од пародонтопатије пре примене антисептика у односу исте испитанике после примењене терапије раствором *CHX*.



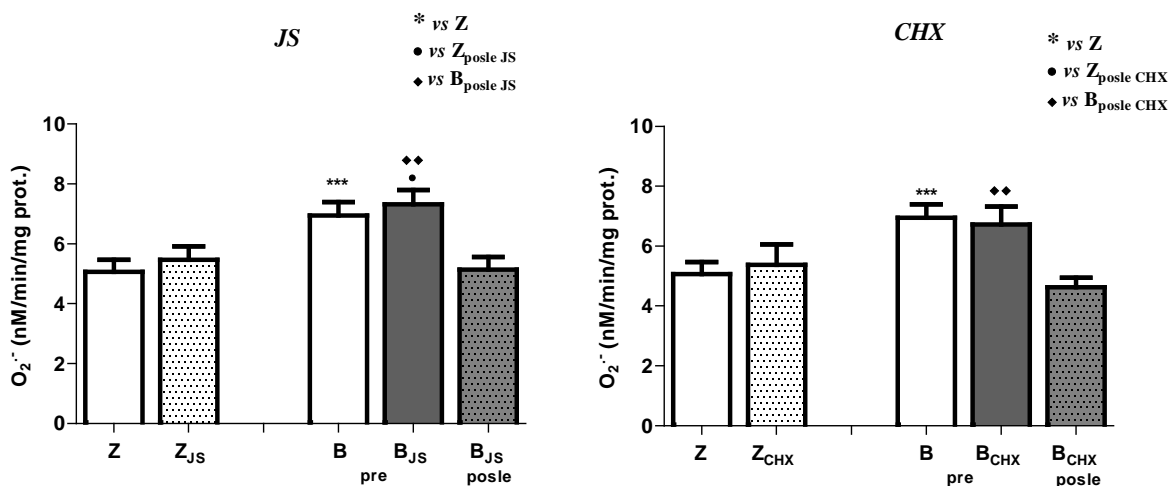
Слика 4.6. Ефекат *JS* и *CHX* на концентрацију *TBARS* у саливи болесника са пародонтопатијом (µM/mg прот.)

Z – здрави испитаници; *Z_{JS}* – здрави испитаници који су добијали водени раствор јона сребра (*JS*); *B* – болесници са пародонтопатијом; *B_{JS pre}* – болесници са пародонтопатијом пре терапије *JS*; *B_{JS posle}* – болесници са пародонтопатијом након третмана *JS*

Вредности су изражене као средња вредност ± *SD*.

4.2.2. Ефекат *JS* и *CHX* на стварање $O_2^{\cdot-}$ у саливи болесника са пародонтопатијом

Стварање $O_2^{\cdot-}$ у саливи болесника са пародонтопатијом пре и након терапије антисептицима (*JS*, *CHX*) приказана је на слици 4.7. Резултати студије показују да је након примене терапије раствором *JS* код оболелих од пародонтопатије дошло до значајног смањења продукције $O_2^{\cdot-}$. Такође се може уочити да је стварање $O_2^{\cdot-}$ код болесника пре терапије било статистички значајно веће у односу на здраве испитанике који су користили раствор *JS*. Значајна статистичка разлика регистрована је и у групи болесника који су у терапији користили раствор *CHX* (болесни пре/после).



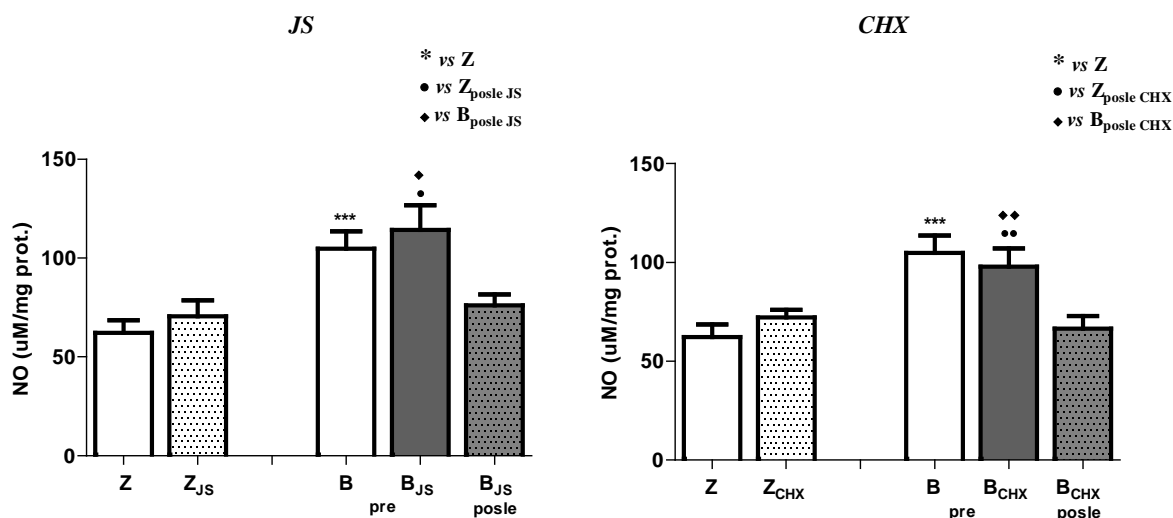
Слика 4.7. Ефекат *JS* и *CHX* на стварање $O_2^{\cdot-}$ у саливи болесника са пародонтопатијом (nM/min/mg прот.)

Z – здрави испитаници; Z_{JS} – здрави испитаници који су добијали водени раствор јона сребра (*JS*); B – болесници са пародонтопатијом; B_{JS pre} – болесници са пародонтопатијом пре терапије *JS*; B_{JS poste} – болесници са пародонтопатијом након третмана *JS*

Вредности су изражене као средња вредност \pm SD.

4.2.3. Ефекат *JS* и *CHX* на концентрацију *NO* у саливи болесника са пародонтопатијом

Концентрација *NO* у саливи болесника са пародонтопатијом пре и након терапије антисептицима (*JS*, *CHX*) приказана је на слици 4.8. Резултати студије показују да су оболели од пародонтопатије пре примене *JS* имали значајно већу концентрацију *NO* него после терапије, као и у односу на контролну групу након примене раствора *JS*. Иста догађања забележена су и у групи која је у терапији користила раствор *CHX*.



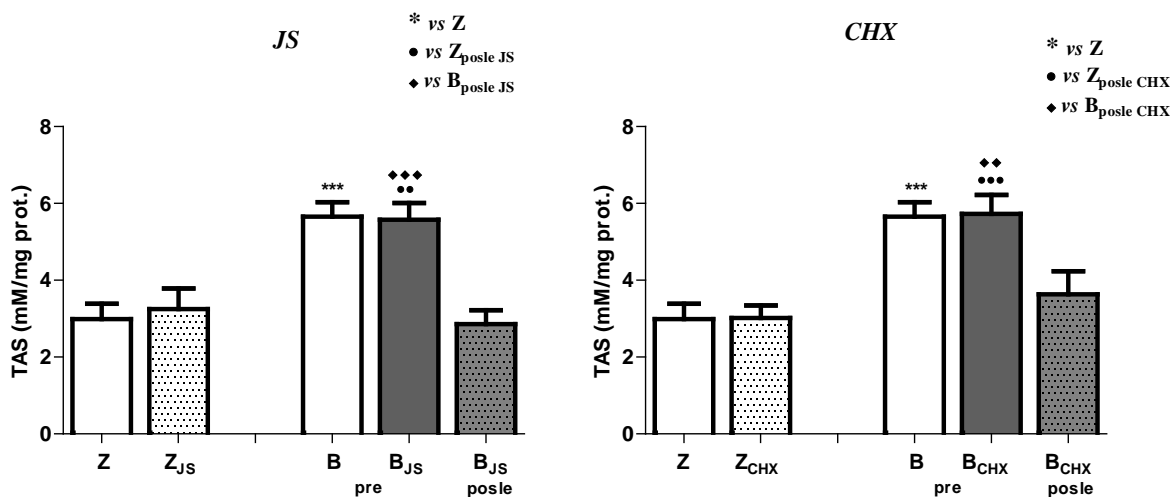
Слика 4.8. Ефекат *JS* и *CHX* на концентрацију *NO* у саливи болесника са пародонтопатијом ($\mu\text{M}/\text{mg}$ прот.)

Z – здрави испитаници; *Z_{JS}* – здрави испитаници који су добијали водени раствор јона сребра (*JS*); *B* – болесници са пародонтопатијом; *B_{JS pre}* – болесници са пародонтопатијом пре терапије *JS*; *B_{JS posle}* – болесници са пародонтопатијом након третмана *JS*

Вредности су изражене као средња вредност \pm SD.

4.2.4. Ефекат *JS* и *CHX* на вредност *TAS* у саливи болесника са пародонтопатијом

Вредност *TAS* у саливи болесника са пародонтопатијом пре и након терапије антисептицима (*JS*, *CHX*) приказана је на слици 4.9. Резултати студије показују да је у обе испитиване групе оболелих од пародонтопатије (*JS*, *CHX*) дошло до смањења концентрације *TAS* после примењене терапије. У односу на саливу здравих испитаника после употребе раствора (*JS*, *CHX*), концентрација *TAS* била је статистички значајно већа у саливи болесника пре започете терапије.



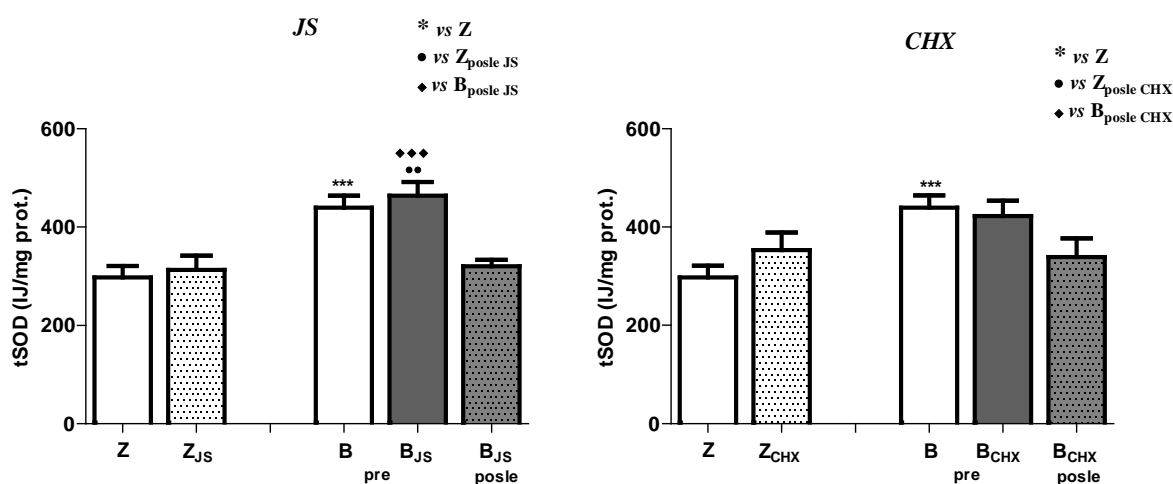
Слика 4.9. Ефекат *JS* и *CHX* на вредност *TAS* у саливи болесника са пародонтопатијом (mM/mg прот.)

Z – здрави испитаници; *Z_{JS}* – здрави испитаници који су добијали водени раствор јона сребра (*JS*); *B* – болесници са пародонтопатијом; *B_{JS pre}* – болесници са пародонтопатијом пре терапије *JS*; *B_{JS posle}* – болесници са пародонтопатијом након третмана *JS*

Вредности су изражене као средња вредност \pm SD.

4.2.5. Ефекат *JS* и *CHX* на активност *tSOD* у саливи болесника са пародонтопатијом

Активност *tSOD* у саливи болесника са пародонтопатијом пре и након терапије антисептицима (*JS*, *CHX*) приказана је на слици 4.10. Резултати студије показују да је у групи испитаника који су у терапији примењивали раствор *JS*, највећа концентрација *tSOD* била присутна код болесника пре примењене терапије, и да се значајно смањила након терапије, али и да су здраве особе које су користиле раствор *JS* имале статистички значајно мање вредности у односу на болеснике пре започете терапије. У групи оболелих од пародонтопатије који су у терапији примали раствор *CHX* није било статистичке значајности између група.



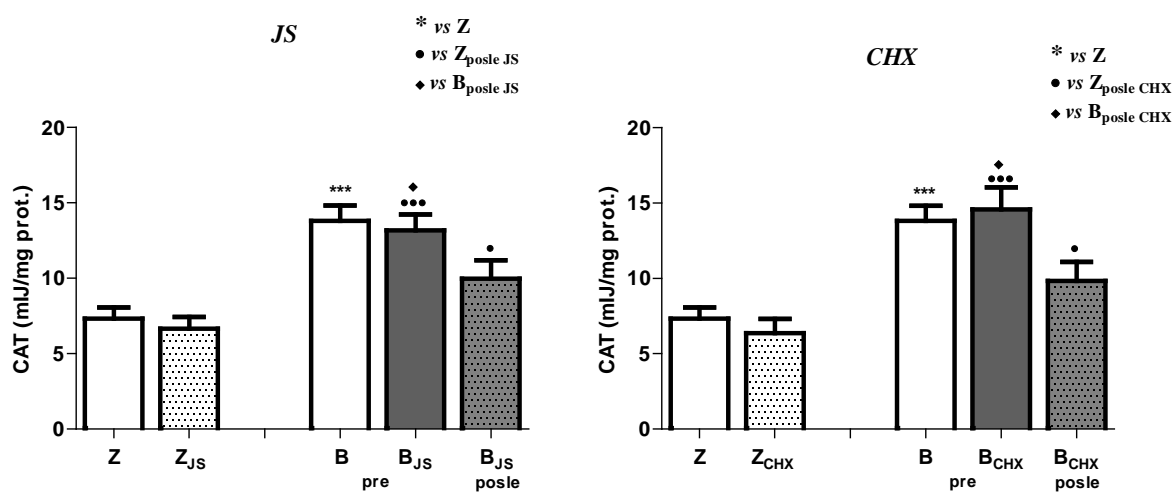
Слика 4.10. Ефекат *JS* и *CHX* на активност *tSOD* у саливи болесника са пародонтопатијом (IJ/mg прот.)

Z – здрави испитаници; *Z_{JS}* – здрави испитаници који су добијали водени раствор јона сребра (*JS*); *B* – болесници са пародонтопатијом; *B_{JS pre}* – болесници са пародонтопатијом пре терапије *JS*; *B_{JS posle}* – болесници са пародонтопатијом након третмана *JS*

Вредности су изражене као средња вредност \pm SD.

4.2.6. Ефекат *JS* и *CHX* на активност *CAT* у саливи болесника са пародонтопатијом

Активност *CAT* у саливи болесника са пародонтопатијом пре и након терапије антисептицима (*JS*, *CHX*) приказана је на слици 4.11. Резултати студије показују да је у групи болесника концентрација *CAT* била статистички значајно већа пре терапије у односу на вредности после терапије, али и у односу на вредности у здравој популацији која је користила раствор *JS*. Међутим, концентрација *CAT* у саливи код особа оболелих од пародонтопатије после терапије имала је статистички значајно већу вредност у односу на здраве испитанике који су користили раствор *JS*, односно није достигла вредност у односу на контролну групу. Иста догађања била су присутна и у групи која је у терапији користила раствор *CHX*.



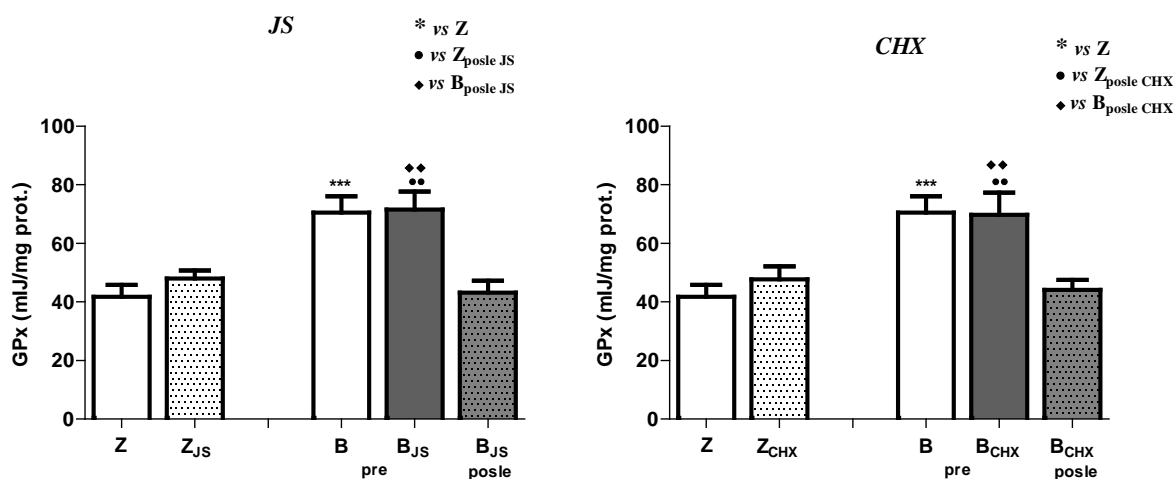
Слика 4.11. Ефекат *JS* и *CHX* на активност *CAT* у саливи болесника са пародонтопатијом (IU/mg прот.)

Z – здрави испитаници; *Z_{JS}* – здрави испитаници који су добијали водени раствор јона сребра (*JS*); *B* – болесници са пародонтопатијом; *B_{JS pre}* – болесници са пародонтопатијом пре терапије *JS*; *B_{JS posle}* – болесници са пародонтопатијом након третмана *JS*

Вредности су изражене као средња вредност \pm SD.

4.2.7. Ефекат *JS* и *CHX* на активност *GPx* у саливи болесника са пародонтопатијом

Активност *GPx* у саливи болесника са пародонтопатијом пре и након терапије антисептицима (*JS*, *CHX*) приказана је на слици 4.12. Резултати студије показују да је након завршене терапије раствором *JS*, као и *CHX* дошло до значајнијег смањења концентрације *GPx* него пре терапије код оболелих од пародонтопатије. Здрави испитаници такође су имали статистички значајно ниже концентрације *GPx* у односу на болеснике пре започете терапије.



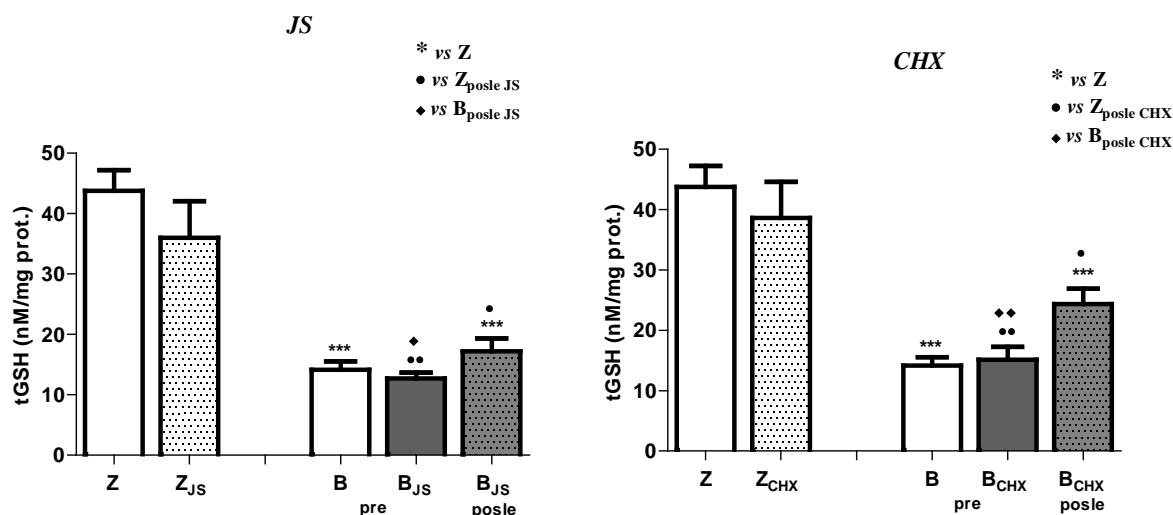
Слика 4.12. Ефекат *JS* и *CHX* на активност *GPx* у саливи болесника са пародонтопатијом (mI/mg прот.)

Z – здрави испитаници; *Z_{JS}* – здрави испитаници који су добијали водени раствор јона сребра (*JS*); *B* – болесници са пародонтопатијом; *B_{JS pre}* – болесници са пародонтопатијом пре терапије *JS*; *B_{JS posle}* – болесници са пародонтопатијом након третмана *JS*

Вредности су изражене као средња вредност \pm SD.

4.2.8. Ефекат *JS* и *CHX* на садржај *tGSH* у саливи болесника са пародонтопатијом

Концентрација *tGSH* у саливи болесника са пародонтопатијом пре и након терапије антисептицима (*JS*, *CHX*) приказана је на слици 4.13. Резултати студије показују да је за разлику од свих осталих приказаних биохемијских параметара, концентрација *tGSH* у обе групе (*JS* и *CHX*) била статистички значајно мања код оболелих од пародонтопатије пре и након терапије у односу на здраве испитанике. Концентрација *tGSH* се након терапије код болесника значајно повећала, али је и даље статистички значајно мања у односу на здраве особе.



Слика 4.13. Ефекат *JS* и *CHX* на концентрацију *tGSH* у саливи болесника са пародонтопатијом (nM/mg прот.)

Z – здрави испитаници; *Z_{JS}* – здрави испитаници који су добијали водени раствор јона сребра (*JS*); *B* – болесници са пародонтопатијом; *B_{JS pre}* – болесници са пародонтопатијом пре терапије *JS*; *B_{JS postle}* – болесници са пародонтопатијом након третмана *JS*

Вредности су изражене као средња вредност ± SD.

4.4. Промене испитиваних биохемијских параметара (*TBARS*, *NO*, *TAS*, *tSOD*, *tGSH*) пре и након примене *JS* и *CHX* у *GCF* болесника са пародонтопатијом

У студији су праћени параметри оксидативних/ нитрозативних промена, као и антиоксидативних активности у *GCF* болесника пре и након пародонталне терапије *JS* или *CHX*.

Табела 4.6. Просечне вредности ($CB \pm CD$) биохемијских параметара (*TBARS*, *NO*, *TAS*, *tSOD*, *tGSH*) пре и након примене *JS* и *CHX* у *GCF* болесника са пародонтопатијом

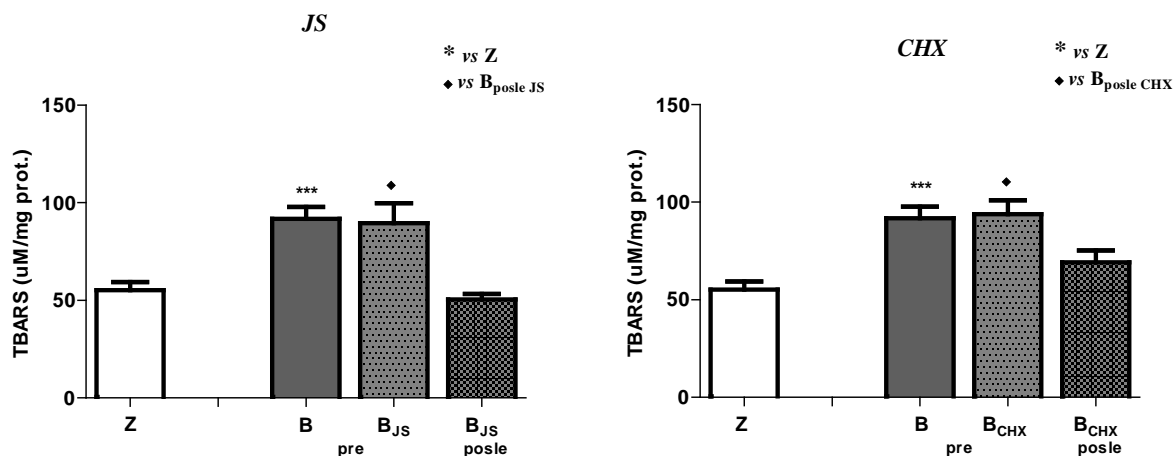
Параметар	<i>GCF</i>			
	<i>JS</i>	<i>Z_{JS}</i>	<i>CHX</i>	<i>Z_{CHX}</i>
<i>TBARS</i>				
Пре	89.615±32.096 [♦]	55.173±16.383	93.913±22.563 [♦]	55.173±16.383
После	50.471±8.821		69.238±19.089	
<i>NO</i>				
Пре	17.165±3.957 ^{***}	30.757±8.482	16.466±4.548 ^{**}	30.757±8.482
После	35.908±6.473		34.983±13.506	
<i>TAS</i>				
Пре	28.944±7.887 [♦]	37.433±7.839	21.678±9.717 ^{***}	37.433±7.839
После	38.448±9.591		39.410±8.727	
<i>tSOD</i>				
Пре	1296.0±411.2 ^{**}	769.9±196.3	1210.3±463.5 [♦]	769.9±196.3
После	859.6±187.7		881.6±207.6	
<i>tGSH</i>				
Пре	8.488±1.314 ^{***}	16.161±2.485	8.559±2.569 ^{***}	16.161±2.485
После	16.349±3.560		17.654±4.760	

JS – јони сребра; *CHX* – хлорхексидин; *Z_{JS}* – здрави испитаници који су добијали водени раствор јона сребра (*JS*); *JS* – болесници са пародонтопатијом пре и после терапије *JS*; *CHX* – болесници са пародонтопатијом пре и после терапије *CHX*; вредности су изражене као средња вредност ± *SD*.

TBARS – супстанце које реагују са тиобарбитурном киселином; *NO* – нитрити и нитрати; *TAS* – укупни антиоксидативни капацитет; *tSOD* – укупна супероксид дизмутаза; *tGSH* – укупни глутатион

4.3.1. Ефекат *JS* и *CHX* на концентрацију *TBARS* у *GCF* пацијената болесника са пародонтопатијом

Концентрација *TBARS* у *GCF* болесника са пародонтопатијом пре и након терапије антисептицима (*JS*, *CHX*) приказана је на слици 4.14. Резултати студије показују да је дошло до значајног смањења концентрације *TBARS* код оболелих од пародонтопатије после терапије у односу на концентрацију *TBARS* пре терапије у обе групе (*JS* и *CHX*). Није постојала статистичка значајност између концентрација *TBARS* код болесника после завршене терапије и здравих испитаника.



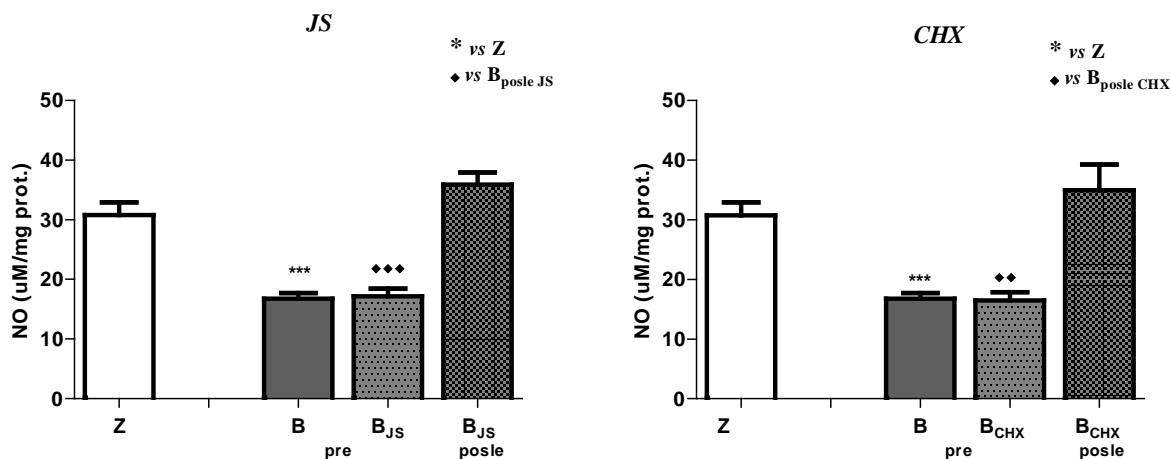
Слика 4.14. Ефекат *JS* и *CHX* на концентрацију *TBARS* у *GCF* болесника са пародонтопатијом ($\mu\text{M}/\text{mg}$ прот.)

Z – здрави испитаници; Z_{JS} – здрави испитаници који су добијали водени раствор јона сребра (*JS*); B – болесници са пародонтопатијом; B_{JS pre} – болесници са пародонтопатијом пре терапије *JS*; B_{JS posle} – болесници са пародонтопатијом након третмана *JS*

Вредности су изражене као средња вредност \pm SD.

4.3.2. Ефекат *JS* и *CHX* на концентрацију *NO* у *GCF* болесника са пародонтопатијом

Концентрација *NO* у *GCF* болесника са пародонтопатијом пре и након терапије антисептицима (*JS*, *CHX*) приказана је на слици 4.15. Резултати студије показују да је након завршене терапије раствором *JS* дошло до значајног повећања концентрације *NO* него пре терапије код оболелих од пародонтопатије. Иста статистичка значајност забележена је и у групи оболелих од пародонтопатије која је за терапију користила раствор *CHX*. Концентрација *NO* била је приближно иста у контролној групи и у групи болесника после завршене терапије применом раствора *JS* и *CHX*.



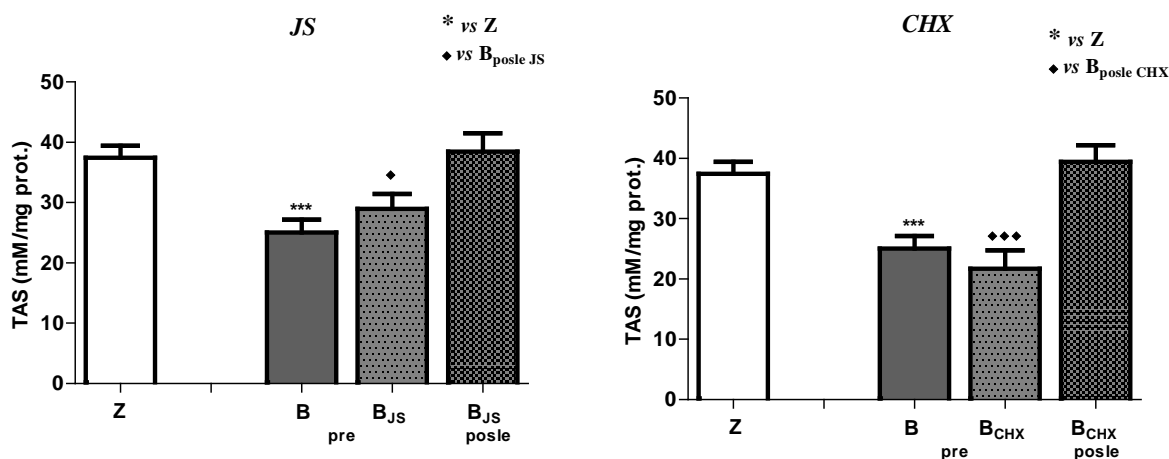
Слика 4.15. Ефекат *JS* и *CHX* на концентрацију *NO* у *GCF* болесника са пародонтопатијом ($\mu\text{M}/\text{mg prot.}$)

Z – здрави испитаници; *Z_{JS}* – здрави испитаници који су добијали водени раствор јона сребра (*JS*); *B* – болесници са пародонтопатијом; *B_{JS pre}* – болесници са пародонтопатијом пре терапије *JS*; *B_{JS posle}* – болесници са пародонтопатијом након третмана *JS*

Вредности су изражене као средња вредност \pm SD.

4.3.3. Ефекат JS и CHX на вредност TAS у GCF болесника са пародонтопатијом

Вредност TAS у GCF болесника са пародонтопатијом пре и након терапије антисептицима (JS, CHX) приказана је на слици 4.16. Резултати студије показују да је у обе групе (JS и CHX) дошло до повећања концентрације TAS после завршене терапије у односу на концентрацију TAS пре терапије. Није било статистички значајне разлике концентрације TAS између здраве популације и оболелих од пародонтопатије после завршене терапије.



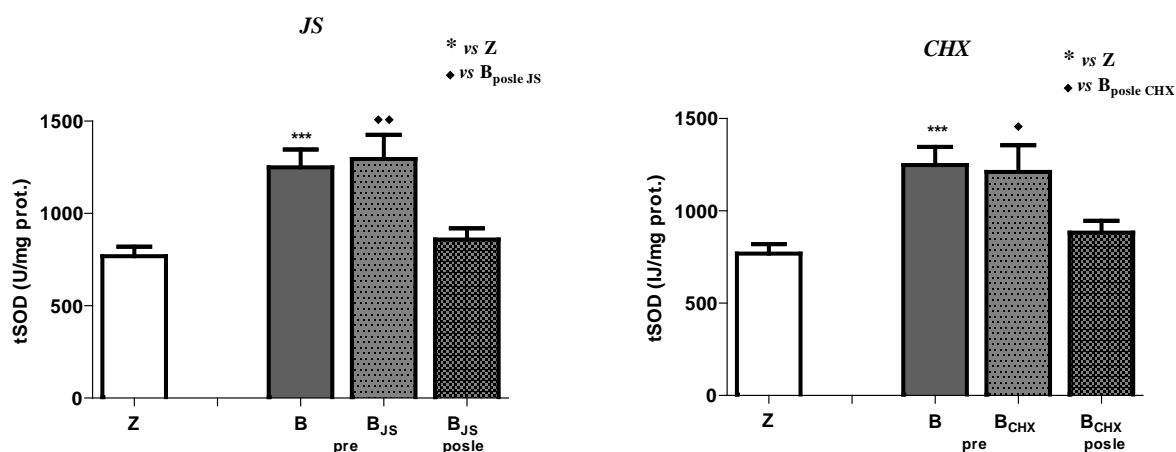
Слика 4.16. Ефекат JS и CHX на вредност TAS у GCF болесника са пародонтопатијом ($\mu\text{M}/\text{mg}$ прот.)

Z – здрави испитаници; Z_{JS} – здрави испитаници који су добијали водени раствор јона сребра (JS); B – болесници са пародонтопатијом; B_{JS} pre – болесници са пародонтопатијом пре терапије JS; B_{JS} posle – болесници са пародонтопатијом након третмана JS

Вредности су изражене као средња вредност \pm SD.

4.3.4. Ефекат JS и CHX на активност tSOD у GCF болесника са пародонтопатијом

Активност tSOD у GCF болесника са пародонтопатијом пре и након терапије антисептицима (JS, CHX) приказана је на слици 4.17. Резултати студије показују да је концентрација tSOD код оболелих од пародонтопатије после терапије била статистички значајно мања него пре терапије у истој популацији, и да је достигла приближно исту вредност у односу на здраву популацију, односно није било статистичке значајности. Ови подаци се односе на обе испитиване групе (JS и CHX).



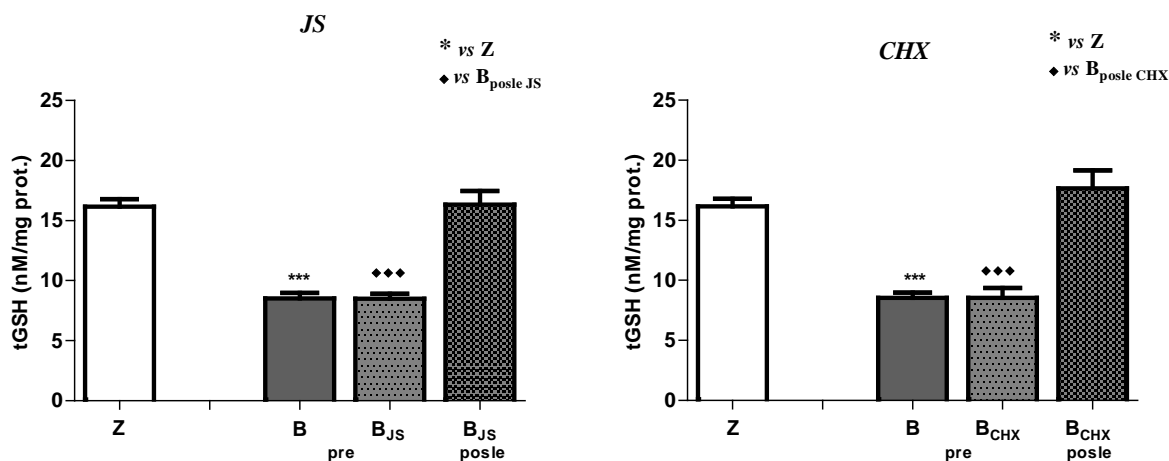
Слика 4.17. Ефекат JS и CHX на активност tSOD у GCF болесника са пародонтопатијом ($\mu\text{M}/\text{mg}$ прот.)

Z – здрави испитаници; Z_{JS} – здрави испитаници који су добијали водени раствор јона сребра (JS); B – болесници са пародонтопатијом; B_{JS pre} – болесници са пародонтопатијом пре терапије JS; B_{JS posle} – болесници са пародонтопатијом након третмана JS

Вредности су изражене као средња вредност \pm SD.

4.3.5. Ефекат *JS* и *CHX* на концентрацију *tGSH* у *GCF* болесника са пародонтопатијом

Концентрација *tGSH* у *GCF* болесника са пародонтопатијом пре и након терапије антисептицима (*JS*, *CHX*) приказана је на слици 4.18. Резултати студије показују да је у обе групе оболелих од пародонтопатије (*JS* и *CHX*) регистровано значајно повећање концентрације *tGSH* после терапије него пре терапије. Није постојала статистички значајна разлика концентрације *tGSH* између контролне групе и болесника са пародонтопатијом после завршене терапије.



Слика 4.18. Ефекат *JS* и *CHX* на концентрацију *tGSH* у *GCF* болесника са пародонтопатијом ($\mu\text{M}/\text{mg}$ прот.)

Z – здрави испитаници; Z_{JS} – здрави испитаници који су добијали водени раствор јона сребра (*JS*); B – болесници са пародонтопатијом; B_{JS pre} – болесници са пародонтопатијом пре терапије *JS*; B_{JS posle} – болесници са пародонтопатијом након третмана *JS*

Вредности су изражене као средња вредност \pm SD.

4.4. Корелативне промене између испитиваних параметара у саливи болесника са хроничним обликом пародонтопатије пре и након терапије антисептицима (*JS*, *CHX*)

4.4.1. *Spearman*-ова корелативна анализа између *PI* и биохемијских параметара након терапије антисептицима (*JS*, *CHX*) у саливи оболелих од пародонтопатије

Поређење промена између *PI* и биохемијских параметара након примене *JS* или *CHX* у саливи болесника са пародонтопатијом урађено је непараметарском *Spearman*-овом корелацијом. Добијени резултати приказани у табели 4.7, показују да није било значајне корелације између *PI* и биохемијских параметара, односно да промена вредности *PI* није праћена променом концентрације биохемијских параметара у истом смеру у саливи код обе испитиване групе (*JS* и *CHX*).

Табела 4.7. *Spearman*-ова корелација између *PI* и параметара оксидативног/нитрозативног статуса у саливи (^S) болесника са хроничним обликом пародонтопатије након одговарајућег третмана (*JS*, *CHX*)

<i>PI</i>	<i>JS</i>		<i>CHX</i>	
	<i>R</i>	<i>P</i>	<i>R</i>	<i>P</i>
<i>TBARS</i> ^S	0.4909	0.125	-0.1963	0.563
<i>O₂</i> ^{-S}	0.3706	0.236	-0.1524	0.430
<i>NO</i> ^S	-0.3495	0.221	-0.4151	0.124
<i>TAS</i> ^S	0.4857	0.078	-0.3062	0.267
<i>tSOD</i> ^S	-0.1636	0.631	-0.2919	0.852
<i>CAT</i> ^S	0.3147	0.319	-0.1524	0.672
<i>GPx</i> ^S	0.0659	0.831	0.1271	0.652
<i>tGSH</i> ^S	0.2703	0.349	-0.2919	0.291

JS – јони сребра; *CHX* – хлорхексидин

PI – плак индекс

TBARS – супстанце које реагују са тиобарбитурном киселином; *O₂*⁻ – супероксидни анион радикал; *NO* – нитрити и нитрати; *TAS* – укупни антиоксидативни капацитет; *tSOD* – укупна супероксид дигмутаза; *CAT* – каталаза; *GPx* – глутатион пероксидаза; *tGSH* – укупни глутатион

4.4.2. Spearman-ова корелативна анализа између GI и биохемијских параметара након терапије антисептицима (JS, CHX) у саливи оболелих од пародонтопатије

Поређење промена између GI и биохемијских параметара након примене JS или CHX у саливи болесника са пародонтопатијом урађено је непараметарском Spearman-овом корелацијом. Добијени резултати у табели 4.8, показују да је у групи третираној раствором JS постојала значајна негативна корелација једино између GI и NO у саливи оболелих од пародонтопатије ($p=0.028$). У групи која је третирана раствором CHX једина значајна корелација присутна је између GI и GPx ($p=0.029$) у саливи испитаника, односно са смањењем вредности GI дошло је и до значајног повећања вредности GPx.

Табела 4.8. Spearman-ова корелација између GI и параметара оксидативног/нитрозативног статуса у саливи (^S) болесника са хроничним обликом пародонтопатије након одговарајућег третмана (JS, CHX)

GI	JS		CHX	
	R	P	r	P
TBARS ^S	0.2909	0.385	- 0.5818	0.060
O ₂ ^{-S}	- 0.0699	0.829	- 0.1263	0.680
NO ^S	- 0.5824*	0.028	- 0.2269	0.415
TAS ^S	0.2088	0.473	- 0.4575	0.086
tSOD ^S	0.3364	0.311	0.2219	0.445
CAT ^S	- 0.5594	0.058	- 0.4181	0.229
GPx ^S	0.1978	0.517	- 0.5630*	0.029
tGSH ^S	0.1208	0.680	- 0.4307	0.108

JS – јони сребра; CHX – хлорхексидин

GI – гингивални индекс

TBARS – супстанце које реагују са тиобарбитурном киселином; O₂⁻ – супероксидни анјон радикал; NO – нитрити и нитрати; TAS – укупни антиоксидативни капацитет; tSOD – укупна супероксид дизмутаза; CAT – каталаза; GPx – глутатион пероксидаза; tGSH – укупни глутатион

4.4.3. Spearman-ова корелативна анализа између IKG и биохемијских параметара након терапије антисептицима (JS, CHX) у саливи оболелих од пародонтопатије

Поређење промена између IKG и биохемијских параметара након примене JS или CHX у саливи болесника са пародонтопатијом урађено је непараметарском Spearman-овом корелацијом. Добијени резултати у табели 4.9. показују да није било статистички значајне корелације између IKG и биохемијских параметара у групи испитаника која је третирана раствором JS, док је у другој испитиваној групи (CHX) постојала значајна негативна корелација између IKG и tGSH ($p=0.040$).

Табела 4.9. Spearman-ова корелација између IKG и параметара оксидативног/нитрозативног статуса у саливи (^S) болесника са хроничним обликом пародонтопатије након одговарајућег третмана (JS, CHX)

IKG	JS		CHX	
	R	P	R	P
TBARS ^S	0.4850	0.130	-0.1906	0.574
O ₂ ^{-S}	0.1105	0.732	0.2037	0.504
NO ^S	-0.2672	0.355	-0.2204	0.429
TAS ^S	0.2717	0.347	-0.0710	0.801
tSOD ^S	0.1538	0.651	0.0855	0.771
CAT ^S	0.0748	0.817	-0.1188	0.743
GPx ^S	0.1562	0.610	0.3552	0.193
tGSH ^S	-0.0512	0.861	-0.5356*	0.040

JS – јони сребра; CHX – хлорхексидин

IKG – индекс крварења гингиве

TBARS – супстанце које реагују са тиобарбитурном киселином; O₂⁻ – супероксидни анјон радикал; NO – нитрити и нитрати; TAS – укупни антиоксидативни капацитет; tSOD – укупна супероксид дигмутаза; CAT – каталаза; GPx – глутатион пероксидаза; tGSH – укупни глутатион

4.4.4. Spearman-ова корелативна анализа између *DPDZ* и биохемијских параметара након терапије антисептицима (*JS*, *CHX*) у саливи оболелих од пародонтопатије

Поређење промена између *DPDZ* и биохемијских параметара након примене *JS* или *CHX* у саливи болесника са пародонтопатијом урађено је непараметарском Spearman-овом корелацијом. Добијени резултати у табели 4.10. показују да није било статистички значајне корелације између *DPDZ* и биохемијских параметара у испитиваној групи која је третирана раствором *JS*. У групи болесника која је третирана раствором *CHX* регистрована је значајна корелација између *DPDZ* и *NO*, односно између *DPDZ* и *GPx* ($p=0.037$ и $p=0.026$).

Табела 4.10. Spearman-ова корелација између *DPDZ* и параметара оксидативног/нитрозативног статуса у саливи (^S) болесника са хроничним обликом пародонтопатије након одговарајућег третмана (*JS*, *CHX*)

<i>DPDZ</i>	<i>JS</i>		<i>CHX</i>	
	<i>R</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>
<i>TBARS</i> ^S	-0,3272	0,325	-0,2909	0,385
<i>O₂</i> ^{-S}	0,0699	0,829	-0,2527	0,404
<i>NO</i> ^S	-0,4461	0,109	-0,5429*	0,037
<i>TAS</i> ^S	0,0021	0,994	-0,7680*	0,016
<i>tSOD</i> ^S	0,1636	0,630	-0,0197	0,946
<i>CAT</i> ^S	-0,2517	0,429	-0,0181	0,960
<i>GPx</i> ^S	0,3956	0,180	0,5714*	0,026
<i>tGSH</i> ^S	0,0769	0,793	-0,4750	0,073

JS – јони сребра; *CHX* – хлорхексидин

DPDZ – дубина пародонталног џепа

TBARS – супстанце које реагују са тиобарбитурном киселином; *O₂*⁻ – супероксидни анион радикал; *NO* – нитрити и нитрати; *TAS* – укупни антиоксидативни капацитет; *tSOD* – укупна супероксид дизмутаза; *CAT* – каталаза; *GPx* – глутатион пероксидаза; *tGSH* – укупни глутатион

4.4.5. Spearman-ова корелативна анализа између NPE и биохемијских параметара након терапије антисептицима (JS, CHX) у саливи оболелих од пародонтопатије

Поређење промена између NPE и биохемијских параметара након примене JS или CHX у саливи болесника са пародонтопатијом урађено је непараметарском Spearman-овом корелацијом. Добијени резултати у табели 4.11 показују да је једина статистички значајна корелација присутна у групи болесника која је третирана CHX између NPE и tGSH ($p=0.004$).

Табела 4.11. Spearman-ова корелација између NPE и параметара оксидативног/нитрозативног статуса у саливи (^S) болесника са хроничним обликом пародонтопатије након одговарајућег третмана (JS, CHX)

NPE	JS		CHX	
	R	P	r	P
TBARS ^S	-0.2181	0.519	-0.3636	0.271
O ₂ · ^{-S}	0.1118	0.729	-0.1263	0.680
NO ^S	-0.4505	0.105	-0.3500	0.200
TAS ^S	-0.0373	0.899	-0.0250	0.929
tSOD ^S	0.2454	0.466	-0.1428	0.626
CAT ^S	-0.3776	0.226	-0.0666	0.854
GPx ^S	0.2912	0.334	0.4464	0.095
tGSH ^S	0.2219	0.445	-0.6893**	0.004

JS – јони сребра; CHX – хлорхексидин

NPE – ниво припојног епитела

TBARS – супстанце које реагују са тиобарбитурном киселином; O₂·⁻ – супероксидни анјон радикал; NO – нитрити и нитрати; TAS – укупни антиоксидативни капацитет; tSOD – укупна супероксид дигмутаза; CAT – каталаза; GPx – глутатион пероксидаза; tGSH – укупни глутатион

4.5. Корелативне промене између испитиваних параметара у *GCF* болесника са хроничним обликом пародонтопатије пре и након терапије антисептицима (*JS*, *CHX*)

4.5.1. *Spearman*-ова корелативна анализа између *PI* и биохемијских параметара након терапије антисептицима (*JS*, *CHX*) у *GCF* оболелих од пародонтопатије

Поређење промена између *PI* и биохемијских параметара након примене *JS* или *CHX* у *GCF* болесника са пародонтопатијом урађено је непараметарском *Spearman*-овом корелацијом. Добијени резултати у табели 4.12 показују да није било значајне корелације између *PI* и биохемијских параметара у обе испитиване групе (*JS* и *CHX*).

Табела 4.12. *Spearman*-ова корелација између *PI* и параметара оксидативног/нитрозативног статуса у *GCF* (^G) болесника са хроничним обликом пародонтопатије након одговарајућег третмана (*JS*, *CHX*)

<i>PI</i>	<i>JS</i>		<i>CHX</i>	
	<i>R</i>	<i>P</i>	<i>R</i>	<i>P</i>
<i>TBARS</i> ^G	-0.6428	0.138	-0.2161	0.661
<i>NO</i> ^G	-0.3571	0.389	-0.6626	0.083
<i>TAS</i> ^G	0.1636	0.651	0.0951	0.757
<i>tSOD</i> ^G	-0.2431	0.498	0.051	0.868
<i>tGSH</i> ^G	-0.2727	0.445	-0.2275	0.454

JS – јони сребра; *CHX* – хлорхексидин

PI – плак индекс

TBARS – супстанце које реагују са тиобарбитурном киселином; $O_2^{\cdot-}$ – супероксидни анион радикал; *NO* – нитрити и нитрати; *TAS* – укупни антиоксидативни капацитет; *tSOD* – укупна супероксид дизмутаза; *CAT* – каталаза; *GPx* – глутатион пероксидаза; *tGSH* – укупни глутатион

4.5.2. Spearman-ова корелативна анализа између GI и биохемијских параметара након терапије антисептицима (JS, CHX) у GCF оболелих од пародонтопатије

Поређење промена између GI и биохемијских параметара након примене JS или CHX у GCF болесника са пародонтопатијом урађено је непараметарском Spearman-овом корелацијом. Добијени резултати у табели 4.13 показују да је код оболелих од пародонтопатије који су третирани раствором JS регистрована значајна корелација између GI и NO ($p=0.045$) у гингивалној течности, док у групи која је третирана раствором CHX није било значајних корелација испитиваних параметара.

Табела 4.13. Spearman-ова корелација између GI и параметара оксидативног/нитрозативног статуса у GCF (^G) болесника са хроничним обликом пародонтопатије након одговарајућег третмана (JS, CHX)

GI	JS		CHX	
	R	P	R	P
TBARS ^G	-0.5714	0.200	-0.1785	0.713
NO ^G	-0.7380*	0.045	-0.3809	0.359
TAS ^G	0.0545	0.881	0.0055	0.985
tSOD ^G	0.1641	0.650	0.3411	0.254
tGSH ^G	0.1151	0.751	0.1568	0.608

JS – јони сребра; CHX – хлорхексидин

GI – гингивални индекс

TBARS – супстанце које реагују са тиобарбитурном киселином; $O_2^{\cdot -}$ – супероксидни ањон радикал; NO – нитрити и нитрати; TAS – укупни антиоксидативни капацитет; tSOD – укупна супероксид дизмутаза; CAT – каталаза; GPx – глутатион пероксидаза; tGSH – укупни глутатион

4.5.3. Spearman-ова корелативна анализа између *IKG* и биохемијских параметара након терапије антисептицима (*JS*, *CHX*) у *GCF* оболелих од пародонтопатије

Поређење промена између *IKG* и биохемијских параметара након примене *JS* или *CHX* у *GCF* болесника са пародонтопатијом урађено је непараметарском Spearman-овом корелацијом. Добијени резултати у табели 4.14 показују да у *GCF* није регистрована статистички значајна корелација приказаних параметара у обе испитиване групе (*JS* и *CHX*).

Табела 4.14. Spearman-ова корелација између *IKG* и параметара оксидативног/нитрозативног статуса у *GCF* (^G) болесника са хроничним обликом пародонтопатије након одговарајућег третмана (*JS*, *CHX*)

<i>IKG</i>	<i>JS</i>		<i>CHX</i>	
	<i>R</i>	<i>P</i>	<i>R</i>	<i>P</i>
<i>TBARS</i> ^G	-0.6666	0.109	0.0370	0.963
<i>NO</i> ^G	-0.2683	0.500	-0.2195	0.619
<i>TAS</i> ^G	0.0184	0.959	0.0694	0.821
<i>tSOD</i> ^G	-0.0123	0.972	0.1147	0.708
<i>tGSH</i> ^G	0.1231	0.734	0.0255	0.934

JS – јони сребра; *CHX* – хлорхексидин

IKG – индекс крварења гингиве

TBARS – супстанце које реагују са тиобарбитурном киселином; $O_2^{\cdot -}$ – супероксидни анион радикал; *NO* – нитрити и нитрати; *TAS* – укупни антиоксидативни капацитет; *tSOD* – укупна супероксид димутаза; *CAT* – каталаза; *GPx* – глутатион пероксидаза; *tGSH* – укупни глутатион

4.5.4. Spearman-ова корелативна анализа између DPDZ и биохемијских параметара након терапије антисептицима (JS, CHX) у GCF оболелих од пародонтопатије

Поређење промена између DPDZ и биохемијских параметара након примене JS или CHX у GCF болесника са пародонтопатијом урађено је непараметарском Spearman-овом корелацијом. Добијени резултати у табели 4.15 показују да је у GCF једина значајна корелација регистрована између DPDZ и NO ($p=0.047$) у групи испитаника који су третирани раствором JS.

Табела 4.15. Spearman-ова корелација између DPDZ и параметара оксидативног/нитрозативног статуса у GCF (^G) болесника са хроничним обликом пародонтопатије након одговарајућег третмана (JS, CHX)

DPDZ	JS		CHX	
	R	P	R	P
TBARS ^G	-0.2142	0.661	0.0051	0.991
NO ^G	-0.743*	0.047	-0.3333	0.427
TAS ^G	-0.0909	0.802	-0.0852	0.781
tSOD ^G	-0.1033	0.776	0.0192	0.950
tGSH ^G	-0.1757	0.627	-0.4456	0.126

JS – јони сребра; CHX – хлорхексидин

DPDZ – дубина пародонталног џепа

TBARS – супстанце које реагују са тиобарбитурном киселином; $O_2^{\cdot-}$ – супероксидни анион радикал; NO – нитрити и нитрати; TAS – укупни антиоксидативни капацитет; tSOD – укупна супероксид дигмутаза; CAT – каталаза; GPx – глутатион пероксидаза; tGSH – укупни глутатион

4.5.5. Spearman-ова корелативна анализа између NPE и биохемијских параметара након терапије антисептицима (JS, CHX) у GCF оболелих од пародонтопатије

Поређење промена између NPE и биохемијских параметара након примене JS или CHX у GCF болесника са пародонтопатијом урађено је непараметарском Spearman-овом корелацијом. Добијени резултати у табели 4.16 показују да ни у једној испитиваној групи није било статистички значајне корелације између испитиваних параметара у GCF.

Табела 4.16. Spearman-ова корелација између NPE и параметара оксидативног/нитрозативног статуса у GCF (^G) болесника са хроничним обликом пародонтопатије након одговарајућег третмана (JS, CHX)

NPE	JS		CHX	
	R	P	R	P
TBARS ^G	-0.2857	0.555	0.0357	0.963
NO ^G	-0.6428	0.096	-0.2619	0.536
TAS ^G	0.0424	0.907	-0.0247	0.936
tSOD ^G	-0.1033	0.776	0.1017	0.740
tGSH ^G	-0.1393	0.700	-0.1898	0.534

JS – јони сребра; CHX – хлорхексидин

NPE – ниво припојног епитела

TBARS – супстанце које реагују са тиобарбитурном киселином; O₂^{•-} – супероксидни анјон радикал; NO – нитрити и нитрати; TAS – укупни антиоксидативни капацитет; tSOD – укупна супероксид димутаза; CAT – каталаза; GPx – глутатион пероксидаза; tGSH – укупни глутатион

5. ДИСКУСИЈА

С обзиром на сложену природу пародонталне болести, идентификација једног осетљивог и специфичног дијагностичког маркера за откривање и предвиђање болести је немогућа (*Zhang i sar., 2009*). Због тога је неопходна анализа комбинације маркера која ће пружити тачнију процену стања пацијента са пародонтопатијом и користити у идентификовању биомаркера који предвиђају напредовање болести. Нажалост, само неколицина тестова из *GCF* и саливе је ушла у клиничку праксу, а ниједан клинички или лабораторијски тест се рутински не користи у праћењу особа са пародонталном болешћу. Чак и након развоја високо софистицираних метода и скоро пола века истраживања, ниједан адекватан маркер није резултирао великим концептуалним променама у пољу пародонталне дијагностике (*Armitage i sar., 2013*). Нити једно од истраживања у међувремену није пружило клинички поуздане и корисне информације за стоматологе у смислу развијања прецизније пародонталне дијагнозе и додатног планирања лечења. Поред тога, заустављено је више студија које испитују повезаност између биомаркера саливе и *GCF* и дизајна студија пародонталних болести.

Поред присуства неколико лонгитудиналних студија доступних у литератури које мере вредност биомаркера у односу на прогресију болести, још једна дилема са којом се пародонтални клиничари сада суочавају јесте како клинички открити напредовање пародонталне болести. Из тренутно доступних доказа очигледно је да не постоји поуздан клинички начин за мерење напредовања болести, што представља велику забуну за употребу биомаркера за прогнозу и процену болести. Штавише, студије у литератури имају пуно методолошких ограничења са малом величином узорка, отежавајући доношење правилних закључака. Сходно томе, ово смањује статистичку снагу студије и вероватноћу успостављања било какве узрочно-последичне везе између анализираних биомаркера и пародонталне болести доводећи у питање њихову унутрашњу и спољашњу валидност.

Пре разматрања параметара оксидативног стреса као потенцијалних маркера пародонталне болести, важно је узети у обзир њихову зависност од различитих фактора као што су старост, пушење, пол и исхрана. Студија *Zhang* и сарадника (2016) није пронашла никакав ефекат пола на *TAS*. Међутим, пол је добро познати фактор ризика за појаву пародонталног обољења и других болести повезаних са оксидативним стресом (*Genco, 1996*). Мушки појединци обично имају већу преваленцију и тежину пародонталне болести од жена (*Shiau i Reynolds, 2010*). У спроведено истраживање било је укључено више испитаника мушког у односу на женски пол, јер се радило углавном о војној популацији (Табела 4.1). У студији *Andruxhov* и сарадника из 2013. године такође је указано на мушки пол као један од важног фактора процене ризика пацијената са пародонтитисом. Међутим, несумњиво је да тачан ефекат пола на *TAS* саливе мора бити испитан у много опсежнијим студијама са већим бројем пацијената.

Старост такође може утицати на ниво параметара оксидативног стреса у саливи. Претходне студије сугеришу да нивои саливарних антиоксиданата, као и производи оксидације протеина позитивно корелирају са годинама (*Celecová u cap., 2013*). Међутим, чини се да су ове промене изражене углавном код старијих особа. Студија *Zhang* и сарадника (2016) показује да промена *TAS* корелира са тежином пародонталне болести, али не и са бактеријским оптерећењем, што подразумева да су промене у оксидативном статусу код пацијената са пародонтитисом пре последица нерегулисаног имунолошког одговора него повећаног присуства бактерија.

Присуство крварења приликом сондирања је мера која се повезује са запаљенским процесом и још увек је најбољи негативни предиктор активности пародонталне болести, где њено одсуство предвиђа недостатак уништавања пародонталног ткива, али има ниску

вредност осетљивости. Резултати спроведене студије показују да је код око 50% оболелих са пародонтопатијом укључених у истраживање било присутно крварење десни (Табела 4.2). Овај податак је од изузетног значаја за развој поузданих, иновативних, једноставних и неинвазивних дијагностичких метода за рано откривање статуса активне болести, односно праћење одговора на пародонталну терапију (*Giannobile u cap ., 2009*).

Ради боље прегледности, ово поглавље подељено је на пет делова, у складу са постављеном хипотезом:

1. Значај примене воденог раствора јона сребра и хлорхексидина на клиничке параметре код пацијената са пародонтопатијом
2. Значај примене воденог раствора јона сребра на параметре оксидативног/ нитрозативног статуса код пацијената са пародонтопатијом
3. Значај примене хлорхексидина на параметре оксидативног/ нитрозативног статуса код пацијената са пародонтопатијом
4. Нови терапијски ефекат примене *JS* или *CHX* у саливи и *GCF* код пацијената са пародонтопатијом

5.1. Значај примене воденог раствора јона сребра и хлорхексидина на клиничке параметре код болесника са пародонтопатијом

Редовна контрола деналног плака најважнији је корак у превенцији каријеса и пародонталних болести (*van der Weijden u Slot, 2011*). У досадашњим епидемиолошким студијама испитивани су фактори ризика за пародонталне болести, као што су старост, пол, ниво образовања, нездрава исхрана, употреба дувана, употреба алкохола и стоматолошко збрињавање (*Petersen u Ogawa, 2012*). У табелама 4.1 и 4.2 приказани су општи подаци испитаника укључених у ову студију, као и различити фактори који утичу на њихово орално здравље.

У спроведеној студији испитиван је ефекат 0,2% раствора *CHX* и колоидног раствора *JS* концентрације *5mg/ml* на клиничке параметре (Плак индекс, Гингивални индекс, Индекс крварења гингиве, Дубина пародонталног цепа, Ниво припојног епитела), у склопу нехируршке терапије особа оболелих од хроничног облика пародонтопатије.

Процент присутног деналног плака веома је осетљив индекс који варира у зависности од уноса хране и оралне хигијене. Примена воденог раствора *JS* код оболелих од пародонтопатије довела је до вишеструког смањења *PI* у односу на групу истих испитаника пре терапије *JS*. Такође, у групи болесника са пародонтопатијом вредност *PI* је смањена након примене *CHX* у односу на групу истих испитаника пре третмана (Слика 4.1, $p < 0.001$). Регистровано смањење после примене воденог раствора *JS* (58%) значајно је веће од редукције плака која је измерена након примене *CHX* (37%) код ових болесника пре третмана и говори у прилог веће ефикасности *JS*, што уз показану добру подношљивост овог антисептика доприноси напретку терапије код болесника са хроничном генерализованом пародонтопатијом (Схема 5.1).

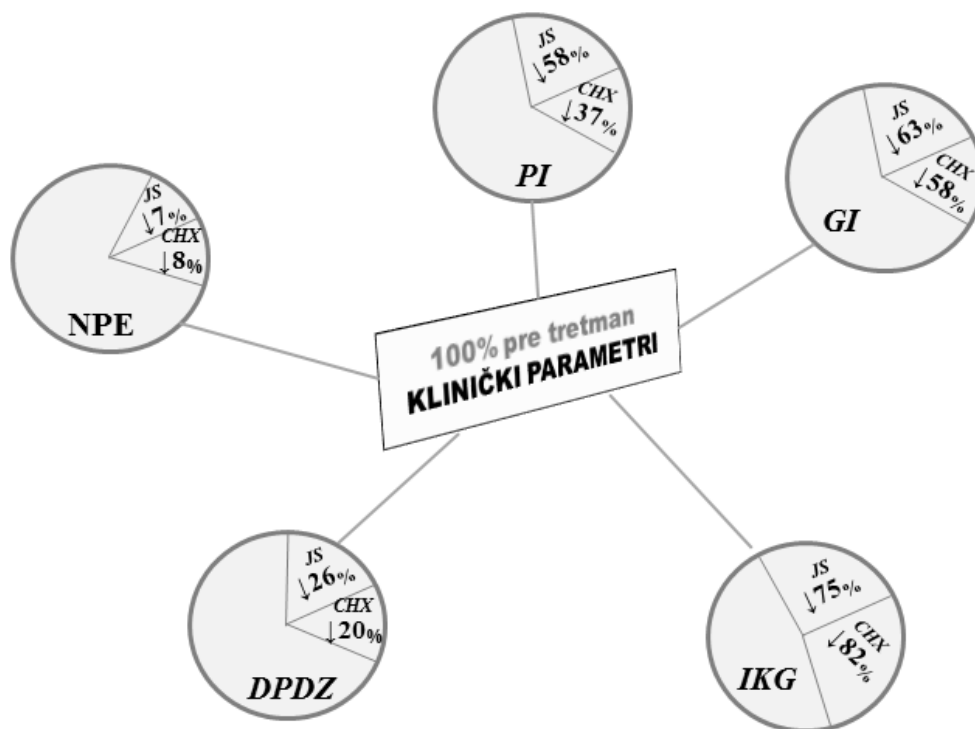
Када се разматрају ови резултати, има се на уму пре свега чињеница да *JS* онемогућавају адхезију бактерија и на тај начин превентивно утичу на спречавање формирања биофилма, који претходи стварању деналног плака (*Monteiro u cap., 2009*). Такође је важно нагласити да је испитивање активности сребра против пародонталних патогена из биофилма у новије време у успону. Студија *Lu* и сарадника из 2013. године је такође фокусирана на антибактеријски утицај различитих величина нанопартикула сребра против анаеробних бактерија. У овом случају, најмањи тестирани нанопартикли (*5nm*) показали су веће антимикробне ефекте у поређењу са већим партиклима (*15-55 nm*).

Yilmaz и *Bayindir* (2013) су добили скоро идентичне резултате након испитивања утицаја *CHX* на плак индекс месец дана после терапије, приказано статистички значајним смањењем вредности плак индекса које објашњавају способношћу *CHX* да продире у

просторе недоступне за потпуну механичку инструментацију, због чега је механичко уклањање субгингивалног денталног плака углавном некомплетно. Способност *CHX* да инхибира развој и формирање денталног плака у првим сатима након испирања, огледа се у његовом високом афинитету за ткива усне дупље и саме површине зуба (*Jain u cap., 2015; Aghili u cap., 2015*).

На схеми 5.1 су шематизовано приказане промене клиничких параметара (%) код болесника са пародонтопатијом након примене два различита антисептика (*JS, CHX*) у односу на исте испитанике пре третмана (100%).

Схема 5.1.



У спроведеној студији је примена *JS* код болесника са пародонтопатијом довела до смањења *GI* (Слика 4.2; $p < 0.001$) и *DPDZ* (Слика 4.4; $p < 0.05$), док није регистрована статистички значајна промена *NPE* у односу на групу истих болесника пре третмана воденим раствором *JS* (Слика 4.5).

Међутим, у истраживању је регистровано смањење вредности *GI* (Слика 4.2; $p < 0.001$) и *DPDZ* (Слика 4.4; $p < 0.05$) после примене *CHX* у односу на исту групу болесника пре терапије овим антисептиком. Такође, у студији је регистровано и вишеструко статистички значајно смањење *IKG* након терапије *CHX* (Слика 4.3; $p < 0.001$). Крварење гингиве приликом сондирања повећава ризик од пародонталног оштећења и може подстаћи чешћу егзацербацију болести. У тромесечној студији *Gonzalez* и сарадника која је спроведена 2015. године (код пацијената који нису лечени) забележена је прогресија болести (дефинисана као повећање дубине сондирања од ≥ 2 mm) на двоструко више места која су два пута била сондирана. У ранијој студији *Lang* и сарадника из 1996. године предложено је да се смањи интервал контроле за оболеле од пародонтопатије за 1 месец ако су резултати крварења приликом сондирања прешли 16-25%, односно да се интервал контроле за ове болеснике повећа за 1 месец ако је крварење приликом сондирања испод 10%. Новије студије показују да су методе самосталног одржавања од стране испитаника веома ефикасне у смањењу крварења приликом сондирања, међу којима је орално испирање два пута недељно натријум-хипохлоритом које може значајно продужити интервал за поновну интервенцију стоматолога, односно смањити потребу за професионалном интервенцијом (*Shah u cap., 2016*).

Иначе, по хемијској дефиницији *CHX* је позитивно наелектрисани катјонски бисгванид, који поседује веома високу способност привлачења негативно наелектрисаних места, укључујући мукозну мембрану, саливарну пеликулу зуба, као и различите компоненте биофилма на површини зуба нпр. бактерије, екстрацелуларне полисахариде и гликопротеине (*Bidar u cap., 2012; Singh u cap., 2014*). На тај начин *CHX* се представља као одличан антимикуробни агенс широког спектра, који значајно смањује раст и развој како факултативних, тако и облигаторних анаероба унутар денталног плака (*Wen u cap., 2014*). Ово се одразило као позитиван клинички ефекат уочен испитивањем утицаја локално примењеног раствора *CHX* на *GI* и *IKG*, који су били статистички значајно нижи месец дана након третмана ($p < 0.001$), што је такође случај након истог времена лечења колоидним раствором *JS* ($p < 0.001$). Због тога на крају студије није било статистички значајних разлика између проучаваних група болесника у овим параметрима ($p = 0.492 / p = 0.918$).

Када се разматра ефекат *CHX* у случају ових параметара, сличне резултате добили су у својој студији *Saglam* и сарадници (2013), где се *IKG* месец дана након терапије процентуално смањило за око 79%, а *GI* за 66%. Међутим, раствор *CHX* има високу цитотоксичну активност на хумани периодонтални лигамент инхибирајући синтезу нуклеинских киселина, протеина и активност митохондрија (*Chang u cap., 2001*). *Pucher* и *Daniel* (1992) такође су доказали да је *CHX* инхибицијом синтезе протеина цитотоксичан за хумане фибробласте.

Пратећи резултате позитивног антибактеријског утицаја различитих величина нанопартикула сребра против анаеробних бактерија, претпоставка је да овај ефекат произилази из адстригентног потенцијала сребра удружених са директним или чак индиректним антибактеријским ефектом јона сребра (*Lu u cap., 2013*). Проласком кроз ћелијски зид бактерија, јони сребра улазе у ћелију и спречавају репликацију молекула ДНК. Овом приликом се догађа и интеракциона инактивација бактеријских протеина, а као последица каталитичке активности сребра долази до ослобађања кисеоничких радикала, који узрокују структурална оштећења унутар бактерија. Овај феномен доводи до оштећења или чак смрти бактерија (*Feng u cap., 2000*).

Студија *Almerich-Silla* и сарадника из 2015. године указала је на везу између крварења приликом извођења нехируршке терапије код болесника са пародонтопатијом и напредовања саме пародонталне болести. Познато је да је степен крварења гингиве повезан са присуством различитих врста агресивних бактерија (*Ximenez-Fyvie u cap., 2006*). У том смислу, поменута студија корелира повећање *IKG* са порастом оксидативног стреса код особа са пародонтопатијом. У сагласности са приказаним налазима, резултати спроведеног истраживања показују смањење *IKG* ($p < 0.001$) након терапије раствором *JS* у односу на болеснике пре третмана (Слика 4.3). Крварење гингиве приликом сондирања може имати утицаја на пародонтално оштећење и смањење крварења након интервенције.

Разматрајући клиничке параметре, значајан резултат био је у смањењу дубине пародонталног џепа, где је у групи код којих је примењен раствор *JS* смањен за 0.97mm у односу на групу *CHX* где је смањење износило 0.65mm или процентуално 26% у групи *JS* и 20% у *CHX* групи.

Веома добре резултате у смањењу дубине пародонталног џепа добили су и други аутори који су као контролу користили раствор *CHX* уз нехируршку терапију пародонтопатије. Вредности дубине пародонталног џепа применом раствора *CHX* су се кретале од 6,28 mm пре до 4.90 mm месец дана после терапије (*Shahab u cap., 2011*). Значајно побољшање у редукцији дубине пародонталних џепова од 4-6 mm од 1.25 mm после 3 месеца и 1.39 mm после 6 месеци приказали су *Kruck* и сарадници (2012), а за исте параметре, *Cobb* је 2002. године приказао вредности од ~1.29 mm. Аутори су добијене резултате објаснили пре свега утицајем антисептика на раст аеробних бактерија, као и на редукцију укупног броја анаеробних бактерија, што може следствено утицати на

антиинфламаторне процесе и поремећај сазревања плака након спроведене каузалне терапије уз иригацију антисептицима.

У овом испитивању приказано је да и примена раствора *JS* доводи до значајног смањења дубине пародонталних џепова, управо због своје успешне антибактеријске ефикасности. Ова ефикасност против пародонталних патогених врста такође је приказана у неким студијама. Једињења која садрже сребро су атрактивна због њихове снажне антимикуробне активности, високе постојаности и распрострањеног антибактеријског спектра (*Patel u cap., 2000*). Резултати *Reise* и сарадника (2016) указују да комплекси сребра 3 и 4 представљају нови потенцијал антибактеријских агенаса за употребу у различитим терапијским процедурама пародонталне болести, каријеса и ендодонтских обољења.

Вредности нивоа припојног епитела су се унутар испитиваних група у нашој студији после терапије незнатно смањиле, тако да статистичка значајност није регистрована, као ни између група *СНХ* и *JS*. Процентуално она је износила у групи *СНХ* - 8%, а у групи *JS* - 7%.

У студији која је поредила ефекте *СНХ* са другим антисептиком такође није било статистички значајних разлика по питању овог параметра. Њихова испитивања показала су да 15, 30 и 60 дана после завршене терапије није било статистички значајног утицаја на ниво припојног епитела ($n=0.21$) (*Rashed u cap., 2016*).

Хлорхексидин глуконат/ диглуконат је најчешће коришћено средство за спречавање стварања денталног плака, али доводи до промене боје зуба и смањује ефикасност након 6 месеци употребе (*Slots u cap., 2017*). Опадајућа ефикасност која се временом појављује након његове примене може бити резултат прекомерног раста микроорганизама отпорних на *СНХ*. Орално испирање *СНХ* у трајању од 4 месеца није успело да реши инфламацију у пародонталним џеповима дубљим од 3 *mm*. Раније анималне студије показују да супрагингивално испирање *СНХ* не смањује патогеност микроба код мајмуна (*Mashimo u cap., 1980*).

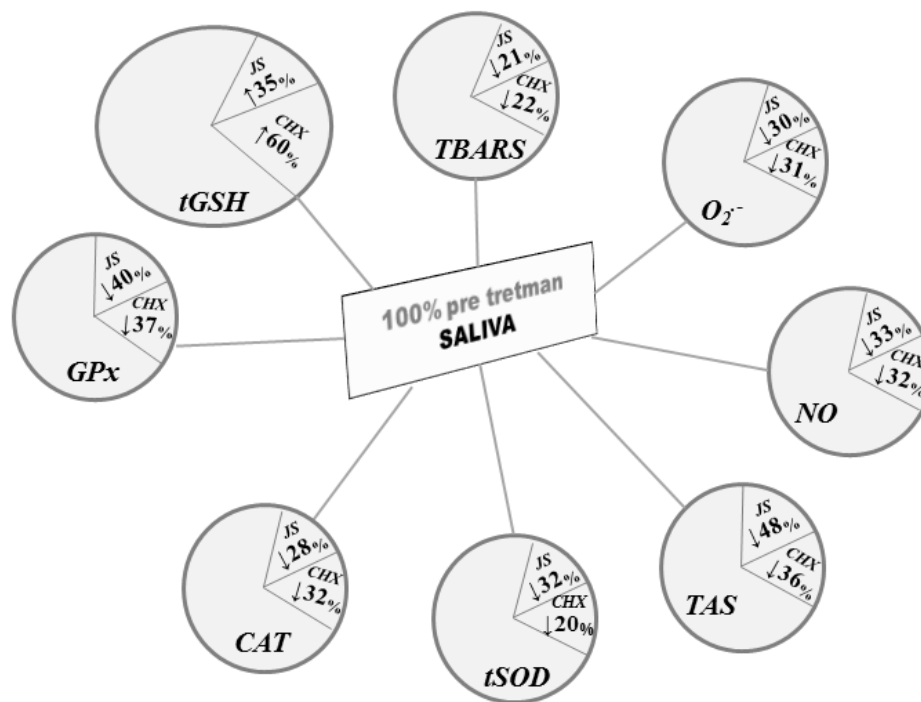
5.2. Значај примене воденог раствора јона сребра на параметре оксидативног/ нитрозативног статуса код болесника са пародонтопатијом

5.2.1. Утицај воденог раствора јона сребра на параметре оксидативног/ нитрозативног статуса у саливи болесника са пародонтопатијом

Патолошки догађаји који доводе до уништавања пародонцијума током запаљења код пародонталних болести представљају сложене интеракције које укључују неравнотежу ензимских и неензимских деградативних механизма. РОС генеришу полиморфонуклеарни леукоцити (ПМН) током инфламаторног одговора и веома су деструктивни. Детекција РОС продуката оксидације уз повећање јона гвожђа и бакра који катализују производњу реактивних радикалних врста, као и постојање дисбаланса у оксидативно/ антиоксидативној активности унутар пародонталних џепова, сугерише значајну улогу РОС-а у оштећењу пародонталног ткива. *In vitro* студије потврђују укљученост РОС у разградњи бројних компоненти ванћелијског матрикса (укључујући протеогликане), што резултира модификацијом функционалних група аминокиселина, доводи до фрагментације језгра протеина и ограничене деполимеризације саставних ланаца гликозаминогликана. Идентификација и карактеризација метаболита везивног ткива у *GCF* која настају деградацијом пародонталних ткива, посебно алвеоларне кости, пружају додатне доказе о улози РОС-а у разарању ткива повезаног са запаљенским пародонталним болестима (*Waddington u cap., 2000*).

Сматра се да је у основи оштећења пародонталног ткива токсично дејство РОС које се нормално стварају током аеробних метаболичких реакција. Саставни део мембрана ћелија пародонталног ткива у високом проценту чине полинезасићене масне киселине, чије незасићене везе их чине погодном метом оштећења РОС (Reiter, 1995).

На схеми 5.2 су шематизовано приказане биохемијске промене (%) у саливи болесника са пародонтопатијом пре и након третмана антисептицима (JS, CHX) у односу на исте испитанике пре третмана (100%).



Најснажнији докази који показују укљученост РОС у патолошко оштећење везивног ткива у току пародонталних болести потичу из инфилтрације ПМН као кључног догађаја одговора домаћина на инвазију микроорганизама (Lynch u Kuramitsu, 1999). Раније студије показале су да ПМН из GCF и крви оболелих од пародонтопатије утичу на стварање O₂⁻ после стимулације, у поређењу са контролном групом (Kimura u cap., 1993; Guarnieri u cap., 1991). Резултати спроведене студије потврђују повећано стварање O₂⁻ у саливи особа са пародонтопатијом у односу на здраве испитанике (Слика 4.7; p<0.001), док терапија раствором JS код оболелих од пародонтопатије редукује продукцију анјона (p<0.01) у односу на исте болеснике пре третмана.

Инфекција пародонталним патогенима изазива запаљење и покреће оксидативни стрес чиме узокује уништавање пародонталних ткива. Нехируршко пародонтално лечење, као и упутства за хигијену усне дупље, могу елиминисати пародонталне патогене и успорити, или чак зауставити процес запаљења у коме је поремећена редокс хомеостаза што директно утиче на активност пародонталне болести (van der Weijden u Hioe, 2005). Новији радови Laku и сарадника (2020) показали су да интензивни пародонтални третман узрокује локалну трауму и пролазну бактеријемiju, што доводи до акутне, краткотрајне системске инфламације и дисфункције ендотела. У складу са овим подацима су и резултати спроведене студије да је у саливи болесника са пародонтопатијом регистровано повећано ослобађање O₂⁻ (Слика 4.7; p<0.001) и нивоа NO (Слика 4.8; p<0.001) у односу на контролну групу здравих испитаника, што резултира деструктивним ефектима на липидне структуре (измерено повећање концентрације TBARS није статистички значајно; Слика 4.6) и протеине (вишеструко смањење садржаја tGSH; Слика 4.13; p<0.001).

Патофизиолошку улогу *NO* у пародонталној болести увели су 2000. године *Ozmeric* и сарадници. Показано је да бактеријски липополисахарид у зиду периопатогених бактерија узрокује смрт и апоптозу пародонталних лигамената кроз повећање *iNOS* и фосфорилацију *C-Jun N*-терминалне киназе (*van't Hof u Ralston, 2001*). На овај начин може изазвати локализовану мирковаскулопатију, трајну исхемију и последично неповратно оштећење ендотела и околних пародонталних ткива (*Bejeh Mir u cap., 2014*). У поменутој студији закључено је да су количине укупног *NO*, нитрита и нитрата у саливи осетљивији биомаркери у односу на садржај истих у *GCF*. На тај начин се одустало од прво предложене претпоставке да *GCF* може имати већи капацитет да одражава пародонталне болести, јер се његови биомаркери углавном излучују из околних појединачних пародонталних ткива. Супротно томе, саливарни биомаркери су производ лучења из различитих извора, укључујући пародонтално ткиво, каријес, системске болести и пљувачне жлезде. *NO* игра веома значајну улогу у процесима оштећења пародонталних ткива.

Поменута студија (*Bejeh-Mir u cap., 2014*) бавила се проучавањем улоге *NO* у процесу оштећења пародонталног ткива и показала да откривање *NO* биомаркера, као и његових крајњих метаболита, има већу вредност у саливи него у *GCF* пацијената са пародонтопатијом. С тим у вези, резултати спроведене студије показују да су вредности *NO* много веће у саливи, као и да је концентрација *NO* статистички значајно већа код болесника пре терапије антисептицима у односу на исте болеснике након третмана (Слике 4.8 и 4.15).

Vegut и сарадници су 2018. године показали повећање концентрације *NO* (NO_2 и NO_3) у саливи пушача, што је било праћено смањењем антиоксидативне одбране у овој популацији испитаника и како ћелијском, тако и ткивном оштећењу. Резултати ове студије потврђују претходне налазе, јер је у саливи особа са пародонтопатијом регистровано вишеструко повећање *NO* вредности (Слика 4.8; $p < 0.001$) и редукција главног антиоксиданса *tGSH* (Слика 4.13; $p < 0.001$) у односу на контролну групу здравих испитаника.

Механизми помоћу којих антиоксиданти штите биолошке системе од оксидативних оштећења укључују директно уклањање РОС и секвестрацију слободних каталитичких јона метала, који промовишу формирање РОС-а. У ткивима сисара, један од најзначајнијих антиоксиданата је *SOD*, која катализује дисмутацију O_2^- и заједно са *CAT* и *GPx* пружа заштитне механизме против унутарћелијске акумулације H_2O_2 . Међутим, активности ових ензима у ванћелијским течностима су ниске, а антиоксидативна активност се углавном приписује протеинима који везују гвожђе као што су феритин, трансферин, лактоферин и хемосидерин, односно протеини који везују бакар, као што је церулоплазмин. Многи антиоксиданси са ниском молекулском масом идентификовани су у саливи и *GCF* (*Moore u cap., 1994*). Неравнотежа између повишене производње РОС и концентрације антиоксиданата директно је укључена у патогенезу многих инфламаторних болести, укључујући пародонталне болести.

Једна од претпоставки била је да повећано генерисање производа пероксидације липида на местима запаљења може бити одговорно за појачану ензимску антиоксидативну активност (*Panjamurthy u cap., 2005*). У спроведеном истраживању регистроване су повећане активности свих антиоксидативних ензима: *tSOD* (Слика 4.10; $p < 0.001$), *CAT* (Слика 4.11; $p < 0.001$) и *GPx* (Слика 4.12; $p < 0.001$) у саливи пацијената са пародонтопатијом у односу на здраве контролне испитанике.

Раније студије показале су повећану концентрацију *TAS* у саливи оболелих, која се смањује применом пародонталне терапије (*Wei u cap., 2010*). Оксиданти произведени током инфламаторног одговора реагују са циљним протеинима или се, пак неутралишу деловањем антиоксиданаса, због чега се мерење концентрације *TAS* у саливи може сматрати важним параметром за пародонталну дијагностику. Међутим, различита

истраживања указују на веома контрадикторне резултате вредности *TAS* у саливи. Неке од претходних студија показују да је концентрација *TAS* у саливи смањена код особа са пародонтопатијом (*Diab-Ladki u cap., 2003; Mashayekhi u cap., 2005*). Друге групе истраживача нису пронашле значајну разлику у концентрацији *TAS* у саливи између оболелих од пародонтопатије и здравих испитаника (*Brock u cap., 2004; Tóthová u cap., 2013*). Напоследку, једна група истраживача показује пораст вредности *TAS* у саливи болесника са пародонтопатијом (*Almerich-Silla u cap., 2015*), што је у складу са резултатима добијеним овом студијом где су вредности *TAS* биле двоструко веће код болесника са пародонтопатијом у односу на здраве (контролне) испитанике (Слика 4.9, $p < 0.001$), као и у односу на здраве испитанике који су добили раствор *JS* за испирање, као контролну групу ($p < 0.01$). Регистроване су повећане активности антиоксиданаса у узорцима саливе као одговор на повећано стварање O_2^- у току пародонталне болести. У том смислу, неспорна је неравнотежа у концентрацијама оксиданаса/ антиоксиданса, удружена са изворима гвожђа и бакра који као катализатори повећавају стварање високо реактивних врста $\bullet OH$ и могу потенцирати озбиљна оштећења пародонталног ткива. Овај сценарио је раније описан у ћелијама периодонталних влакана и епителних ћелија гингиве који су подложни ћелијским оштећењима и лизи ћелија у присуству РОС (*Altman u cap., 1992*).

Претходне студије су већ указале да је ниво *tSOD* повезан са многим инфламаторним болестима и у том смислу, могао би да се одрази почетак болести (*McCord u Edeas, 2005*). Резултати спроведене студије показују да је активност *tSOD* у саливи болесника пре третмана раствором *JS* била повећана (Слика 4.10; $p < 0.01$) у односу на контролну групу здравих испитаника који су добили раствор *JS* за испирање усне дупље. Третман овим антисептиком код болесника са пародонтопатијом у саливи враћа активност ензима на контролне вредности. Приказани резултати активности антиоксидативног ензима указују да повећање *tSOD* може бити праћено раним инфламаторним синдромом код ових болесника. Смањење *tSOD* у саливи након примене раствора *JS* (Слика 4.10; $p < 0.001$) у односу на исте испитанике пре терапије, праћено је повећањем садржаја *tGSH* после терапије (Слика 4.13; $p < 0.05$). Све ове промене међутим, не воде ткивне структуре пародонцијума у стање оксидативног стреса, јер нема значајне промене концентрације *TBARS* код ових болесника (Слика 4.6).

Примена раствора *JS* код болесника са пародонтопатијом, поред очуваних нивоа контролних липидних пероксида и садржаја *tGSH*, смањује ниво O_2^- на вредност нижу од контролне групе ($p < 0.05$). Опет је салива медијум у коме се испољавају кључне промене, на супрот смањењу стварања супероксида (Слика 4.7; $p < 0.01$), концентрација *tGSH* расте (Слика 4.13; $p < 0.05$), а опада активност *GPx*, ензима који катализује редукцију водоник пероксида од стране редукованог глутатиона (Слика 4.12; $p < 0.01$). Такође, у раду је показано и смањење активности *CAT* после примене раствора *JS* код болесника са пародонтопатијом у односу на болеснике пре примењеног третмана (Слика 4.11; $p < 0.05$). Регистровано смањење активности ензима је ипак веће од вредности добијених у групи здравих испитаника после примене раствора *JS* ($p < 0.05$). Познато је да антиоксидативни ензими непосредно или посредно убрзавају реакције којима се врши неутрализација РОС, при чему је *CAT* кључни ензим у неутрализацији токсичног H_2O_2 .

Још један разлог смањене активности *tSOD* (Слика 4.10; $p < 0.001$) у групи болесника са пародонтопатијом након примене раствора *JS* може бити недостатак анјона, јер је у истој групи болесника регистровано и смањење продукције O_2^- (Слика 4.7; $p < 0.01$) у односу на исте испитанике пре терапије *JS*. Такође, O_2^- лако реагује са азот моноксидом и формира штетни пероксинитрит анјон у реакцији која је три пута бржа од дисмутације коју катализује *SOD*. Поменута реакција укључена је у ацетилацију аминокиселина, која је покренута грам-негативним анаеробима (*Butler u cap., 2015*). У складу са литературом, показан је и незнатан пораст ЛПО који није статистички значајан (Слика 4.6) код ових

болесника, потврђујући развој оксидативног стреса са напредовањем болести. Ову идеју подржава прекомерна производња РОС преко *NADPH* оксидазе и мијелопероксидазе током фагоцитозе бактеријских патогена и њихове интеракције са две главне мете у мембранским фосфолипидима, двоструком везом између C-атома и естарском везом између глицерола и масних киселина (*Huang u cap., 2014; Das u Roychoudhury, 2014*).

Као неензимски антиоксиданс, глутатион делује директно уклањајући РОС, или као кофактор ензима *GPx* и *GST* у процесима коњугације или катализујући редукују липидних хидропероксида и H_2O_2 . Пародонтални патогени могу редуковати глутатион и променити однос редуковани/ оксидовани облик *GSH* према оксидантима, што представља јасан биомаркер оксидативног стреса у пародонтопатији. *Grant* и сарадници (2010) показали су да успешна пародонтална терапија враћа редокс баланс оштећеном пародонталном ткиву. Значајан пораст концентрације *tGSH* након терапије антисептицима (*JS, CHX*) код особа са пародонтопатијом вероватно је повезан са њиховом катализаторском улогом у детоксификацији ксенобиотика пореклом из периопатогена или неутрализацијом хидропероксида ослобођених из процеса липопероксидације повезане са оксидативним стресом узрокованим пародонталним инфламаторним процесом, заједно са глутатионом (*Bains u Bains, 2015*).

Анализа гингивалног ткива открила је редуковану активност антиоксиданаса код оболелих од пародонтопатије у поређењу са контролном групом (*Patel u cap., 2012*). Иста група аутора указује и на значајан пораст *GPx* и смањење нивоа *GSH* у гингивалним ткивима и серуму болесника са пародонтопатијом, у поређењу са контролном групом (испитаници са клинички здравим пародонцијумом). Смањена концентрација *tGSH* измерена је и у саливи болесника са пародонтопатијом пре третмана раствором *JS* (Слика 4.13; $p < 0.001$) у односу на исту групу након примењеног третмана. Као кључни унутарћелијски антиоксиданс, *GSH* штити активне тиолне групе молекула од утицаја слободнорадикалских врста (*Gu i sar., 2015*). Повећање концентрације *tGSH* у групи болесника која је добила терапију раствором *JS* управо је показатељ његове заштитне функције, односно да су на рачун повећања *tGSH* тиолне групе остале очуване.

5.2.2. Утицај воденог раствора јона сребра на параметре оксидативног/ нитрозативног статуса у *GCF* пацијената са пародонтопатијом

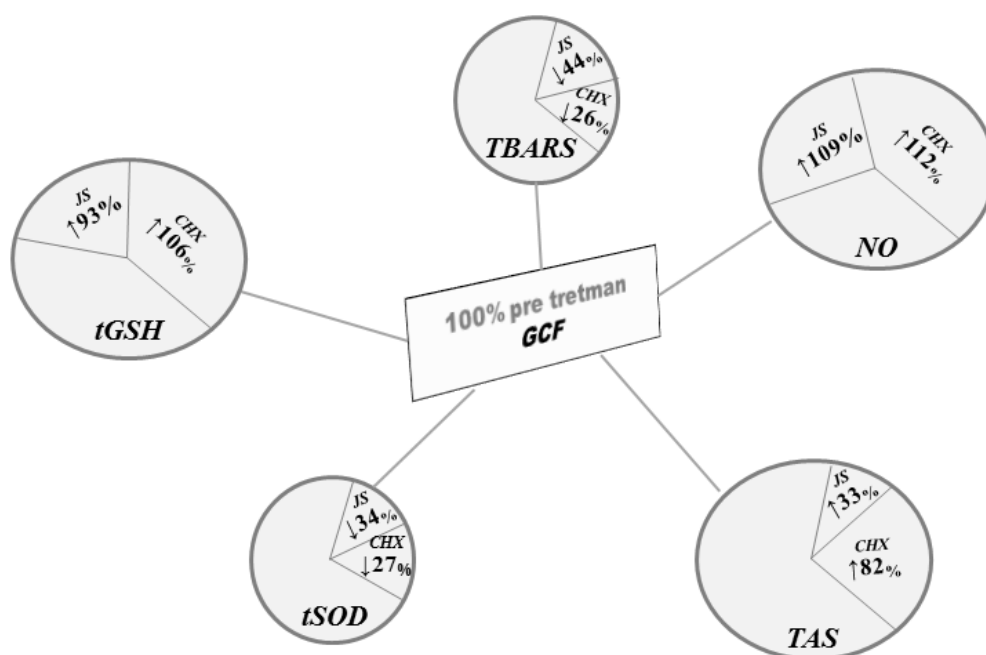
Идентификација низа биохемијских фактора присутних у *GCF* омогућила је да се потенцијални дијагностички и прогностички биомаркери користе у процени биолошког стања пародонцијума и код оболелих и код здравих особа. *GCF* се може сматрати серумским трансудатом који потиче из дубље постављеног пародонталног везивног ткива, а излива се преко слободне ивице гингиве у усну дупљу. У *GCF* идентификовани су метаболити везивног ткива повезани са бројним клиничким стањима повезани са ресорпцијом или преобликовањем алвеоларне кости.

Неке од ранијих студија испитивале су нивое јона прелазних метала у пародонталним џеповима с циљем њиховог утицаја на раст пародонталних патогена и производњу фактора вируленције (*Petrovich u cap., 1996*). Утврђене су позитивне корелације између концентрације гвожђа и бакра у *GCF* и тежине пародонталне болести.

Wei и сарадници су 2010. године показали да се концентрација ЛПО у саливи није променила код болесника са пародонтопатијом у односу на контролне субјекте. За разлику од саливе, у *GCF* ових пацијената регистровано је значајно повећање ЛПО у односу на здраве испитанике, које се редукује након примењене терапије. Анализом добијених резултата ове студије, регистроване су идентичне вредности. Наиме, нису измерене промене у концентрацији *TBARS* у саливи (Слика 4.6) особа са пародонтопатијом пре терапије у односу на контролну, док је у *GCF* добијено статистички значајно повећање нивоа *TBARS* (Слика 4.14; $p < 0.001$) у односу на здраве субјекте. Након примене третмана раствором *JS* код оболелих од пародонтопатије дошло

је до смањења концентрације *TBARS* ($p < 0.05$) на ниво контролних вредности. Ови резултати говоре у прилог чињеници да се ниво ЛПО у *GCF* квалитативно и квантитативно разликује од саливе. Присутан је тренд повећања концентрације *TBARS* у *GCF* и саливи у односу на здраве испитанике следећим редоследом: *GCF* > салива > здрав периодонцијум.

На схеми 5.3 шематизовано су приказане биохемијске промене (%) у *GCF* болесника са пародонтопатијом пре и након третмана антисептицима (*JS*, *CHX*) у односу на исте испитанике пре третмана (100%).



Концентрација *TBARS* након примене *JS* редукује се за 44% у односу на групу особа са пародонтопатијом пре примењеног третмана, док је у групи болесника који су третираны раствором *CHX* тај проценат много мањи (само 26%). Добијени резултати показују бољу физиолошку одбрану липидних мембрана од оксидативног оштећења са применом *JS* као антисептика.

У клиничкој студији *Bejeh-Mir* (2014) процењује се дијагностичка улога нитрита, нитрата и азотног оксида између саливе и *GCF* у циљу разликовања здравог пародонцијума од гингивитиса и пародонтопатије. Поменута студија закључује да откривање *NO* биомаркера и његових крајњих метаболита нема значајну вредност у *GCF*, као ни у саливи за процену пародонталног здравља. Ниво $NO_2 + NO_3$ у *GCF* је много нижи код болесника са пародонтопатијом пре примене раствора *JS* (Слика 4.15, $p < 0.001$) у односу на ниво *NO* након третмана када се увећао за 109% (схема 4.3). Такође, показана је негативна корелација између *DPDZ* и концентрације *NO* у *GCF* болесника након примене раствора *JS* (Табела 4.15; $r = -0,743$; $p < 0.05$). Ови подаци потврђују штетне ефекте *NO* који се са смањењем *DPDZ* смањују након терапије раствором *JS*.

За разлику од снижених вредности *TAS* у саливи особа са пародонтопатијом пре третмана *JS*, у *GCF* истих испитаника регистровано је повећање укупног антиоксидативног капацитета (Слика 4.16; $p < 0.001$) који се са употребом воденог раствора *JS* враћа на ниво контролних вредности ($p < 0.05$). Разлике у резултатима *TAS* између различитих студија, као и у различитим медијумима, могле би се објаснити различитим аналитичким методама које се користе за процену *TAS* (*Wang и сар., 2015*). Нарочито је важна чињеница да *TAS* представља параметар који укључује

интегрисану активност различитих антиоксиданаса и често зависи од њихове интеракције и синергистичких ефеката (*Ghiselli u cap., 2000*).

Akalin и сарадници су 2005. године показали да је активност *SOD* у *GCF* значајно виша код болесника са хроничним обликом пародонтопатије, и да са повећањем нивоа *SOD*, прогредира и процес инфламације. Пет година касније, *Wei* и сарадници (2010) потврђују повећање активности *SOD* у саливи и *GCF* у току прогресије запаљења код болесника са пародонтопатијом. Резултати овог рада у складу су са налазима поменутих студија, јер је активност *tSOD* била значајно виша у оба испитивана медијума: саливи (Слика 4.10, $p < 0.001$) и *GCF* (Слика 4.17, $p < 0.001$) у односу на здраву, контролну групу. Познато је да периодонтална влакна код људи поседују ензим *SOD* чиме су заштићени од токсичног дејства РОС, посебно од O_2^- у току инфламаторног одговора (*Jacoby u Davis, 1991*). Такође је познато да бактеријски липополисахарид стимулише ослобађање супероксида из фибробласта гингиве, што показује да индукција *SOD* може представљати важан механизам одбране фибробласта у току инфламације. Штавише, повећани ниво активности *SOD* у инфламираној гингиви код болесника са пародонтопатијом може указивати на повећано стварање O_2^- од стране ПМН. Повећана синтеза супероксида доводи до појаве оксидативног стреса, што је узроковало повећану потребу за стварањем *SOD* због успостављања РОС-АО баланса у циљу заштите ткива.

Chapple и *Matthews* (2007) показали су да је за степенасти аниоксидативни одговор у *GCF* одговоран глутатион. Повећан ниво *GSH* у *GCF* након примене *JS* (Слика 4.18, $p < 0.001$) може бити резултат повећане синтезе ћелија пародонталног ткива или механизма активног или пасивног ослобађања секундарне протеазне активности на епителним ћелијама гингиве. Гингивално ткиво се састоји од течности која у хроничним инфламаторним условима има смањену концентрацију глутатиона, због немогућности нормалних ткивних хомеостатских механизма да се заштите од оштећења ткива. Смањене концентрације глутатиона у *GCF* код оболелих од пародонтопатије могу бити резултат различитих фактора који резултирају смањеном синтезом и/ или појачаном локалном разградњом.

5.3. Значај примене хлорхексидина на параметре оксидативног/ нитрозативног статуса код пацијената са пародонтопатијом

5.3.1. Утицај хлорхексидина на параметре оксидативног/ нитрозативног статуса у саливи пацијената са пародонтопатијом

Истраживања *Waddington* и сарадника из 2000. године показују да патолошки догађаји који доводе до уништавања пародонцијума у току инфламаторне пародонталне болести представљају сложене интеракције, пре свега неравнотежу у ензимским и неензимским деградацивним механизмима. Иста студија указује на директну укљученост РОС, ослобођених из бројних метаболичких извора, у патогенези оштећења ткива пародонцијума. Већ је указано да РОС генеришу претежно ПМН током инфламаторног одговора и да се сматрају високо реактивним радикалима. Детекција продуката оксидације ових РОС, повишење јона гвожђа и бакра који катализују стварање најреактивнијих радикалних врста, као и неравнотежа у оксидативној/ антиоксидативној активности у самим пародонталним цевовима, сугерише значајну улогу РОС у оштећењу ткива пародонцијума.

Као резултат поремећаја редокс сигнализације и контроле услед дисбаланса између оксиданата и антиоксиданата, оксидативни стрес доводи до молекуларних оштећења (*D'Aiuto u cap., 2010*). Поред добро познате чињенице да оксидативни стрес има важну улогу у патогенези хроничних инфламаторних стања, па и у обољењу пародонцијума, пре

десетак година указано је да је оксидативни стрес централна веза између системских болести и пародонтопатије (*Chapple, 1997*). *Thomas* је са сарадницима (2013) дефинисао пародонтопатију као хронично инфламаторно стање покренуто као одговор на биофилм плака, које карактерише запаљење и губитак периодонталне и коштане потпоре са прекомерном производњом *ROS* и протеолитичких ензима. У току процеса оксидације стварају се *POC*, међу којима слободни радикали или деривати кисеоника, као што су супероксидни анјон радикал ($O_2^{\cdot-}$), хидроксилни радикал ($\bullet OH$) и азот оксид (NO) радикал (NO^{\cdot}), као и радикали који не потичу од кисеоника, као што су водоник пероксид (H_2O_2) и хипохлорна киселина ($HOCl$). Маркери оксидативног стреса у саливи већ дуже се време разматрају као могуће средство за дијагностику пародонталних обољења (*Tóthová u sar., 2015*). Пошто већина оксиданата има врло кратко време полураспада, мерење оксидационих производа је једини показатељ оксидативног стреса који се може користити (*Chapple u Matthews, 2007*).

У саливи болесника са пародонтопатијом пре третмана раствором *JS* нису регистроване промене концентрације *TBARS* (Слика 4.6). Није било значајних разлика у концентрацијама овог параметра у саливи и након примене воденог раствора *JS* на почетку или после завршетка терапије. Међутим, вреди напоменути да су се догодиле промене у маркерима оксидативног стреса, тачније оштећењу ћелијских мембрана у саливи болесника након примене *CHX* у односу на исте испитанике пре третмана (Слика 4.6; $p < 0.01$). Наиме, код ових болесника регистрована је значајно већа концентрација *TBARS* која говори о промоцији пероксидације липида мембране пре пародонталног лечења у односу на групу истих субјеката након примењене терапије *CHX*. Ови резултати показују да оштећење ткива пародонцијума код болесника омета редокс хомеостазу, мења ниво антиоксиданата у балансирању *POC* и утиче на активност пародонталне болести. Примена терапије *CHX* код ових оболелих пацијената доводи до значајног смањења концентрације *TBARS* (Слика 4.6; $p < 0.01$) уз очување нивоа *tGSH* (Слика 4.13; $p < 0.01$) у саливи, што управо подстиче познату претпоставку да се смањење тиолних група дешава реверзибилно, односно на протеинима, а не на кључном ћелијском антиоксидансу-глутатиону (*Vujotic i sar., 2020*). Добијени резултати код испитаника који су добили терапију *CHX* упућују на значајно отпорније липидне мембране и нешто фрагилнију отпорност протеина у односу на деловање слободних радикала које је подстакнуто применом овог антисептика.

Скорашња студија *Puati* и сарадника (2018) показала је значајне промене *pH*, укупних протеина, *MDA* и *TAS*, као и у њиховој корелацији са *DMFS/dfs* (engl. *DMFT – Decayed, Missing, and Filled Permanent Teeth*) скором у популацији деце са каријесом. Код болесника пре терапије раствором *CHX* дубина пародонталног џепа *DPDZ* била је у позитивној корелацији са концентрацијом *TBARS* ($r = 0.6193$; $p < 0.05$), што значи да је пре третмана већа дубина пародонталног џепа била праћена повећањем ЛПО у саливи болесника са пародонтопатијом. Међутим, након терапије раствором *CHX*, *DPDZ* била је у негативној корелацији са *TAS* (Табела 4.10; $r = -0,7680$; $p < 0,05$).

Постоје студије које су потврдиле да је дошло до повећане производње $O_2^{\cdot-}$, синтезе *NO* и активности миелопероксидазе код инфламације периодонцијума (*Matejka u sar., 1998*). У спроведеној студији регистрована је повећана продукција $O_2^{\cdot-}$ пре терапије раствором *CHX* код болесника са пародонтопатијом, док је по завршетку терапије вредност анјона враћена на ниво контролне групе испитаника (Слика 4.7; $p < 0.01$).

Sukuroglu и сарадници (2015) указали су на бољи *NO* одговор у саливи него у *GCF* код особа са пародонтопатијом, као и бољи дијагностички потенцијал саливе од *GCF* и плазме за процену ризика од прекомерног раста ткива гингиве. Резултати студије на болесника са пародонтопатијом у овом истраживању показали су повећање концентрације *NO* у саливи оболелих од пародонтопатије (Слика 4.8; $p < 0.001$), која се враћа на ниво контролних вредности након терапије *CHX*. Студија је показала и присуство корелације

NO са клиничким параметрима. Наиме, након терапије *CHX* у саливи оболелих од пародонтопатије пронађена је негативна корелација између *DPDZ* и концентрације *NO* (Табела 4.10; $r=-0.5429$, $p<0.05$), што указује на штетне ефекте *NO* чије смањење концентрације након терапије *CHX* узрокује повећање дубине пародонталних џепова.

Novakovic и сарадници су 2014. године показали да су укупни антиоксиданти у саливи, као и вредности *tSOD* остали непромењени код клинички здравих испитаника (без пародонталне терапије). Антиоксидативне супстанце су категорисане према месту деловања (унутарћелијски, ванћелијски или мембрански везани); растворљивости (у води или масти); пореклу (егзогено, ендогено или синтетичко); структуре које штите (ДНК заштитне, протеинске или липидне); начин деловања (превентивно или прекидом ланца). Резултати спроведеног истраживања су у складу са поменутом студијом, јер је у контролним групама здравих испитаника који су користили један од антисептика (*JS*, *CHX*), вредност *TAS* (Слике 4.9 и 4.16), као и активност антиоксидативног ензима *tSOD* (Слике 4.10 и 4.17) остали непромењени у односу на исту групу здравих субјеката без примене одговарајућих антисептика. Терапија раствором *CHX* код оболелих од пародонтопатије доводи до значајног смањења вредности *TAS* у саливи (Слика 4.9; $p<0.01$) у односу на исту групу пре примењеног третмана.

Анализа урађена коришћењем мултиваријантног генерализованог линеарног модела показала је да *TAS* у саливи значајно зависи од укупне дијагнозе, али не и од других параметара као што су старост, пол, статус пушења и присуство бактерија. Студија *Zhang* и сарадника (2016) показује да су промене параметара оксидативног стреса код болесника са пародонтитисом повезане са инфламаторним процесима у пародонцијуму, а не директно са бактеријским оптерећењем. Резултате из ове студије поткрепљују нека пређашња истраживања која показују да *TAS* у саливи негативно корелира са тежином пародонтитиса (*Diab-Ladki и сар.*, 2003; *Mashayekhi и сар.*, 2005). Наиме, у групи болесника након терапије раствором *CHX* пронађена је негативна Сперманова корелација између *TAS* и *DPDZ* (Табела 4.10; $r=-0.7680$; $p<0.05$), што значи да се након терапије дубина *DPDZ* смањује са повећањем антиоксидативног капацитета у саливи оболелих од пародонтопатије.

Повећање нивоа *TAS* (Слика 4.9; $p<0.001$), као и активности антиоксидативних ензима: *tSOD* (Слика 4.10; $p<0.001$), *CAT* (Слика 4.11; $p<0.001$) и *GPx* (Слика 4.12; $p<0.001$) може бити протективни и адаптивни механизам који се развија у саливи болесника са пародонтопатијом као одговор на оксидативни стрес. *McCusker* и *Hoidal* (1990) га дефинишу и као механизам самоодбране. Примена раствора *CHX* код ових болесника враћа активност *CAT* и *GPx* на ниво вредности контролне групе. У том смислу, повећане вредности *TAS* у саливи оболелих од пародонтопатије могу представљати компензаторну *up*-регулацију антиоксидативне одбране усне шупљине у циљу спречавања оксидативног оштећења које се огледа кроз друге услове оксидативног стреса (*Su и сар.*, 2009). Такође, како су код оболелих од пародонтопатије присутни пародонтални џепови који често могу крварити на локалну провокацију, немогуће је искључити антиоксидативну одбрану из крви као извор повећаних вредности *TAS* у саливи ових особа.

Унутар пародонталних ткива, *SOD* је имунолокализован претежно у пародонталним влакнима, нарочито у колагенским влакнима и фибробластима (*Jacoby и Davis*, 1991). *Elis* и сарадници (1999) показали су да је тежина клиничке слике повезана са активношћу антиоксидативних ензима. Резултати спроведене студије такође указују да код болесника са пародонтопатијом након примене третмана раствором *CHX* у саливи постоји позитивна корелација између активности *GPx* и *DPDZ* (Табела 4.10; $r=0.5714$; $p<0.05$).

Новије студије потврђују улогу *GPx* у спречавању оксидативног оштећења покренутог цитотоксичним пероксидом, процес пероксидације липида и дегенерацију

протеина (Toczewska и Konopka, 2019). Повећање активности овог ензима у саливи пре терапије раствором *CHX* може бити резултат ширења оштећења због апоптозе покренуте оксидативним микроокружењем. Регистровано повећање активности *GPx* (Слика 4.12) у групи болесника пре терапије раствором *CHX* веће је у односу на групу здравих испитаника који су испирали усну дупљу раствором *CHX* ($p < 0.01$), као и у односу на групу болесника после терапије раствором *CHX* ($p < 0.01$).

Студија Aziz и сарадика из 2013. године пратила је промене оксидативних параметара у серуму болесника и показала значајне корелације у активности *GPx* са клиничким параметрима. На основу обрађених резултата из ове студије показано је да у саливи болесника са пародонтопатијом након терапије раствором *CHX* постоји негативна корелација између активности *GPx* и вредности *GI* (Табела 4.8, $r = -0.5630$; $p < 0.05$).

Tsai и сарадници су 2005. године радили на студији одређивања параметара оксидативног стреса код особа са прогресивном хроничном пародонтијом и указали на повећање концентрације ЛПО које је било праћено смањеним садржајем *GSH* и непромењеном активношћу *GPx*. Такође, указали су на РОС као потенцијалне узрочнике оштећења пародонцијума у току процеса инфламације пародонталних ткива. Дисбаланс оксидативних и антиоксидативних активности је кључни фактор оштећујућег деловања РОС. Међутим, поменута студија није пронашла корелацију између *GSH*, *GPx* и ЛПО вредности у саливи болесника са пародонтопатијом, што се поклапа са резултатима ове студије.

Свеприсутни антиоксидативни ћелијски тиол - глутатион је ниско-молекуларни главни не-протеински тиол, присутан у свим како еукариотским, тако и у прокариотским ћелијама (Pavarino и сар., 2013). Он је моћан антиоксиданс који спречава оштећења ћелијских компоненти посредованих РОС-ом и делује као кофактор ензима у уклањању реактивних врста. Значајна улогу глутатиона потврђена је у метаболизму хранљивих састојака и регулисању ћелијских догађаја као што су ћелијска апоптоза, пролиферација ћелија, производња цитокина, имунолошки одговор, експресија гена, синтеза ДНК и протеина, трансдукција сигнала и глутатионилација/деглутатионилација протеина (Wu и сар., 2004).

Tsai и сарадници (2005) показали су високе нивое *GSH* у саливи здравих испитаника у односу на болеснике са пародонтопатијом. Анализом добијених података из ове студије добијене су такође вишеструко повећане концентрације *tGSH* у саливи, у популацији здравих добровољаца у односу на оболеле са пародонтопатијом (Слика 4.13; $p < 0.001$). Смањен садржај овог трипептида примећен је у групи болесника пре терапије раствором *CHX* (Слика 4.13; $p < 0.01$) у односу на групу здравих испитаника који су користили раствор *CHX*. Приказани резултати могу се објаснити чињеницом да се огромне количине *GSH* троше у току стварања РОС што финално доводи до дефицита самог антиоксиданса. Такође, могуће је и да многе бактерије из усне шупљине и пародонталних црева могу користити *GSH*. Carlsson је 1993. године показао да *Peptostreptococcus micros* користи *GSH* за стварање H_2S .

Поред директне функције трипептида глутатиона у пресретању слободних радикала, он има битну функцију кофактора у изоензимским облицима *GPx*. Пародонтално ткиво има знатну активност овог ензима који обезбеђује заштиту од пероксида. Са друге стране, ово ткиво има висок степен искоришћавања кисеоника, а створени пероксиди се формирају и од стране аминоксидаза, као и из реакције *TPNH*-оксидаза са масним киселинама мембранских фосфолипида. У раду је регистровано повећање концентрације *tGSH* у саливи болесника након третмана раствором *CHX* у односу на исту групу испитаника пре терапије овим антисептиком (Слика 4.13; $p < 0.05$) које је, на жалост још увек значајно ниже од контролних вредности овог трипептида ($p < 0.001$). Повећање *tGSH* након примене *CHX* је веома битан фактор одржања редокс баланса. Међутим, резултати рада показују да су вредности *tGSH* снижене након примене

CHX и у односу на групу здравих испитаника која је користила овај антисептик за испирање усне дупље ($p < 0.05$). Подаци из литературе говоре у прилог чињеници да ниво *tGSH* као једног од најмоћнијих антиоксиданата и регулатор других антиоксиданата, значајно опада у ткиву пародонцијума током напредовања болести. Разлог оштећења антиоксидативног система јесте повећани унос полинезасићених и делимично хидрогенизованих биљних масти и претерана изложености токсичним супстанцама (*Naganuma и сар., 1990*).

Студија *Ximenez-Fyvie* и сарадника је 2000. године указала на веће вредности *PI* и већи проценат субгингивалних пародонтопатогена у односу на особе са здравим пародонцијумом. Ови подаци у складу су са добијеном негативном корелацијом у спроведеној студији између *IKG* и *tGSH* у саливи након примене раствора *CHX* код оболелих од пародонтопатије (Табела 4.9; $r = -0.5356$; $p < 0.05$). Могуће је претпоставити да је велики број микробиота метаболизирао *GSH* што је резултирало сниженим нивоима овог трипептида у саливи и *GCF*. Због присуства већег нивоа РОС, *GSH* се континуирано трошио и постао је у великој мери недовољан. Редукција оксидованог у редуковани *GSH* и брзина његове синтезе из аминикиселина није била довољна за опоравак. У исто време, ствара се повећана концентрација РОС и узрокује оштећење пародонталног ткива. Ова објашњења потврђују повећање ЛПО код оболелих. Поред тога, промена услова оксидо-редукције може активирати *NF- κ B*, који покреће стварање и активацију проинфламаторних медијатора.

Сматра се да су промене у антиоксидативном капацитету саливе повезане пре са инфламаторним одговором него са повећаним бактеријским оптерећењем. Овај закључак је генерално у складу са тренутним мишљењем да је оштећење ткива пародонцијума углавном последица нерегулисаног нерешеног имунолошког одговора него због појачаног присуства бактерија (*Meyle и Chapple, 2015*).

5.3.2. Утицај хлорхексидина на параметре оксидативног/ нитрозативног статуса у *GCF* пацијената са пародонтопатијом

In vitro студије показале су да РОС учествују у разградњи ванћелијског матрикса и модификују функционалне групе аминокиселина, што доводи до фрагментације језгра протеина (*Mei и сар., 2019*). Идентификација и карактеризација метаболита везивног ткива у *GCF* који настају деградацијом пародонталних ткива, посебно алвеоларне кости, пружају додатне доказе о улози РОС у разарању ткива повезаног са запаљенским пародонталним болестима.

Celec и сарадници су 2005. године показали изузетно високе вредности ЛПО код болесника са пародонтопатијом који су нарочито подложни пероксидацији. Повећана концентрација *TBARS* у *GCF* регистрована је и у овој студији пре третмана раствором *CHX* (Слика 4.14; $p < 0.001$) у односу на контролне вредности здравих испитаника. Након третмана раствором *CHX* код ових болесника региструје се смањење вредности ЛПО (Слика 4.14; $p < 0.05$) и повећање *tGSH* (Слика 4.18; $p < 0.001$), што је знак веома очуваног, чак унапређеног редокс стања у овим узорцима у односу на исту групу испитаника пре терапије раствором *CHX*.

Студија *Dakovic* (2005) показала је повећани садржај МДА у ткиву особа са хроничним апикалним пародонтитисом у односу на здраво ткиво код добровољаца. У тој студији била је поремећена равнотежа између оксидативног стреса и нивоа антиоксиданса, тако да су аутори показали оштећење већег броја ћелија и ткива деловањем РОС у самом процесу запаљења код пародонталних болести. Иста студија указала је и на постојање корелације између пероксидације липида и клиничких параметара, тако да су закључили да је опасност од оштећења пародонталног ткива већа, уколико постоји повећани ниво ЛПО. Повећање ЛПО у саливи оболелих од

пародонтопатије не одражава се само на веће оштећење ткива пародонцијума узроковано РОС, већ и на сам процес пародонтопатије.

Добро је позната дуална улога *NO*, који може деловати као мач са две оштрице, што значи да на једној страни делује противзапаљенски, а на другој страни као слободни радикал у облику пероксиднитрита показује бројна оштећујућа дејства на пародонтално ткиво (*Bejeh Mir u cap., 2014*). Азот-оксид у саливи може се ослободити из више извора, укључујући слободне нервне завршетке, секреторне или ендотелне ћелије пљувачних жлезда или интраоралне бактерије (*Bayindir u cap., 2005*). У том смислу, чини се да је *GCF* поузданији извор за идентификацију пародонталне болести, јер на њу утичу само пародонтална ткива која окружују зубе у поређењу са комплетном саливом која се излучује из главних пљувачних жлезда. Штавише, салива је под већим утицајем системског инфламаторног и инфективног процеса (*Samani u cap., 2012*).

Резултати студије *Bejeh-Mir* и сарадника (2014) су у потпуној сагласности са добијеним подацима ове студије која је показала повећане концентрације *NO* у саливи (Слика 4.8) и смањене нивое *NO* у *GCF* (Слика 4.15) код болесника са пародонтопатијом у односу на здраве испитанике. Применом одговарајућег антисептика, нивои *NO* су враћени на контролне вредности. Добијени резултати показују да је смањење концентрације *NO* након примене раствора *JS* и *CHX* у саливи (Схема 5.2) било око 30% за оба антисептика, док су вредности *NO* повећане за 109% после терапије раствором *JS*, односно 112% након примене раствора *CHX* у *GCF* (Схема 5.3) код болесника са пародонтопатијом у односу на исте болеснике пре одговарајућег третмана.

Већ је указано да оксидативни стрес представља дисбаланс између производње *ROS* и уклањања реактивних интермедијара, укључујући H_2O_2 , *NO*, O_2^- и друге хидроксилне радикале. Раније студије показале су да специфични биомаркери оксидативног стреса, као што је *tSOD*, одражавају тежину болести и ефикасност пародонталног лечења (*Sculley u Langley-Evans, 2003*). У студији *Chapple* из 1997. године забележен је низак укупан антиоксидативни статус код пацијената са пародонталном болешћу, који је објашњен штетним ефектима РОС. Једна каснија студија показала је да је укупни антиоксидативни капацитет био мањи код оболелих од пародонтопатије него код здравих испитаника (*Brock u cap., 2004*). Ови подаци су у складу са резултатима спроведене студије, јер су у *GCF* болесника са пародонтопатијом регистроване смањене вредности *TAS* (Слика 4.16; $p < 0.05$) у односу на здраве испитанике без примењеног третмана антисептиком.

Студија *Bains* и *Bains* из 2018. године показала је да особе са пародонтопатијом поред смањеног капацитета *TAS* у саливи, имају и ниже концентрације редукованог глутатиона у серуму и *GCF*, тако да пародонтална терапија враћа редокс равнотежу оштећеном ткиву. Резултати спроведене студије показују да су вредности *TAS* повећане у саливи (Слика 4.9) и снижене у *GCF* (Слика 4.16) оболелих особа пре терапије антисептицима које се враћају на ниво контролних вредности након терапије (*JS*, *CHX*). Садржај *tGSH* одговарао је налазима претходних студија јер је у спроведеном истраживању регистровано смањење концентрације овог антиоксиданса како у саливи (Слика 4.13), тако и у *GCF* (Слика 4.18) код оболелих испитаника.

Могућа су два узрока дисбаланса у реакцијама оксидативног стреса: повећање РОС није праћено повећањем антиоксиданаса, или смањење антиоксиданаса без промене стварања РОС. *Brock* и сарадници су 2002. године показали да је дошло до редукације АО одбране код болесника са пародонталном болешћу после нехируршке терапије која утиче на побољшање клиничких параметара и може повећати антиоксидативни капацитет код ових болесника. Наведени подаци су потврђени студијом *Tsai* и сарадника 2005. године. Спроведеним истраживањем са терапијским ефектима примене различитих антисептика код болесника са пародонтопатијом добијени су идентични резултати у *GCF*. Наиме, анализом резултата овог истраживања показано је повећање укупног *TAS* у *GCF* после

примене раствора *CHX* (Слика 4.16; $p < 0.001$) у односу на исте испитанике пре терапије. Приказани резултати могу се објаснити већом осетљивошћу болесника са пародонтопатијом на дисбаланс у ситуацијама оксидативног стреса. Међутим, РОС имају веома кратак животни век, због чега је тешко открити њихово присуство.

За разлику од непромењених вредности *tSOD* у саливи код особа са пародонтопатијом пре и након терапије *CHX* (Слика 4.10), у *GCF* истих болесника регистровано је смањење активности овог ензима након примењене терапије (Слика 4.17; $p < 0.05$). На повећану активност антиоксидативног ензима у *GCF* пародонталних болесника указано је у претходним студијама код иреверзибилног пулпитиса, што потврђује повећање активности *SOD* са прогресијом инфламације, односно када пулпитис прелази у апикални пародонтитис (*Cheng u cap., 2006*). Добијени подаци у два различита биолошка медијума упућују на оперативну антиоксидативну одбрану која одржава редокс миље липида и протеина након терапије раствором *CHX* код пародонталних болесника, уз веће промене које се доминантно региструју у *GCF*. Повећана активност *tSOD* у *GCF* оболелих од пародонтопатије у односу на здраве испитанике (Слика 4.17; $p < 0.001$) може значити и могућу надокнаду антиоксиданаса у реакцијама детоксикације супероксида створених у условима оксидативног стреса у ткивима гингиве. Примена раствора *CHX* смањује активност антиоксидативног ензима на ниво контролних вредности. Могући разлог повећања активности антиоксидативних ензима код ових болесника јесте покренуто стање оксидативног стреса уз пратеће повећање стварања РОС које антиоксидативни ензим не може у потпуности уклонити.

Обзиром да се сматра главним антиоксидансом, *GSH* представља најважнији редокс регулатор у контроли запаљенских процеса, а самим тим и оштећења пародонцијума. *Chapple* и сарадници (2007) сугеришу да су и *GSH* и укупни *TAS* у плазми значајно смањени код болесника са пародонталном болешћу у поређењу са клинички здравим испитаницима. Такође је утврђено да су концентрације редукованог и оксидованог глутатиона значајно смањене у *GCF* код хроничне пародонталне болести (*Trivedi u Lal, 2017*). Ови резултати показани су у бројним студијама у којима је потврђено смањење садржаја *tGSH* у серуму и *GCF* код болесника са пародонтопатијом (*Chapple u cap., 2002; Sculley u Langley-Evans, 2003*). Резултати спроведене студије су у складу са наведеним подацима, јер је у *GCF* особа са пародонтопатијом регистровано вишеструко смањење вредности *tGSH* (Слика 4.18; $p < 0.001$), које након терапије раствором *CHX* одговарају контролним вредностима здравих испитаника.

Упркос значајним везама између маркера оксидативног стреса и пародонталне болести, главно ограничење у повезаности је чињеница да на ниво оксидативног стреса утичу и други фактори околине, као и унос исхране.

5.4. Нови терапијски ефекат примене *JS* и *CHX* у саливи и *GCF* код болесника са пародонтопатијом

У анималним студијама показано је да се ниво зубних наслага смањује када су пацови третирани дијетом која садржи антиоксидант (*Ooshima u cap., 1993*). Познато је да је *tSOD* биомаркер оксидативног стреса, чија већа активност је повезана са већом пропацијом оксидативног стреса. Иста студија указала је на позитивну корелацију *PI* са *tSOD* што је у складу са резултатима овог рада да повећање *PI* значајно прати и повећање активности *tSOD* у *GCF* оболелих пре терапије раствором *CHX* ($r=0,9891$, $p < 0.05$). Добијени резултати могу значити да добра орална хигијена, односно нижи индекс плака може смањити оксидативни стрес у *GCF*.

Показано је да *CHX* изазива више нежељених дејстава међу којима и поремећај чула укуса, пребојавање зуба, као и оток пљувачних жлезда. Спроведено истраживање потврдило је да је оксидативни стрес веома важан фактор код оболелих од пародонтопатије и да праћење антиоксидативног капацитета може помоћи у бољем

разумевању механизма оштећења пародонталног ткива, као и развоју нових терапијских смерница. Такође, студија је показала да су антиоксидативни ензими маркери степена оштећења пародонцијума.

Резултати студије такође показују да је водени раствор *JS* примењен код болесника са хроничном генерализованом пародонтопатијом подједнако ефикасан као и до сада широко коришћен *CHX*, што је од изузетног значаја обзиром да се у терапији ових болесника користе антибиотици за локалну примену, *CHX*, хијалуронска киселина и водоник-пероксид. Антибиотици у терапији пародонтопатије су веома ефикасни, али имају и неке неповољне стране, као што су неједнако дејство на све узрочнике пародонтопатије, појаве резистенције, могуће појаве гљивичних инфекција или алергијске манифестације.

Водени раствор *JS* делује веома ефикасно не само на бактерије, већ и на гљивице и вирусе, при чему је код локалне примене изванредно добро подношљив. Резултати ове студије потврђују да водени раствор *JS* показује једнаку ефикасност на оксидо/нитрозативне параметре као раствор *CHX*. У том смислу, ови резултати би уз познату далеко бољу подношљивост *JS* указивали на његову редовну примену и бољу перспективу лечења болесника са хроничном генерализованом пародонтопатијом. Истовремено, на овај начин омогућена је и реevaluација *JS*, који су до сада коришћени у стоматологији, али у далеко мањој мери него што то овај препарат заслужује.

Познато је да оксидативни стрес и немогућност антиоксидативног одбрамбеног система у живим организмима да се избори са прекомерном производњом слободних радикала резултира оксидативним оштећењем свих класа биомолекула, укључујући протеине, липиде, фосфолипиде и деоксирибонуклеинске киселине (*Djukic u cap., 2008*). Измена контроле ћелијске сигнализације и разградња енергије финално се завршава ћелијском смрћу, односно апоптозом. Прекомерна производња РОС (укључујући $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , $HO\cdot$ и $HOCl$) јавља се и у лезијама зуба у току процеса фагоцитозе. Реактивне врсте нападају ћелијске мембране фаголизозома и неутрофила у току респираторне експозиције. Временом се производи оксидације полинезасићених масних киселина, састојака ћелијске мембране претварају у карбониле, попут МДА (*Bayir u Kagan, 2008*). Заједно са мијелопероксидазом и *NADH*-оксидазом, они из фаголизозома излазе у фагоцитни цитосол и даље на место инфекције где оштећују фагоците и пародонтално ткиво. Иако се ефекти РОС јављају унутарћелијски, унутар фаголизозома, они су дифузибилни и могу да реагују изван фаголизозома, унутар неутрофила и околних ткива (на пример са *GCF*, у случају процеса пародонтопатије). Реактивне врсте произведене мијелопероксидазом одговорне су за оксидацију, хлорисање и нитрирање цитосолних протеина, гликопротеина и липопротеина у неутрофилима или у околним ткивима и директно су одговорни за нежељени ефекат запаљења (смрт фагоцита и оштећење ткива) (*Love u cap., 2016; Wilkie-Grantham u cap., 2015*).

Биолошки медијуми, попут серума, саливе и *GCF*, представљају добре изворе као прогностички биомаркери за стање пародонталног ткива, оксидативни статус и исходе терапије. Студије показују да би инфламаторни медијатори у саливи могли бити биомаркери за многе оралне болести, укључујући орални карцином и пародонтална обољења (*Yang u cap., 2014*). Повезаност биомаркера у *GCF* и пародонталне болести је мање значајна од повезаности између биомаркера саливе и овог обољења. Узорци саливе садрже јединствене информације о оралним физиолошким променама и могу представљати корисне дијагностичке медијуме за пародонталне болести (*Giannobile u cap., 2009*). У том смислу, салива не представља само системску циркулацију, већ јој је и лакше приступити и применити је шире.

Резултати ове студије указују на појаву значајног оксидативног стреса код оболелих од пародонтопатије, који је праћен повећањем *ЛПО* у усној дупљи, пре свега у

GCF. Терапија антисептицима враћа и контролише антиоксидативни капацитет саливе и *GCF* локалним модификовањем нивоа *TBARS*, *TAS* и *SOD*. Налази такође сугеришу да су присутни значајни односи између оксидантног и пародонталног статуса и да оксидативни стрес може играти важну улогу у терапији пародонталне болести.

Код болесника са пародонталном болешћу присутно је веће клиничко пародонтално оштећење, системски оксидативни стрес и инфламација у односу на здраве испитанике. Превенција и третман ових болесника антисептицима може бити корисна подршка у контроли различитих хроничних болести повезаних са инфламацијом.

Студије *Tsai* и сарадника из 2005. године показују да пародонтални третман резултира побољшањем концентрације *GSH* и тиола у саливи болесника са пародонтопатијом. На схеми 5.2 показано је да се применом раствора *CHX* повећава садржај трипептида глутатиона у саливи оболелих 60% у односу на исту групу испитаника пре терапије. Такође, примена раствора *JS* код оболелих од пародонтопатије повећава садржај *tGSH* у саливи за 35% у односу на болеснике пре примењене терапије. Повећање од 93% *tGSH* показано је и у *GCF* након примене раствора *JS* и чак 106% у групи где је примењен раствор *CHX* у односу на испитанике пре примењеног одговарајућег третмана (схема 5.3).

Са друге стране, постоји друга група истраживача чије су студије указале на значај *GCF* за дијагностику и анализу оралних болести и исхода лечења (*Taso u cap., 2018*). У односу на *GCF*, у саливи је много интензивнији утицај оралних фактора из околине (хигијенске навике, исхрана, пушење итд.). Водећи се чињеницом да је *GCF* врло специфична течност усне шупљине (трансудат крвне плазме смештен у гингивалном сулкусу), мање изложена оралним факторима из околине у поређењу са саливом, које захтева неинвазивно узорковање, много чешће се бира *GCF* као одговарајућа орална матрица за тестирање.

Претходне студије показују високе вредности *TBARS* код болесника са пародонтопатијом који су нарочито подложни настанку пероксидације (*Celec u cap., 2005*). Смањење *TBARS* које се региструје након примене раствора *JS* (схема 5.3) веће је (44%) у односу на регистровано смањење вредности ЛПО после примене раствора *CHX* (26%), што говори о очуваном редокс стању и физиолошкој одбрани липидних мембрана од оксидативног деловања након примене раствора *JS* где су промене изражене у далеко већем проценту у односу на други антисептик (*CHX*). Примена антисептика (*JS*, *CHX*) враћа редокс равнотежу у оштећеном пародонталном ткиву било у смеру смањења *TAS* (48% за *JS*, 36% за *CHX*) у саливи (схема 5.2) или повећања антиоксидативног капацитета (33% за *JS*, 82% за *CHX*) у *GCF* (схема 5.3) код болесника са пародонтопатијом.

Добијени резултати у овој студији показују смањење антиоксидативног капацитета само у *GCF* (Табела 4.6) за разлику од саливе (Табела 4.5), што се одражава на локално повећање ЛПО у *GCF* и указује на огроман значај у етиологији пародонталне болести, јер је повезан са оштећењем пародонцијума, за разлику од много ширих промена описаних у саливи.

Анализирајући резултате приказане на схемама 5.1-3, стиче се утисак да примена оба испитивана антисептика (*JS*, *CHX*) делује промотивно, доводећи чак до унапређеног редокс стања у саливи и *GCF* код болесника са пародонтопатијом, уз напомену да водени раствор *JS* не мења битно редокс стање у односу на оксидативне промене у протеинима, али значајно више смањује ЛПО и последично оштећење мембрана у *GCF*, као и редукцију *PI* у односу на примењену терапију раствором *CHX*.

Узимајући у обзир ограничења тренутне студије, измерени нивои у саливи болесника у поређењу са њиховим *GCF* нивоима, имају већу параклиничку и дијагностичку вредност.

Сумарно, у истраживању је показана ефикасност воденог раствора *JS*, која поред његове добре подношљивости указује и на могућност интензивне примене овог антисептика код болесника са хроничном генерализованом пародонтопатијом, што би допринело великом напретку у терапији са једне стране, односно значајном побољшању перспективе лечења код ових болесника.

6. ЗАКЉУЧЦИ

1. Примена антисептика (*JS*, *CHX*) смањује вредности клиничких параметара (*PI*, *GI*, *IKG*, *NPE*) код пацијената са пародонтопатијом у односу на исту групу пацијената пре одговарајућег третмана, при чему бољи ефекат на *PI* испољавају *JS* (редукција 58%) у односу на *CHX* (редукција 37%).
2. Примена *JS* у *GCF* смањује концентрацију *TBARS*, док *CHX* редукује нивое овог параметра у саливи и *GCF* пацијената са пародонтопатијом у односу на групу пацијената пре одговарајућег третмана.
3. Терапија болесника са пародонтопатијом антисептицима (*JS*, *CHX*) смањује продукцију O_2^- у односу на период пре третмана код истих пацијената.
4. У саливи пацијената са пародонтопатијом терапија антисептицима (*JS*, *CHX*) смањује концентрацију *NO* у односу на групу пацијената пре третмана, док је у *GCF* концентрација *NO* снижена у односу на контролну групу здравих испитаника, тако да примена оба антисептика (*JS*, *CHX*) враћа концентрацију *NO* на ниво контролних вредности.
5. Код пацијената са пародонтопатијом оба антисептика (*JS*, *CHX*) у саливи смањују вредност *TAS* у односу на групу пацијената пре терапије, док у *GCF* повећавају снижене вредности овог параметра до нивоа контролних.
6. Активност *tSOD* смањена је код пацијената са пародонтопатијом после примене *JS* у саливи и *GCF*, док примена *CHX* враћа ниво активности ензима на контролне вредности само у *GCF*.
7. Код пацијената са пародонтопатијом након терапије антисептицима (*JS*, *CHX*) у саливи је снижена активност *CAT* у односу на исту групу пацијената пре одговарајућег третмана.
8. Активност *GPx* је значајно снижена у саливи болесника са пародонтопатијом након третмана антисептицима (*JS*, *CHX*) у односу на групу истих пацијената пре терапије.
9. У саливи и *GCF* пацијената са пародонтопатијом снижене су вредности *tGSH* у односу на групу здравих испитаника, док примена оба антисептика (*JS*, *CHX*) успешно враћа концентрацију овог трипептида на ниво контролних вредности.
10. *Pearson*-ова корелативна анализа је код крварења гингиве показала позитивну корелацију између група пацијената са пародонтопатијом пре и након третмана антисептицима (*JS*, *CHX*), док је *Spearman*-овом анализом добијена позитивна корелација за *IKG* после третмана *JS* између група JS_{posle} и CHX_{posle} , као и између *DPDZ* и *NPE*.
11. У саливи пацијената са пародонтопатијом пре терапије *CHX*, *Spearman*-ова корелативна анализа је показала позитивну корелацију између *DPDZ* и концентрације *TBARS*, као и између *NPE* и активности *CAT*, док је негативна корелација пронађена између следећих параметара: *DPDZ* и вредности *TAS*, *DPDZ* и концентрације *NO*, *GI* и активности *GPx*, *IKG* и садржаја *tGSH*.
12. У *GCF* болесника са пародонтопатијом код одређивања активности *tSOD* *Spearman*-овом корелативном анализом показана је позитивна корелација пре и након примењеног третмана *CHX*, док је у групи пре третмана *CHX* добијена позитивна корелација између *PI* и активности *tSOD*, односно негативна корелација између *NPE* и концентрације *TBARS*, а у групи након третмана *CHX* добијена негативна корелација између *IKG* и *tGSH*.

7. ЛИТЕРАТУРА

1. Aas JA, Paster BJ, Stokes LN, Olsen I, Dewhirst FE. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 5721-32.
2. Abdellatif HM, Burt BA. An epidemiological investigation into the relative importance of age and oral hygiene status as determinants of periodontitis. *J Dent Res* 1987; 66: 13-8.
3. Addy M, Moran JM. Clinical indicators for the use of chemical adjuncts to plaque control: Chlorhexidine formulations. *Periodontol* 2000; 1997: 15: 52-4.
4. Aghili H, Jafari Nadoushan AA, Herandi V. Antimicrobial effect of zataria multiflora extract in comparison with chlorhexidine mouthwash on experimentally contaminated orthodontic elastomers ligatures. *J Dent (Teheran)* 2015; 12(1): 1-10.
5. Akalin FA, Toklu E, Renda N. Analysis of superoxide dismutase activity levels in gingiva and gingival crevicular fluid in patients with chronic periodontitis and periodontally healthy controls. *J Clin Periodontol* 2005; 32: 238-43.
6. Akanmu D, Cecchini R, Aruoma OI, Halliwell B. The antioxidant action of ergothioneine. *Arch Biochem Biophys* 1991; 288(1): 10-6.
7. Akram Z, Vohra F, Javed F. Locally delivered metformin as adjunct to scaling and root planing in the treatment of periodontal defects: a systematic review and meta-analysis. *J Periodontal Res* 2018; 53: 941-9.
8. Alidaee MR, Taheri A, Mansoori P, Ghods I. Silver nitrate cautery in aphthous stomatitis : A randomized controlled trial. *British Journal of Dermatology* 2005; 153: 521-5.
9. Almerich-Silla JM, Montiel-Company JM, Pastor S, Serrano F, Puig-Silla M, Dasí F. Oxidative stress parameters in saliva and its association with periodontal disease and types of bacteria. *Dis Markers* 2015; 653537.
10. Altman LC, Baker C, Fleckman P. Neutrophil-mediated damage to human gingival epithelial cells. *J Periodont Res* 1992; 27: 70-9.
11. American Academy of Periodontology (2000). „Proceedings of the International Workshop for the classification of periodontal diseases“, *ANN. Periodontol.* 2000; in press
12. American Academy of Periodontology Research. Science and Therapy Committee Position Paper: Epidemiology of Periodontal diseases. *J Periodontol* 2005; 76: 1406-19.
13. Anderson ME. Tissue glutathione. In: Greenwald RA, editor. *Handbook of methods for oxygen radical research*. Boca Raton: CRC Press; 1986. p. 317-23.
14. Andreyev AY, Kushnareva YE, Starkov AA. Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. *Biochemistry (Moscow)* 2005; 70: 200-14.
15. Andrukhov O, Haririan H, Bertl K, Rausch WD, Bantleon HP, Moritz. Nitric oxide production, systemic inflammation and lipid metabolism in periodontitis patients: possible gender aspect. *J Clin Periodontol* 2013; 40: 916-23.

16. Armitage GC. Analysis of gingival crevice fluid and risk of progression of periodontitis *Periodontol* 2000; 2004; 34: 109-19.
17. Armitage GC. Learned and unlearned concepts in periodontal diagnostics: a 50-year perspective *Periodontol* 2000; 2013; 62(1): 20-36.
18. Asad M, Aziz AW, Raman RP, Harun HW, Ali TB, Chinna K, Vaithilingam RD. Comparison of nonsurgical periodontal therapy with oral hygiene instruction alone for chronic periodontitis. *J Oral Sci* 2017; 59(1): 111-20.
19. Atif F, Yousuf S, Agrawal SK. Restraint stress-induced oxidative damage and its amelioration with selenium. *J Pharmacol* 2008; 600: 59-63.
20. Auclair C, Voisin E. Nitroblue tetrazolium reduction. In: Greenwald RA, editor. *Handbook of Methods for Oxygen Radical Research*, CRC Press, Florida; 1985. p. 123-32.
21. Ausschill TM, Arweiler NB et al. Spatial distribution of vital and dead microorganisms in dental biofilms. *Arch Oral Biol* 2001; 46: 471-6.
22. Axelsson PA. Commentary: Periodontitis is preventable. *J Periodontol*. 2014; 85: 1303-7.
23. Ayala A, Muñoz MF, Argüelles S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid Med Cell Longev* 2014; 2014: 360438.
24. Azaripour A, Dittrich S, Van Noorden CJF, Willerhausen B. Efficacy of photodynamic therapy as adjunct treatment of chronic periodontitis: a systematic review and meta-analysis. *Lasers Med Sci* 2018; 33: 407-23.
25. Aziz A, Kalekar M, Benjamin T, Suryakar A, Prakashan M, Bijle M. Effects of nonsurgical periodontal therapy on some oxidative stress markers in patients with chronic periodontitis: a biochemical study. *World J Dent* 2013; 4(1): 17-23.
26. Baderstein A, Nilveus R, Egelberg J. Effect of nonsurgical periodontal therapy II. Severely advanced periodontitis. *J Clin Periodontol* 1984; 11: 63-76.
27. Bains VK, Bains R. The antioxidant master glutathione and periodontal health *Dent Res J (Isfahan)* 2015; 12(5): 389-405.
28. Barca E, Cifcibasi E, Cintan S. Adjunctive use of antibiotics in periodontal therapy. *J Instab Univ Fac Dent* 2015; 49: 55-62.
29. Bartold PM, Wiebkin OW, Thonard JC. Behaviour of hyaluronic acid from gingival epithelium and connective tissue in an analytical centrifuge. *Conn Tiss Res* 1984; 12: 257-64.
30. Batista AC, Silva TA, Chun JH, Lara VS. Nitric oxide synthesis and severity of human periodontal disease. *Oral Dis* 2002; 8(5): 254-60.
31. Bayindir YZ, Polat MF, Seven N. Nitric oxide concentrations in saliva and dental plaque in relation to caries experience and oral hygiene. *Caries Res* 2005; 39: 130-3.
32. Bayir H and Kagan VE. Bench-to-bedside review: mitochondrial injury, oxidative stress and apoptosis—there is nothing more practical than a good theory. *Critical Care* 2008; 12(1): 206.
33. Beck JD, Offenbacher S. The association between periodontal diseases and cardiovascular diseases: a state of the science review. *Ann Periodontol* 2001; 6: 9-15.

34. Beck JD, Koch GG, Rozier RG, Tudor GE . Prevalence and risk indicators for periodontal attachment loss in a population of older community-dwelling blacks and whites. *J Periodontol* 1990; 61: 521-8.
35. Begum SF, Nagajothi G, Latha KS, Sandeep G, Sreekanth B, Kumar CS, Rajendra W, Maddu N. Possible role of nicotine and cotinine on nitroxidative stress and antioxidant content in saliva of smokeless tobacco consumers. *Pract Lab Med* 2018; 12: e00105.
36. Bejeh-Mir AP, Parsian H, Khoram MA, Ghasemi N, Bijani A, Khosravi-Samani M. Diagnostic Role of Salivary and GCF Nitrite, Nitrate and Nitric Oxide to Distinguish Healthy Periodontium from Gingivitis and Periodontitis *Int J Mol Cell Med* 2014; 3(3): 138-45.
37. Bertl K, Haririan H, Laky M, Matejka M, Andrukhov O, Rausch-Fan X. Smoking influences salivary histamine levels in periodontal disease. *Oral Dis* 2012; 18: 410-6.
38. Bertl K, Schoiber A, Haririan H, Laky M, Steiner I, Rausch WD. Non-surgical periodontal therapy influences salivary melatonin levels. *Clin Oral Investig* 2013; 17: 1219-25.
39. Bidar M, Naderinasab M, Talati A, Ghazvini K, Asgari S, Hadizadeh B, Gharechahi M, Mashadi NA. The effects of different concentrations of chlorhexidine gluconate on the antimicrobial properties of mineral trioxide aggregate and calcium enriched mixture. *Dent Res J* 2012; 9: 466-71.
40. Borrell LN, Burt BA, Neighbors HW, Taylor GW. Social factors and periodontitis in an older population. *Am J Public Health* 2004; 94: 748-54.
41. Borrell LN, Burt BA, Gillespie BW, Lynch J, Neighbors HW. Periodontitis in the United States: Beyond black and white. *J Public Health Dent* 2002; 62: 92-101.
42. Bratthall D, Hansel Petersson G. Cariogram - a multi-factorial risk assessment model for a multifactorial disease. *Community Dent Oral Epidemiol* 2005; 33: 256-64.
43. Brennan PA, Thomas GJ, Langdon JD. The role of nitric oxide in oral diseases. *Arch Oral Biol* 2003; 48(2): 93-100.
44. Brigelius-Flohe R. Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. *Free Radic Biol Med* 1999; 27: 951-65.
45. Brock GR, Matthews J, Butterworth C, Chapple ILC. Plasma and crevicular fluid antioxidant defense in periodontitis and health. *J Dent Res* 2002; 81.
46. Brock GR, Butterworth CJ, Matthews JB, Chapple IL. Local and systemic total antioxidant capacity in periodontitis and health. *J Clin Periodontol* 2004; 31: 515-21.
47. Buonocore G, Perrone S, Tataranno ML. Oxygen toxicity: chemistry and biology of reactive oxygen species. *Semin Fetal Neonatal Med* 2010; 15: 186-90.
48. Burkhart NC, Katz AK. Other topical medications. U: Freedberg JM, Eisen AZ, Wolf K, Austen KF, Goldsmith LA, Katz SI, Fitzpatrick TB, editors. *Fitzpatrick's Dermatology in general medicine*. New York: McGraw – Hill, 8th Ed., 2012: 2697-707.
49. Butler CA, Veith PD, Nieto MF, Dashper SG, Reynolds EC. Lysine acetylation is a common post-translational modification of key metabolic pathway enzymes of the anaerobe *Porphyromonas gingivalis*. *Journal of Proteomics* 2015; 128: 352-64.
50. Carlsson J, Larsen JT, Edlund MB. *Peptostreptococcus micros* has a uniquely high capacity to form hydrogen sulphide from glutathione. *Oral Microbiology and Immunology* 1993; 8(1): 42-5.

51. Carvalho LH, D Avila GB, Leao A, Haffajee AD, Socransky SS, Feres M. Scaling and root planning, systemic metronidazole and professional plaque removal in the treatment of chronic periodontitis in a Brazilian population. I Clinical results. *J Clin Perodontol* 2004; 31: 1070-6.
52. Carvalho LH, D Avila GB, Leao A, Haffajee AD, Socransky SS, Feres M. Scaling and root planning, systemic metronidazole and professional plaque removal in the treatment of chronic periodontitis in a Brazilian population. II Microbiological results. *J Clin Perodontol* 2005; 32: 406-11.
53. Castro MML et al. Antioxidans as adjuvants in periodontitis treatment: a systematic review and meta-analysis. *Oxidative Med Cell Longev* 2019; 22: 918-78.
54. Caton J, Ryan ME. Clinical studies on the management of periodontal diseases utilizing subantimicrobial dose doxycycline (SDD). *Pharmacol Res* 2011; 63(2): 114-20.
55. Celec P, Hodosy J, Celecová V, Vodrázka J, Cervenka T, Halcák L, Bozek P, Kopáni M, Kúdela M. Salivary thiobarbituric acid reacting substances and malondialdehyde--their relationship to reported smoking and to parodontal status described by the papillary bleeding index. *Dis Markers* 2005; 21(3): 133-7.
56. Celecová V, Kamodyová N, Tóthová L, Kúdela M, Celec P. Salivary markers of oxidative stress are related to age and oral health in adult non-smokers. *J Oral Pathol Med* 2013; 42: 263-6.
57. Chang YC, Huang FM, Tai KW, Chou MY. The effect of sodium hypochlorite and chlorhexidine on cultured human periodontal ligament cells. *Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2001; 92: 446-50.
58. Chang CH, Han ML, Teng NC, Lee CY, Huang WT, Lin CT, Huang YK. Cigarette Smoking Aggravates the Activity of Periodontal Disease by Disrupting Redox Homeostasis- An Observational Study. *Sci Rep* 2018; 8(1): 11055.
59. Chapple IL et al. Primary prevention of periodontitis: managing gingivitis. *J Clin Periodontol* 2015; 42: (16): S71-S76.
60. Chapple IL, Brock G, Eftimiadi C, Matthews JB. Glutathione in gingival crevicular fluid and its relation to local antioxidant capacity in periodontal health and disease. *Mol Pathol* 2002; 55: 367-73.
61. Chapple IL, Brock GR, Milward MR, Ling N, Matthews JB. Compromised GCF total antioxidant capacity in periodontitis: cause or effect? *J Clin Periodontol* 2007; 34(2): 103-10.
62. Chapple IL, Griffiths HR, Milward MR, Ling MR, Grant MM. Antioxidant Micronutrients and Oxidative Stress Biomarkers. *Methods Mol Biol* 2017; 1537: 61-77.
63. Chapple IL, Matthews JB. The role of reactive oxygen and antioxidant species in periodontal tissue destruction. *Periodontol 2000* 2007; 43: 160-232.
64. Chapple IL. Role of free radicals and antioxidants in the pathogenesis of the inflammatory periodontal diseases. *Clin Mol Pathol* 1996; 49: M247-55.
65. Chapple IL. Reactive oxygen species and antioxidants in inflammatory diseases. *J Clin Periodontol* 1997; 24: 287-96.
66. Cheng YK, Hwang GY, Lin CD, Tsai MH, Tsai SW, Chang WC. Altered expression profile of superoxide dismutase isoforms in nasal polyps from nonallergic patients. *Laryngoscope* 2006; 116(3): 417-22.

67. Cherian MG, Kang YJ. Metallothionein and liver cell regeneration. *Exp Biol Med* 2006; 231: 138-44.
68. Christodoulides N, Floriano PN, Miller CS, Ebersole JL, Mohanty S, Dharshan P, Griffin M, Lennart A, Ballard KL, King CP Jr, Langub MC, Kryscio RJ, Thomas MV, McDevitt JT. Lab-on-a-chip methods for point-of-care measurements of salivary biomarkers of periodontitis. *Ann NY Acad Sci* 2007; 1098: 411-28.
69. Chye RM et al. Effectiveness of different commercial chlorhexidine-based mouthwashes after periodontal and implant surgery: a systematic review. *Implant Dent* 2019; 28: 74-85.
70. Cobb CM. Clinical significance of non-surgical periodontal therapy: An evidence-based perspective of scaling and root planing. *J Clin Periodontol* 2002; 29 (Suppl.2): 6-16.
71. Colombo AP et al. Effects of non-surgical mechanical therapy on the subgingival microbiota of Brazilians with untreated chronic periodontitis; 9 month results. *J Periodontol* 2005; 76: 778-84.
72. Cosyn J, Sabzevar MM. A systematic review on the effects of subgingival chlorhexidine gel administration in the treatment of chronic periodontitis. *J Periodontol* 2005; 76: 1805-13.
73. Craig RG, Yip JK, Mijares DQ, Le Geroz RZ, Socransky SS, Haffajee AD. Progression of destructive periodontal diseases in three urban minority population: role of clinical and demographic factors. *J Clin Periodontol* 2003; 30: 1075-83.
74. Croucher R, Marcenes W, Torress M, Hughes F, Sheiham A. The relationship between life events and periodontitis. A case control study. *J Clin Periodontol*. 1997; 24: 39-43.
75. Cutler CW et al. Association between periodontitis and hyperlipidemia: cause or effect? *J Periodontol* 1999;70: 1429-34.
76. D'Aiuto F, Nibali L, Parkar M, Patel K, Suvan J, Donos N. Oxidative stress, systemic inflammation, and severe periodontitis. *J Dent Res* 2010; 89: 1241-6.
77. Đajić D, Đukanović D, Zelić O, Ursu-Magdu I. Parodontopatije. 2.ed G. Milanovac: Dečje Novine, 1988.
78. Dakovic D, Lekic M, Bokonjic D, Lazic Z, Cutovic T, Mladenovic R. Evaluation of periodontal status and treatment needs of the Serbian military forces population. *Vojnosanit Pregl*. 2021; OnLine-First Issue 00, Pages: 10-10 <https://doi.org/10.2298/VSP191125010D>
79. Daković D. Malondialdehid kao indikator lokalnih oksidativnih oštećenja ćelija kod obolelih od parodontopatija. Magistarski rad, 2005.g, Beograd, Srbija
80. Das K, Roychoudhury A. Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. *Frontiers in Environmental Science* 2014; 2.
81. de Souza SL, Taba M Jr. Cross-sectional evaluation of clinical parameters to select high prevalence populations for periodontal disease: the site comparative severity methodology. *Braz Dent J* 2004; 15(1): 46-53.
82. Denny P, Hagen FK, Hardt M, Liao L, Yan W, Arellanno M, Bassilian S, Bedi GS, Boontheung P, Cociorva D, Delahunty CM, Denny T, Dunsmore J, Faull KF, Gilligan J, Gonzalez-Begne M, Halgand F, Hall SC, Han X, Henson B, Hewel J, Hu S, Jeffrey S, Jiang J, Loo JA, Ogorzalek Loo RR, Malamud D, Melvin JE, Miroshnychenko O, Navazesh M, Niles R, Park SK, Prakobphol A, Ramachandran P, Richert M, Robinson S,

- Sondej M, Souda P, Sullivan MA, Takashima J, Than S, Wang J, Whitelegge JP, Witkowska HE, Wolinsky L, Xie Y, Xu T, Yu W, Ytterberg J, Wong DT, Yates JR 3rd, Fisher SJ. The proteomes of human parotid and submandibular/sublingual gland salivas collected as the ductal secretions. *J Proteome Res* 2008; 7: 1994-2006.
83. Deshpande RG et al. Invasion strategies of the oral pathogen *Porphyromonas gingivalis*: implications for cardiovascular disease. *Inv Metast* 1999; 18: 57-69.
 84. Dhivya H. Glutathione: A master antioxidant and an immune system modulator. *J Bio Inf Sci* 2012; 1: 28-30.
 85. Diab-Ladki R, Pellat B, Chahine R. Decrease in the total antioxidant activity of saliva in patients with periodontal diseases. *Clin Oral Investig* 2003; 7: 103-7.
 86. Dickinson DA, Forman HJ. Cellular glutathione and tiols metabolism. *Biochem Pharmacol* 2002; 64: 1019-26.
 87. Đorđević V, Pavlović D, Kocić G. Karakteristike slobodnih radikala. U: *Biohemija slobodnih radikala*. Medicinski fakultet Univerziteta u Nišu; 2000. p. 6-87.
 88. Dotan Y, Lichtenberg D, Pinchuk I. Lipid peroxidation cannot be used as a universal criterion of oxidative stress. *Prog Lipid Res* 2004; 43(3): 200-27.
 89. Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 2002; 82(1): 47-95.
 90. Đukić M, Ninković M, and Jovanović M. Oxidative stressclinical diagnostic significance. *Journal of Medical Biochemistry* 2008; 27(4).
 91. Eakle WS, Ford C, Boyd RL. Depth of penetration in periodontal pockets with oral irrigation. *J Clin Periodontol* 1986; 13: 39-44.
 92. Edgar WM. Saliva: its secretion, composition and functions. *Br Dent J* 1992; 172: 305-12.
 93. Eick S et al. Hyaluronic acid as an adjunct after scaling and root planing: A prospective randomized clinical trial. *J Periodontol* 2013; 84: 941-9.
 94. Eismann D, Prusas R. Periodontal findings before and after ortodontic therapy in cases incisor cross- bite. *Eur J Orthod* 1990; 12: 281-3.
 95. El Rafie MH, Mohamed AA, Shaheen TI, Hebeish A. Antimicrobial effect of silver nanoparticles produced by fungal process on cotton fabrics. *Carbohydrate Polymers* 2010; 80: 779-82.
 96. Ellis JS, Seymour RA et al. Prevalence of gingival overgrwth induced by calcium channel blockers: a community based study. *J Periodontol* 1999; 70: 63-7.
 97. Faramarzi M, Shirmohammadi A, Chitsazi M, Shamami MS, Ghanitab S. The clinical and metabolic effects of subgingival application of xanthan-based chlorhexidine gel in Type 2 diabetic patients with chronic periodontitis. *Dent Res J* 2017; 14: 299-305.
 98. Faveri M et al. Scaling and root planing and chlorhexidine mouthrinses in the treatment of chronic periodontitis: a randomized, placebo-controlled clinical trial. *J Clin Periodontol* 2006; 33: 819-28.
 99. Feng QL, Wu J, Chen GQ, Cui FZ, Kim JO. A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *J Biomed Mater Res* 2000; 52: 662-8.

100. Fernandez Y et al. Effect of an oxygenating agent on oral bacteria in vitro on dental plaque composition in healthy young adults. *Front Cell Infect Microbiol* 2015; 4: 95-8.
101. Fidaleo M. Peroxisomes and peroxisomal disorders: the main facts. *Exp Toxicol Pathol* 2010; 62(6):615-25.
102. Forstermann U, Closs EI, Pollock JS, Nakane M, Schwarz P, Gath I. Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions. *Hypertension* 1994; 23: 1121-31.
103. Genco RJ. Current view of risk factors for periodontal disease. *J Periodontol* 1996; 67: 1041-9.
104. Ghallab NA, Hamdy E, Shaker OG. Malondialdehyde, superoxide dismutase and melatonin levels in gingival crevicular fluid of aggressive and chronic periodontitis patients. *Aust Dent J* 2016; 61(1): 53-61.
105. Ghallab NA. Diagnostic potential and future directions of biomarkers in gingival crevicular fluid and saliva of periodontal diseases: Review of the current evidence *Arch Oral Biol* 2018; 87: 115-24.
106. Ghiselli A, Serafini M, Natella F, Scaccini C. Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: critical view and experimental data. *Free Radic Biol Med* 2000; 29: 1106-14.
107. Giannobile WV. Salivary diagnostics for periodontal diseases. *J Am Dent Assoc* 2012; 143(10 Suppl): 6S-11S.
108. Giannobile WV. Saliva as a diagnostic tool for periodontal disease: current state and future directions. *Periodontol* 2000; 2009; 50: 52-64.
109. Girotti M, Khan N, Mc Lellan B. Early measurement of systemic lipid peroxidation products in the plasma of major blunt trauma patients. *J Trauma* 1991; 31: 32-5.
110. Golub LM, Mc Namara TF et al. Adjunctive treatment with subantimicrobial doses of doxycycline: effects on gingival fluid collagenase activity and attachment loss in adult periodontitis. *J Clin Periodontol* 2001; 28: 146-56.
111. Gonzalez S, Cohen CL, Galvan M, Alonizan FA, Rich SK, Slots J. Gingival bleeding on probing: relationship to change in periodontal pocket depth and effect of sodium hypochlorite oral rinse. *J Periodontal Res* 2015; 50: 397-402.
112. Góth L. A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range. *Clin Chim Acta* 1991; 196(2-3): 143-51.
113. Grant MM, Brock GR, Matthews JB, Chapple IL. Crevicular fluid glutathione levels in periodontitis and the effect of non-surgical therapy. *J Clin Periodontol* 2010; 37: 17-23.
114. Graziani F, Karapetsa D, Alonso B, Herrera D. Nonsurgical and surgical treatment of periodontitis: How many options for one disease? *Periodontol* 2000 2017; 75: 52-88.
115. Greenstein G, Lamster I. Bacterial transmission in periodontal diseases: a critical review. *J Periodontol* 1997; 68: 421-31.
116. Griffith OW. Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis. *Free Radic Biol Med* 1999; 27: 922-35.
117. Griffiths GS. Formation, collection and significance of gingival crevice fluid. *Periodontol* 2000 2003; 31:32-42.

118. Grossi SG , Skrepcinski FB, De Caro T et al. Response to periodontal therapy in diabetics and smokers. *J Periodontol* 1996; 67: 1094-102.
119. Gu F, Chauhan V, Chauhan A. Glutathione redox imbalance in brain disorders. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2015; 18: 89-95.
120. Guarnieri C, Zucchelli G, Bernardi F. Enhanced superoxide production with no change of the antioxidant activity in gingival fluid of patients with chronic adult periodontitis. *Free Rad Res Comms* 1991; 15: 11-6.
121. Guentsch A, Kramesberger M, Sroka A, Pfister W, Potempa J, Eick S. Comparison of gingival crevicular fluid sampling methods in patients with severe chronic periodontitis. *J Periodontol* 2011; 82(7): 1051-60.
122. Haffajee AD, Socransky SS. Attachment level changes in destructive periodontal diseases. *J Clin Periodontol* 1986; 13: 461-72.
123. Haffajee AD, Cugini MA, Dibart S, Smith C, Kent RL Jr, Socransky SS. The effect of SRP on the clinical and microbiological parameters of periodontal diseases. *J Clin Periodontol* 1997; 24: 324-34.
124. Halliwell B. Superoxide-dependent formation of hydroxyl radicals in the presence of iron salts: it's role in the degradation of hyaluronic acid by a superoxide-generating system. *FEBS Letts* 1978; 96: 238-42.
125. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine*, Third edition, Oxford University Press Inc., New York, USA; 1999. p. 1-936.
126. Hanes PJ, Purvis JP. Local antiinfective therapy. pharmacological agents. A systematic review. *Ann Periodontol* 2003; 8: 79-98.
127. Hendek MK, Erdemir EO, Kisa U. Evaluation of salivary procalcitonin levels in different periodontal diseases. *J Periodontol* 2015; 86(6): 820-6.
128. Heunig BJ et al. Association of a vitamin D receptor gene polymorphism with localized early onset periodontal diseases. *J Periodontol* 1999; 70: 1032-8.
129. Hou G-L, Tsai C-C. Relationship between periodontal furcation involvement and molar cervical enamel projections. *J Periodontol* 1987; 58: 715-21.
130. Hu S, Zhou M, Jiang J, Wang J, Elashoff D, Gorr S, Michie SA, Spijkervet FK, Bootsma H, Kallenberg CG, Vissink A, Horvath S, Wong DT. Systems biology analysis of Sjogren Ös syndrome and mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma in parotid glands. *Arthritis Rheum* 2009; 60: 81-92.
131. Huang Y, Zhu M, Li Z. Mass spectrometry-based metabolomic profiling identifies alterations in salivary redox status and fatty acid metabolism in response to inflammation and oxidative stress in periodontal disease. *Free Radical Biology and Medicine* 2014; 70: 223-32.
132. Hujoel P, Zina LG, Cruz-Cunha J, Lopez R. Historical perspectives on theories of periodontal disease etiology. *Periodontology* 2000 2012; 58: 153-60.
133. Isidor F, Karring T, Attstöröm R. The effect of root planing as compared to that of surgical treatment. *J Clin Periodontol* 1984; 19: 240-4.
134. Jacoby BH, Davis WL. The electron microscopic immunolocalization of a copper-zinc superoxide dismutase in association with collagen fibers of periodontal soft tissues. *J Periodontol* 1991; 62: 413-20.

135. Jaedicke KM, Preshaw PM, Taylor JJ. Salivary cytokines as biomarkers of periodontal diseases. *Periodontol 2000* 2016; 70(1): 164-83.
136. Jain A, Bhaskar DJ, et al. Comparative evaluation of honey, chlorhexidine gluconate (0,2%) and combination of xylitol and chlorhexidine mouthwash (0,2%) on the clinical level of dental plaque: A 30 days randomized control trial. *Perspect Clin Res* 2015; 6: 53-7.
137. James P, Worthington HV, Parnell C, et al. Chlorhexidine mouthrinse as an adjunctive treatment for gingival health. *Cochrane Database Syst Rev* 2017; 3: CD008676.
138. Jenkins DC, Charles IG, Thomsen LL, Moss DW, Holmes LS, Baylis SA, Rhodes P, Westmore K, Emson PC, Moncada S. Roles of nitric oxide in tumor growth. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995; 92(10): 4392-6.
139. Jepsen S et al. Prevention and control of dental caries and periodontal diseases at individual population level: consensus report of group 3 of joint EFP/ORCA workshop on the boundaries between caries and periodontal diseases. *J Clin Periodontol* 2017; 44(18): 585-93.
140. Ji S, Choi Y. Point-of-care diagnosis of periodontitis using saliva: technically feasible but still a challenge. *Front Cell Infect Microbiol* 2015; 5: 65.
141. Johnson LR et al. The effects of subgingival calculus on the clinical outcomes of locally-delivered controlled-release doxycycline compared to scaling and root planing. *J Clin Periodontol* 2002; 29(2): 87-91.
142. Kaldahl WB, Kalkwarf KL, Patil KD. A review of longitudinal studies that compared periodontal therapies. *J Periodontol* 1993; 64: 243-53.
143. Kaplish V, Kaur Walia M, Hari Kumar S.L. Local drug delivery systems in the treatment of periodontitis: A review. *Pharmacophore* 2013; 4(2): 39-49.
144. Kaufman E, Lamster IB. Analysis of saliva for periodontal diagnosis – a review. *J Clin Periodontol* 2000; 27: 453-65.
145. Kendall HK, Marshall RI, Bartold PM. Nitric oxide and tissue destruction. *Oral Dis* 2001; 7: 2-10.
146. Kimura S, Yonemura T, Kaya H. Increased oxidative product formation by peripheral blood polymorphonuclear leukocytes in human periodontal diseases. *J Periodont Res* 1993; 28: 197-203.
147. Kinane DF, Hajishengallis G. Polymicrobial infections, biofilms, and beyond. *J Clin Periodontol* 2009; 36(5): 404-5.
148. Kingman A, Albandar JM. Methodological aspects of epidemiological studies of periodontal diseases. *Periodontol 2000* 2002; 29:11-30.
149. Kinney JS, Morelli T, Braun T, Ramseier CA, Herr AE, Sugai JV, Shelburne CE, Rayburn LA, Singh AK, Giannobile WV. Saliva/pathogen biomarker signatures and periodontal disease progression. *J Dent Res* 2011; 90(6): 752-8.
150. Kobayashi T et al. The Fc gamma receptor genotype as severity factor for chronic periodontitis in Japanese patients. *J Periodontol* 2001; 72: 1324-31.
151. Koreeda N, Iwano Y et al. Periodic exacerbation of gingival inflammation during menstrual cycle. *J Oral Sci* 2005; 47(3): 159-64.
152. Krall EA. The periodontal- systemic connection: implications for treatment patients with osteoporosis and periodontal disease. *Ann Periodontol* 2001; 6: 209-13.

153. Kruck C, Eick S, Knofler GU, Purschwitz RE, Jentsch HFR. Clinical and microbiologic results 12 months after scaling and root planing with different irrigation solution in patients with moderate chronic periodontitis: a pilot randomized trial. *J Periodontol* 2012; 83: 312-20.
154. Kruidenier L, Verspaget HW. Review article: oxidative stress as a pathogenic factor in inflammatory bowel disease - radicals or ridiculous. *Aliment Pharmacol Ther* 2002; 16: 1997-2015.
155. Kuramitsu HK. Proteases of *Porphyromonas gingivalis*: what don't they do? *Oral Microbiology and Immunology* 1998; 13 (5): 263-70.
156. Laky M, Anscheringer I, Wolschner L, Heber S, Haririan H, Rausch-Fan X, Volf I, Moritz A, Assinger A. Periodontal treatment does not result in detectable platelet activation in vivo. *Clin Oral Investig* 2020; 24(5): 1853-59.
157. Lamont RJ, Jenkinson HF. Life below the gum line: pathogenic mechanisms of *Porphyromonas gingivalis*. *Microbiol Mol Biol Rev* 1998; 62: 1244-63.
158. Lang NP, Joss A, Tonetti MS. Monitoring disease during supportive periodontal treatment by bleeding on probing. *Periodontol 2000* 1996; 12: 44-8.
159. Lang NP, Kiel RA, Anderhalden K. Clinical and microbiological effects of subgingival restorations with overhanging or clinically perfect margins. *J Clin Periodontol* 1983; 10: 563-78.
160. Lang NP, Schätzle MA, Loe H. Gingivitis as risk factor in periodontal disease. *J Clin Periodontol*. 2009; 36: 3-8.
161. Lecic J, Cakic S, Janjic Pavlovic O, Ciemil a, Vukotic O, Petrovic V et al. Different methods for subgingival application of chlorhexidine in the treatment of patients with chronic periodontitis. *Acta Odontol Scand* 2016; 74: 502-07.
162. Li W, Wang RE, Finger M, Lang NP. Evaluation of antigingivitis effects of a chlorhexidine mouthwash with or without an antidiscoloration system compared to placebo during experimental gingivitis. *Journal of Investigative and Clinical Dentistry* 2014; 5: 15-22.
163. Li Y, St John MA, Zhou X, Kim Y, Sinha U, Jordan RCK, Eisele D, Abemayor E, Elashoff D, Park N-H, Wong DT. Salivary transcriptome diagnostics for oral cancer detection. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 8442-50.
164. Lindhe J, Lijnenberg B, Adielsson B. Effect of long-term tetracycline therapy on human periodontal disease. *J Periodontol* 1983; 10: 590-601.
165. Lindhe J. *Clinical Periodontology and Implant Dentistry*, 2004 Munksgaard (4th Ed)
166. Loo JA, Yan W, Ramachandran P, Wong DT. Comparative human salivary and plasma proteomes. *J Dent Res* 2010; 89: 1016-23.
167. Loos BG, Tjoa S. Host-derived diagnostic markers for periodontitis: do they exist in gingival crevice fluid? *Periodontol 2000* 2005; 53-72.
168. Love DT, Barrett TJ, White MY, Cordwell SJ, Davies MJ, Hawkins CL. Cellular targets of the myeloperoxidase-derived oxidant hypochlorous acid (HOCl) and its role in the inhibition of glycolysis in macrophages. *Free Radical Biology and Medicine* 2016; 94: 88-98.
169. Lovegrove JM. Dental plaque revisited: bacteria associated with periodontal disease. *J NZ Soc Periodontol* 2004; 87: 7-21.

170. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193(1): 265-75.
171. Lu Z, Rong K, Li J, Yang H, Chen R. Size-dependent antibacterial activities of silver nanoparticles against oral anaerobic pathogenic bacteria. *J Mater Sci Mater Med* 2013; 24: 6.
172. Lynch MC, Kuramitsu HK. Role of superoxide dismutase in the physiology of *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun* 1999; 67: 3367-75.
173. Mark LL, Haffajee AD, Socransky SS, et al. Effect of the interleukin-1 genotype on monocyte IL-1 beta expression in subjects with adult periodontitis. *J Periodontal Res* 2000; 35: 172-7.
174. Marton IJ, Balla G, Hegedus C et al (1993). The role of reactive oxygen intermediates in the pathogenesis of chronic apical periodontitis. *Oral Microbiol Immunol* 8: 254-7.
175. Mashayekhi F, Aghahoseini F, Rezaie A, Zamani MJ, Khorasani R, Abdollahi M. Alteration of cyclic nucleotides levels and oxidative stress in saliva of human subjects with periodontitis. *J Contemp Dent Pract* 2005; 6: 46-53.
176. Mashimo PA, Umemoto T, Slots J, Genco RJ, Ellison SA. Pathogenicity testing of *Macaca arctoides* subgingival plaque following chlorhexidine treatment. *J Periodontol* 1980; 51(4): 190-2.
177. Matesanz-Perez P et al. A systematic review on the effects of local antimicrobials as adjuncts to subgingival debridement compared with subgingival debridement alone, in the treatment of chronic periodontitis. *J Clin Periodontol* 2013; 40: 227-41.
178. McArthur WP, Tsai CC, Baehni PC, Genco RJ, Taichman NS. Leukotoxic effects of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* modulation by serum components. *Journal of Periodontal Res* 1981; 16 (2): 159-70.
179. McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase and enzymatic function for erythrocyte superoxide (hemocupreine). *J Biol Chem* 1969; 244: 6049-55.
180. McCord JM, Edeas MA. SOD, oxidative stress and human pathologies: a brief history and a future vision. *Biomed Pharmacother* 2005; 59: 139-42.
181. McCusker K, Hoidal J. Selective increase of antioxidant enzyme activity in the alveolar macrophages from cigarette smokers and smoke-exposed hamsters. *Am Rev Respir Dis* 1990; 141: 678-82.
182. Mei YM, Li L, Wang XQ, Zhang M, Zhu LF, Fu YW, Xu Y. AGEs induces apoptosis and autophagy via reactive oxygen species in human periodontal ligament cells *J Cell Biochem* 2019; doi: 10.1002/jcb.29499.
183. Mercado FB, Marshall RI, Klestov AC, Bartold PM. Relationship between rheumatoid arthritis and periodontitis. *J Periodontol* 2001; 72: 779-87.
184. Meyle J, Chapple I. Molecular aspects of the pathogenesis of periodontitis. *Periodontol* 2000 2015; 69: 7-17.
185. Miller CS, King CP Jr, Langub MC, Kryscio RJ, Thomas MV. Salivary biomarkers of existing periodontal disease: a cross-sectional study. *J Am Dent Assoc* 2006; 137: 322-9.
186. Miller CS, Foley JD, Bailey AL, Campell CL, Humphries RL, Christodoulides N. Current developments in salivary diagnostics. *Biomark Med* 2010; 4: 171-89.

187. Misra RR, Hochadel JF, Smith GT, Cook JC, Waalkes MP, Wink DA. Evidence that nitric oxide enhances cadmium toxicity by displacing the metal from metallothionein. *Chem Res Toxicol* 1996; 9: 326-32.
188. Mombelli A, Schmid B, Rutar A, Lang NP. Persistence patterns of *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia/nigrescens* and *Acinobacillus actinomycetemcomitans* after mechanical therapy of periodontal disease. *J Periodontol* 2000; 71: 14-21.
189. Monteiro DR, Gorup LF, Takamiya AS, Ruvollo-Filho AC, de Camargo ER, Barbosa DB. The growing importance of materials that prevent microbial adhesion: antimicrobial effect of medical devices containing silver. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2009; 34: 103-10.
190. Moore S, Calder KAC, Miller NJ. Antioxidant activity of saliva and periodontal disease. *Free Rad Res Comms* 1994; 21: 417-25.
191. Morrison EC, Ramfjord SP, Hill RW. Short-term effects of initial, nonsurgical periodontal treatment (hygienic phase). *J Clin Periodontol* 1980; 7 (3): 199-211.
192. Moseley R, Waddington RJ, Embery G. Degradation of glycosaminoglycans by reactive oxygen species, derived from stimulated polymorphonuclear leukocytes. *Biochim Biophys Acta* 1997; 1362: 221-31.
193. Moseley R, Waddington RJ, Embery G. The modification of alveolar bone proteoglycans by reactive oxygen species in vitro. *Conn Tiss Res* 1998; 37: 13-28.
194. Moshage H, Kok B, Huizenga JR, Jansen PL. Nitrite and nitrate determinations in plasma: a critical evaluation. *Clin Chem* 1995; 41(6 Pt 1): 892-6.
195. Moynihan P, Petersen PE. Diet, nutrition and the prevention of dental diseases. *Public Health Nutr* 2004; 7: 201-26.
196. Myiata Y, Takeda H, Kitano S, Hanazawa S. *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide-stimulated bone resorption via CD14 is inhibited by broad spectrum antibiotics. *Infection and Immunity* 1997; 65(9): 3513-9.
197. Naganuma A, Anderson ME, Meister A. Cellular glutathione as a determinant of sensitivity to mercuric chloride toxicity. Prevention of toxicity by giving glutathione monoester. *Biochem Pharmacol* 1990; 40: 693-7.
198. Navarro-González JA, Garcia-Benayas C, Arenas J. Semiautomated measurement of nitrate in biological fluids. *Clin Chem* 1998; 44: 679-81.
199. Nishikawa T, Naruse K, Kobayashi Y, Miyajima S, Mizutani M, Kikuchi T, Soboku K, Nakamura N, Sokabe A, Tosaki T, Hata M, Ohno N, Noguchi T, Matsubara T. Involvement of nitrosative stress in experimental periodontitis in diabetic rats. *J Clin Periodontol* 2012; 39(4): 342-9.
200. Noack B, Genco RJ. Periodontal infections contribute to elevated systemic C-reactive protein level. *J Periodontol* 2001; 72: 1221-7.
201. Novakovic N, et al. Salivary antioxidants as periodontal biomarkers in evaluation of tissue status and treatment outcome. *J Periodontal Res* 2014; 49: 129-36.
202. Nunn ME. Understanding the etiology of periodontitis: an overview of periodontal risk factors. *Periodontology* 2000. 2003; 32: 11-23.
203. Nussler AK, Billiar TR. Inflammation, immunoregulation, and inducible nitric oxide synthase. *J Leukoc Biol* 1993; 54(2): 171-8.

204. Ooshima T, et al. Oolong tea polyphenols inhibit experimental dental caries in SPF rats infected with mutans streptococci. *Caries Res* 1993; 27: 124-9.
205. Ozmeric N, Elgun S, Uraz A. Salivary arginase in patients with adult periodontitis. *Clin Oral Investig* 2000; 4: 21-4.
206. Page RC. The microbiological case for adjunctive therapy for periodontitis. *J Int Acad Periodontol* 2004; 6(4) Supp: 143-9.
207. Palmer RM, Matthews JP, Wilson RF. Non surgical periodontal treatment with and without adjunctive metronidazoli in smokers and non- smokers. *J Clin Periodontol* 1999; 26: 158- 63.
208. Panjamurthy K, Manoharan S, Ramachandran CR. Lipid peroxidation and antioxidant status in patients with periodontitis. *Cell Mol Biol Lett* 2005; 10(2): 255-64.
209. Papapanou PN. Epidemiology of periodontal diseases: An update. *J Int Acad Periodontol* 1999; 1: 110-16.
210. Parke DV, Sapota A. Chemical toxicity and reactive oxygen species. *Int J Occup Med Environ Health* 1996; 9(4): 331-40.
211. Parris M, Kidd PD. Glutathione: systemic protectant against oxidative and free radical damage. *Altern Med Rev* 1997; 2: 155-76.
212. Pârveu AE, Alb SF, Crăciun A, Taulescu MA. Efficacy of subantimicrobial-dose doxycycline against nitrosative stress in chronic periodontitis. *Acta Pharmacol Sin* 2013; 34(2): 247-54.
213. Paster BJ, Olsen I, Aas JA, Dewhirst FE. The breadth of bacterial diversity in the human periodontal pocket and other oral sites. *Periodontol* 2000 2006; 42: 80-7.
214. Patel SP, Rao NS, Pradeep AR. Effect of nonsurgical periodontal therapy on crevicular fluid and serum glutathione peroxidase levels. *Dis Markers* 2012; 32: 1-7.
215. Patel V, Santerre JP, Friedman S. Suppression of bacterial adherence by experimental root canal sealers. *J Endod* 2000; 26: 20-24.
216. Pavarino EC, Russo A, Galbiatti AL, Almeida WP, Bertollo EM. Glutathione: Biosynthesis and mechanism of action. In: Labrou N, Flemetakis E, editors. *Biochemistry and Mechanism of Action*. New York: Nova Science Publishers, Inc.; 2013. p.1-31.
217. Petersen PE, Ogawa H. Strengthening the prevention of periodontal disease: the WHO approach. *J Periodontol* 2005; 76: 2187-93.
218. Petersen PE. The World Oral Health Report 2003: Continuous improvement of oral health in the 21st century- The approach of the WHO Global Oral Health Programme. *Community Dent Oral Epidemiol* 2003; 31(1): 3-24.
219. Petersen PE, Ogawa H. The global burden of periodontal disease: towards integration with chronic disease prevention and control. *Periodontol* 2000 2012; 60: 15-39.
220. Petrovich IA, Podorozhnaia RP, Genesina TI, et al. Iron in oral cavity fluid in gingival inflammation. *Patologicheskaiia fiziologiia I eksperimentalnaia terapiia* 1996; 3: 22-4.
221. Philstrom BL, McHugh RB, Oliphant TH, Ortiz- Campos C. Comparison of surgical and non- surgical treatment of periodontal disease. A review of current studies and additional results after 6 ½ years. *J Clin Perodontol* 1983; 10: 524-41.

222. Pitiphat W, Merchant AT, Rimm EB, Joshipura KJ. Alcohol consumption increases periodontal risk. *J Dent Res* 2003; 82: 509-13.
223. Pucher JJ, Daniel JC. The effect of chlorhexidine digluconate on human fibroblasts in vitro. *J Periodontol* 1992; 63: 526-32.
224. Ramfjord SP et al. 4 modalities of periodontal treatment compared over 5 years. *J Clin Periodontol* 1987; 14: 445-52.
225. Radox Laboratories, Ltd. Radicales Libres, United Kingdom, Crumlin, 1996; 1-16.
226. Rashed HT. Evaluation of the effect of hydrogen peroxide as mouthwash in comparison with chlorhexidine in chronic periodontitis patients: A clinical study. *J Int Soc Prev Community Dent* 2016; 6 (3): 206-12.
227. Rateitschak-Pluss EM, et al. Non-surgical periodontal treatment: where are the limits? An SEM study. *J Clin Periodontol* 1992; 19: 240-4.
228. Reise M, Gottschaldt M, Matz C, Volpel A, Jandt KD, Schubert US, Sigusch BW. Antibacterial effect of silver (I) carbohydrate complexes on oral pathogenic key species in vitro. *BMC Oral Health* 2016; 16: 42-9.
229. Reiter RJ. Oxidative processes and antioxidative defense mechanisms in the aging brain. *FASEB J* 1995; 9: 526-33.
230. Ren C, McGrath C, Jin L, Zhang C, Yang Y. The effectiveness of low-level laser therapy as an adjunct to non-surgical periodontal treatment: a meta-analysis. *J Periodontal Res* 2017; 52(1): 8-20.
231. Rotenoy KR, Pain U. The Merck Manual of diagnosis and treatment. U: Porter SR, editor. Merck Sharp & Dohme Corp., Witherhouse, NJ; 19th Ed. 2011. p. 1620-34.
232. Rusu D et al. Evaluation hydrophobic gel adhering to the gingiva in comparison with a standard water-soluble 1% chlorhexidine gel after scaling and root planing in patients with chronic moderate periodontitis. A randomized clinical trial. *Int J Dent Hyg* 2015.
233. Saglam M, Arslan U, Bozkurt Buket S, Hakki SS. Boric Acid Irrigation as an Adjunct to Mechanical Periodontal Therapy in Patients With Chronic Periodontitis: A Randomized Clinical Trial. *J Periodontol* 2013; 84: 9 1297-308.
234. Saito T, Shimazaki Y, Koga T, Tsuzuki M, Ohshima A. Relationship between upper body obesity and periodontitis. *J Dent Res* 2001; 80: 1631-36.
235. Sakallioğlu EE, Lütüoğlu M, Sakallioğlu U, Ceylan GK, Pamuk F, Dede FÖ, Dede D. Gingival crevicular fluid levels of neuropeptides following dental restorations. *J Appl Biomater Funct Mater* 2015; 13(2): e186-93.
236. Samani K, Poorsattar Bejeh Mir A, Kashiri M, et al. Introducing cut-points for salivary nitric oxide to distinguish periodontitis from the normal periodontium. *Minerva Stomatol* 2012; 61: 443-8.
237. Scandalios JG. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Brazilian J Med Biolog Res* 2005; 38: 995-1014.
238. Schmidt AM, Weidman E, Lalla E, et al. Advanced glycation endproducts (AGEs) induce oxidant stress in the gingiva: a potential mechanism underlying accelerated periodontal disease associated with diabetes. *J Periodont Res* 1996; 31: 508-15.
239. Sculley DV, Langley-Evans SC. Periodontal disease is associated with lower antioxidant capacity in whole saliva and evidence of increased protein oxidation. *Clinical science* 2003; 105: 167-72.

240. Sekino S, Ramberg P. The effect of a mouth rinse containing phenolic compounds on plaque formation and developing gingivitis. *J Clin Periodontol* 2005; 32(10): 1083-8.
241. Shah P, Mehta R, Duseja S, Desai K, Shah S. Clinical evaluation of 0.10% sodium hypochlorite as an oral rinse in chronic generalized periodontitis patients. *Adv Hum Biol* 2016; 6: 51-6.
242. Shahab A, Haghghati F, Baeri M, Jamalifar H, Abdollahi M. A clinical, microbiological and immunological comparison between subgingival irrigation with Dentol™ and chlorhexidine in advanced periodontitis. *Arch Med Sci* 2011; 7.1: 154-60.
243. Silva-Boghossian CM, Colombo AP, Tanaka M, Rayo C, Xiao Y, Siqueira WL. Quantitative proteomic analysis of gingival crevicular fluid in different periodontal conditions. *PLoS One* 2013; 8(10): e75898.
244. Silverton SF, Adebajo OA, Moonga BS et al (1999). Direct microsensor measurement of nitric oxide produced by the osteoclast. *Biochem Biophys Res Comm* 259: 73-7.
245. Singh H, Kapoor P, Dhillon J, Kaur M . Evaluation of tree different concentrations of chlorhexidine for their substantivity to human dentin. *Indian J Dent* 2014; 5: 199-201.
246. Siqueira JF, Jr. et al. Bacteriologic investigation of the effects of sodium hypochlorite and chlorhexidine during the endodontic treatment of teeth with apical periodontitis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2007; 104: 122-30.
247. Slots J. Focal infection of periodontal origin. *Periodontology* 2000 2019; 79(1): 233-5.
248. Slots J. Periodontitis: facts, fallacies and the future. *Periodontol* 2000 2017; 75(1): 7-23.
249. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C& Kent RL Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. *Journal of Clinical Microbiology* 1998; 25(2): 134-44.
250. Soskolne WA, Cohen S, Sennerby L, Wennerberg A, Shapira L. The effect of titanium surface roughness on the adhesion of monocytes and their secretion of TNF-alpha and PGE2. *Clin Oral Implants Res* 2002; 13(1): 86-93.
251. Spacciapoli P, Buxton D, Rothstein D, Friden P. Antimicrobial activity of silver nitrate against periodontal pathogens. *J Periodontol Res* 2001; 36: 108-13.
252. Sree SL, Sethupathy S. Evaluation of the efficacy of taurine as an antioxidant in the management of patients with chronic periodontitis. *Dent Res J (Isfahan)* 2014; 11(2): 228-33.
253. Straub AM, Suvan J, Lang NP, Mombelli A, Braman V, Massaro J, Friden P, Tonetti MS. Phase 1 evaluation of local delivery device relasing silver ions in periodontal pockets: safety, pharmacokinetics and bioavailability. *J Periodontol Res* 2001; 36: 187-93.
254. Streckfus C, Bigler L, Dellinger T, Dai X, Kingman A, Thigpen JT. The presence of soluble c-erbB-2 in saliva and serum among women with breast carcinoma: a preliminary study. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 2363-70.
255. Su H, Gornitsky M, Velly AM, Yu H, Benarroch M, Schipper HM. Salivary DNA, lipid, and protein oxidation in nonsmokers with periodontal disease. *Free Radic Biol Med* 2009; 46(7): 914-21.
256. Sudharani A Pyati, R Naveen Kumar, Vinod Kumar, N H Praveen Kumar, K M Parveen Reddy. Salivary Flow Rate, pH, Buffering Capacity, Total Protein, Oxidative Stress and Antioxidant Capacity in Children with and without Dental Caries. *J Clin Pediatr Dent* 2018; 42(6): 445-9.

257. Sukuroglu E, Güncü GN, Kilinc K, Caglayan F. Using Salivary Nitrite and Nitrate Levels as a Biomarker for Drug-Induced Gingival Overgrowth. *Front Cell Infect Microbiol* 2015; 5: 87.
258. Sun M, Zigman S. An important spectrophotometric assay for superoxide dismutase based on epinephrine auto-oxidation. *Anal Biochem* 1978; 90: 81-9.
259. Taba M Jr, Kinney J, Kim AS, Giannobile WV. Diagnostic biomarkers for oral and periodontal diseases. *Dent Clin North Am* 2005; 49(3): 551-71.
260. Taso E, Stefanovic V, Stevanovic I, Vojvodic D, Topic A, Petkovic-Curcin A, Obradovic-Djuricic K, Markovic A, Djukic M, Vujanovic D. Influence of Dental Restorations on Oxidative Stress in Gingival Crevicular Fluid *Oxid Med Cell Longev* 2018; 2018:1823189.
261. Taubman MA, Valverde P, Han X, Kawai T. Immune response: the key to bone resorption in periodontal disease. *J Periodontol* 2005; 76: 2033-41.
262. Taylor GW et al. Glycemic control and alveolar bone loss progression in type 2 diabetes. *Ann periodontol* 1998; 3: 30-9.
263. Taylor GW. Bidirectional interrelationships between diabetes and periodontal diseases: An epidemiological perspective. *Ann Periodontol* 2001; 6: 99-112.
264. Teles RP, Haffajee AD, Socransky SS. Microbiological goals of periodontal therapy. *Periodontol* 2000 2006; 42: 180-218.
265. Tervonen T, Oliver RC. Long term control of diabetes mellitus and periodontitis. *J Clin Periodontol* 1993; 20: 431-5.
266. Tezal M, Grossi SG, Ho AW, Genco RJ. The effect of alcohol consumption on periodontal disease. *J Periodontol* 2001; 72: 183-9.
267. Thomas B, Ramesh A, Suresh S, Prasad BR. A comparative evaluation of antioxidant enzymes and selenium in the serum of periodontitis patients with diabetes mellitus type 2. *Contemp Clin Dent* 2013; 4: 176-80.
268. Thomas MV, Branscum A, Miller CS, Ebersole J, Al-Sabbagh M, Schuster JL. Within-subject variability in repeated measures of salivary analytes in healthy adults. *J Periodontol* 2009; 80(7): 1146-53.
269. Thorstensson H. Periodontal disease in adult insulin dependent diabetes. *Swed Dent J Suppl* 1995; 107: 1-68.
270. Toczewska J, Konopka T. Activity of enzymatic antioxidants in periodontitis: A systematic overview of the literature. *Dent Med Probl* 2019; 56(4): 419-26.
271. Tomar SL, Asma S. Smoking- attributable periodontitis in the United States: Findings from NHANES III National Health and Nutrition Examination Survey. *J Periodontol* 2000; 71: 743-51.
272. Topcu AO, Akalin FA, Sahbazoglu KB, Yamalik N, Kilinc K, Karabulut E, Tözüm TF. Nitrite and nitrate levels of gingival crevicular fluid and saliva in subjects with gingivitis and chronic periodontitis. *J Oral Maxillofac Res* 2014; 5(2): e5.
273. Tóthová L, Hodosy J, Mettenburg K, Fábryová H, Wagnerová A, Ba'bícková J. No harmful effect of different Coca-cola beverages after 6 months of intake on rat testes. *Food Chem Toxicol* 2013; 62: 343-8.
274. Tóthová L, Kamodyová N, Cervenka T, Celec P. Salivary markers of oxidative stress in oral diseases. *Front Cell Infect Microbiol* 2015; 5: 73.

275. Trivedi S, Lal N. Antioxidant enzymes in periodontitis J Oral Biol Craniofac Res 2017; 7(1): 54-7.
276. Tsai CC, Chen HS, Chen SL, Ho YP, Ho KY, Wu YM, Hung CC. Lipid peroxidation: a possible role in the induction and progression of chronic periodontitis. J Periodontal Res 2005; 40(5): 378-84.
277. Tsiligardis G, Yucel-Lindberg T, Modeer T. Enhanced levels of prostaglandin E2, leukotrine B4, and matrix metalloproteinase-9 in gingival crevicular fluid from patients with Down syndrome. Acta odontol Scand 2003; 61(3): 154-8.
278. Tsuchida S, Satoh M, Umemura H, Sogawa K, Kawashima Y, Kado S, Sawai S, Nishimura M, Kodera Y, Matsushita K, Nomura F. Proteomic analysis of gingival crevicular fluid for discovery of novel periodontal disease markers. Proteomics 2012; 12(13): 2190-202.
279. Tüter G, Kurtiş B, Serdar M. Interleukin-1beta and thiobarbituric acid reactive substance (TBARS) levels after phase I periodontal therapy in patients with chronic periodontitis. J Periodontol 2001; 72(7): 883-8.
280. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mayur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. Int J Biochem Cell Biol 2007; 39: 44-84.
281. Van der Oost R, Beyer J, Vermeulen N. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. Environ Toxicol Pharmacol 2003; 13: 57-149.
282. van der Weijden F, Slot DE. Oral hygiene in the prevention of periodontal diseases: the evidence. Periodontol 2000 2011; 55: 104-23.
283. van der Weijden GA, Hioe KPA. systematic review of the effectiveness of self-performed mechanical plaque removal in adults with gingivitis using a manual toothbrush. J Clin Periodontol 2005; 32: 214-28.
284. van't Hof RJ, Ralston SH. Nitric oxide and bone. Immunology 2001; 103: 255-61.
285. Vujotic L, Matic S, Borkovic-Mitic S, Stojisavljevic A, Mutic J, Bascarevic V, Jokovic M, Pavlovic S. Association between oxidative stress biomarkers and concentrations of some metal ions in the blood of patients with brain tumors and hydrocephalus. Arch Med Sci 2020; 16: 811-9.
286. Vyas SP et al. Controlled and targeted drug delivery strategies towards intraperiodontal pocket diseases. J Clin Pharm Ther 2005; 25: 21-42.
287. Wactawski-Wende J. Periodontal diseases and osteoporosis: association and mechanisms. Ann Periodontol 2001; 6: 197-208.
288. Waddington RJ, Moseley R, Embery G. Reactive oxygen species: a potential role in the pathogenesis of periodontal diseases. Oral Dis 2000; 6(3): 138-51.
289. Wang W, Ballatori N. Endogenous glutathione conjugates: occurrence and biological functions. Pharmacol Rev 1998; 50: 335-55.
290. Wang J, Schipper HM, Velly AM, Mohit S, Gornitsky M. Salivary biomarkers of oxidative stress: a critical review. Free Radic Biol Med 2015; 85: 95-104.
291. Wei D, Zhang XL, Wang YZ, Yang CX, Chen G. Lipid peroxidation levels, total oxidant status and superoxide dismutase in serum, saliva and gingival crevicular fluid in chronic periodontitis patients before and after periodontal therapy. Aust Dent J 2010; 55(1): 70-8.

292. Wen L, Wang RE, Finger M, Lang NP. Evaluation of the antigingivitis effect of a chlorhexidine mouthwash with or without an discoloration system compared to placebo during experimental gingivitis. *Journal of Investigative and Clinical Dentistry* 2014; 5: 15-22.
293. Wilkie-Grantham RP, Magon NJ, Harwood DT et al. Myeloperoxidase-dependent lipid peroxidation promotes the oxidative modification of cytosolic proteins in phagocytic neutrophils. *Journal of Biological Chemistry* 2015; 290(5): 9896-905.
294. Winkler JR, Murray PA, Grassi M, Hammerle C. Diagnosis and management of HIV-associated periodontal lesions. *J Am Dent Assoc* 1989; Suppl: 25S-34S.
295. Wu G, Fang YZ, Yang S, Lupton JR, Turner ND. Glutathione metabolism and its implications for health. *J Nutr* 2004; 134: 489-92.
296. Ximenez-Fyvie LA, Almaguer-Flores A, Jacobo-Soto V, Lara-Cordoba M, Sanchez-Vargas LO, and Alcantara-Maruri E. Description of the subgingival microbiota of periodontally untreated Mexican subjects: chronic periodontitis and periodontal health. *Journal of Periodontology* 2006; 77 (3): 460-71.
297. Ximenez-Fyvie LA, Haffajee AD, Socransky SS. Comparison of the microbiota of supra and subgingival plaque in health and periodontitis. *J Clin Periodontol* 2000; 27: 648-57.
298. Yaari A, Tovbin D, Zlotnick M, Mostoslavsky M, Shemer Avni Y, Hanuka N, Burbea Z, Katzir Z, Storch S, Margalith M. Detection of HCV salivary antibodies by a simple and rapid test. *J Virol Methods* 2006; 133: 1-5.
299. Yang PS. Scaling-stimulated salivary antioxidant changes and oral-health behavior in an evaluation of periodontal treatment outcomes. *Scientific World Journal* 2014; 814671.
300. Yilmaz HG, Bayindir H. Clinical evaluation of chlorhexidine and essential oils for adjunctive effects in ultrasonic instrumentation of furcation involvements: a randomized controlled clinical trial. *Int J Dent Hyg* 2012; 10(2): 113-7.
301. Yoshida A, Ansai T. *Microbiological Diagnosis for Periodontal Diseases, Periodontal Diseases- A Clinician's Guide*, Dr. Jane Manakil (Ed.) 2012; ISBN: 978-953-307-818-2
302. Yoshida A. et al. Loop mediated isothermal amplification method for rapid detection of the periodontopathic bacteria *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* and *Treponema denticola*. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 2418-24.
303. Zaura-Arite E, van Marle J, ten Cate JM. Confocal microscopy study of undisturbed and chlorhexidine-treated dental biofilm. *J Dent Res* 2001; 80: 1436-40.
304. Zelko IN, Mariani TJ, Folz RJ. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Rad Biol Med* 2002; 33: 337-49.
305. Zhang L, Henson BS, Camargo PM, Wong DT. The clinical value of salivary biomarkers for periodontal disease. *Periodontol* 2000; 2009: 51: 25-37.

БИОГРАФИЈА

Владан Ковачевић је рођен 25.10.1970. у Београду. Стоматолошки факултет Универзитета у Београду је завршио 1996. године са просечном оценом 8,16 и оценом 10,00 на дипломском испиту. Приправнички стаж је завршио у Д.З. “Вождовац“ 1997. године, када је положио и државни испит. 1998. године завршава Школу резервних официра Санитетске службе Војномедицинске академије са просечном оценом 9,47. Током 2002. године завршио је специјализацију из пародонтологије и оралне медицине на Клиници за стоматологију Војномедицинске академије и положио специјалистички испит са одличном оценом. Од 1.11.2002. се налази у сталном саставу колектива Клинике за стоматологију, на Одељењу за пародонтологију и оралну медицину. Током година проведених у раду на Војномедицинској академији, учествује у праћењу и увођењу савремених дијагностичких и терапијских метода у области пародонтологије и периимплантологије. Ангажован је као ментор доктора стоматологије на приправничком стажу, и на специјалистичким академским студијама које се обављају на Клиници за стоматологију Војномедицинске академије. Учествује као организатор и предавач клиничких семинара у оквиру Континуиране медицинске едукације, као и двосеместралне специјалистичке наставе. Од 2014. године ради на Одељењу за имплантологију, као начелник Одсека за периимплантологију, истраживање и производњу замена за кост. Учесник је у НИ пројекту Медицинског факултета Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду под називом: „ Стање оралног здравља припадника Војске Србије, утврђивање стратегије за превентивни преограм и континуирану терапију“. 2016. изабран је у звање асистента на Медицинском факултету Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду, за научну област орална медицина. Учесник је на конгресима и семинарима међународног карактера. Објавио је три рада у међународним часописима као први аутор, а у три је коаутор. Ожењен је и има двоје деце.

ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Владан М. Ковачевић, изјављујем да докторска дисертација под насловом:

**ЕФИКАСНОСТ РАСТВОРА ЈОНА СРЕБРА НА ПРОМЕНЕ ОКСИДО –
НИТРОЗАТИВНИХ ПАРАМЕТАРА У ТЕРАПИЈИ БОЛЕСНИКА СА ХРОНИЧНИМ
ОБЛИКОМ ПАРОДОНТОПАТИЈЕ**

која је одбрањена на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу представља *оригинално ауторско дело* настало као резултат *сопственог истраживачког рада*.

Овом Изјавом такође потврђујем:

- да сам *једини аутор* наведене докторске дисертације,
- да у наведеној докторској дисертацији *нисам извршио/ла повреду* ауторског нити другог права интелектуалне својине других лица,
- да умножени примерак докторске дисертације у штампаној и електронској форми у чијем се прилогу налази ова Изјава садржи докторску дисертацију истоветну одбрањеној докторској дисертацији.

У Крагујевцу, 2021. године,

потпис аутора

ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Владан М. Ковачевић

дозвољавам

не дозвољавам

Универзитетској библиотеци у Крагујевцу да начини два трајна умножена примерка у електронској форми докторске дисертације под насловом:

ЕФИКАСНОСТ РАСТВОРА ЈОНА СРЕБРА НА ОКСИДО- НИТРОЗАТИВНЕ ПАРАМЕТРЕ У ТЕРАПИЈИ БОЛЕСНИКА СА ХРОНИЧНИМ ОБЛИКОМ ПАРОДОНТОПАТИЈЕ

која је одбрањена на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, и то у целини, као и да по један примерак тако умножене докторске дисертације учини трајно доступним јавности путем дигиталног репозиторијума Универзитета у Крагујевцу и централног репозиторијума надлежног министарства, тако да припадници јавности могу начинити трајне умножене примерке у електронској форми наведене докторске дисертације путем *преузимања*.

Овом Изјавом такође

дозвољавам

не дозвољавам¹

припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од следећих *Creative Commons* лиценци:

¹ Уколико аутор изабере да не дозволи припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци, то не искључује право припадника јавности да наведену докторску дисертацију користе у складу са одредбама Закона о ауторском и сродним правима.

- Ауторство
 - Ауторство - делити под истим условима
 - Ауторство - без прерада
 - Ауторство - некомерцијално
- 5) Ауторство - некомерцијално - делити под истим условима
- 6) Ауторство - некомерцијално - без прерада²

У Крагујевцу, 2021. године,

потпис аутора

² Молимо ауторе који су изабрали да дозволе припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци да заокруже једну од понуђених лиценци. Детаљан садржај наведених лиценци доступан је на: <http://creativecommons.org.rs/>

