

UNIVERZITET U BEOGRADU
STOMATOLOŠKI FAKULTET

Nikola Z. Radović

Mikro RNK-146a i mikro RNK-155 u gingivalnoj
tečnosti, kao potencijalni biomarkeri
parodontopatije kod sistemski zdravih osoba i
obolelih od dijabetes melitusa tip 2

Doktorska disertacija

Beograd, 2019

UNIVERSITY OF BELGRADE
SCHOOL OF DENTAL MEDICINE

Nikola Z. Radović

MicroRNA-146a and microRNA-155 as novel
crevicular fluid biomarkers for periodontitis in
nondiabetic and type 2 diabetic patients

PhD Thesis

Belgrade, 2019

Mentor:

dr Jelena Roganović, vanredni profesor Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu

Komentor:

dr Nataša Nikolić Jakoba, vanredni profesor Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu

Članovi komisije:

dr Saša Janković, redovni profesor Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu

dr Božidar Brković, vanredni profesor Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu

dr Sanja Milutinović Smiljanić, docent Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu

dr Zoran Mandinić, docent Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu

dr sci. Nina Petrović, naučni saradnik Instituta za nuklearne nauke “Vinča” Univerziteta u Beogradu

Datum odbrane: _____

Zahvalnica i posveta

Ova doktorska disertacija je realizovana u Laboratoriji za radiobiologiju i molekularnu genetiku Instituta za nuklearne nauke "Vinča" Univerziteta u Beogradu. Jedan deo istraživanja u okviru doktorske disertacije je urađen u RJ Institutski predmeti Stomatološkog fakulteta u Beogradu, dok je klinički deo istraživanja obavljen na Klinici za parodontologiju i oralnu medicinu, Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Teza je realizovana u okviru projekta osnovnih istraživanja Ministarstva za prosvetu, nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije broj 175021 pod nazivom "Kontrola bola i molekularni mehanizmi kao faktori regenerativne terapije u stomatologiji kod zdravih pacijenata i pacijenata sa dijabetes melitusom".

Najveću zahvalnost dugujem mom mentoru prof. dr Jeleni Roganović, izuzetnom nastavniku i vizionaru u nauci, na ogromnoj posvećenosti, nesebičnim savetima i predanom radu tokom izrade i pisanja teze. Hvala Vam na autorirtetu koji ste imali, na razumevanju i ogromnoj podršci.

Mom komentoru, prof. dr Nataši Nikolić Jakoba, želim da izrazim ogromnu zahvalnost na veštinama koje mi je prenela u kliničkom radu tokom izrade ove teze, ali i tokom naše višegodišnje saradnje na Klinici za parodontologiju i oralnu medicinu. Svojom preciznošću, smirenošću i sa velikim strpljenjem uveli ste me u svet nauke i istraživanja. Hvala Vam na strpljenju, razumevanju i poverenju.

Jedno beskrajno hvala dugujem dr sci. Nini Petrović, naučnom saradniku Instituta za nuklearne nauke „Vinča” što je učestvovala u dizajnu dela doktorske disertacije, izradi dela eksperimenata, kao i analizi i tumačenju rezultata proisteklih iz eksperimentalnog dela disertacije. Nina, ti znaš koliko mnogo uticaja si imala na moju motivaciju i koliko mnogo zasluge ide tebi. Hvala ti na izuzetnoj posvećenosti, na svakom savetu. Veliko hvala na pomoći oko statističke obrade podataka. Hvala ti što si učinila da i dalje verujem da su predan rad i kvalitet jedino što donosi rezultat. Naučila si me da još više zavolim nauku i hvala ti na tome.

Zahvaljujem se i celokupnom kolektivu na Klinici za parodontologiju i oralnu medicinu, mojim kolegama doktorandima i specijalizantima sa Klinike, na pomoći i pruženoj podršci tokom izrade teze. Bojana i Jeco, beskrajno vam hvala, bez vas bi ovo bilo mnogo teže.

Hvala mojim prijateljima, koji su bezrezervno verovali u mene i davali mi podršku svih ovih godina. Nevena, Bato, znate da je ovo i vaš uspeh. Maki, svako hvala bi bilo malo za svu ljubav i podršku.

Sve što ova disertacija sa sobom nosi, svaku reč, svaki rezultat, ponos, sreću i zadovoljstvo, posvećujem mojim roditeljima, mojoj Sandri i mom Zoranu, kao i mom bratu Dukiju. Hvala vam što ste mi podarili ono najvrednije, a to je osećaj zajednice i ljubav kao jedino merilo vrednosti. Hvala vam na podršci i hvala vam što verujete u mene. Obećavam da ću se i dalje truditi da vas činim ponosnim i srećnim.

Mikro RNK-146a i mikro RNK-155 u gingivalnoj tečnosti, kao potencijalni biomarkeri parodontopatije kod sistemski zdravih osoba i obolelih od dijabetes melitusa tip 2

Rezime

Nedavne studije pokazuju ključnu ulogu genetičkih i epigenetičkih mehanizama u razvoju multifaktorijalnih oboljenja kao što su parodontopatija i dijabetes melitus tip 2 (DM tip 2). Tako su se cirkulatorne miRNK pojavile kao potencijalni novi biomarkeri mnogih oboljenja i igraju važnu ulogu u regulaciji značajnih bioloških procesa među kojima je i inflamacija. Cilj ove studije je bio da se istraže vrednosti i značaj nivoa ekspresije molekula miRNK-146a i miRNK-155, nivo aktivnosti enzima SOD-e (superoksid dizmutaze), kao i vrednosti koncentracije enzima matriksne metaloproteinaze 9 (MMP-9) u gingivalnoj tečnosti ispitanika obolelih od hronične parodontopatije sistemski zdravih (HP grupa) i obolelih od DM tipa 2 (HPDM grupa) i ispitanika sa klinički zdravim parodontcijumom sistemski zdravih (Z grupa) i obolelih od DM tipa 2 (ZDM grupa). U istraživanje je bilo uključeno 96 ispitanika oba pola (44 muškaraca i 52 žene). Nivo oralne higijene i stanje parodontalnih tkiva verifikovano je pomoću graduisane parodontalne sonde (PCPUNC 15, Hu Friedy, Chicago, USA) merenjem sledećih kliničkih parametara: plak indeks, gingivalni indeks, krvarenje na provokaciju, dubina sondiranja, nivo pripojnog epitela i nivo ivice gingive. Uzorci gingivalne tečnosti su uzimani sa dva reprezentativna mesta filter papirima PerioPaper®, (Pro-Flow Corp., Amityville, NY, USA), 24h nakon merenja i beleženja kliničkih parametara. Ispitanicima sa hroničnom parodontopatijom uzorci su uzimani iz dva parodontalna džepa, na mestima sa najvećim vrednostima dubine sondiranja i pozitivnim vrednostima krvarenja na provokaciju, dok je ispitanicima sa zdravim parodontcijumom uzorak gingivalne tečnosti uziman u regiji gornjeg desnog centralnog sekutića i gornjeg desnog prvog molara (meziostibularne površine). Klinička merenja i uzorkovanje gingivalne tečnosti su rađena dva puta: na prvom pregledu i šest nedelja nakon sprovedene kauzalne terapije obolelog parodontcijuma. Vrednosti nivoa ekspresije molekula miRNK su određivane lančanom reakcijom polimeraze kojoj prethodi reverzna transkripcija korišćenjem prajmera sa petljom, (eng. *stem-loop*) qRT-PCR (eng. *real-time quantitative reverse transcriptase- polymerase chain reaction*). Aktivnost enzima SOD-e je određivana spektrofotometrijskom metodom, dok su vrednosti koncentracije molekula MMP-9 mereni *ELISA* metodom (eng. *enzyme-linked immunosorbent*

assay). Vrednosti merenih kliničkih parametara su predstavljane kao srednja vrednost \pm standardna devijacija. Vrednosti svih merenih kliničkih parametara bile su statistički značajno veće u HP i HPDM grupama u poređenju sa vrednostima ovih parametara u odnosu na Z i ZDM grupe, inicijalno tokom prvog merenja i 6 nedelja nakon sprovedene kauzalne terapije. ($p < 0.01$). Povećane vrednosti nivoa ekspresije molekula miRNK-146a i miRNK-155 su pronađene u HP i HPDM grupama pre terapije, dok su se vrednosti nivoa ekspresije ovih miRNK smanjile šest nedelja nakon kauzalne terapije parodontopatije, na vrednosti slične onima kao kod ispitanika sa zdravim parodontcijumom u Z i ZDM grupama (Mann-Whitney test, $p < 0.01$). Rezultati naše studije su pokazali postojanje jake pozitivne korelacije između dobijenih vrednosti aktivnosti enzima SOD-e i vrednosti nivoa ekspresije molekula miRNK-146a ($p < 0.001$) u HP i HPDM grupama pre terapije i ($p < 0.001$) u HP i HPDM grupama nakon primenjene terapije. Takođe primenom Spirmanovog ili Pirsonovog korelacionog testa je bila dobijena statistički značajna pozitivna korelacija između nivoa aktivnosti enzima SOD-e i nivoa ekspresije molekula miRNK-155 u HP grupi ispitanika pre i nakon primenjene kauzalne terapije, kao i u HPDM grupi pre primenjene terapije ($p < 0.001$). Vrednosti nivoa aktivnosti enzima SOD-e su bile statistički značajno povećane u grupama ispitanika sa hroničnom parodontopatijom (HPDM i HP grupe), dok su se vrednosti nivoa aktivnosti smanjivale, šest nedelja nakon kauzalne terapije obolelog parodontcijuma, na vrednosti slične onima kao kod ispitanika sa zdravim parodontcijumom (ZDM i Z grupe) ($p < 0.01$). Vrednosti koncentracije molekula MMP-9 su bile značajno povećane u grupama ispitanika sa hroničnom parodontopatijom (HPDM i HPu grupe), dok su se vrednosti koncentracija smanjivale, šest nedelja nakon kauzalne terapije obolelog parodontcijuma, na vrednosti slične onima kao kod ispitanika sa zdravim parodontcijumom (ZDM i Z grupe) ($p < 0.01$). Dobijene vrednosti nivoa ekspresije molekula miRNK-146a su veće kod ispitanika u ZDM grupi u poređenju sa vrednostima dobijenim kod ispitanika u Z grupi (ANOVA test sume opsega, Kruskal-Wallis-ov test analize varijanse opsega). MiRNK-146a i miRNK-155 se mogu smatrati potencijalno novim biomarkerima obolelih od hronične parodontopatije sistemski zdravih i obolelih od DM tipa 2.

Ključne reči: miRNK-146a, miRNK-155, epigenetički modulatori, parodontopatija, diabetes melitus tip 2, SOD, matriksne metaloproteinaze

Naučna oblast: Stomatologija

Uža naučna oblast: Parodontologija

UDK broj: 577.21:616.311.2-002(043.3)

MicroRNA-146a and microRNA-155 as novel crevicular fluid biomarkers for periodontitis in nondiabetic and type 2 diabetic patients

Abstract

Recent studies point at the crucial role of genetic and epigenetic mechanisms in the development of multifactorial diseases such as periodontitis and diabetes mellitus (DM) type 2. In addition, circulatory microRNAs (miRs) have emerged as novel biomarkers for various diseases. Aim of this study was to investigate the levels of miR-146a and miR-155 and superoxide dismutase (SOD) activity in gingival crevicular fluid (GCF), as well as levels of MMP-9, in periodontitis patients with (CPDM) and without DM type 2 (CP), as well as in periodontally healthy, control groups with or without DM type 2 (PHDM and PH, respectively). Ninety-six subjects (44 males and 52 females) were included in the study. Using a periodontal probe (PCPUNC 15, Hu Friedy, Chicago, USA), full-mouth periodontal evaluation was carried out. The following clinical parameters were recorded: probing pocket depth (PPD), clinical attachment level (CAL), bleeding on probing (BOP), gingival index (GI), and plaque index (PI). Baseline, GCF samples were collected from two representative sites per participant, 24h after the clinical measurements were recorded using paper strip, PerioPaper®, (Pro-Flow Corp., Amityville, NY, USA). Representative sites in periodontally healthy participants were mesiovestibular aspect of the right upper central incisor and right upper first molar. In patients with periodontitis, the two sites demonstrating the highest values of PPD and positive BOP were considered as representative. The clinical measurements were recorded, and GCF samples were taken from the sampling site at baseline and 6 weeks after the periodontal treatment. MiRNA modulation was analyzed using real-time quantitative reverse transcriptase- polymerase chain reaction qRT-PCR. SOD activity was measured spectrophotometrically, while the levels of MMP-9 was measured using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Mean values of full-mouth and sample sites' PPD, CAL, BOP, GI, PI were statistically higher in CP and CPDM groups compared to periodontally healthy groups (PH and PHDM), baseline as well as 6 weeks after non-surgical therapy. (Anova and Bonferroni post hoc test. $p < 0.01$). The upregulation of miR-146a and miR-155 was observed baseline in CP and CPDM patients, while the levels decreased six weeks after the non-surgical therapy to the levels comparable to PH and PHDM, respectively. (Mann-Whitney test, $p < 0.01$) Expression levels

of miRNA-146a positively correlated with SOD activity ($p < 0.01$) baseline and 6 weeks after non-surgical therapy in CP and CPDM patients ($p < 0.001$). Expression levels of miRNA-155 positively correlated with SOD activity baseline and 6 weeks after initial therapy in CP and CPDM patients, as well as baseline in CP patients ($p < 0.001$). Activity of major antioxidant enzyme, SOD, is significantly enhanced in CP and CPDM patients baseline and decreased 6 weeks after non-surgical therapy to the levels comparable to periodontally healthy subjects. ($p < 0.01$) Activity of MMP-9 is significantly enhanced in CP and CPDM patients baseline and decreased 6 weeks after non-surgical therapy to the levels comparable to periodontally healthy subjects. ($p < 0.01$) Levels of miR-146a were higher in PHDM compared to PH patients (ANOVA test, Kruskal-Wallis test). MiR-146a and miR-155 may be considered as possible novel biomarkers for periodontitis in nondiabetic and type 2 diabetic patients.

Key words: miR-146-a, miR-155, epigenetic modulators, periodontitis, diabetes mellitus type 2, SOD, matrix metalloproteinases

Scientific field: Dentistry

Specific topic: Periodontology

UDC number: 577.21:616.311.2-002(043.3)

Skraćenice

3'UTR- 3' netranslatirajući region (eng. *3'untranslated region*, 3'UTR)

AGEs- krajnji proizvodi uznapredovale glikozilacije (eng. *advanced glycation end products*, AGEs)

AGO2- argonaut 2 (eng. *Argonaute-2*)

AP-1- eng. *Activator protein-1*

BMI- indeks telesne mase (eng. *body mass index*)

cDNK- komplementarna DNK

DGCR8- eng. *DiGeorge Syndrome critical region gene 8*, DGCR8

DM- dijabetes melitus (eng. *diabetes mellitus*)

DNK- dezoksiribonukleinska kiselina

FADD- eng. *Fas-associated death domain*

GLUT4- transporter glukoze 4 (eng. *glucose transporter type 4*)

HbA1c- glikozilirani hemoglobin (eng. *glycated hemoglobin*)

HIV- virus humane imunodeficijencije (eng. *human immunodeficiency virus*)

IKKε- eng. *Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit epsilon*

IL-1β- interleukin 1 beta (eng. *interleukin 1 beta*)

IRAK-1- eng. *interleukin-1 receptor-associated kinase 1*

iRNK- informaciona ribonukleinska kiselina (eng. *mRNA*)

LPS- lipopolisaharid

miRNK- mikro ribonukleinska kiselina, mikro RNK (eng. *microRNA*)

MMPs- matriksne metaloproteinaze (eng. *matrix metalloproteinases*)

MPC- eng. *microprocesor complex- MPC*

MyD88- eng. *myeloid differentiation primary response gene 88*

NADPH- redukovani nikotin amid adenin dinukleotid fosfat dehidrogenaza (eng. *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*)

NF- κ B- eng. *nuclear factor kappa beta*

PACT- eng. *protein activator of PKR kinase*

PGE₂- prostaglandin E₂

PRPs- eng. *Pattern Recognition Receptors*

qRT-PCR- lančana reakcija polimeraze kojoj prethodi reverzna transkripcija, u realnom vremenu (eng. *real-time quantitative reverse transcriptase- polymerase chain reaction*)

RAGE- receptor za krajnje proizvode uznapredovale glikozilacije (eng. *receptor for advanced glycation end-products*)

RISC- eng. *RNA-induced silencing complex, RISC*

ROS- reaktivne kiseonične vrste (eng. *reactive oxygen species*)

SASP- (eng. *senescence-associated secretory phenotype*)

SHIP-1 eng. *SH2 domain-containing inositol-5'-phosphatase-1*

SOCS- eng. *Suppressor of cytokine signaling*

SOD- superoskid dizmutaza

TAB1- eng. *TAK1-binding protein 1*

TAB2- eng. *TAK1-binding protein 2*

TAK1- eng. *transforming growth factor beta-activated kinase 1*

TIMP- tkivni inhibitori matriksnih metaloproteinaza (eng. *tissue inhibitors of matrix metalloproteinases*)

TLRs- eng. *toll-like receptors*

TNF α - tumorski faktor nekroze alfa

TRAF-6- receptor tumorskog faktora nekroze 6

TRBP- eng. *HIV-1 transactivation response RNA-binding protein*

TRIF- eng. *TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β*

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Parodontopatije.....	1
1.1.1. Klasifikacija parodontopatija.....	4
1.1.1.1. Savremena klasifikacija parodontopatija.....	6
1.1.2. Gingivalna tečnost kao dijagnostički medijum.....	8
1.1.2.1. Metode za uzorkovanje gingivalne tečnosti.....	10
1.1.3. Faktori rizika za nastanak parodontopatije.....	12
1.2. Dijabetes melitus kao faktor rizika za parodontopatiju.....	14
1.2.1. Oksidativni stres u parodontopatiji i dijabetes melitusu	17
1.3. Epigenetički mehanizmi u regulaciji parodontopatije i dijabetes melitusa.....	21
1.3.1. Mikro RNK (miRNK).....	24
1.3.2. Ekstraćelijske, cirkulatorne miRNK.....	27
1.3.3. MiRNK-146a i miRNK-155.....	29
2. CILJEVI.....	34
3. MATERIJAL I METODE.....	36
3.1. Selekcija pacijenata.....	36
3.2. Klinički parametri za procenu stanja parodoncijuma.....	38
3.3. Uzimanje uzoraka gingivalne tečnosti.....	40
3.4. Određivanje koncentracije MMP-9 u gingivalnoj tečnosti imunoesejskom metodom (ELISA).....	42
3.5. Kvantitativno određivanje aktivnosti enzima SOD-e spektrofotometrijskom metodom.....	43
3.6. Izolacija miRNK.....	43

3.7.	Merenje ekspresije miRNK.....	44
3.8.	Lančana reakcija polimeraze kojoj prethodi reverzna transkripcija korišćenjem prajmera sa petljom (Stem-Loop RT-PCR).....	45
3.9.	Statistička obrada podataka.....	47
3.10.	<i>In silico</i> analiza predikcije ciljnih gena miRNK-e.....	48
4.	REZULTATI.....	49
4.1.	Demografske karakteristike ispitanika.....	49
4.2.	Klinički parametri za procenu stanja parodontijuma.....	50
4.3.	Rezultati analize nivoa ekspresije molekula miRNK-146a.....	55
4.3.1.	Nivoi ekspresije molekula miRNK-146a u grupama sistemski zdravih ispitanika i obolelih od DM tipa 2 sa zdravim parodontijumom	55
4.3.2.	Nivoi ekspresije molekula miRNK-146a u ZDM grupi i HPDM grupi pre terapije.....	55
4.3.3.	Nivoi ekspresije miRNK-146a u HP grupi pre terapije i Z grupi.....	56
4.3.4.	Nivoi ekspresije molekula miRNK-146a u grupama HP i HPDM pre, u odnosu na nivoe ekspresije molekula miRNK-146a nakon kauzalne terapije.....	57
4.3.5.	Nivoi ekspresije molekula miRNK-146a u HP grupi i HPDM grupi pre kauzalne terapije.....	58
4.3.6.	Nivoi ekspresije molekula miRNK-146a u HP grupi i HPDM grupi nakon kauzalne terapije.....	59
4.4.	Rezultati analize nivoa ekspresije molekula miRNK-155.....	60
4.4.1.	Nivoi ekspresije molekula miRNK-155a u Z i ZDM grupi.....	60
4.4.2.	Nivoi ekspresije molekula miRNK-155 u ZDM grupi i u HPDM grupi pre terapije.....	61
4.4.3.	Nivoi ekspresije molekula miRNK-155 u HP grupi pre terapije i Z grupi.....	62

4.4.4.	Nivoi ekspresije molekula miRNK-155 u grupama HP i HPDM pre i posle kauzalne terapije parodontopatije	62
4.4.5.	Nivoi ekspresije molekula miRNK-155 u HP grupi i HPDM grupi pre kauzalne terapije.....	64
4.4.6.	Nivoi ekspresije molekula miRNK-155 u HP i HPDM grupi nakon kauzalne terapije.....	65
4.5.	Aktivnost enzima SOD-e.....	66
4.6.	Koncentracija enzima MMP-9.....	67
4.7.	Povezanost ekspresije miRNK-146a i miRNK-155 sa aktivnošću enzima SOD-e, sa koncentracijom MMP-9, kao i sa kliničkim parametrima parodontopatije	69
4.7.1.	Rezultati analize povezanosti ekspresije molekula miRNK-146a i miRNK-155 u HP i HPDM grupama pre i posle terapije.....	73
4.7.2.	Rezultati analize povezanosti aktivnosti enzima SOD-e i nivoa ekspresije molekula miRNK-146a u HP i HPDM grupama pre i posle terapije.....	74
4.7.3.	Rezultati analize povezanosti aktivnosti enzima SOD-e i nivoa ekspresije molekula miRNK-155 u HP i HPDM grupama pre i posle terapije.....	76
4.7.4.	Rezultati analize povezanosti koncentracije molekula MMP-9 i nivoa ekspresije molekula miRNK-146a u HP i HPDM grupama pre i posle terapije	77
4.7.5.	Rezultati analize povezanosti koncentracije molekula MMP-9 i nivoa ekspresije molekula miRNK-155 u HP i HPDM grupama pre i posle terapije	79
4.7.6.	Rezultati analize povezanosti vrednosti dubine sondiranja i nivoa ekspresije molekula miRNK-146a u HP i HPDM grupama pre i posle terapije	80
4.7.7.	Rezultati analize povezanosti vrednosti dubine sondiranja i nivoa ekspresije molekula miRNK-155 u HP i HPDM grupama pre i posle terapije	82
4.7.8.	Rezultati analize povezanosti vrednosti dubine sondiranja i aktivnosti enzima SOD u HP i HPDM grupama pre i posle terapije	83
4.7.9.	Rezultati analize povezanosti vrednosti dubine sondiranja i koncentracije molekula MMP-9 u HP i HPDM grupama pre i posle terapije	85

4.7.10. Rezultati analize povezanosti vrednosti nivoa pripojnog epitela i nivoa ekspresije molekula miRNK-146a u HP i HPDM grupama pre i posle terapije	86
4.7.11. Rezultati analize povezanosti vrednosti nivoa pripojnog epitela i nivoa ekspresije molekula miRNK-155 u HP i HPDM grupama pre i posle terapije	88
4.7.12. Rezultati analize povezanosti vrednosti nivoa pripojnog epitela i aktivnosti enzima SOD-e u HP i HPDM grupama pre i posle terapije.....	89
4.7.13. Rezultati analize povezanosti vrednosti nivoa pripojnog epitela i koncentracije molekula MMP-9 u HP i HPDM grupama pre i posle terapije.....	91
4.8. Rezultati multiple linearne regresije.....	92
4.9. Dijagnostička moć molekula miRNK-146a i miRNK-155.....	94
4.10. Rezultati <i>in silico</i> analize.....	97
5. DISKUSIJA.....	98
6. ZAKLJUČCI ISTRAŽIVANJA.....	107
7. LITERATURA.....	109

1. UVOD

1.1. Parodontopatije

Parodontopatija je hronično, multifaktorijalno, inflamatorno oboljenje potpornog aparata zuba, uzrokovano mikroorganizmima iz dentalnog biofilma (parodontopatogenima) u okviru kojeg mikrobná disbioza dovodi do hroničnog i destruktivnog inflamatornog odgovora tkiva domaćina (Jepsen i sar., 2017). Ovo oboljenje karakteriše progresivna destrukcija potpornog aparata zuba zahvatajući sva tkiva parodontocijuma: gingivu, cement korena zuba, periodoncijum i alveolarnu kost. Parodontopatije se smatraju jednim od najrasprostranjenijih oboljenja u humanoj populaciji.

Mnoga epidemiološka istraživanja su pokazala da je najzastupljenija klinička forma parodontopatije hronična parodontopatija. Karakteriše se sporim i postepenim gubitkom potpornog aparata zuba. U odnosu na stepen destrukcije parodontalnih tkiva hronična parodontopatija je klasifikovana na: blagu (1-2mm gubitak tkiva), umerenu (3-4mm gubitak tkiva) i uznapredovalu formu (≥ 5 mm gubitak tkiva) (Armitage, 2004). Od uznapredovale forme ovog oboljenja boluje više od 10% odrasle populacije (Kassebaum i sar., 2014, Eke i sar., 2015). Nasuprot ovoj kliničkoj formi, agresivne parodontopatije karakteriše brz i obiman gubitak parodontalnih tkiva. Mogu se javiti u lokalizovanoj ili generalizovanoj formi. Najčešće se javljaju u ranom detinjstvu, mada se agresivni karakter u destrukciji parodontalnih tkiva može manifestovati u bilo kom uzrastu (Armitage, 2004).

Parodontopatija nastaje kao posledica kompleksne interakcije između mikroorganizama dentalnog plaka i imuno-inflamatornog odgovora tkiva domaćina (Ebersole i sar., 2017). Klinički se karakteriše neprestanom smenom perioda aktivnosti oboljenja i perioda remisije. Stoga, ukoliko se na vreme ne leči, od blage inflamacije oboljenje napreduje do veoma ozbiljne destrukcije potpornog aparata zuba. Mikroorganizmi dentalnog plaka, njihovi toksini, enzimi i metaboliti, su glavni etiološki faktor oboljenja parodontocijuma, bez čijeg prisutva bolest ne može nastati (Meyle i Chapple, 2015). Mikroorganizmi oslobađaju različite supstance, specifične komponente bakterija (lipopolisaharid – LPS, lipoteihoičnu kiselinu, ekstraćelijske vezikule, enzime: kolagenaze,

proteinaze, hijaluronidaze i leukotoksin) koje direktno oštećuju ćelije i tkiva domaćina. Sa druge strane, aktiviranjem endogenih ćelijskih i humoralnih inflamatornih sistema i međusobne interakcije mehanizama urođenog i stečenog imuniteta, takođe se narušava integritet parodontcijuma (Knight i sar., 2016).

Zajedno sa mikroorganizmima dentalnog plaka, koji su glavni etiološki faktor u nastanku parodontopatije, na patogenetski tok utiču i akcesorni etiološki faktori. Akcesorni etiološki faktori u nastanku parodontopatije mogu biti lokalni i opšti. U lokalne akcesorne faktore ubrajaju se: druge naslage na zubima (čvrste: zubni kamenac, subgingivalni konkrementi i zubne pigmentacije, kao i meke: materija alba i ostatci hrane), jatrogeni faktori, impakcija hrane, loše navike, morfološka i anatomska odstupanja mekog i koštanog tkiva kao i ostali lokalni faktori. Jedan od najznačajnijih lokalnih etioloških faktora je i traumatska okluzija. Opšti akcesorni etiološki faktori utiču na smanjenje otpornosti parodontcijuma prema delovanju mikroorganizama dentalnog plaka. U opšte akcesorne etiološke faktore se ubrajaju nutritivni faktori, endokrine bolesti, krvne bolesti, imunološki poremećaji i drugi. U etiopatogenezi parodontopatija je značajan fenomen sinergizma delovanja glavnog i akcesornih etioloških faktora.

Manifestacija i progresija oboljenja potpornog aparata zuba (gingivitisi i parodontopatije) umnogome je determinisana prirodom urođenog i stečenog imunskog odgovora na prisustvo i dejstvo bakterijskih kompleksa iz dentalnog biofilma. Patofiziološki ključnim ćelijskim i molekularnim putevima dolazi do aktivacije različitih tkivnih proteinaza, među kojima posebno značajno mesto zauzimaju matriksne metaloproteinaze (Meyle i Chapple, 2015).

Matriksne metaloproteinaze (MMP) su porodica endopeptidaza koje učestvuju u degradaciji molekula ekstraćelijskog matriksa, poput kolagena, gelatina i elastina, kao i u degradaciji bazalne membrane. MMP svoju ulogu imaju i u drugim fiziološkim i ćelijskim mehanizmima: remodelaciji, reparaciji i regeneraciji tkiva kroz mehanizme regulacije rasta ćelije, inflamacije i angiogeneze (Sorsa i sar., 2004). Izlučuju ih različite vrste ćelija: neutrofilni granulociti, makrofagi, fibroblasti, epitelne ćelije, plazma ćelije, osteoblasti i osteoklasti.

MMP su svrstane u nekoliko različitih grupa: kolagenaze (MMP-8), gelatinaze/tip IV kolagenaze (MMP-9), stromelizine, matrilizine, metaloproteinaze membranskog tipa i druge grupe (Sorsa i sar., 2004). Izlučene u latentnim (inaktivnim) formama mogu biti aktivirane proteazama poreklom od bakterija ili inflamatornim medijatorima (TNF- α , interleukin-1 β), kao i slobodnim

kiseoničnim radikalima. Sve navedeno se smatra indirektnim mehanizmom tkivne destrukcije koji se javlja tokom patogeneze parodontopatije (Hardy i sar., 2012). MMP svojim delovanjem dovode do destrukcije marginalnih periodontalnih vlakana, kao i apikalne migracije pripojnog epitela. Na ovaj način je mikroorganizimima dentalnog plaka omogućeno širenje u apikalnom pravcu, duž površine korena zuba. MMP su inhibirane od strane proteaznih inhibitora, velikih proteina krvne plazme kao što su glikoprotein α 1- antitripsin i α 2 - makroglobulin. Najznačajniji tkivni inhibitori MMP-a su proteini iz familije TIMP (eng. *tissue inhibitors of metalloproteinases*), produkovani od strane mnogih ćelija (Li i sar., 2018).

MMP-9 pripada grupi gelatinaza, izlučena najčešće od strane neutrofilnih granulocita, vrši denaturaciju intersticijalnog kolagena, gelatina, laminina, elastina, fibronektina, osteonektina, plazminogena kao i kolagena tip IV, V, VII, X i XIV. Procena nivoa ove gelatinaze u gingivalnoj tečnosti tokom aktivne faze inflamacije parodontalnih tkiva efikasno prikazuje stepen patološke degradacije kolagena i može biti od dijagnostičkog značaja (Chen i sar., 2000).

Do nedavno postavljanje dijagnoze i klasifikacija parodontopatija su se bazirale na konvencionalnoj kliničkoj proceni stanja parodontalnih tkiva kao što su merenje dubine parodontalnih džepova (sondiranjem graduisanom parodontalnom sondom), merenje akumulacije dentalnog plaka, procena krvarenja na provokaciju parodontalnom sondom i radiografskom procenom gubitka alveolarne kosti. Procena ovih kliničkih parametara uglavnom zavisi od iskustva i veštine stomatologa, što može voditi ka subjektivnoj oceni stanja potpornih zubnih tkiva. "Idealna dijagnoza" ne bi trebalo da bude bazirana isključivo na detekciji i beleženju kliničkih parametara u momentu pregleda, već i na drugim kliničkim, biohemijskim i mikrobiološkim parametrima koji bi vodili ka preciznijoj prognozi i proceni progresije oboljenja. Stoga poslednjih 15 godina intenzivno se istražuju alternativne dijagnostičke metode, bazirane na objektivnim, kvantitativnim merenjima koja bi doprinela preciznijoj proceni stanja parodontalnih tkiva.

Pored toga što dovodi do oštećenja svih parodontalnih tkiva, mnogim studijama je pokazano da je parodontopatija povezana sa nekim sistemskim oboljenjima i da ima uticaja na njih, uključujući kardiovaskularna oboljenja (Belstrom i sar., 2012), dijabetes melitus (Zhou i sar., 2015), reumatoidni artritis (de Pablo i sar., 2009), gojaznost (Suvan i sar., 2011) i osteoporozu (Martinez-Maestre i sar., 2010).

1.1.1. Klasifikacija parodontopatija

Prema staroj, internacionalno prihvaćenoj klasifikaciji, (Armitage, 2004) parodontopatija je podeljena na:

- I. Hronična parodontopatija (ranije sporonapredujuća parodontopatija ili parodontopatija odraslih) (**Slika 1.2.**)
 - 1. Lokalizovana
 - 2. Generalizovana
- II. Agresivna parodontopatija (ranije juvenilna parodontopatija) (**Slika 1.3.**)
 - 1. Lokalizovana
 - 2. Generalizovana
- III. Parodontopatija udružena sa sistemskim oboljenjima
- IV. Ulceronekrozna parodontopatija
- V. Parodontalni abscesi



Slika 1.1. Zdrav parodoncijum



Slika 1.2. Hronična generalizovana parodontopatija



Slika 1.3. Lokalizovana agresivna parodontopatija

1.1.1.1. Savremena klasifikacija parodontopatija (Papapanou i sar., 2018)

Poslednje dve decenije prethodna klasifikacija parodontalnih oboljenja i stanja (Armitage, 2004), je veoma uspešno primenjivana kako u kliničkom radu, tako i u domenu naučnih istraživanja u parodontologiji. Međutim, zbog mnogobrojnih nedostataka, nejasnih razlika u patofiziološkim mehanizmima među pojedinim kliničkim formama parodontopatije, kao i dijagnostičke nepreciznosti, Evropska Federacija za parodontologiju i Američka Akademija za parodontologiju su revidirale prethodnu klasifikaciju uz implementaciju novih saznanja o epidemiologiji, etiologiji i patogenezi oboljenja parodontalnih tkiva.

Prema poslednjoj, internacionalno prihvaćenoj klasifikaciji (Papapanou i sar., 2018) parodontopatije se dele na:

1. Parodontopatije

- a. Stadijumi (bazirani na uznapređovalosti oboljenja i kompleksnosti lečenja)
 - Step 1, inicijalni stadijum
 - Step 2, manifestni stadijum
 - Step 3, uznapređovali ili terminalni stadijum, sa povećanom verovatnoćom daljeg gubitka zuba
 - Step 4, uznapređovali ili terminalni stadijum, sa povećanom verovatnoćom gubitka svih zuba
- b. Obim i distribucija (lokalizovana forma, generalizovana forma, molari-sekutići forma)
- c. Step progresije (bazirano na brzini napredovanja oboljenja i očekivanom odgovoru na primenjenu terapiju)
 - Step/Gradus A, spora stopa napredovanja
 - Step/Gradus B, umerena stopa napredovanja
 - Step/Gradus C, brza stopa napredovanja

2. Nekrozna parodontalna oboljenja
 - Nekrozni gingivitis
 - Nekrozna parodontopatija
 - Nekrozni stomatitis
3. Parodontopatije kao manifestacija sistemskih oboljenja

Podaci iz najsavremenije naučne literature ukazuju na to da ne postoje specifične fenotipske karakteristike koje su jedinstvene za parodontopatiju kod obolelih od dijabetes melitusa (Jepsen i sar., 2018). Na osnovu ovih podataka, dijabetes melitus udružen sa parodontopatijom se ne smatra posebnim kliničkim entitetom. Naime, dijabetes melitus se smatra veoma bitnim modifikujućim faktorom za nastanak parodontopatije, stoga prilikom postavljanja dijagnoze parodontopatije veoma treba voditi računa o glikemijskom statusu pacijenata. Vodeći se najnovijom kalsifikacijom parodontalnih oboljenja (Papapanou i sar., 2018, Tonetti i sar., 2018) kontrola glikemije kod obolelih od dijabetes melitusa utiče na brzinu napredovanja parodontopatije i očekivani odgovor domaćina na primenjenu terapiju.

1.1.2. Gingivalna tečnost kao dijagnostički medijum

Gingivalna tečnost je fiziološka tečnost, odnosno inflamatorni eksudat u slučajevima inflamacije gingive, koji nastaje iz spleta krvnih sudova u krznu gingive, lokalizovanog neposredno ispod pripojnog epitela. Predstavlja refleksiju sastojaka krvnog seruma kao i ćelijskog odgovora i događaja tokom patoloških procesa u parodontalnim tkivima (produkti tkivne destrukcije, mnogobrojni medijatori inflamacije, antitela) (Barros i sar., 2016). Ova tečnost je poznata još od devetnaestog veka, ali se o njenom sastavu i mogućoj ulozi u patogenezi parodontopatije malo više zna od pedesetih godina dvadesetog veka.

Danas je veoma dobro poznato da se sastav gingivalne tečnosti obolelih od hronične parodontopatije razlikuje u odnosu na sastav gingivalne tečnosti individua sa zdravim parodontcijumom. Naime, razlike su evidentne kako u vrsti mikrobiološke flore, tako i u koncentraciji pojedinih molekularnih biomarkera (Barros i sar., 2016). Navedene razlike ukazuju na to da se gingivalna tečnost može koristiti kao pouzdan dijagnostički medijum za prikaz dinamike patogenetskih promena u parodontcijumu kako na ćelijskom, tako i na molekularnom nivou.

Analiza sastojaka gingivalne tečnosti zauzima značajnu ulogu u istraživanju patofiziologije oboljenja parodontcijuma. Korišćenje gingivalne tečnosti kao dijagnostičkog medijuma koji daje informacije o stanju kako mekih, tako i tvrdih tkiva parodontcijuma, smatra se najneinvazivnijom metodom (Majeed i sar., 2016). Kao lako dostupan medijum, veoma često je bio korišćen u potrazi za potencijalnim dijagnostičkim biomarkerima oboljenja parodontcijuma (Loos i Tjoa, 2005). Takođe, gingivalna tečnost se može koristiti i za analizu biomarkera sistemskih oboljenja i stanja, uključujući i dijabetes melitus (Sakallioğlu i sar., 2008).

Količina gingivalne tečnosti koja može biti prikupljena je najčešće mala. U prisustvu inflamacije parodontalnih tkiva količina gingivalne tečnosti je povećana. Takođe, njena količina raste žvakanjem čvrste hrane, intenzivnim četkanjem zuba, tokom ovulacije, trudnoće, uzimanja kontraceptivnih medikamenata i kod pušača. Produkcija gingivalne tečnosti je povećana u jutarnjim satima, između 6h-10h, nakon čega se smanjuje. Istraživanja različitih autora su pokazala

da se vrednosti zapremine gingivalne tečnosti kreću od 0,43 - 1,56 μ l u zavisnosti od stepena inflamacije gingive (Wassall i Preshaw, 2016).

Do danas više od 90 različitih komponenata je pronađeno i istraživano u gingivalnoj tečnosti kako poreklom od tkiva domaćina, tako i poreklom od mikroorganizama (Loos i Tjoa, 2005). Gingivalna tečnost sadrži supstance iz krvnog seruma: organske komponente (ugljene hidrate, proteine), specifična antitela, antigene, enzime, elektrolite (natrijum, kalijum, kalcijum i druge) kao i lokalno prisutne medijatore inflamacije i produkte destrukcije tkiva. U gingivalnoj tečnosti su prisutni i različiti ćelijski elementi (deskvamirane epitelne ćelije, bakterije, leukociti: polimorfonuklearne ćelije, limfociti, monociti/makrofagi) i komponente bakterijskih ćelija.

MMP, kao veoma značajna grupa endopeptidaza, zadužena za destrukciju kolagena tokom aktivne faze destrukcije parodontalnih tkiva su dokazane i merene u gingivalnoj tečnosti (Marcaccini i sar., 2010). Brojne studije su pokazale da povećan nivo MMP u gingivalnoj tečnosti, pljuvački i tkivu gingive predstavlja inflamatorne markere progresije parodontopatije (Sorsa i sar., 2004, Uitto i sar., 2003, Mantyla i sar., 2003). Klinička istraživanja su pokazala da nivo MMP-a značajno raste u parodontalnim tkivima pacijenata sa dijabetes melitusom, što nepovoljno utiče na tok i ishod parodontopatije. Naime, u istraživanju Kumar i saradnika je pokazano da značajno povećani nivoi MMP-8 i MMP-9 u gingivi pacijenata sa parodontopatijom udruženom sa dijabetes melitusom, predstavljaju značajan faktor smanjene regeneracije parodontalnih tkiva (Kumar i sar., 2006).

1.1.2.1. Metode za uzorkovanje gingivalne tečnosti

Postoje tri velike grupe metoda za uzorkovanje gingivalne tečnosti:

- Unutarsulkusna tehnika pranja
- Mikrokapilarna tehnika, upotrebom mikrokapilarnih pipeta poznate zapremine (Pradeep i sar., 2009)
- Apsorpcione tehnike, podeljene na unutarsulkusne i vanslukusne tehnike. Kod unutarsulkusnih tehnika, standardizovani papirni ulošci (Periopaper[®], Pro-Flow Corp., Amityville, NY, USA) se postavljaju u gingivalni sulkus, gingivalni džep ili parodontalni džep. U zavisnosti od primenjene tehnike, papirni ulošci se postavljaju ili na sam ulaz u sulkus ili do prvog otpora (Griffiths, 2003). Nakon vađenja iz parodontalnog prostora se meri volumen uzorkovanog fluida primenom aparata (Periotron 6000, ProFlow) (**Slika 1.4.**).



Slika 1.4. Apsorpciona tehnika uzorkovanja gingivalne tečnosti i merenje količine gingivalne tečnosti upotrebom Perotron® aparata. Preuzeto iz (Barros i sar., 2016)

1.1.3. Faktori rizika za nastanak parodontopatije

Prisustvo specifičnih bakterija, dijabetes melitus i pušenje se izdvajaju kao najznačajniji modifikujući faktori i faktori rizika za nastanak parodontopatije (Knight i sar., 2016). Oni ispoljavaju svoje efekte na fiziološki i inflamatorni odgovor tkiva domaćina, vaskularni i imunski sistem i utiču na tkivnu regeneraciju i reparaciju. Svojim dejstvom imaju potencijal da modifikuju podložnost oboljenju, mikrobiološki sastav dentalnog plaka, kliničku manifestaciju parodontalnih oboljenja, progresiju oboljenja i odgovor na terapiju (Knight i sar., 2016).

Faktori rizika su podeljeni na: nepromenljive (nemodifikujuće) i promenljive (modifikujuće - stečene ili faktore ponašanja). U nepromenljive faktore se svrstavaju: starost, pol, rasa/etnička pripadnost, genski polimorfizmi, dok se u promenljive faktore svrstavaju pušenje, dijabetes melitus, gojaznost, osteopenija/osteoporoza, HIV infekcija, psihosocijalni faktori kao i prisustvo specifičnih mikroorganizama.

U uslovima homeostaze postoji jasna i konstantna interakcija između imunskog sistema, mikroorganizama i načina života (odsustvo pušenja, kontrola stresa i dijetetski režim). Ova interakcija u velikoj meri je regulisana genima (Schaefer, 2018). Naime, geni kodiraju za određene imunske receptore i molekule i na taj način menjaju podložnost i osetljivost domaćina na pojedine mikroorganizme dentalnog plaka.

Dobro je poznato da pušenje, kao faktor rizika, izaziva pojavu mnogih hroničnih oboljenja. Pušenje je jedan od najznačajnijih faktora rizika za nastanak parodontopatije, utičući na povećanu prevalenciju, stepen i težinu oštećenja tkiva parodoncijuma (Nociti i sar., 2015). Pušači pokazuju 2,6 - 6 puta veći rizik za nastanak parodontopatije kao i slabiji odgovor tkiva na primenjenu terapiju (Heitz-Mayfield, 2005). Efekat pušenja se na tkivu domaćina odražava kao hronična redukcija krvnog protoka, oslabljena funkcija neutrofilnih granulocita, smanjena produkcija citokina i faktora rasta, inhibicija rasta i funkcije fibroblasta i smanjena produkcija kolagena (Goncalves i sar., 2011). Pušenje uzrokuje oksidativna oštećenja neutrofilnih granulocita kao prve linije odbrane tkiva parodoncijuma, dovodeći do stvaranja veće količine reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS, eng. *reactive oxygen species*) i posledično do nastanka oksidativnog stresa (Agnihotri i sar., 2009).

Pokazana je uska povezanost parodontopatije i drugih sličnih, u osnovi inflamatornih sistemskih oboljenja, kao što su metabolički sindrom (Kaye i sar., 2016), ishemijska bolest srca (Ryden i sar., 2016, Tonetti i sar., 2013) i dijabetes melitus (Gurav i Jadhav, 2011).

Savremene studije iz oblasti patofiziologije parodontopatije, bazirane na istraživanju specifičnih mehanizama na unutarćelijskom i molekularnom nivou, pokazuju multifaktorijalne biološke interakcije u specifičnim tkivnim fenotipovima (Meyle i Chapple, 2015, Ebersole i sar., 2017). Primenom novih kliničkih i bioloških parametara, kojima bi se bolje definisao tkivni fenotip, unapredila bi se prevencija oboljenja, kontrola oboljenja kao i terapija različitih kliničkih formi parodontopatija (Slots, 2017).

1.2. Diabetes melitus kao faktor rizika za parodontopatiju

Dijabetes melitus (DM) je globalno, epidemijsko oboljenje. Definiše se kao progresivni, metabolički poremećaj kompleksne etiologije koji karakteriše neadekvatna regulacija endokrinih i metaboličkih puteva zaduženih za regulaciju nivoa glukoze u krvi, što posledično vodi ka hroničnoj hiperglikemiji. Bolest karakteriše i poremećaj metabolizma ugljenih hidrata, masti i proteina koji nastaju kao posledica poremećaja sekrecije i/ili aktivnosti insulina.

Broj obolelih od dijabetesa progresivno raste. Procenjuje se da je više od pola miliona dece do 14 godina obolelo od DM tipa 1. Takođe je poznato je da danas 415 miliona odraslih od 20 - 79 godina starosti živi sa dijabetesom, kao i da postoji 193 miliona nedijagnostikovanih slučajeva. Prema procenama stručnjaka se očekuje da će do 2040. godine broj obolelih prelaziti 642 miliona (Međunarodna federacija obolelih od dijabetesa, eng. *International Diabetes Federation (IDF, 2015.)*).

Danas je aktuelna etiološka klasifikacija dijabetesa kojom su razdvojeni tipovi dijabetesa prema patogenetskim mehanizmima nastanka u 4 osnovne kategorije: tip 1 (ranije “insulin zavisni”), tip 2 (ranije “insulin nezavisni”), drugi specifični oblici dijabetesa i gestacijski dijabetes.

Kod obolelih od DM tipa 1 (5-10%) je prisutna destrukcija β ćelija Langerhansovih ostrvaca pankreasa, koja vodi potpunom nedostatku insulinske sekrecije. Tačan uzrok nije potpuno jasan, ali se smatra da je najverovatnije autoimunog porekla. Najčešće se dijagnostikuje kod dece, adolescenata i mlađih osoba.

DM tip 2 se može rangirati od dominantne insulinske rezistencije do dominantnog deficita sekrecije insulina, koji je udružen sa insulinskom rezistencijom, kao i povećanom produkcijom glukoze u jetri. DM tip 2 je najzastupljenija forma dijabetes melitusa. Njegova zastupljenost se kreće od 90-95%. Najčešće se javlja kod gojaznih osoba i može biti kontrolisan higijensko-dijetetskim režimom i oralnim hipoglikemicima.

Prema poslednjim važećim preporukama Svetske zdravstvene organizacije i IDF-a, određivanje glikemije iz venskog uzorka plazme i dalje ostaje osnova testiranja nivoa glukoze i treba da bude standardni metod za određivanje i saopštavanje nalaza. Prema preporukama Svetske

zdravstvene organizacije oralni test opterećenja glukozom je potrebno primeniti kod osoba sa glikemijom natašte između 6.1 - 6.9 mmol/l radi određivanja stanja glukozne tolerancije.

Međunarodni eksperstki komitet Američke asocijacije za dijabetes (ADA), Evropske asocijacije za istraživanja o dijabetesu (EASD) i Međunarodne federacije (IDF), su uvrstili HbA1c kao kriterijum i za postavljanje dijagnoze DM. Glikozilirani hemoglobin (HbA1c) odražava prosečnu vrednost glikemije u plazmi tokom prethodna 2-3 meseca u jednom merenju, koje može biti sprovedeno bilo kada u toku dana i ne zahteva posebne pripreme uključujući i stanje gladovanja. HbA1c kao pouzdana mera hronične hiperglikemije, predstavlja stepen izloženosti hiperglikemiji tokom vremena i smatra se dobrim biohemijskim markerom DM-a i dobrim dijagnostičkim markerom. Prema ovim preporukama, predložena vrednost HbA1c od 6,5%, se smatra kao dovoljno senzitivna i specifična da može predstaviti graničnu vrednost za postavljanje dijagnoze DM-a. Vrednosti glikoziliranog hemoglobina od 5,7 - 6,4% ukazuju na povećan rizik od nastanka dijabetesa - stanje nazvano predijabetes.

Kao posledica hronične hiperglikemije će doći do razvoja i nastanka komplikacija koje izaziva DM: mikroangiopatije (retinopatija, nefropatija, neuropatija), makroangiopatije (periferna, kardiovaskularna i cerebrovaskularna) i otežano zarastanja rana. Pored ovih, parodontopatija je prepoznata kao komplikacija DM-a (Löe, 1993). Pokazano je da i DM tip 1 i tip 2 imaju štetne efekte na parodontcijum (Persson i sar., 2003) i da su oba tip DM-a faktori rizika za nastanak parodontopatije (Knight i sar., 2016). Takođe je pokazana značajno veća prevalencija i uznapredovalost parodontopatije kod obolelih od DM-a (Löe, 1993).

Mnogi autori DM i parodontopatiju posmatraju kao dva međusobno veoma povezana oboljenja (Polak i Shapira, 2018). Naime je pokazano da DM predstavlja jedan od najznačajnijih faktora rizika u nastanku parodontopatije, kao i da parodontopatija utiče na kontrolu glikemije obolelih od DM-a doprinoseći bržem razvoju komplikacija dijabetesa (Mealey i Oates, 2006). Neke studije pokazuju pozitivan efekat terapije parodontopatije na regulisanje glikemije kod obolelih od DM-a (Noor i sar., 2015, Sima i Glogauer, 2013, Teeuw i sar., 2010). Takođe je pokazano da je kod obolelih od uznapredovale forme parodontopatije značajno povišen nivo serumskog HbA1c, kako kod obolelih od DM-a, tako i kod sistemski zdravih ispitanika (Borgnakke i sar., 2013). Rezultati studija su pokazali smanjenje vrednosti serumskog HbA1c tri meseca nakon inicijalne faze lečenja parodontopatije (Chapple i sar., 2013, Friedewald i sar., 2009). Podaci iz literature ukazuju na

povećan rizik od razvoja i nastanka DM tipa 2 kod osoba obolelih od uznapredovalih formi parodontopatija (Morita i sar., 2012, Saito i sar., 2004).

Smatra se da se u osnovi patofiziološkog mehanizma, kojim DM utiče na kliničku sliku i progresiju parodontopatije, nalaze inflamacija i oksidativni stres. Pokazano je da DM povećava inflamaciju u parodontocijumu što za posledicu ima prisustvo većeg broja proinflamatornih molekula kao što su TNF- α , PGE₂ i IL-1 β (Preshaw, 2012, Salvi i sar., 1997). Na povećanu podložnost inflamaciji i infekciji parodontalnih tkiva kod obolelih od DM-a utiče i neadekvatna funkcija polimorfonuklearnih leukocita koja se ogleda u smanjenoj hemotaksi, defektnoj fagocitozi i adherenciji kao i u naglašenom odgovoru monocita i makrofaga (Taylor i sar., 2013). Hronična hiperglikemija utiče na sintezu, funkciju i sazrevanje kolagena kao i na održavanje kolagena i komponenata ekstracelularnog matriksa, direktno utičući na integritet parodontalnih tkiva (Southerland i sar., 2006). Kod obolelih od DM tipa 2 je uočena povećana ekspresija enzima zaduženih za razgradnju vezivnog tkiva i međucelijske supstance u inflamiranoj gingivi. Naime, odnos između enzima MMP-a i njihovih tkivnih inhibitora je narušen (Bastos i sar., 2017).

U stanjima hiperglikemije dolazi do povećane produkcije krajnjih produkata glikozilacije (*AGEs- advanced glycation end-products*). Pokazano je da AGEs sa svojim receptorima RAGE (eng. *receptor for advanced glycation end-products*) učestvuju u indukciji mehanizama oksidativnog stresa i inflamacije kao i da imaju uticaj na vaskularne komplikacije tokom DM-a (Chawla i sar., 2014). Mnogi molekuli, među kojima su proteini, masti i ugljeni hidrati, podležu procesima glikozilacije. U studiji Zizzi i saradnika, je dokazan značajno povećan nivo AGEs kod obolelih od DM-a, kao i statistički značajna korelacija između vrednosti nivoa ekspresije AGEs u tkivu gingive (kako u površinskim slojevima epitela, tako i u endotelnim ćelijama krvnih sudova gingive i fibroblastima) i dužine trajanja DM-a (Zizzi i sar., 2013). Vezivanje glukoze, AGEs i oksidisanih lipoproteina male gustine za njihove komplementarne receptore na ćelijskoj membrani neutrofilnih granulocita, dovodi do povećanja lokalnog inflamatornog odgovora tkiva domaćina. Ovakav hiperinflamatorni ćelijski odgovor vodi bržoj destrukciji parodontalnih tkiva (Sonnenschein i Meyle, 2015).

Sa druge strane, nivo glukoze u gingivalnoj tečnosti i krvi je veći kod osoba obolelih od DM-a, što dovodi do promena u sastavu i dinamici mikrobiološke flore, utičući na tok i progresiju oboljenja parodontocijuma (Polak i Shapira, 2018)

1.2.1. Oksidativni stres u parodontopatiji i dijabetes melitusu

Oksidativni stres predstavlja narušenu ravnotežu između stvaranja slobodnih kiseoničnih i nitrozoradikala i mehanizama antioksidativne zaštite. Kada se poveća aktivnost i koncentracija ROS i/ili se redukuje antioksidativna odbrana dolazi do oksidativnog stresa (Chapple i Matthews, 2007, Sies, 1997).

ROS predstavljaju visoko reaktivne molekule koje luče ćelije urođenog imunskog odgovora: neutrofilni granulocit i makrofagi. Imaju veoma kratak životni vek i nisu pravi slobodni radikali, ali ove reaktivne susptance su sposobne za formiranje radikala u ćelijskom i vanćelijskom okruženju. Produkuju se kao rezultat normalnog metabolizma kiseonika i učestvuju u fiziološkom ćelijskom metabolizmu i ćelijskoj signalizaciji (Lushchak, 2014).

Nasuprot svojoj ulozi u fiziološkim uslovima i stanjima, ROS se izlučuju i tokom inflamacije u tkivima parodoncijuma. U prvim fazama imuno-inflamatornog odgovora tkiva domaćina na dejstvo parodontopatogena iz oralnog biofilma, neutrofilni granulociti predstavljaju najmnogobrojnije inflamatorne ćelije u gingivalnom sulkusu i tkivu gingive. Takođe imaju veoma značajnu ulogu i u prvoj liniji odbrane, urođenom imunskom odgovoru. Neutrofilni granulociti ujedno predstavljaju i najveći izvor ROS tokom patogeneze parodontopatije (Miyasaki, 1991.). Naime u toku fagocitoze, posredstvom enzima NADPH, neutrofili oslobađaju velike količine superoksidnih anjona. Ovaj mehanizam se naziva „oksidativni prasak ili oksidativna eksplozija“ (Chapple i Matthews, 2007). ROS produkovane u visokim koncentracijama mogu uzrokovati oštećenja parodontalnih tkiva putem mnogobrojnih mehanizama kao što su oštećenje DNK, lipidna peroksidacija, oštećenje proteina, oksidacija enzima (Chapple i Matthews, 2007). Isto tako, kao medijatori inflamacije, učestvuju u oslobađanju proinflamatornih citokina od strane monocita i makrofaga (Allen i sar., 2011, Akalin i sar., 2008). ROS mogu uticati na stimulaciju mnogobrojnih gena koji kodiraju za različite transkripcione faktore. Utiču i na diferencijaciju, razviće kao i na stimulaciju različitih međućelijskih signalnih puteva zaduženih za vazoregulaciju, proliferaciju fibroblasta i povećanu ekspresiju antioksidativnih enzima (Gomes i sar., 2012). Među najznačajnijim ROS su superoksidni anjon i hidrogen peroksid, dok su najznačajniji nitrozativni molekuli azot monoksid i peroksinitrit (Chapple i Matthews, 2007).

U studijama White i saradnika i Ling i saradnika pokazana je povećana aktivnost i produkcija ROS od strane neutrofilnih granulocita iz periferne krvi ispitanika sa parodontopatijom u odnosu na ispitanike sa zdravim parodontijumom (Phillips i sar., 2014, Ling i sar., 2016). Slične rezultate su pokazale i druge studije, ukazujući na postojanje hiperreaktivnog fenotipa neutrofilnih granulocita stimulisanih putem Fc γ R receptora (eng. *Fc-gamma receptor*) kod obolelih od parodontopatije (Gustafsson i sar., 2006, Matthews i sar., 2007a). Takođe je pokazano da i bez bilo kakve stimulacije, neutrofili granulociti kod obolelih od parodontopatije u odnosu na osobe sa zdravim parodontijumom, oslobađaju mnogo više ROS (Matthews i sar., 2007a, Ling i sar., 2016). U studiji Matthews i saradnika je pokazan uticaj terapije parodontopatije na smanjenje produkcije ROS od strane neutrofilnih granulocita. Naime, ova studija je ukazala da podjednako i konstitutivni i reaktivni mehanizmi utiču na hiperreaktivnost neutrofilnih granulocita kod obolelih od parodontopatije (Matthews i sar., 2007b). Rezultati mnogih *in vitro* studija nesumnjivo ukazuju na činjenicu da, pored neutrofilnih granulocita i druge ćelije u parodontalnim tkivima (monociti, gingivalni fibroblasti i ćelije periodoncijuma) stimulisane od strane parodontopatogena, pokazuju povećanu produkciju ROS (Chang i sar., 2013, Golz i sar., 2014).

Sistem antioksidativne zaštite obuhvata enzime, preventivne antioksidanse koji suprimiraju stvaranje slobodnih radikala (superoksid dizmutaza - SOD, katalaza, glutation peroksidaza i glutation reduktaza) i neenzimske komponente (redukovani glutation, mokraćna kiselina, vitamin A, C, E, albumini i bilirubin). U fiziološkim uslovima antioksidansi efikasno neutrališu dejstvo ROS i na taj način sprečavaju dalja tkivna oštećenja.

SOD je antioksidativni enzim koji neutrališe superoksidne anjone, odnosno kiseonične radikale koji se oslobađaju tokom inflamatornog odgovora i izazivaju oštećenje vezivnog tkiva, prevodeći ih u molekularni kiseonik i vodonik peroksid (Faraci i Didion, 2004). Ovaj enzim se oslobađa kao homeostatski, zaštitni mehanizam ćelija i tkiva i može se naći i unutar ćelije i van ćelije. Postoje tri tipa ovoga enzima: SOD1 – bakar i cink zavisni enzimi u citoplazmi, SOD2 - mangan zavisni enzim u mitohondrijama i SOD3 - ekstracelularni enzim (Mates i sar., 1999). Svaki od ove tri vrste enzima je produkt različitih gena (Zelko i sar., 2002).

Enzim SOD je otkriven u tkivu periodoncijuma i predstavlja važan odbrambeni mehanizam gingivalnih fibroblasta od prekomerno produkovanih superoksidnih anjona (Akalin i sar., 2008).

U studiji Ellis i saradnika je pokazano da nivo aktivnosti enzima SOD-a u tkivu humane gingive opada sa povećanjem dubine sondiranja parodontalnih džepova (Ellis i sar., 1998). Statistički značajna negativna korelacija između vrednosti nivoa aktivnosti enzima SOD-a i vrednosti kliničkih parametara parodontopatije je pokazana u studiji Trivedi i saradnika (Trivedi i sar., 2014). Mnogim studijama su pokazani povećani nivoi aktivnosti enzima SOD-a kod obolelih od parodontopatije u odnosu na osobe sa zdravim parodontcijumom, kao i pozitivni efekat terapije obolelih od parodontopatije na smanjenje nivoa aktivnosti enzima SOD-a (Panjamurthy i sar., 2005, Novakovic i sar., 2014).

Oksidativni stres ima veoma značajnu ulogu u nastanku i razvoju mnogih mikrovaskularnih i makrovaskularnih komplikacija DM-a (Negre-Salvayre i sar., 2009). U patofiziologiji oštećenja tkiva parodontcijuma oksidativni stres se navodi kao ključni mehanizam, koji nastaje kao posledica uzajamnog dejstva tkiva domaćina i mikroorganizama. Takođe, kliničke i eksperimentalne studije su pokazale veoma značajnu ulogu mehanizama oksidativnog stresa kao patofiziološkog mehanizma u progresiji parodontopatije udružene sa DM-om (Wang i sar., 2017, Bullon i sar., 2009).

Mnogi modifikujući faktori rizika kao što su DM i pušenje mogu uticati na promene u produkciji ROS i na nivo aktivnosti antioksidativnih enzima kod obolelih od parodontopatije. Rezultati studije Wang i saradnika ukazuju na povećanu ekspresiju enzima SOD-a u tkivima obolelih od DM-a, te je tako pokazana njegova uloga u neutralizaciji dejstva prekomerno produkovanih ROS (Wang i sar., 2011).

U svojoj studiji Reznick i saradnici su analizirali parametre oksidativnog stresa u serumu i pljuvački kod 20 ispitanika obolelih od DM tipa 1 i 12 sistemski zdravih ispitanika (kontrolna grupa) (Reznick i sar., 2006). Rezultati ove studije su pokazali povećane vrednosti koncentracije mokraćne kiseline i totalnog antioksidativnog kapaciteta u uzorcima nestimulisane pljuvačke u grupi obolelih od DM tipa 1 u odnosu na kontrolnu grupu. Rezultati studije Ben-Zvi i saradnika su pokazali povećane vrednosti parametara oksidativnog stresa (mokraćna kiselina, peroksidaza, SOD i totalni antioksidativni kapacitet) u serumu i pljuvački u grupi ispitanika obolelih od DM-a (Ben-Zvi i sar., 2007). Takođe je pokazano da se redoks potencijal pljuvačke kod obolelih od DM-a razlikuje od redoks potencijala pljuvačke sistemski zdravih ispitanika (Zloczower i sar., 2007). Guemues i saradnici su u svojoj studiji poredili vrednosti koncentracija redukovano glutaciona u

pljuvački kod ispitanika podeljenih u tri grupe: oboleli od DM tipa 1, oboleli od DM tipa 2, dok su kontrolnu grupu činili sistemski zdravi ispitanici. Rezultati ove studije ukazuju na niže vrednosti koncentracija redukovanog glutaciona u grupi ispitanika obolelih od DM tipa 1 u odnosu na druge dve grupe. Šta više u obe grupe ispitanika obolelih od DM-a je pokazana pozitivna korelacija između vrednosti koncentracija redukovanog glutaciona i vrednosti dubine sondiranja, kao i pozitivna korelacija između totalnog antioksidativnog kapaciteta i protoka pljuvačke (Gumus i sar., 2009).

Povećane vrednosti koncentracije malondialdehida, kao produkta lipidne peroksidacije u plazmi i gingivalnoj tečnosti, su pokazane kod obolelih od DM-a i mogu imati uticaja na izmene u inflamatornom odgovoru u tkivima (Bastos i sar., 2012). Isti autori su pokazali statistički značajnu korelaciju između markera lipidne peroksidacije i kliničkih parametara parodontopatije, ukazujući na njihovu veoma značajnu međusobnu povezanost. U studiji Trivedi i saradnika su pokazane povećane vrednosti nivoa malondialdehida u obe grupe ispitanika obolelih od hronične parodontopatije (sistemski zdravih i obolelih od DM-a) u odnosu na ispitanike sa zdravim parodontacijumom (Trivedi i sar., 2014). Međutim, nije pokazana statistički značajna razlika u vrednostima nivoa malondialdehida između sistemskih zdravih ispitanika i ispitanika sa DM-om, obolelih od hronične parodontopatije, ($p > 0.05$). Isti autori su pokazali da postoji značajna razlika u nivoima aktivnosti enzima SOD-e u pljuvački između grupe obolelih od DM-a u odnosu na sistemski zdrave ispitanike sa hroničnom parodontopatijom (Trivedi i sar., 2014). Rezultati studije Monea i saradnika ukazuju da kod obolelih od DM tipa 2, pored povećanih vrednosti nivoa malondialdehida, su prisutne i smanjene vrednosti glutaciona u parodontalnim tkivima (Monea i sar., 2014). Takođe, kod obolelih od DM-a je pokazan povećan nivo aktivnosti enzima SOD-e i povećana ekspresija gena SOD1 u gingivalnim tkivima obolelih od parodontopatije (Akalin i sar., 2008, Duarte i sar., 2012).

1.3. Epigenetički mehanizmi u regulaciji parodontopatije i dijabetes melitusa

Epigenetičke promene (epigenetička osobina ili epigenetičko svojstvo) su nasledne promene genske ekspresije bez promena u hromozomu ili izmena u DNK sekvenci (Berger i sar., 2009).

Smatra se da epigenetički faktori predstavljaju vezu između genetičkih faktora i faktora spoljašnje sredine. Pored dobro poznate genetske predispozicije, faktori spoljašnje sredine i nutritivni status, svojim dejstvom na epigenetičke mehanizme mogu uticati na rast, razvoj i diferencijaciju ćelija i tkiva kao i na povećanu podložnost mnogim multifaktorijskim oboljenjima poput DM-a (Reddy and Natarajan, 2011) i parodontopatije (Ling i Groop, 2009, Keating i sar., 2016, Martins i sar., 2016, Larsson i sar., 2015).

Za razliku od humanog genoma, koji je tokom čitavog života i u svim ćelijama organizma isti, humani epigenom je dinamičan i razlikuje se među pojedinim ćelijama i tkivima. Epigenom se tokom života menja kao odgovor na intracelularne i ekstracelularne događaje, a takođe i delovanjem faktora iz spoljašnje sredine (Larsson i sar., 2015).

U epigenetičke mehanizme se ubrajaju: metilacija DNK, posttranslaciona modifikacija histona i remodelacija hromatina kao i genska regulacija posredovana malim nekodirajućim RNK molekulima (Kaikkonen i sar., 2011).

Metilacija DNK je jedan od najzastupljenijih i najstabilnijih epigenetičkih mehanizama. Ovim mehanizmom se modifikuje pristupačnost genskim promotorima, vezivanjem metil grupe za 5' poziciju citozinskih ostataka pomoću enzima DNK metiltransferaze i tako se stišava transkripcija. Nasuprot ovom procesu, demetilacija DNK najčešće aktivira transkripciju (Ito i Kuraoka, 2015). Metilacija DNK, kao jedan od epigenetičkih mehanizama, je veoma značajan u mnogim ćelijskim procesima i razviću (Miranda i Jones, 2007), a takođe i u kancerogenezi (Ramassone i sar., 2018).

Modifikacija histona podrazumeva acetilaciju, metilaciju, fosforilaciju, ubikvitinaciju i sumoilaciju specifičnih aminokiselinskih ostataka histona. Tako dolazi do kondenzacije hromatina i posledično do aktivacije gena, utišavanja gena ili oba procesa istovremeno. Krajnji efekat modifikacije histona zavisi od toga koji su se specifične ostaci metilisali i od broja dodatih metil grupa.

U prethodne dve decenije studije na malim, nekodirajućim RNK molekulima, posebno mikro RNK, su u konstantnom porastu. Ovi molekuli učestvuju u epigenetičkoj regulaciji genske ekspresije više gena istovremeno. Ovi mehanizmi su potencijalno reverzibilni i prolazni.

Pretpostvalja se da se epigenetičke promene dešavaju lokalno, u regiji gingivalnog sulkusa, na spoju gingive i dentalnog biofilma i da se epigenetičke promene razlikuju između inflamiranog i zdravog tkiva parodonticijuma (Larsson i sar., 2015, Barros i Offenbacher, 2014). Sama infekcija i inflamatorni odgovor tkiva domaćina mogu izazvati promene u epigenomu i tako uticati na podložnost parodontopatiji. Naime je pokazano da oralni patogeni, kao što su bakterije *Porphyromonas gingivalis* i *Fusobacterium nucleatum* mogu indukovati acetilaciju histona u kulturi ćelija humanih oralnih keratinocita (Martins i sar., 2016). Ova studija ukazuje na kompleksnu međusobnu povezanost epigenetičkih mehanizama, pojedinih receptora koji prepoznaju mikroorganizme i inflamatornog odgovora tkiva domaćina. U studiji Benakanakere i saradnici su pokazali da u tkivu gingive miša, koja je stimulirana bakterijom *Porphyromonas gingivalis*, dolazi do povećane metilacije DNK. Naime, rezultati ove studije ukazuju da metilacija DNK TLR2 menja mehanizme imunskog odgovora tkiva domaćina i vodi ka povećanoj podložnosti parodontopatiji (Benakanakere i sar., 2015).

Rizik od kardiovaskularnih oboljenja i DM-a raste sa godinama i poznato je da je starenje povezano sa hipometilacijom genomske DNK. U stanjima hiperglikemije je pokazano da transkripcioni faktor Pdx1 stimuliše ekspresiju insulina preko koaktivatora p300 i HMT SET7/9, koji posledično povećavaju acetilaciju histona i H3K4me2 i stvaranje otvorenog hromatina na insulinskom promotoru (Chakrabarti i sar., 2003). Opsežna klinička i epidemiološka istraživanja su pokazala da do komplikacija DM-a dolazi i u uslovima dobro regulisane glikemije, te da inicijalna hiperglikemija može izazvati progresiju oboljenja i kasne komplikacije i uprkos kasnijoj dobroj regulaciji glikemije. Ovaj fenomen je nazvan „metabolička memorija” (Hill i Fisher, 2010). Ovim fenomenom mogu biti pogođeni različiti tipovi ćelija: endotelne, imunske, ćelije glatkog mišića i fibroblasti. U metaboličku memoriju su uključeni različiti mehanizmi: povećana produkcija AGEs, prekomerna ekspresija AGEs receptora, povećana produkcija superoksidnog anjona, glikozilacija mitohondrijalnih proteina, oštećenja mitohondrijalne DNK, aktivacija protein kinase C i drugi (Ceriello, 2012). Pretpostavlja se da su epigenetičke promene, kao što su posttranslaciona modifikacija histona i metilacija DNK, uključene u mehanizme metaboličke

memorije i da mogu biti odgovorne za trajne promene u genskoj ekspresiji koje su povezane sa komplikacijama DM-a (Reddy i sar., 2015). Takođe hiperglikemija može izazvati niz epigenetičkih promena, koje perzistiraju i nakon normalizacije glikemije (Reddy i sar., 2015). Pretpostavlja se da su i nekodirajuće mikroRNK, verovatno uključene u mehanizme metaboličke memorije (Zhong i sar., 2015).

1.3.1. Mikro RNK (miRNK)

MiRNK je familija malih nekodirajućih regulatornih RNK molekula (19 - 24 nukleotida (nt)) koja inhibira početak translacije iRNK u proteine ili indukuje degradaciju iRNK (Bartel, 2004). Osnovna funkcija im je u regulaciji ekspresije gena procesom RNK interferencije. RNK interferencija je proces kojim mali molekuli RNK utišavaju gene na posttranskripcionom nivou, vezivanjem za ciljne iRNK sa kojima imaju određen stepen komplementarnosti. Utišavanje gena miRNK ostvaruju na tri načina: degradacijom komplementarne iRNK, blokiranjem njene translacije i modifikacijom histona u sekvenci jedarne DNK, u kojoj se nalazi gen sa koga se eksprimira komplementarna iRNK (Bartel, 2009).

Prva otkrivena miRNK je *lin-4* 1993. godine kod vrste *Caenorhabditis elegans*. Sedam godina kasnije 2000. godine je otkrivena druga miRNK, *let-7* kod iste vrste. Prvi put naziv „mikro RNK“ dobija 2001. godine (Ranjha i Paul, 2013). MiRNK učestvuju u procesu utišavanja gena kod biljaka, životinja i čoveka već 400 miliona godina. Do trenutka pisanja ove disertacije je registrovano da humani genom kodira više od 2600 zrelih miRNK kod čoveka (<http://mirbase.org/>). Interesantno je da svaka od ovih miRNK može imati afinitet prema više gena i regulisti nekoliko gena istovremeno, kao i da jedan gen može biti regulisan od strane nekoliko različitih miRNK. Tako su ovi mali molekuli nekodirajućih miRNK uključeni u finu regulaciju skoro svakog biološkog procesa. Danas se smatraju veoma značajnim potencijalnim biomarkerom mnogobrojnih oboljenja, kao što su kardiovaskularna, (Barwari i sar., 2016), DM (Sebastiani i sar., 2017), parodontopatija (Ogata i sar., 2014), tumori (Park i sar., 2009) i mnoga druga.

Biogeneza, sazrevanje, funkcija i sekrecija molekula miRNK su veoma kompleksni molekularni mehanizmi koji još uvek nisu u potpunosti razjašnjeni (Bartel, 2004).

MiRNK geni su najčešće transkribovani RNK polimerazom II (Lee i sar., 2004) ili RNK polimerazom III (Borchert i sar., 2006). Kao posledica nastaje primarna miRNK (dugačka nekoliko stotina do hiljadu nukleotida), koja ima karakterističnu „*stem-loop*“ strukturu. Ona je zatim isečena od strane Rnaze III - „Drosha“ u mali „*hairpin-like*“, prekursor miRNK (~60 nukleotida) (Lee i sar., 2003).

MiRNK negativno reguliše ekspresiju proteina vezujući se za 3'UTR ciljne iRNK-e. Ako postoji komplementarnost između miRNK i 3'UTR iRNK-e doći će do degradacije iRNK-e. Ako postoji samo parcijalna komplementarnost sa 3'UTR iRNK-e doći će do inhibicije translacije. Neke studije ukazuju na uticaj miRNK na 5'UTR regulišući DNK metilaciju i modifikaciju histona. Postaje potpuno jasno da miRNK ne reguliše samo gensku ekspresiju na postranskripcionom nivou, već i na transkripcionom nivou modifikujući hromatin (Ranjha i Paul, 2013).

MiRNK predstavlja približno 1-2% eukariotskog transkriptoma i učestvuje u esencijalnim procesima kao što su: razviće, ćelijska diferencijacija, proliferacija, apoptoza, kontrola ćelijskog ciklusa, metabolizma i u inflamatornim procesima i kancerogenezi. Kod sisara specifične miRNK povezane su sa procesima hematopoeze, adipocitne diferencijacije, sekrecije insulina, razvojem mozga i diferencijacijom neurona. Pokazano je da jedna miRNK može da zaustavi sintezu i do 200 proteina, odnosno da reguliše ekspresiju i po nekoliko stotina gena (Carbonell i sar., 2012, Satoh, 2012). Kompleksna mreža miRNK i ciljnih iRNK-a naziva se "targetom" (eng. "targetome") (Satoh, 2012).

Podaci iz literature pokazuju veoma značajnu ulogu miRNK-e u fenotipskom utišavanju kao i proliferaciji i migraciji endotelih ćelija i ćelija glatkih mišića u intimi malih krvnih sudova, a takođe imaju uticaj i na produkciju, migraciju i ekspresiju mnogih adhezivnih molekula, angiogenih faktora rasta i transkripcionih faktora u endotelnim ćelijama (Urbich i sar., 2008). Isto tako u studiji Xiao i Rajewsky je pokazana uloga miRNK-a u ćelijama imunskog odgovora, monocitima i makrofagima u regulaciji inflamacije, oksidativnog stresa, imunske funkcije i diferencijacije (Xiao i Rajewsky, 2009).

Između miRNK-a i inflamatornih molekula postoji recipročni regulatorni uticaj - ne samo da miRNK negativno utiču na ekspresiju proinflamatornih gena i tako utiču na stvaranje citokina, već i citokini utiču na ekspresiju miRNK-a (Andersen i sar., 2014).

Otkrićem malih nekodirajućih molekula RNK-a, mikro RNK-a, zaduženih za gensku regulaciju u okviru epigenetičkih mehanizama, sve više se istražuje njihova povezanost i umešanost u patogenetski tok mnogih hroničnih inflamatornih oboljenja među kojima su i DM i parodontopatija (Feng i sar., 2016).

Pojava DM tip 2 je najčešće uzrokovana kombinacijom genetičkih i epigenetičkih faktora (Sommese i sar., 2017). Sve veći broj podataka u studijama humanog genoma ukazuje na postojanje više od 80 različitih genskih lokusa za DM tipa 2 (Imamura i sar., 2016). Naime, rezultati studije van de Bunt i saradnika ukazuju da su mnogobrojni genski lokusi targeti pojedinih miRNK-a, ukazujući na njihovu ulogu u patofiziologiji DM-a (van de Bunt i sar., 2013). Takođe, rezultati nekoliko studija ukazuju na ulogu miRNK-a u patogenezi DM-a (Muhonen i Holthofer, 2009, Gallagher i sar., 2010, Hashimoto i Tanaka, 2017). Pokazana je i ključna regulatorna uloga mnogih miRNK-a: miRNK-146, miRNK-21, miRNK-375 (Poy i sar., 2004) u početku i razvoju DM-a, kao i uloga ovih miRNK-a u sklonosti organizma ka DM-u (Gong i sar., 2014). Dokazano je da utiču na funkciju β ćelija pankreasa, na njihov razvoj i diferencijaciju, a isto tako i na sekreciju insulina i na insulinsku rezistenciju (Chen i sar., 2014). Takođe je pokazan izuzetan značaj cirkulatornih miRNK-146a, miRNK-155, miRNK-31 u regulaciji homeostaze glukoze u jetri, masnom tkivu i mišićima (Guay i Regazzi, 2013).

1.3.2. Ekstraćelijske, cirkulatorne miRNK

Dugi niz godina se smatralo da miRNK, kao regulatori genske ekspresije, svoju funkciju mogu ostvariti isključivo intracelularno. U mnogobrojnim studijama poslednjih desetak godina je otkriveno da ekstraćelijske, cirkulatorne miRNK-e mogu da kruže krvotokom i da se nađu u telesnim tečnostima, gde su za razliku od drugih vrsta RNK-a poput informacionih (iRNK), veoma stabilne i zadržavaju biološku funkciju. U ovako stabilnom obliku mogu poslužiti kao biomarkeri patološkog stanja koje izaziva promene u njihovoj ekspresiji (Tijsen i sar., 2012, Gupta i sar., 2010). Njihovi jedinstveni obrasci ekspresije, stabilnost u cirkulaciji i neinvazivnost tokom detekcije, čine ih biomarkerima budućnosti za dijagnozu i prognozu kardiovaskularnih oboljenja, (de Gonzalo-Calvo i sar., 2017) DM tipa 2 (Rome, 2013) i mnogih malignih oboljenja (Xie i sar., 2013b).

Cirkulatorne miRNK (u serumu, plazmi, pljuvački, nosnom sekretu, urinu, mleku i drugim telesnim tečnostima) se sekretuju različitim mehanizmima: aktivnom sekrecijom egzozoma, koji su porekla multivezikularnih telašaca, putem apoptotičnih tela, a isto tako i pasivnim transportom vezane za miRNK-vezujuće proteine. Svoju stabilnost od dejstva enzima RNA-za, ekstracelularno zadržavaju inkorporirane u mikrovezikulama, egzozomima, egzozomima sličnim vezikulama, apoptotskim telima, kao i formiranjem stabilnog kompleksa protein-miRNK (Chen i sar., 2012). Stoga zbog svoje stabilnosti i specifične funkcije imaju prednost nad drugim biomarkerima kao što su proteini ili bakterijski produkti (Kim i sar., 2015).

Cirkulatorne miRNK predstavljaju novi mehanizam međućelijske komunikacije koji još uvek nije dovoljno istražen. Svoje dejstvo mogu ostvariti kao intracelularni signalni molekuli, ali i kao međućelijski transdukcionni signali.

U poslednjoj deceniji je dokazano i opisano prisustvo cirkulatornih miRNK-a u različitim telesnim tečnostima: amnionskoj, cerebrospinalnoj, peritonealnoj, bronhialnoj, semenoj, tečnosti plućne maramice, kao i u krvnoj plazmi, pljuvački, mleku, kolostrumu, suzama i mokraći (Weber i sar., 2010).

Smatra se da cirkulatorne miRNK-e u cirkulaciji (serumu) doprinose normalnom funkcionisanju cirkulatornog i imunskog sistema (Gautam i sar., 2016) i mogu se koristiti kao potencijalni biomarkeri mnogih patoloških stanja i oboljenja (Reid i sar., 2011).

Mnoge studije su pokazale prisustvo cirkulatornih miRNK-a i u pljuvački, kompleksnom fluidu sekretovanom od strane tri para velikih i 450-750 malih pljuvačnih žlezda (jezičnih, žlezda obrazne sluzokože, tvrdog i mekog nepca i gingive) (Xie i sar., 2013b, Xie i sar., 2015, Zahran i sar., 2015). Njihova uloga, kao potencijalnih neinvazivnih biomarkera u pljuvački, za detekciju oralnih karcinoma je predmet istraživanja mnogih studija. MiRNK-21 (Zhang i sar., 2012), miRNK-145 (Akao i sar., 2007) i miRNK-184 (Liu i sar., 2011) su istraživane kao potencijalni biomarkeri iz pljuvačke brojnih malignih lezija, dok su miRNK-140 (Kai i sar., 2014), miRNK-155 (Shi i sar., 2015) i miRNK-146a (Palmieri i sar., 2014) povezivane sa oralnim skvamocelularnim karcinomom.

U novijoj literaturi termin "*salivaomics*" prvi put se javlja 2008. godine i prikazuje brz i rapidan razvoj znanja o različitim komponentama pljuvačke. On predstavlja različite biološke molekule u pljuvački podeljenih u pet grupa: metabolomi, mikrobiomi, proteomi, transkriptomi i miRNK. Pronalaskom ovih bioloških molekula ("*salivaomics*") je omogućeno istraživačima da otkriju, razviju i potvrde značaj biomarkera za rano otkrivanje oboljenja, njihovu predikciju, terapiju i prognostičku procenu (Wong, 2012, Kaczor-Urbanowicz i sar., 2017, Tasoulas i sar., 2016).

1.3.3. *MiRNK-146a i miRNK-155*

U regulaciju urođenog imunskog odgovora su uključene različite miRNK-e koje mogu inhibirati ili stimulisati inflamatorne procese, najčešće regulacijom NF- κ B signalnog puta.

Tokom patogeneze parodontopatije urođeni imunitet i ćelije urođenog imuniteta predstavljaju prvu liniju odbrane protiv patogena uglavnom putem specifičnih receptora - PRPs (*Pattern Recognition Receptors*). Veoma značajna porodica ovih receptora, uključena u patogenezu parodontopatije, su TLR: TLR-2 i TLR-4 (Sanz i sar., 2011). Ovi receptori prepoznaju mikroorganizme i njihove komponente iz dentalnog biofilma, uključujući lipopolisaharide bakterija *Porphiromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* i drugih *Gram-negativnih* vrsta, na taj način aktivirajući različite signalne puteve. Ovako se pokreću imunski i inflamatorni odgovori koji rezultiraju eliminacijom patogena uz pokretanje druge linije odbrane, stečenog imuniteta (Sanz i sar., 2011).

TLR-4 je najčešća grupa receptora koja prepoznaje bakterijski lipopolisaharid. TLR signalni put se odigrava posredstvom mnogobrojnih TLR adaptorskih proteina (MyD88 porodica) i TRIF. Oni aktiviraju signalne transdukcijske puteve, koji dovode do aktivacije transkripcionog faktora NF- κ B i drugih transkripcionih faktora, kao što je AP-1 (Akira i Takeda, 2004). Optimalna produkcija proinflamatornih medijatora je ključna za kontrolisanje infekcije i inflamacije. Međutim, nekontrolisana produkcija istih, preko TLR signalnog puta, može dovesti do oštećenja tkiva i pojave septičnog šoka. Inflamatorni odgovor mora biti veoma precizno regulisan, te se poslednjih godina mnogo pažnje pridaje istraživanju i pronalaženju novih, finih regulatora (*"fine-tuners"*) inflamacije, kao što su nekodirajuće miRNK-e (Quinn i O'Neill, 2011). Naime, danas se zna da su miRNK-e uključene u regulaciju veoma kompleksne mreže sazrevanja, proliferacije, diferencijacije i aktivacije ćelija urođenog i stečenog imunskog sistema (Fitzgerald i Caffrey, 2014).

Centralno mesto u TLR signalnom putu čine miRNK-146a, miRNK-155, (Schulte i sar., 2013) i miRNK-21 (Quinn i O'Neill, 2011).

Hsa-miR-146a je locirana na drugom egzonu LOC285628 gena na hromozomu 5. Dosadašnja istraživanja su pokazala da je ova miRNK uključena u imunske procese, inflamaciju i virusne infekcije regulišući ekspresiju različitih ciljnih gena uključenih u inflamaciju (Li i sar., 2010).

Podaci iz savremene naučne literature ukazuju na to da su istraživanja uloge malih nekodirajućih molekula miRNK i njihov značaj u patogenezi parodontopatije u velikom porastu (Irwandi i Vacharaksa, 2016, Keschull i Papapanou, 2015). Rezultati mnogih studija ukazuju na značajne razlike u profilima ekspresije molekula miRNK u inflamiranim parodontalnim tkivima u odnosu na zdrava tkiva potpornog aparata zuba (Lee i sar., 2011, Xie i sar., 2011, Ogata i sar., 2014, Stoecklin-Wasmer i sar., 2012).

U studiji Taganov i saradnika je pokazana značajna uloga miRNK-146a u TLR signalnom putu. Pronašli su da je indukcija transkripcije miRNK-146a pod dejstvom lipopolisaharida, TNF α , IL-1 β zavisna od proinflamatornog transkripcionog faktora NF- κ B (Taganov i sar., 2006). Stimulacija TLR4 je okidač za jedarnu translokaciju NF- κ B, rezultujući tako aktivacijom transkripcije NF- κ B ciljnih gena, koji kodiraju za medijatore inflamacije, citokine, proteine akutne faze i mnoge enzime.

Xie i saradnici su u svojoj studiji pokazali veoma značajnu ulogu miRNK-146a i miRNK-155 u imuno-inflamatornom odgovoru u tkivu gingive (Xie i sar., 2011). Uzimanjem isečaka tkiva gingive biopsijom kod deset ispitanika sa zdravim parodontijumom i deset ispitanika obolelih od hronične parodontopatije je vršena izolacija molekula RNK-e, a zatim softverska analiza nivoa ekspresije profila različitih miRNK-a. Pokazana je značajno veća ekspresija molekula miRNK-146a i miRNK-155 u isečcima tkiva gingive obolelih od hronične parodontopatije u odnosu na isečke tkiva gingive ispitanika sa zdravim parodontijumom. Upotrebom dve kompjuterske metode, Targetscan i MicroRNA.org je pokazano da miRNK-146a kao potencijalne ciljne molekule koristi iRNK-u gena koji kodiraju za receptore TRAF-6 i IRAK-1, preko MyD88-zavisne kaskade (Xie i sar., 2014, Xie i sar., 2011). Naime, u eksperimentanoj studiji Xie i saradnici, na kulturi ćelija humanih gingivalnih fibroblasta, nakon stimulacije lipopolisaharidom porekla bakterije *Porphyromonas gingivalis*, su pokazali da inhibicija miRNK-146a dovodi povećanja vrednosti koncentracija proinflamatornih citokina IL-1 β , IL-6 i TNF- α putem aktivacije IRAK-1 (Xie i sar., 2014). MiRNK-146a inhibira ekspresiju IRAK-1 direktnim vezivanjem za

3'UTR IRAK-1. Ovi podaci ukazuju da miRNK-146a ima ulogu u finoj regulaciji imunskog odgovora tokom patogeneze parodontopatije.

Takođe, rezultati studije Jiang i saradnika su pokazali da miRNK-146a ima ulogu u finoj regulaciji inflamacije, stišavajući sekreciju proinflamatornih citokina blokiranjem TLR signalnog puta nakon stimulacije humanih ćelija periodoncijuma lipopolisaharidom porekla bakterije *Porphyromonas gingivalis* (Jiang i sar., 2015). Naime je pokazana značajno veća aktivnost molekula TLR2 i TLR4, transkripcionog faktora NF κ B kao i značajno veći nivo ekspresije miRNK-146a nakon stimulacije humanih ćelija periodoncijuma lipopolisaharidom u odnosu na aktivnost ovih molekula pre stimulacije. Hung i saradnici su u svojoj eksperimentalnoj studiji na kulturi ćelija periodontalnog ligamenta pokazali da miRNK-146a indukuje diferencijaciju ovih ćelija stišavajući transkripciju preko NF- κ B (Hung i sar., 2010).

U studiji Motedayyen i saradnika, uzimanjem uzoraka tkiva gingive biopsijom kod 10 ispitanika sa zdravim parodoncijumom i 20 ispitanika obolelih od hronične parodontopatije, su pokazani povećani nivoi ekspresije molekula miRNK-146a, zajedno sa smanjenim vrednostima proinflamatornih citokina TNF- α i IL-6 kod obolelih od hronične parodontopatije u odnosu na grupu ispitanika sa zdravim parodoncijumom. Takođe je pokazana i pozitivna korelacija između nivoa ekspresije molekula miRNK-146a sa drugim kliničkim parametrima hronične parodontopatije (dubina sondiranja i nivo pripojnog epitela) (Motedayyen i sar., 2015).

Visoka ekspresija miRNK-146a je pokazana u mnogim inflamatornim oboljenjima kao što su osteoartritis i reumatoidni artritis, (Nakasa i sar., 2008) kao i u onkogenezi (Bhaumik i sar., 2008).

MiRNK-155 je mala nekodirajuća RNK jedna od najčešće ispitivanih "onco- miR". Kao prva onkogeni miRNK, danas zauzima centralno mesto u istraživanju kao potencijalni biomarker i promoter mnogih vrsta B-ćelijskih limfoma, naročito Hodžkin limfoma (Eis i sar., 2005). Ova miRNK je izražena u mnogim ćelijama imunskog odgovora: B ćelijama, T ćelijama, makrofagima, dendritičnim ćelijama i u populaciji progenitornih stem ćelija. MiRNK-155 kao potencijalne ciljne molekule koristi iRNK-u gena koji kodiraju za receptore TAK1, TAB1, TAB2, aktivirajući tako IKK i MAPK puteve, što rezultira jedarnom translokacijom NF- κ B i transkripcionog faktora AP1 (Ceppi i sar., 2009). Zajedno NF- κ B i AP1 indukuju ekspresiju najznačajnijih proinflamatornih citokina. Još jedan potencijalni ciljni molekul miRNK-155 je iRNK gena koji kodira za receptor IKK ϵ , povezan sa transkripcionim faktorom IRF3/7, zaduženim za stimulaciju produkcije

interferona 1 (Liang i sar., 2011). Takođe je pokazana i njena uloga u mehanizmima preživljavanja gingivalnih epitelnih ćelija inficiranih bakterijom *Porphyromonas gingivalis*, preko fosfoinozitol 3-kinaza/Akt signalnog puta (Yilmaz i sar., 2004).

Korišćenjem standardizovanih miRNK PCR poredaka, Lee i saradnici u svojoj studiji su pokazali povećane profile ekspresije različitih molekula miRNK između inflamiranih i zdravih parodontalnih tkiva (Lee i sar., 2011). U svojoj studiji Xie i saradnici, primenom miRCURYTM poretka, su pokazali povećanje u profilima ekspresije veće od dva puta kod 91 različite miRNK-e, kao i smanjenje od tri do četiri puta u profilima ekspresije druge 34 miRNK-e u inflamiranom tkivu gingive u odnosu na zdravu gingivu (Xie i sar., 2011). Rezultati studija Ogata i saradnika i Stoecklin-Wasmer i saradnika na više od 200 biopsijskih uzoraka tkiva gingive nesumnjivo ukazuju na razlike u profilima ekspresije miRNK-a u inflamiranim tkivima u odnosu na zdravo tkivo gingive (Stoecklin-Wasmer i sar., 2012, Ogata i sar., 2014).

U studiji Jablonski i saradnika je pokazan direktan efekat miRNK-155 na M1 fenotip makrofaga (inflamatorni makrofagi stimulirani interferonom γ i lipopolisaharidom) tokom inflamatornog odgovora (Jablonski i sar., 2016). Naime su rezultati pokazali značajno povećane vrednosti nivoa ekspresije miRNK-155 nakon stimulacije M1 makrofaga sa najvećim vrednostima šest sati nakon stimulacije. Nasuprot ovome, nije pokazano povećanje u vrednostima nivoa ekspresije miRNK-155 nakon stimulacije M2 makrofaga (makrofagi sa većim kapacitetom fagocitne i antigenske prezentacije u odnosu na M1 fenotip makrofaga koji se smatraju antiinflamatornim makrofagima i imaju ulogu u reparaciji tkiva). Kao ključni molekul, koji potencijalno usmerava inflamatorni fenotip makrofaga, ova miRNK u budućnosti se može koristiti kao potencijalni biomarker mnogih inflamatornih oboljenja.

Takođe, jedan od mehanizama dejstva miRNK-146a i miRNK-155 je fina kontrola funkcije imunskog odgovora, preko antigen prezentujućih dendritičnih ćelija. Naime, utišavanje c-Fos ekspresije u dendritičnim ćelijama posredstvom miRNK-155 je ključno za maturaciju i funkciju ovih ćelija, uključujući i njihovu sposobnost da pokrenu ćelijski imunski odgovor (Dunand-Sauthier i sar., 2011). Nasuprot miRNK-155, miRNK-146a fino reguliše TLR signalni put u dendritičnim ćelijama i tako efektivno smanjuje količinu citokina produkovanih od strane ovih ćelija, kao i njihovo preživljavanje (Karrich i sar., 2013).

Za ispitivanje uloge i funkcije određenih bioloških struktura u molekularnoj genetici koristi se *in silico* analiza pomoću komercijalno dostupnih softvera. Trenutno je za ispitivanje uloge i funkcije miRNK dostupno više od 15 softvera. *In silico* analizom pomoću softvera je omogućena predikcija potencijalnih zajedničkih ciljnih molekula za koje se specifična analizirana miRNK vezuje, na osnovu definisanih kriterijuma kao što su: savijanje molekula RNK-e, termodinamičke karakteristike miRNK-e i ciljnih gena, međusobna komplementarnost i konzervisanost ciljnih mesta kroz biološke vrste. Zbog različitih faktora koje algoritmi navedenih softvera upotrebljavaju za predviđanje ciljnih gena, sâm rezultat predikcije je kompleksan i nije identičan u svim bazama i programima. Senzitivnost softvera za predikciju ciljnih gena se kreće u granicama od 65-68% (Chow i sar., 2008).

U okviru ove doktorske disertacije za predikciju zajedničkih targeta analiziranih miRNK-a je korišćen ComiR softver (Coronnello i Benos, 2013, Coronnello i sar., 2012).

2. CILJEVI RADA

Imajući u vidu značaj cirkulatornih miRNK, kao perspektivnih biomarkera hroničnih inflamatornih oboljenja poput parodontopatija i DM-a i činjenice da do sada nema podataka o prisustvu miRNK-a u gingivalnoj tečnosti pacijenata sa parodontopatijom sistemski zdravih ispitanika i obolelih od DM tipa 2, postavili smo sledeće ciljeve doktorske disertacije:

- Izolacija RNK i miRNK iz gingivalne tečnosti ispitanika sa zdravim parodontacijom i gingivalnog eksudata obolelih od hronične parodontopatije, sistemski zdravih ispitanika i obolelih od DM tipa 2
- Određivanje nivoa ekspresije molekula miRNK-146a i miRNK-155 kod ispitanika sa zdravim parodontacijom, sistemski zdravih i obolelih od DM tipa 2
- Određivanje nivoa ekspresije molekula miRNK-146a i miRNK-155 ispitanika obolelih od hronične parodontopatije, sistemski zdravih i obolelih od DM tipa 2
- Ispitavanje i analiziranje uticaja kauzalne terapije parodontopatije na nivoe ekspresije molekula miRNK-146a i miRNK-155 kod ispitanika sa hroničnom parodontopatijom, sistemski zdravih i obolelih od DM tipa 2
- Utvrđivanje povezanosti nivoa ekspresije miRNK-146a i miRNK-155 sa kliničkim parodontalnim parametrima
- Upoređivanje koncentracije molekula MMP-9 u gingivalnoj tečnosti sistemskih zdravih ispitanika i obolelih od DM tipa 2 sa zdravim parodontacijom
- Upoređivanje koncentracije molekula MMP-9 u gingivalnom eksudatu ispitanika sa hroničnom parodontopatijom, sistemskih zdravih i obolelih od DM tipa 2
- Ispitavanje i analiziranje aktivnosti enzima SOD-e u gingivalnoj tečnosti sistemskih zdravih ispitanika i obolelih od DM tipa 2 sa zdravim parodontacijom
- Ispitavanje i analiziranje aktivnosti enzima SOD-e u gingivalnom eksudatu ispitanika sa hroničnom parodontopatijom, sistemskih zdravih i obolelih od DM tipa 2
- Ispitavanje uticaja kauzalne terapije na vrednosti koncentracija molekula MMP-9 u gingivalnom eksudatu kod ispitanika sa hroničnom parodontopatijom, sistemski zdravih i obolelih od DM tipa 2

- Ispitivanje uticaja kauzalne terapije na vrednosti aktivnosti enzima SOD-e u gingivalnom eksudatu kod ispitanika sa hroničnom parodontopatijom, sistemski zdravih i obolelih od DM tipa 2
- Utvrđivanje povezanosti vrednosti koncentracija molekula MMP-9, sa kliničkim parametrima parodontopatije kod sistemski zdravih ispitanika i obolelih od DM tipa 2
- Ispitivanje povezanosti aktivnosti enzima SOD-e u gingivalnom eksudatu, sa kliničkim parametrima parodontopatije kod sistemski zdravih ispitanika i obolelih od DM tipa 2
- *In silico* analizom ispitivanje predikcije ciljnih gena regulisanih molekulima miRNK-146a i miRNK-155
- Analiza korelacije između nivoa ekspresije molekula miRNK-146a i miRNK-155 sa koncentracijom molekula MMP-9 kao i sa aktivnošću enzima SOD-e u gingivalnom eksudatu sistemski zdravih ispitanika i obolelih od DM tipa 2.

3. MATERIJAL I METODE

Istraživanje u okviru doktorske disertacije je sprovedeno na Klinici za parodontologiju i oralnu medicinu Stomatološkog fakulteta u Beogradu, RJ Inštitutski predmeti Stomatološkog fakulteta u Beogradu i u Institutu za nuklearne nauke “Vinča” u Beogradu, u okviru projekta osnovnih istraživanja Ministarstva za prosvetu, nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije broj 175021 pod nazivom “Kontrola bola i molekularni mehanizmi kao faktori regenerativne terapije u stomatologiji kod zdravih pacijenata i pacijenata sa dijabetes melitusom”.

3.1. Selekcija pacijenata

U istraživanje je uključeno 96 ispitanika oba pola od kojih je 44 ispitanika muškog pola i 52 ispitanika ženskog pola, koji su pročitali i shvatili informaciju o istraživanju i potpisali pristanak za učestvovanje u istom. Ispitanici su podeljeni u sledeće grupe:

- 1) 24 sistemski zdrava ispitanika sa hroničnom parodontopatijom (HP grupa),
- 2) 24 ispitanika sa hroničnom parodontopatijom obolelih od DM tipa 2 (HPDM grupa)
- 3) 24 ispitanika obolela od DM tipa 2 sa klinički zdravim parodontcijumom (ZDM grupa)
- 4) 24 sistemski zdrava ispitanika sa klinički zdravim parodontcijumom (Z grupa)

Veličina uzorka je izračunata primenom programa GPower 3.1., na osnovu rezultata prethodno objavljenih studija o značajnom povećanju ekspresije miRNK-146a u inflamiranim parodontalnim tkivima (Xie i sar., 2011) i u DM-u (Rong i sar., 2013). Pri stepenu značajnosti od 0.05, uzorak od 96 ispitanika (24 ispitanika u svakoj od četiri grupe) je bio dovoljan za snagu studije > 98% (ANOVA za nezavisne uzorke).

Prilikom prve posete na osnovu anamneze i kliničkog pregleda su selektovani ispitanici za uključenje u studiju.

Dijagnoza hronične generalizovane uznapredovale parodontopatije je postavljena na osnovu poznatih kriterijuma: >30% mesta svih prisutnih zuba je zahvaćeno oboljenjem, nivo pripojnog epitela >5 mm, prisutno krvarenje na provokaciju na više od 10% regija (Armitage, 2004).

Zdravim parodontcijumom je smatrano kada je: dubina sondiranja <3 mm, nivo pripojnog epitela 0 mm, prisutno krvarenje na provokaciju na manje od 10% mesta (Himani i sar., 2014).

Uključujući kriterijumi: ispitanici stariji od 18 godina, sistemski zdravi, nepušači, prisutno >20 zuba, unazad 6 meseci nisu imali nikakve zahvate na parodontcijumu, nisu uzimali antibiotike, antiinflamatorne lekove, vitaminske suplemente kao ni imunosupresivnu terapiju.

Isključujući kriterijumi za grupu sistemski zdravih ispitanika obolelih od parodontopatije: ispitanici mlađi od 18 godina, ispitanici sa nekim hroničnim sistemskim oboljenjem, prisustvo <20 zuba, pušači, ispitanici koji su imali neki parodontalni zahvat unazad 6 meseci, ispitanici koji su unazad 6 meseci primali antibiotsku terapiju, uzimali antiinflamatorne lekove i suplemente vitamin kao i specijalnu dijetu, trudnice i dojilje.

Uključujući kriterijumi ispitanika obolelih od DM tipa 2 sa parodontopatijom su: stariji od 18 godina, najmanje dve godine boluju od DM tipa 2, $HbA1c < 8\%$, (Ribeiro i sar., 2011) odsustvo drugih sistemskih oboljenja, nepušači, prisustvo >20 zuba, ispitanici koji unazad 6 meseci nisu imali nikakve zahvate na parodontcijumu, nisu uzimali antibiotike, antiinflamatorne lekove, vitaminske suplemente kao ni imunosupresivnu terapiju.

Isključujući kriterijumi ispitanika obolelih od DM tipa 2 su: mlađi od 18 godina, ispitanici koji manje od dve godine boluju od DM tipa 2, $HbA1c \geq 8\%$, prisustvo <20 zuba, pušači, ispitanici koji su imali neki parodontalni zahvat unazad 6 meseci, ispitanici koji su unazad 6 meseci primali antibiotsku terapiju, uzimali antiinflamatorne lekove i suplemente vitamina kao i specijalnu dijetu, trudnice i dojilje.

Prilikom formiranja grupe bolesnika obolelih od DM tipa 2 sa klinički zdravim parodontcijumom važili su isti kriterijumi kao i za sistemski zdrave pacijente.

3.2. Klinički parametri za procenu stanja parodonticijuma

Nivo oralne higijene i kliničko stanje parodontalnih tkiva je verifikovano sledećim kliničkim parametrima:

- plak indeks po Silness Løe (bodovan od 0-3: gde je 0 bodova potpuno odsustvo plaka u gingivalnoj trećini krunice zuba; gde je 1 bod tanak sloj dentalnog plaka koji se nalazi u predelu ivice gingive i na okolnoj gingivalnoj trećini površine krunice zuba, plak se ne vidi, a otkriva se prevlačenjem vrha sonde preko ovog regiona; gde je 2 boda umerena količina plaka koja se i vizualno može uočiti, plak se nalazi na ivici gingive i na površini zuba u njenom susedstvu i/ili mala količina dentalnog plaka koja se otkriva u gingivalnom sulkusu, odnosno džepu; gde je 3 boda velika količina dentalnog plaka koja pokriva ivicu gingive i okolnu površinu zuba, ali je njime u potpunosti ispunjen i gingivalni sulkus, odnosno gingivalni ili parodontalni džep) (Silness i Løe, 1964)
- gingivalni indeks po Løe Silnessu (bodovan od 0-3: gde je 0 zdrava, čvrsta, bledoružičasta gingiva, a njena površina sitnozrnasta, papila je u interdentalnom prostoru; gde je 1 blaga inflamacija, ivica gingive je nešto crvenija nego normalno i postoji minimalni otok, gingiva ne krvari na blagu provokaciju parodontalnom sondom; gde je 2 umerena inflamacija, gingiva je crvene boje sa izraženim edemom slobodne gingive i interdentalnih papila, gingiva krvari prilikom sondiranja; gde je 3 jaka inflamacija, gingiva je veoma crvena, a može biti i lividna, slobodna gingiva i interdentalne papile su jako uvećane, na papilama mogu da postoje i ulceracije kada gingiva krvari na najmanju provokaciju) (Løe i Silness, 1963)
- krvarenje na provokaciju (mereno 15 sekundi nakon sondiranja gingivalnog sulkusa ili parodontalnog džepa parodontalnom sondom, evidentirano kao prisutno ili odsutno krvarenje) (Ainamo i Bay, 1975)
- dubina sondiranja (rastojanje između ivice gingive i dna gingivalnog sulkusa ili parodontalnog džepa izraženo u milimetrima)
- nivo pripojnog epitela (rastojanje između cementno-gleđne granice i dna gingivalnog sulkusa ili parodontalnog džepa, odnosno mesta gde parodontalna sonda nailazi na otpor, izraženo u milimetrima)

- nivo ivice gingive (rastojanje između ivice slobodne gingive i cementno-gleđne granice, izraženo u milimetrima)

Na svim prisutnim zubima pomoću graduisane parodontalne sonde (PCPUNC 15, Hu Friedy, Chicago, USA) je merena dubina sondiranja, nivo pripojnog epitela i nivo ivice gingive u predelu 6 tačaka oko zuba (mezijalno, sredina i distalno vestibularne i oralne površine zuba). Sva merenja je vršio jedan iskusni istraživač. Kalibracija je vršena dva puta, pre i tokom studije, kako bi se osigurala unutaristraživačka konstantnost i reproducibilnost u merenju (Kohen Kappa > 0.75 za svaki parametar).

Nakon merenja i beleženja kliničkih parametara svaki ispitanik je bio edukovan o pravilnom održavanju oralne higijene. Klinička merenja i uzorkovanje gingivalne tečnosti su rađena su dva puta: na prvom pregledu i 6 nedelja nakon sprovedene kauzalne terapije obolelog parodontcijuma.

Ispitanici sa hroničnom parodontopatijom, sistemski zdravi i oboleli od DM tipa 2, (HP i HPDM grupa) su bili podvrgnuti kauzalnoj fazi terapije parodontopatije, koja je podrazumevala uklanjanje svih čvrstih i mekih supragingivalnih i subgingivalnih naslaga, obradu svih parodontalnih džepova i poliranje površine korenova zuba u lokalnoj anesteziji primenom mašinskih (Cavitron® Ultrasonic Inc., Long Island City, NY, USA) i ručnih instrumenata (Gracey curretes, Hu-Friedy® Manufacturing Inc., Chicago, IL, USA), kvadrant po kvadrant u periodu od dve nedelje od strane istog lekara.

3.3. Uzimanje uzoraka gingivalne tečnosti

Na osnovu anamneze i kliničkog pregleda su definisana mesta uzorkovanja gingivalne tečnosti.

Uzorci gingivalne tečnosti su uzimani sa dva reprezentativna mesta filter papirima PerioPaper® (Pro-Flow Corp., Amityville, NY, USA) 24h nakon merenja i beleženja kliničkih parametara kako bi se izbegao kontakt sa krvlju neposredno nakon sondiranja (**Slika 3.1. i Slika 3.2.**).



Slika 3.1. Dinamika uzorkovanja gingivalne tečnosti

Svim ispitanicima je naglašeno da dva sata pre uzimanja uzoraka ne jedu i ne piju tečnost. Kod ispitanika sa hroničnom parodontopatijom uzorci su uzimani iz dva parodontalna džepa, na mestima sa najvećim vrednostima dubine sondiranja i pozitivnim vrednostima krvarenja na provokaciju. Kod ispitanika sa zdravim parodoncijumom uzorci gingivalne tečnosti su uzimani u regiji gornjeg desnog centralnog sekutića i gornjeg desnog prvog molara (meziostibularne površine). Pre uzorkovanja sa reprezentativnih zuba su pažljivo uklonjene supragingivalne naslage, zubi su izolovani vaterolnama, a nakon toga lagano posušeni vazduhom. Filter papiri su plasirani u parodontalni prostor (parodontalni džep ili gingivalni sulkus) do prvog otpora i ostavljeni su 30 sekundi. Nakon vađenja iz parodontalnog prostora je meren volumen uzorkovanog fluida (Periotron 6000, ProFlow) nakon čega su odlagani u zasebnu plastičnu epruveticu (Ependorf®) u kojoj se nalazilo 250 µl tečnosti (voda oslobođena RNA-za). Odmah potom plastične epruvete su odlagane u tečni azot i transportovane do mesta skladištenja (zamrzivač na -70°C) gde su čuvane do momenta analiziranja. Filter papiri kontaminirani pljuvačkom i krvlju su isključivani iz studije. Nakon odmrzavanja uzorci su centrifugirani na 3000 x g 15 min kako bi se supernatant koristio za dalje analize.



Slika 3.2. Uzorkovanje gingivalne tečnosti kod ispitanika sa zdravim parodontijumom sa meziovestibularne površine gornjeg desnog centralnog sekutića pomoću filter papira, PerioPaper®

3.4. Određivanje koncentracije MMP-9 u gingivalnoj tečnosti imunoesejskom metodom (ELISA)

Nakon odmrzavanja uzoraka se pristupilo određivanju koncentracije MMP-9 prema uputstvu proizvođača. Potom je korišćen komercijalni ELISA kit, Quantikine Human MMP-9 Elisa kit (R&D systems, USA). MMP-9 iz uzorka se vezuje za antitelo inkorporirano za pločicu kita. Daljim dodavanjem enzima peroksidaze rena, konjugovanim sa poliklonalnim antitelom specifičnim za humani MMP-9 i supstrata enzima se razvija boja proporcionalna vezivanju MMP-9 za pločicu.

3.5. Kvantitativno određivanje aktivnosti enzima SOD spektrofotometrijskom metodom

Aktivnost enzima SOD-e je merena primenom *SIGMA-ALDRICH*[®] SOD Assay Kit (Sigma-Aldrich. Inc, USA).

3.6. Izolacija miRNK

Izolacija i prečišćavanje molekula miRNK su rađeni uz pomoć miRCURY Isolation Kit-Biofluids kita (Exiqon Inc., Woburn, MA, USA).

Nakon odmrzavanja su uzorci centrifugirani na 3000 x g 5 minuta. 200µl supernatanta je prebačeno u nove tube, a zatim dodato 60µl *Lysis solution BF*. Sve zajedno je mešano 5 sekundi i inkubirano na sobnoj temperaturi 3 minuta. Zatim je usledila precipitacija proteina dodavanjem 20µl *Protein Precipitation Solution BF*. Sve zajedno je mešano 5 sekundi, zatim inkubirano 1 minut na sobnoj temperaturi, a nakon toga je centrifugirano 3 minuta na 11000 x g. 2µl supernatanta je prebačeno u nove tube. Prilagođavanje uslova za vezivanje je vršeno dodavanjem 270µl izopropanola u supernatant. Sve je zatim mešano 5 sekundi. Postavljene su miRNK mini spin kolone (*Mini Spin Column BF*) u nove kolekcione tube i nakon toga kroz njih je provučen celokupni uzorak. Sve to je inkubirano 2 minuta na sobnoj temperaturi, a zatim je centrifugirano 30 sekundi na 11000 x g. Višak tečnosti je prosut i postupak je ponovljen ukoliko je bilo više od 300µl uzorka. Preko kolona zatim je dodato 100µl *Wash Solution 1 BF*. Sve je centrifugirano 30 sekundi na 11000 x g. Višak tečnosti je odstranjen i kolone su vraćene u tube. Preko kolona je dodato 700µl *Wash Solution 2 BF*. Sve je centrifugirano 30 sekundi na 11000 x g. Višak tečnosti je prosut i kolone su vraćene u tube. Preko kolona je dodato 250µl *Wash Solution 2 BF*. Sve je centrifugirano 2 minuta na 11000 x g kako bi se membrana potpuno osušila. MiRNK mini spin kolone su prebačene u nove kolekcione tube (1.5ml). Zatim je dodato 100µl vode oslobođene RNA-za direktno preko membrane. Sve je inkubirano 1 minut na sobnoj teperaturi. Poklopac je zatvoren i sve je centrifugirano 1 minut na 11000 x g. Uzorci prečišćene RNK su čuvani na -80°C do dalje analize.

3.7. Merenje ekspresije miRNK

Određivanje koncentracije izolovanih molekula RNK je rađeno metodom spektrofotometrije. U spektrofotometraskoj analizi odnos A260/A280 je uzet kao indikator čistoće molekula RNK.

Koncentracija izolovanih molekula RNK je vršena merenjem apsorbance na NanoDrop 1000 spektrofotometru (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA). Uzorci čiji je odnos A260/A280 bio približno između 1.8 i 2.1 su smatrani čistim i pogodnim za dalju analizu. Izmerene koncentracije molekula RNK su bile u opsegu od 5 do 50 ng/μL.

U cilju kvantifikacije molekula miRNK-146a i miRNK-155 u odnosu na endogenu kontrolu RNU6B su korišćeni specifični TaqMan®MicroRNA eseji (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Za reakciju reverzne transkripcije je korišćeno 10 ng izolovane RNK i komponente Taqman®MicroRNA Reverse Transcription Kit-a (Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific, Vilnius, Lithuania). Reakcija amplifikacije je imala temperaturni profil dat u **Tabeli 3.1.**

Tabela 3.1. Temperaturni profil reakcije reverzne transkripcije miRNK

Vreme	Temperatura
30 minuta	16 °C
30 minuta	42°C
5 minuta	85°C
∞	4°C

3.8. Lančana reakcija polimeraze kojoj prethodi reverzna transkripcija korišćenjem prajmera sa petljom (Stem-Loop RT-PCR)

Umnožavanje cDNK molekula je rađeno metodom kvantitativne lančane reakcije polimeraze u realnom vremenu korišćenjem prajmera sa petljom (*Stem-Loop qRT-PCR*) uz pomoć Taqman®2xUniversal PCR Master Mix, No AmpersaeUNG (Applied Biosystems, by Life Technologies, Warrington, UK) (**Tabela 3.2.**). Nakon reakcije reverzne transkripcije uzorci cDNK su amplifikovani uz pomoć specifičnih TaqMan eseja: hsa-miR-146a (ID:000468); hsa-miR-155 (ID: 002623) i malih nukleusnih RNK (nRNK)-RNU6B (ID:001093) korišćenih kao endogena kontrola. Reakcija amplifikacije je imala temperaturni profil dat u **Tabeli 3.3.** Vrednosti relativne kvantifikacije su analizirane 7500 System SDS Software-om (Applied Biosystems, Foster City, California, USA) komparativnom $\Delta\Delta C_t$ metodom prema sledećoj jednačini:

$$RQ \text{ vrednost} = 2^{-(dC_{tuzorka} - dC_{tkalibratora})}$$

$$dC_t = C_{tmiR-146a/155} - C_{tRNU6B}$$

gde RQ vrednost predstavlja relativnu kvantifikaciju (eng. *relative quantity*)

Tabela 3.2. Komponente reakcije kvantitativnog PCR-a u realnom vremenu

Komponenta	Zapremina komponente master miksa po reakciji od 20 μl
	Jedna reakcija
TaqMan®Small RNA Assay (20x)	1.00 μ L
cDNK produkt reakcije reverzne transkripcije	1.33 μ L
<i>TaqMan®2xUniversal PCR Master Mix, No AmpErase®UNG</i>	10.00 μ L
DEPC H ₂ O	7.67 μ L
Ukupna zapremina	20.00 μL

Tabela 3.3. Temperaturni profil reakcije kvantitativnog PCR-a u realnom vremenu

Korak	Aktivacija enzima	PCR	
	HOLD	Ciklus (40 ciklusa)	
		Denaturacija	Aniling/ekstenzija
Temperatura	95 °C	95 °C	60 °C
Vreme	10 minuta	15 sekundi	60 sekundi

3.8. Statistička obrada podataka

Rezultati merenja su izraženi kao medijane i srednje vrednosti \pm standardna greška (klinički parametri). Rezultati su obrađivani neparametrijskim statističkim testovima, jer ekspresioni nivoi molekula miRNK-146a i miRNK-155 nisu bili distribuirani prema normalnoj raspodeli. Razlike u nivoima ekspresije molekula miRNK-146a i miRNK-155 između grupa, kao i korelacija ove ekspresije sa standardnim prognostičkim i dijagnostičkim parametrima karakterističnih za parodontopatiju, su prikazane testom sume opsega (Mann-Whitney test, prilikom poređenja 2 grupe) ili ANOVA testom sume opsega odnosno neparametrijskim Kruskal-Wallis-ovim testom analize varijanse opsega (Dunov post-test, eng. *Dunn's post-test*) za upoređivanje 3 ili više grupa. Takođe za upoređivanje grupa pre i posle terapije je korišćen Wilcoxon-ov test opsega. Za analizu povezanosti je korišćen neparametrijski Spirmanov test korelacije. Primenom metode multiple linearne regresije je korišćena kao zavisna varijabla relativna ekspresija miRNK, dok su uzrast, pol i parodontopatija korišćene kao nezavisne varijable. U cilju procene preciznosti miRNK-146a i miRNK-155 kao dijagnostičkih parametara parodontopatije, je formirana ROC kriva na osnovu

preračunavanja prostora ispod krive i cut-off vrednosti. Za nivo statističke značajnosti je smatrana $p < 0.05$.

Za obradu rezultata su korišćeni IBM SPSS Statistics 18 (IBM Corporation, Armonk, NY, USA) i GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc. CA) programi.

3.9. In silico analiza predikcije ciljnih gena miRNK

Analizom predikcije potencijalnih ciljnih gena čija je ekspresija regulisana molekulom miRNK-146a i miRNK-155 je korišćen ComiR softver.

ComiR je internet softver namenjen kombinatornoj predikciji ciljnih molekula miRNK-a. ComiR matematički alati preračunavaju verovatnoću da analizirane miRNK sa svojim 3'UTR budu funkcionalni ciljni molekuli, što zavisi od relativne miRNK ekspresije, za svaki gen koji prepoznaju. Što je rezultat bliži vrednosti 1 to je veća verovatnoća da će te miRNK utišati ciljni gen.

4. REZULTATI

4.1. Demografske karakteristike ispitanika

U ispitivanju je učestvovalo 96 ispitanika oba pola (44 muškarca i 52 žene), prosečne starosti 44,05 godina. Najmlađi ispitanik je imao 23 godine, a najstariji 71. Prosečna starost ispitanika je bila značajno veća kod obolelih od parodontopatije (HP grupa i HPDM grupa), u odnosu na ispitanike sa zdravim parodontcijumom (ZDM grupa i Z grupa) (**Tabela 4.1.**). Nije bila pokazana statistički značajna razlika u starosnoj distribuciji među grupama i unutar ispitivanih grupa.

Ispitanici su pokazivali umereno povećanje telesne težine, bez razlika u srednjim vrednostima BMI između grupa (**Tabela 4.1.**).

Tabela 4.1. Demografske karakteristike ispitanika

Grupa	(^a N)	Pol		Uzrast (prosečna vrednost)	BMI
		M/Ž	(^a N)		
Z	24	11/13	33.4	26.37	
ZDM	24	10/14	33.2	26.93	
HP	24	13/11	54.7	27.31	
HPDM	24	10/14	54.9	25.45	

(^aN) broj ispitanika. BMI- indeks telesne mase (eng. *body mass index*)

4.2. Klinički parametri za procenu stanja parodontijuma

Mereni klinički parametri: indeksi oralne higijene (plak indeks (PI)) kao i indeksi stanja parodontijuma (dubina sondiranja (DS), krvarenje na provokaciju (KNP), gingivalni indeks (GI) i nivo pripojnog epitela (NPE)) na svim zubima kao i na reprezentativnim mestima su bili statistički značajno veći kod obolelih od parodontopatije u grupama HPDM i HP u poređenju sa grupama ispitanika sa zdravim parodontijumom, grupe ZDM i Z ($p < 0.01$) (**Tabela 4.2. Tabela 4.3. Tabela 4.4. Tabela 4.5.**).

Prosečne vrednosti dubine sondiranja (DS) i nivoa pripojnog epitela (NPE) su bile statistički značajno veće u grupi HPDM u poređenju sa HP grupom ($p < 0.05$) dok se ostali parametri (PI, GI, KNP) nisu značajno razlikovali između ove dve grupe (**Tabela 4.2. Tabela 4.3. Tabela 4.4. Tabela 4.5.**).

Prosečne vrednosti svih merenih parametara su bile statistički značajno veće u grupi HPDM u poređenju sa ZDM grupom ($p < 0.05$) (**Tabela 4.2. Tabela 4.3. Tabela 4.4. Tabela 4.5.**).

Prosečne vrednosti svih merenih parametara su bile statistički značajno veće u grupi HP u poređenju sa Z grupom ($p < 0.01$) (**Tabela 4.2. Tabela 4.3. Tabela 4.4. Tabela 4.5.**).

Takođe prosečne vrednosti svih merenih parametara u HP i HPDM grupama su pokazivale statistički značajno manje vrednosti nakon sprovedene kauzalne terapije u odnosu na vrednosti pre terapije ($p < 0,01$) (**Tabela 4.2. Tabela 4.3. Tabela 4.4. Tabela 4.5.**).

Tabela 4.2. Vrednosti plak indeksa i gingivalnog indeksa pre kauzalne terapije

Grupa		Plak indeks	Gingivalni index
Z	Sve regije	0.18±0.00	0.16±0.08
	Uzorkovane regije	0.00±0.00	0.00±0.00
ZDM	Sve regije	0.15±0.10	0.18±0.07
	Uzorkovane regije	0.00±0.00	0.00±0.00
HP	Sve regije	2.21±0.18**	2.36±0.43**
	Uzorkovane regije	2.16±0.49**	2.58±0.39**
HPDM	Sve regije	2.38±0.28#	2.35±0.43#
	Uzorkovane regije	2.25±0.36#	2.55±0.50#

Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost ± standardna devijacija. ** $p < 0.01$ HP grupa u poređenju sa Z grupom. # $p < 0.05$ HPDM grupa u poređenju sa ZDM grupom.

Tabela 4.3. Vrednosti kliničkih parametara (indeksi stanja parodontijuma) po grupama ispitanika pre kauzalne terapije

Grupa		Dubina sondiranja (mm)	Nivo pripojnog epitela (mm)	Krvarenje na provokaciju (%)
Z	Sve regije	2.17±0.30	2.24±0.45	8.7±5.4
	Uzorkovane regije	1.77±0.24	0.48±0.38	0.00±0.00
ZDM	Sve regije	2.43±0.42	2.40±0.40	9.6±4.3
	Uzorkovane regije	2.25±0.23	0.63±0.33	0.00±0.00
HP	Sve regije	4.42±0.24**	4.92±0.11**	76.5±8.7**
	Uzorkovane regije	4.33±0.22**	5.85±0.35**	100.00±0.00**
HPDM	Sve regije	4.79±0.45#	5.16±1.32#	72.5±8.3#
	Uzorkovane regije	4.71±0.33#*	6.17±0.16#*	100.00±0.00#

Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost ± standardna devijacija. ** $p < 0.01$ HP grupa u poređenju sa Z grupom. # $p < 0.05$ HPDM grupa u poređenju sa ZDM grupom. * $p < 0.05$ HP grupa u poređenju sa HPDM grupom

Tabela 4.4. Vrednosti plak indeksa i gingivalnog indeksa nakon kauzalne terapije

Grupa		Plak indeks	Gingivalni index
HP	Sve regije	0.5±0.35‡	0.86±0.32‡
	Uzorkovane regije	0.39±0.43‡	0.54±0.55‡
HPDM	Sve regije	0.46±0.24‡	0.67±0.56‡
	Uzorkovane regije	0.36±0.46‡	0.51±0.48‡

Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost ± standardna devijacija. ‡ $p < 0.01$ pre, u odnosu na rezultate nakon kauzalne terapije.

Tabela 4.5. Vrednosti kliničkih parametara (indeksi stanja parodontijuma) po grupama ispitanika nakon kauzalne terapije

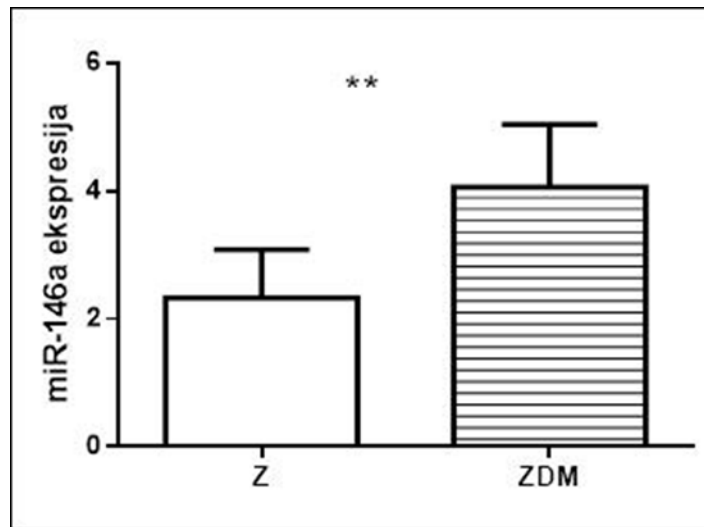
Grupa		Dubina sondiranja (mm)	Nivo pripojnog epitela (mm)	Krvarenje
				na provokaciju (%)
HP	Sve regije	3.26±0.49‡	4.19±1.23‡	8.25±1.50‡
	Uzorkovane regije	2.34±0.28‡	4.11±0.85‡	0.36±0.38‡
HPDM	Sve regije	3.15±0.35‡	4.37±1.18‡	7.19±2.91‡
	Uzorkovane regije	3.11±0.51‡	4.12±1.43‡	0.33±0.34‡

Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost ± standardna devijacija. ‡ $p < 0.01$ pre, u odnosu na rezultate nakon kauzalne terapije.

4.3. Rezultati analize nivoa ekspresije molekula miRNK-146a

4.3.1. Nivoi ekspresije molekula miRNK-146a u grupama sistemski zdravih ispitanika i obolelih od DM tip 2 sa zdravim parodontcijumom

Nivoi ekspresije molekula miRNK-146a su pokazivali statistički značajno veće vrednosti u grupi ispitanika ZDM u odnosu na Z grupu (**Grafik 4.1.**).

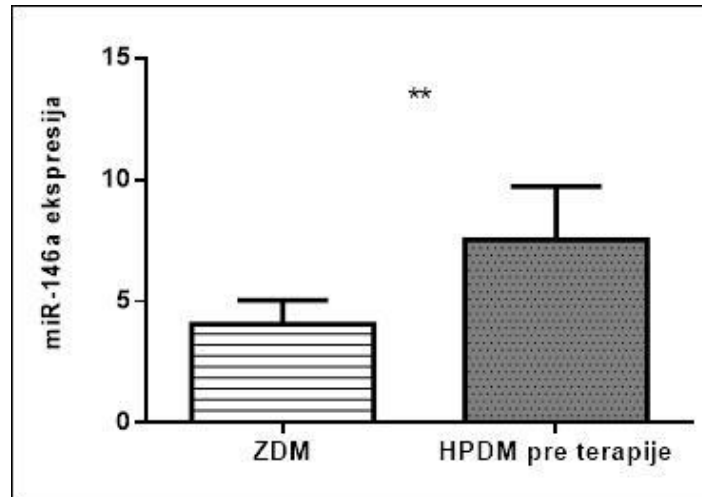


Grafik.4.1. Relativne vrednosti nivoa ekspresije molekula miRNK-146a u Z i ZDM grupama.

** - $p < 0.01$

4.3.2. Nivoi ekspresije molekula miRNK-146a u ZDM grupi i HPDM grupi pre terapije

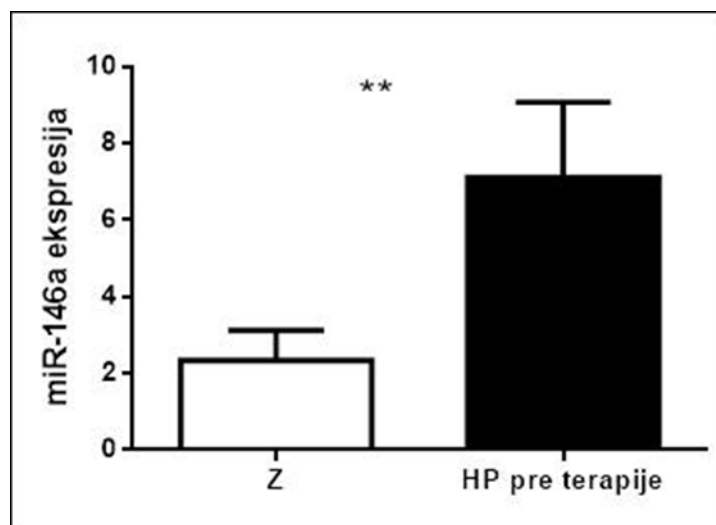
Nivoi ekspresije molekula miRNK-146a su pokazivali statistički značajno veće vrednosti u grupi ispitanika HPDM pre terapije u odnosu na ZDM grupu (**Grafik 4.2.**).



Grafik.4.2. Relativne vrednosti nivoa ekspresije molekula miRNK-146a u HPDM grupi pre terapije i ZDM grupi. **- $p < 0.01$

4.3.3. Nivoi ekspresije molekula miRNK-146a u HP grupi pre terapije i Z grupi

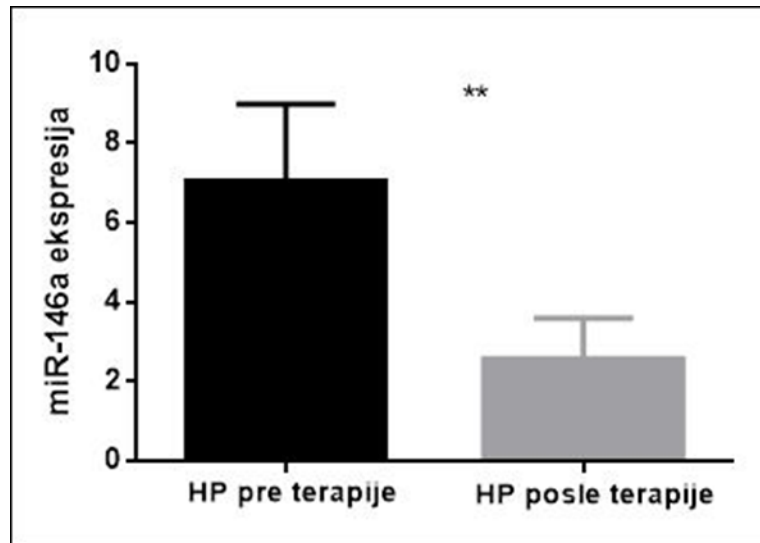
Nivoi ekspresije molekula miRNK-146a su pokazivali statistički značajno veće vrednosti u grupi ispitanika HP pre terapije u odnosu na Z grupu (**Grafik. 4.3.**).



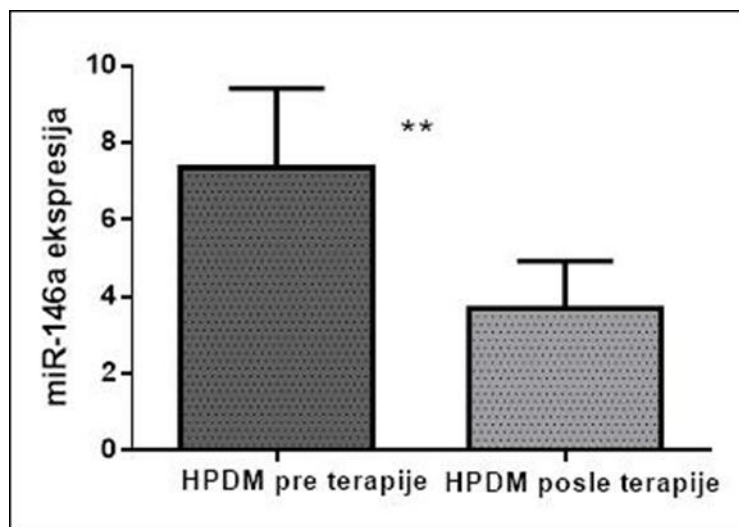
Grafik 4.3. Relativne vrednosti nivoa ekspresije molekula miRNK-146a u HP grupi pre terapije i Z grupi. **- $p < 0.01$

4.3.4. Nivoi ekspresije molekula miRNK-146a u grupama HP i HPDM pre, u odnosu na nivo ekspresije molekula miRNK-146a nakon kauzalne terapije

U grupama HPDM i HP nivoi ekspresije molekula miRNK-146a su bili statistički značajno povećani pre kauzalne terapije, dok su se nivoi ekspresije smanjili nakon kauzalne terapije do nivoa bliskih onim kod ispitanika u ZDM i Z grupama (**Grafik 4.4. i Grafik 4.5.**).



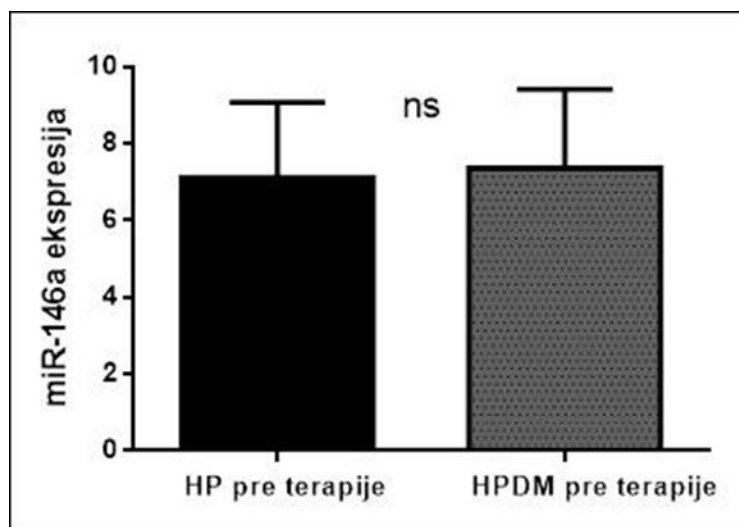
Grafik 4.4. Relativne vrednosti nivoa ekspresije molekula miRNK-146a u HP grupi pre i posle kauzalne terapije. **- $p < 0.01$



Grafik 4.5. Relativne vrednosti nivoa ekspresije molekula miRNK-146a u HPDM grupi pre i posle kauzalne terapije. ******- $p < 0.01$

4.3.5. Nivoi ekspresije molekula miRNK-146a u HP grupi i HPDM grupi pre kauzalne terapije

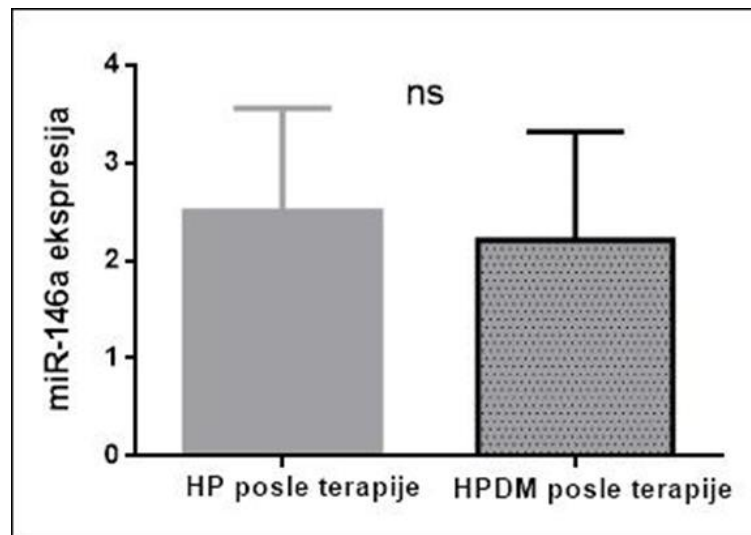
Nivoi ekspresije miRNK-146a se nisu statistički značajno razlikovale u HP grupi i HPDM grupi pre kauzalne terapije (**Grafik 4.6.**).



Grafik 4.6. Relativne vrednosti nivoa ekspresije molekula miRNK-146a u HP i HPDM grupi pre kauzalne terapije. *ns*- nema statistički značajne razlike

4.3.6. Nivoi ekspresije molekula miRNK-146a u HP grupi i HPDM grupi nakon kauzalne terapije

Nivoi ekspresije miRNK-146a se nisu statistički značajno razlikovale između HP i HPDM grupe nakon kauzalne terapije (**Grafik 4.7.**).

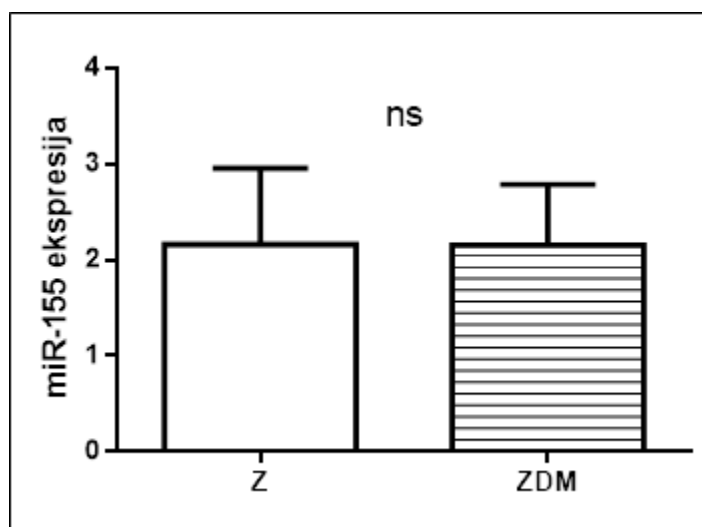


Grafik 4.7. Relativne vrednosti nivoa ekspresije molekula miRNK-146a u HP i HPDM grupi nakon kauzalne terapije. *ns*- nema statistički značajne razlike

4.4. Rezultati analize nivoa ekspresije molekula miRNK- 155

4.4.1. Nivoi ekspresije molekula miRNK-155a u Z i ZDM grupi

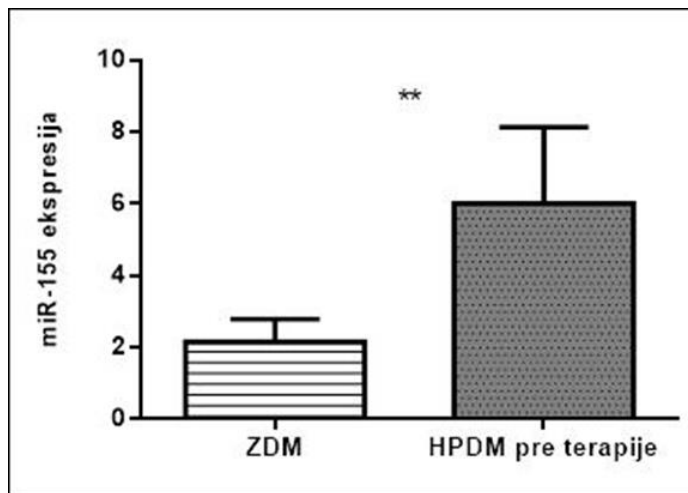
Nivoi ekspresije molekula miRNK-155 se nisu statistički značajno razlikovali kod ispitanika sa zdravim parodontcijumom (ZDM i Z grupa) (**Grafik 4.8.**).



Grafik 4.8. Relativne vrednosti nivoa ekspresije molekula miRNK-155 u Z i ZDM grupi.
ns- nema statistički značajne razlike

4.4.2. Nivoi ekspresije molekula miRNK-155 u ZDM i HPDM grupi pre kauzalne terapije

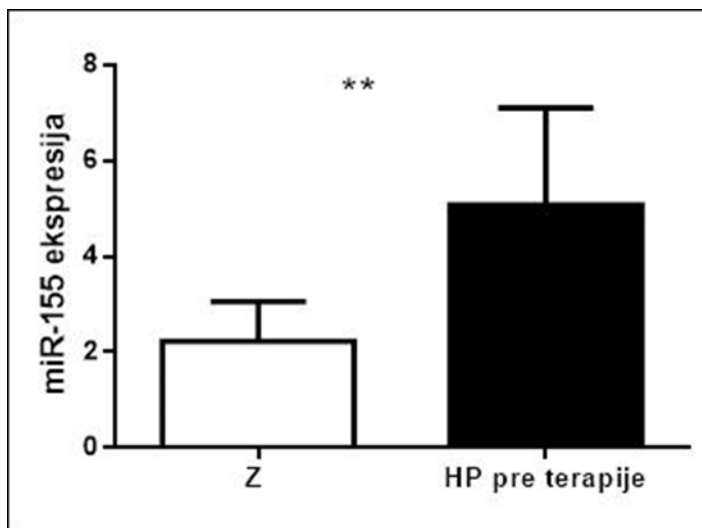
Dobijeni rezultati nivoa ekspresije molekula miRNK-155 su se statistički značajno razlikovali u HPDM grupi pre terapije u odnosu na ZDM grupu (**Grafik 4.9.**).



Grafik 4.9. Relativne vrednosti nivoa ekspresije molekula miRNK-155 u HPDM grupi pre terapije i ZDM grupi. ** - $p < 0.01$

4.4.3. Nivoi ekspresije molekula miRNK-155 u HP grupi pre terapije i Z grupi

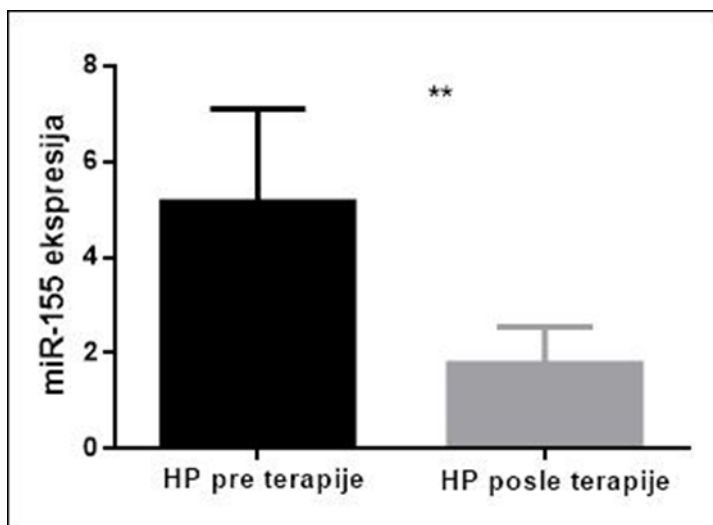
Nivoi ekspresije molekula miRNK-155 su pokazali statistički značajno veće vrednosti u HP grupi pre terapije u odnosu na Z grupu (**Grafik 4.10.**).



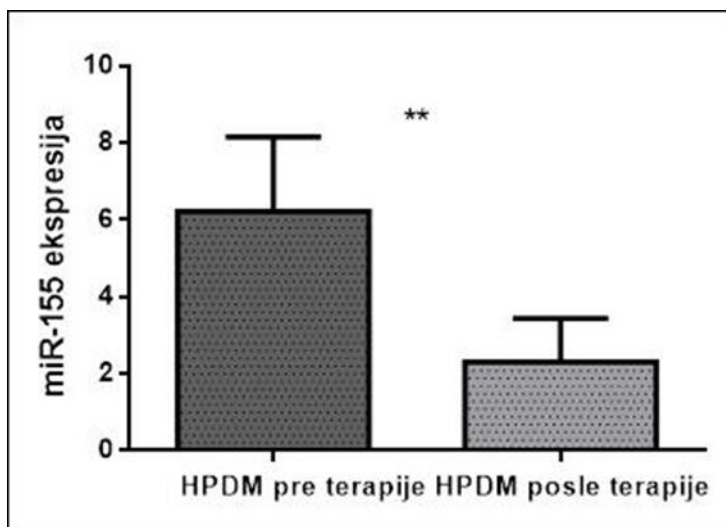
Grafik 4.10. Relativne vrednosti nivoa ekspresije molekula miRNK-155 u HP grupi pre terapije i Z grupi. ** - $p < 0.01$

4.4.4. Nivoi ekspresije molekula miRNK-155 u grupama HP i HPDM pre i posle kauzalne terapije parodontopatije

U grupama HPDM i HP nivoi ekspresije molekula miRNK-155 su bili statistički značajno povećani pre kauzalne terapije, dok su se nivoi ekspresije smanjili nakon kauzalne terapije do nivoa bliskih onim kod ispitanika u ZDM i Z grupama (**Grafik 4.11. i Grafik 4.12.**).



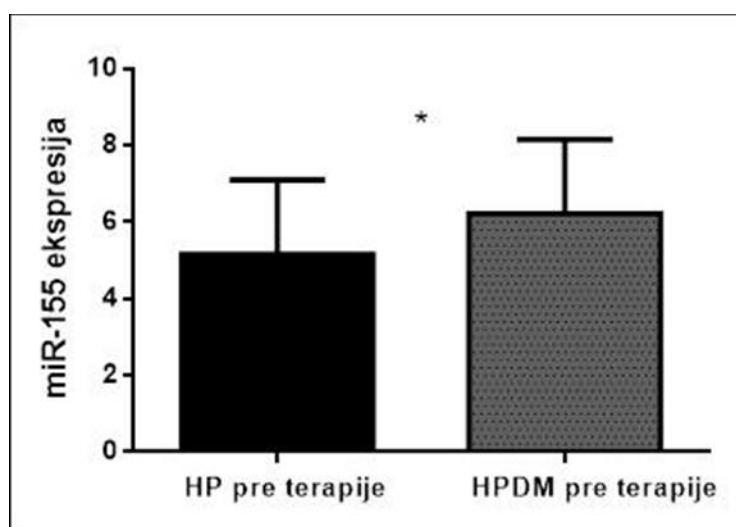
Grafik 4.11. Relativne vrednosti nivoa ekspresije molekula miRNK-155 u HP grupi pre i posle kauzalne terapije. ******- $p < 0.01$



Grafik 4.12. Relativne vrednosti nivoa ekspresije molekula miRNK-155 u HPDM grupi pre i posle kauzalne terapije. ******- $p < 0.01$

4.4.5. Nivoi ekspresije molekula miRNK-155 u HP grupi i HPDM grupi pre kauzalne terapije

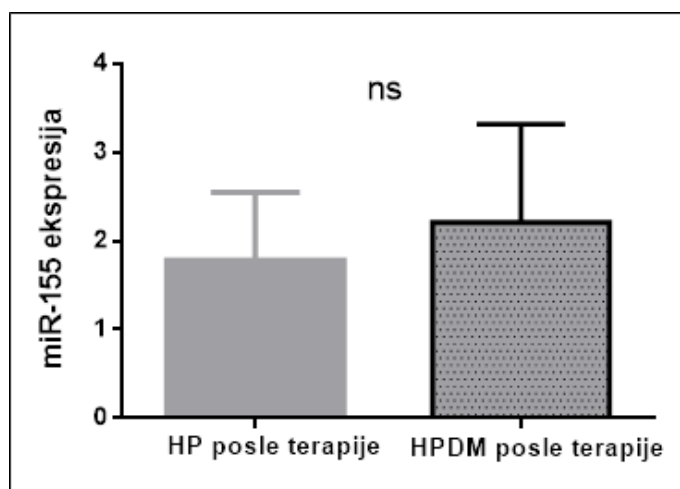
Dobijeni rezultati nivoa ekspresije molekula miRNK-155 se nisu statistički značajno razlikovali u HPDM i HP grupi pre kauzalne terapije (**Grafik 4.13.**).



Grafik 4.13. Relativne vrednosti nivoa ekspresije molekula miRNK-155 u HP i HPDM grupama pre kauzalne terapije. $*-p < 0.01$

4.4.6. Nivoi ekspresije molekula miRNK-155 u HP i HPDM grupi nakon kauzalne terapije

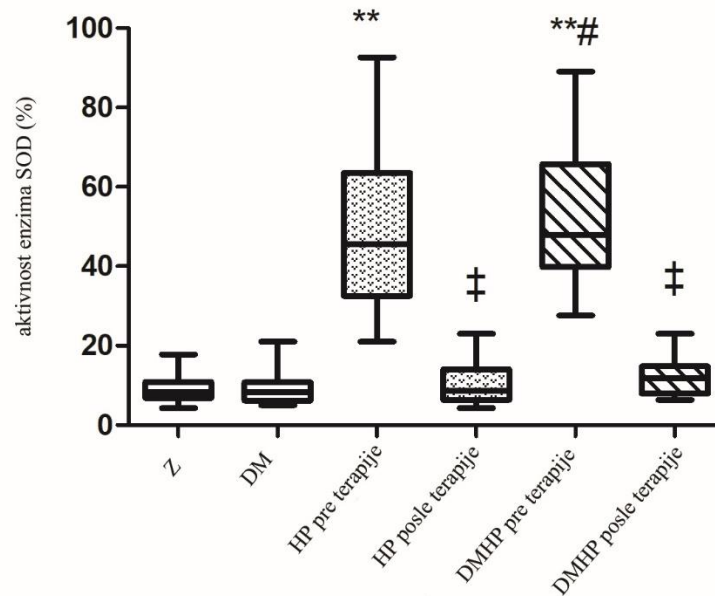
Dobijeni rezultati nivoa ekspresije molekula miRNK-155 se nisu statistički značajno razlikovali u vrednostima ekspresije između ove dve grupe (**Grafik 4.14.**).



Grafik 4.14. Relativne vrednosti nivoa ekspresije molekula miRNK-155 u HP i HPDM grupi nakon kauzalne terapije. *ns*- nema statistički značajne razlike

4.5. Aktivnost enzima SOD-e

Vrednosti aktivnosti enzima SOD-e su bile statistički značajno veće u grupama ispitanika sa hroničnom parodontopatijom (HPDM i HP grupe), dok su se vrednosti njene aktivnosti smanjile šest nedelja nakon kauzalne terapije na vrednosti slične onima kao kod ispitanika sa zdravim parodoncijumom (ZDM i Z grupe) (**Grafik 4.15.**).



Grafik 4.15. Relativne vrednosti nivoa aktivnosti enzima SOD-e u uzorcima gingivalne tečnosti po grupama ispitanika. ** - $p < 0.01$ u poređenju sa Z grupom. # - $p < 0.01$ u poređenju sa ZDM grupom. ‡ - $p < 0.01$ pre terapije u odnosu na vrednosti nakon kauzalne terapije.

4.6. Koncentracija enzima MMP-9

Vrednosti koncentracije molekula MMP-9 su bile značajno veće u grupama ispitanika sa hroničnom parodontopatijom (HPDM i HP grupe), dok su se vrednosti koncentracija smanjile šest nedelja nakon kauzalne terapije na vrednosti slične onima kao kod ispitanika sa zdravim parodontcijumom (ZDM i Z grupe) (Tabela 4.6. Tabela 4.7.).

Tabela 4.6. Koncentracije enzima MMP-9 u gingivalnoj tečnosti po grupama ispitanika pre kauzalne terapije

Grupa	(^a N)	MMP-9 (ng/ml)
Z	24	14.43±2.88
ZDM	24	17.9±1.98
HP	24	58.77±4.06 #
HPDM	24	55.05±5.95 **

Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost ± standardna devijacija. ** $p < 0.01$ u poređenju sa ZDM grupom. # $p < 0.01$ u poređenju sa Z grupom.

Tabela 4.7. Koncentracije enzima MMP-9 u gingivalnoj tečnosti u grupama obolelih od parodontopatije nakon kauzalne terapije

Grupa	(^aN)	MMP-9 (ng/ml)
HP	24	18.3±4.38‡
HPDM	24	20.9±1.94‡

Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost ± standardna devijacija. ‡ $p < 0.01$ pre terapije u odnosu na vrednosti nakon kauzalne terapije.

4.7. Povezanost ekspresije miRNK-146a i miRNK-155 sa aktivnošću enzima SOD-e, sa koncentracijom MMP-9, kao i sa kliničkim parametrima parodontopatije

Primenom Spearmanovog testa je dobijena statistički značajna pozitivna korelacija između nivoa ekspresije molekula miRNK-146a i miRNK-155 i nivoa aktivnosti enzima SOD-e kako pre terapije, tako i nakon primenjene terapije u HP i HPDM grupama (**Tabela 4.8.**). Istim testom je pokazana statistički značajna pozitivna korelacija između nivoa ekspresije miRNK-146a i miRNK-155 kako pre terapije, tako i nakon primenjene terapije u HP i HPDM grupama (**Tabela 4.8.**). Takođe nije bilo statistički značajne korelacije između vrednosti koncentracije molekula MMP-9 i obe ispitivane miRNK pre kauzalne terapije, kao ni posle primenjene terapije u HP i HPDM grupama (**Tabela 4.8.**).

Takođe, ovom analizom nije dobijena statistički značajna korelacija između zasebnih vrednosti nivoa ekspresije molekula miRNK-146a i miRNK-155 sa kliničkim parametrima. Sa druge strane, je pokazana pozitivna korelacija između aktivnosti SOD-e sa nivoom pripojnog epitela u HPDM grupi, kao i povezanost koncentracije MMP-9 sa nivoom pripojnog epitela u HP grupi (**Tabela 4.9. Tabela 4.10.**).

Tabela 4.8. Rezultati analize povezanosti nivoa ekspresije molekula miRNK-146a i miRNK-155 sa aktivnošću SOD-e i koncentracijom MMP-9

Promenljiva 1	Promenljiva 2	^a N	Grupa	^b Koeficijent korelacije	p vrednost
SOD, MMP-9 i miRNK-146a/155 korelacije					
SOD	miRNK-146a	24	HP pre	r = 0.909	p < 0.001
SOD	miRNK-155	21	HP pre	r = 0.907	p < 0.001
SOD	miRNK-146a	21	HP posle	r = 0.832	p < 0.001
SOD	miRNK-155	21	HP posle	r = 0.802	p < 0.001
SOD	miRNK-146a	21	HPDM pre	r = 0.779	p < 0.001
SOD	miRNK-155	21	HPDM pre	r = 0.760	p < 0.001
SOD	miRNK-146a	21	HPDM posle	r = 0.525	p = 0.014
SOD	miRNK-155	19	HPDM posle	r = 0.290	p = 0.228
miRNK-146a	miRNK-155	21	HP pre	r = 0.978	p < 0.001
miRNK-146a	miRNK-155	21	HP posle	r = 0.950	p < 0.001
miRNK-146a	miRNK-155	21	HPDM pre	r = 0.962	p < 0.001
miRNK-146a	miRNK-155	19	HPDM posle	r = 0.819	p < 0.001
MMP-9	miRNK-146a	15	HP pre	r = 0.272	p = 0.324
MMP-9	miRNK-155	13	HP pre	r = 0.113	p = 0.711
MMP-9	miRNK-146a	15	HP posle	r = -0.115	p = 0.673
MMP-9	miRNK-155	13	HP posle	r = -0.331	p = 0.902
MMP-9	miRNK-146a	12	HPDM pre	r = -0.003	p = 0.987
MMP-9	miRNK-155	11	HPDM pre	r = -0.196	p = 0.551
MMP-9	miRNK-146a	12	HPDM posle	r = 0.274	p = 0.386
MMP-9	miRNK-155	9	HPDM posle	r = 0.067	p = 0.868

^aN-broj ispitanika. ^bKoeficijent korelacije. p vrednosti < 0.05 smatrane su statistički značajnim

Tabela 4.9. Rezultati analize povezanosti nivoa ekspresije molekula miRNK-146a i miRNK-155 kao i aktivnosti enzima SOD-e, koncentracije molekula MMP-9 sa dubinom sondiranja u HP i HPDM grupama pre i nakon kauzalne terapije

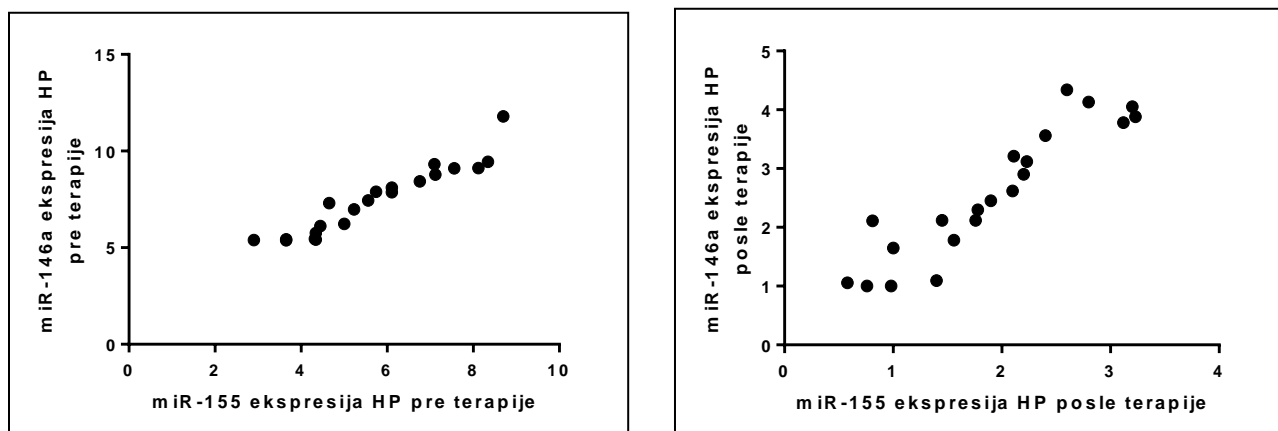
Promenljiva 1	Promenljiva 2	^a N	Grupa	^b Koeficijent korelacije	p vrednost
Dubina sondiranja, SOD, MMP-9 i miRNK-146a/155 korelacije					
DS	miRNK-146a	13	HP pre	r = -0.239	p = 0.354
DS	miRNK-155	13	HP pre	r = 0.153	p = 0.622
DS	SOD	13	HP pre	r = 0.201	p = 0.516
DS	MMP-9	13	HP pre	r = -0.115	p = 0.380
DS	miRNK-146a	13	HP posle	r = -0.198	p = 0.367
DS	miRNK-155	13	HP posle	r = -0.216	p = 0.334
DS	SOD	11	HP posle	r = -0.237	p = 0.286
DS	MMP-9	13	HP posle	r = 0.143	p = 0.637
DS	miRNK-146a	9	HPDM pre	r = 0.280	p = 0.305
DS	miRNK-155	9	HPDM pre	r = 0.559	p = 0.127
DS	SOD	8	HPDM pre	r = -0.222	p = 0.436
DS	MMP-9	9	HPDM pre	r = -0.524	p = 0.075
DS	miRNK-146a	9	HPDM posle	r = 0.089	p = 0.905
DS	miRNK-155	9	HPDM posle	r = 0.260	p = 0.556
DS	SOD	8	HPDM posle	r = -0.218	p = 0.343
DS	MMP-9	9	HPDM posle	r = -0.348	p = 0.159

Tabela 4.10. Rezultati analize povezanosti nivoa ekspresije molekula miRNK-146a i miRNK-155, kao i aktivnosti enzima SOD-e i koncentracije MMP-9 sa nivoom pripojnog epitela u HP i HPDM grupama pre i nakon kauzalne terapije

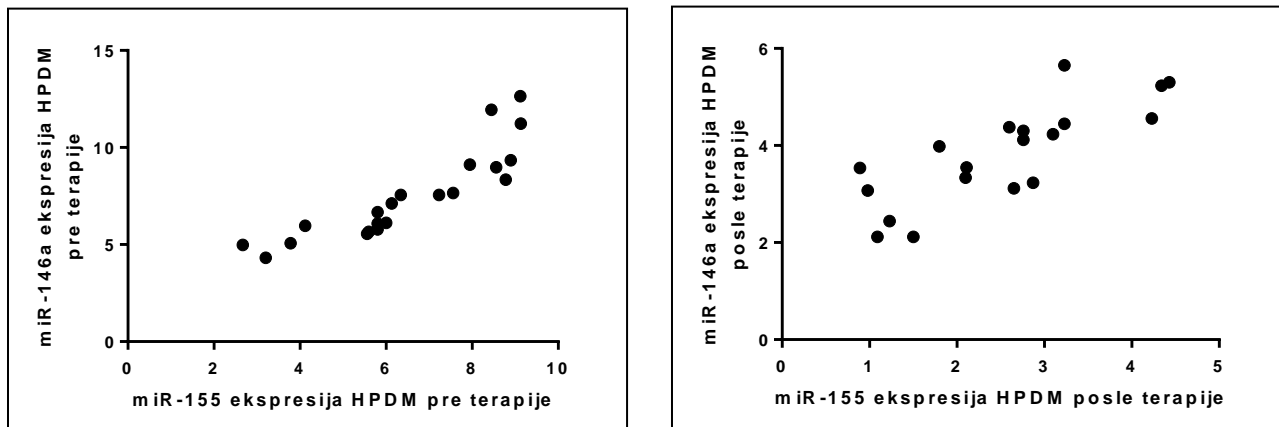
Promenljiv	Promenljiva 2	^a N	Grupa	^b Koeficijent korelacije	p vrednost
a 1					
Nivo pripojenog epitela, SOD, MMP-9 i miRNK-146a/155 korelacije					
NPE	miRNK-146a	16	HP pre	r = 0.073	p = 0.791
NPE	miRNK-155	16	HP pre	r = 0.623	p = 0.048
NPE	SOD	16	HP pre	r = 0.159	p = 0.556
NPE	MMP9	15	HP pre	r = -0.431	p = 0.043
NPE	miRNK-146a	16	HP posle	r = -0.275	p = 0.217
NPE	miRNK-155	16	HP posle	r = -0.070	p = 0.655
NPE	SOD	14	HP posle	r = -0.092	p = 0.611
NPE	MMP9	15	HP posle	r = 0.058	p = 0.836
NPE	miRNK-146a	9	HPDM pre	r = 0.656	p = 0.043
NPE	miRNK-155	9	HPDM pre	r = 0.046	p = 0.908
NPE	SOD	8	HPDM pre	r = -0.546	p = 0.056
NPE	MMP9	9	HPDM pre	r = -0.380	p = 0.166
NPE	miRNK-146a	9	HPDM posle	r = 0.452	p = 0.261
NPE	miRNK-155	9	HPDM posle	r = -0.387	p = 0.193
NPE	SOD	8	HPDM posle	r = -0.124	p = 0.524
NPE	MMP9	9	HPDM posle	r = 0.227	p = 0.587

4.7.1. Rezultati analize povezanosti ekspresije molekula miRNK-146a i miRNK-155 u HP i HPDM grupama pre i posle terapije

Primenom Spirmanovog korelacionog testa rezultati naše studije su pokazali da postoji statistički značajna pozitivna korelacija između nivoa ekspresije molekula miRNK-146a i molekula miRNK-155 u grupama HP i HPDM pre i nakon primenjene terapije ($r=0.978$, $p<0.001$; $r=0.950$, $p<0.001$; $r=0.962$, $p<0.001$; $r=0.819$, $p<0.001$, **Tabela 4.8.**, **Slika 4.1.** i **Slika 4.2.**).



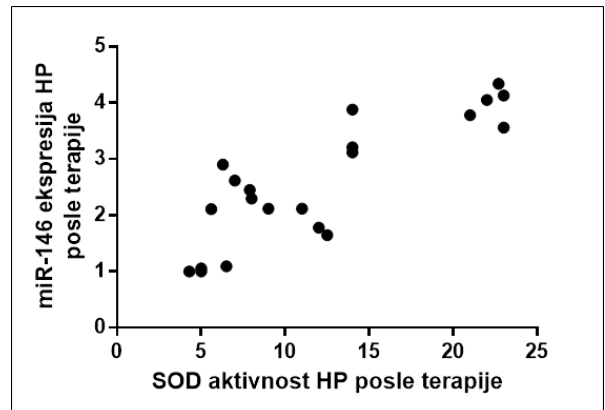
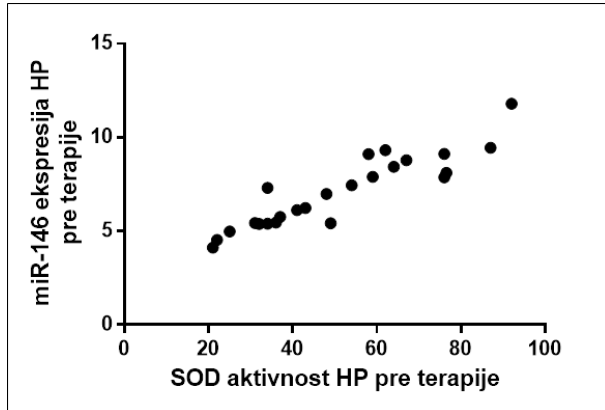
Slika 4.1. Korelacija između nivoa ekspresije molekula miRNK-155 i miRNK-146a u HP grupi pre i nakon kauzalne terapije



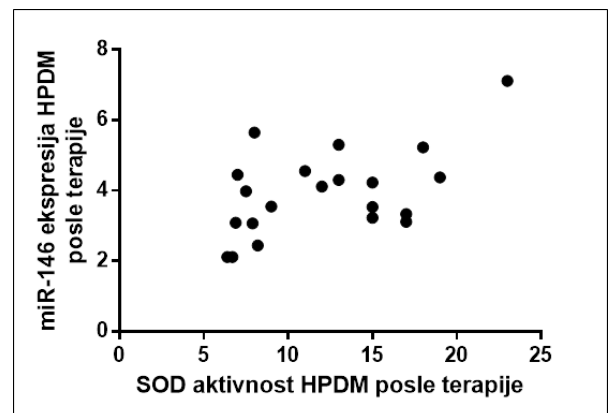
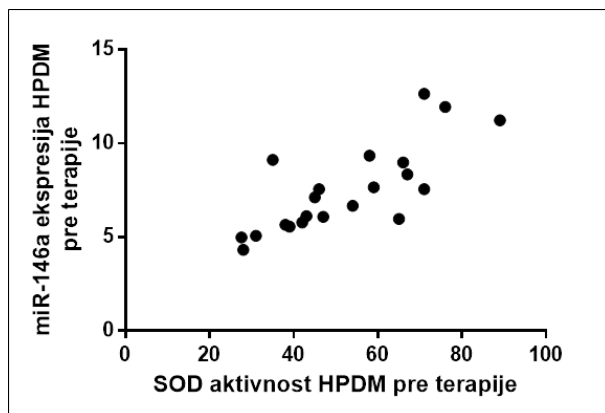
Slika 4.2. Korelacija između nivoa ekspresije molekula miRNK-155 i miRNK-146a u HPDM grupi pre i nakon kauzalne terapije

4.7.2. Rezultati analize povezanosti aktivnosti enzima SOD-e i nivoa ekspresije molekula miRNK-146a u HP i HPDM grupama pre i posle terapije

Rezultati naše studije su pokazali postojanje jake pozitivne korelacije između dobijenih vrednosti aktivnosti enzima SOD-e i vrednosti nivoa ekspresije molekula miRNK-146a u HP i HPDM grupama pre terapije ($r=0.909$, $p<0.001$; $r=0.832$, $p<0.001$) i nakon primenjene terapije ($r=0.779$, $p<0.001$; $\rho=0.525$, $p<0.001$) (**Tabela 4.8. Slika 4.3. Slika 4.4.**).



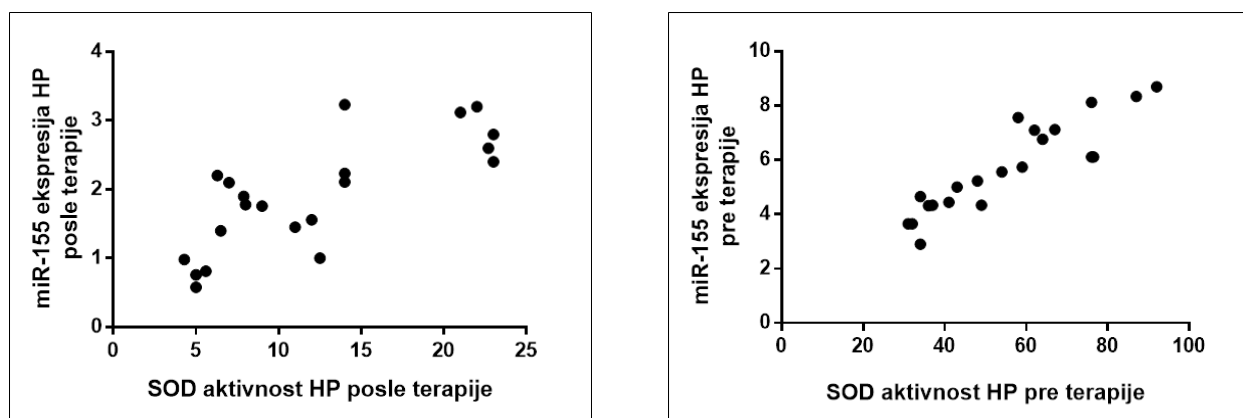
Slika 4.3. Korelacija između nivoa aktivnosti enzima SOD-e i nivoa ekspresije molekula miRNK-146a u HP grupi pre i nakon kauzalne terapije



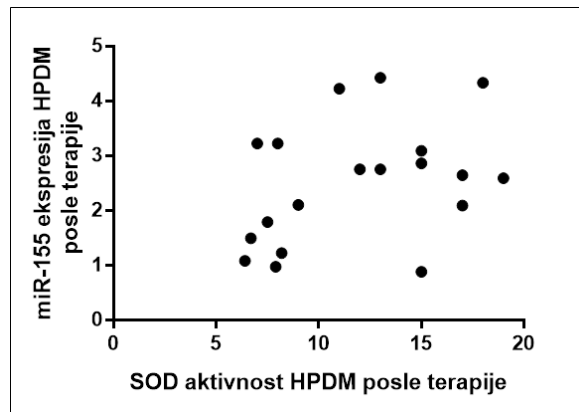
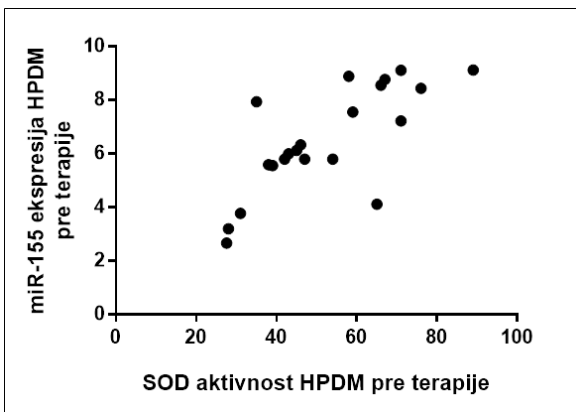
Slika 4.4. Korelacija između nivoa aktivnosti enzima SOD-e i nivoa ekspresije molekula miRNK-146a u HPDM grupi pre i nakon kauzalne terapije

4.7.3. Rezultati analize povezanosti aktivnosti enzima SOD-e i nivoa ekspresije molekula miRNK-155 u HP i HPDM grupama pre i posle terapije

Primenom Spirmanovog korelacionog testa je bila dobijena statistički značajna pozitivna korelacija između nivoa aktivnosti enzima SOD-e i nivoa ekspresije molekula miRNK-155 u HP grupi ispitanika pre i nakon primenjene kauzalne terapije, kao i u HPDM grupi pre primenjene terapije ($r=0.907$, $p<0.001$; $r=0.802$, $p<0.001$; $r=0.760$, $p<0.001$, **Tabela 4.8., Slika 4.5. i Slika 4.6.**). Jedino u HPDM grupi posle kauzalne terapije nije bila pokazana statistički značajna korelacija između ova dva parametra. (**Tabela 4.8. Slika 4.5. Slika 4.6.**).



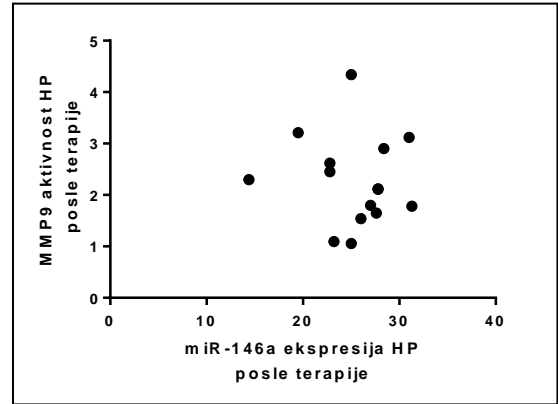
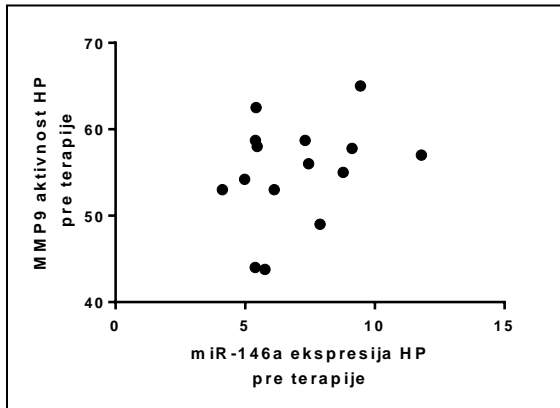
Slika 4.5. Korelacija između aktivnosti enzima SOD-e i nivoa ekspresije molekula miRNK-155 u HP grupi pre i nakon kauzalne terapije



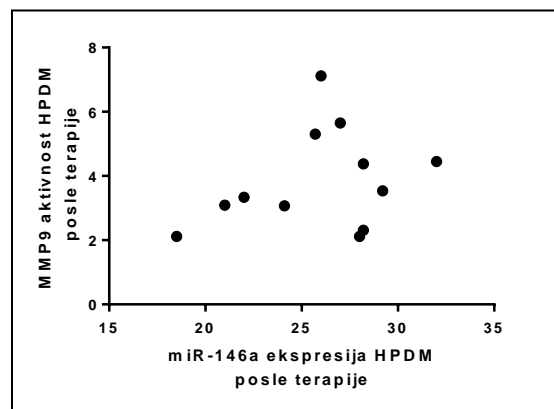
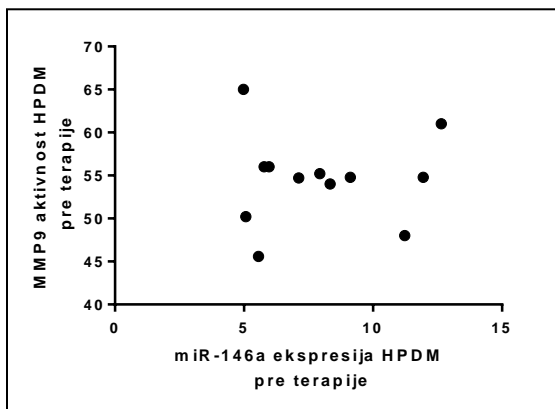
Slika 4.6. Korelacija između aktivnosti enzima SOD-e i nivoa ekspresije molekula miRNK-155 u HPDM grupi pre i nakon kauzalne terapije

4.7.4. Rezultati analize povezanosti koncentracije molekula MMP-9 i nivoa ekspresije molekula miRNK-146a u HP i HPDM grupama pre i posle terapije

Statistički značajna korelacija između vrednosti koncentracije molekula MMP-9 i nivoa ekspresije molekula miRNK-146a nije bila uočena ni u jednoj od grupa obolelih od parodontopatije (HP i HPDM) ni pre, kao ni nakon primenjene kauzalne terapije ($r = -0.115$, $p = 0.673$; $r = -0.003$, $p = 0.987$, **Tabela 4.8.**, **Slika 4.7.** i **Slika 4.8.**).



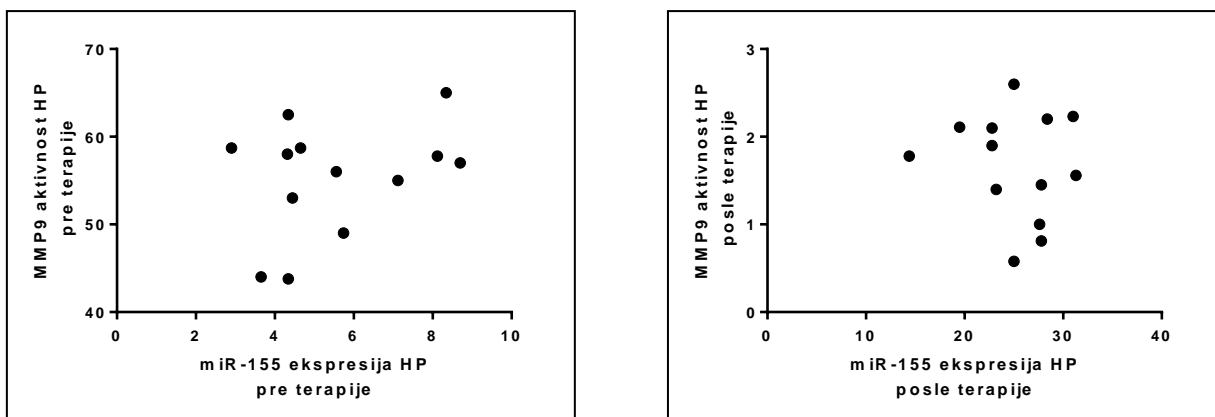
Slika 4.7. Korelacija između nivoa ekspresije molekula miRNK-146-a i koncentracije MMP-9 u HP grupi pre i nakon kauzalne terapije



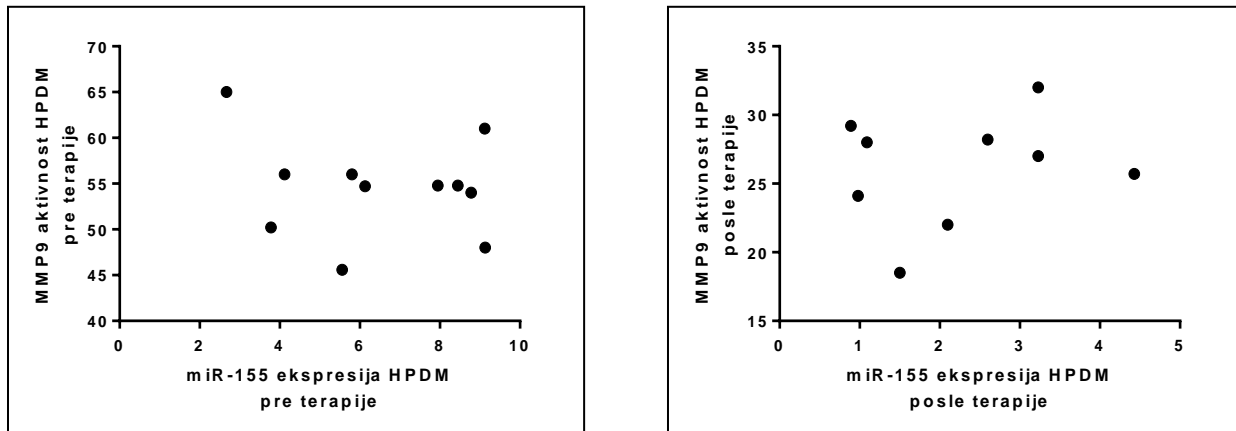
Slika 4.8. Korelacija između nivoa ekspresije molekula miRNK-146-a i koncentracije MMP-9 u HPDM grupi pre i nakon kauzalne terapije

4.7.5. Rezultati analize povezanosti koncentracije molekula MMP-9 i nivoa ekspresije molekula miRNK-155 u HP i HPDM grupama pre i posle terapije

Statistički značajna korelacija između vrednosti koncentracije molekula MMP-9 i nivoa ekspresije molekula miRNK-155 nije bila uočena ni u jednoj od grupa obolelih od parodontopatije (HP i HPDM) ni pre, kao ni nakon kauzalne terapije ($r=-0.331$, $p=0.950$; $r=-0.196$, $p=0.551$, **Tabela 4.8., Slika 4.9. i Slika 4.10.**).



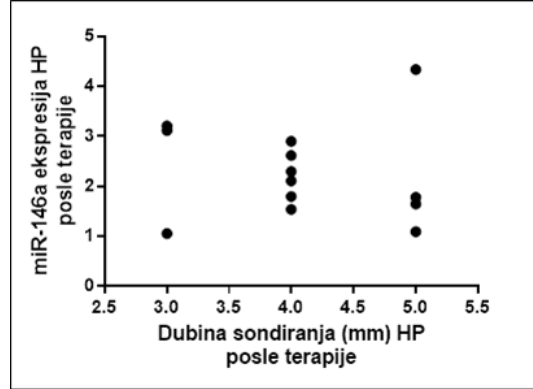
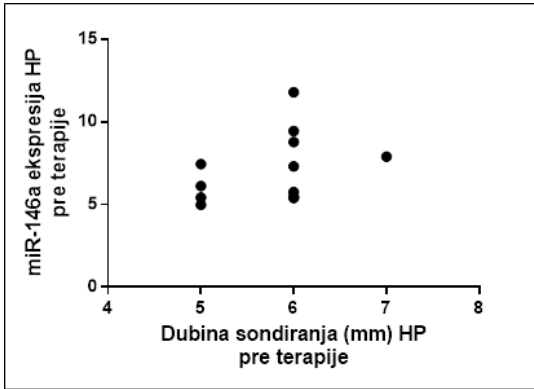
Slika 4.9. Korelacija između nivoa ekspresije molekula miRNK-155 i koncentracije molekula MMP-9 u HP grupi pre i nakon kauzalne terapije



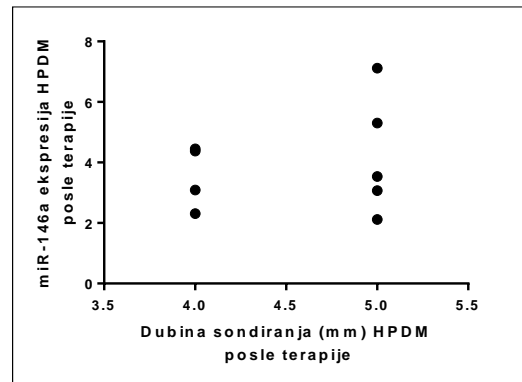
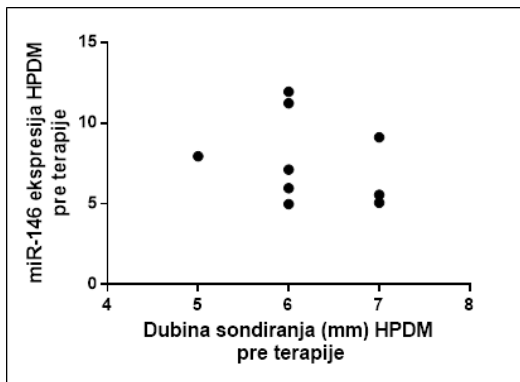
Slika 4.10. Korelacija između nivoa ekspresije molekula miRNK-155 i koncentracije molekula MMP-9 u HPDM grupi pre i nakon kauzalne terapije

4.7.6. Rezultati analize povezanosti vrednosti dubine sondiranja i nivoa ekspresije molekula miRNK-146a u HP i HPDM grupama pre i posle terapije

Rezultati naše studije nisu pokazali statistički značajnu korelaciju između vrednosti dubine sondiranja i vrednosti nivoa ekspresije molekula miRNK-146a ni u jednoj od grupa ispitanika obolelih od hronične parodontopatije (HP i HPDM) ni pre, kao ni nakon primenjene kauzalne terapije ($r=-0.239$, $p=0.354$; $r=-0.198$, $p=0.367$; $r=0.280$, $p=0.305$; $r=0.089$, $p=0.905$; **Tabela 4.9., Slika 4.11. i Slika 4.12.**).



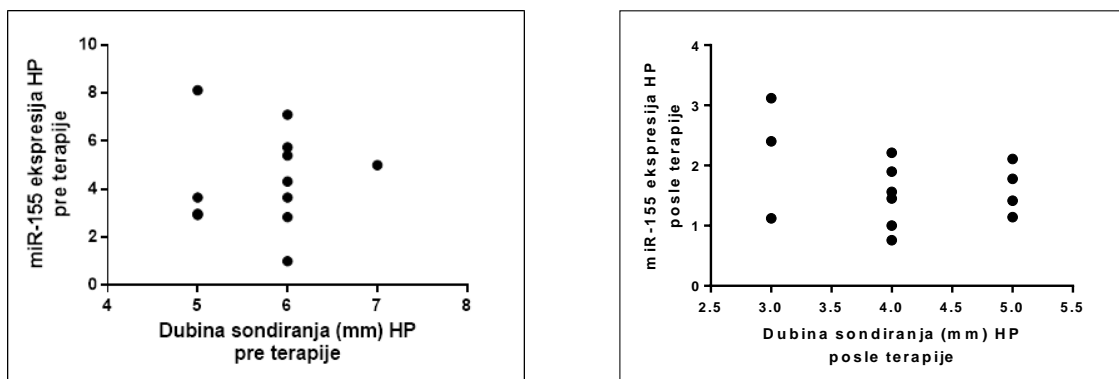
Slika 4.11. Korelacija između vrednosti dubine sondiranja i nivoa ekspresije molekula miRNK-146-a u HP grupi pre i nakon kauzalne terapije



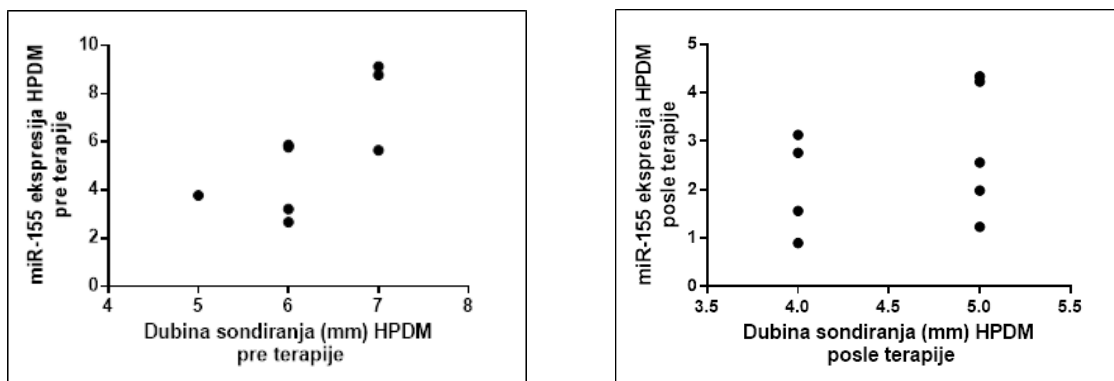
Slika 4.12. Korelacija između vrednosti dubine sondiranja i nivoa ekspresije molekula miRNK-146-a u HPDM grupi pre i nakon kauzalne terapije

4.7.7. Rezultati analize povezanosti vrednosti dubine sondiranja i nivoa ekspresije molekula miRNK-155 u HP i HPDM grupama pre i posle terapije

Rezultatima naše studije nismo dobili statistički značajnu korelaciju između vrednosti dubine sondiranja i vrednosti nivoa ekspresije molekula mikroRNK-155 ni u jednoj od grupa ispitanika obolelih od hronične parodontopatije (HP i HPDM) ni pre, kao ni nakon primenjene kauzalne terapije ($r=0.153$, $p=0.622$; $r=-0.216$, $p=0.334$; $r=0.559$, $p=0.127$; $r=0.260$, $p=0.556$; Tabela 4.9., Slika 4.13. i Slika 4.14.).



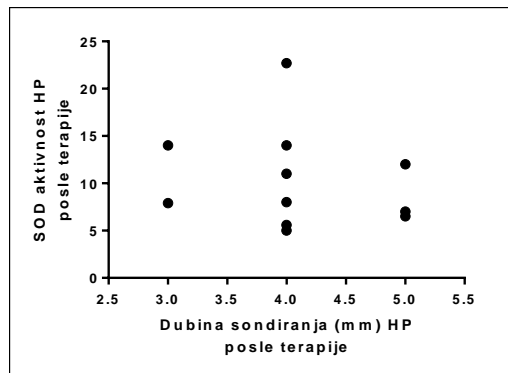
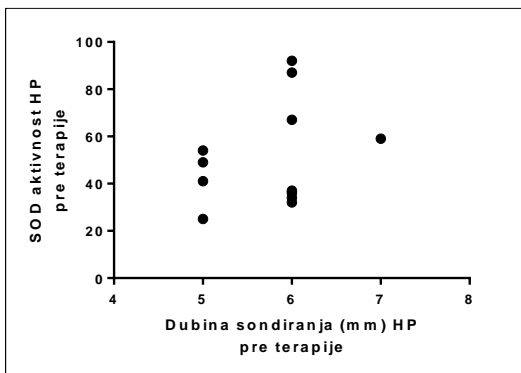
Slika 4.13. Korelacija između vrednosti dubine sondiranja i nivoa ekspresije molekula miRNK-155 u HP grupi pre i nakon terapije



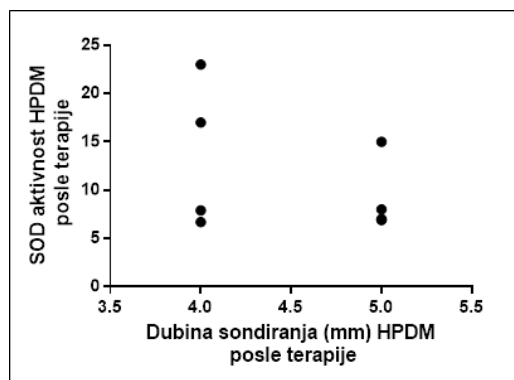
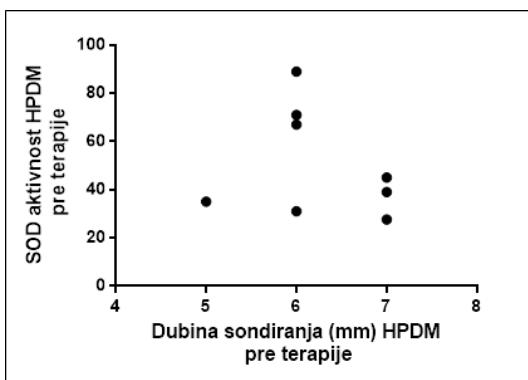
Slika 4.14. Korelacija između vrednosti dubine sondiranja i nivoa ekspresije molekula miRNK-155 u HPDM grupi pre i nakon kauzalne terapije

4.7.8. Rezultati analize povezanosti vrednosti dubine sondiranja i aktivnosti enzima SOD-e u HP i HPDM grupama pre i posle terapije

Statistički značajna korelacija između vrednosti dubine sondiranja i aktivnosti enzima SOD nije bila uočena ni u jednoj od grupa ispitanika obolelih od hronične parodontopatije (HP i HPDM) ni pre, kao ni nakon primenjene kauzalne terapije ($r=0.201$, $p=0.516$; $r=-0.237$, $p=0.286$; $r=-0.222$, $p=0.436$; $r=-0.218$, $p=0.343$; **Tabela 4.9., Slika 4.15. i Slika 4.16.**).



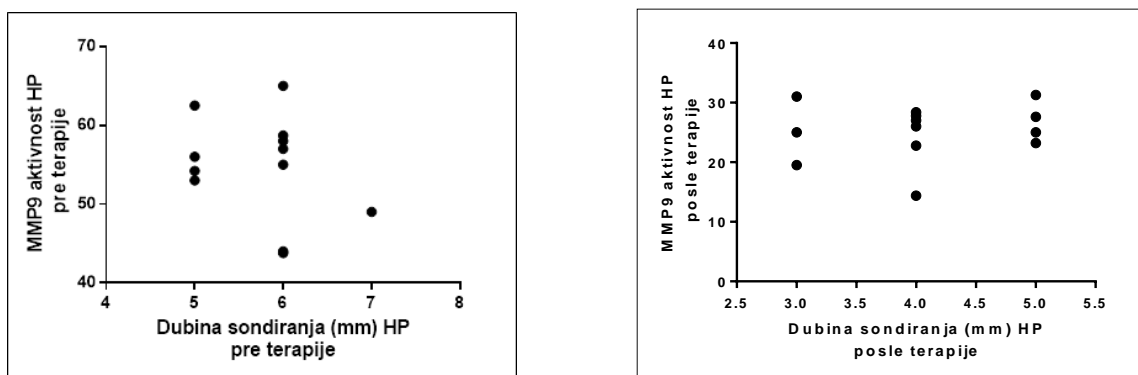
Slika 4.15. Korelacija između vrednosti dubine sondiranja i aktivnosti enzima SOD-e u HP grupi pre i nakon kauzalne terapije



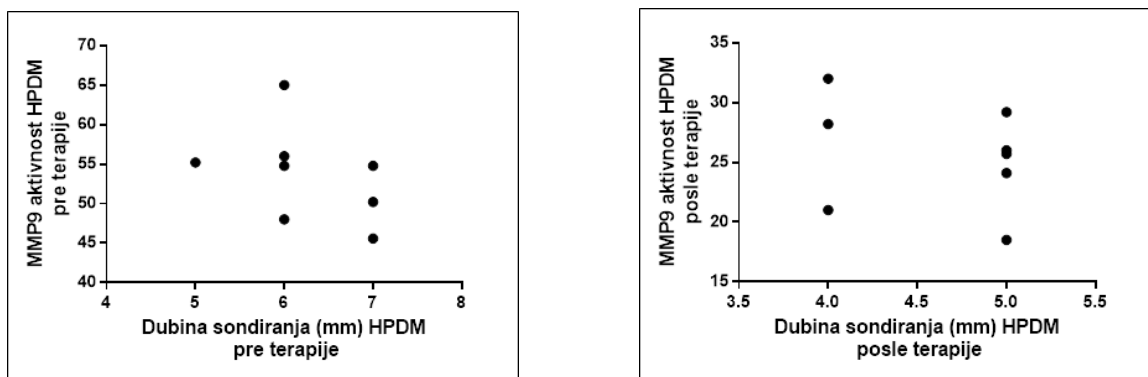
Slika 4.16. Korelacija između vrednosti dubine sondiranja i aktivnosti enzima SOD-e u HPDM grupi pre i nakon kauzalne terapije)

4.7.9. Rezultati analize povezanosti vrednosti dubine sondiranja i koncentracije molekula MMP-9 u HP i HPDM grupama pre i posle terapije

Kod ispitanika obolelih od hronične parodontopatije (HP i HPDM grupa) ni pre, kao ni nakon primenjene kauzalne terapije nije bila dobijena statistički značajna korelacija između vrednosti dubine sondiranja i vrednosti koncentracije molekula MMP-9 ($r=-0.115$, $p=0.380$; $r=0.143$, $p=0.637$; $r=-0.524$, $p=0.075$; $r=-0.348$, $p=0.159$; **Tabela 4.9., Slika 4.17. i Slika 4.18.**)



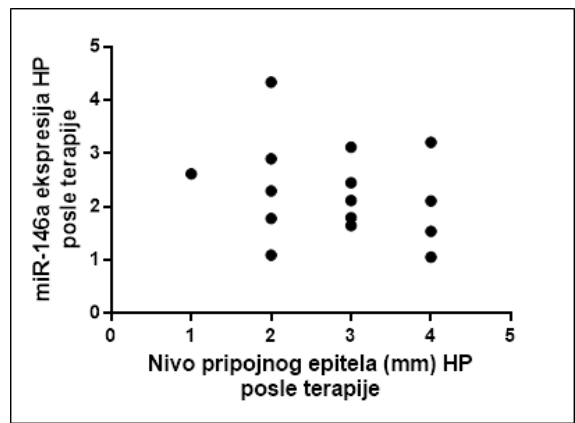
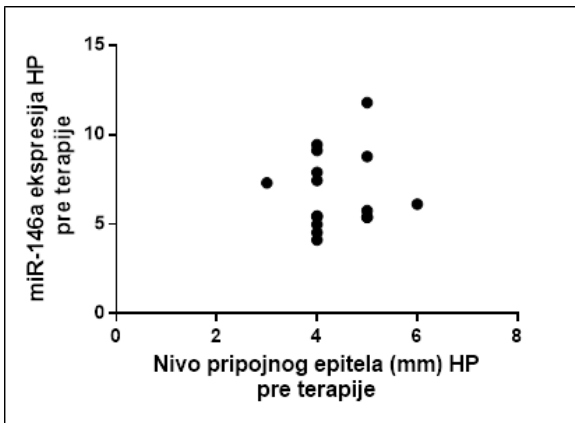
Slika 4.17. Korelacija između vrednosti dubine sondiranja i koncentracije molekula MMP-9 u HP grupi pre i nakon kauzalne terapije



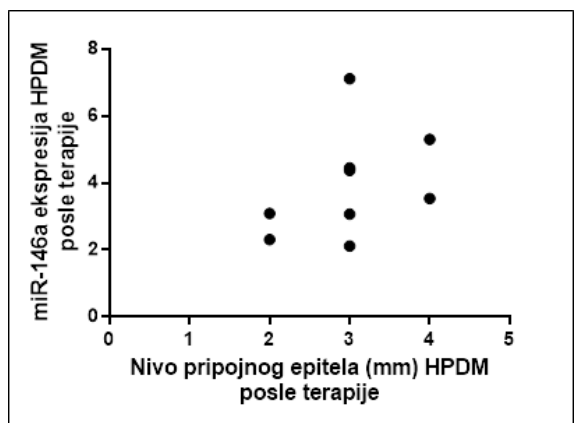
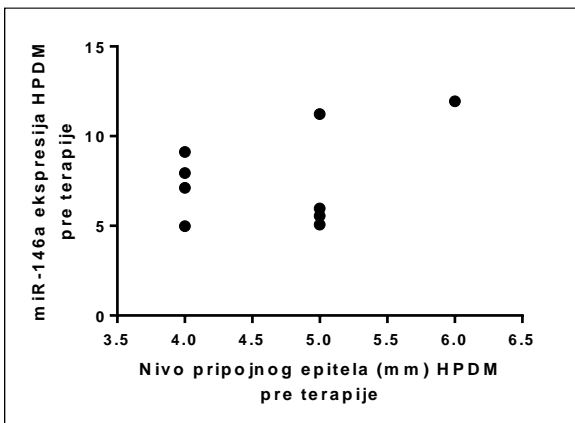
Slika 4.18. Korelacija između vrednosti dubine sondiranja i koncentracije molekula MMP-9 u HPDM grupi pre i nakon kauzalne terapije

4.7.10. Rezultati analize povezanosti vrednosti nivoa pripojnog epitela i nivoa ekspresije molekula miRNK-146a u HP i HPDM grupama pre i posle terapije

Kod ispitanika obolelih od hronične parodontopatije sa udruženim DM tipa 2 je pokazana značajna pozitivna korelacija između vrednosti nivoa pripojnog epitela i vrednosti nivoa ekspresije molekula miRNK-146a ($r=0.623$, $p<0.05$). Međutim, nije utvrđena značajna povezanost između ovih parametara u HP grupi (**Tabela 4.10.**, **Slika 4.19.** i **Slika 4.20.**).



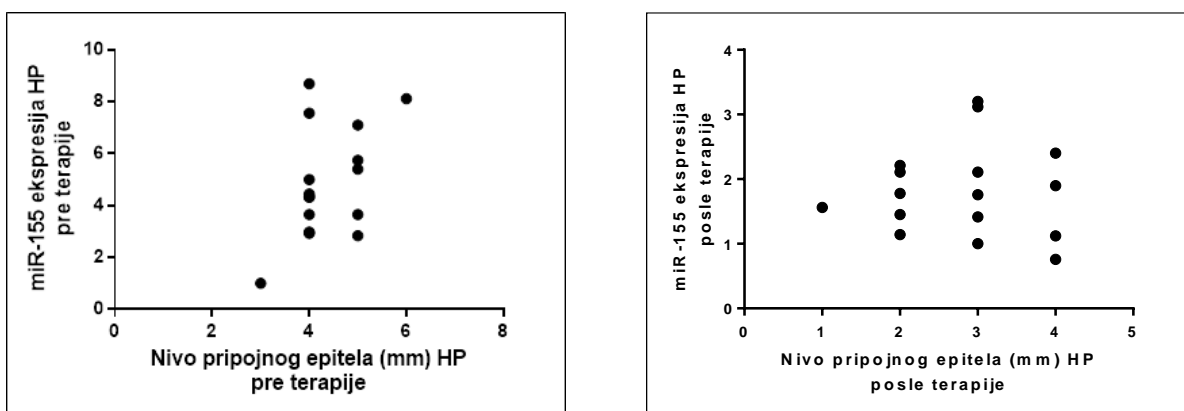
Slika 4.19. Korelacija između vrednosti nivoa pripojnog epitela i vrednosti ekspresije molekula miRNK-146a u HP grupi pre i nakon kauzalne terapije



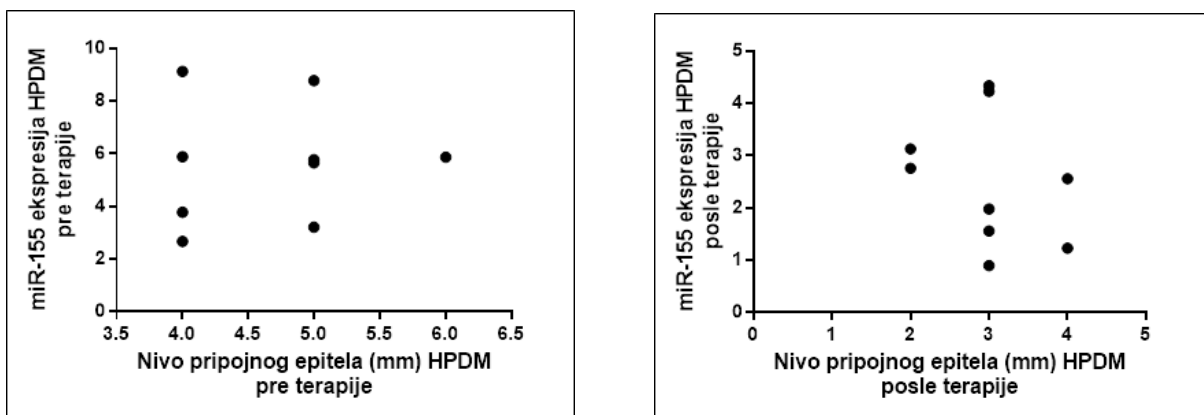
Slika 4.20. Korelacija između vrednosti nivoa pripojnog epitela i vrednosti ekspresije molekula miRNK-146a u HPDM grupi pre i nakon kauzalne terapije

4.7.11. Rezultati analize povezanosti vrednosti nivoa pripojnog epitela i nivoa ekspresije molekula miRNK-155 u HP i HPDM grupama pre i posle terapije

U grupi pacijenata sa hroničnom parodontopatijom (HP) je dobijena statistički značajna korelacija između vrednosti nivoa pripojnog epitela i vrednosti nivoa ekspresije molekula miRNK-155 ($r=0.623$, $p<0.05$). Međutim, statistički značajna povezanost između ova dva parametra nije pokazana u grupi HPDM (Tabela 4.10., Slika 4.21. i Slika 4.22.).



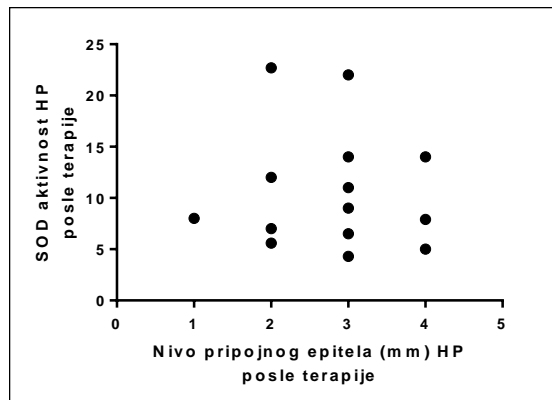
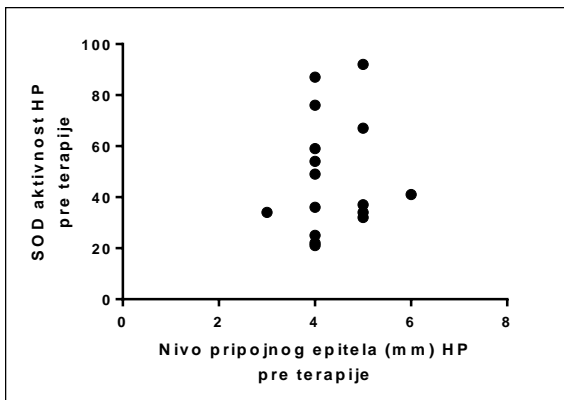
Slika 4.21. Korelacija između vrednosti nivoa pripojnog epitela i vrednosti ekspresije molekula miRNK-155 u HP grupi pre i nakon kauzalne terapije



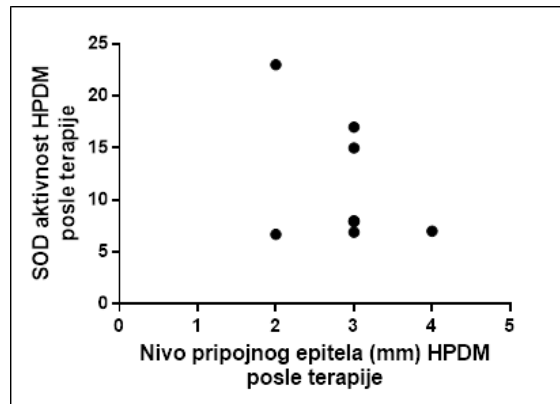
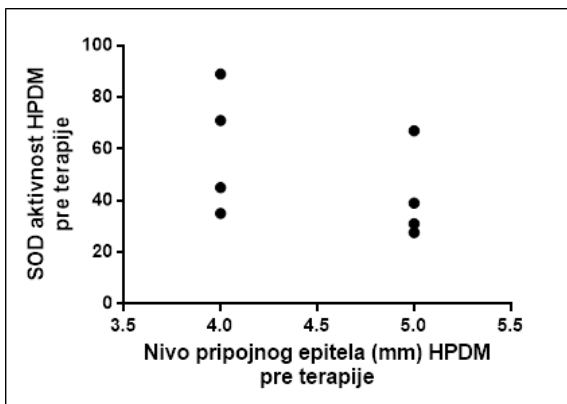
Slika 4.22. Korelacija između vrednosti nivoa pripojnog epitela i vrednosti ekspresije molekula miRNK-155 u HPDM grupi pre i nakon kauzalne terapije

4.7.12. Rezultati analize povezanosti vrednosti nivoa pripojnog epitela i aktivnosti enzima SOD-e u HP i HPDM grupama pre i posle terapije

Rezultatima naše studije nije bila dobijena statistički značajna korelacija između vrednosti nivoa pripojnog epitela i vrednosti aktivnosti enzima SOD-e kod ispitanika obolelih od hronične parodontopatije (HP i HPDM grupe) ni pre, kao ni nakon primenjene kauzalne terapije. ($r=-0.546$, $p=0.056$; **Tabela 4.10.**, **Slika 4.23.** i **Slika 4.24.**).



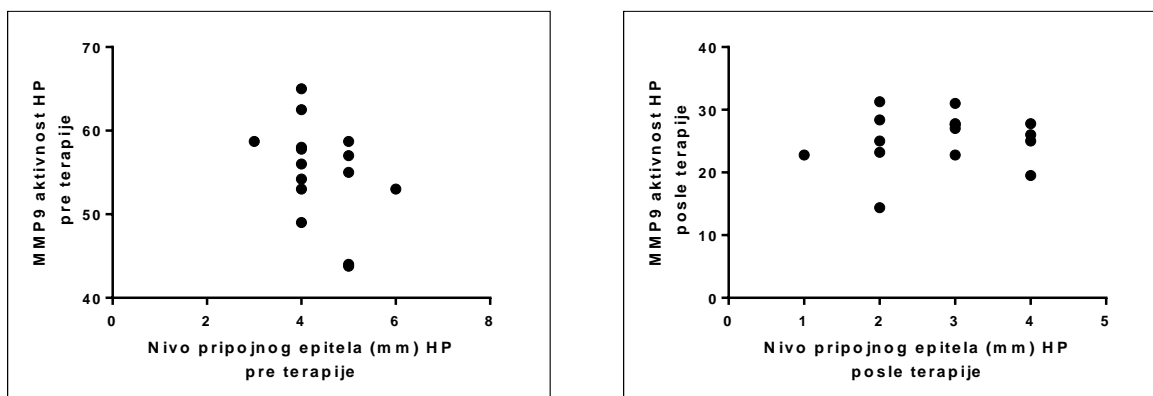
Slika 4.23. Korelacija između vrednosti nivoa pripojnog epitela i aktivnosti enzima SOD-e u HP grupi pre i nakon kauzalne terapije



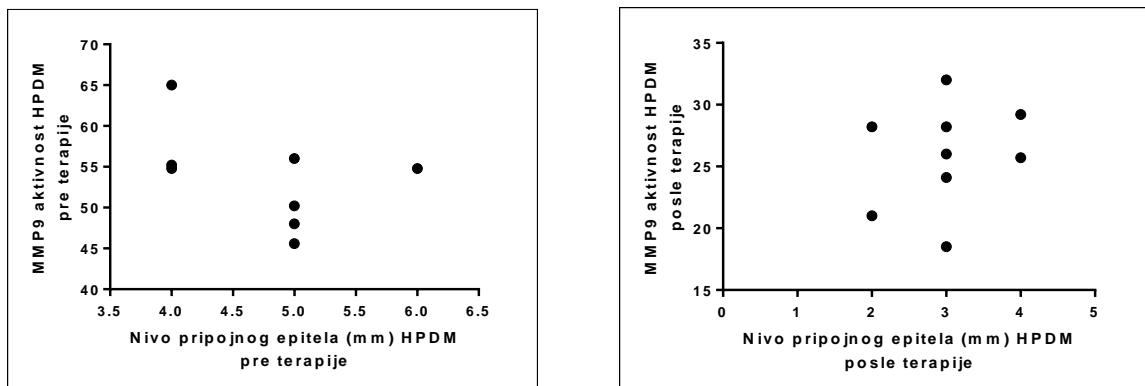
Slika 4.24. Korelacija između vrednosti nivoa pripojnog epitela i aktivnosti enzima SOD-e u HPDM grupi pre i nakon kauzalne terapije

4.7.13. Rezultati analize povezanosti vrednosti nivoa pripojnog epitela i koncentracije molekula MMP-9 u HP i HPDM grupama pre i posle terapije

U HP grupi pre primenjene terapije smo uočili statistički značajnu negativnu korelaciju ($r=-0.431$, $p=0.043$) dok kod ispitanika obolelih od hronične parodontopatije (HPDM grupa) ni pre, kao ni nakon primenjene kauzalne terapije nije bila dobijena statistički značajna korelacija između vrednosti nivoa pripojnog epitela i vrednosti koncentracije molekula MMP-9 (; **Tabela 4.10.**, **Slika 4.25.** i **Slika 4.26.**).



Slika 4.25. Korelacija između vrednosti nivoa pripojnog epitela i koncentracije molekula MMP-9 u HP grupi pre i nakon kauzalne terapije



Slika 4.26. Korelacija između vrednosti nivoa pripojnog epitela i koncentracije molekula MMP-9 u HPDM grupi pre i nakon kauzalne terapije

4.8. Rezultati multiple linearne regresije

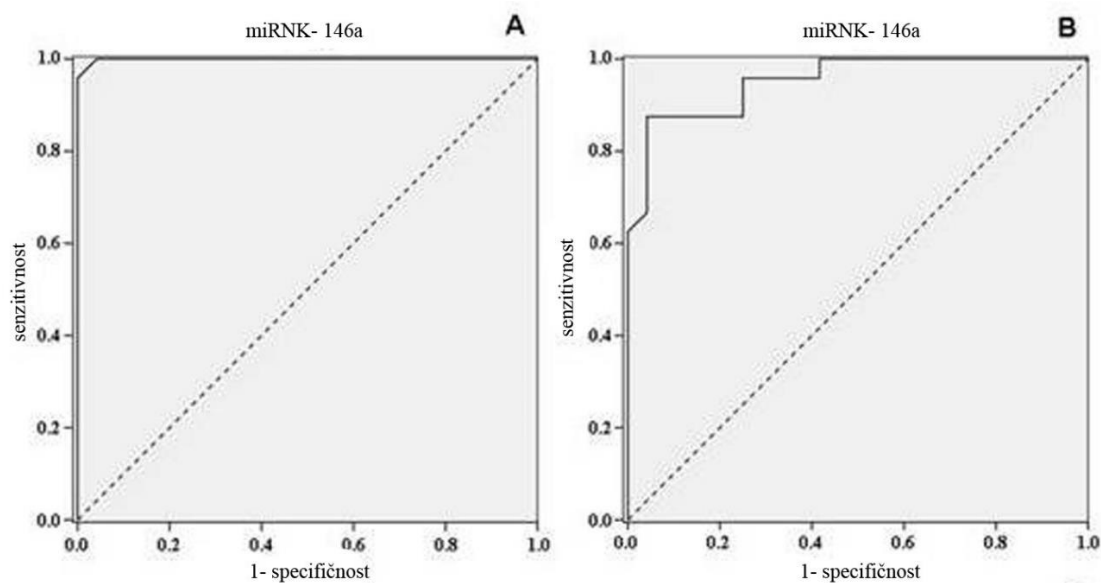
Rezultati dobijeni multiplom linearnom regresijom su pokazali da parodontopatija značajno utiče na ekspresiju miRNK-146a i miRNK-155 u gingivalnoj tečnosti i posle prilagođavanja u odnosu na uzrast i pol (**Tabela 4.11.**).

Tabela 4.11. Rezultati multiple linearne regresije. Povezanost nivoa ekspresije molekula miRNK-146a i miRNK-155 i parodontopatije, prilagođena uzrastu i polu, kod sistemski zdravih ispitanika i obolelih od DM tipa 2

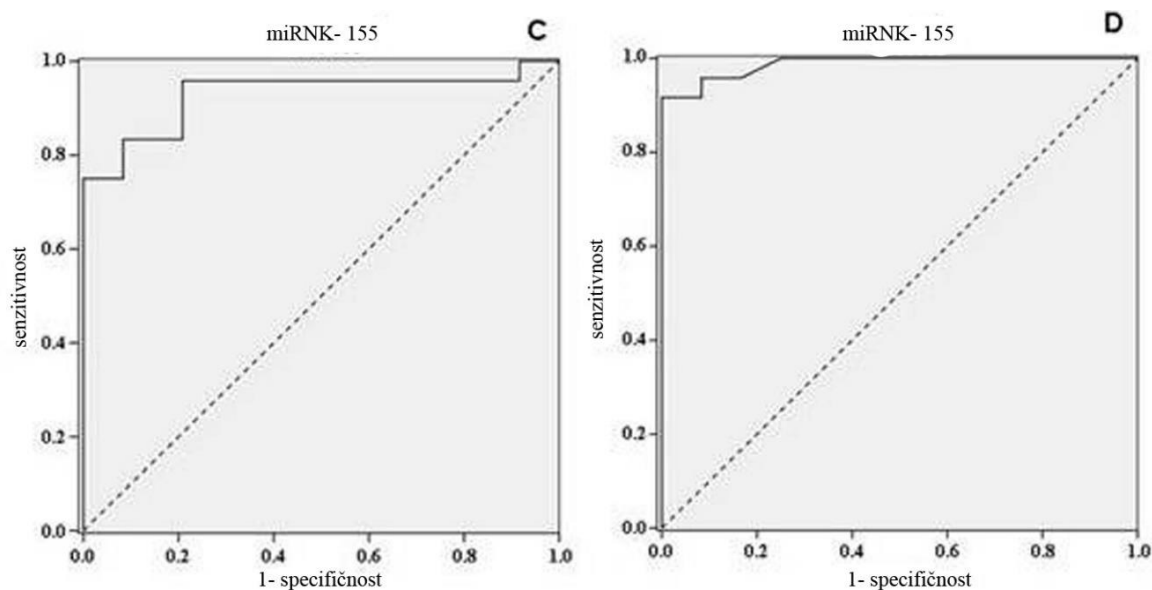
Zavisna varijabla	Nezavisna varijabla	Procena	SE	<i>p</i> vrednost	95% CI
miRNK-146a	Parodontopatija	0.950	0.806	< 0.001	3.629 do 6.879
	Uzrast	-0.118	0.032	0.422	-0.090 do 0.039
	Pol	-0.071	0.426	0.363	-1.251 do 0.467
miRNK-155	Parodontopatija	0.953	0.792	< 0.001	2.444 do 5.637
	Uzrast	-0.286	0.031	0.132	-0.112 do 0.015
	Pol	-0.160	0.419	0.112	-1.522 do 0.166
miRNK-146a (sa DM tip 2)	Parodontopatija	-0.882	1.111	< 0.001	-6.518 do -2.041
	Uzrast	-0.174	0.046	0.454	-0.127 do 0.058
	Pol	0.075	0.527	0.485	-0.691 do 1.433
miRNK-155 (sa DM tip 2)	Parodontopatija	-1.013	0.939	< 0.001	-6.983 do -3.199
	Uzrast	-0.211	0.039	0.269	-0.121 do 0.035
	Pol	0.063	0.445	0.473	-0.575 do 1.220

4.9. Dijagnostička moć molekula miRNK-146a i miRNK-155

Dijagnostička moć miRNK-146a i miRNK-155 kao biomarkera u gingivalnoj tečnosti je prikazana pomoću ROC (*eng. receiver operating characteristic*) kriva (**Slika 4.27. i Slika 4.28**) i njihovih odgovarajućih vrednosti (**Tabela 4.12.**).



Slika 4.27. ROC krive za razlikovanje zdravih ispitanika od ispitanika sa hroničnom parodontopatijom koristeći nivoe ekspresije miRNK-146a kod ispitanika u HP grupi (A) i kod ispitanika u HPDM grupi (B) dobijene logističkom regresionom analizom



Slika 4.28. ROC krive za razlikovanje zdravih ispitanika od ispitanika sa hroničnom parodontopatijom koristeći nivoe ekspresije miRNK-155 kod ispitanika u HP grupi (C) i kod ispitanika u HPDM grupi (D) dobijene logističkom regresionom analizom

ROC krive za obe miRNK u HP i HPDM grupama su pokazivale visoku dijagnostičku preciznost za parodontopatiju s obzirom da su vrednosti AUC za sve krive bile $AUC \geq 0.9$. MiRNK-146a je pokazivala najbolje karakteristike sa senzitivnošću od 100%, specifičnošću od 96%, cutoff vrednošću od 4.11 arbitrarnih jedinica u HP grupi ispitanika. U HPDM grupi miRNK-155 je pokazivala najbolje karakteristike sa senzitivnošću od 72%, specifičnošću od 100% i cutoff vrednošću od 3.56 arbitrarnih jedinica (**Tabela 4.12.**).


Tabela 4.12. Preciznost molekula miRNK-146a i miRNK- 155 kao biomarkera za dijagnozu hronične parodontopatije u HP i HPDM grupama

Biomarker	AUC	Cutoff	Senzitivnost	1-Specificnost	Youden-ov indeks
miRNK-146a (HP)	0.999	4.11	1.00	0.04	0.96
miRNK-146a (HPDM)	0.952	5.45	0.88	0.04	0.83
miRNK-155 (HP)	0.929	2.70	0.96	0.21	0.75
miRNK-155 (HPDM)	0.988	3.56	0.92	0.00	0.92

AUC- prostor ispod krive (eng. *area under the curve*)

4.10. Rezultati in silico analize

U ovom istraživanju koristili smo ComiR internet softver za kombinatornu predikciju zajedničkih targeta za miRNK-146a i miRNK-155. Upotrebom ovog softvera rezultati koji su bili dobijeni našom studijom su ukazivali na visoku verovatnoću da iRNK SOD2 bude prepoznata od strane ispitivanih miRNK, izražena kao vrednost od 0.924 (eng. *equal abundance*) za iRNK SOD2 (Slika 4.29.).



ComiR: Combinatorial miRNA target prediction tool

Go to help page | New Submission

Thank you for using the ComiR server. The ComiR scores computed for the inputed miRNA sets are shown in the table at the bottom of the page.

Modify Results Table

Show genes with ComiR score greater than in at least one sample.

Sort table by Decreasing order

Show rank or score

Ensembl_ID	Entrez_ID	Gene_name	equal_abundance
ENSG00000108219	81619	TSPAN14	0.9241
ENSG00000100784	9252	RPS6KA5	0.9241
ENSG00000065135	2773	GNAI3	0.9241
ENSG00000145012	4026	LPP	0.9241
ENSG00000115919	8942	KYNU	0.924
ENSG00000143252	6391	SDHC	0.924
ENSG00000112096	6648 100129518	SOD2	0.924
ENSG00000206579	114786	XKR4	0.924
ENSG00000104290	7976	FZD3	0.9238
ENSG00000138443	10152	ABI2	0.9238

Slika 4.29. Prikaz dobijenih rezultata upotrebom softvera ComiR

5. DISKUSIJA

Tokom inflamacije u parodontijumu dolazi do povećane produkcije gingivalne tečnosti. Zahvaljujući njenoj specifičnosti, kao serumskog inflamatornog eksudata produkovanog iz gingivalnog tkiva, je pokazano da verno reprezentuje stanje lokalne inflamatorne reakcije parodontalnih tkiva, mnogo pouzdanije nego pljuvačka ili serum (Barros i sar., 2016). Sa druge strane imajući u vidu da cirkulatorne miRNK zbog svoje stabilnosti i specifičnih funkcija predstavljaju pouzdanije biomarkere inflamatornih stanja u odnosu na proteine ili bakterijske produkte (Kim i sar., 2015), u ovoj studiji po prvi put su izolovani i analizirani molekuli miRNK-146a i miRNK-155 u gingivalnoj tečnosti pacijenata sa hroničnom parodontopatijom sistemski zdravih i obolelih od DM tipa 2. Takođe je po prvi put praćen i uticaj kauzalne terapije parodontopatije na ekspresiju ovih miRNK u gingivalnom eksudatu. Pokazali smo da su miRNK-146a i miRNK-155 iz gingivalnog eksudata dobri dijagnostički biomarkeri hronične parodontopatije i kod sistemski zdravih i kod obolelih od DM tipa 2, kao i da u kompleksnoj interakciji ove miRNK, sa velikom verovatnoćom regulišu aktivnost enzima SOD-e, sugerišući da njihova uloga u parodontopatiji verovatno uključuje i regulaciju oksidativnog stresa.

Treba napomenuti da je pre objavljivanja rezultata naše studije objavljena jedna pilot studija, u kojoj su analizirani nivoi ekspresije oko 40 različitih cirkulatornih miRNK u gingivalnoj tečnosti kod obolelih od parodontopatije. U toj studiji profilisane su cirkulatorne miRNK iz gingivalne tečnosti svega tri ispitanika obolela od hronične parodontopatije i pet ispitanika sa klinički zdravim parodontijumom (Saito i sar., 2017). Naša studija je prva kohortna studija koja je obuhvatala 96 ispitanika u kojoj smo, pored analize nivoa ekspresije miRNK u grupama ispitanika sa zdravim parodontijumom i obolelih od parodontopatije i udruženog DM-a, analizirali i efekte kauzalne terapije parodontopatije na nivoe ovih biomarkera u gingivalnom eksudatu.

Imajući u vidu da su miRNK-146a i miRNK-155 prisutne u tkivima parodontijuma (Xie i sar., 2011, Jiang i sar., 2015), kao i činjenicu da su miRNK-146a i miRNK-155 snažni aktivatori makrofaga koji indukuju imunski odgovor (Jablonski i sar., 2016, O'Connell i sar., 2007), možemo pretpostaviti da su parodontalna tkiva zajedno sa inflamatornim ćelijama najverovatniji izvori ovih miRNK u gingivalnoj tečnosti.

Naši rezultati pokazuju da su nivoi ekspresije molekula miRNK-146a i miRNK-155 u gingivalnom eksudatu značajno veći kod ispitanika sa hroničnom parodontopatijom i da se njihove vrednosti značajno smanjuju posle kauzalne terapije. Takođe, regresionom analizom je pokazano da su miRNK-146a i miRNK-155 pouzdani biomarkeri hronične parodontopatije nezavisno od pola i starosti pacijenta. Značajno je da su u studiji Xie i saradnika, uzimanjem uzoraka tkiva gingive biopsijom, a koristeći RT-PCR, autori potvrdili prisustvo 12 različitih molekula miRNK koje su pokazivale različitu ekspresiju u zdravim i obolelim tkivima parodontijuma. Od 12 analiziranih miRNK, 10 miRNK, i među njima miRNK-146a, su pokazivale povećanu ekspresiju u inflamiranim parodontalnim tkivima, dok su dve miRNK (od kojih je jedna miRNK-155), pokazivale smanjenu ekspresiju u inflamiranim parodontalnim tkivima u odnosu na zdrava tkiva. Predikcijom ciljnih gena ovih miRNK je pokazano da obe učestvuju u inflamatornim procesima, a da je porast ekspresije miRNK-146a u vezi sa njenom antiinflamatornom ulogom (Xie i sar., 2011). U tom kontekstu je pokazano da inhibiciju miRNK-146a prati oslobađanje IL-1 β , IL-6, IL-10 i TNF- α iz gingivalnih fibroblasta stimulisanih lipopolisaharidom poreklom bakterije *Porphyromonas gingivalis* u *in vitro* uslovima (Xie i sar., 2013a). Sa druge strane, Sipert i saradnici su analizirali nivo ekspresije molekula miRNK-146a i miRNK-155 u humanim fibroblastima stimulisanih lipopolisaharidom iz tri različita tkiva (zubne pulpe, periodoncijuma i gingive). Autori su pokazali četiri puta veću ekspresiju miRNK-146a u gingivalnim fibroblastima u odnosu na druge ispitivane vrste ćelija i dva i po puta smanjenu ekspresiju miRNK-155 (Sipert i sar., 2014). *In vitro* istraživanje Nahid i saradnika je pokazalo da parodontopatogene bakterije dovode uvek do aktivacije miRNK-146a i ponekada do aktivacije miRNK-155 (Nahid i sar., 2011). Kompleksnost uloga miRNK-146a i miRNK-155 u zapaljenju su pokušali da objasne Schulte i saradnici, ispitujući aktivnost ovih miRNK u ovčjim makrofagima. Rezultati ove studije pokazuju da nakon stimulacije lipopolisaharidom prvo se aktivira miRNK-146a, dok se miRNK-155 uključuje naknadno i predstavlja antiinflamatornu odbranu nakon što je antiinflamatorni efekat miRNK-146a prevaziđen (Schulte i sar., 2013). U prilog kompleksnih, međusobno povezanih i isprepletanih uloga ovih miRNK u parodontopatiji, govore i naši rezultati koji su utvrdili povezanost svake zasebno, miRNK-146a i miRNK-155 sa samo jednim kliničkim parametrom parodontopatije (nivoom pripojnog epitela), u različitim grupama pacijenata sa hroničnom parodontopatijom, najverovatnije zbog toga što u kontroli inflamacije ne deluju zasebno, već u interakciji. U prilog postojanja ove interakcije i to sinergističke, govore i naši rezultati o snažnoj

pozitivnoj korelaciji između miRNK-146a i miRNK-155 koju smo opazili u grupama sa parodontopatijom i nezavisno od prisustva DM tipa 2.

U cilju razjašnjenja regulatorne uloge miRNK-146a i miRNK-155 u parodontopatiji primenili smo *in silico* analizu, upotrebom internet softvera za kombinatornu predikciju - ComiR (Coronnello i Benos, 2013). U cilju predikcije potencijalnih ciljnih gena čija je ekspresija regulisana molekulima miRNK-146a i miRNK-155 u ovoj studiji, na osnovu *in silico* analize, SOD₂ iRNK je izdvojena kao najznačajniji ciljni molekul (gen) koje prepoznaju miRNK-146a i miRNK-155 u parodontopatiji. Rezultati ukazuju na veliku mogućnost da iRNK SOD₂ gena bude regulisana od strane ovih molekula sugerišući da miRNK-146a i miRNK-155 u kombinaciji sa izuzetno velikom verovatnoćom regulišu ekspresiju SOD₂ gena i na taj način utiču na regulaciju mehanizama oksidativnog stresa. Da bismo potvrdili rezultate *in silico* analize statistički smo ispitali povezanost ekspresije miRNK-146a i miRNK-155 sa aktivnosti SOD-e u gingivalnom eksudatu i pokazali da postoji statistički značajna pozitivna korelacija između nivoa aktivnosti enzima SOD-e i nivoa ekspresije molekula miRNK-146a i miRNK-155 u grupama ispitanika (HP i HPDM) pre i nakon primenjene kauzalne terapije. Enzim SOD2 je mangan zavisni enzim u mitohondrijama koji katalizuje neutralizaciju superoksidnog anjona u kiseonik i vodonik peroksid (Mates i sar., 1999). U studiji Ji i saradnika u *in vitro* eksperimentima koristeći PC12 ćelijske linije je pokazano je da vodonik peroksid, kao produkt aktivnosti enzima SOD2, indukuje povećanu ekspresiju molekula miRNK-146a koja zatim smanjuje ekspresiju SOD₂ gena (Ji i sar., 2013). Ovim je pokazano da miRNK-146a ima ulogu u finoj regulaciji ekspresije SOD2 gena, a kao jedan od potencijalnih mehanizama je inhibicija translacije proteina. Na ovaj način je identifikovana potencijalna regulatorna uloga ove miRNK u ekspresiji enzima SOD2 na posttranskripcionom nivou.

Imajući u vidu da DM tip 2 odlikuje stanje hronične inflamacije slabog intenziteta od interesa je bilo ispitati da li DM *per se* utiče na nivoe ekspresija ispitivanih antiinflamatornih miRNK u gingivalnom eksudatu. Naši rezultati su pokazali da su vrednosti nivoa ekspresije molekula miRNK-146a, ali ne i miRNK-155, bile veće u gingivalnom eksudatu ispitanika sa zdravim parodontcijumom obolelih od DM tipa 2, u odnosu na sistemski zdrave ispitanike sa zdravim parodontcijumom, što upućuje na povezanost DM tipa 2 i miRNK-146a. U skladu sa ovim rezultatom Rong i saradnici su pronašli povišene vrednosti nivoa ekspresije molekula miRNK-146a u plazmi obolelih od DM tipa 2, ukazujući na to da ekspresija ove cirkulatorne miRNK može

poslužiti kao potencijalni biomarker u krvi obolelih od DM tipa 2 (Rong i sar., 2013). Sa druge strane Wang i Hu su pokazali da je miRNK-146a iz krvi pouzdan biomarker dijabetične periferne neuropatije, kao i da su nivoi ekspresije miRNK-146a u negativnoj korelaciji sa dužinom trajanja oboljenja, kao i sa vrednosti HbA1c (Wang i Xu, 2018).

Poslednjih godina je sve više rezultata studija koji ukazuju da je kod obolelih od DM tipa 2 povećana ekspresija miRNK-146a - fini zaštitni molekularni mehanizam, kojim se vrši utišavanje gena koji kodiraju za proinflamatorne molekule i tako smanjuje rizik od progresije komplikacija DM-a kao što je dijabetična nefropatija (Ye i Steinle, 2016, Bhatt i sar., 2016). U tom kontekstu je pokazano da miRNK-146a učestvuju u negativnoj regulaciji i smanjuje nivo ekspresije i drugih proinflamatornih molekula kao što su TNF α , IL-1, IL-6 i translacioni faktor proinflamatornog signalnog puta - NF κ B, kao i proteina ekstracelularnog matriksa (fibronektin i kolagen 1 α IV) koji su odgovorni za strukturne promene tkiva mrežnjače i bubrega u toku DM-a (Chen i sar., 2017). Ovi autori su pokazali da je antiinflamatorni efekat miRNK-146a posredovan negativnom regulacijom gena koji kodiraju za IRAK1 i TRAF6. Ovakav antiinflamatorni zaštitni efekat miRNK-146a je pokazan i u srčanom tkivu na animalnom modelu DM-a (Feng i sar., 2017).

Sa druge strane, nedavna studija Beltrami i saradnika je pokazala povećanu ekspresiju miRNK-155 u urinu pacijenata sa oboljenjem bubrega udruženim sa DM-om (Beltrami i sar., 2018). Od značaja je i da ekspresija miRNK-155 u serumu može biti povezana sa kontrolom glikemije (Lin i sar., 2016). Naime, ovi autori su, na animalnom modelu dijabetesa, pokazali da povećanje ekspresije miRNK-155 dovodi do hipoglikemije, poboljšava toleranciju glukoze i osetljivost na insulin, koji najverovatnije nije posledica direktnog uticaja miRNK-155 na proliferaciju i funkciju β ćelija pankreasa (Lin i sar., 2016).

DM tip 2, kardiovaskularna oboljenja i parodontopatija su oboljenja koja dele zajednički entitet - stanje hronične inflamacije slabog intenziteta. Danas se zna da ćelije sa niskim sekretornim fenotipom udruženim sa starenjem (SASP) mogu uticati na razvoj ovih oboljenja (Palmer i sar., 2015). Ove ćelije sekretuju mnoštvo medijatora koji doprinose nastanku hronične sistemske inflamacije, slabog intenziteta - „*inflammaging*” (Prattichizzo i sar., 2016b). Takvo stanje hronične inflamacije je uočeno kod obolelih od DM tipa 2 i karakteriše se konstantnom aktivnošću signalnog puta koji je posredovan transkripcionim faktorom NF- κ B odgovornim za transkripciju gena koji kodiraju za proinflamatorne medijatore. Nedavne studije su pokazale da molekuli

miRNK ulaze u sastav sekretovanih materija koje su poreklom ćelija sa SASP (Weilner i sar., 2013). Jedan od molekula povezanih sa procesima inflamacije i procesima udruženim sa starenjem je i miRNK-146a (*inflammation-miRNA, senescence-associated miRNA*) (Saba i sar., 2014). Interesantno je da i pored pokazane značajne uloge miRNK-146a u progresiji DM tipa 2, rezultati naše studije su pokazali da je miRNK-155 bolji biomarker parodontopatije kod ispitanika obolelih od DM tipa 2. Takođe, u našoj studiji ekspresija molekula miRNK-146a u gingivalnoj tečnosti obolelih od hronične parodontopatije nije bila značajno promenjena u prisustvu DM tipa 2. Dobijeni rezultati opet upućuju na kompleksnu ulogu miRNK-146a i miRNK-155 u hroničnoj parodontopatiji kao i potencijalno veći značaj miRNK-155 u inflamatornom odgovoru parodontalnih tkiva kod ispitanika obolelih od DM tipa 2. Imajući u vidu pomenutu studiju Schulte i saradnika možemo pretpostaviti da u uslovima parodontopatije i udruženog DM tipa 2, miRNK-155 ima ulogu strogog regulatora inflamatornog odgovora, nakon što je zbog izraženije inflamacije, koju smo i pokazali kliničkim parametrima parodontopatije u prisustvu DM tipa 2, iscrpljen potencijal regulisanja imunskog odgovora posredstvom miRNK-146a. Ovo može biti jedno od objašnjenja rezultata naše studije da su vrednosti nivoa ekspresije molekula miRNK-155 značajno veće kod ispitanika obolelih od hronične parodontopatije i DM tipa 2 u odnosu na sistemski zdrave ispitanike (bez DM tipa 2), što nije slučaj kada su u pitanju vrednosti nivoa ekspresije molekula miRNK-146a.

Veoma je značajno da naši rezultati pokazuju da kod ispitanika obolelih od DM tipa 2, iako sa dobro kontrolisanom glikemijom ($HbA1C < 8\%$), vrednosti kliničkih parametara inflamacije u parodontocijumu pokazuju značajno veće vrednosti u odnosu na sistemski zdrave ispitanike, što govori o izmenjenom inflamatornom odgovoru u tkivima obolelih od DM tipa 2 (Graves i sar., 2007). Rezultati brojnih istraživanja ukazuju na kompleksnu povezanost parodontopatije sa DM-om (Polak i Shapira, 2018, Taylor i sar., 2013). Iako Taylor i saradnici u svojoj studiji nisu pokazali da DM tip 1 i DM tip 2 imaju uticaja na sastav mikrobiološke flore u biofilmu (Taylor i sar., 2013), rezultati drugih studija kao što su Casarin i saradnici i Zhou i saradnici, analizom rezultata sekvenciranja DNK-a bakterija subgingivalnog biofilma, su pokazali potencijalne razlike u sastavu mikrobiološke flore kod pacijenata obolelih od parodontopatije udružene sa DM-om u odnosu na parodontalno zdrave ispitanike sa DM-om, kao i između sistemski zdravih pacijenata obolelih od parodontopatije i onih sa zdravim parodontocijumom. Tako se kod pacijenata sa zdravim parodontocijumom, zastupljenost bakterija iz rodova *Prevotella*, *Pseudomonas* i *Tannerella*

značajno razlikovala između sistemski zdravih ispitanika i obolelih od DM-a, dok je kod pacijenata sa parodontopatijom, najveća razlika bila u zastupljenosti bakterija iz rodova *Actinomyces* i *Aggregatibacter* (Casarin i sar., 2013, Zhou i sar., 2013). Sa druge strane, kod obolelih od DM tipa 2 u gingivalnoj tečnosti je pokazan povećan nivo proinflammatoryh molekula kao što su: TNF α , IL-1 i IL-6 koji bi mogli da budu uzrok povećanog lokalnog imunskog odgovora na bakterije iz oralnog biofilma i povećane podložnosti parodontopatiji u DM tip 2. (Bastos i sar., 2012, Duarte i sar., 2012, Yang i sar., 2014). Takođe, u prilog činjenici da je izmenjen inflamatorni odgovor u tkivima obolelih od DM tipa 2 govore i rezultati studija koji pokazuju povišene nivoe AGEs i RAGE u tkivu gingive obolelih od hronične parodontopatije udružene sa DM-om u odnosu na sistemski zdrave ispitanike sa parodontopatijom. Naime, studije Lalla i saradnika i Chang i saradnika na eksperimentalnim životinjama (pacovima) su pokazale da se blokiranjem AGEs i njihovih receptora - RAGE, u tkivu gingive posledično smanjuju i nivoi proinflammatoryh medijatora kao što je TNF α i MMP-9 koji su odgovorni za progresiju oštećenja parodontalnih tkiva (Lalla i sar., 2000, Chang i sar., 2014). Treba napomenuti da neki autori ukazuju na oksidativni stres kao patofiziološki mehanizam nastanka parodontopatije kod pacijenata sa DM tipa 2. Naime je pokazano da su nivoi parametara oksidativnog stresa bili značajno veći kod pacijenata sa DM tipa 2, kao i da postoji značajna korelacija između parametara lipidne peroksidacije iz krvi i gingivalnog eksudata ispitanika obolelih od DM tipa 2, sa kliničkim parodontološkim parametrima. (Bastos i sar., 2012).

Međutim, u svetlu nedavnih istraživanja epigenetičkih faktora kao dominantnih u nastanku i progresiji multifaktorijalnih oboljenja kao što su parodontopatija i DM tip 2, moguće je pretpostaviti da uslovi hronično povišene glikemije i stanje hronične inflamacije slabog intenziteta, kakvi vladaju u tkivima obolelih od DM tipa 2, mogu da dovedu i do epigenetičkih izmena u susednim ćelijama domaćina posredstvom cirkulatornih miRNK koje nose izmenjeni “epigenetički zapis”- fenomen poznat kao epigenetička transmisija oštećenja (Prattichizzo i sar., 2016a). Shodno tome se može pretpostaviti da promena ekspresije molekula miRNK-146a u gingivalnoj tečnosti obolelih od DM tipa 2 koju smo i pokazali, može uticati i na promene u inflamatornom odgovoru okolnih parodontalnih tkiva, dovodeći tako do ozbiljnije kliničke slike parodontopatije, kakvu smo opazili i kod naših pacijenata sa DM tipa 2 i pored dobro kontrolisanog DM-a. Šta više, Costantino i saradnici su pokazali da su miRNK, među kojima su miRNK-146a i miRNK-155, nosioci “hiperglikemijske - metaboličke memorije” u DM-u. Naime, nivoi ekspresija

ovih miRNK su bile značajno promenjene u srčanom tkivu životinja obolelih od DM-a, a do normalizacije nivoa ekspresije miRNK nije došlo ni posle uspostavljanja normoglikemije (Costantino i sar., 2016). Ovi autori pretpostavljaju da trajne promene u ekspresiji miRNK koje vode patološkim ćelijskim procesima, kao što su neregulisana apoptoza, fibroza i oksidativni stres, čine osnovu hiperglikemijske memorije i mogu da objasne zašto se kardiovaskularne komplikacije u DM-u razvijaju i pored normalizacije glikemije.

Za razmatranje regulatornih uloga miRNK-146a i miRNK-155 u parodontopatiji udruženoj sa DM tipa 2 je značajno pomenuti istraživanja Taganov i saradnika u kome se kao direktni ciljni molekuli miRNK-146a navode iRNK gena koji kodiraju za receptor IRAK1 i TRAF6, ključne komponente TLR4 signalnog puta (Taganov i sar., 2006). Naime, miRNK-146a utišava gene za TRAF6 i IRAK1, na taj način blokirajući njihovu dalju sintezu, te stoga sprečava prekomernu produkciju proinflamatornih citokina TNF- α , IL-6 (Honda i sar., 2012, Xie i sar., 2013a) i IL-1 β (Xie i sar., 2013a). Wang i saradnici su analizom DNK na humanim fibroblastima poreklom zdravih i inflamiranih tkiva, pokazali značajno veću ekspresiju TLR2 i TLR4 u inflamiranim tkivima parodontcijuma (Wang i sar., 2003). Takođe, Duarte i saradnici u svojoj studiji dokazuju povećanu ekspresiju TLR2 i TLR4 kod pacijenata sa hroničnom parodontopatijom iako nisu pokazali da postoji značajan uticaj DM tipa 2 na ekspresiju ovih receptora (Duarte i sar., 2012). Sa druge strane, povećana ekspresija TLR2 u vezivnom tkivu gingive kod ispitanika obolelih od hronične parodontopatije udružene sa DM tipa 2, u odnosu na grupu sistemski zdravih ispitanika obolelih od hronične parodontopatije je pokazana i u studiji Rojo-Botello i saradnika (Rojo-Botello i sar., 2012). Za razliku od molekula miRNK-146a čija ekspresija je primarno regulisana produktima bakterijskih ćelija, ekspresija molekula miRNK-155 je prevashodno regulisana virusnim i bakterijskim nukleotidima. MiRNK-155 kao ciljne molekule koristi iRNK gena koji kodiraju za receptore: SHIP-1 i SOCS-1 (Androulidaki i sar., 2009), I κ B kinazu β , I κ B kinazu ϵ , FADD, kao i mnoge druge (O'Connell i sar., 2009).

U cilju ispitivanja uloge oksidativnog stresa u parodontopatiji udruženoj sa DM tipa 2, a imajući u vidu rezultate *in silico* analize po kojoj miRNK-146a i miRNK-155 u uslovima naše studije pokazuju veliki afinitet prema SOD2 genu, smo ispitivali aktivnost enzima SOD-e u gingivalnom eksudatu pacijenata sa parodontopatijom i udruženim DM tipa 2. Rezultati su pokazali statistički značajno veće vrednosti nivoa aktivnosti enzima SOD-e u gingivalnoj tečnosti

ispitanika sa hroničnom parodontopatijom obolelih od DM tipa 2 u odnosu na sistemski zdrave ispitanike. Takođe je od važnosti da su nakon kauzalne terapije vrednosti aktivnosti enzima SOD-e bile kod zdravih ispitanika. Ovi rezultati su u saglasnosti i sa rezultatima drugih studija (Akalin i sar., 2008, Wei i sar., 2010). Ellis i saradnici su pokazali da progresiju parodontopatije prati smanjena aktivnost enzima SOD-e, što za rezultat ima povećanu količinu ROS i posledično veću destrukciju parodontalnih tkiva (Ellis i sar., 1998). Sa druge strane, rezultati studije Akalin i saradnika su pokazali značajno veći nivo aktivnosti enzima SOD-e u gingivi kod ispitanika obolelih od parodontopatije udružene sa DM tipa 2 u odnosu na kontrolnu grupu sistemski zdravih ispitanika i dokazali da DM povećava antioksidativnu aktivnost enzima SOD-e, najverovatnije kao mehanizam odbrane od pojačanog stvaranja ROS u DM-u (Akalin i sar., 2008). Takođe, isti autori su pokazali i statistički značajnu negativnu korelaciju između aktivnosti enzima SOD-e i kliničkih parametara parodontopatije.

Proteaze MMP-8 i MMP-9 su najzastupljenije MMP-e u inflamiranim parodontalnim tkivima i smatraju se najznačajnijim i najodgovornijim za oštećenja potpornih tkiva u toku parodontopatije (Franco i sar., 2017). Narušen balans između MMP-a i tkivnih inhibitora matriksnih metaloproteinaza vodi destrukciji kolagenih vlakana tokom patogeneze parodontopatije (Hannas i sar., 2007). Sa druge strane, MMP-9 se smatra odgovornom za nastanak vaskularnih komplikacija i otežano zarastanje rana u toku DM-a (Ayuk i sar., 2016). Stoga smo ispitivali uticaj hronične parodontopatije kao i uticaj DM tipa 2 na koncentracije MMP-9 u gingivalnoj tečnosti i analizirali povezanost ovog molekula sa ispitivanim miRNK. Iako smo pokazali da hroničnu parodontopatiju prati povećana ekspresija MMP-9 kod obolelih od DM tipa 2, vrednosti MMP-9 se nisu značajno razlikovale. Do sada nije bilo podataka o koncentracijama MMP-9 u gingivalnom eksudatu kod pacijenata sa parodontopatijom obolelih od DM tipa 2, dok su ispitivanja MMP-8 i MMP-9 u gingivalnom tkivu pacijenata sa parodontopatijom kod obolelih od DM tipa 2 pokazala da DM tip 2 utiče na povećanje MMP-a u gingivalnom tkivu (Kumar i sar., 2006). Nakon kauzalne terapije u ovoj studiji koncentracije MMP-9 su bile značajno smanjene u svim grupama pacijenata sa parodontopatijom, nezavisno od prisustva DM tipa 2. Šta više, u grupi ispitanika sa hroničnom parodontopatijom, sistemski zdravih i obolelih od DM tipa 2 je pokazano da su vrednosti koncentracija molekula MMP-9 u negativnoj korelaciji sa kliničkim parodontalnim parametrima. Rezultati studije Correa i saradnika su pokazali značajno smanjene vrednosti koncentracija molekula MMP-8 i MMP-9 u gingivalnoj tečnosti kod ispitanika obolelih od hronične

parodontopatije, kako sistemski zdravih tako i obolelih od DM tipa 2, tri meseca nakon kauzalne terapije, u odnosu na vrednosti koncentracija ovih molekula pre terapije, što je u saglasnosti i sa rezultatima našeg istraživanja (Correa i sar., 2008).

Jedno od ograničenja naše studije je što nismo analizirali vrednosti nivoa ekspresije molekula miRNK-146a i miRNK-155 u serumu ispitanika kako bi procenili da li su vrednosti ovih miRNK iz gingivalne tečnosti u korelaciji sa vrednostima ekspresije miRNK-146a i miRNK-155 u serumu obolelih od DM tipa 2. Ovakvo istraživanje u budućnosti bi moglo značajno doprineti razvijanju novih dijagnostičko-prognostičkih analiza u DM-u, imajući u vidu međusobnu povezanost parodontopatije i DM-a, sa jedne strane i sa druge strane, neinvazivnost detekcije stabilnih biomarkera kao što su miRNK u oralnim biofluidima.

6. ZAKLJUČCI ISTRAŽIVANJA

1. Vrednosti merenih kliničkih parodontalnih parametara ispitanika sa hroničnom parodontopatijom su bile veće kod obolelih od DM tip 2 u odnosu na sistemski zdrave ispitanike.
2. Vrednosti merenih kliničkih parodontalnih parametara su se smanjile šest nedelja nakon kauzalne terapije obolelog parodoncijuma, što ukazuje na smirivanje inflamacije parodontalnih tkiva.
3. Aktivnosti enzima SOD su pokazivale statistički značajno veće vrednosti u grupi ispitanika sa hroničnom parodontopatijom u odnosu na ispitanike sa zdravim parodoncijumom.
4. Aktivnosti enzima SOD su se smanjili šest nedelja nakon kauzalne terapije parodontopatije i kod sistemski zdravih ispitanika i kod obolelih od DM tip 2, što ukazuje da se smirivanjem inflamacije i parametri mehanizama oksidativnog stresa smanjuju.
5. Postojanje pozitivne korelacije između izmerene aktivnosti enzima SOD i nivoa ekspresije molekula miRNK-146a ukazuje na regulatornu ulogu ove miRNK u mehanizmima oksidativnog stresa. Stoga se ova miRNK može smatrati potencijalnim biomarkerom u gingivalnom eksudatu obolelih od parodontopatije.
6. Koncentracije molekula MMP-9 pokazivale su statistički značajno veće vrednosti u grupi ispitanika sa hroničnom parodontopatijom u odnosu na ispitanike sa zdravim parodoncijumom.
7. Koncentracije molekula MMP-9 pokazivale su statistički značajno veće vrednosti pre kauzalne terapije obolelog parodoncijuma u odnosu na vrednosti nakon terapije. Stoga se ovaj enzim može smatrati pouzdanim biomarkerom inflamacije u gingivalnom eksudatu.
8. Nivoi ekspresije molekula miRNK-146a i miRNK-155 su bili statistički značajno veći i kod ispitanika sa zdravim parodoncijumom i kod ispitanika sa hroničnom parodontopatijom obolelih od DM tip 2, u odnosu na sistemski zdrave ispitanike što ukazuje na njihovu kompleksnu ulogu i u patogenezi DM tip 2.

9. Nivoi ekspresije molekula miRNC-146a i miRNC-155 su se značajno smanjili nakon kauzalne terapije parodontopatije, što ukazuje na njihovu ulogu u patogenezi parodontopatije i njihovu vodeću ulogu kao proinflamatornih miRNC.
10. Molekuli miRNC-146a i miRNC-155 su potencijalni biomarkeri, koji u budućnosti mogu predstavljati nestandardni dijagnostički i prognostički parametar parodontopatije.

7. LITERATURA

- AGNIHOTRI, R., PANDURANG, P., KAMATH, S. U., GOYAL, R., BALLAL, S., SHANBHOGUE, A. Y., KAMATH, U., BHAT, G. S. & BHAT, K. M. 2009. Association of Cigarette Smoking With Superoxide Dismutase Enzyme Levels in Subjects With Chronic Periodontitis. *Journal of Periodontology*, 80, 657-662.
- AINAMO, J., & Bay, I. 1975. Problems and proposals for recording gingivitis and plaque. *International Dental Journal*, 25, 229-235.
- AKALIN, F. A., ISIKSAL, E., BALTACIOGLU, E., RENDA, N. & KARABULUT, E. 2008. Superoxide dismutase activity in gingiva in type-2 diabetes mellitus patients with chronic periodontitis. *Archives of Oral Biology*, 53, 44-52.
- AKAO, Y., NAKAGAWA, Y. & NAOE, T. 2007. MicroRNA-143 and-145 in colon cancer. *DNA and Cell Biology*, 26, 311-320.
- AKIRA, S. & TAKEDA, K. 2004. Toll-like receptor signalling. *Nature Reviews Immunology*, 4, 499-511.
- ALLEN, E. M., MATTHEWS, J. B., O' HALLORAN, D. J., GRIFFITHS, H. R. & CHAPPLE, I. L. 2011. Oxidative and inflammatory status in Type 2 diabetes patients with periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology*, 38, 894-901.
- ANDERSEN, H. H., DUROUX, M. & GAZERANI, P. 2014. MicroRNAs as modulators and biomarkers of inflammatory and neuropathic pain conditions. *Neurobiology of Disease*, 71, 159-168.
- ANDROULIDAKI, A., ILIOPOULOS, D., ARRANZ, A., DOXAKI, C., SCHWORER, S., ZACHARIOUDAKI, V., MARGIORIS, A. N., TSICHLIS, P. N. & TSATSANIS, C. 2009. The Kinase Akt1 Controls Macrophage Response to Lipopolysaccharide by Regulating MicroRNAs. *Immunity*, 31, 220-231.
- ARMITAGE, G. C. 2004. Periodontal diagnoses and classification of periodontal diseases. *Periodontology 2000*, 34, 9-21.
- AYUK, S. M., ABRAHAMSE, H. & HOURELD, N. N. 2016. The Role of Matrix Metalloproteinases in Diabetic Wound Healing in relation to Photobiomodulation. *Journal of Diabetes Research*.

- BARROS, S. P. & OFFENBACHER, S. 2014. Modifiable risk factors in periodontal disease Epigenetic regulation of gene expression in the inflammatory response. *Periodontology* 2000, 64, 95-110.
- BARROS, S. P., WILLIAMS, R., OFFENBACHER, S. & MORELLI, T. 2016. Gingival crevicular fluid as a source of biomarkers for periodontitis. *Periodontology* 2000, 70, 53-64.
- BARTEL, D. P. 2004. MicroRNAs: Genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 116, 281-297.
- BARTEL, D. P. 2009. MicroRNAs: Target Recognition and Regulatory Functions. *Cell*, 136, 215-233.
- BARWARI, T., JOSHI, A. & MAYR, M. 2016. MicroRNAs in Cardiovascular Disease. *Journal of the American College of Cardiology*, 68, 2577-2584.
- BASTOS, A. S., GRAVES, D. T., LOUREIRO, A. P. D., ROSSA, C., ABDALLA, D. S. P., FAULIN, T. D. S., CAMARA, N. O., ANDRIANKAJA, O. M. & ORRICO, S. R. P. 2012. Lipid Peroxidation Is Associated with the Severity of Periodontal Disease and Local Inflammatory Markers in Patients with Type 2 Diabetes. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 97, E1353-E1362.
- BASTOS, M. F., TUCCI, M. A., DE SIQUEIRA, A., DE FAVERI, M., FIGUEIREDO, L. C., VALLIM, P. C. & DUARTE, P. M. 2017. Diabetes may affect the expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors more than smoking in chronic periodontitis. *Journal of Periodontal Research*, 52, 292-299.
- BELTRAMI, C., SIMPSON, K., JESKY, M., WONNACOTT, A., CARRINGTON, C., HOLMANS, P., NEWBURY, L., JENKINS, R., ASHDOWN, T., DAYAN, C., SATCHELL, S., CORISH, P., COCKWELL, P., FRASER, D. & BOWEN, T. 2018. Association of Elevated Urinary miR-126, miR-155, and miR-29b with Diabetic Kidney Disease. *American Journal of Pathology*, 188, 1982-1992.
- BEN-ZVI, I., GREEN, Y., NAKHOUL, F., KANTER, Y. & NAGLER, R. M. 2007. Effects of diabetes mellitus, chronic renal failure and hemodialysis on serum and salivary antioxidant status. *Nephron Clinical Practice*, 105, 114-120.

- BENAKANAKERE, M., ABDOLHOSSEINI, M., HOSUR, K., FINOTI, L. S. & KINANE, D. F. 2015. TLR2 Promoter Hypermethylation Creates Innate Immune Dysbiosis. *Journal of Dental Research*, 94, 183-191.
- BERGER, S. L., KOUZARIDES, T., SHIEKHATTAR, R. & SHILATIFARD, A. 2009. An operational definition of epigenetics. *Genes & Development*, 23, 781-783.
- BHATT, K., LANTING, L. L., JIA, Y., YADAV, S., REDDY, M. A., MAGILNICK, N., BOLDIN, M. & NATARAJAN, R. 2016. Anti-Inflammatory Role of MicroRNA-146a in the Pathogenesis of Diabetic Nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology*, 27, 2277-2288.
- BHAUMIK, D., SCOTT, G. K., SCHOKRPUR, S., PATIL, C. K., CAMPISI, J. & BENZ, C. C. 2008. Expression of microRNA-146 suppresses NF-kappa B activity with reduction of metastatic potential in breast cancer cells. *Oncogene*, 27, 5643-5647.
- BORCHERT, G. M., LANIER, W. & DAVIDSON, B. L. 2006. RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nature Structural & Molecular Biology*, 13, 1097-1101.
- BORGNAKKE, W. S., YLOSTALO, P. V., TAYLOR, G. W. & GENCO, R. J. 2013. Effect of periodontal disease on diabetes: systematic review of epidemiologic observational evidence. *Journal of Clinical Periodontology*, 40, S135-S152.
- BULLON, P., MORILLO, J. M., RAMIREZ-TORTOSA, M. C., QUILES, J. L., NEWMAN, H. N. & BATTINO, M. 2009. Metabolic Syndrome and Periodontitis: Is Oxidative Stress a Common Link? *Journal of Dental Research*, 88, 503-518.
- CARBONELL, J., ALLOZA, E., ARCE, P., BORREGO, S., SANTOYO, J., RUIZ-FERRER, M., MEDINA, I., JIMENEZ-ALMAZAN, J., MENDEZ-VIDAL, C., GONZALEZ-DEL POZO, M., VELA, A., BHATTACHARYA, S. S., ANTINOLO, G. & DOPAZO, J. 2012. A map of human microRNA variation uncovers unexpectedly high levels of variability. *Genome Medicine*, 4.
- CASARIN, R. C. V., BARBAGALLO, A., MEULMAN, T., SANTOS, V. R., SALLUM, E. A., NOCITI, F. H., DUARTE, P. M., CASATI, M. Z. & GONCALVES, R. B. 2013. Subgingival biodiversity in subjects with uncontrolled type-2 diabetes and chronic periodontitis. *Journal of Periodontal Research*, 48, 30-36.
- CEPPI, M., PEREIRA, P. M., DUNAND-SAUTHIER, I., BARRAS, E., REITH, W., SANTOS, M. A. & PIERRE, P. 2009. MicroRNA-155 modulates the interleukin-1 signaling pathway

- in activated human monocyte-derived dendritic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106, 2735-2740.
- CERIELLO, A. 2012. The emerging challenge in diabetes: The "metabolic memory". *Vascular Pharmacology*, 57, 133-138.
- CHAKRABARTI, S. K., FRANCIS, J., ZIESMANN, S. M., GARMEY, J. C. & MIRMIRA, R. G. 2003. Covalent histone modifications underlie the developmental regulation of insulin gene transcription in pancreatic beta cells. *Journal of Biological Chemistry*, 278, 23617-23623.
- CHANG, M. C., TSAI, Y. L., CHEN, Y. W., CHAN, C. P., HUANG, C. F., LAN, W. C., LIN, C. C., LAN, W. H. & JENG, J. H. 2013. Butyrate induces reactive oxygen species production and affects cell cycle progression in human gingival fibroblasts. *Journal of Periodontal Research*, 48, 66-73.
- CHANG, P. C., TSAI, S. C., CHONG, L. Y. & KAO, M. J. 2014. N-Phenacylthiazolium Bromide Inhibits the Advanced Glycation End Product (AGE)-AGE Receptor Axis to Modulate Experimental Periodontitis in Rats. *Journal of Periodontology*, 85, E268-E276.
- CHAPPLE, I. L. C., GENCO, R. & WORKING GRP 2 JOINT, E. A. 2013. Diabetes and periodontal diseases: consensus report of the Joint EFP/AAP Workshop on Periodontitis and Systemic Diseases. *Journal of Clinical Periodontology*, 40, S106-S112.
- CHAPPLE, I. L. C. & MATTHEWS, J. B. 2007. The role of reactive oxygen and antioxidant species in periodontal tissue destruction. *Periodontology 2000*, 43, 160-232.
- CHAWLA, D., BANSAL, S., BANERJEE, B. D., MADHU, S. V., KALRA, O. P. & TRIPATHI, A. K. 2014. Role of advanced glycation end product (AGE)-induced receptor (RAGE) expression in diabetic vascular complications. *Microvascular Research*, 95, 1-6.
- CHEN, H. Y., COX, S. W., ELEY, B. M., MANTYLA, P., RONKA, H. & SORSA, T. 2000. Matrix metalloproteinase-8 levels and elastase activities in gingival crevicular fluid from chronic adult periodontitis patients. *Journal of Clinical Periodontology*, 27, 366-369.
- CHEN, H. Y., LAN, H. Y., ROUKOS, D. H. & CHO, W. C. 2014. Application of microRNAs in diabetes mellitus. *Journal of Endocrinology*, 222, R1-R10.
- CHEN, S. L., FENG, B. A., THOMAS, A. A. & CHAKRABARTI, S. 2017. miR-146a regulates glucose induced upregulation of inflammatory cytokines extracellular matrix proteins in the retina and kidney in diabetes. *Plos One*, 12.

- CHEN, X., LIANG, H. W., ZHANG, J. F., ZEN, K. & ZHANG, C. Y. 2012. Secreted microRNAs: a new form of intercellular communication. *Trends in Cell Biology*, 22, 125-132.
- CHOW, T. F. F., CROW, M., EARLE, T., EL-SAID, H., DIAMANDIS, E. P. & YOUSEF, G. M. 2008. Kallikreins as microRNA targets: an in silico and experimental-based analysis. *Biological Chemistry*, 389, 731-738.
- CORONNELLO, C. & BENOS, P. V. 2013. ComiR: combinatorial microRNA target prediction tool. *Nucleic Acids Research*, 41, W159-W164.
- CORONNELLO, C., HARTMAIER, R., ARORA, A., HULEIHEL, L., PANDIT, K. V., BAIS, A. S., BUTTERWORTH, M., KAMINSKI, N., STORMO, G. D., OESTERREICH, S. & BENOS, P. V. 2012. Novel Modeling of Combinatorial miRNA Targeting Identifies SNP with Potential Role in Bone Density. *Plos Computational Biology*, 8.
- CORREA, F. O. B., GONCALVES, D., FIGUEREDO, C. M. S., GUSTAFSSON, A. & ORRICO, S. R. P. 2008. The Short-Term Effectiveness of Non-Surgical Treatment in Reducing Levels of Interleukin-1 beta and Proteases in Gingival Crevicular Fluid From Patients With Type 2 Diabetes Mellitus and Chronic Periodontitis. *Journal of Periodontology*, 79, 2143-2150.
- COSTANTINO, S., PANENI, F., LUSCHER, T. F. & COSENTINO, F. 2016. MicroRNA profiling unveils hyperglycaemic memory in the diabetic heart. *European Heart Journal*, 37, 572-576.
- DE GONZALO-CALVO, D., IGLESIAS-GUTIERREZ, E. & LLORENTE-CORTES, V. 2017. Epigenetic Biomarkers and Cardiovascular Disease: Circulating MicroRNAs. *Revista Espanola De Cardiologia*, 70, 763-769.
- DUARTE, P. M., MIRANDA, T. S., LIMA, J. A., GONCALVES, T. E. D., SANTOS, V. R., BASTOS, M. F. & RIBEIRO, F. V. 2012. Expression of Immune-Inflammatory Markers in Sites of Chronic Periodontitis in Patients With Type 2 Diabetes. *Journal of Periodontology*, 83, 426-434.
- DUNAND-SAUTHIER, I., SANTIAGO-RABER, M. L., CAPPONI, L., VEJNAR, C. E., SCHAAD, O., IRLA, M., SEGUIN-ESTEVEZ, Q., DESCOMBES, P., ZDOBNOV, E. M., ACHA-ORBEA, H. & REITH, W. 2011. Silencing of c-Fos expression by microRNA-155 is critical for dendritic cell maturation and function. *Blood*, 117, 4490-4500.

- EBERSOLE, J. L., DAWSON, D., EMECEN-HUJA, P., NAGARAJAN, R., HOWARD, K., GRADY, M. E., THOMPSON, K., PEYYALA, R., AL-ATTAR, A., LETHBRIDGE, K., KIRAKODU, S. & GONZALEZ, O. A. 2017. The periodontal war: microbes and immunity. *Periodontology 2000*, 75, 52-115.
- EIS, P. S., TAM, W., SUN, L. P., CHADBURN, A., LI, Z. D., GOMEZ, M. F., LUND, E. & DAHLBERG, J. E. 2005. Accumulation of miR-155 and BIC RNA in human B cell lymphomas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102, 3627-3632.
- EKE, P. I., DYE, B. A., WEI, L., SLADE, G. D., THORNTON-EVANS, G. O., BORGNAKKE, W. S., TAYLOR, G. W., PAGE, R. C., BECK, J. D. & GENCO, R. J. 2015. Update on Prevalence of Periodontitis in Adults in the United States: NHANES 2009 to 2012. *Journal of Periodontology*, 86, 611-622.
- ELLIS, S. D., TUCCI, M. A., SERIO, F. G. & JOHNSON, R. B. 1998. Factors for progression of periodontal diseases. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, 27, 101-105.
- FARACI, F. M. & DIDION, S. P. 2004. Vascular protection - Superoxide dismutase isoforms in the vessel wall. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, 24, 1367-1373.
- FENG, B., CHEN, S. L., GORDON, A. D. & CHAKRABARTI, S. 2017. miR-146a mediates inflammatory changes and fibrosis in the heart in diabetes. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 105, 70-76.
- FENG, J., XING, W. L. & XIE, L. 2016. Regulatory Roles of MicroRNAs in Diabetes. *International Journal of Molecular Sciences*, 17.
- FITZGERALD, K. A. & CAFFREY, D. R. 2014. Long noncoding RNAs in innate and adaptive immunity. *Current Opinion in Immunology*, 26, 140-146.
- FRANCO, C., PATRICIA, H. R., TIMO, S., CLAUDIA, B. & MARCELA, H. 2017. Matrix Metalloproteinases as Regulators of Periodontal Inflammation. *International Journal of Molecular Sciences*, 18.
- FRIEDEWALD, V. E., KORNMAN, K. S., BECK, J. D., GENCO, R., GOLDFINE, A., LIBBY, P., OFFENBACHER, S., RIDKER, P. M., VAN DYKE, T. E. & ROBERTS, W. C. 2009. The American Journal of Cardiology and Journal of Periodontology Editors' Consensus: Periodontitis and Atherosclerotic Cardiovascular Disease. *Journal of Periodontology*, 80, 1021-1032.

- GALLAGHER, I. J., SCHEELE, C., KELLER, P., NIELSEN, A. R., REMENYI, J., FISCHER, C. P., RODER, K., BABRAJ, J., WAHLESTEDT, C., HUTVAGNER, G., PEDERSEN, B. K. & TIMMONS, J. A. 2010. Integration of microRNA changes in vivo identifies novel molecular features of muscle insulin resistance in type 2 diabetes. *Genome Medicine*, 2.
- GAUTAM, A., KUMAR, R., DIMITROV, G., HOKE, A., HAMMAMIEH, R. & JETT, M. 2016. Identification of extracellular miRNA in archived serum samples by next-generation sequencing from RNA extracted using multiple methods. *Molecular Biology Reports*, 43, 1165-1178.
- GOLZ, L., MEMMERT, S., RATH-DESCHNER, B., JAGER, A., APPEL, T., BAUMGARTEN, G., GOTZ, W. & FREDE, S. 2014. LPS from *P. gingivalis* and Hypoxia Increases Oxidative Stress in Periodontal Ligament Fibroblasts and Contributes to Periodontitis. *Mediators of Inflammation*.
- GOMES, E. C., SILVA, A. N. & DE OLIVEIRA, M. R. 2012. Oxidants, Antioxidants, and the Beneficial Roles of Exercise-Induced Production of Reactive Species. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*.
- GONCALVES, R. B., COLETTA, R. D., SILVERIO, K. G., BENEVIDES, L., CASATI, M. Z., DA SILVA, J. S. & NOCITI, F. H. 2011. Impact of smoking on inflammation: overview of molecular mechanisms. *Inflammation Research*, 60, 409-424.
- GONG, W. J., XIAO, D., MING, G. F., YIN, J. Y., ZHOU, H. H. & LIU, Z. Q. 2014. Type 2 diabetes mellitus-related genetic polymorphisms in microRNAs and microRNA target sites. *Journal of Diabetes*, 6, 279-289.
- GRAVES, D. T., LIU, R. & OATES, T. W. 2007. Diabetes-enhanced inflammation and apoptosis - impact on periodontal pathosis. *Periodontology 2000*, 45, 128-137.
- GRIFFITHS, G. S. 2003. Formation, collection and significance of gingival crevice fluid. *Periodontology 2000*, 31, 32-42.
- GUAY, C. & REGAZZI, R. 2013. Circulating microRNAs as novel biomarkers for diabetes mellitus. *Nature Reviews Endocrinology*, 9, 513-521.
- GUMUS, P., BUDUNELI, N., CETINKALP, S., HAWKINS, S. I., RENAUD, D., KINANE, D. F. & SCOTT, D. A. 2009. Salivary Antioxidants in Patients With Type 1 or 2 Diabetes and Inflammatory Periodontal Disease: A Case-Control Study. *Journal of Periodontology*, 80, 1440-1446.

- GUPTA, S. K., BANG, C. & THUM, T. 2010. Circulating MicroRNAs as Biomarkers and Potential Paracrine Mediators of Cardiovascular Disease. *Circulation-Cardiovascular Genetics*, 3, 484-488.
- GURAV, A. & JADHAV, V. 2011. Periodontitis and risk of diabetes mellitus. *Journal of Diabetes*, 3, 21-28.
- GUSTAFSSON, A., ITO, H., ASMAN, B. & BERGSTROM, K. 2006. Hyper-reactive mononuclear cells and neutrophils in chronic periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology*, 33, 126-129.
- HANNAS, A. R., PEREIRA, J. C., GRANJEIRO, J. M. & TJADERHANE, L. 2007. The role of matrix metalloproteinases in the oral environment. *Acta Odontologica Scandinavica*, 65, 1-13.
- HARDY, D. C., ROSS, J. H., SCHUYLER, C. A., LEITE, R. S., SLATE, E. H. & HUANG, Y. 2012. Matrix metalloproteinase-8 expression in periodontal tissues surgically removed from diabetic and non-diabetic patients with periodontal disease. *Journal of Clinical Periodontology*, 39, 249-255.
- HASHIMOTO, N. & TANAKA, T. 2017. Role of miRNAs in the pathogenesis and susceptibility of diabetes mellitus. *Journal of Human Genetics*, 62, 141-150.
- HEITZ-MAYFIELD, L. J. A. 2005. Disease progression: identification of high-risk groups and individuals for periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology*, 32, 196-209.
- HILL, D. & FISHER, M. 2010. The effect of intensive glycaemic control on cardiovascular outcomes. *Diabetes Obesity & Metabolism*, 12, 641-647.
- HIMANI, G. S., PRABHUJI, M. L. V. & KARTHIKEYAN, B. V. 2014. Gingival crevicular fluid and interleukin-23 concentration in systemically healthy subjects: their relationship in periodontal health and disease. *Journal of Periodontal Research*, 49, 237-245.
- HONDA, T., TAKAHASHI, N., MIYAUCHI, S. & YAMAZAKI, K. 2012. Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide induces miR-146a without altering the production of inflammatory cytokines. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 420, 918-925.
- HUNG, P. S., CHEN, F. C., KUANG, S. H., KAO, S. Y., LIN, S. C. & CHANG, K. W. 2010. miR-146a Induces Differentiation of Periodontal Ligament Cells. *Journal of Dental Research*, 89, 252-257.

- IMAMURA, M., TAKAHASHI, A., YAMAUCHI, T., HARA, K., YASUDA, K., GRARUP, N., ZHAO, W., WANG, X., HUERTA-CHAGOYA, A., HU, C., MOON, S., LONG, J., KWAK, S. H., RASHEED, A., SAXENA, R., MA, R. C. W., OKADA, Y., IWATA, M., HOSOE, J., SHOJIMA, N., IWASAKI, M., FUJITA, H., SUZUKI, K., DANESH, J., JORGENSEN, T., JORGENSEN, M. E., WITTE, D. R., BRANDSLUND, I., CHRISTENSEN, C., HANSEN, T., MERCADER, J. M., FLANNICK, J., MORENO-MACIAS, H., BURTT, N. P., ZHANG, R., KIM, Y. J., ZHENG, W., SINGH, J. R., TAM, C. H. T., HIROSE, H., MAEGAWA, H., ITO, C., KAKU, K., WATADA, H., TANAKA, Y., TOBE, K., KAWAMORI, R., KUBO, M., CHO, Y. S., CHAN, J. C. N., SANGHERA, D., FROSSARD, P., PARK, K. S., SHU, X. O., KIM, B. J., FLOREZ, J. C., TUSIE-LUNA, T., JIA, W. P., TAI, E. S., PEDERSEN, O., SALEHEEN, D., MAEDA, S. & KADOWAKI, T. 2016. Genome-wide association studies in the Japanese population identify seven novel loci for type 2 diabetes. *Nature Communications*, 7.
- IRWANDI, R. A. & VACHARAKSA, A. 2016. The role of microRNA in periodontal tissue: A review of the literature. *Archives of Oral Biology*, 72, 66-74.
- ITO, S. & KURAOKA, I. 2015. Epigenetic modifications in DNA could mimic oxidative DNA damage: A double-edged sword. *DNA Repair*, 32, 52-57.
- JABLONSKI, K. A., GAUDET, A. D., AMICI, S. A., POPOVICH, P. G. & GUERAU-DE-ARELLANO, M. 2016. Control of the Inflammatory Macrophage Transcriptional Signature by miR-155. *Plos One*, 11.
- JEPSEN, S., BLANCO, J., BUCHALLA, W., CARVALHO, J. C., DIETRICH, T., DORFER, C., EATON, K. A., FIGUERO, E., FRENCKEN, J. E., GRAZIANI, F., HIGHAM, S. M., KOCHER, T., MALTZ, M., ORTIZ-VIGON, A., SCHMOECKEL, J., SCULEAN, A., TENUTA, L. M. A., VANDER VEEN, M. H. & MACHIULSKIENE, V. 2017. Prevention and control of dental caries and periodontal diseases at individual and population level: consensus report of group 3 of joint EFP/ORCA workshop on the boundaries between caries and periodontal diseases. *Journal of Clinical Periodontology*, 44, S85-S93.
- JEPSEN, S., CATON, J. G., ALBANDAR, J. M., BISSADA, N. F., BOUCHARD, P., CORTELLINI, P., DEMIREL, K., DE SANCTIS, M., ERCOLI, C., FAN, J. Y., GEURS, N. C., HUGHES, F. J., JIN, L. J., KANTARCI, A., LALLA, E., MADIANOS, P. N., MATTHEWS, D., MCGUIRE, M. K., MILLS, M. P., PRESHAW, P. M., REYNOLDS,

- M. A., SCULEAN, A., SUSIN, C., WEST, N. X. & YAMAZAKI, K. 2018. Periodontal manifestations of systemic diseases and developmental and acquired conditions: Consensus report of workgroup 3 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *Journal of Clinical Periodontology*, 45, S219-S229.
- JI, G. H., LV, K., CHEN, H. L., WANG, T. M., WANG, Y. L., ZHAO, D. S., QU, L. N. & LI, Y. H. 2013. MiR-146a Regulates SOD2 Expression in H₂O₂ Stimulated PC12 Cells. *Plos One*, 8.
- JIANG, S. Y., XUE, D., XIE, Y. F., ZHU, D. W., DONG, Y. Y., WEI, C. C. & DENG, J. Y. 2015. The negative feedback regulation of microRNA-146a in human periodontal ligament cells after Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide stimulation. *Inflammation Research*, 64, 441-451.
- KACZOR-URBANOWICZ, K. E., CARRERAS-PRESAS, C., KACZOR, T., TU, M., WEI, F., GARCIA-GODOY, F. & WONG, D. T. W. 2017. Emerging technologies for salivaomics in cancer detection. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 21, 640-647.
- KAI, Y., PENG, W., LING, W., HAO, J. B. & ZHUAN, B. 2014. Reciprocal effects between microRNA-140-5p and ADAM10 suppress migration and invasion of human tongue cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 448, 308-314.
- KAIKKONEN, M. U., LAM, M. T. Y. & GLASS, C. K. 2011. Non-coding RNAs as regulators of gene expression and epigenetics. *Cardiovascular Research*, 90, 430-440.
- KARDESLER, L., BIYIKOGLU, B., CETINKALP, S., PITKALA, M., SORSA, T. & BUDUNELI, N. 2010. Crevicular fluid matrix metalloproteinase-8,-13, and TIMP-1 levels in type 2 diabetics. *Oral Diseases*, 16, 476-481.
- KARRICH, J. J., JACHIMOWSKI, L. C. M., LIBOUBAN, M., IYER, A., BRANDWIJK, K., TAANMAN-KUETER, E. W., NAGASAWA, M., DE JONG, E. C., UITTENBOGAART, C. H. & BLOM, B. 2013. MicroRNA-146a regulates survival and maturation of human plasmacytoid dendritic cells. *Blood*, 122, 3001-3009.
- KASSEBAUM, N. J., BERNABE, E., DAHIYA, M., BHANDARI, B., MURRAY, C. J. L. & MARCENES, W. 2014. Global Burden of Severe Periodontitis in 1990-2010: A Systematic Review and Metaregression. *Journal of Dental Research*, 93, 1045-1053.

- KAYE, E. K., CHEN, N., CABRAL, H. J., VOKONAS, P. & GARCIA, R. I. 2016. Metabolic Syndrome and Periodontal Disease Progression in Men. *Journal of Dental Research*, 95, 822-828.
- KEATING, S. T., PLUTZKY, J. & EL-OSTA, A. 2016. Epigenetic Changes in Diabetes and Cardiovascular Risk. *Circulation Research*, 118, 1706-1722.
- KEBSCHULL, M. & PAPAPANOU, P. N. 2015. Mini but mighty: microRNAs in the pathobiology of periodontal disease. *Periodontology 2000*, 69, 201-220.
- KIM, J. M., JUNG, K. H., CHU, K., LEE, S. T., BAN, J., MOON, J., KIM, M., LEE, S. K. & ROH, J. K. 2015. Atherosclerosis-Related Circulating MicroRNAs as a Predictor of Stroke Recurrence. *Translational Stroke Research*, 6, 191-197.
- KNIGHT, E. T., LIU, J., SEYMOUR, G. J., FAGGION, C. M. & CULLINAN, M. P. 2016. Risk factors that may modify the innate and adaptive immune responses in periodontal diseases. *Periodontology 2000*, 71, 22-51.
- LALLA, E., LAMSTER, I. B., FEIT, M., HUANG, L., SPESSOT, A., QU, W., KISLINGER, T., LU, Y., STERN, D. M. & SCHMIDT, A. M. 2000. Blockade of RAGE suppresses periodontitis-associated bone loss in diabetic mice. *Journal of Clinical Investigation*, 105, 1117-1124.
- LARSSON, L., CASTILHO, R. M. & GIANNOBILE, W. V. 2015. Epigenetics and Its Role in Periodontal Diseases: A State-of-the-Art Review. *Journal of Periodontology*, 86, 556-568.
- LEE, Y., AHN, C., HAN, J. J., CHOI, H., KIM, J., YIM, J., LEE, J., PROVOST, P., RADMARK, O., KIM, S. & KIM, V. N. 2003. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*, 425, 415-419.
- LEE, Y., KIM, M., HAN, J. J., YEOM, K. H., LEE, S., BAEK, S. H. & KIM, V. N. 2004. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *Embo Journal*, 23, 4051-4060.
- LEE, Y. H., NA, H. S., JEONG, S. Y., JEONG, S. H., PARK, H. R. & CHUNG, J. 2011. Comparison of inflammatory microRNA expression in healthy and periodontitis tissues. *Biocell*, 35, B43-B49.
- LI, L., CHEN, X. P. & LI, Y. J. 2010. MicroRNA-146a and Human Disease. *Scandinavian Journal of Immunology*, 71, 227-231.

- LI, X. T., LU, J. X., TENG, W., ZHAO, C. J. & YE, X. L. 2018. Quantitative Evaluation of MMP-9 and TIMP-1 Promoter Methylation in Chronic Periodontitis. *DNA and Cell Biology*, 37, 168-173.
- LIANG, D. G., GAO, Y., LIN, X. Z., HE, Z. H., ZHAO, Q. L., DENG, Q. & LAN, K. 2011. A human herpesvirus miRNA attenuates interferon signaling and contributes to maintenance of viral latency by targeting IKK epsilon. *Cell Research*, 21, 793-806.
- LIN, X. L., QIN, Y. J., JIA, J. S., LIN, T. Y., LIN, X., CHEN, L., ZENG, H., HAN, Y. J., WU, L. H., HUANG, S., WANG, M., HUANG, S. H., XIE, R. Y., LIANG, L. Q., LIU, Y., LIU, R. Y., ZHANG, T. T., LI, J., WANG, S. C., SUN, P. H., HUANG, W. H., YAO, K. T., XU, K., DU, T. & XIAO, D. 2016. MiR-155 Enhances Insulin Sensitivity by Coordinated Regulation of Multiple Genes in Mice. *Plos Genetics*, 12.
- LING, C. & GROOP, L. 2009. Epigenetics: A Molecular Link Between Environmental Factors and Type 2 Diabetes. *Diabetes*, 58, 2718-2725.
- LING, M. R., CHAPPLE, I. L. C. & MATTHEWS, J. B. 2016. Neutrophil superoxide release and plasma C-reactive protein levels pre- and post-periodontal therapy. *Journal of Clinical Periodontology*, 43, 652-658.
- LIU, Z. S., WEI, S., MA, H. X., ZHAO, M., MYERS, J. N., WEBER, R. S., STURGIS, E. M. & WEI, Q. Y. 2011. A functional variant at the miR-184 binding site in TNFAIP2 and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Carcinogenesis*, 32, 1668-1674.
- LOOS, B. G. & TJOA, S. 2005. Host-derived diagnostic markers for periodontitis: do they exist in gingival crevice fluid? *Periodontology 2000*, 39, 53-72.
- LÖE, H. 1993. Periodontal disease. The sixth complication of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 16: 329-34.
- LÖE, H., & SILNESS, J. 1963. Periodontal disease in pregnancy. I. Prevalence and severity. *Acta Odontologica Scandinavica*, 21, 533-551.
- LUSHCHAK, V. I. 2014. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chemico-Biological Interactions*, 224, 164-175.
- MAJEED, Z. N., PHILIP, K., ALABSI, A. M., PUSHPARAJAN, S. & SWAMINATHAN, D. 2016. Identification of Gingival Crevicular Fluid Sampling, Analytical Methods, and Oral Biomarkers for the Diagnosis and Monitoring of Periodontal Diseases: A Systematic Review. *Disease Markers*.

- MARTINS, M. D., JIAO, Y., LARSSON, L., ALMEIDA, L. O., GARAICOA-PAZMINO, C., LE, J. M., SQUARIZE, C. H., INOHARA, N., GIANNOBILE, W. V. & CASTILHO, R. M. 2016. Epigenetic Modifications of Histones in Periodontal Disease. *Journal of Dental Research*, 95, 215-222.
- MATES, J. M., PEREZ-GOMEZ, C. & DE CASTRO, I. N. 1999. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clinical Biochemistry*, 32, 595-603.
- MATTHEWS, J. B., WRIGHT, H. J., ROBERTS, A., COOPER, P. R. & CHAPPLE, I. L. C. 2007a. Hyperactivity and reactivity of peripheral blood neutrophils in chronic periodontitis. *Clinical and Experimental Immunology*, 147, 255-264.
- MATTHEWS, J. B., WRIGHT, H. J., ROBERTS, A., LING-MOUNTFORD, N., COOPER, P. R. & CHAPPLE, I. L. C. 2007b. Neutrophil hyper-responsiveness in periodontitis. *Journal of Dental Research*, 86, 718-722.
- MEALEY, B. L. & OATES, T. W. 2006. Diabetes mellitus and periodontal diseases. *Journal of Periodontology*, 77, 1289-1303.
- MEYLE, J. & CHAPPLE, I. 2015. Molecular aspects of the pathogenesis of periodontitis. *Periodontology 2000*, 69, 7-17.
- MIRANDA, T. B. & JONES, P. A. 2007. DNA methylation: The nuts and bolts of repression. *Journal of Cellular Physiology*, 213, 384-390.
- MONEA, A., MEZEI, T., POPSOR, S. & MONEA, M. 2014. Oxidative Stress: A Link between Diabetes Mellitus and Periodontal Disease. *International Journal of Endocrinology*.
- MORITA, I., INAGAKI, K., NAKAMURA, F., NOGUCHI, T., MATSUBARA, T., YOSHII, S., NAKAGAKI, H., MIZUNO, K., SHEIHAM, A. & SABBAH, W. 2012. Relationship between Periodontal Status and Levels of Glycated Hemoglobin. *Journal of Dental Research*, 91, 161-166.
- MOTEDAYYEN, H., GHOTLOO, S., SAFFARI, M., SATTARI, M. & AMID, R. 2015. Evaluation of MicroRNA-146a and Its Targets in Gingival Tissues of Patients With Chronic Periodontitis. *Journal of Periodontology*, 86, 1380-1385.
- MUHONEN, P. & HOLTHOFER, H. 2009. Epigenetic and microRNA-mediated regulation in diabetes. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 24, 1088-1096.
- NAHID, M. A., RIVERA, M., LUCAS, A., CHAN, E. K. L. & KESAVALU, L. 2011. Polymicrobial Infection with Periodontal Pathogens Specifically Enhances MicroRNA

- miR-146a in ApoE(-/-) Mice during Experimental Periodontal Disease. *Infection and Immunity*, 79, 1597-1605.
- NAKASA, T., MIYAKI, S., OKUBO, A., HASHIMOTO, M., NISHIDA, K., OCHI, M. & ASAHARA, H. 2008. Expression of MicroRNA-146 in rheumatoid arthritis synovial tissue. *Arthritis and Rheumatism*, 58, 1284-1292.
- NEGRE-SALVAYRE, A., SALVAYRE, R., AUGÉ, N., PAMPLONA, R. & PORTERO-OTIN, M. 2009. Hyperglycemia and Glycation in Diabetic Complications. *Antioxidants & Redox Signaling*, 11, 3071-3109.
- NOCITI, F. H., CASATI, M. Z. & DUARTE, P. M. 2015. Current perspective of the impact of smoking on the progression and treatment of periodontitis. *Periodontology 2000*, 67, 187-210.
- NOOR, R., SAYEED, F. & CHADDA, V. 2015. DIABETES AND PERIODONTAL DISEASE - A BIDIRECTIONAL RELATIONSHIP. *Annals of Dental Specialty*, 3, 56-58.
- NOVAKOVIC, N., TODOROVIC, T., RAKIC, M., MILINKOVIC, I., DOZIC, I., JANKOVIC, S., ALEKSIC, Z. & CAKIC, S. 2014. Salivary antioxidants as periodontal biomarkers in evaluation of tissue status and treatment outcome. *Journal of Periodontal Research*, 49, 129-136.
- O'CONNELL, R. M., CHAUDHURI, A. A., RAO, D. S. & BALTIMORE, D. 2009. Inositol phosphatase SHIP1 is a primary target of miR-155. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106, 7113-7118.
- O'CONNELL, R. M., TAGANOV, K. D., BOLDIN, M. P., CHENG, G. H. & BALTIMORE, D. 2007. MicroRNA-155 is induced during the macrophage inflammatory response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104, 1604-1609.
- OGATA, Y., MATSUI, S., KATO, A., ZHOU, L., NAKAYAMA, Y. & TAKAI, H. 2014. MicroRNA expression in inflamed and noninflamed gingival tissues from Japanese patients. *Journal of Oral Science*, 56, 253-260.
- PALMER, A. K., TCHKONIA, T., LEBRASSEUR, N. K., CHINI, E. N., XU, M. & KIRKLAND, J. L. 2015. Cellular Senescence in Type 2 Diabetes: A Therapeutic Opportunity. *Diabetes*, 64, 2289-2298.

- PALMIERI, A., CARINCI, F., MARTINELLI, M., PEZZETTI, F., GIRARDI, A., CURA, F., RUBINI, C. & SCAPOLI, L. 2014. Role of the MIR146A polymorphism in the origin and progression of oral squamous cell carcinoma. *European Journal of Oral Sciences*, 122, 198-201.
- PANJAMURTHY, K., MANOHARAN, S. & RAMACHANDRAN, C. R. 2005. Lipid peroxidation and antioxidant status in patients with periodontitis. *Cellular & Molecular Biology Letters*, 10, 255-264.
- PAPAPANOU, P. N., SANZ, M., BUDUNELI, N., DIETRICH, T., FERES, M., FINE, D. H., FLEMMIG, T. F., GARCIA, R., GIANNOBILE, W. V., GRAZIANI, F., GREENWELL, H., HERRERA, D., KAO, R. T., KEBSCHULL, M., KINANE, D. F., KIRKWOOD, K. L., KOCHER, T., KORNMAN, K. S., KUMAR, P. S., LOOS, B. G., MACHTEI, E., MENG, H. X., MOMBELLI, A., NEEDLEMAN, I., OFFENBACHER, S., SEYMOUR, G. J., TELES, R. & TONETTI, M. S. 2018. Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *Journal of Clinical Periodontology*, 45, S162-S170.
- PARK, N. J., ZHOU, H., ELASHOFF, D., HENSON, B. S., KASTRATOVIC, D. A., ABEMAYOR, E. & WONG, D. T. 2009. Salivary microRNA: Discovery, Characterization, and Clinical Utility for Oral Cancer Detection. *Clinical Cancer Research*, 15, 5473-5477.
- PERSSON, R. E., HOLLENDER, L. G., MACENTEE, M. I., WYATT, C. C. L., KIYAK, H. A. & PERSSON, G. R. 2003. Assessment of periodontal conditions and systemic disease in older subjects - Focus on diabetes mellitus. *Journal of Clinical Periodontology*, 30, 207-213.
- PHILLIPA, W., PAUL, C., MIKE, M. & IAIN, C. 2014. Differential activation of neutrophil extracellular traps by specific periodontal bacteria. *Free Radical Biology and Medicine*, 75, S53-S53.
- POLAK, D. & SHAPIRA, L. 2018. An update on the evidence for pathogenic mechanisms that may link periodontitis and diabetes. *Journal of Clinical Periodontology*, 45, 150-166.
- POY, M. N., ELIASSON, L., KRUTZFELDT, J., KUWAJIMA, S., MA, X. S., MACDONALD, P. E., PFEFFER, S., TUSCHL, T., RAJEWSKY, N., RORSMAN, P. & STOFFEL, M.

2004. A pancreatic islet-specific microRNA regulates insulin secretion. *Nature*, 432, 226-230.
- PRADEEP, A. R., DAISY, H., HADGE, P., GARG, G. & THORAT, M. 2009. Correlation of Gingival Crevicular Fluid Interleukin-18 and Monocyte Chemoattractant Protein-1 Levels in Periodontal Health and Disease. *Journal of Periodontology*, 80, 1454-1461.
- PRATTICHIZZO, F., BONAFE, M., CEKA, A., GIULIANI, A., RIPPO, M. R., RE, M., ANTONICELLI, R., PROCOPIO, A. D. & OLIVIERI, F. 2016a. Endothelial Cell Senescence and Inflammaging: MicroRNAs as Biomarkers and Innovative Therapeutic Tools. *Current Drug Targets*, 17, 388-397.
- PRATTICHIZZO, F., GIULIANI, A., CEKA, A., RIPPO, M. R., BONFIGLI, A. R., TESTA, R., PROCOPIO, A. D. & OLIVIERI, F. 2015. Epigenetic mechanisms of endothelial dysfunction in type 2 diabetes. *Clinical Epigenetics*, 7.
- PRATTICHIZZO, F., GIULIANI, A., DE NIGRIS, V., PUJADAS, G., CEKA, A., LA SALA, L., GENOVESE, S., TESTA, R., PROCOPIO, A. D., OLIVIERI, F. & CERIELLO, A. 2016b. Extracellular microRNAs and endothelial hyperglycaemic memory: a therapeutic opportunity? *Diabetes Obesity & Metabolism*, 18, 855-867.
- PRESHAW, P. M. 2012. Critical issues in clinical periodontal research. *Periodontology 2000*, 59, 7-13.
- QUINN, S. R. & O'NEILL, L. A. 2011. A trio of microRNAs that control Toll-like receptor signalling. *International Immunology*, 23, 421-425.
- RAMASSONE, A., PAGOTTO, S., VERONESE, A. & VISIONE, R. 2018. Epigenetics and MicroRNAs in Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 19.
- RANJHA, R. & PAUL, J. 2013. Micro-RNAs in inflammatory diseases and as a link between inflammation and cancer. *Inflammation Research*, 62, 343-355.
- REDDY, M. A. & NATARAJAN, R. 2011. Epigenetic mechanisms in diabetic vascular complications. *Cardiovascular Research*, 90, 421-429.
- REDDY, M. A., ZHANG, E. L. & NATARAJAN, R. 2015. Epigenetic mechanisms in diabetic complications and metabolic memory. *Diabetologia*, 58, 443-455.
- REID, G., KIRSCHNER, M. B. & VAN ZANDWIJK, N. 2011. Circulating microRNAs: Association with disease and potential use as biomarkers. *Critical Reviews in Oncology Hematology*, 80, 193-208.

- REZNICK, A. Z., SHEHADEH, N., SHAFIR, Y. & NAGLER, R. M. 2006. Free radicals related effects and antioxidants in saliva and serum of adolescents with Type 1 diabetes mellitus. *Archives of Oral Biology*, 51, 640-648.
- RIBEIRO, F. V., DE MENDONCA, A. C., SANTOS, V. R., BASTOS, M. F., FIGUEIREDO, L. C. & DUARTE, P. M. 2011. Cytokines and Bone-Related Factors in Systemically Healthy Patients With Chronic Periodontitis and Patients With Type 2 Diabetes and Chronic Periodontitis. *Journal of Periodontology*, 82, 1187-1196.
- ROJO-BOTELLO, N. R., GARCIA-HERNANDEZ, A. L. & MORENO-FIERROS, L. 2012. Expression of toll-like receptors 2, 4 and 9 is increased in gingival tissue from patients with type 2 diabetes and chronic periodontitis. *Journal of Periodontal Research*, 47, 62-73.
- ROME, S. 2013. Are extracellular microRNAs involved in type 2 diabetes and related pathologies? *Clinical Biochemistry*, 46, 937-945.
- RONG, Y., BAO, W., SHAN, Z. L., LIU, J., YU, X. F., XIA, S. F., GAO, H., WANG, X., YAO, P., HU, F. B. & LIU, L. G. 2013. Increased MicroRNA-146a Levels in Plasma of Patients with Newly Diagnosed Type 2 Diabetes Mellitus. *Plos One*, 8.
- RYDEN, L., BUHLIN, K., EKSTRAND, E., DE FAIRE, U., GUSTAFSSON, A., HOLMER, J., KJELLSTROM, B., LINDAHL, B., NORHAMMAR, A., NYGREN, A., NASMAN, P., RATHNAYAKE, N., SVENUNGSSON, E. & KLINGE, B. 2016. Periodontitis Increases the Risk of a First Myocardial Infarction A Report From the PAROKRANK Study. *Circulation*, 133, 576-583.
- SABA, R., SORENSEN, D. L. & BOOTH, S. A. 2014. MicroRNA-146a: a dominant, negative regulator of the innate immune response. *Frontiers in Immunology*, 5.
- SAITO, A., HORIE, M., EJIRI, K., AOKI, A., KATAGIRI, S., MAEKAWA, S., SUZUKI, S., KONG, S., YAMAUCHI, T., YAMAGUCHI, Y., IZUMI, Y. & OHSHIMA, M. 2017. MicroRNA profiling in gingival crevicular fluid of periodontitis-a pilot study. *Febs Open Bio*, 7, 981-994.
- SAITO, T., SHIMAZAKI, Y., KIYOHARA, Y., KATO, I., KUBO, M., IIDA, M. & KOGA, T. 2004. The severity of periodontal disease is associated with the development of glucose intolerance in non-diabetics: The Hisayama study. *Journal of Dental Research*, 83, 485-490.

- SAKALLIOGLU, E. E., LUTFIOGLU, M., SAKALLIOGLU, U., DIRAMAN, E. & KESKINER, I. 2008. Fluid dynamics of gingiva in diabetic and systemically healthy periodontitis patients. *Archives of Oral Biology*, 53, 646-651.
- SALVI, G. E., YALDA, B., COLLINS, J. G., JONES, B. H., SMITH, F. W., ARNOLD, R. R. & OFFENBACHER, S. 1997. Inflammatory mediator response as a potential risk marker for periodontal diseases in insulin-dependent diabetes mellitus patients. *Journal of Periodontology*, 68, 127-135.
- SANZ, M., VAN WINKELHOFF, A. J. & WORKING GRP 1 SEVENTH EUROPEAN, W. 2011. Periodontal infections: understanding the complexity - Consensus of the Seventh European Workshop on Periodontology. *Journal of Clinical Periodontology*, 38, 3-6.
- SATOH, J. 2012. Molecular network analysis of human microRNA targetome: from cancers to Alzheimer's disease. *Biodata Mining*, 5.
- SCHAEFER, A. S. 2018. Genetics of periodontitis: Discovery, biology, and clinical impact. *Periodontology 2000*, 78, 162-173.
- SCHULTE, L. N., WESTERMANN, A. J. & VOGEL, J. 2013. Differential activation and functional specialization of miR-146 and miR-155 in innate immune sensing. *Nucleic Acids Research*, 41, 542-553.
- SEBASTIANI, G., NIGI, L., GRIECO, G. E., MANCARELLA, F., VENTRIGLIA, G. & DOTTA, F. 2017. Circulating microRNAs and diabetes mellitus: a novel tool for disease prediction, diagnosis, and staging? *Journal of Endocrinological Investigation*, 40, 591-610.
- SHI, L. J., ZHANG, C. Y., ZHOU, Z. T., MA, J. Y., LIU, Y., BAO, Z. X. & JIANG, W. W. 2015. MicroRNA-155 in oral squamous cell carcinoma: Overexpression, localization, and prognostic potential. *Head and Neck-Journal for the Sciences and Specialties of the Head and Neck*, 37, 970-976.
- SIES, H. 1997. Oxidative stress: Oxidants and antioxidants. *Experimental Physiology*, 82, 291-295.
- SILNESS, J., & LÖE, H. 1964. Periodontal disease in pregnancy.II. Correlation between oral hygiene and periodontal condition.*Acta Odontologica Scandinavica*, 21, 121–135.
- SIMA, C. & GLOGAUER, M. 2013. Diabetes Mellitus and Periodontal Diseases. *Current Diabetes Reports*, 13, 445-452.

- SIPERT, C. R., MORANDINI, A. C., DIONISIO, T. J., TRACHTENBERG, A. J., KUO, W. P. & SANTOS, C. F. 2014. MicroRNA-146a and microRNA-155 show tissue-dependent expression in dental pulp, gingival and periodontal ligament fibroblasts in vitro. *Journal of Oral Science*, 56, 157-164.
- SLOTS, J. 2017. Periodontitis: facts, fallacies and the future. *Periodontology 2000*, 75, 7-23.
- SOMMESE, L., ZULLO, A., MANCINI, F. P., FABBRICINI, R., SORICELLI, A. & NAPOLI, C. 2017. Clinical relevance of epigenetics in the onset and management of type 2 diabetes mellitus. *Epigenetics*, 12, 401-415.
- SONNENSCHNEIN, S. K. & MEYLE, J. 2015. Local inflammatory reactions in patients with diabetes and periodontitis. *Periodontology 2000*, 69, 221-254.
- SORSA, T., TJADERHANE, L. & SALO, T. 2004. Matrix metalloproteinases (MMPs) in oral diseases. *Oral Diseases*, 10, 311-318.
- SOUTHERLAND, J. H., TAYLOR, G. W., MOSS, K., BECK, J. D. & OFFENBACHER, S. 2006. Commonality in chronic inflammatory diseases: periodontitis, diabetes, and coronary artery disease. *Periodontology 2000*, 40, 130-143.
- STOECKLIN-WASMER, C., GUARNIERI, P., CELENTI, R., DEMMER, R. T., KEBSCHULL, M. & PAPAPANOU, P. N. 2012. MicroRNAs and Their Target Genes in Gingival Tissues. *Journal of Dental Research*, 91, 934-940.
- TAGANOV, K. D., BOLDIN, M. P., CHANG, K. J. & BALTIMORE, D. 2006. NF-kappa B-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103, 12481-12486.
- TASOULAS, J., PATSOURIS, E., GIAGINIS, C. & THEOCHARIS, S. 2016. Salivaomics for oral diseases biomarkers detection. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 16, 285-295.
- TAYLOR, J. J., PRESHAW, P. M. & LALLA, E. 2013. A review of the evidence for pathogenic mechanisms that may link periodontitis and diabetes. *Journal of Clinical Periodontology*, 40, S113-S134.
- TEEUW, W. J., GERDES, V. E. A. & LOOS, B. G. 2010. Effect of Periodontal Treatment on Glycemic Control of Diabetic Patients - A systematic review and meta-analysis. *Diabetes Care*, 33, 421-427.

- TIJSEN, A. J., PINTO, Y. M. & CREEMERS, E. E. 2012. Circulating microRNAs as diagnostic biomarkers for cardiovascular diseases. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 303, H1085-H1095.
- TONETTI, M. S., GREENWELL, H. & KORNMAN, K. S. 2018. Staging and grading of periodontitis: Framework and proposal of a new classification and case definition. *Journal of Clinical Periodontology*, 45, S149-S161.
- TONETTI, M. S., VAN DYKE, T. E. & WORKING GRP 1 JOINT, E. A. 2013. Periodontitis and atherosclerotic cardiovascular disease: consensus report of the Joint EFP/AAP Workshop on Periodontitis and Systemic Diseases. *Journal of Clinical Periodontology*, 40, S24-S29.
- TRIVEDI, S., LAL, N., MAHDI, A. A., MITTAL, M., SINGH, B. & PANDEY, S. 2014. Evaluation of Antioxidant Enzymes Activity and Malondialdehyde Levels in Patients With Chronic Periodontitis and Diabetes Mellitus. *Journal of Periodontology*, 85, 713-720.
- URBICH, C., KUEHBACHER, A. & DIMMELER, S. 2008. Role of microRNAs in vascular diseases, inflammation, and angiogenesis. *Cardiovascular Research*, 79, 581-588.
- VAN DE BUNT, M., GAULTON, K. J., PARTS, L., MORAN, I., JOHNSON, P. R., LINDGREN, C. M., FERRER, J., GLOYN, A. L. & MCCARTHY, M. I. 2013. The miRNA Profile of Human Pancreatic Islets and Beta-Cells and Relationship to Type 2 Diabetes Pathogenesis. *Plos One*, 8.
- WANG, C., LI, S., SHANG, D. J., WANG, X. L., YOU, Z. L. & LI, H. B. 2011. Antihyperglycemic and neuroprotective effects of one novel Cu-Zn SOD mimetic. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 21, 4320-4324.
- WANG, G. F. & XU, N. 2018. Expression and clinical significance of microRNA 146a in peripheral blood mononuclear cells from type 2 diabetic neuropathy patients. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 11, 7165-7173.
- WANG, P. L., OHURA, K., FUJII, T., OIDO-MORI, M., KOWASHI, Y., KIKUCHI, M., SUETSUGU, Y. & TANAKA, J. 2003. DNA microarray analysis of human gingival fibroblasts from healthy and inflammatory gingival tissues. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 305, 970-973.
- WANG, Y., ANDRUKHOV, O. & RAUSCH-FAN, X. 2017. Oxidative Stress and Antioxidant System in Periodontitis. *Frontiers in Physiology*, 8.

- WEBER, J. A., BAXTER, D. H., ZHANG, S. L., HUANG, D. Y., HUANG, K. H., LEE, M. J., GALAS, D. J. & WANG, K. 2010. The MicroRNA Spectrum in 12 Body Fluids. *Clinical Chemistry*, 56, 1733-1741.
- WEI, D., ZHANG, X. L., WANG, Y. Z., YANG, C. X. & CHEN, G. 2010. 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. *Australian Dental Journal*, 55, 70-78.
- WEILNER, S., SCHRAML, E., REDL, H., GRILLARI-VOGLAUER, R. & GRILLARI, J. 2013. Secretion of microvesicular miRNAs in cellular and organismal aging. *Experimental Gerontology*, 48, 626-633.
- WONG, D. T. W. 2012. Salivaomics. *The Journal of the American Dental Association*, 143, Supplement 10, 19S-24S.
- XIAO, C. C. & RAJEWSKY, K. 2009. MicroRNA Control in the Immune System: Basic Principles. *Cell*, 136, 26-36.
- XIE, Y.-F., SHU, R., JIANG, S.-Y., LIU, D.-L., NI, J. & ZHANG, X.-L. 2013a. MicroRNA-146 inhibits pro-inflammatory cytokine secretion through IL-1 receptor-associated kinase 1 in human gingival fibroblasts. *Journal of Inflammation-London*, 10.
- XIE, Y.-F., SHU, R., JIANG, S.-Y., LIU, D.-L. & ZHANG, X.-L. 2011. Comparison of microRNA profiles of human periodontal diseased and healthy gingival tissues. *International Journal of Oral Science*, 3, 125-134.
- XIE, Y. F., SHU, R., JIANG, S. Y., SONG, Z. C., GUO, Q. M., DONG, J. C. & LIN, Z. K. 2014. miRNA-146 negatively regulates the production of pro-inflammatory cytokines via NF-kappa B signalling in human gingival fibroblasts. *Journal of Inflammation-London*, 11.
- XIE, Z., CHEN, G., ZHANG, X., LI, D., HUANG, J., YANG, C., ZHANG, P., QIN, Y., DUAN, Y., GONG, B. & LI, Z. 2013b. Salivary MicroRNAs as Promising Biomarkers for Detection of Esophageal Cancer. *Plos One*, 8.
- XIE, Z. J., YIN, X. Y., GONG, B., NIE, W. J., WU, B., ZHANG, X. C., HUANG, J., ZHANG, P. Y., ZHOU, Z. W. & LI, Z. J. 2015. Salivary microRNAs Show Potential as a Noninvasive Biomarker for Detecting Resectable Pancreatic Cancer. *Cancer Prevention Research*, 8, 165-173.

- YANG, X., ZHANG, J. C., NI, J., OUYANG, B., WANG, D., LUO, S. G., XIE, B. Y. & XUAN, D. Y. 2014. Toll-Like Receptor 4-Mediated Hyper-Responsiveness of Gingival Epithelial Cells to Lipopolysaccharide in High-Glucose Environments. *Journal of Periodontology*, 85, 1620-1628.
- YE, E. A. & STEINLE, J. J. 2016. miR-146a protects primary human retinal microvascular endothelial cells from hyperglycemia-induced apoptosis by attenuating inflammatory pathways mediated by TLR4/NF-kappa B and TNF alpha. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 57, 2.
- YILMAZ, O., JUNGAS, T., VERBEKE, P. & OJCIUS, D. M. 2004. Activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway contributes to survival of primary epithelial cells infected with the periodontal pathogen Porphyromonas gingivalis. *Infection and Immunity*, 72, 3743-3751.
- ZAHARAN, F., GHALWASH, D., SHAKER, O., AL-JOHANI, K. & SCULLY, C. 2015. Salivary microRNAs in oral cancer. *Oral Diseases*, 21, 739-747.
- ZELKO, I. N., MARIANI, T. J. & FOLZ, R. J. 2002. Superoxide dismutase multigene family: A comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radical Biology and Medicine*, 33, 337-349.
- ZHANG, B. G., LI, J. F., YU, B. Q., ZHU, Z. G., LIU, B. Y. & YAN, M. 2012. microRNA-21 promotes tumor proliferation and invasion in gastric cancer by targeting PTEN. *Oncology Reports*, 27, 1019-1026.
- ZHONG, X. Y., LIAO, Y. F., CHEN, L. L., LIU, G., FENG, Y., ZENG, T. S. & ZHANG, J. J. 2015. The MicroRNAs in the Pathogenesis of Metabolic Memory. *Endocrinology*, 156, 3157-3168.
- ZHOU, M., RONG, R. C., MUNRO, D., ZHU, C. X., GAO, X., ZHANG, Q. & DONG, Q. F. 2013. Investigation of the Effect of Type 2 Diabetes Mellitus on Subgingival Plaque Microbiota by High-Throughput 16S rDNA Pyrosequencing. *Plos One*, 8.
- ZIZZI, A., TIRABASSI, G., ASPRIELLO, S. D., PIEMONTESE, M., RUBINI, C. & LUCARINI, G. 2013. Gingival advanced glycation end-products in diabetes mellitus-associated chronic periodontitis: an immunohistochemical study. *Journal of Periodontal Research*, 48, 293-301.

ZLOCZOWER, M., REZNICK, A. Z., ZOUBY, R. O. & NAGLER, R. M. 2007. Relationship of flow rate, uric acid, peroxidase, and superoxide dismutase activity levels with complications in diabetic patients: Can saliva be used to diagnose diabetes? *Antioxidants & Redox Signaling*, 9, 765-773.

BIOGRAFIJA

Nikola Radović je rođen 09.06.1987. godine u Beogradu, gde je završio osnovnu i srednju školu. Osnovne studije je upisao 2005. godine na Stomatološkom fakultetu, Univerziteta u Beogradu. Diplomirao je 17.02.2011. godine, sa prosečnom ocenom 9.00, odbranom diplomskog rada pod nazivom “*Etiopatogenetski aspekt mukogingivalnih anomalija*” pod rukovodstvom mentora prof. dr Božidara Dimitrijevića na Klinici za parodontologiju i oralnu medicinu.

Po završetku fakulteta obevezan pripravnički staž kao doktor stomatologije, je obavio na Vojnomedicinskoj akademiji u periodu od 17.05.2011. - 17.05.2012. godine. Stručni ispit za doktora stomatologije je položio 30.05.2012. godine.

Od jula 2012. do jula 2017. godine je bio zaposlen kao doktor stomatologije u stomatološkoj ordinaciji “dr Koković”. Trenutno je zaposlen, kao doktor stomatologije u stomatološkoj ordinaciji “Dental studio 3”.

01.06.2015. godine je upisao specijalističke studije iz oblasti *Parodontologija i oralna medicina* na Stomatološkom fakultetu, Univerziteta u Beogradu. Specijalistički ispit na Klinici za parodontologiju i oralnu medicinu sa odličnom ocenom je položio 27.06.2018. godine.

Školske 2012/2013. godine na Stomatološkom fakultetu, Univerziteta u Beogradu je upisao poslediplomske doktorske akademske studije, na kojima je položio sve ispite predviđene planom i programom studija sa prosečnom ocenom 9.94.

Do sada je publikovao 1 rad. Prisustvovao je mnogobrojnim domaćim i inostranim simpozijumima i kongresima, uglavnom iz oblasti parodontologije, implantologije i oralne hirurgije. Član je Udruženja parodontologa Srbije, Srpskog lekarskog društva (SLD), Sekcije za parodontologiju i Evropske federacije za parodontologiju (EFP). Posедуje znanje engleskog jezika (viši nivo), nemačkog jezika (srednji nivo), ruskog jezika (početni nivo), kao i veštine rada na računaru.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Никола З. Радовић

Број уписа 4019/2012

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Микро РНК-146а и микро РНК-155 у гингивалној течности, као потенцијални биомаркери пародонтопатије код системски здравих особа и оболелих од дијабетес мелитуса тип 2

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

Потпис докторанда

У Београду, 2019.

Прилог 2.

**Изјава о истоветности штампане и електронске верзије
докторског рада**

Име и презиме аутора Никола З. Радовић

Број уписа 4019/2012

Студијски програм Базична и клиничка истраживања у стоматологији

Наслов рада **Микро РНК-146а и микро РНК-155 у гингивалној течности, као потенцијални биомаркери пародонтопатије код системски здравих особа и оболелих од дијабетес мелитуса тип 2**

Ментор др Јелена Рогановић, ванредни професор Стоматолошког факултета Универзитета у Београду

Коментор др Наташа Николић Јакоба, ванредни професор Стоматолошког факултета Универзитета у Београду

Потписани Никола З. Радовић

изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума**

Универзитета у Београду.

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

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

Потпис докторанда

У Београду, 2019.

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом: Микро РНК-146а и микро РНК-155 у гингивалној течности, као потенцијални биомаркери пародонтопатије код системски здравих особа и оболелих од дијабетес мелитуса тип 2

која је моје ауторско дело.

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

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

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

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

Потпис докторанда

У Београду, 2019.

1. Ауторство - Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. Ауторство – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.