

UNIVERZITET U BEOGRADU
STOMATOLOŠKI FAKULTET

Neda Đ. Perunović

**NIVOI IL-1 β , IL-6, TNF- α , PGE2 U
GINGIVALNOJ TEČNOSTI I U KRVI
PREVREMENO POROĐENIH ŽENA
SA PARODONTITISOM**

doktorska disertacija

Beograd, 2015

UNIVERSITY OF BELGRADE
SCHOOL OF DENTAL MEDICINE

Neda Đ. Perunović

**LEVELS OF IL-1 β , IL-6, TNF- α , PGE2 IN
GINGIVAL FLUID AND BLOOD IN
PRETERM DELIVERY WOMEN
WITH PERIODONTITIS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2015

MENTOR:

Prof. dr **Saša Čakić**,
Univerzitet u Beogradu, Stomatološki fakultet,
Klinika za parodontologiju i oralnu medicinu

ČLANOVI KOMISIJE:

Prof. dr **Saša Janković**,
Univerzitet u Beogradu, Stomatološki fakultet,
Klinika za parodontologiju i oralnu medicinu

Prof. dr **Jelena Milašin**,
Univerzitet u Beogradu, Stomatološki fakultet,
Institut za humanu genetiku

Prof. dr **Zoran Aleksić**,
Univerzitet u Beogradu, Stomatološki fakultet,
Klinika za parodontologiju i oralnu medicinu

Doc. dr **Ana Pucar**,
Univerzitet u Beogradu, Stomatološki fakultet,
Klinika za parodontologiju i oralnu medicinu

Prof. dr **Darko Plećaš**,
Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet,
Klinika za ginekologiju i akušerstvo Kliničkog centra Srbije

Datum odbrane:

Zahvalnica

Najveću zahvalnost dugujem mom mentoru prof. dr Saši Čakiću. Zahvaljujući ogromnoj posvećenosti prof. Čakića uspela sam da ovo kompleksno istraživanje sprovedem do kraja.

Zahvalila bih se mr dr Ljubinki Nikolić na velikoj pomoći u realizaciji istraživanja. Dr Nikolić mi je svojim zalaganjem pokazala da samo temeljan i pošten rad dovodi do uspešnog kraja. Zajedničkim snagama uspele smo da savladamo sve prepreke.

Veliku zahvalnost na celokupnom znanju iz oblasti parodontologije dugujem prof dr. Saši Jankoviću. Ponosna sam što mi je prof. dr Janković bio dugodišnji mentor.

Profesorki Jeleni Milašin sam posebno zahvalna na divnoj dugogodišnjoj saradnji, znanju koje mi je prenela i pomoći u mom naučno-istraživačkom radu.

Prof dr. Zoranu Aleksiću bih se zahvalila na znanju i podršci koju mi je pružio tokom doktorskih studija.

Dr Mii Rakić se zahvaljujem na velikoj pomoći i podršci u svemu.

Kolektivu Klinike za parodontologiju i oralnu medicinu se zahvaljujem na divnom druženju i podršci tokom svih ovih godina.

Na kraju želela bih da se zahvalim mojoj sestri, majci i ocu koji su me podržavali da istrajem u borbi koja se zove naučno usavršavanje.

Doktorat posvećujem mom ocu Đorđiju B. Perunoviću, mojoj najvećoj moralnoj podršci u životu.

NIVOI IL-1 β , IL-6, TNF- α , PGE2 U GINGIVALNOJ TEČNOSTI I U KRVI PREVREMENO POROĐENIH ŽENA SA PARODONTITISOM

SAŽETAK

Uvod. Prevremeni porođaj se definiše kao onaj porođaj koji se dogodi pre navršene 37. nedelje gestacije. Prevremeni porođaj se smatra značajnim uzrokom perinatalnog morbiditeta i važnim činiocem perinatalnog mortaliteta. Prostaglandin E2 (PGE2), interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6 i faktor nekroze tumora alfa (TNF- α) su medijatori zapaljenja koji su označeni i kao biohemijski markeri - prediktori porođaja. Nivoi ovih medijatora zapaljenja se postepeno povećavaju tokom trudnoće i postizanje njihovih kritičnih vrednosti dovodi do započinjanja porođaja. Pretpostavka je da postojanje udaljene infekcije koja ima elemente imunskog odgovora slične prevremenom porođaju, usled sposobnosti da naruši lokalnu homeostazu medijatora porođaja, može predstavljati faktor rizika za njegov nastanak. Parodontopatija je hronično inflamatorno oboljenje prouzrokovano predominantno anareobnim Gram negativnim bakterijama. Utvrđeno je da pacijenti oboleli od parodontopatije imaju povišene nivoe IL-1 β , IL-6, PGE2 i TNF- α u gingivalnoj tečnosti u poređenju sa ispitanicima sa zdravim parodontalnim tkivima. Takođe, usled povećane vaskularne propustljivosti u uslovima inflamacije u parodontacijumu, parodontopatogene bakterije i medijatori zapaljenja imaju sposobnost da prodru u sistemske cirkulaciju. Brojna istraživanja su sprovedena sa ciljem da se istraži eventualna povezanost inflamacije u parodontacijumu i prevremenog porođaja. Ustanovljeno je da parodontopatija trudnica predstavlja visok faktor rizika za nastanak prevremenog porođaja. Predložena su dva mehanizma na osnovu kojih parodontopatija može uticati na prevremeni porođaj: 1) direktni koji podrazumeva prodor parodontopatogenih bakterija u feto-placentalnu jedinicu i sledstvenu stimulaciju lokalne inflamacije ili 2) indirektni mehanizam prema kom medijatori zapaljenja iz parodontalnog žarišta cirkulišu i sinergističkim delovanjem povećaju lokalnu inflamaciju feto-placentalne jedinice. U pogledu mogućeg indirektnog mehanizma povezanosti parodontopatije i prevremenog porođaja, oskudni su podaci o uticaju inflamacije u parodontacijumu na sistemske nivoe medijatora porođaja. Hipoteza ove

studije je da patogenetski mehanizmi parodontopatije i prevremenog porođaja uključuju povećanu produkciju određenih istih proinflammatoryh medijatora, te je moguće postojanje udruženosti ova dva patološka stanja.

Cilj ove studije je bio da se ispituju nivoi PGE₂, IL-1 β , IL-6 i TNF- α u gingivalnoj tečnosti i u perifernoj venskoj krvi kod prevremeno porođenih žena i žena porođenih u terminu i da se izvrši komparativna analiza sa kliničkim parodontalnim parametrima. Takođe, ispitivano je i prisustvo parodontopatogenih mikroorganizama *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia* i *Treponema denticola* u uzorcima subgingivalnog plaka porođenih žena.

Materijal i metod. U istraživanje je uključeno 120 sistemskih zdravih žena: 60 prevremeno porođenih žena (pre 37. nedelje gestacije) – PP grupa i 60 žena porođenih u terminu (nakon 37. nedelje gestacije) – TP grupa. Kod svih ispitanica je sproveden klinički pregled parodontalnih tkiva i uzorkovanje gingivalne tečnosti (GT), subgingivalnog plaka i periferne venske krvi u periodu do 48 h nakon porođaja. Od svake porodilje uzeti su uzorci gingivalne tečnosti i subgingivalnog plaka sa istog mesta reprezentativnog zuba. Pored dve osnovne studijske grupe, dalja podela je izvršena prema parodontalnom statusu ispitanica (ispitanice sa klinički zdravim parodontalnim tkivima, ispitanice sa gingivitisom i ispitanice sa parodontopatijom). Evaluacija stanja parodontalnih tkiva i nivoa oralne higijene izvedena je merenjem sledećih kliničkih parametara: dubine sondiranja (DS), nivoa pripojnog epitela (NPE), krvarenja na provokaciju (KNP), plak indeksa (PI) i gingivalnog indeksa (GI). Evaluacija nivoa IL-1 β , IL-6, TNF- α i PGE₂ u uzorcima gingivalne tečnosti i periferne venske krvi ispitanica izvršena je primenom enzimskog imunoabsorpcionog testa - ELISA (eng. *Enzyme-linked immunosorbent assay*). Prisustvo genoma parodontopatogenih mikroorganizama *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia* i *Treponema denticola* u uzorcima subgingivalnog dentalnog plaka dokazivano je lančanom reakcijom polimeraze (Polymerase chain reaction-PCR).

Rezultati. Distribucija godina između prevremeno porođenih žena i žena porođenih u terminu nije pokazala statistički značajnu razliku ($p=0.641$). Svi mereni klinički parametri su bili statistički značajno veći u grupi prevremeno porođenih žena u poređenju sa grupom žena porođenih u terminu ($p<0.001$). Poređenjem distribucija

različitih stanja tkiva parodontijuma između ispitivanih grupa potvrđena je statistički značajna zastupljenost parodontopatije kod prevremeno porođenih žena u odnosu na žene porođene u terminu ($p < 0.001$) i statistički značajna zastupljenost zdravih parodontalnih tkiva u grupi žena porođenih u terminu u odnosu na grupu prevremeno porođenih žena ($p < 0.001$). Grupa prevremeno porođenih žena je pokazala statistički značajno povišene nivoe PGE2 i IL-6 u gingivalnoj tečnosti u porođenju sa grupom žena porođenih u terminu ($p < 0.05$). Poređenjem dobijenih vrednosti ispitivanih medijatora zapaljenja u uzorcima periferne venske krvi ispitanica između PP grupe i TP grupe nije dobijena statistički značajna razlika ($p > 0.05$). Poređenjem dobijenih vrednosti ispitivanih medijatora zapaljenja između ispitanica sa različitim stanjima tkiva parodontijuma dobijeno je da su nivoi IL-1 β , IL-6 i PGE2 u gingivalnoj tečnosti bili statistički značajno povišeni kod ispitanica obolelih od parodontopatije u odnosu na one sa klinički zdravim parodontijumom ($p < 0.05$). U gingivalnoj tečnosti ispitanica sa gingivitisom statistički značajno su bili povišeni nivoi IL-1 β , IL-6, TNF- α u odnosu na ispitanice sa klinički zdravim parodontijumom ($p < 0.05$). Poredeći navedene medijatore nije nađena statistička značajnost između ispitanica sa gingivitisom i klinički zdravim parodontijumom ($p > 0.05$). IL-1 β u uzorcima gingivalne tečnosti porodilja je bio značajno pozitivno korelisan sa krvarenjem na provokaciju (KNP) i gingivalnim indeksom (GI) ($p < 0.01$). IL-6 i PGE2 u gingivalnoj tečnosti porodilja su pokazali statistički značajno pozitivnu korelaciju sa svim merenim kliničkim parametrima ($p < 0.01$). PGE2 u uzorcima plazme porodilja je pokazao značajno pozitivnu korelaciju sa dubinom sondiranja (DS), nivoom pripojnog epitela (NPE) i gingivalnim indeksom (GI) ($p < 0.01$). U TP grupi nivoi PGE2 i IL-6 u gingivalnoj tečnosti su bili značajno pozitivno korelisan sa nivoom IL-1 β u plazmi, nivo IL-1 β u gingivalnoj tečnosti je bio značajno pozitivno korelisan sa nivoom IL-6 u plazmi i nivo TNF- α u GT je bio značajno negativno korelisan sa njegovim nivoom u plazmi ($p < 0.01$). U PP grupi nivo TNF- α u GT je bio značajno pozitivno korelisan sa nivoom PGE2 u plazmi ($p < 0.01$). *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* i *Treponema denticola* su bile zastupljene u većem procentu uzoraka subgingivalnog plaka prevremeno porođenih žena u odnosu na njihovu zastupljenost u uzorcima subgingivalnog plaka žena porođenih u terminu ($p < 0.05$). Zastupljenost bakterije

Prevotella intermedia u subgingivalnom plaku se nije razlikovala između prevremeno porođenih žena i žena porođenih u terminu ($p>0.05$).

Zaključak. U grupi prevremeno porođenih žena ustanovljena je značajno veća zastupljenost parodontopatije, značajno povišeni nivoi PGE2 i IL-6 u gingivalnoj tečnosti i značajno veća zastupljenost *P.gingivalis*, *A.actinomycetemcomitans* i *T.denticola* u uzorcima subgingivalnog plaka u poređenju sa ženama porođenim u terminu. Takođe, i na osnovu postignute značajne korelacije između nivoa PGE2 u plazmi i DS, NPE i nivoa TNF- α u GT može se ukazati na potencijalni uticaj parodontopatije na povišenje nivoa medijatora zapaljenja koji su ujedno i biohemijskih markeri porođaja.

Ključne reči: parodontopatija, prevremeni porođaj, interleukin-1beta, interleukin-6, faktor nekroze tumora-alfa, prostaglandin E2, gingivalna tečnost

Naučna oblast: Stomatologija

Uža naučna oblast: Parodontologija

UDK broj: 616.311.2-002:618.39(043.3)

ABSTRACT

LEVELS OF IL-1 β , IL-6, TNF- α , PGE2 IN GINGIVAL FLUID AND BLOOD IN PRETERM DELIVERY WOMEN WITH PERIODONTITIS

Background. Preterm delivery represents the adverse pregnancy outcome when delivery occurs before 37 week of gestation. Preterm birth is considered as the major source of neonatal mortality and significant cause of neonatal morbidity, representing the most important epidemiological aspect of this pathology. Prostaglandin E2 (PGE2), interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor alpha (TNF- α) are recognized as the main triggers of the labor. These mediators gradually increase as pregnancy progresses while achievement of their critical concentrations leads to the labor onset. There is an attitude that distant infection sharing the immunological response pattern with preterm pathology represents the risk factor for preterm birth due to ability to disrupt local homeostasis of labor mediators. Periodontitis is a chronic inflammatory disease caused predominantly by anaerobic Gram negative bacteria. It is reported that patients suffering periodontitis have increased gingival crevicular fluid (GCF) levels of IL-1 β , IL-6, PGE2 and TNF- α compared to periodontally healthy individuals. Furthermore, periopathogens and subsequent inflammatory mediators have ability to enter systemic circulation and that is expressed under conditions of periodontal inflammation due to increased vascular permeability. A number of studies were conducted to investigate relationship between periodontal inflammation and preterm birth and it is established that maternal periodontitis represents the high risk factor for preterm birth. There are two proposed pathways by which periodontitis might affect pre-term birth: 1) directly when periopathogens invade the foetal-placental unit subsequently stimulating local inflammation or 2) indirectly when inflammatory mediators circulate from periodontal burden and synergistically increase local inflammation. Regarding second proposed mechanism, there is a lack of information about influence of periodontal status on systemic levels of labor mediators. We hypothesized that periodontal inflammation is associated with increase in local and

systemic levels of PGE₂, IL-1 β , IL-6 and TNF- α and with pre-term labor. Thus objective of this study was to evaluate local and plasma levels of PGE₂, IL-1 β , IL-6 and TNF- α between women giving pre-term (PTB) and full-term (FTB) birth and to correlate them with periodontal parameters. We also investigated the presence of the periodontal microorganisms *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and *Treponema denticola* from subgingival plaque of PTB and FTB women.

Materials and Methods. The study population included 120 systemically healthy women: 60 preterm birth women (delivery before completed 37 weeks of gestation)-PTB group and 60 full term birth women (delivery after completed 37 weeks of gestation) – FTB group. All participants underwent periodontal examination and sampling of subgingival plaque, GCF and plasma within 48 hours following delivery. GCF samples and subgingival plaque samples were collected from one representative site per participant being the unit of analysis. Following periodontal examination all participants were further stratified into three groups based on the periodontal status and according to the classification of periodontal diseases (periodontally healthy subjects, gingivitis and periodontitis). A full-mouth periodontal measurements were performed to record following clinical parameters: probing depth (PD), clinical attachment level (CAL), bleeding on probing (BOP), plaque index (PI) and gingival index (GI). PGE₂, IL-1 β , IL-6 and TNF- α levels were estimated using enzyme-linked immunosorbent assays in the gingival crevicular fluid (GCF) and plasma samples. The presence of the periodontal microorganisms *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and *Treponema denticola* from subgingival plaque was analyzed using PCR amplification.

Results. No significant difference in mean age was observed between preterm birth women and full term birth women (p=0.641). All measured clinical parameters were significantly higher in PTB group compared to FTB group (p<0.001). Analysis of periodontal status between investigated groups demonstrated significantly higher frequency of periodontitis in PTB group compared to FTB group (p<0.001) and significantly higher frequency of periodontally healthy participants in FTB group compared to PTB group (p<0.001). Preterm birth women exhibited significantly

increased GCF levels of IL-6 and PGE2 compared to FTB women ($p < 0.05$), while there were no significant differences in plasma levels of measured markers ($p > 0.05$). GCF levels of IL-1 β , IL-6 and PGE2 as well as plasma levels of TNF- α and PGE2 were significantly higher in periodontitis compared to periodontal healthy subjects ($p < 0.05$), while differences between gingivitis and periodontitis were not statistically significant ($p > 0.05$). GCF levels of IL-1 β were positively correlated with BOP and GI, while IL-6 and PGE2 were positively correlated with all measured clinical parameters including PI, GI, BOP, PD and CAL. The plasma levels of PGE2 were positively correlated with PD, CAL and GI. In the full-term birth mothers GCF levels of IL-6 and PGE2 were positively correlated with serum levels of IL-1 β , GCF levels of IL-1 β were positively correlated with serum IL-6, GCF levels of TNF- α were negatively correlated with his serum levels while GCF levels of IL-6 was positively correlated with serum levels of PGE 2. In the pre-term birth mothers GCF levels of TNF α were positively correlated with serum levels of PGE2. In subgingival plaque samples of PTB group *P.gingivalis*, *A.actinomycetemcomitans* and *T. Denticola* were more frequently detected compared to FTB women.

Conclusions. Mothers giving preterm birth showed higher rate of periodontitis, worse periodontal parameters, significantly increased GCF levels of IL-6 and PGE2 and more frequently detected periodontal bacteria *P.gingivalis*, *A.actinomycetemcomitans* and *T. Denticola* in subgingival samples compared to FTB. Based on significant correlation identified between plasma PGE2 and PD, CAL and GCF TNF- α in PTB it seems that periodontitis might impact overall increase in labor triggers hence contribute to the preterm labor onset.

Key words: periodontitis, preterm birth, interleukin-1beta, interleukin-6, tumor necrosis factor-alpha, prostaglandin E2, gingival crevicular fluid.

Scientific field: Dental medicine

Scientific field specialized: Periodontology

UDC: 616.311.2-002:618.39(043.3)

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Definicija i prevalencija zapaljenskih oboljenja parodontcijuma.....	1
1.2. Etiologija i patogeneza parodontopatije.....	8
1.2.1.1.Parodontopatogeni mikroorganizmi.....	8
1.2.1.2.Medijatori zapaljenskih i imunoloških reakcija.....	11
1.2.1.3.Inflamatorna osteoklastogeneza.....	15
1.3. Etiologija i patogeneza prevremenog porođaja.....	16
1.4. Parodontopatija i prevremeni porođaj - biološki mehanizmi povezanosti.....	23
2. CILJEVI	28
3. MATERIJAL I METODE	29
3.1. Studijske grupe i kriterijumi uključenja i isključenja iz studije.....	30
3.2. Klinička merenja.....	32
3.3. Uzorkovanje gingivalne tečnosti, subgingivalnog dentalnog plaka i periferne venske krvi kod porodilja.....	34
3.3.1.1. Selekcija mesta uzorkovanja i uzimanje uzoraka gingivalne tečnosti i subgingivalnog dentalnog plaka.....	34
3.3.1.2. Uzimanje uzoraka periferne venske krvi.....	35
3.4. Određivanje nivoa IL-1 β , IL-6, TNF- α i PGE2 u gingivalnoj tečnosti i u perifernoj venskoj krvi ELISA metodom.....	35
3.5. Identifikacija parodontopatogenih mikroorganizama primenom PCR metode.....	38

3.6. Statistička analiza podataka.....	41
4. REZULTATI.....	42
4.1. Deskriptivne karakteristike podataka obe studijske grupe.....	42
4.1.1. Parodontalni status ispitanica.....	42
4.1.2. Klinički parametri.....	45
4.2. Nivoi IL-1 β , IL-6, TNF- α i PGE2 u gingivalnoj tečnosti i u perifernoj venskoj krvi kod prevremeno porođenih žena i žena porođenih u terminu.....	51
4.3. Nivoi IL-1 β , IL-6, TNF- α i PGE2 u gingivalnoj tečnosti i u perifernoj venskoj krvi porodilja u uslovima različitih stanja tkiva parodonticijuma.....	56
4.4. Korelacija nivoa IL-1 β , IL-6, TNF- α i PGE2 u gingivalnoj tečnosti i u perifernoj venskoj krvi ispitanica sa kliničkim parametrima.....	61
4.5. Međusobna korelacija merenih medijatora zapaljenja u gingivalnoj tečnosti i u perifernoj venskoj krvi ispitanica.....	62
4.6. Zastupljenost ispitivanih parodontopatogenih mikroorganizama kod prevremeno porođenih žena i žena porođenih u terminu.....	63
4.7. Zastupljenost ispitivanih parodontopatogenih mikroorganizama u uslovima različitih stanja tkiva parodonticijuma.....	67
4.8. Korelacija nalaza parodontopatogenih mikroorganizama i nivoa IL-1 β , IL-6, TNF- β i PGE2 u gingivalnoj tečnosti i u perifernoj venskoj krvi ispitanica.....	71
5. DISKUSIJA	72

5.1. Biohemijski markeri prevremenog porođaja u gingivalnoj tečnosti i u krvi.....	84
5.2. Očekivani naučni doprinos.....	89
6. ZAKLJUČCI.....	92
7. LITERATURA.....	94

1. UVOD

1.1. Definicija i prevalencija zapaljenskih oboljenja parodontijuma

Potporni aparat zuba (parodontijum) predstavlja biološku i funkcionalnu celinu, koju čini kompleks različitih tkiva i čija je glavna uloga da pričvrsti zub u alveoli. Funkcije parodontijuma su i očuvanje integriteta mastikatorne sluzokože usne duplje kao i prenos i amortizacija sila koje se razvijaju tokom mastikacije. Tkiva koja čine potporni aparat zuba su gingiva, parodontijum (periodontalni ligament), cement i alveolarna kost.

Termin oboljenja parodontijuma se odnosi na zapaljenska oboljenja potpornih tkiva zuba- gingivitis i parodontitis tj. parodontopatiju (Pihlstrom i sar., 2005). Kao osnovni etiološki faktor ovih oboljenja označen je dentalni plak odnosno patogena mikroflora dentalnog plaka (biofilma). Dentalni plak predstavlja meku organsku naslagu koja se formira na gingivi, zubima i drugim mestima u usnoj duplji. Dentalni plak čini zajednica mikroorganizama povezana u polisaharidni matriks sa organskim i neorganskim materijama.

Oboljenja potpornih tkiva zuba se svrstavaju u najčešća oboljenja u humanoj populaciji, kod odraslih osoba (Dentino i sar., 2013). Odgovorna su, zajedno sa zubnim karijesom, za gubitak najvećeg broja zuba što za posledicu ima remećenje osnovnih funkcija stomatognatog sistema. Rezultati brojnih epidemioloških istraživanja ukazuju na visoku zastupljenost i rasprostranjenost oboljenja parodontijuma u svim zemljama, bez obzira na ekonomski razvoj. Izrazito visoka prevalenca na globalnom nivou (Papapanou 1999, Petersen 2003) ukazuje da predstavljaju značajan zdravstveni i socio-ekonomski problem. Eke i saradnici su pregledom 3742 osobe starije od 30 godina na teritoriji Amerike u vremenskom periodu od 2009. do 2010. godine ustanovili zastupljenost parodontopatije u preko 47 % ispitanika što iznosi 64.7 miliona odraslih osoba (Al-Harhi i sar., 2013). Podaci epidemioloških studija sprovedenih na teritoriji

Evrope ukazuju na zastupljenost parodontopatije u 27 do 74 % od ukupnog broja ispitivanih odraslih osoba (Dye 2011, Aimetti i sar., 2015)

Oboljenja parodontalnih tkiva pripadaju grupi hroničnih humanih oboljenja, čija se prevalenca procenjuje na 40 % sa tendencijom rasta, bez obzira na ekonomski razvoj zemlje. Kod najzastupljenijih hroničnih oboljenja kao sto su kardiovaskularna oboljenja, karcinomi, hronične obstruktivne bolesti pluća i dijabetes mellitus tip 2 prepoznati su isti faktori rizika kao i kod parodontalnih oboljenja, a to su, pored ostalih, malnutricija, fizička neaktivnost, pušenje, konzumacija alkohola i psihološki stress (Petersen i Ogawa 2005).

Uticaj oboljenja usne duplje, pre svega oboljenja parodonticijuma, na sistemsko zdravlje ljudi je višedecenijski predmet mnogih studija. Parodontalna medicina je posebna oblast medicine odnosno stomatologije koja se bavi povezanošću parodontopatije i sistemskih stanja i bolesti. Rezultati brojnih istraživanja su pokazali povezanost oboljenja parodonticijuma i mnogih sistemskih bolesti među kojima se ističu dijabetes melitus, kardiovaskularne bolesti, respiratorna oboljenja, cerebrovaskularna oboljenja, reumatoidni artritis, rizik od prevremenog porođaja i druge komplikacije trudnoće i porođaja (Gulati i sar., 2013).

Gingivitis se definišu kao inflamatorno oboljenje gingive, čiji je osnovni etiološki faktor biofilm tj. dentalni plak. Dentalni plak, različitim mehanizmima (invazijom mikroorganizama, egzotoksinima, endotoksinima i inhibicijom imunog odgovora domaćina), izaziva zaštitnu inflamatornu reakciju u gingivi. Stalno prisustvo mikroorganizama dentalnog plaka predstavlja izvor bakterijskih antigena koji iscrpljuje mnogobrojne faktore odbrane usne duplje. Kao rezultat nemogućnosti imunog odgovora domaćina da se izbori sa dejstvom štetnih noksi, dolazi do razvoja patološkog procesa u gingivi.

Klinički znaci gingivitisa obuhvataju krvarenje gingive, promenu boje, konzistencije, površinske strukture, oblika kao i uvećanje gingive. Inflamatorne promene gingive mogu biti reverzibilnog karaktera ukoliko je prisutan eksudativni tip inflamacije. Dominacija drugih tipova zapaljenja, kao što su produktivni i alterativni, uzrokuje ireverzibilne promene gingive. *Gingivitis catarrhalis* je najčešći oblik

gingivitisa i karakteriše se dominacijom eksudativnog tipa inflamacije (Slika 1.). Prisutna inflamacija u gingivi je u korelaciji sa prisutnim dentalnim plakom i uklanjanje etiološkog faktora tj. dentalnog plaka dovodi do izlječenja.

Epidemiološke studije su pokazale visoku zastupljenost gingivitisa uzrokovanih plakom, koja iznosi preko 75% u različitim populacijama širom sveta (Papapanou 1999, Petersen 2003). Svakako gingivitisi, kao zapaljensko oboljenje gingive, su najzastupljeniji kod dece i prevalenca gingivitisa se povećava sa starošću deteta (Stamm 1986). Ustanovljeno je da većina mladih osoba boluje od gingivitisa.



Slika 1. *Gingivitis catarrhalis*

Parodontopatija se definiše kao hronično inflamatorno, destruktivno oboljenje potpornih tkiva zuba, multifaktorijalne prirode. Multifaktorijalnost oboljenja se ogleda u sadejstvu i kompleksnoj interakciji više faktora koji određuju tok i ishod bolesti. Mikrobiološki agensi, imunološke reakcije domaćina, genetska predispozicija i prisustvo faktora rizika kao što su pušenje, varijacije u hormonalnom statusu (trudnoća, menopauza), sistemska oboljenja (diabetes mellitus, osteoporoza, imunodeficijencije, oboljenja krvi), psihološki stres, malnutricija, upotreba različitih medikamenata, loša oralna higijena su činioci koji utiču na razvoj oboljenja. Dok je kod gingivitisa zapaljenski proces ograničen na gingivu, kod parodontopatije zapaljenskim procesom su zahvaćena i posledično destruisana dublja tkiva parodontijuma - periodoncijum, alveolarna kost i cement korena zuba. Destrukcija dubljih parodontalnih tkiva, pre svega potpornog koštanog tkiva, dovodi do gubitka zuba. Klinički znaci parodontopatije su zapaljenje gingive, recesija gingive, parodontalni džepovi sa odgovorajućim sadržajem i pojavom subgingivalnih konkremenata, labavljenje i patološka migracija zuba.

Američka akademija za parodontologiju je 1999. godine donela konsenzus o klasifikaciji parodontalnih stanja i bolesti (Armitage, 1999).

Prema usvojenoj klasifikaciji izvršena je podela parodontopatija :

- i. hronična parodontopatija (Slika 2.)
 - lokalizovana
 - generalizovana

- ii. agresivna parodontopatija (Slika 3.)
 - lokalizovana
 - generalizovana

- iii. parodontopatije udružene sa sistemskim bolestima

- iv. uleceronekrozna parodontopatija (Slika 4.)

Najučestalijom formom se smatra hronična parodontopatija. Ova klinička forma parodontopatije je sporonapredujuća i karakteriše se postepenom destrukcijom parodontalnih tkiva. Podaci brojnih epidemioloških studija govore u prilog činjenice da se radi o najrasprostranjenijem oboljenju ljudskog roda. Rezultati istraživanja su pokazali da se prevalenca hronične parodontopatije povećava sa starošću ispitanika (Brown i Löe 1991).



Slika. 2. Hronična parodontopatija

Za razliku od hronične, agresivna parodontopatija je brzonapredujuća forma. Karakteriše je rapidan gubitak potpornog koštanog tkiva, javljanje oboljenja unutar familije i odsustvo sistemskih bolesti kod pacijenta obolelih od ove forme parodontopatije (Armitage 1999).

Sekundarna obeležja koja se dovode u vezu sa agresivnom parodontopatijom su disproporcija količine dentalnog plaka i stepena destrukcije tkiva, povišeni nivoi bakterija *A.actinomycescomitans* i u nekim populacijama i *P.gingivalis*, abnormalnost fagocita, hiperaktivni fenotip makrofaga kao i spontani prekid napredovanja oboljenja. Takođe, karakteriše je i značajno mala zastupljenost u populaciji. Prevalenca agresivne parodontopatije se kreće do 1 %, sa predominacijom crne rase u odnosu na belu rasu (Löe i Brown 1991).



Slika 3. Agresivna parodontopatija (Preuzeto iz Roshna i Nandakumar 2012)

Ulceronekrozna parodontopatija je forma parodontopatije koja se odlikuje brzom destrukcijom parodontocijuma. Najčešće oboljevaju osobe sa sistemskim stanjima koje smanjuju otpornost domaćina kao što su sindrom stečene imunodeficijencije, malnutricija i imunosupresija (Novak 1999). Predisponirajući faktori za nastanak ulcero-nekrozne parodontopatije su i loša oralna higijena, psihološki stres, konzumacija

alkohola i nikotina i njeno pređašnje javljanje. Karakterišu je ulcerozno-nekrozni procesi koji prvo zahvataju gingivu. Ulkusi su prekriveni tzv. pseudomembranama – žućkasto belim i sivim naslagama. Nekrozni proces se zatim širi u dublja tkiva parodontijuma i dovodi do formiranja koštanih sekvestara. Najčešće izolovane bakterije iz lezija ove forme parodontopatije - *Treponema sp* i *Selenomonas sp.*, *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia* i *Porphyromonas gingivalis* karakteriše izraženi patogeni potencijal. Takođe, kod pacijenata obolelih od ulceronekrozne parodontopatije se javljaju bol, krvarenje spontano ili na blagu provokaciju kao i izražen *foetor ex ore* .



(Preuzeto iz Albandar i Tinoco 2002)

Slika 4. Ulceronekrozna parodontopatija

1.2. Etiologija i patogeneza parodontopatije

Parodontopatija je hronično inflamatorno oboljenje potpornih tkiva zuba inicirano bakterijama dentalnog plaka tj. biofilma. Gram negativni anaerobni mikroorganizmi, koji kolonizuju subgingivalnu regiju, se smatraju osnovnim etiološkim faktorom parodontopatije. Međutim, samo prisustvo bakterija nije dovoljno za razvoj oboljenja. Ekspresija i progresija oboljenja je determinisana imunim odgovorom domaćina na bakterije biofilma. Destrukcija periodontalnog ligamenta i potpornog koštanog tkiva predstavlja ishod ekstenzivnog imunog odgovora domaćina na bakterije dentalnog plaka. Time se objašnjava činjenica da i pored adekvatnog održavanja oralne higijene i dobre kontrole plaka određene osobe razvijaju teške forme parodontopatije, dok sa druge strane pojedinci sa obiljem naslaga u ustima ne razvijaju uznapredovale forme bolesti. Podložnost tj. prijemčivost osobe za nastanak parodontopatije podrazumeva uzajamno dejstvo bakterija, domaćina i faktora sredine (Seymour i Taylor 2004).

Patogenetski mehanizmi parodontopatije uključuju kompleksne imuno-inflamatorne reakcije domaćina koje su inicirane parodontopatogenim mikroorganizmima biofilma.

Dominantne karakteristike oboljenja parodontocijuma su infekcija i inflamacija. Može se reći da parodontopatija nastaje usled infekcije u parodontocijumu koja je praćena inflamatornim i imunim odgovorom domaćina. Inflamacija predstavlja zaštitnu reakciju gingivalnog tkiva na mikroorganizme dentalnog plaka i njihove produkte. Tokom lokalne inflamatorne reakcije proizvode se medijatori inflamacije koji dovode do oštećenja tkiva parodontocijuma.

1.2.1. Parodontopatogeni mikroorganizmi

Etiologija parodontopatije je polimikrobna i svojim parodontopatogenim potencijalom ističu se *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Treponema denticola* i *Fusobacterium nucleatum*.

Njihova esencijalna uloga se ogleda u inicijaciji inflamatornog procesa ali oštećenje parodontalnih tkiva i progresija oboljenja nastaje kao rezultat destruktivne uloge imunog odgovora domaćina. Složena priroda ovog oboljenja ogleda se u kompleksnoj interakciji parodontopatogenih bakterija i ćelija imunog odgovora. Ta interakcija podrazumeva aktivaciju imunih ćelija, komponentama parodontopatogenih bakterija, koje produkuju pro-inflamatorne medijatore kao što su IL-1 β , IL-6, TNF- α zatim PGE-2, matriksne metaloproteinaze.

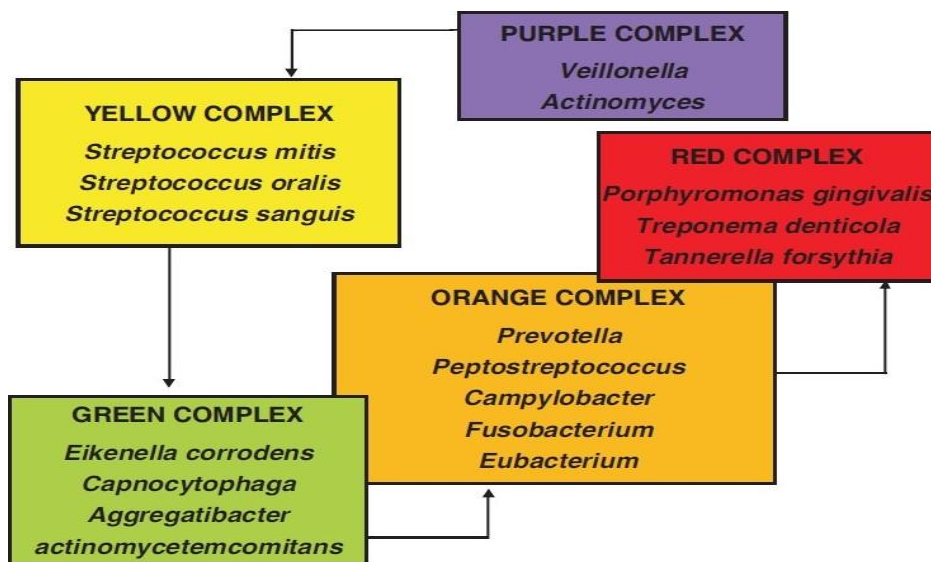
Parodontopatogene bakterije raspolažu faktorima virulencije pomoću kojih mogu da modifikuju imunološke reakcije domaćina u destruktivnom smeru.

Endotoksin, koji je po sastavu lipopolisaharid (LPS) kao gradivni element većine parodontopatogenih bakterija se karakteriše imunoaktivnim potencijalom. LPS prodire iz biofilma u tkivo gingive gde se vezuju za proteine koji vezuju lipide. Taj kompleks biva prepoznat od strane CD-14 receptora monocita/makrofaga što predstavlja signal za produkciju i sekreciju proinflamatornih citokina (IL-1 β , IL-6, TNF- α), PGE2 i matriks metaloproteinaza.

Parodontopatogeni mikroorganizmi sintetišu brojne enzime – kolagenazu, hijaluronidazu, fosfolipazu, alkalnu i kiselu fosfatazu, amniopeptidazu, koji utiču na nastanak i razvoj oboljenja parodonticijuma. Hijaluronidaza ragrađuje međućelijsku supstancu, kolagenaza razgrađuje kolagen i elastaza razgrađuje elastična vlakna krvnih sudova. Patogena aktivnost bakterija dentalnog plaka se ogleda i u produkciji egzotoksina, među kojima se posebno ističe leukotoksin produkovan od strane *A.actinomycetemcomitans*. Patogeni potencijal leukotoksina se ogleda u smanjenju zaštitinih reakcija fagocita. Invazija mikroorganizama je takodje mehanizam kojim bakterije dentalnog plaka utiču na nastanak i razvoj patološkog procesa u parodonticijumu. Pasivnom infiltracijom bakterije prodiru u tkivo gingive i u dublja tkiva parodonticijuma.

Socransky i saradnici (Socransky i sar., 1998) su izvršili podelu bakterija subgingivalnog dentalnog plaka u šest kompleksa, dajući im specifične boje. Bakterije crvenog i narandžastog kompleksa dominiraju u subgingivalnom plaku obolelih od hronične parodontopatije. Svojim parodontopatogenim potencijalom se posebno ističu

bakterije crvenog kompleksa - *P.gingivalis*, *T.denticola* i *T.forsythia* koje su dovedene u vezu sa uznapredovalim formama hronične parodontopatije



Slika 5. Socransky kompleks bakterija (preuzeto iz Socransky i sar., 1998)

Aggregatibacter actinomycetemcomitans je fakultativno anerobni, gram negativni nepokretni kokobacil. Visoko je zastupljen u dentalnom plaku pacijenata sa dijagnostikovanom agresivnom parodontopatijom i identifikovan je kao njen glavni etiološki faktor (Asikainen 1986). *A.actinomycetemcomitans* je takodje prisutan kod hronične parodontopatije gde je njegova uloga manja jasna. Postoje šest serotipova *A.actinomycetemcomitans* (Kaplan i sar., 2001), od kojih serotipovi a i b pokazuju svojstvenost parodontopatiji. Ova bakterijska vrsta poseduje brojne faktore virulencije koji mogu biti uključeni u patogenezu parodontopatije (Fives-Taylor i sar., 1999). Među njima se ističu leukotoksin, citoletalni toksin rastezanja, faktori imunosupresije, inhibitori hemotakse, inhibitori funkcije polimorfonukleara i elementi koji ih čine otpornim na komplement, kolagenaze, inhibitore proliferacije fibroblasta i inhibitore koštane formacije, faktori koji stimulišu medijatore inflamacije .

Porphyromonas gingivalis je anerobni Gram negativni bacil koji poseduje fimbrije. Svojestven je hroničnim parodontopatijama. Produkuje enzime i toksične metabolite i brojne druge faktore virulencije (LPS, proteinaze, adhezija i koagregacija koji mogu aktivirati imuni odgovor domaćina (Holt i Ebersole 2005). *Prevotella intermedia* je crnopigmentisana gram negativna striktno anaerobna parodontopatogena bakterija koja je značajno zastupljena kod pacijenata obolelih od hronične, agresivne i ulceronekrozne parodontopatije i kod gingivitisa u toku trudnoće (Socransky i sar., 1998; Dahlén i sar., 1990; Dzink i sar., 1983; Moore i sar., 1985). *P.intermedia* indukuje ekspresiju proinflammatoryh citokina u epitelnim ćelijama gingivalnog porekla. *Treponema denticola* je striktno anaerobna gram negativna bakterija čija se zastupljenost procenjuje na oko 50% u subgingivalnom plaku obolelih od parodontopatije. Ova vrsta bakterije je retko prisutna kod zdravih parodontalnih tkiva. Pored dokazane povezanosti sa hroničnom parodontopatijom njeno prisustvo se vezuje za i ulceronekroznu parodontopatiju.

Važno je naglasiti da je prisustvo parodontopatogenih mikroorganizama neophodno za nastanak inflamacije u parodontacijumu, ali insuficijentno za razvoj oboljenja. Naime, prisustvo parodontalnih bakterija, u značajno manjoj proporciji, je dokazano i kod osoba sa zdravim parodontalnim tkivima (Newman i sar., 1978, Lourenco i sar., 2014). Takođe, ustanovljene su i varijacije u zastupljenosti parodontopatogenih bakterija u različitim populacijama. Cullinan i saradnici (Cullinan i sar., 2003) u svojoj petogodišnjoj prospektivnoj studiji na uzorku od 504 odrasle osobe su ustanovili varijacije u zastupljenosti *P. gingivalis*, *A. Actinomycetemcomitans* i *P. intermedia*, pri čemu je mali broj ispitanika pokazao prisustvo ovih bakterija istovremeno tokom kontrolnih pregleda. Takodje, nije ustanovljena korelacija prisustva *A. Actinomycetemcomitans* i *P. intermedia* i kliničkih parametara pokazatelja parodontalne destrukcije. Ove činjenice ukazuju na značaj imunoloških reakcija domaćina u destrukciji parodontalnih tkiva.

1.2.2. Medijatori zapaljenskih i imunoloških reakcija

Savremena istraživanja u polju patogeneze parodontopatije su centralnu ulogu parodontopatogenih bakterija zamenila imunološkim reakcijama domaćina koje su uključene u destrukciju parodontalnih tkiva. Imunološki odgovor domaćina na parodontopatogene

bakterije biofilma se smatra ključnim elementom koji određuje da li će doći do razvoja oboljenja parodonticijuma.

Mehanizmi odbrane domaćina se sastoje od urođene imunosti, prirodne tj. nativne i stečene ili adaptivne imunosti. Urođena imunost predstavlja tip odbrane domaćina koji posreduje u ranoj zaštiti od infekcija, sprečavajući prodor mikroorganizama kao i omogućavanjem njihove brze eliminacije. Kao odgovor na prodor mikroorganizama u tkiva domaćina aktivira se i adaptira stečeni tip imunosti. Interaktivna komunikacija između ova dva tipa imunosti ogleda se u složenim mehanizmima aktivacije mnogobrojnih ćelija imunosti kao i u produkciji različitih molekula.

Komponente urođene imunosti čine epitelne barijere, fagociti, urođenoubilačke ćelije, sistem komplementa, citokini i proteini plazme. Stečena imunost je bazirana na složenim interakcijama između antigen prezentirajućih ćelija i T i B limfocita. Urođena i stečena imunost određuju dalje napredovanje parodontalne infekcije.

Ekcesivan imuni odgovor domaćina se smatra odgovornim za destrukciju parodontalnih tkiva u toku parodontopatije. U odgovoru na parodontopatogene mikroorganizme subgingivalnog dentalnog plaka dolazi do produkcije medijatora zapaljenskih i imunoloških reakcija. Njihove funkcije su brojne ali najvažnija se ogleda u aktivaciju urođene imunosti domaćina.

Citokini su solubilni proteini koji omogućavaju komunikaciju između leukocita i između leukocita i drugih ćelija, imaju autokrino i parakrino dejstvo. Citokini su u urođenoj imunosti produkovani od strane makrofaga. Signal za aktivaciju makrofaga je prepoznavanje mikroorganizma, odnosno vezivanje LPS za receptor. Izvori citokina u celularnoj imunosti su pomoćnički T-limfociti. Citokini od posebne važnosti u patogenezi parodontopatije su interleukin-1 beta (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6) i faktor nekroze tumora alfa (TNF- α).

Parodontopatija predstavlja svojevrsni rezervoar proinflamatornih citokina i prostaglandina, čije su povišene koncentracije ustanovljene lokalno u gingivalnoj tečnosti i sistemski u cirkulaciji (Page i sar., 1991, Page i Kornman, 1997)

IL-1 β je plejotropni citokin, jedan od najpotentnijih i najfunkcionalniji aktivator ćelija (Dinarello 1988). Glavni ćeljski izvori IL-1 β su makrofagi, ćelije prirodne ubice (NK) i B ćelije. Brojne druge ćelije kao što su fibroblasti, keratinociti, endotelne ćelije proizvode IL-1 kao odgovor na stimulaciju. Ustanovljena je produkcija ovog citokina i od strane ćelija centralnog nervnog sistema (Besedovsky i del Rey 1996).

Biološka aktivnost IL-1 β je veoma raznovrsna, pri čemu je fokus delovanja usmeren na aktivaciju proteina akutne faze, prostaglandina, drugih citokina, indukciju sinteze kolagena i kolagenaze i resorpciju alveolarne kosti (Dinarello 1988). Takođe, imaju mogućnost i da stimulišu proliferaciju limfocita, inhibišu sintezu interferona (IFN), kao i stimulaciju produžene produkcije limfokina od strane T ćelija i imunoglobulina od strane plazma ćelija. Ove funkcije IL-1 β ukazuju na njegovu izraženu proinflamatornu aktivnost. Trigger okidači produkcije IL-1 β su limfokini, drugi citokini, prostaglandin E₂ (PGE₂), komponente komplementa i bakterije odnosno lipopolisaharid (LPS). Značajna uloga IL-1 β je i mogućnost stimulacije gingivalnih fibroblasta da proizvode značajne nivoe PGE₂ i kolagenaza (Richards & Rutherford 1988, Meikle i sar., 1989). Takođe, ustanovljen je i demineralizujući efekat na alveolarnu kost (Tatakis 1993). Povišeni nivoi IL-1 β su utvrđeni u gingivalnoj tečnosti, vezivnom tkivu gingive i u serumu pacijenata obolelih od parodontopatije (Gemmell i sar., 1997).

Interleukin - 6 (IL-6) je proinflamatorni citokin kojeg proizvode monociti i makrofagi, T ćelije, fibroblasti, hepatociti, endotelijalne ćelije i neuralne ćelije (Van Snick 1990). Glavni izvori IL-6 u ljudskom organizmu su T i B ćelije, fibroblasti i monociti/makrofagi, pri čemu i ćelije koje proizvode IL-6 međusobno stimulišu jedna drugu. Monociti imaju mogućnost produkcije IL-6 nezavisno od uticaja drugih ćelija ali produkcija od strane T ćelije je uslovljena stimulacijom monocita (Horii i sar., 1988). Biološka aktivnost IL-6 je usmerena na diferencijaciju B ćelija u plazma ćelije, aktivaciju T ćelija i produkciju proteina akutne faze poreklom iz hepatocita. Ustanovljeni su i proinflamatorni i antiinflamatorni efekti IL-6.

Faktor nekroze tumora alfa (TNF- α) je važan medijator inflamatornih reakcija i može se reći da ima centralnu ulogu u patogenezi uznapredovalih formi hronične parodontopatije (Yücel i sar., 2015). Glavni izvori TNF- α su monociti/makrofagi. TNF-

α omogućava adheziju polimorfonukleara za endotelne ćelije, njihovu degranulaciju i stimuliše fagocitozu. IL-1 β i TNF- α indukuju ekspresiju drugih medijatora, kao što su prostaglandini amplifikujući inflamatorni odgovor domaćina, stimulišu produkciju kolagena i povećavaju fagocitnu aktivnost (Pfizenmaier i sar., 1996). Takođe, IL-1 β i TNF- α sinergističkim dejstvom stimulišu resorpciju alveolarne kosti (Stashenko i sar., 1987).

Kao medijatori imunskih reakcija koji su uključeni u destrukciju tkiva parodontcijuma u toku parodontopatije ističu se prostaglandini, posebno PGE₂ (Genco 1992). Najpre, uloga prostaglandina u parodontalnoj destrukciji je potvrđena sposobnošću inhibitora sinteze prostaglandina da redukuju gubitak koštanog tkiva u toku parodontopatije (Offenbacher i sar., 1990). Prostaglandini predstavljaju grupu lipidnih medijatora zapaljenja koji nastaju od arahidonske kiseline dejstvom ciklooksigenaza. Metabolizam arahidonske kiseline se odvija putem enzima lipooksigenaze i ciklooksigenaze 1 i 2 koja katalizuje konverziju arahidonske kiseline između ostalog i u prostaglandine. Prostaglandini su podeljeni u 10 subklasa, od koji D, E, F G, H i I su najvažnije. Prostaglandin E₂ stimuliše resorpciju alveolarne kosti i takođe se smatra medijatorom tkivne destrukcije. U gingivalnom tkivu prostaglandin E₂ je uglavnom lokalizovan u makrofagima i produkcija je odgovor na bakterijsku stimulaciju (LPS). Ustanovljeno je da ćelije periodontalnog ligamenta takođe produkuju prostaglandin E₂, bez obzira na stimulaciju. Sekrecije PGE je pojačana pod uticajem IL-1 β , TNF- α i paratiroidnog hormona.

Matriks metaloproteinaze (MMP) predstavljaju grupu Zn²⁺ zavisnih enzima endopeptidaza koje imaju sposobnost da degradiraju komponente ekstraćelijskog matriksa. Uloga matriks metaloproteinaza kao medijatora je dokumentovana u patološkim procesima ali i u fiziološkim procesima kao što je remodelacija vezivnog tkiva koja se odvija tokom obnavljanja tkiva kao i u toku rasta i razvoja (Pafe McCaw i sar., 2007).

Ova familija enzima obuhvata sledeće članove – intersticijalne kolagenaze (MMP-1, 2, 3), gelatinaze (MMP- 2 i 9), stromelizine (MMP-3, 10, 11) i membrane vezane MMP. MMP sintetišu ne samo ćelije vezivnog tkiva, već i makrofagi, monociti i endotelijalne ćelije takodje. Patološka remodelacija vezivnog tkiva je posledica

neodržavanja normalnog regulatornog mehanizma usled disbalansa regulatornih faktora. U pogledu MMP, homeostaza vezivnog tkiva je uslovljena balansom MMP i tkivnih inhibitora MMP (TIMP). Narušavanje balansa MMP i TIMP dovodi do destrukcije kolagena ekstraćelijskog matriksa, što je potvrđeno u slučaju parodontopatije (Kubota i sar., 2008). TIMP su merljivi samo u gingivalnoj tečnosti zdravih parodontalnih tkiva. Dokazana je pozitivna korelacija nivoa MMP u gingivalnoj tečnosti i inflamacije u parodonticijumu (Kiili i sar., 2002).

1.2.3. Inflamatorna osteoklastogeneza

Inflamatorna reakcija gingive predstavlja inicijalni odgovor na mikroorganizme dentalnog plaka i njihove produkte. Ova zaštitna reakcija aktivira urođenu imunost što rezultira oslobađanjem citokina i drugih medijatora inflamacije koji uslovljavaju dalje napredovanje inflamacije u dublja tkiva parodonticijuma. Propagacija inflamacije na susednu alveolarnu kost je posledica nemogućnosti da se "inflamatorni front" ograniči na nivou gingive. Osnovna obeležja parodontopatije su destrukcija periodontalnog ligamenta i alveolarne kosti inflamatornim procesom. Osteoklastična resorpcija predstavlja zaštitni mehanizam koji ima za cilj da spreči prodor bakterija u kost, ali posledično dovodi do rasklaćenja i gubitka zuba na kraju. Da li će inflamatorni proces dovesti do koštane resorpcije zavisi od dva faktora: suficijentne koncentracije medijatora inflamacije u tkivu gingive i medijatori inflamacije moraju penetrirati na kritičnu distancu u odnosu na alveolarnu kost (Cochran 2008).

Glavnim patološkim procesom parodontopatije se dakle smatra inflamatorna osteoklastogeneza koja predstavlja proces sazrevanja pre-osteoklasta i povećanje aktivnosti zrelih osteoklasta. Incirana je postizanjem kritične koncentracije medijatora inflamacije. Inflamatorna osteoklastogeneza je regulisana interakcijom receptora aktivatora nuklearnog faktora kapa b (RANK), njegovog liganda (RANKL) i osteoprotežerina (OPG). RANK je receptor na površini ćelija osteoklastnih progenitora i zrelih osteoklasta. RANKL je ligand koji se vezuje sa RANK, OPG je njegov kompetativan antagonist- ligand koji se takodje vezuje za RANK. Vezivanje RANKL

za RANK uslovljava diferencijaciju osteoklasta odnosno koštanu resorpciju. Dakle, odnos RANKL/OPG određuje da li će doći do resorpcije ili formacije koštanog tkiva. Na osnovu ovih činjenica, citokini i drugi signalni molekuli uključeni u interakciju RANK, RANKL i OPG se smatraju ključnim pro-inflamatornim medijatorima parodontopatije.

Proinflamatorni citokini – IL-1 β , IL-6, IL-11, IL-17, TNF- β , zatim PGE2 u kritičnoj koncentraciji stimulišu koštanu resorpciju tj. indukuju osteoklastogenezu povećavajući ekspresiju RANKL i smanjujući produkciju OPG (Nakashima i sar., 2000).

1.4. Etiologija i patogeneza prevremenog porođaja

Porođaj (*latin. partus*) predstavlja fiziološki proces kojim se završava gestacijski period. U toku porođaja, koordinisane kontrakcije materice (lat. *uterus*) posledično dovode do dilatacije grlića uterusa i uzrokuju ekspulziju fetusa. Važno je istaći da je mehanizam porođaja u očekivanom terminu kao i prevremenog porođaja (porođaj pre navršene 37. nedelje gestacije) u suštini isti osim razlike u vremenu nastanka (Mennon i sar., 2011). Kod terminskog porođaja, do pucanja membrana u uterusu tj. plodovih ovojaka dolazi usled kontrakcije uterusa. Prevremeni porođaj uslovljavaju različiti patološki procesi koji aktiviraju neke od mehanizama porođaja pre vremena (Romero i sar., 2006).

Biološki mehanizam porođaja je regulisan složenom interakcijom hormona i citokina. Povećana uterusna kontraktilnost u porođaju u terminu rezultat je aktivacije a zatim stimulacije miometrijuma. Aktivacija može biti provocirana mehanički rastezanjem uterusa, i endokrinim putem kao rezultat povećane aktivnosti fetalne hipotalamo-pituitarne-adrenalne osovine (HPA). Povećana sekrecija adenokortikotropnog hormona od strane fetalne hipofize, kako se bliži porođaj, stimuliše produkciju glukokortikoida. Glukokortikoidi dospevaju u placentu i stimulišu sintezu estrogena i prostaglandina a inhibiraju sintezu progesterona. Upravo odnos

estrogen-progestoren koji se povećava u korist estrogena i dostiže kulminaciju neposredno pred porođaj stimuliše lokalnu sintezu prostaglandina i uzrokuje niz posledičnih reakcija koji dovode do porođaja. Kortikosteroidi povećavaju nivo PGE2 stimulisanjem sinteze delujući na povećanje sinteze Prostaglandin H2 Sintetaze (PGHS-2) i inhibicijom njihove razgradnje održavanjem niskog nivoa 15-OH Prostaglandin Dehidrogenaze (PGDH). Ovi procesi se mogu odvijati i zavisno i nezavisno od estrogena. Na sličan način proinflamatorni citokini dovode do porasta PGHS-2 i smanjenja PGDH koji na nekoliko načina mogu pokrenuti porođaj u terminu ili prevremeni porođaj (Gibb i sar., 2001, Gyomory i sar., 2000, Whittle i sar., 2000).

Oksitocin, hormon koji utiče na učestalost i intenzitet kontrakcija glatke muskulature uterusa, se smatra važnim činiocem porođaja. Neposredno pred porođaj dolazi do povećane sinteze receptora za oksitocin i oksitocina usled stimulacije neurohipofize trudnice signalima iz nadraženog uterusa, mehanizmom pozitivne povratne sprege. Istraživanja su pokazala da i inflamacija utiče na produkciju oksitocinskih receptora i citokina u ćelijama glatke muskulature uterusa (Helmer i sar., 2002).

Uloga proinflamatornih medijatora kao što su interleukin-1 (IL-1), interleukin-6 (IL-6), faktor nekroze tumora alfa (TNF- α) i PGE2 je evidentna i u terminskom i prevremenom porođaju, nezavisno od prisustva infekcije (Christiaens i sar., 2008). Navedeni medijatori su označeni kao glavni pokretači porođaja. Nivoi ovih zapaljenskih medijatora se postepeno povećavaju tokom gestacije, i dostižu najviše nivoe neposredno pre porođaj. Porođaj predstavlja proces sa inflamatornim elementima (Golightly i sar., 2001, Dudley i sar., 1996) što se objašnjava ključnom ulogom proinflamatornih medijatora u stimulaciji aktivnosti miometrijuma i potenciranju kontrakcija uterusa.

Činjenica da lokalno povećane koncentracije IL-1 β , IL-6, TNF- α i PGE2 nastaje u periodu koji prethodi porođaju iskorišćeno je u terapijske svrhe u slučajevima kada se porođaj ne odvija očekivanim tokom. Jedna od prvih supstanci koja je našla svoju široku kliničku primenu je PGE2 (Nunes 1999).

Prostaglandini imaju važnu ulogu u osnovnim fazama porođaja – rupturi fetalne membrane, cervikalnoj dilataciji, kontrakcijama miometrijuma, separaciji placente i involuciji uterusa. Posebno se izdvaja uloga prostaglandina u inicijaciju kontrakcija miometrijuma i smatraju se triger faktorima porođaja (Olson i Ammann 2007) . Mnogi inflamatorni procesi, praćeni porastom bioloških markera tj. citokina kao konačni ishod daju povećanje koncentracije PGE2 i PGF2-alfa.

Prema definiciji koju je dala Svetska zdravstvena organizacija (SZO) 1977. god prevremeni porođaj je onaj porođaj koji se dogodi pre navršene 37. nedelje gestacije (WHO 1977). Klasifikacija na sub-kategorije je izvršena prema gestacijskoj starosti na: izuzetno rani PP (pre 28. nedelje gestacije), značajno rani PP (između 28 i 32 nedelje gestacije) i umereno rani PP (od 32 do 37 nedelje gestacije). Incidenca prevremenog porođaja se kreće od 5 do 18 %, aproksimativno oko 11 %, na svetskom nivou (Blencowe i sar., 2013), sa tendencijom porasta u mnogim zemljama. Stopa prematuriteta u Vojvodini iznosi 9% (Velisavljev-Filipović G 2010). Prevremeni porođaj se smatra značajnim svetskim zdravstvenim problemom u razvijenim i zemljama u razvoju, bez obzira na socio-ekonomski status. Procenjuje se da se godišnje rodi 15 miliona prematurusa, dok se smrtni ishod od komplikacija prevremenog porođaja desi u čak 1 milion slucaja. Prevremeni porođaj je vodeći uzrok smrtnog ishoda novorođenčadi u prvom mesecu života i drugi po redu uzrok smrti dece ispod pet godina života (Chang i sar., 2013). Imajući u vidu da se 70 % perinatalnog mortaliteta i preko 50 % perinatalnog morbiditeta pripisuje prevremnom porođaju postoji poseban interes za otkrivanje njegovog uzroka i prevenciju (McCormick 1985, WHO 2006).

Prevremeno rođena novorođenčad (prematurusi) zbog skraćenog intrauterinog razvoja, pokazuju karakteristike nezrelog organizma što predstavlja osnovu za multiorganska oštećenja.

Mnogobrojna oboljenja koja se dovode u vezu sa prevremenim rođenjem, utiču na smanjenje stope preživljavanja prevremeno rođene dece i optimalan razvoj. Prevremeno rođena deca se suočavaju sa povećanim rizikom za nastanak bolesti kao što su nekrotizirajući kolitis (Lin i sar., 2006), respiratorni distres sindrom (Pike i sar., 2014), nozo-komijalna sepsa, intrakranijalna hemoragija (Brouwer i sar. 2008),

prematurusna retinopatija (Saugstad 2006, Khalesi i sar., 2015) i bronho-pulmonalna displazija (Walsh i sar., 2006). Takođe, prevremeno rođenje se vezuje za povećan rizik za nastanak kongenitalnih anomalija (Kanes i Visintainer 2007), poremećaje pažnje (Breslay i sar., 1996) i smanjene kognitivne sposobnosti kod dece predškolskog uzrasta (Sommerfelt i sar., 1996). Usled nedovoljno razvijene i urođene i stečene imunosti, prematurusi se smatraju imunokompromitovanim domaćinima što ih čini podložnim za nastanak infekcija. Neonatalna infekcija udružena sa prevremenim porođajem se smatra vodećim uzrokom smrti novorođenčadi (Lawn i sar., 2010).

Prevremeni porođaj može nastati kao spontani i planirani ishod gestacije. Planirani prevremeni porođaj tzv. jatrogeni prematuritet je posledica indukovanog ili porođaja carski rezom. On je indikovano u slučajevima kad se proceni da je rizik od nastavka trudnoće veći od posledica koje sa sobom nosi prevremeni porođaj. Istraživanja su pokazala da je povećanje stope jatrogenog prematuriteta rezultiralo smanjenjem učestalosti perinatalnog mortaliteta.

Spontani prevremeni porođaj sa zastupljenošću od 70% od ukupnih prevremenih porođaja je multikauzalne etiologije (Romero 2014). Mnogi patološki procesi se dovode u vezu sa nastankom ovog nepovoljnog ishoda trudnoće, ali tačan patogenetski mehanizam nije ustanovljen.

Danas se kao etiološki činioci i faktori rizika spontanog prevremenog porođaja navode (Williams i sar., 2000, Menon i sar., 2011):

- Medicinske i obstetričke komplikacije- preeklampsija, autoimune bolesti, metaboličke bolesti, fetalni distres, zastoj u razvoju ploda, abrupcija placente, fetalna smrt
- Socio-ekonomski faktori i navike- kao sto su pušenje, korišćenje alkohola i droga, slaba uhranjenost i prekomerna telesna težina trudnica, starost trudnice, psihološki stres trudnice, prekomerno fizičko opterećenje
- Terapijski postupci - prethodne hirurške intervencije
- Infekcije - manifestne infekcije amnionske tečnosti i horioamniona, sublikiničke infekcije amnionske tečnosti (bez jasne kliničke slike infekcije i sa intaktnim plodovim ovojcima)

- Multiple trudnoće
- Skraćeni grlić materice
- Vaginalno krvavljenje
- Rasna pripadnost
- Genetski faktori - genski polimorfizmi za pro-inflamatorne citokine

Do spontanog prevremenog rođenja može doći usled spontanog porođaja sa intaktnim plodovim ovojnicama i usled preterminskog prematurnog prsnuća plodovih ovojnica (pPPOP). Preterminsko prematurno prsnuće ovojnica ploda se definiše kao spontano prsnuće fetalnih membrana pre 37. nedelje gestacije i najmanje 1 sat pre započinjanja kontrakcija.

Istraživanja su pokazala da se prematuritet češće javlja u toku multiplih trudnoća (blizanačka, trostruka trudnoća) u odnosu na jednostruke. Prekomerno rastezanje miometrijuma i grlića materice usled prisustva više od jednog ploda može uzrokovati prevremeno započinjanje porođaja. Incidenca artificijalno začetih multiplih trudnoća je u porastu, pre svega zbog reproduktivnih tehnika koji se primenjuju u lečenju steriliteta. Jednostruke trudnoće, začete in-vitro fertilizacijom su takođe u značajnom riziku od prevremenog porođaja (Jackson i sar., 2004).

Rasna pripadnost takođe pokazuje određene specifičnost u pogledu prevremenog porođaja, kod bele rase je zastupljeniji prevremeni porođaj sa intaktnim plodovim membranama dok je kod crne rase učestaliji prevremeni porođaj urokovano pPPOP (Annanth i Vintzileos 2006).

Ulozi psihološkog stresa kao faktoru rizika za prevremeni porođaj se sve više pridaje značaj u naučnoj literaturi (Copper i sar., 1996). Tačan mehanizam uticaja stresa kojim je izložena trudnica na nastanak prevremenog porođaja nije razjašnjen. Kao moguće objašnjenje navodi se da psihološki stres dovodi do povećane produkcije kortikosteroida koji posledično dovode do porasta nivoa PGE2 koji se smatraju medijatorima porođaja (Wadhawa i sar., 2001). Takođe i loši socio-ekonomski uslovi života kojima su izložene trudnice su dovedeni u vezu sa povećanim rizikom za prevremeni porođaj.

Infekcija i inflamacija fetalnih membrana – horioamnionitisi se smatraju najzastupljenijim etiološkim faktorima prevremenog porođaja, čak u 40 % slučajeva (Lettieri i sar., 1993, Goldenberg i sar., 2000). Međutim, histološki nalaz horioamnionitisa može biti prisutan i u odsustvu infekcija vagine i cervikalne oblasti.

Može se istaći da je intrauterina infekcija, uzrokovana bakterijama, najučestaliji i veoma važan činiac koji dovodi do prevremenog porođaja (Goldenberg i sar., 2000). Amnionska duplja se smatra sterilnom sredinom i izolacija bakterija u amnionskoj tečnosti se smatra patološkim nalazom. Većina infekcija amnionske tečnosti je subklinička, bez jasne simptomatologije i podrazumeva primenu invazivne metode. amniocenteze u cilju dobijanje uzorka za analizu. Asimptomatska intrauterina infekcija se smatra najučestalijim uzorkom preterminskog prematurnog prsnuća plodovih ovojnica. Usled rupture membrane, koja predstavlja svojevrsnu barijeru omogućen je lakši prodor mikroorganizmima iz vaginalne i cervikalne regije i nastanak manifestne infekcije (Romero 1988).

Prodor mikroorganizma u amnionsku duplju može se ostvariti najčešće ascendentnim putem preko vagine i grlića materice, zatim hematogenom deseminacijom preko placente, retrogradnim putem preko peritoneuma i toku invazivnih dijagnostičkih procedura.

Bakterijska infekcija vagine tj. bakterijska vaginoza je poznat faktor rizika za nastanak prevremenog porođaja i najčešći uzrok intrauterine infekcije (Chaim i sar., 1997, Leitich i sar., 2003). Karakteriše je promena vaginalne flore u kojoj normalno laktobacilarnu mikrofloru zamenjuju Gram negativne anerobne bakterije (Hiller i sar., 1993). Brojne studije su pokazale češće prisustvo bakterijske vaginoze kod prevremeno porođenih žena u odnosu na one porođene u terminu. Potencijalno patogeni mikroorganizmi lokalizovani u vagini i grliću materice trudnice mogu direktno prodreti u amnionsku duplju i uzrokovati infekciju amnionske tečnosti sa posledičnim pucanjem plodovih ovojaka. Najčešće izolovane bakterije iz inficirane amnionske tečnosti su *Ureaplasma urealyticum*, *Fusobacterium species*, *Mycoplasma hominis*, *Gardnerella vaginalis* i anaerobni mikroorganizmi (Goncalves i sar., 2002) Međutim, bakterije mogu prisutne u amnionskoj tečnosti trudnica sa intaktnim plodovim ovojcima, bez ikakvih pratećih simptoma karakterističnim za horioamnionitis (Goldenberg i sar., 2000). Kod

prevremeno porođenih žena sa intaktnim fetalnim membranama najčešće su izolovane bakterije vaginalnog porekla niske virulencije.

Detekcija i tretman subkliničkih infekcija genitalnog trakta su posebno u žiži interesovanja stručne javnosti. Međutim, rezultati i preporuke u dijagnostici i lečenju su često kontradiktorni (McDonald 1994, Romero 1993). Kod verifikovanih infekcija, čak i lečenje bilo sistemski ili lokalno ne pruža odgovor na pitanje da li upotreba antimikrobnih lekova poboljšava ishod trudnoće ili ne.

Mehanizam kojim intrauterina infekcija odnosno mikroorganizmi u amnionskoj tečnosti uslovljavaju prevremeni porođaj podrazumava aktivaciju imunog sistema i stimulaciju produkcije proinflammatoryh medijatora. Kao odgovor na stimulaciju bakterijskog endotoksina dolazi do povećane produkcije proinflammatoryh citokina kao što su IL-1 β , IL-6 i TNF- α koji indukuju sintezu prostaglandina koji zatim iniciraju porođaj.

I pored nabrojanih, etioloških faktora i faktora rizika, značajan broj prevremenih porođaja ostaje nepoznate etiologije. Aproksimativno, oko 50 % prevremenih porođaja se smatra idiopatskim (Challis JR 2001.)

Prema dosadašnjim saznanjima, na osnovu razumevanja bioloških mehanizama u toku terminskog porođaja, ključna uloga u inicijaciji prevremenog porođaja pripada prostaglandinima i proinflammatorym citokinima. S obzirom da se infekcija i inflamacija smatraju, u najvećem broju slučajeva, ključnim činiocima prematuriteta inflamatorni odgovor domaćina na prisustvo infektivnog agensa je najverovatniji mehanizam odgovoran za inicijaciju ovog nepovoljnog ishoda gestacije. Patogeneza prevremenog porođaja nije razjašnjena u potpunosti i posebna pažnja se posvećuje otkrivanju novih, mogućih faktora rizika koji će pružiti bolje sagledavanje ovog kompleksnog procesa.

1.5. Parodontopatija i prevremeni porođaj – biološki mehanizmi povezanosti

I pored identifikacije mnogobrojnih etioloških faktora i faktora rizika, značajan procenat prevremenih porođaja ostaje nerazjašnjenje etiologije. Poznato je da su infekcija i inflamacija najznačajniji i najučestaliji etiološki faktori prevremenog porođaja, odnosno njihovo prisustvo u toku trudnoće može uzrokovati disbalans složene mreže citokina i hormona koje regulišu gestaciju. U skladu sa tim, postoji stav da udaljena infekcija, prisutna u toku trudnoće, koja deli imunološki i/ili inflamatorni profil sa patologijom prevremenog porođaja, predstavlja faktor rizika. Sposobnost infektivnog procesa, prisutnog u toku gestacije, da različitim mehanizmima poremeti lokalnu homeostazu medijatora porođaja predstavlja ključnu pretpostavku. Postavlja se pitanje da li imunomodulatori koji se javljaju lokalno kako kod terminskog, tako i prevremenog porođaja, ako se pojave u povećanoj koncentraciji u krvi stvoreni na udaljenom mestu bilo imunskim procesom ili infekcijom mogu prouzrokovati prerani završetak trudnoće odnosno da li mogu indukovati porođaj. Jedna od pretpostavki je i da parodontopatija koja ima elemente i infektivnog i imunološkog procesa u toku kojih dolazi do povećanja koncentracije citokina kao što su IL-1, IL-6, IL-2, TNF- α i PGE2 i PGF2-alfa može inicirati prevremeni porođaj.

Činjenica je da parodontopatija kao inflamatorno oboljenje predstavlja svojevrsni rezervoar pro-inflamatornih medijatora koji su takođe u povećanoj koncentraciji prisutni u periodu koji prethodi i u terminskom i u prevremenom porođaju. Parodontopatija je hronično inflamatorno oboljenje, prouzrokovano predominantno Gram negativnim bakterijama, sa snažnim imunoinduktivnim i agresivnim potencijalom (Shikawa i sar., 1997). Centralnim patološkim procesom parodontopatije se smatra inflamatorna osteoklastogeneza koja je regulisana trijasom RANK/RANKL/OPG a inicirana postizanjem kritične koncentracije pro-inflamatornih medijatora- medijatora parodontopatije stimulisanih lipopolisaharidom (LPS). Aktivnost LPS se ogleda u stimulaciji celularnog imuniteta u produkciji proinflamatornih citokina (IL-1 β , IL-6, TNF- α), PGE2, matriksmetaloproteinaza.

Prostaglandin E2 (PGE2) je identifikovan kao glavni regulatorni molekul koji posreduje u produkciji RANKL kao odgovor na stimulaciju *P.gigivalis*, *T.denticola* i *T.socranskii*, bakterija koje su dovedene u vezu sa nepovoljnim ishodima trudnoće (Choi i sar., 2005, Africa 2011, Ercan i sar., 2013). Takođe, IL-1 β , IL-6 i TNF- α , inicirajući povećanu ekspresiju RANKL, značajno stimulišu resorpciju koštanog tkiva (Nakashima i sar., 2000, Nagasawa i sar., 2007). Vazno je istaći da je kod pacijenta obolelih od parodontopatije dokazano prisustvo povišenih nivoa IL-1 β , IL-6, PGE2 i TNF α u gingivalnoj tečnosti u poređenju sa osobama sa zdravim parodontalnim tkivima (Heasman i sar., 1993, Graves 2008). Osim toga, paropatogene bakterije i posledično produkovani inflamatorni medijatori, imaju mogućnost ulaska u sistemsku cirkulaciju (Beck i sar., 1996, Grossi i Genco 1998) usled povećane vaskularne propustljivosti u uslovima prisutne parodontalne inflamacije (Van Dyke i Van Winkelhoff 2013).

Na osnovu svih nabrojanih činjenica, brojne studije su sprovedene sa ciljem da se istraži povezanost između inflamacije u parodontijumu i prevremenog porođaja. Ustanovljeno je da parodontopatija trudnica predstavlja visok faktor rizika za prevremeni porođaj (Bosnjak i sar., 2006, Sanots-Pereira i sar., 2007, Chambrone i sar. 2011, Madianos i sar., 2013, Sanz i sar., 2013). Takođe, u nedavno objavljenom preglednom radu se ističe da primena adekvatnog terapijskog protokola inflamiranih parodontalnih tkiva može smanjiti rizik za nastanak prevremenog porođaja (Lopez i sar., 2015).

Tačan patogenetski mehanizam povezanosti parodontopatije i prevremenog porođaja nije ustanovljen. Postoji pretpostavka da parodontopatija povećava lokalni zapaljenski status u fetoplacentalnoj jedinici i posledično uzrokuje početak porođaja.

Hipotetički, predložena su dva glavna mehanizma povezanosti inflamiranih parodontalnih tkiva i fetoplacentalne jedinice – direktni i indirektni (Sanz i sar., 2013). Direktni mehanizam podrazumeva moguću transmisiju parodontopatogenih bakterija i/ili njihovog najagresivnijeg građivnog elementa endotoksina iz zapaljenskih tkiva parodontijuma putem cirkulacije u fetoplacentalnu jedinicu i sledstvenu stimulaciju lokalne inflamacije. Prema mogućem direktnom mehanizmu, hematogeni prispeli mikroorganizmi i endotoksin stimulišu lokalnu produkciju, od strane placente,

proinflatornih citokina i PGE2. Dostizanjem kritičnih koncentracija ovih medijatora započinje porođaj.

Indirektni mehanizam uticaja parodontopatije na prevremeni porođaj podrazumeva da medijatori zapaljenja iz parodontalnog žarišta cirkulišu i sinergističkim delovanjem stimulišu i/ili povećaju lokalnu inflamaciju u fetoplacentalnoj jedinici. Značajno je istaći da parodontopatija kao hronično inflamatorno oboljenje predstavlja izvor medijatora inflamacije koju su ujedno i biohemijski markeri porođaja. Povećana produkcija ovih bioaktivnih molekula u gingivalnoj tečnosti, od strane makrofaga i drugih ćelija, je rezultat stimulacije lipopolisaharidnog endotoksina. Pretpostavka je da prisutni inflamatorni medijatori u krvi mogu preći horiamnionsku barijeru i naći se u amnionskoj tečnosti i inicirati prevremeni porođaj. Povišeni nivoi PGE2, IL-6 i IL-8 u amnionskoj tečnosti trudnica sa dijagnostikovanom parodontopatijom u periodu od 15 do 20 nedelje gestacije predstavljaju značajan faktor rizik za nastanak prevremenog porođaja (Dörtbudak i sar., 2005). Istraživanja su pokazala da inflamacija utiče na produkciju citokina u ćelijama glatke muskulature uterusa i intaruterini porast prostaglandina stimuliše kontraktilnost miometrijuma.

U oba predložena mehanizma, pretpostavlja se da se sistemski efekat infekcije u parodontocijumu ogleda u pokretanju niza kaskadnih reakcija u fetoplacentalnoj jedinici koje rezultiraju prevremenim kontrakcijama uterusa i započinjanjem porođaja.

I pored nepoznavanja tačnog mehanizma patološke relacije između parodontopatije i prevremenog porođaja, brojne epidemiološke, mikrobiološke, imunološke i studije sprovedene na animalnim modelima su pružile dokaze u prilog njihove povezanosti.

Moguća hematogena translokacija parodontalnih bakterija u fetalnu jedinicu je ispitivana u studijama na animalnim modelima (Lin i sar., 2003, Collin i sar., 1994, Offenbacher i sar., 2005). Uticaj *P.gingivalis* na nepovoljne ishode trudnoće je ispitivan nakon subkutane inokulacije bakterije i i.v. injekcije LPS poreklom *P.gingivalis*. Rezultati su pokazali povećanu lokalnu produkciju PGE2 i TNF- α , što je za posledicu imalo zastoj u razvoju ploda kao i fetalnu smrt.

Ispitivanje moguće povezanosti bakterija iz usne duplje i nepovoljnih ishoda trudnoće je sprovedeno i u humanim kliničkim studijama. Madianos i saradnici su u svojoj studiji analizirali nivoe IgG antitela majke i IgM antitela fetusa, dobijenih iz krvi

pupčane vrpce, na parodontalne bakterije crvenog i narandžastog kompleksa (Madianos i sar., 2001). Ustanovljeni su značajno viši nivoi fetalnih IgM antitela na *Campylobacter rectus* kod prevremeno rođenih u poređenju sa terminskom novorođenčadi. Bearfield i saradnici u svojoj studiji zaključuju da je moguće oralno poreklo bakterija *F.nucleatum* i *Streptococcus spp.* u amnionskoj tečnosti ispitanica sa istorijom nepovoljnih ishoda trudnoće (Bearfield i sar., 2002). U amnionskoj tečnosti prevremeno porođenih žena ustanovljeno je prisustvo bakterija *F. nucleatum*, *Bergeyella sp* i *P.gingivalis*, dok je u krvi dobijenoj iz pupčane vrpce dokazano prisustvo *Bergeyella sp* kao i IgM antitela na *P.gingivalis* (Sanz i sar., 2013).

Savremena istraživanja potencijalnu ulogu parodontopatije u iniciranju prevremenog porođaja ispituju analizirajući biohemijske markere svojstvene ovim stanjima. Brojne studije, kao biohemijske markere- prediktore prevremenog porođaja ističu medijatore zapaljenskih i imunih reakcija IL-1 β , IL-6, TNF- α i PGE2 (Inglis 1997, Thorsen i sar., 2001). Dokazane su povišene koncentracije navedenih medijatora inflamacije u amnionskoj tečnosti i u serumu prevremeno porođenih žena u odnosu na terminski porođene žene (Madianos i sar., 2013).

U vezi sa već spomenutim indirektnim mehanizmom povezanosti parodontopatije i prevremenog porođaja oskudni su podaci o mogućem uticaju inflamatornih medijatora poreklom iz parodontalnog žarišta na fetoplacentalnu jedinicu.

Cilj naše studije je bio da se ispituju nivoi PGE2, IL-1 β , IL-6 i TNF- α u gingivalnoj tečnosti i u perifernoj venskoj krvi kod prevremeno porođenih žena i žena porođenih u terminu i da se izvrši komparativna analiza sa kliničkim parodontalnim parametrima. Takođe, ispitivano je i prisustvo parodontopatogenih mikroorganizama *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia* i *Treponema denticola* u uzorcima subgingivalnog plaka porođenih žena.

Gingivalna tečnost (GT) je transudat seruma prisutan u uslovima zdravih parodontalnih tkiva u gingivalnom sulkusu ili inflamatorni eksudat u uslovima zapaljenskih oboljenja parodonticijuma u gingivalnom i parodontalnom dzepu. Elementi gingivalne tečnosti potiču iz seruma, tkiva parodonticijuma, ćelija inflamatornog i imunog odgovora domaćina infiltriranih u parodontalna tkiva, mikroorganizama

biofilma. Prikupljanje i analiza GT je neinvazivna metoda koja omogućava detekciju proinflammatory medijatora uključenih u destrukciju parodontalnih tkiva.

Prevremeni porođaj je značajan zdravstveni problem, sa aspekta neonatalnog morbiditeta i mortaliteta sa jedne strane i finansijskih troškova vezano za neonatalnu negu prevremeno rođenih novorođenčadi sa druge strane. Identifikacija trudnica koje su u riziku za prevremeni porođaj je od izuzutnog značaja, ali primena dosadašnjih metoda nije doprinela smanjenju visoke stope učestalosti ovog neželjenog ishoda trudnoće. Razlog leži u tome da se prepoznavanje trudnica visokog rizika za nastanak prevremenog porođaja zasniva na podacima iz prethodnih trudnoća, prisustvu dobro poznatih faktora rizika kao što su multiple trudnoće i pojavi karakterističnih simptoma koje prethode porođaju. Pronalaženje visokospecifičnih metoda, koje će sa pouzdanošću moći identifikovati trudnice visokog rizika za nastanak prevremennog porođaja, je od ključnog značaja. U tu svrhu, posebna pažnja se poklanja identifikaciji biohemijskih parametara – prediktora prevremenog porođaja.

Razumevanje moguće interakcije između parodontopatije i prevremenog porođaja može doprineti boljem sagledavanju patogeneze ovog najčešćeg uzroka perinatalnog morbiditeta i mortaliteta .

Hipoteza ove studije je da patogenetski mehanizmi parodontopatije i prevremenog porođaja uključuju povećanu produkciju određenih istih proinflammatory medijatora, te je moguće postojanje udruženosti ova dva patološka stanja.

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Ciljevi sprovedenog istraživanja su bili:

1. Odrediti nivoe IL-1 β , IL-6, TNF- α i PGE2 u gingivalnoj tečnosti i u perifernoj venskoj krvi kod prevremeno porođenih žena i žena porođenih u očekivanom terminu
2. Ispitati da li su nivoi ispitivanih medijatora zapaljenja u gingivalnoj tečnosti svojstveni različitim stanjima tkiva parodontcijuma
3. Ispitati da li su nivoi ispitivanih medijatora zapaljenja u perifernoj venskoj krvi svojstveni različitim stanjima tkiva parodontcijuma
4. Ispitati prisustvo parodontopatogenih mikroorganizama (*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Treponema denticola*) u subgingivalnom plaku prevremeno porođenih žena i žena porođenih u terminu
5. Ispitati da li su detektovani parodontopatogeni mikroorganizmi svojstveni različitim stanjima tkiva parodontcijuma
6. Komparativnom analizom kliničkih parametara stanja parodontcijuma i nivoa medijatora zapaljenja u gingivalnoj tečnosti i u perifernoj venskoj krvi kod prevremeno porođenih žena ispitati moguću povezanost parodontopatije i prevremenog porođaja.

3. MATERIJAL I METODOLOGIJA

U svrhu dobijanja što potpunijih podataka o potencijalnoj povezanosti patogenetskih mehanizama parodontopatije i prevremenog porođaja, sproveden je kompleksan metodološki koncept. Istraživački postupak je obuhvatio:

- uzimanje anamnestičkih podataka i klinički pregled parodontalnih tkiva
- uzimanje uzoraka gingivalne tečnosti i subgingivalnog plaka
- uzimanje uzoraka periferne venske krvi i
- laboratorijske analize uzoraka.

Kliničkim pregledom se utvrđivalo stanje potpornih tkiva zuba, primenom precizno definisanih kliničkih parametara. Na osnovu dobijenih podataka se utvrđivalo postojanje zdravih parodontalnih tkiva ili zapaljenskih oboljenja parodontcijuma, gingivitisa i parodontopatije. Pomenute procedure - parodontološki pregled, uzorkovanje gingivalne tečnosti, subgingivalnog plaka i periferne venske krvi, su se sprovodile do 48 časova nakon porođaja.

Laboratorijski deo istraživačkog postupka je podrazumevao :

1. određivanje koncentracija medijatora zapaljenja u uzorcima gingivalne tečnosti (GT) i periferne venske krvi
2. mikrobiološku analizu subgingivalnog dentalnog plaka

Dobijeni podaci su pružili uvid o lokalnim zbivanjima u parodontalnim tkivima i sistemskom odgovoru organizma domaćina u bliskom periodu nakon porođaja (do 48 h), u uslovima zdravog i obolelog parodontcijuma. Komparativnom analizom podataka, dobijenih kliničkim i laboratorijskim istraživanjem, ispitivalo se postojanje eventualne povezanosti parodontopatije i prevremenog porođaja.

3.1. Studijske grupe i kriterijumi uključenja i isključenja iz studije

U istraživanje je uključeno 120 žena, porođenih na Klinici za ginekologiju i akušerstvo Kliničkog centra Srbije. Ispitanice su grupisane na sledeći način :

- 60 prevremeno porođenih žena (pre 37. nedelje gestacije) – PP grupa
- 60 žena porođenih u terminu (nakon 37. nedelje gestacije) - TP grupa

Gestacijska starost trudnice se utvrđivala prema obstetričkim kriterijumima, na osnovu poslednjeg menstrualnog ciklusa i ultrazvučnog pregleda (Phoebus i sar., 2003).

Pored dve osnovne studijske grupe, dalja podela je izvršena prema parodontalnom statusu ispitanica na osnovu kriterijuma američke Akademije za parodontologiju (Armitrage, 1999) na:

1. porodilje sa klinički zdravim parodontcijumom
2. porodilje sa dijagnostikovanim gingivitisom
3. porodilje sa dijagnostikovanom parodontopatijom

Kriterijumi za dijagnozu klinički zdravog parodontcijuma su bili :

- dubina sondiranja manja od ili jednaka 3mm i nivo pripojnog epitela 0 mm
- krvarenje na provokaciju nakon sondiranja prisutno na manje od 10 % ukupno pregledanih površina zuba
- odsustvo inflamacije gingive
- prisustvo više od 20 zuba (ne računajući treće molare)

Za postavljanje dijagnoze gingivitisa postavljeni su sledeći kriterijumi:

- prisutna inflamacija gingive
- dubina sondiranja veća od 3 mm

- vrednost nivoa pripojnog epitela 0 mm

Za postavljanje dijagnoze parodontopatije prihvatilo se sledeći nalaz:

- dubina sondiranja veća od 3 mm

- vrednost nivoa pripojnog epitela veća od 0 mm

- prisustvo više od 20 zuba (ne računajući treće molare)

Kriterijumi isključenja iz studije su bili :

- ✓ postojanje bilo koje sistemske bolesti koje se dovode u vezu sa prevremenim porođajem, kao i komplikacija trudnoće koje mogu uticati na njegov nastanak kao što su dijabetes, kardiovaskularna oboljenja, bubrežna oboljenja, autoimuna oboljenja, preeklampsija
- ✓ multiple trudnoće
- ✓ infekcija u toku trudnoće
- ✓ korišćenje antibiotika u toku trudnoće
- ✓ korišćenje antiinflamatornih lekova u toku trudnoće
- ✓ dijagnostikovana abnormalnost ploda i kongenitalne infekcije novorođenčeta
- ✓ tretman parodontalnih tkiva u toku trudnoće
- ✓ konzumacija alkohola i nikotina
- ✓ trudnoća začeta asistiranim reproduktivnim tehnikama -ART
- ✓ druge forme gingivitisa i parodontopatije osim *gingivitis catarrhalis* i hronične parodontopatije

Studija je odobrena od strane Etičkog komiteta Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu (br.36/18). Sve ispitanice su, pre uključivanja u studiju, bile jasno informisane o protokolu i procedurama istraživanja i dale su svoj pismeni pristanak.

3.2. Klinička merenja

Anamnestički podaci i nalazi kliničkih merenja ispitanica su beleženi u jedinstvene evidencione i parodontalne kartone. U okviru anamneze, posebna pažnja je posvećena podacima o odražavanju oralne higijene ispitanica kao i o lošim navikama pre i u toku trudnoće.

Prema ustanovljenoj metodologiji, evaluacija stanja parodontalnih tkiva i nivoa oralne higijene izvedena je merenjem sledećih kliničkih parametara:

- Dubine sondiranja (DS)- mereno rastojanje od ivice gingive do dna sulkusa/gingivalnog ili parodontalnog džepa (izraženo u mm)
- Nivoa pripojnog epitela (NPE)- mereno rastojanje od gleđno-cementne granice do dna parodontalnog džepa (izraženo u mm)
- Krvarenja na provokaciju (KNP) - odsustvo-0 ili prisustvo-1 krvarenja nakon sondiranja u trajanju od 15 s
- Plak indeksa po Silness-Löe-u (PI) (Silness&Löe 1964), bodovanje je izvršeno na sledeći način :
 - 0 bodova je podrazumevalo odsustvo plaka u gingivalnoj trećini krunice zuba
 - 1 bod se dodeljivao ukoliko se tanak sloj dentalnog plaka, koji se nalazio u predelu ivice gingive i na okolnoj gingivalnoj trećini površine krunice zuba, klinički nije uočavao, a otkrivao se povlačenjem vrha sonde preko ovog regiona.
 - 2 boda je podrazumevalo prisustvo umerene, vizuelno uočljive, količine plaka, lokalizovane na ivici gingive i na površini zuba u njenom susedstvu kao i i/ili male količine dentalnog plaka u gingivalnom sulkusu, odnosno džepu
 - 3 boda je najveća vrednost koja se dodeljivala u slučaju postojanja velike količine dentalnog plaka koji pokriva ivicu gingive i okolnu površinu zuba ali je njime potpuno ispunjen bio i gingivalni sulkus, odnosno gingivalni ili parodontalni džep

Plak indeks (PI) se izračunavao sabiranjem dobijenih vrednosti, zatim deljenjem zbira sa brojem pregledanih površina (četiri) i podelom sa brojem prisutnih zuba.

- Gingivalnog indeksa po Loe-Silness-u (GI) (Löe 1963), prema kome je stanje gingive izraženo u bodovima na sledeći način :
 - 0 bodova (zdrava gingiva) – postojanje čvrste i bledoružičaste gingive sa sitnozrnastom površinom i papilom u interdentalnom prostoru
 - 1 bod (blaga inflamacija) – crvenija ivica gingive nego normalno sa prisutnim minimalnim otokom, odsustvo krvarenja na blagu provokaciju parodontalnom sondom
 - 2 boda (umerena inflamacija) – crvena boja gingive, izraženi edem slobodne gingive i interdentalnih papila, pozitivno krvarenje na sondiranje parodontalnom sondom
 - 3 bodova (jaka inflamacija) – najveća dodeljena vrednost u slučaju postojanja veoma crvene ili lividne boje gingive, jako uvećane slobodne gingive i papile, na papilama moguće postojanje ulceracija, krvarenje gingive pri najmanjoj provokaciji

Gingivalni indeks (GI) za ispitivanu osobu se dobio sabiranjem izmerenih vrednosti (bodova) na pregledanim površinama zuba, zatim deljenjem dobijenog zbira sa četiri i podelom dobijene vrednosti sa brojem prisutnih zuba. Dobijeni rezultati su se tumačili na sledeći način:

- a. blaga inflamacija 0,1-1
- b. umerena inflamacija 1,1-2
- c. inflamacija velikog inteziteta 2,1-3

Klinička merenja su obavljena u 6 tačaka oko zuba (buko-mezijalna, buko-medijalna, buko-distalna, oro-mezijalna, oro-medijalna i oro-distalna), i u slučaju PI i

GI u 4 tačke (buko-mezijalna, buko-distalna, buko-medijalna i oro-medijalna) na svim prisutnim zubima, isključujući treće molare. Merenja su izvršena primenom graduisane parodontalne sonde (North Carolina Hu-Friedy, Chicago, IL, USA).

Na osnovu merenih kliničkih parametara izvršeno je dalje grupisanje porođenih žena u odnosu na stanje tkiva parodonticijuma:

- Porodilje sa zdravim parodonticijumom
- Porodilje sa dijagnostikovanim gingivitisom
- Porodilje sa dijagnostikovanom parodontopatijom

3.3. Uzorkovanje gingivalne tečnosti, subgingivalnog dentalnog plaka i periferne venske krvi kod porodilja

3.3.1.1. Selekcija mesta uzorkovanja i uzimanje uzoraka gingivalne tečnosti i subgingivalnog dentalnog plaka

Od svake porodilje uzeti su uzorci gingivalne tečnosti i subgingivalnog plaka sa istog mesta reprezentativnog zuba, do 48 h nakon porođaja. U slučaju parodontopatije uzorak se uzimao iz parodontalnog džepa zuba sa najvećom vrednošću nivoa pripojnog epitela, kod gingivitisa sa najvećom vrednošću gingivalnog indeksa Loe-Silness i u slučajevima klinički zdravog parodonticijuma sa mezijalnog strane prvog stalnog molara u gornjoj vilici. U slučajevima nepostajanja prvog molara, kao reprezentativno mesto za uzorkovanje se uzimala mezijalna strana gornjeg prvog premolara.

Sam postupak podrazumevao je izolaciju mesta uzorka vaterolnom u cilju sprečavanja kontaminacije pljuvačkom. Za ispitivanje koncentracija medijatora zapaljenja dve standardizovane papirne trake su aplikovane u gingivalni sulkus,

gingivalni džep ili paradontalni džep do pojave otpora u trajanju od 30 sekundi i zatim odlagane u plastične tubice (ependorfe) koje su sadržale 0,5 ml fosfatnog pufera (PBS). Za mikrobiološku analizu postupak se razlikovao po tome što su se oba filter papira odlagala u prazne ependorfe. Zatim se izvršilo vorteksovanje i centrifugiranje ependorfa sa fosfatnim puferom radi eliminacije plaka i ćelijskih elementa. Uzorci gingivalne tečnosti i subgingivalnog dentalnog plaka su bili zamrznuti na -70°C do početka analize.

3.3.1.2. *Uzimanje uzoraka periferne venske krvi*

Uzorkovanje venske krvi se izvršilo u okviru rutinskog vađenja krvi posle porođaja, standardnom venepukcijom iz antekubitalne vene u vakumirane epruvete sa antikoagulansom (EDTA) od strane obučenog medicinskog osoblja. Nakon uzorkovanja periferne venske krvi izvršilo se centrifugiranje krvi (3000 obrtaja 15 min) u cilju separacije plazme. Uzorci plazme su alikvotirani i potom skladišteni na -20° C do početka analize.

3.4. *Određivanje nivoa medijatora zapaljenja u gingivalnoj tečnosti i u krvi ELISA metodom*

Evaluacija medijatora zapaljenja u uzorcima gingivalne tečnosti i periferne venske krvi ispitanica izvršena je primenom enzimskog imunoadsorpcionog testa - ELISA (eng. *Enzyme-linked immnosorbent assay*). ELISA metod predstavlja imunsku metodu zasnovanu na specifičnoj reakciji vezivanja između antigena i antitela.

U studiji su korišćeni komercijalni ELISA kitovi visoke senzitivnosti (Slika 6.) :

- za određivanje koncentracija - IL-1 β Human IL-1 β High Sensitivity ELISA BMS224HS eBioscience
- za određivanje koncentracija TNF- α - Human TNF- α High Sensitivity ELISA BMS223HS eBioscience

- za određivanje koncentracija IL-6 – Human IL-6 High Sensitivity ELISA BMS213 HS eBioscience
- za određivanje koncentracija PGE₂ –PGE₂ high Sensitivity EIA kit Catalog No. ADI-930-001 Enzo Life Science

Minimalne detekcione granice, definisane u upustu proizvođača primenjenih ELISA kitova, su bile za IL-1 β 0.05 pg/ml, za IL-6 0.03 pg/ml, za TNF- α 0.13 pg/ml i za PGE₂ 8.26 pg/ml. U istraživanje su bile uključene koncentracije koje su se nalazile u opsegu primenjenog ELISA kita. Uzorci čije su koncentracije bile van propisanog opsega, bili su eliminisani iz studije.

Postupak određivanja koncentracija medijatora zapaljenja u uzorcima gingivalne tečnosti i periferne venske krvi ELISA metodom je podrazumevao sledeće faze:

- odmrzavanje uzoraka gingivalne tečnosti i plazme na sobnoj temperaturi
- plasiranje pripremljenih uzoraka i standarda u bunare mikrotitarske ploče, obložene specifičnim antitelima
- dodavanje enzimom vezanih detekcionih antitela
- pranje kojim su se otklanjala nevezana antitela
- inkubacije
- dodavanje substrata koji je enzim preveo u obojeni produkt
- dodavanje stop rastvora koji je sprečio dalju enzimsku aktivnost i promenu u boji

Intezitet dobijene boje je bio direktno proporcionalan količini vezanih medijatora u ispitivanom materijalu, izuzev u slučaju primene ELISA kita za evaluaciju PGE₂.

U slučaju određivanja koncentracija PGE₂ primenjen je kompetitivni ELISA test, gde je intezitet dobijene boje je bio obrnuto proporcionalan koncentraciji PGE₂ u uzorcima i standardima.

Evaluacija inteziteta boje je izvršena pomoću spektrofotometrije (talasne dužine 450/620 nm). Izmerena optička gustina je korišćena za određivanje koncentracije ispitivanih medijatora zapaljenja, primenom kalibracione krive zadate regresionom analizom. Koncentracija ispitivanih medijatora u gingivalnoj tečnosti je izražena kao medijator po mestu uzorkovanja (medijator (pg)/mesto uzorkovanja - pg/ μ m) (Pascale i sar., 2014). Koncentracija ispitivanih medijatora u plazmi je izražena u pg/ml.



Slika 6. Evaluacija medijatora ELISA metodom

3.5. Identifikacija parodontopatogenih mikroorganizama primenom PCR metode

Prisustvo genoma parodontopatogenih mikroorganizama, u uzorcima subgingivalnog plaka, dokazivano je lančanom reakcijom polimeraze (*Polymerase chain reaction-PCR*).

Priprema uzoraka pre PCR analize je podrazumevala izolaciju eventualno prisutne bakterijske DNK. Nakon odmrzavanja uzoraka subgingivalnog plaka, dodavano je po 100 µl sterilne dejonizovane vode u svaki ependorf. Uzorci su zatim kuvani na temperaturi od 100°C u trajanju od 10 minuta. Supernatant je korišćen kao matrica u konvencijalnim i dupleks PCR reakcijama.

Uzorci subgingivalnog dentalnog plaka su ispitivani na postojanje sledećih parodontopatogenih bakterija: *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* i *Treponema denticola*.

PCR metoda predstavlja amplifikaciju željene sekvence dezoksiribonukleinske kiseline (DNK) koja se postiže korišćenjem dva oligonukleotidna prajmera komplementarna krajevima sekvence.

Za PCR analizu izvršena je priprema reakcione smeše. Reakciona smeša, zapremine 25 µl, bila je sledećeg sadržaja:

- sterilna voda
- deoksiribonukleotidi, gradivni elementi DNK
- joni Mg, neophodni za rad Taq polimeraze i sintezu DNK
- pufer koji obezbeđivao optimalnu aktivnost Taq polimeraze
- visokospecifični prajmeri, neophodni za otpočinjanje DNK sinteze
- Taq polimeraza, termostabilna DNK polimeraza koja je katalizovala ugradnju neklotida po principu komplementarnosti sa DNK matricom
- 5 µl uzoraka sa pretpostavljenom bakterijskom DNK

Detekcija bakterijske DNK u uzorcima subgingivalnog plaka podrazumevala je primenu visokospecifičnih prajmera za željene bakterije. Sekvence poznatih prajmera kao i dužine očekivanih PCR produkata za ispitivane mikroorganizme prikazane su u tabeli 1.

	Sekvence prajmera	Veličina PCR produkta (bp)
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	Forward AGG CAG CTT GCC ATA CTG CG Reverse ACT GTT AGC AAC TAC CGA TGT	400 bp
<i>Prevotella intermedia</i>	Forward CGT GGA CCA AAG ATT CAT CGG TGG A Reverse CCG CTT TAC TCC CCA ACA AA	259 bp
<i>Aggregatibacter actinomycetamcomitans</i>	Forward GCT AAT ACC GCG TAG AGT CGG Reverse ATT TCA CAC CTC ACT TAA AGG T	500 bp
<i>Treponema denticola</i>	Forward TAA TAC CGA ATG TGC TCA TTT ACA T Reverse TCA AAG AAG CAT TCC CTC TTC TTC TTA	316 bp

Tabela 1. Sekvence visokospecifičnih prajmera

Sama PCR reakcija podrazumevala je 25-40 ponovljenih ciklusa sinteze DNK. Svaki ciklus je podrazumevao tri koraka:

- Denaturaciju DNK zagrevanjem reakcione smeše na 95°C, čime je omogućeno raskidanje vodonicnih veza između komplementarnih lanaca
- Hibridizaciju prajmera sa matricom, odnosno formiranje vodoničnih veza između prajmera i komplementarne sekvence na matrici
- Elongaciju prajmera, ugradnja nukleotida na 3' krajevima prajmera (sinteza DNK) katalizovanu termostabilnom DNK polimerazom

Temperaturni profil PCR reakcije prikazan je u tabeli 2.

35 ciklusa				
Početna denaturacija	Denaturacija	Hibridizacija	Elongacija	Finalna elongacija
3 min.	1 min.	1 min.	1-1.30 min.	7 min.
95°C	94 °C	55-60 °C	72 °C	72 °C

Tabela 2. Temperaturni profil PCR reakcije

Za otkrivanje parodontopatogenih bakterija *A.actinomycetemcomitans* i *P.intermedia* primenjena je dupleks PCR tehnika. Standardnom PCR tehnikom identifikovane su *P.gingivalis* i *T.denticola*. Dupleks PCR tehnika je podrazumevala simultanu amplifikaciju genskih sekvenci uz primenu dva para prajmera, dok je standardna PCR tehnika podrazumevala korišćenje jednog para prajmera.

Nakon završene lančane reakcije polimeraze, verifikacija produkata amplifikacije bakterijske DNK izvršena je elektroforezom na poliakrilamidnom gelu, pri konstantnom naponu struje od 230 V. Vizuelizacija amplifikovanih fragmenata bakterijske DNK tj. traka, nakon bojenja gela etidijum-bromidom, izvršena je na transiluminatoru pod UV-svetlom.

3.6. STATISTIČKA ANALIZA PODATAKA

Primarne ishodišne varijable u istraživanju su bili nivoi IL-1 β , IL-6, TNF- α i PGE2 u uzorcima gingivalne tečnosti i periferne venske krvi porodilja. Sekundarne ishodišne varijable su bili klinički parametri korišćeni u evaluaciji stanja tkiva parodontijuma (DS, NPE, KNP, PI i GI) i mikrobiološki nalaz. Klinička merenja su obavljena po prisutnom zubu. Dobijene vrednosti su iskazane po zubu, zatim po ispitanici, a u okviru svake grupe dat je zbirni pregled parametara.

Godine starosti, klinički parametri i nivoi merenih medijatora zapaljenja prikazani su kao srednja vrednost, standardna devijacija, vrednost medijane i interval poverenja. Mikrobiološki nalaz i parodontalni status izraženi su procentualno. U analizi su primenjeni ne-parametrijski testovi s obzirom da je statistički uzorak bio relativno mali. Godine starosti i parodontalni status, između prevremeno porođenih žena i žena porođenih u terminu, evaluirani su primenom Fisher exact testa. Poređenje nivoa medijatora zapaljenja i kliničkih parametara između ispitivanih grupa je izvršeno pomoću Kruskal-Wallis testa, a razlike su potom evaluirane pomoću Mann-Whitney testa. Ista grupa testova je korišćena za poređenje nivoa medijatora zapaljenja i mikrobiološkog nalaza u odnosu na parodontalni status. Za evaluaciju razlika učestalosti detektovanih parodontopatogenih mikroorganizama između ispitivanih grupa primenjen je Hi-kvadrat test.

Korelacije između merenih parametara su određene pomoću Spirmanovog koeficijenta korelacije ("Spearman's rank correlation" test).

Sve analize su izvršene primenom statističkog paketa SPSS (SPSS 20.0, Inc., Chicago, IL, USA) sa nivoom značajnosti postignutim na 5% ($p < 0.05$).

4. REZULTATI

4.1. Deskriptivne karakteristike podataka obe studijske grupe

Sprovedeno istraživanje predstavlja studiju preseka, koja je obuhvatila 120 porodilja, koje su na osnovu toga da li je porođaj nastupio pre ili nakon navršene 37. nedelje gestacije, bile podeljene u dve osnovne studijske grupe :

1. 60 prevremeno porođenih žena (porođene pre 37. nedelje gestacije)
2. 60 žena porođenih u terminu (porođene posle 37. nedelje gestacije)

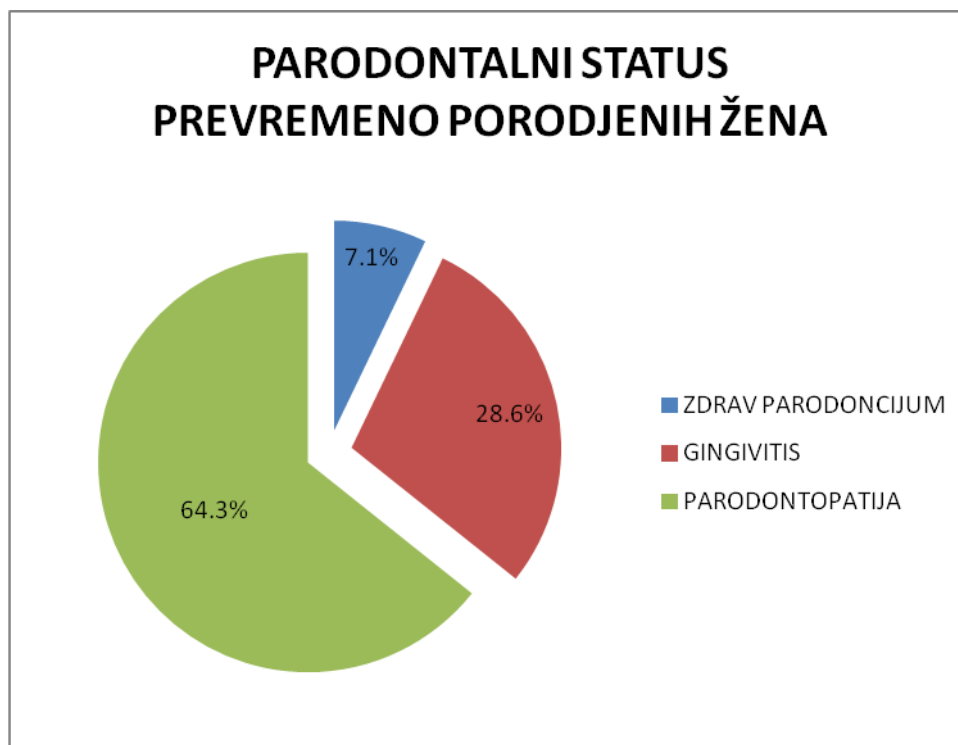
Srednja vrednost godina starosti ispitanica u grupi prevremeno porođenih žena je iznosila 21.76 ± 7.09 , dok je srednja vrednost godina starosti ispitanica u grupi žena porođenih u terminu iznosila 28.69 ± 3.71 . Distribucija godina između ispitivanih grupa nije pokazala statistički značajnu razliku ($p=0.641$).

4.1.1. Parodontalni status ispitanica

Na osnovu parodontalnog statusa sve ispitanice, uključene u ovo istraživanje, su bile razvrstane u 3 grupe :

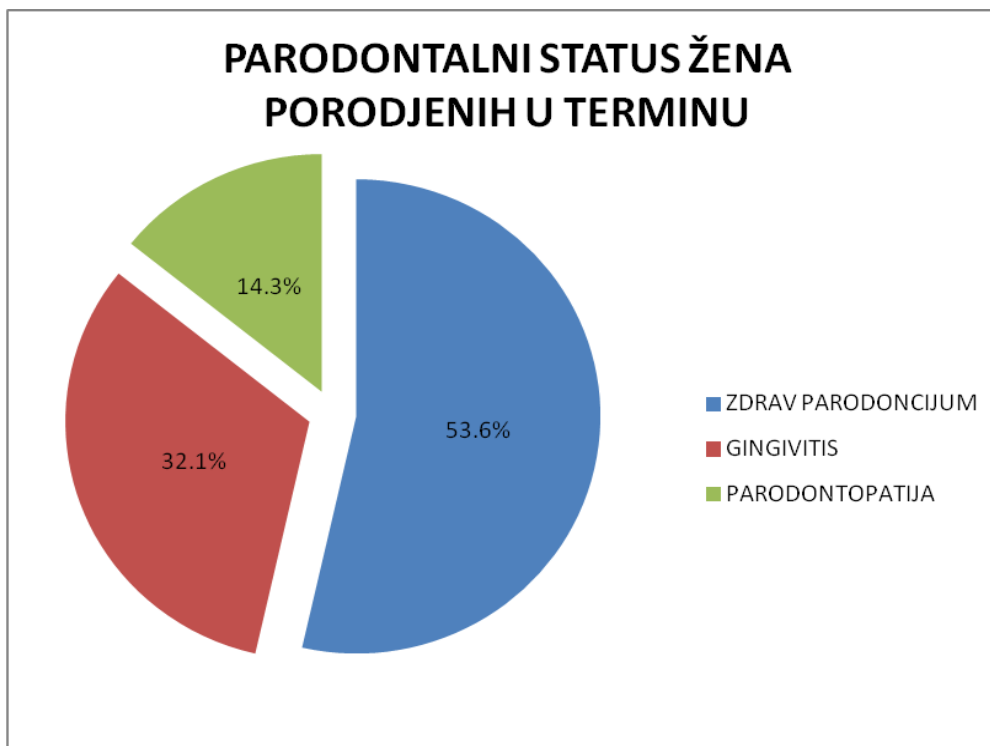
1. zdrav parodoncijum
2. gingivitis
3. parodontopatija

U grupi prevremeno porođenih žena zastupljenost parodontopatije je iznosila 64.3%, zastupljenost gingivitisa je bila 28.6% a zdravih parodontalnih tkiva 7.1% (Grafik 1.).



Grafik 1. Distribucija različitih stanja tkiva parodoncijuma kod prevremeno porođenih žena

U grupi žena porođenih u terminu zastupljenost parodontopatije je iznosila 14.3%, zastupljenost gingivitisa je bila 32.1% a zdravih parodontalnih tkiva 53.6% (Grafik 2.).



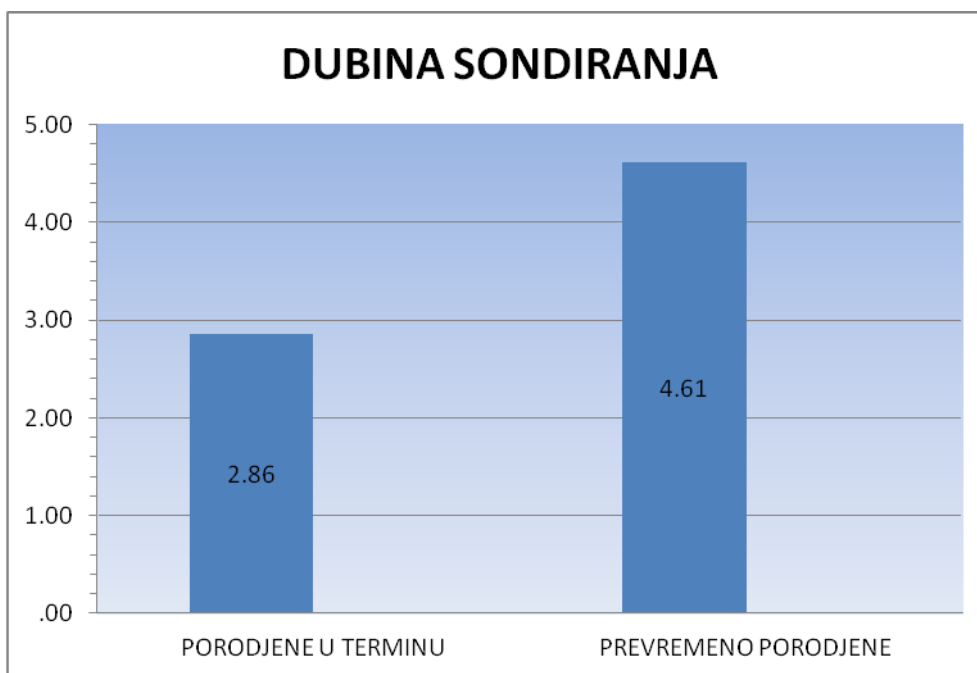
Grafik 2. Distribucija različitih stanja tkiva parodoncijuma kod žena porođenih u terminu

Porođenjem distribucija različitih stanja tkiva parodoncijuma između ispitivanih grupa potvrđena je statistički značajna zastupljenost zdravih parodontalnih tkiva u grupi žena porođenih u terminu u odnosu na grupu prevremeno porođenih žena ($p < 0.001$) i statistički značajna zastupljenost parodontopatije kod prevremeno porođenih žena u odnosu na žene porođene u terminu ($p < 0.001$). Zastupljenost gingivitisa nije pokazala statističku značajnu razliku između ispitivanih grupa ($p = 0.912$).

4.1.1.2. Klinički parametri

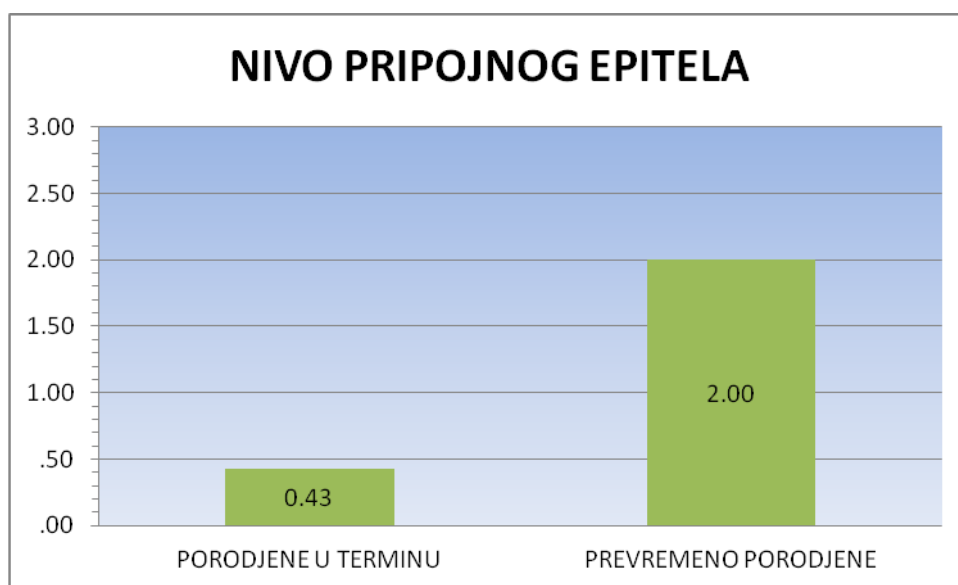
U cilju evaluacije stanja tkiva parodoncijuma i postavljanje dijagnoze klinički zdravog parodoncijuma, gingivitisa ili parodontopatije, primenjeni su klinički parametri – dubina sondiranja (DS), nivo pripojnog epitela (NPE), krvarenje na provokaciju (KNP), plak indeks (PI) i gingivalni indeks (GI)

Srednje vrednosti dubine sondiranja (DS) iznosile su 4.61 ± 1.37 mm u grupi prevremeno porođenih žena i 2.86 ± 1.04 mm u grupi žena porođenih u terminu (Grafik 3.). Upoređivanjem dobijenih srednjih vrednosti DS između ispitivanih grupa utvrđena je statistički značajno veća vrednost ovog parametra kod prevremeno porođenih žena u odnosu na žene porođene u terminu ($p < 0.001$).



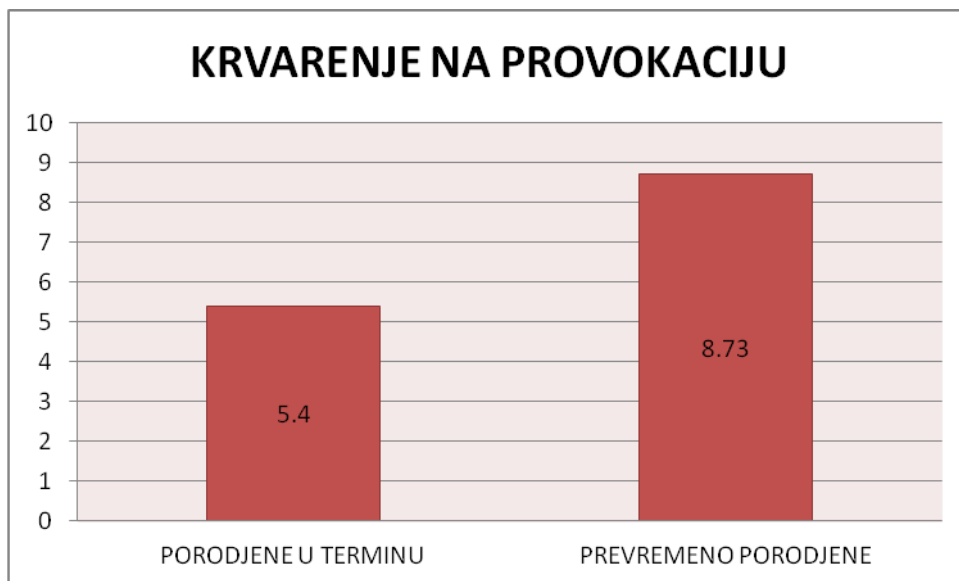
Grafik 3. Srednje vrednosti dubine sondiranja (DS) kod žena porođenih u terminu i prevremeno porođenih žena.

Srednje vrednosti nivoa pripojnog epitela (NPE) iznosile su 0.43 ± 1.07 mm u grupi žena porođenih u terminu i 2.00 ± 1.72 mm u grupi prevremeno porođenih žena (Grafik 4.). Poređenjem dobijenih srednjih vrednosti između ispitivanih grupa utvrđena je statistički značajno veća vrednost ovog parametra kod prevremeno porođenih žena u odnosu na žene porođene u terminu ($p < 0.001$).



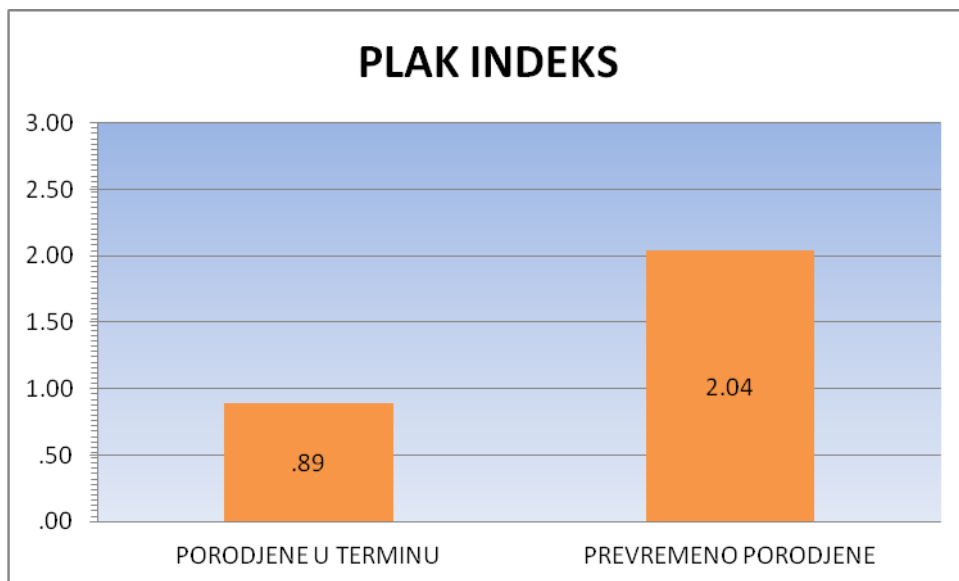
Grafik 4. Srednje vrednosti nivoa pripojnog epitela (NPE) kod žena porođenih u terminu i prevremno porođenih žena

Srednje vrednosti kvarenja na provokaciju (KNP) su bile 5.4 ± 0.51 u grupi žena porođenih u terminu i 8.73 ± 1.9 u grupi prevremno porođenih žena (Grafik 5.). Upoređivanjem dobijenih srednjih vrednosti između ispitivanih grupa dobijena je statistički značajno veća vrednost ovog parametra kod prevremeno porođenih žena u odnosu na žene porođene u terminu ($p < 0.001$).



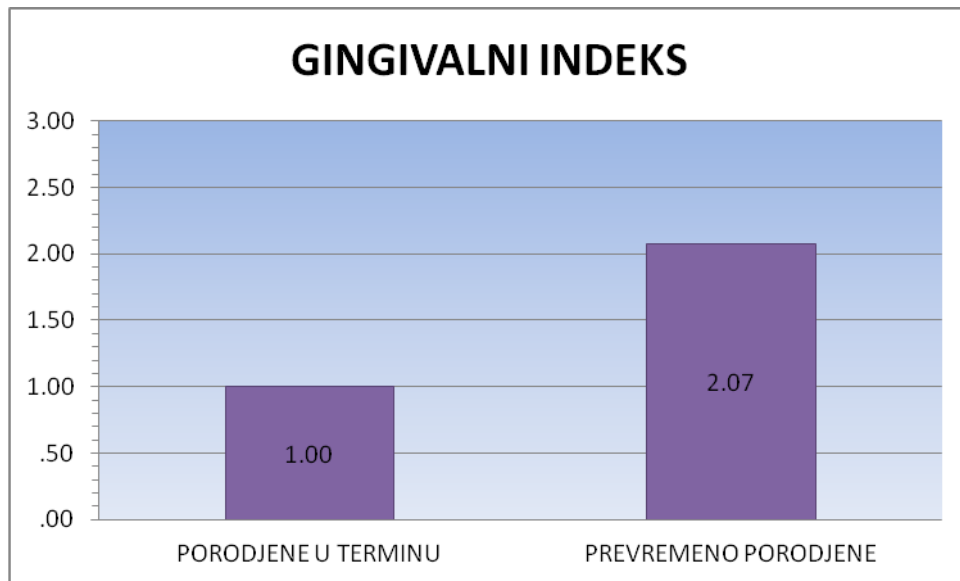
Grafik 5. Srednje vrednosti krvarenja na provokaciju (KNP) kod prevremeno porođenih žena i žena porođenih u terminu

U cilju procene oralne higijene primenjen je Plak indeks (PI) po Silnes Löu-u. Srednje vrednosti plak indeksa iznosile su u 0.89 ± 1.06 u grupi žena porođenih u terminu i 2.04 ± 1.0 u grupi prevremeno porođenih žena (Grafik 6.). Poređenjem srednjih vrednosti PI između ispitivanih grupa dobijena je statistički značajno veća vrednost ovog parametra kod prevremeno porođenih žena u odnosu na žene porođene u terminu ($p < 0.001$).



Grafik 6. Srednje vrednosti Plak indeksa (PI) kod žena porođenih u terminu i prevremeno porođenih žena

U cilju kliničke procene stanja gingive primenjen je Gingivalni indeks (GI) po Löe Silnessu. Prosečne vrednosti gingivalnog indeksa iznosile su 1.00 ± 1.01 kod žena porođenih u terminu i 2.07 ± 0.71 kod prevremeno porođenih žena (Grafik 7.). Poređenjem dobijenih srednjih vrednosti među grupama ovog parametra dobijena je statistički značajno veća vrednost ovog parametra kod prevremeno porođenih žena u odnosu na žene porođene u terminu ($p < 0.001$).



Grafik 7. Srednje vrednosti Gingivalnog indeksa (GI) kod žena porođenih u terminu i prevremeno porođenih žena

Ispitivanjem kliničkih parametara potvrđene su statistički značajno veće srednje vrednosti svih merenih kliničkih parametara (DS, NPE, KNP, PI i GI) kod prevremeno porođenih žena u odnosu na žene porođene u terminu ($p < 0.001$).

Rezultati ispitivanja kliničkih parametara, godine starosti ispitanica, kao i procentulana zastupljenost zdravih parodontalnih tkiva, gingivitisa i parodontopatije su sumirani u Tabeli 3. Prikazane su srednje vrednosti DS, NPE, KNP, PI i GI po grupama ispitanica. Vrednosti su izražene kao srednja vrednost \pm standardna devijacija i interval poverenja i u procentima za stanja tkiva parodoncijuma.

Tabela 3. Deskriptivne karakteristike godina starosti, različitih stanja tkiva parodontijuma i kliničkih parametara između ispitivanih grupa

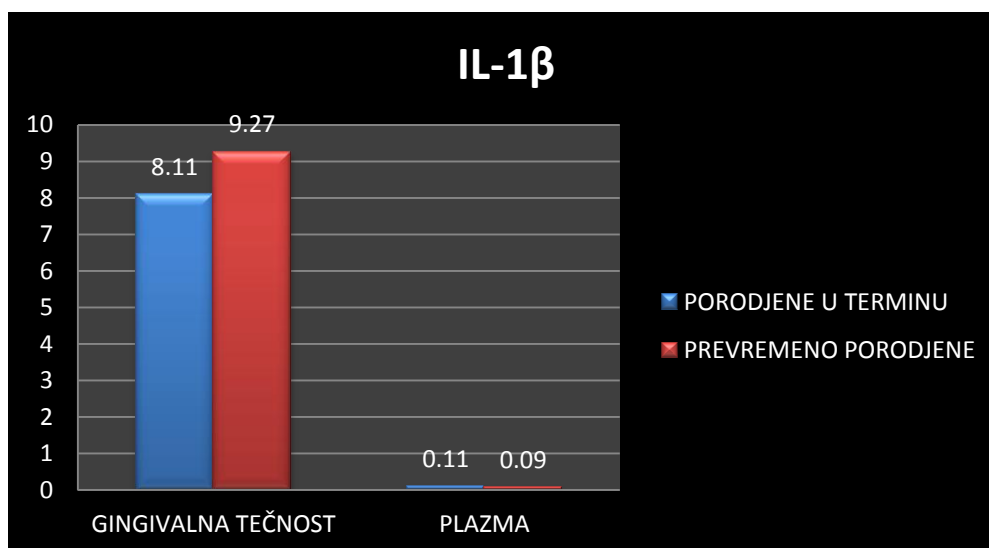
	Žene porođene u terminu (N=60)	Prevremeno porođene žene (N=60)	p-vrednost
Godine starosti	28.69±3.71 (28.0; 26.45-30.93)	21.67±7.09 (23.0; 4.04-39.29)	0.641
DS (mm)	2.86±1.04 (2.5; 2.45-3.26)	4.61±1.37 (5.0; 4.08-5.14)	< 0.001*
NPE (mm)	0.43±1.07 (0.0; 0.1-0.84)	2.00±1,72 (2.0; 1.33-2.67)	< 0.001*
KNP	5.4±0.51 (5.0; 5.15-5.65)	8.73±1.9 (8.0; 7.46-10.0)	< 0.001*
PI	0.89±1.06 (0.50; 0.48-1.31)	2.04±1.0 (2.0; 1.65-2.42)	< 0.001*
GI	1.00±1.01 (1.0; 0.61-1.39)	2.07±0.71 (2.0; 1.79-2.35)	< 0.001*
Zdrav parodontcijum (%)	53.6	7.1	< 0.001*
Gingivitis (%)	32.1	28.6	0.912
Parodontopatija (%)	14.3	64.3	< 0.001*

DS, dubina sondiranja, NPE, nivo pripojnog epitela; KNP, krvarenje na provokaciju, PI, plak indeks; GI, gingivalni indeks, GT-gingivalna tečnost , *- p vrednost < 0.05

4.2. Nivoi IL-1 β , IL-6, TNF- α i PGE2 u gingivalnoj tečnosti i u perifernoj venskoj krvi kod prevremeno porođenih žena i žena porođenih u terminu

U svim analiziranim uzorcima gingivalne tečnosti i u krvi porodilja, koncentracije ispitivanih medijatora (IL-1 β , IL-6, TNF- β i PGE2) su bile iznad minimalnog detekcionog limita, propisanog od strane proizvođača komercijalnih kitova korišćenih u ovoj studiji.

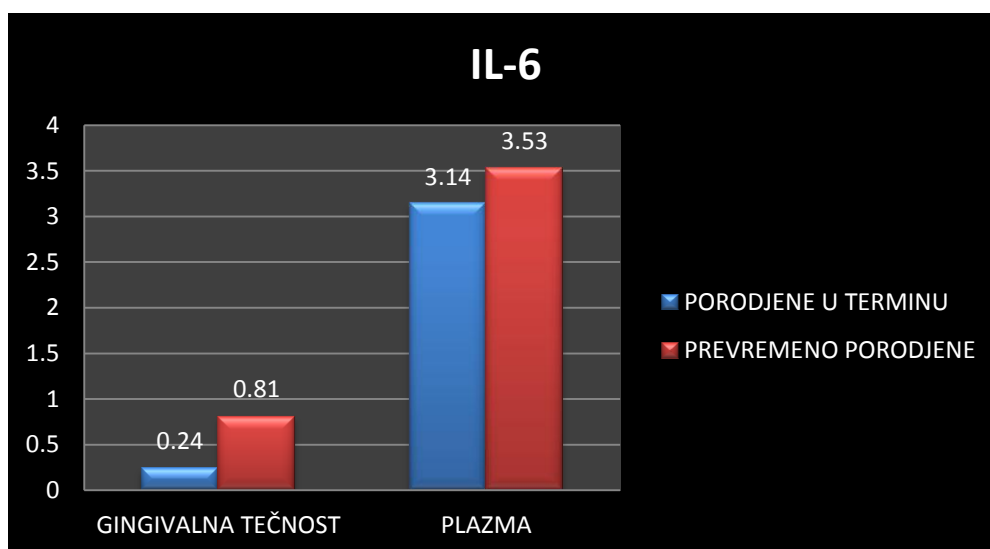
Srednja vrednost koncentracija IL-1 β u GT u grupi žena porođenih u terminu je iznosila 8.11 \pm 3.55 pg/mu, i u grupi prevremeno porođenih žena je iznosila 9.27 \pm 4.43 pg/mu (Grafik 8.). Poređenjem srednjih vrednosti koncentracija IL-1 β u GT između ispitivanih grupa nije dobijena statistički značajna razlika ($p=0.089$). Srednja vrednost koncentracija IL-1 β u plazmi u grupi žena porođenih u terminu je iznosila 0.11 \pm 0.09 pg/ml, i u grupi prevremeno porođenih žena je iznosila 0.09 \pm 0.02 pg/ml (Grafik 8.) Poređenjem srednjih vrednosti koncentracija IL-1 β u plazmi između ispitivanih grupa nije dobijena statistički značajna razlika ($p=0.099$).



Grafik 8. Srednje vrednosti koncentracija IL-1 β u gingivalnoj tečnosti (GT) i plazmi kod prevremeno porođenih žena i žena porođenih u terminu

Srednja vrednost koncentracija IL-6 u uzorcima GT kod prevremeno porođenih žena je iznosila 0.81 ± 1.11 pg/mu i u grupi žena porođenih u terminu je iznosila 0.24 ± 0.30 pg/mu (Grafik 9.). Poređenjem srednjih vrednosti koncentracija IL-6 u GT između ispitivanih grupa dobijena je statistički značajno veća vrednost kod prevremeno porođenih žena u odnosu na žene porođene u terminu ($p=0.004$).

Srednja vrednost koncentracija IL-6 u uzorcima plazme u grupi prevremeno porođenih žena je iznosila 3.53 ± 1.51 pg/ml i u grupi žena porođenih u terminu je iznosila 3.14 ± 1.53 pg/ml (Grafik 9.). Poređenjem srednjih vrednosti koncentracija IL-6 između ispitivanih grupa nije dobijena statistički značajna razlika ($p=0.851$).

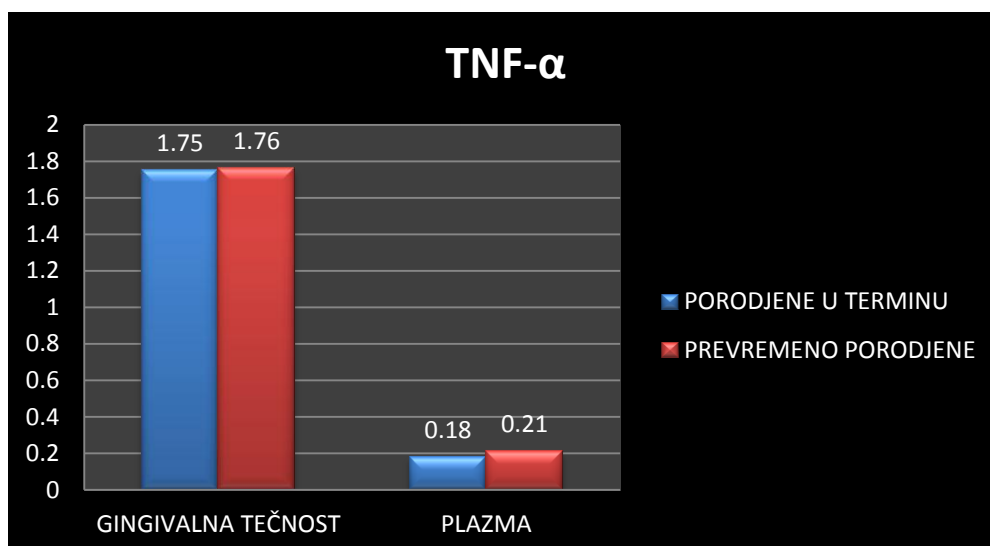


Grafik 9. Srednje vrednosti koncentracija IL-6 u gingivalnoj tečnosti (GT) i plazmi kod prevremeno porođenih žena i žena porođenih u terminu

Srednja vrednost koncentracija TNF- α u GT u grupi prevremeno porođenih žena je iznosila 1.76 ± 3.45 pg/mu i u grupi žena porođenih u terminu je iznosila 1.75 ± 2.03 pg/mu (Grafik 10.). Poređenjem dobijenih vrednosti TNF- α u GT između grupa nije utvrđena statistički značajna razlika ($p=0.768$).

Srednja vrednost koncentracija TNF- α u plazmi kod prevremeno porođenih žena je iznosila 0.21 ± 0.41 i kod žena porođenih u terminu je iznosila 0.18 ± 0.38 (Grafik 10.).

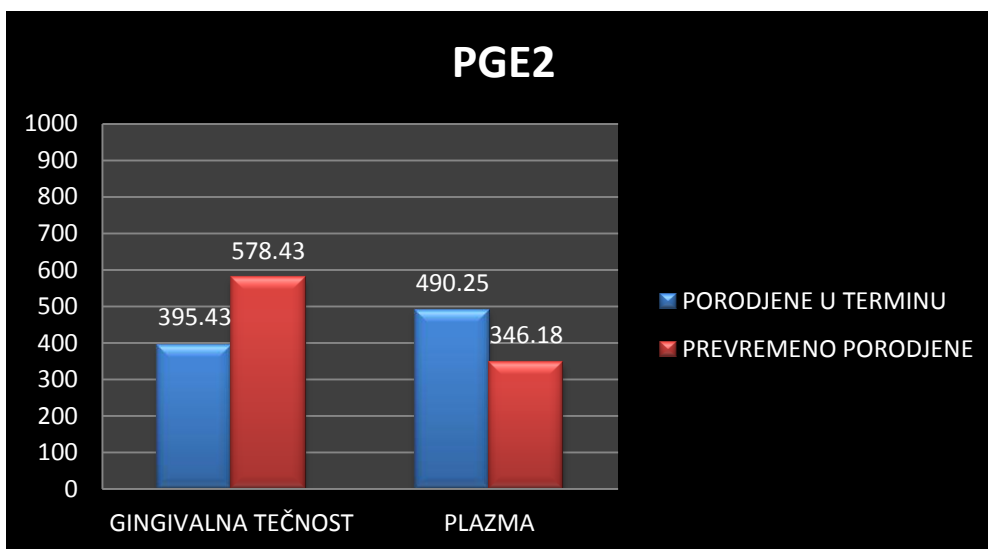
Poređenjem dobijenih vrednosti TNF- α između grupa nije dobijena statistički značajna razlika ($p=0.336$).



Grafik 10. Srednje vrednosti koncentracija TNF- α u gingivalnoj tečnosti (GT) i plazmi kod prevremeno porođenih žena i žena porođenih u terminu

Srednja vrednost koncentracija PGE2 u GT kod prevremeno porođenih žena je iznosila 578.43 ± 369.98 pg/mu i kod žena porođenih u terminu je iznosila 395.43 ± 410.76 pg/mu (Grafik 11.). Poređenjem dobijenih vrednosti između grupa potvrđena je statistički značajno veća vrednost PGE2 u GT kod prevremeno porođenih žena u odnosu na žene porođene u terminu ($p=0.021$).

Srednja vrednost koncentracija PGE2 u plazmi kod prevremeno porođenih žena je iznosila 346.18 ± 465.75 pg/ml i kod žena porođenih u terminu je iznosila 490.25 ± 486.19 pg/ml (Grafik 11.). Poređenjem dobijenih vrednosti između grupa nije dobijena statistički značajna razlika ($p=0.091$).



Grafik 11. Srednje vrednosti koncentracija PGE2 u u gingivalnoj tečnosti (GT) i plazmi kod prevremeno porođenih žena i žena porođenih u terminu

Vrednosti merenih medijatora IL-1 β , IL-6, TNF- β i PGE2 u gingivalnoj tečnosti i u krvi kod žena porođenih u terminu i prevremeno porođenih žena , kao i razlike između grupa sumirane su u Tabeli 4. Sve vrednosti su prikazane kao srednja vrednost \pm standardna devijacija i interval poverenja.

Tabela 4. Vrednosti medijatora zapaljenja i razlike između ispitivanih grupa

	Žene porodene u terminu (N=60)	Prevremeno porodene Žene (N=60)	p-vrednost
IL-1β gt (pg/mu)	8.11 \pm 3.55 (10.07; 6.06-10.15)	9.27 \pm 4.43 (11.43; 6.71-11.82)	0.089
IL-6 gt (pg/mu)	0.24 \pm 0.30 (0.14; 0.12-0.36)	0.81 \pm 1.11 (0.25; 0.38-1.24)	*0.004
TNF-α gt (pg/mu)	1.75 \pm 2.03 (0.59; 1.96-4.56)	1.76 \pm 3.45 (0.71; 0.43-3.10)	0.768
PGE2 gt (pg/mu)	395.43 \pm 410.76 (221.43; 147.21-643.65)	578.43 \pm 369.98 (403.85; 236.25-920.6)	*0.021
IL-1β p (pg/ml)	0.11 \pm 0.09 (0.09;0.06-0.16)	0.09 \pm 0.02 (0.10;0.09-0.11)	0.099
IL-6 p (pg/ml)	3.14 \pm 1.53 (3.66; 2.22-4.07)	3.53 \pm 1.51 (4.14; 2.14-4.93)	0.851
TNF-α p (pg/ml)	0.18 \pm 0.38 (0.06; 0.04-0.33)	0.21 \pm 0.41 (0.10; 0.05-0.37)	0.336
PGE2 p (pg/ml)	490.25 \pm 486.19 (372.71; 301.72-678.77)	346.18 \pm 465.75 (62.07; 165.58-526.78)	0.091

gt-gingivalna tečnost, p-plazma, pg/mu-pg/mesto uzorkovanja

*- p vrednost <0.05

4.3. Nivoi IL-1 β , IL-6, TNF- α i PGE2 u gingivalnoj tečnosti i u krvi porodilja u uslovima različitih stanja tkiva parodontijuma

Na osnovu stanja parodontijuma izvršeno je podgrupisanje porodilja na:

1. Porodilje sa zdravim parodontalnim tkivima (N=36)
2. Porodilje sa gingivitisom (N=36)
3. Porodilje sa parodontopatijom (N=48)

Srednje vrednosti koncentracija IL-1 β , IL-6, TNF- α i PGE2 u GT su bile veće kod porodilja sa gingivitisom u odnosu na porodilje sa zdravim parodontalnim tkivima, kao i u kod porodilja obolelih od parodontopatije u poređenju sa porodiljama sa gingivitisom i zdravim parodontalnim tkivima.

Poređenjem srednjih vrednosti koncentracija IL-1 β u GT među grupama potvrđene su statistički značajno veće koncentracije ovog citokina kod porodilja obolelih od parodontopatije u odnosu na porodilje sa zdravim parodontalnim tkivima ($p=0.014$). Takođe, srednja vrednost koncentracija IL-1 β u GT je bila statistički značajno veća kod porodilja sa gingivitisom u odnosu na porodilje sa zdravim parodontalnim tkivima ($p=0.009$). Poređenjem srednjih vrednosti koncentracija IL-1 β u GT između porodilja sa gingivitisom i porodiljama obolelim od parodontopatije statistička značajnost nije postignuta ($p>0.05$).

Srednja vrednost koncentracije IL-6 u gingivalnoj tečnosti je bila statistički značajno veća u grupi porodilja obolelih od parodontopatije u odnosu na porodilje sa zdravim parodontacijumom ($p=0.000$), kao i u grupi porodilja sa gingivitisom u odnosu na porodilje sa zdravim parodontacijumom ($p=0.001$). Poređenjem srednjih vrednosti koncentracija IL-6 u GT između porodilja sa gingivitisom i porodiljama obolelim od parodontopatije statistička značajnost nije postignuta ($p>0.05$).

Srednja vrednost koncentracija TNF- α u gingivalnoj tečnosti je bila značajno veća u grupi porodilja sa gingivitisom u odnosu na grupu zdravih parodontalnih tkiva ($p=0.009$). Poređenjem srednjih vrednosti koncentracija TNF- α u GT između grupa porodilja sa gingivitisom i porodilja obolelih od parodontopatije, kao i među grupama

parodontopatija i zdrava parodontalna tkiva , statistička značajnost nije postignuta ($p>0.05$).

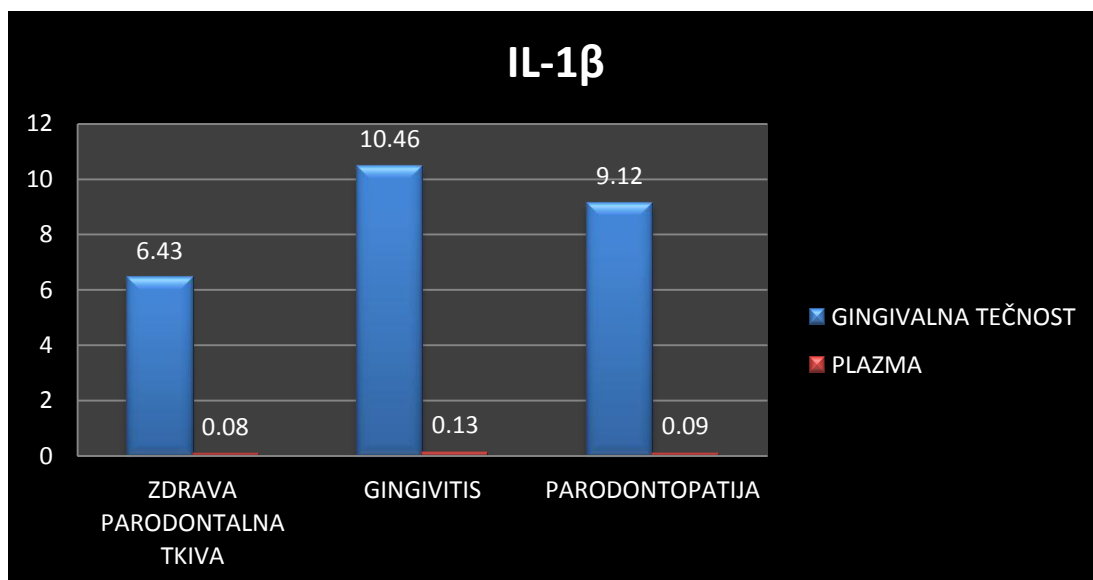
Srednja vrednost koncentracija PGE2 u gingivalnoj tečnosti je bila statistički značajno veća kod porodilja obolelih od parodontopatije u odnosu na porodilje sa zdravim parodontalnim tkivima ($p=0.009$). Poređenjem srednjih vrednosti koncentracija PGE2 u GT između grupa porodilja sa gingivitisom i porodilja obolelih od parodontopatije, kao i među grupama gingivitis i zdrava parodontalna tkiva, statistička značajnost nije postignuta ($p>0.05$).

Poređenjem srednjih vrednosti koncentracija IL-1 β i IL-6 u plazmi između grupa porodilja sa različitim stanjima tkiva parodontijuma, statistički značajna razlika nije postignuta ($p>0.05$).

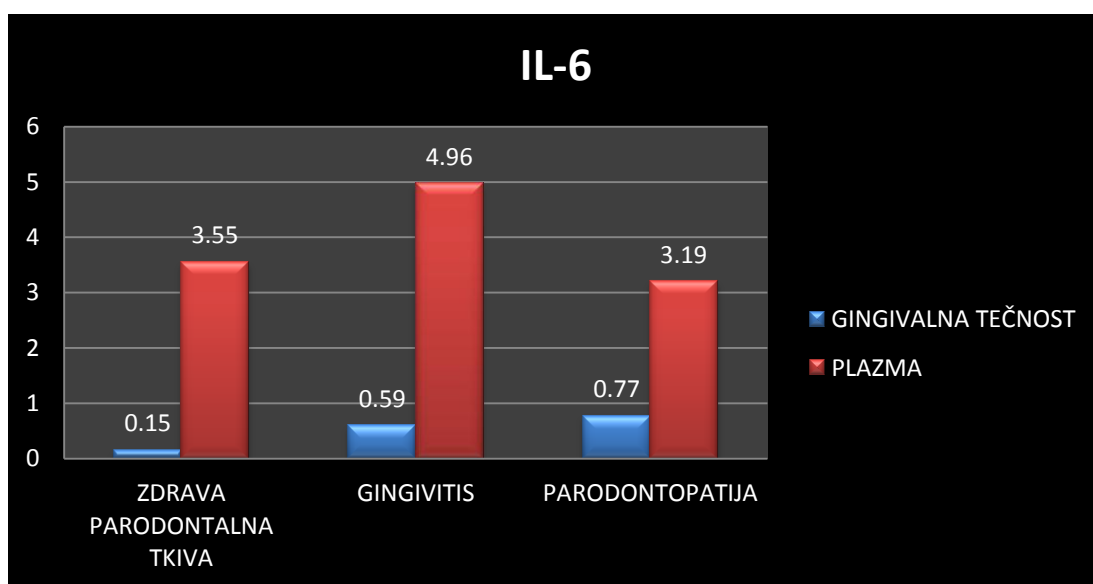
Srednja vrednost koncentracija TNF- α u plazmi je bila značajno veća kod porodilja obolelih od parodontopatije u odnose na one sa zdravim parodontalnim tkivima ($p=0.047$).

Statistički značajno veća srednja vrednost koncentracije PGE2 u plazmi je potvrđena u grupi porodilja obolelih od parodontopatije u odnose na one sa zdravim parodontalnim tkivima ($p=0.002$).

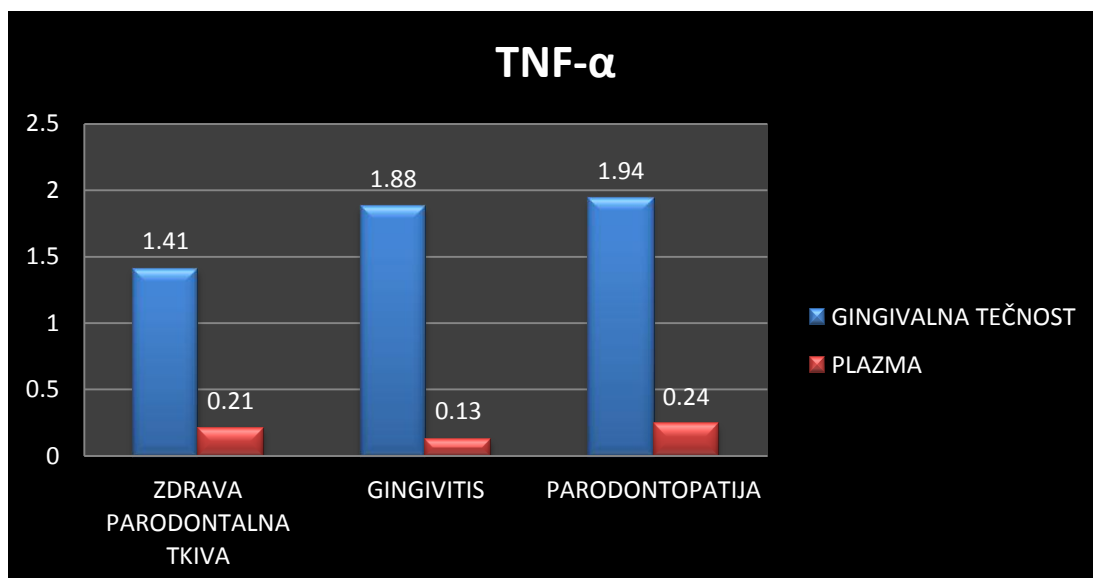
Srednje vrednosti koncentracija merenih medijatora u uslovima različitih stanja tkiva parodontijuma su prikazane grafički (Grafik 12., Grafik 13., Grafik 14., Grafik 15.)



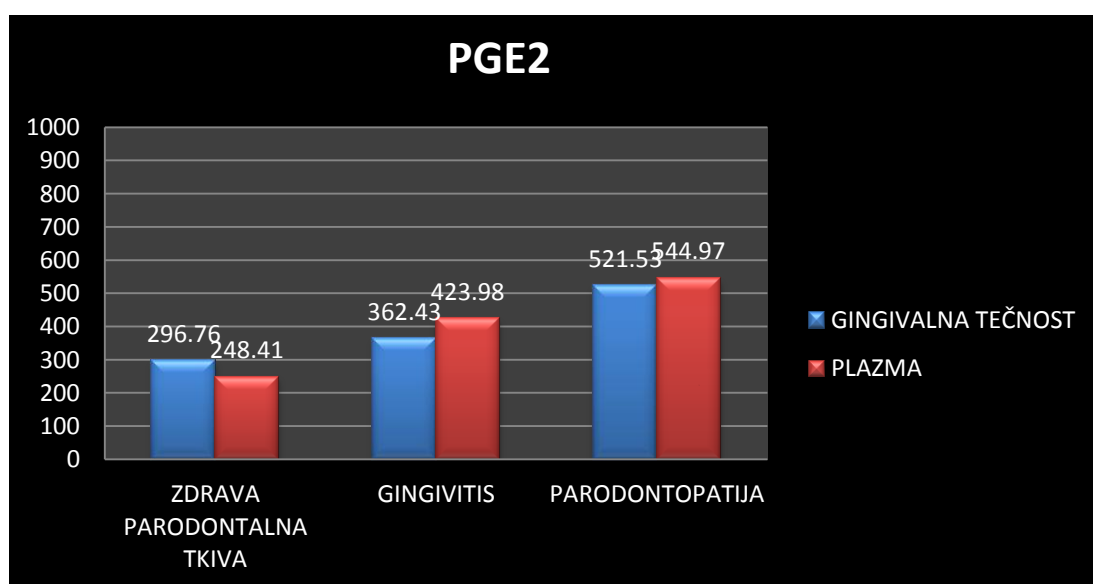
Grafik 12. Srednje vrednosti koncentracija IL-1 β u gingivalnoj tečnosti i u plazmi u uslovima različitih stanja tkiva parodonticijuma



Grafik 13. Srednje vrednosti koncentracija IL-6 u gingivalnoj tečnosti i u plazmi u uslovima različitih stanja tkiva parodonticijuma



Grafik 14. Srednje vrednosti koncentracija TNF- α u gingivalnoj tečnosti i u plazmi u uslovima različitih stanja tkiva parodontijuma



Grafik 15. Srednje vrednosti koncentracija PGE2 u gingivalnoj tečnosti i u plazmi u uslovima različitih stanja tkiva parodontijuma

Vrednosti merenih medijatora kod različitih stanja tkiva parodontijuma, kao i njihove međusobne razlike prikazane su u tabeli 5. Sve vrednosti su prikazane kao srednja vrednost \pm standardna devijacija i interval poverenja.

Tabela 5. Vrednosti medijatora zapaljenja u gingivalnoj tečnosti i u krvi u uslovima različitih stanja tkiva parodontijuma.

	Zdrava parodontalna tkiva (N=36)	Gingivitis (N=36)	Parodontopatija (N=48)	p-vrednost
IL-1 gt (pg/mu)	6.43±3.39 (5.00; 3.83-9.03)	10.46±2.79 (11.36; 8.31-12.61)	9.12±4.69 (11.73;5.76-12.47)	G>ZP p=0.009* G/P p=0.514 P/ZP p=0.014*
IL-6 gt (pg/mu)	0.15 ± 0.24 (0.05; 0.02- 0.28)	0.59 ± 0.99 (0.27; 0.04- 1.08)	0.77 ± 0.97 (0.25; 0.33- 1.21)	G>ZP p=0.001* G/P p=0.391 P>ZP p=0.000*
TNF-α gt (pg/mu)	1.41 ± 1.80 (0.51; 0.48-2.33)	1.88 ±2.14 (0.71; 0.78-2.98)	1.94 ± 3.80 (0.69; 0.25-3.63)	G >ZP p=0.009* G /P p= 0.647 P /ZP p=0.086
PGE2 gt (pg/mu)	296.76±332.20 (184.71; 125.96-467.57)	362.43± 238.57 (365.38; 239.77-485.09)	521.53± 334.97 (424.82; 373.01- 670.05)	G/ZP p=0.153 P/G p=0.174 P>ZP p=0.009*
IL-1β p (pg/ml)	0.08±0.02 (0.09;0.07-0.12)	0.13±0.11 (0.09;0.06-0.20)	0.09±0.02 (0.09;0.08-0.10)	G/ZP p=0.603 G/P p=0.667 P/ZP p=0.667
IL-6 p (pg/ml)	3.55±2.35 (3.29, 2.34-4.75)	4.96±6.40 (2.60; 1.67-8.26)	3.19±1.45 (3.01; 2.54-3.83)	G/ZP p=0.864 G/P p=0.824 P/ZP p=0.717
TNF-α p (pg/ml)	0.21±0.47 (0.04; 0.03-0.46)	0.13±0.15 (0.09; 0.06-0.22)	0.24±0.46 (0.12; 0.03-0.44)	G/ZP p=0.476 G/P p=0.355 P>ZP p=0.047*
PGE2 p (pg/ml)	248.41 ±287.13 (89.62; 100.69-396.14)	423.98±550.41 (63.67; 140.98-706.97)	544.97±512.58 (420.69; 317.70-772.24)	G/ZP p=0.432 G/P p=0.276 P>ZP p=0.002*

gt-gingivalna tečnost, p-plazma, pg/mu-pg/mesto uzorkovanja

*- p vrednost <0.05

4.4. Korelacija nivoa IL-1 β , IL-6, TNF- α i PGE2 u gingivalnoj tečnosti i u perifernoj venskoj krvi ispitanica sa kliničkim parametrima

IL-6 i PGE2 u gingivalnoj tečnosti porodilja su pokazali statistički značajno pozitivnu korelaciju sa svim merenim kliničkim parametrima. PGE2 u uzorcima plazme porodilja je pokazao značajno pozitivnu korelaciju sa dubinom sondiranja (DS), nivoom pripojnog epitela (NPE) i gingivalnim indeksom (GI). IL-1 β u uzorcima gingivalne tečnosti porodilja je bio značajno pozitivno korelisan sa krvarenjem na provokaciju (KNP) i gingivalnim indeksom (GI). IL-1 β , IL-6 i TNF- α u uzorcima plazme porodilja kao i TNF- α u uzorcima gingivalne tečnosti nisu pokazali nijednu značajnu korelaciju sa merenim kliničkim parametrima.

Korelacije merenih medijatora zapaljenja, u gingivalnoj tečnosti i u krvi, sa kliničkim parametrima korišćenim u proceni stanja tkiva parodontijuma kod porodilja, sumirane su u tabeli 6.

Tabela 6. Koeficijent korelacije za kliničke parametre i nivoe medijatore zapaljenja u gingivalnoj tečnosti i u perifernoj venskoj krvi

	IL-1 β gt	IL-6 gt	TNF gt	PGE2 gt	IL-1 β p	IL-6 p	TNF p	PGE2 p
DS	.373	.562**	.179	.416**	.189	-.099	.140	.227**
NPE	.318	.370**	.090	.324**	.369	-.099	.169	.265**
KNP	.478**	.561**	.199	.300**	.421	.120	.016	.222
PI	.060	.430**	.220	.417**	.112	-.043	.116	.208
GI	.011**	.560**	.220	.345**	.189	.097	.095	.272**

DS-dubina sondiranja, NPE-nivo pripojnog epitela; KNP-krvarenje na provokaciju, PI-plak indeks; GI- gingivalni indeks, gt-gingivalna tečnost; p-plazma.

** - p vrednost <0.01

4.5. Međusobna korelacija merenih medijatora zapaljenja u gingivalnoj tečnosti i u perifernoj venskoj krvi ispitanica

U grupi žena porođenih u terminu nivoi IL-6 i PGE₂ u GT su pokazali značajno pozitivnu korelaciju sa nivoom IL-1 β u plazmi, nivo IL-1 β u GT je pokazao značajno pozitivnu korelaciju sa nivoom IL-6 u plazmi, nivo TNF- α u GT je pokazao značajno negativnu korelaciju sa njegovim nivoom u plazmi i nivo IL-6 u GT je pokazao značajno pozitivnu korelaciju sa nivoom PGE₂ u plazmi. U grupi prevremeno prođenih žena statistički značajna pozitivna korelacija je postignuta između nivoa TNF- α u GT i nivoa PGE₂ u plazmi.

Međusobna korelacija merenih medijatora u gingivalnoj tečnosti i u perifernoj venskoj krvi ispitanica prikazana je u tabeli 7.

Tabela 7. Koeficijent korelacije za nivoe medijatora zapaljenja u gingivalnoj tečnosti i u perifernoj venskoj krvi

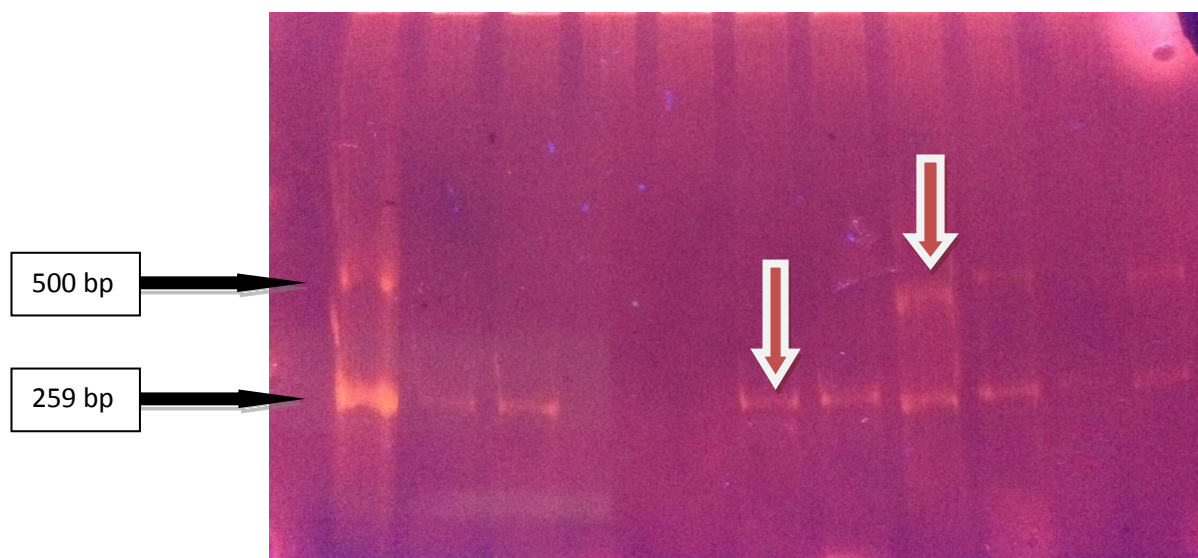
	Žene porođene u terminu				Prevremeno porođene žene			
	IL-1 β p	IL-6 p	TNF- α p	PGE ₂ p	IL-1 β p	IL-6 p	TNF- α p	PGE ₂ p
IL-1β gt	-.062	.353**	-.003	.056	.044	-.016	.021	-.013
IL-6 gt	.348**	-.014	-.181	.399**	.019	.214	-.056	.042
TNF-α gt	-.168	-.199	-.361**	-.181	-.115	.222	-.176	.458**
PGE₂ gt	.370**	.039	-.219	.217	-.090	.168	-.058	.220

gt-gingivalna tečnost; p-plazma, ** - p vrednost <0.01

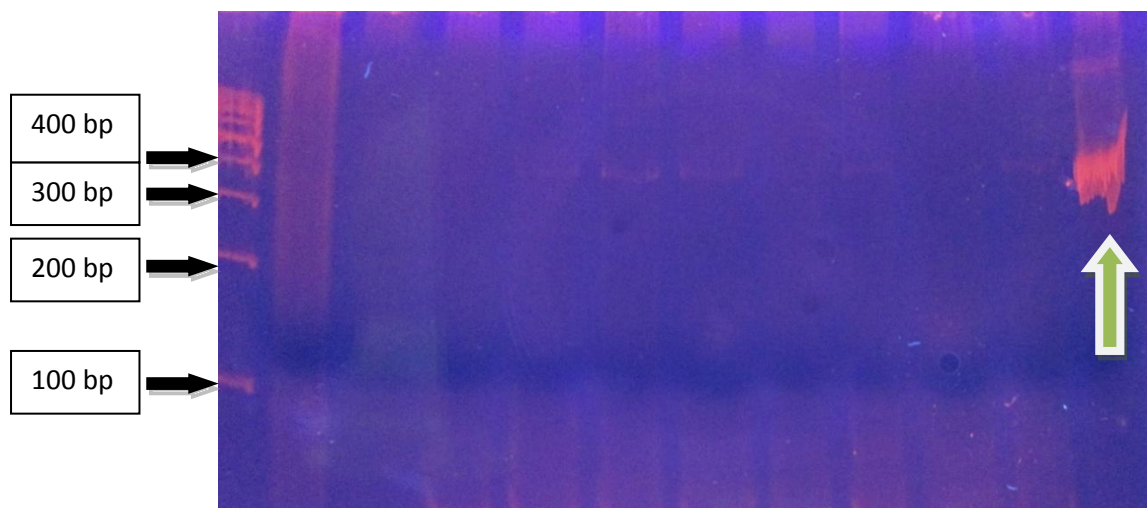
4.6. Zastupljenost ispitivanih parodontopatogenih mikroorganizama kod prevremeno porođenih žena i žena porođenih u terminu

Primenom reakcije lančane polimeraze (PCR metode) u uzorcima subgingivalnog dentalnog plaka određivalo se prisustvo/odsustvo genoma četiri parodontopatogena mikroorganizma - *Porphyromonas gingivalis* (Pg), *Prevotella intermedia* (Pi) *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa) i *Treponema denticola* (Td).

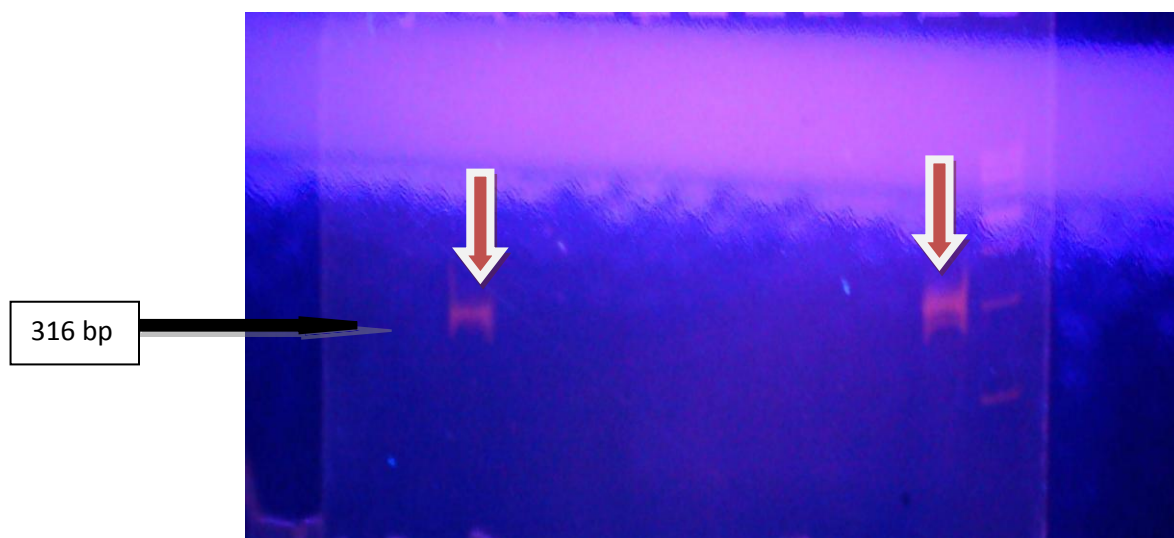
Postojanje elektroforetskih traka na poliakrilamidnom gelu, očekivane duzine za ispitivane bakterije, označavalo je pozitivan nalaz (Slika 7., Slika 8., Slika 9.).



Slika 7. Poliakrilamidni gel sa trakama koje odgovaraju amplifikovanim fragmentima bakterija *P.intermedia* (259 bp) i *A.actinomycetemcomitans* (500 bp)



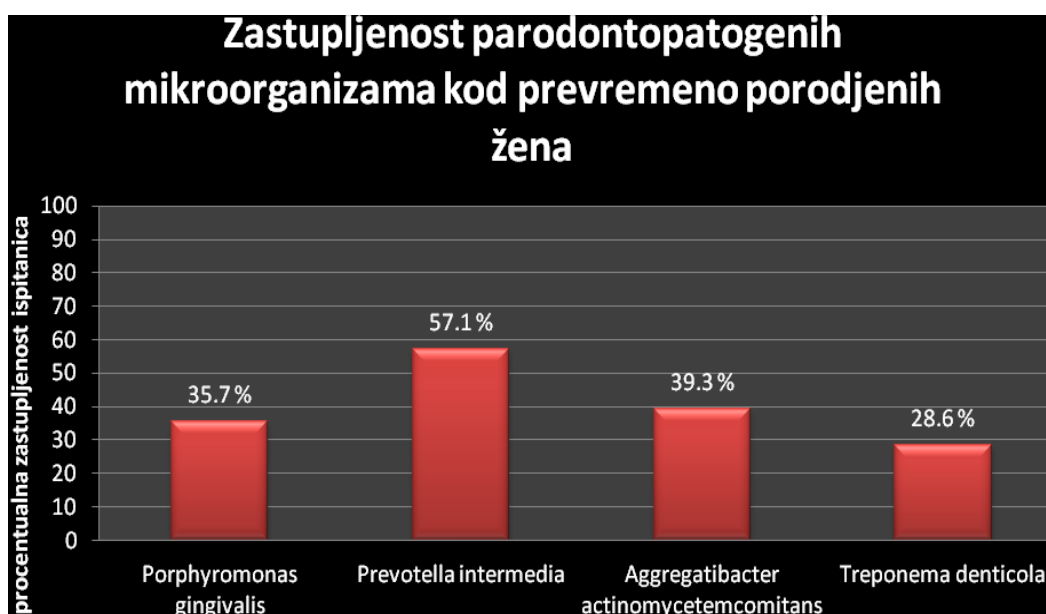
Slika 8. Poliakrilamidni gel sa trakom koja odgovara amplifikovanom fragmentu *P.gingivalis* (400 bp)



Slika 9. Poliakrilamidni gel sa trakama koje odgovaraju amplifikovanim fragmentima *T.denticola* (316 bp)

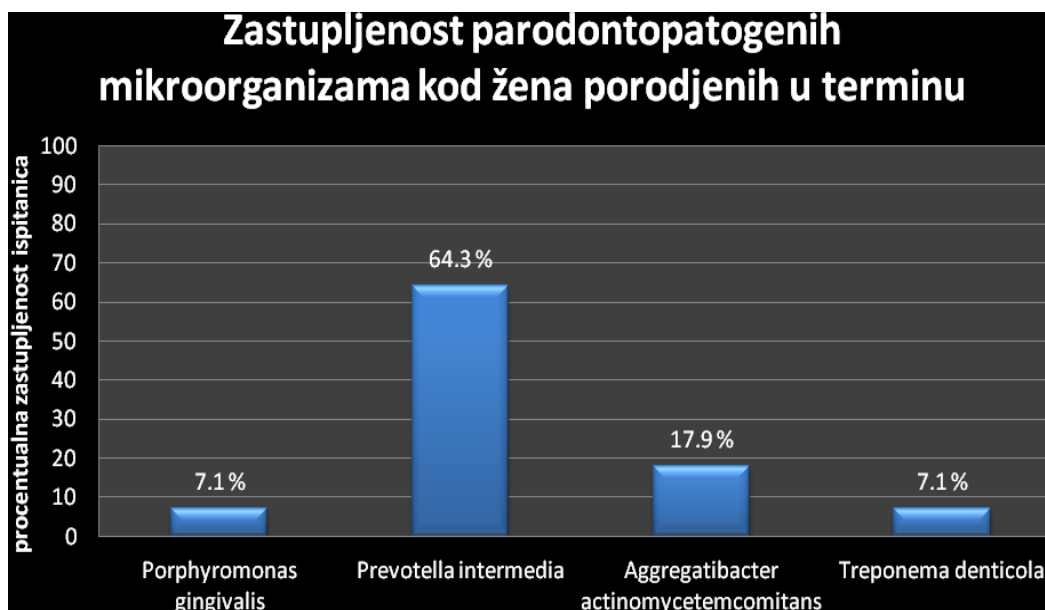
Procenat pozitivnih uzoraka, u grupi prevremeno porođenih žena, na prisustvo *Porphyromonas gingivalis* je iznosio 35.7% (21 ispitanica od 60), na prisustvo vrste

Prevotella intermedia je bio 57.1% (34 ispitanica od 60), na *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* 39.3% (24 ispitanica od 60) i na *Treponema denticola* 28.6% (17 ispitanica od 60) (Grafik 16.).



Grafik 16. Procenat porodilja pozitivnih na ispitivane parodontopatogene bakterije u grupi prevremeno porođenih žena

Procenat pozitivnih uzoraka, u grupi žena porođenih u terminu, na prisustvo *Porphyromonas gingivalis* je iznosio 7.1% (4 ispitanice od 60), na *Prevotella intermedia* 64.3% (39 ispitanica od 60), na *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* 17.9% (11 ispitanica od 60) i na vrstu *Treponema denticola* 7.1% (4 ispitanice od 60) (Grafik 17.).



Grafik 17. Procenat porodilja pozitivnih na ispitivane parodontopatogene bakterije u grupi žena porođenih u terminu

Poređenjem procentualne zastupljenosti ispitivanih parodontopatogenih bakterija između grupa, potvrđena je statistički značajno veća zastupljenost bakterijske vrste *Porphyromonas gingivalis* u grupi prevremeno porođenih žena u odnosu na žene porođene u terminu ($p=0.000$). Statistička značajnost je potvrđena i u zastupljenosti bakterija *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ($p=0.015$) i *Treponema denticola* ($p=0.003$) u grupi prevremeno porođenih žena u odnosu na žene porođene u terminu. Poređenjem zastupljenosti parodontopatogene bakterije *Prevotella intermedia* među grupama, statistički značajna razlika nije postignuta ($p=0.454$).

Zastupljenost parodontopatogenih bakterija u uzorcima subgingivalnog plaka prevremeno porođenih žena i žena porođenih u terminu i razlika između grupa prikazana je u tabeli 8.

Tabela 8. Zastupljenost ispitivanih parodontopatogenih mikroorganizama i razlika između grupa

	Zene porodene u terminu (N=60)	Prevremeno porodene žene (N=60)	p-vrednost
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	4 (7.1%)	21 (35.7%)	0.000*
<i>Prevotella intermedia</i>	39 (64.3%)	34 (57.1%)	0.454
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	11 (17.9%)	24 (39.3%)	0.015*
<i>Treponema denticola</i>	4 (7.1%)	17 (28.6%)	0.003*

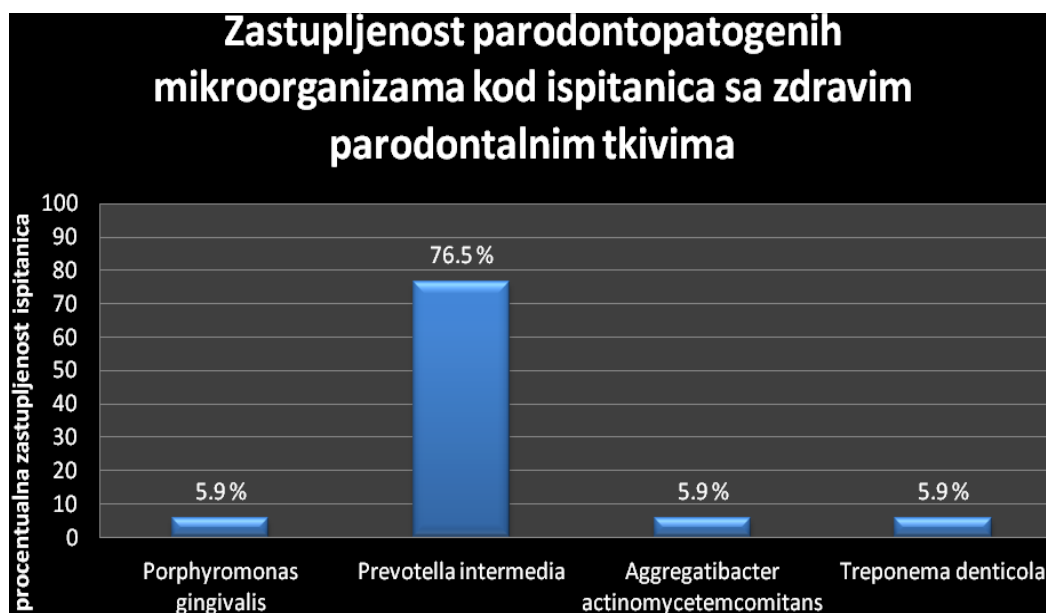
*- p vrednost <0.05

4.7. Zastupljenost ispitivanih parodontopatogenih mikroorganizama u uslovima različitih stanja tkiva parodontcijuma

U uzorcima subgingivalnog dentalnog plaka porodilja sa zdravim parodontalnim tkivima, u visokom procentu dominirala je bakterija *Prevotella intermedia* (76.5%). Procentualna zastupljenost vrsta *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* i *T. denticola* je bila ista i iznosila je 5.9 %.

Kod porodilja sa dijagnostikovanom gingivitisom procentualno najzastupljenija je bila *Prevotella intermedia* (47.1%). *A. actinomycetemcomitans* je otkrivena u 23.5% uzoraka porodilja obolelih od gingivitisa, dok je zastupljenost vrsta *P. gingivalis* i *T. denticola* iznosila 11.8%.

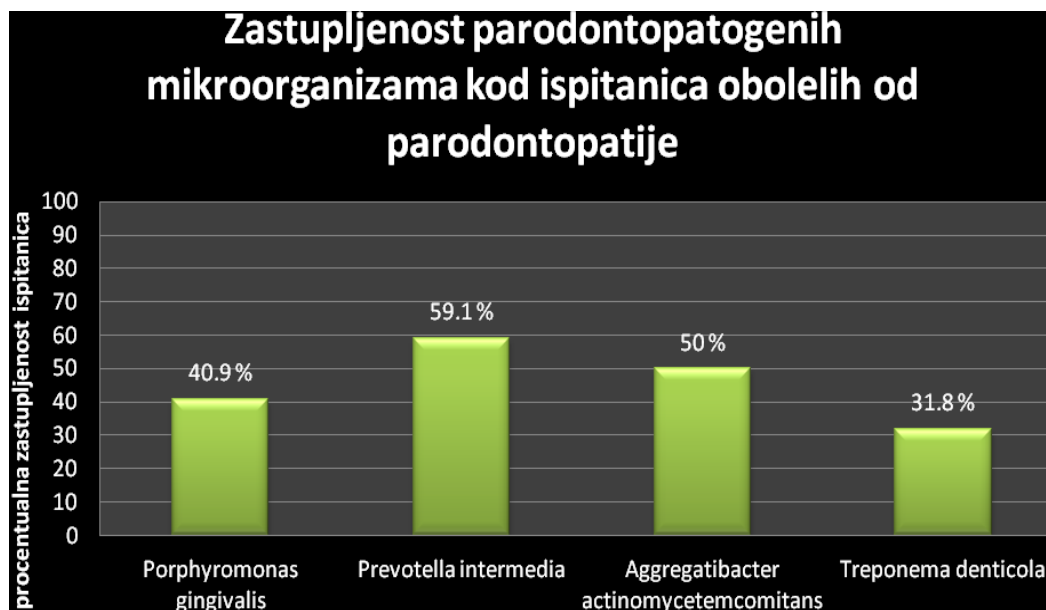
U uzorcima subgingivalnog dentalnog plaka porodilja obolelih od parodontopatije, procentualno najzastupljenija je bila *P.intermedia* (59.1%). U relativno visokom procentu otkrivene su *A.actinomyetemcomitans* (50%), *P.gingivalis* (40.9%) i *T.denticola* (31.8%).



Grafik 18. Zastupljenost ispitivanih parodontopatogena kod ispitanica sa zdravim parodontalnim tkivima



Grafik 19. Zastupljenost ispitivanih parodontopatogena kod ispitanica sa gingivitisom



Grafik 20. Zastupljenost ispitivanih parodontopatogena kod ispitanica obolelih od parodontopatije

Poređenjem zastupljenosti ispitivanih parodontopatogena u različitim stanjima tkiva parodontcijuma, potvrđena je statistički značajno veća zastupljenost bakterijske vrste *P.gingivalis* kod porodilja obolelih od parodontopatije u poređenju sa porodiljama sa dijagnostikovanim gingivitisom ($p=0.003$), kao i u odnosu na porodilje sa zdravim parodontalnim tkivima ($p=0.000$).

P.intermedia je značajno bila zastupljenija kod ispitanica sa klinički zdravim parodontcijumom u odnosu na ispitanice sa gingivitisom ($p=0.029$).

Zastupljenost *A.actinomycetemcomitans* je statistički značajno bila veća kod porodilja sa parodontopatijom u poređenju sa porodiljama sa klinički zdravim parodontalnim tkivima ($p=0.000$), kao i u odnosu na porodilje sa gingivitisom ($p=0.012$).

Kod porodilja obolelih od parodontopatije, zastupljenost bakterije *T.denticola* je statistički značajno bila veća u poređenju sa porodiljama sa gingivitisom ($p=0.036$), kao i u odnosu na porodilje sa klinički zdravim parodontcijumom ($p=0.005$).

Procentualna zastupljenost ispitivanih parodontopatogenih mikroorganizama, u uslovima različitih stanja tkiva parodontcijuma, kod ispitanica obe studijske grupe prikazana je u tabeli 9.

Tabela 9. Zastupljenost ispitivanih parodontopatogenih mikroorganizama u uslovima različitih stanja tkiva parodontcijuma i razlike između grupa

	Zdrava parodontalna tkiva (N=36)	Gingivitis (N=36)	Parodontopatija (N=48)	p-vrednost
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	2 (5.9 %)	4 (11.8%)	20 (40.9%)	G/ZP $p=0.674$ P>G $p=0.003^*$ P>ZP $p=0.000^*$
<i>Prevotella intermedia</i>	27 (76.5%)	17 (47.1%)	28 (59.1%)	ZP>G $p=0.029^*$ G/P $p=0.379$ P/ZP $p=0.164$
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	2 (5.9%)	8 (23.5%)	24 (50%)	G /ZP $p=0.085$ P >G $p=0.012^*$ P>ZP $p=0.000^*$
<i>Treponema denticola</i>	2 (5.9%)	4 (11.8%)	15 (31.8%)	G/ZP $p=0.674$ P>G $p=0.036^*$ P>ZP $p=0.005^*$

*- p vrednost <0.05

4.8. Korelacija nalaza parodontopatogenih mikroorganizama i nivoa IL-1 β , IL-6, TNF- β i PGE2 u gingivalnoj tečnosti i u perifernoj venskoj krvi ispitanica

Nivo IL-6 u gingivalnoj tečnosti je pokazao značajno pozitivnu korelaciju sa nalazom bakterija *Porphyromonas gingivalis* i *Treponema denticola* u subgingivalnom dentalnom plaku porodilja. Nivo TNF- α u plazmi je pokazao značajno pozitivnu korelaciju sa nalazom bakterijske vrste *T.denticola* u uzorku subgingivalnog dentalnog plaka.

Preostali mereni medijatori inflamacije u gingivalnoj tečnosti i u plazmi nisu pokazali nijednu značajnu korelaciju sa nalazom parodontopatogenih mikroorganizama u uzorcima subgingivalnog dentalnog plaka porodilja.

Korelacija nalaza parodontopatogenih mikroorganizama i nivoa merenih medijatora zapaljenja prikazana je u tabeli 10.

Tabela 10. Koeficijent korelacije za parodontopatogene mikroorganizame i nivoe medijatora zapaljenja

	IL-1 β gt	IL-6 gt	TNF- α gt	PGE ₂ gt	IL-1 β p	IL-6 p	TNF- α p	PGE ₂ p
Pg	-.325	.386**	.258	.191	-.325	-.085	.246	.064
Pi	-.204	.046	-.137	-.075	-.204	.131	.205	.075
Aa	.158	.228	.237	.089	.158	.010	.191	.035
Td	.056	.434**	-.065	.273*	.056	.022	0.382**	.017

Pg - *Porphyromonas gingivalis*, Pi - *Prevotella intermedia*, Td - *Treponema denticola*, Aa - *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

gt - gingivalna tečnost, p- plazma,

*- p vrednost <0.05, **- p vrednost <0.01

5. DISKUSIJA

Zapaljenska oboljenja potpornih tkiva zuba, gingivitisi uzrokovani plakom i parodontopatije, se odlikuju visokom zastupljenošću u humanoj populaciji. Tokom proteklih tridesetak godina objavljen je veliki broj studija koje su se bavile uticajem oboljenja usne duplje, predominantno parodontopatije, na sistemsko zdravlje ljudi. Rezultati savremenih istraživanja su pružili dokaze o povezanosti parodontopatije i nekih od najzastupljenijih sistemskih bolesti današnjice kao što su kardiovaskularne bolesti i diabetes melitus (Tonetti 2009, Friedewald i sar., 2009, Chavarry i sar., 2009).

Determinisanje individue sa predispozicijom za nastanak parodontopatije, pored prisustva dobro definisanih faktora rizika, podrazumeva i razumevanje složenih imunoloških mehanizama domaćina koji se smatraju odgovornim za oštećenje parodontalnih tkiva. Stručna javnost je centralnu ulogu mikrobiološke etiologije u patogenezi oboljenja parodontopatije preusmerila na imuni odgovor domaćina. Upravo, neuravnoteženost između protektivnih i destruktivnih elemenata imunog odgovora domaćina se smatra ključnim faktorom patogeneze parodontopatije (Liu i sar., 2010). Smatra se da osobe sa težim formama parodontopatije odnosno sa obimnom destrukcijom potpornog koštanog tkiva imaju drugačiji imunoinflamatorni odgovor na bakterije dentalnog plaka u poređenju sa osobama sa blažim formama parodontopatije. Još uvek nije sasvim precizno ustanovljeno koji su sve to mehanizmi imunog odgovora domaćina odgovorni za destrukciju parodontalnih tkiva.

Usled nemogućnosti imunog odgovora domaćina da se izbori sa patogenim bakterijama dentalnog plaka nastaje perzistirajuća infekcija u parodontocijumu. Prisutna hronična infekcija nema samo lokalno dejstvo. Sve je više dokaza koji upućuju da oboljenja sa inflamatornom etiopatogenezi, kao što su ateroskleroza, aspiraciona pneumonija, hronična opstruktivna bolest pluća, reumatoidni artritis, neurološka oboljenja poput Alchajmerove bolesti i multiple skleroze i psorijaza mogu da imaju vezu sa infekcijom u parodontocijumu (Prasanna SJ 2011, Sheu i sar., 2013, Ganzetti i sar., 2014, Scannapieco 2014, Koziel i sar., 2014, Cerajewska i sar., 2015, Kholý i sar.,

2015, Payne i sar., 2015, Silosi i sar., 2015, Saffi i sar., 2015). Tendencija otkrivanja novih oboljenja čiji uzrok, tok i težina može biti povezan sa parodontopatijom se povećava. Razumevanje složene interakcije između hronične infekcije u parodontocijumu i sistemskih stanja i oboljenja je od izuzetnog značaja.

Najpre, u studijama koje datiraju još od pre tri decenije, utvrđivanje povezanosti parodontopatije i sistemskih oboljenja kao što su diabetes mellitus, ateroskleroza i respiratorne bolesti se baziralo na identifikaciji zajedničkih faktora rizika. Esencijalnim korakom u preciznijem ispitivanju ove povezanosti se smatra analiza biohemijskih markera svojstvenih ovim oboljenjima (Taylor i sar., 2013, D'Aiuto i sar., 2013, Öztekin i sar., 2013) kao i varijacija u naslednoj osnovi - genskih polimorfizama za te biomarkere (Geismar i sar., 2008, Struch i sar., 2008, Xiao i sar. 2009, Schulz i sar., 2012).

Pro-inflamatorni citokini (IL-1 β , IL-6 i TNF- α) i PGE2 su se izdvojili kao medijatori inflamacije čiji je intezitet produkcije pokazatelj aktivnosti destrukcije tkiva parodontocijuma. Utvrđeno je da pacijenti oboleli od parodontopatije imaju povišene nivoe IL-1 β , IL-6, PGE2 i TNF- α u gingivalnoj tečnosti u poređenju sa ispitanicima sa zdravim parodontalnim tkivima (Haesman i sar., 1993, Graves 2008). Usled povećane vaskularne propustljivosti u uslovima inflamacije u parodontocijumu (Van Dyke i Van Winkelhoff 2013), parodontopatogene bakterije i medijatori zapaljenja imaju sposobnost da prodru u sistemsku cirkulaciju (Beck i sar. 1996, Gross i Gencko 1998). Takođe, dokazano je da su povišene koncentracije IL-1 β , IL-6, TNF- α i PGE2 prisutne i u serumu pacijenata obolelih od nekih sistemskih bolesti, koje imaju inflamatornu etiopatogenezu, u poređenju sa sistemskim zdravim osobama (Hu i sar., 2004, Foschino i sar., 2007).

Fiziološka trudnoća je regulisana složenom interakcijom hormona i mrežom lokalno produkovanih citokina. Prevrmeni porođaj, značajan uzrok perinatalnog morbiditeta i važan činilac perinatalnog mortaliteta, se karakteriše multifaktorijalnom prirodom. Mnogobrojni etiološki činiooci i faktori rizika su identifikovani, ali i dalje značajan procenat ostaje nerazjašnjene etiologije (Chalis 2001). Istovremeno sadejstvo više prisutnih faktora rizika se smatra najverovatnijim mehanizmom nastanka. Zaključak većine autora, čiji je fokus istraživanja bio patogenetski mehanizam

prevremenog porođaja, je da su infekcija i inflamacija najfrekventniji prekursori (Hillier i sar., 1988, Gibbs i sar., 1992, Hill i sar., 1998.).

Identifikovani su biohemijski markeri (Haram i sar., 2003, Inglis i sar., 1997, GURSOY i sar., 2010) koji se smatraju prediktorima prevremenog porođaja. Prostaglandin E2 (PGE2), interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6 i faktor nekroze tumora alfa (TNF- α) su prepoznati kao pokretači - kako prevremenog, tako i porođaja u očekivanom terminu. Navedeni biohemijski markeri su medijatori inflamacije tj. njihova produkcija je stimulisana infekcijom. Istraživanja su pokazala da inflamacija utiče na produkciju citokina u ćelijama glatke muskulature uterusa, a intrauterini porast prostaglandina stimuliše kontraktilnost miometrijuma. Nivoi ovih medijatora zapaljenja se postepeno povećavaju tokom trudnoće i postizanje njihovih najviših vrednosti dovodi do započinjanja porođaja (Haram i sar. 2003).

Važno je istaći da su ovi biološki molekuli prisutni u amnionskoj tečnosti i u odsustvo infekcije i inflamacije (Saito i sar., 1993), a povećanje njihovih koncentracija prethodi i terminskom i prevremenom porođaju. Značajno povišene koncentracije IL-1 β , IL-6, TNF- α i PGE2 su ustanovljene u amnionskoj tečnosti (Saito i sar., 1993, Inglis i sar., 1997, Goldenberg i sar., 2005, GURSOY i sar., 2010) i u serumu (Greg i sar., 1997, Gucer i sar., 2001) prevremeno porođenih žena u poređenju sa terminskim porođenim ženama. Kod ispitanica sa dijagnostikovanom intrauterinom infekcijom statistička značajnost je bila još izraženija. Poređenjem koncentracija ovih medijatora između prevremeno porođenih žena sa i bez manifestne infekcije amnionske tečnosti ustanovljene su njihove značajno više koncentracije u uslovima prisutne infekcije amnionske tečnosti (Hillier i sar., 1993, Inglis 1997, Hitti i sar., 2001).

Pretpostavka je da postojanje udaljene infekcije koja ima elemente imunskog odgovora slične prevremenom porođaju, usled sposobnosti da naruši lokalnu homeostazu medijatora porođaja, može predstavljati faktor rizika za njegov nastanak.

Prevenција ovog najčešćeg nepovoljnog ishoda trudnoće predstavlja jedan od važnijih ciljeva svih nacionalnih zdravstvenih saveta. U tu svrhu sprovedena su istraživanja sa ciljem definisanja mogućih faktora rizika i boljeg razumevanja patogeneze prevremenog porođaja.

Brojne studije su sprovedene sa svrhom da se istraži eventualna povezanost inflamacije u parodontijumu i prevremenog porođaja. Pored definisanja parodontopatije kao visokog faktor rizika za PP ustanovljeno je i da ova stanja dele i zajedničke faktore rizika kao što su godine starosti, pušenje i socio-ekonomski status (Williams i sar., 2000).

Međutim, tačan mehanizam povezanosti ova dva patološka stanja nije u potpunosti razjašnjen. Kao moguća objašnjenja se predlažu direktni i indirektni mehanizmi kojim bi infekcija u parodontijumu mogla da uslovi prevremeni porođaj (Sanz i sar., 2013, Madianos i sar., 2013). Direktni mehanizam podrazumeva hematogenu diseminaciju parodontopatogenih bakterija i patoloških produkata u fetoplacentalnu jedinicu koji posledično stimulišu lokalnu inflamaciju. Indirektni mehanizam podrazumeva da medijatori zapaljenja iz parodontalnog žarišta prodiru u cirkulaciju, dospevaju u fetoplacentalnu jedinicu i povećaju nivoe već pristunih medijatora.

U pogledu mogućeg indirektnog mehanizma povezanosti parodontopatije i prevremenog porođaja, oskudni su podaci o mogućem uticaju parodontalnog žarišta kao izvora medijatora inflamacije odnosno medijatora porođaja.

Ova studija predstavlja prvu studiju u našoj zemlji, koja se bavila analizom imunoloških parametara svojstvenih i parodontopatiji i prevremenom porođaju kod prevremeno porođenih žena i žena porođenih u očekivanom terminu. Na osnovu dostupne literature, nema podataka o sličnim istraživanjima na teritoriji Republike Srbije.

Cilj našeg istraživanja je bio da se evaluiraju nivoi PGE₂, IL-1 β , IL-6 i TNF- α u GT i u perifernoj venskoj krvi prevremeno porođenih žena i žena porođenih u terminu i da se komparativnom analizom sa kliničkim parodontalnim parametrima i mikrobiološkim nalazom ispita eventualna povezanost parodontopatije i prevremenog porođaja. Sproveden je složen metodološki koncept, koji je pored kliničkog pregleda parodontalnih tkiva obuhvatio i imunološku analizu uzoraka gingivalne tečnosti i periferne venske krvi, kao i mikrobiološku analizu uzoraka subgingivalnog dentalnog plaka porodilja. U gingivalnoj tečnosti i u plazmi porođenih žena analizirani su nivoi

biohemijskih markera koji se dovode u vezu sa prevremenim porođajem, a takođe predstavljaju i medijatore inflamacije svojstvene parodontopatiji. U subgingivalnom dentalnom plaku ispitivano je prisustvo četiri najzastupljenija parodontopatogena mikroorganizma, za koje se smatra da uzrokuju inflamatorne promene u parodoncijumu.

Rezultati ovog istraživanja su nedvosmisleno pokazali da je parodontopatija značajnije zastupljena u grupi prevremeno porođenih žena u poređenju sa grupom žena porođenih u terminu ($p < 0.001$). Procenat prevremeno porođenih ispitanica kod kojih je dijagnostikovana parodontopatija je iznosio 64.3%. Kod ispitanica porođenih u terminu taj procenat je bio značajno manji i iznosio je 14.3%. Približno slična zastupljenost gingivitisa je zabeležena u obe grupe ispitanica. Zastupljenost klinički zdravih parodontalnih tkiva je bila značajno veća u grupi porodilja porođenih u terminu u poređenju sa grupom prevremeno porođenih žena ($p < 0.001$). U našoj studiji, procenat osoba sa zdravim parodontalnim tkivima u grupi porodilja koje su se porodile u pravovremnom terminu je iznosio 53.6%, dok je u grupi prevremeno porođenih žena iznosio 7.1%.

U grupi prevremeno porođenih ispitanica, obuhvaćenih ovom studijom, svi mereni klinički parametri svojstveni parodontopatiji (DS, NPE i KNP), su bili statistički značajno veći u poređenju sa grupom ispitanica porođenih u terminu ($p < 0.001$). Kao pouzdan pokazatelj destrukcije parodontalnih tkiva u kliničkoj proceni se ističe nivo pripojnog epitela (NPE). Srednja vrednost NPE u grupi prevremeno porođenih žena je iznosila 2 mm, što predstavlja dvostruku veću vrednost u porođenju sa 0.43 mm koliko je iznosila srednja vrednost NPE u grupi žena porođenih u odgovarajućem terminu.

Rezultati naše studije su pokazali da je grupa prevremeno porođenih žena pokazala povišene nivoe svih evaluiranih medijatora u gingivalnoj tečnosti, statistički značajno više nivoe PGE2 i IL-6 u poređenju sa grupom žena porođenih u očekivanom terminu ($p < 0.05$). Važno je napomenuti da su upravo ovi medijatori zapaljenja definisani kao glavni trigger okidači porođaja. IL-6 je pro-inflamatorni citokin koji je normalno prisutan u niskim koncentracijama u amnionskoj tečnosti u toku drugog i trećeg trimestra trudnoće a neposredno pred nastupajući porođaj zabeleženo je povećanje njegove koncentracije (Romero i sar. 1989). Međutim kod infekcija

amnionske tečnosti ustanovljeno je dramatično povećanje nivoa ovog medijatora (Romero i sar. 1992). Uloga prostaglandina u inicijaciji porođaja je dokumentovana u naučnoj literaturi pre više od 30 godina (Novy i sar., 1980). Prostaglandini, PGE₂ i PGF₂-alfa su označeni kao medijatori stimulacije kontraktilnosti miometrijuma (Chalis 2000, Iliodromiti i sar., 2012). Značajno povišene koncentracije ovih medijatora porođaja su ustanovljene u amnionskoj tečnosti, plazmi i u urinu trudnica tokom samog porođaja (Iliodromiti i sar., 2012, Casey i sar. 1989). Povišene koncentracije IL-6 i PGE₂ lokalno u amnionskoj tečnosti, kao i IL-1 u cervikalnoj regiji se smatraju prognostičkim faktorom prevremenog porođaja (Jun JK i sar., 2000, Goepfert i sar., 2001).

Kada smo poredili nivoje ispitivanih medijatora zapaljenja u uzorcima periferne venske krvi ispitanica između PP grupe i TP grupe statistički značajna razlika nije dobijena ($p > 0.05$).

Poređenjem nivoa ispitivanih biohemijskih markera, svojstvenih i porođaju i parodontopatiji, u uzorcima gingivalne tečnosti ispitanica sa različitim parodontalnim statusom ustanovljeno je da oni pokazuju svojstvenost inflamatornim oboljenjima parodontcijuma bazirano na osnovu distribucija njihovih koncentracija. Pokazani su signifikantno viši nivoi IL-1 β i IL-6 u uslovima gingivitisa i parodontopatije, TNF- α u uslovima gingivitisa i PGE₂ u uslovima parodontopatije, u odnosu na ispitanice sa kliničkim zdravim parodontalnim tkivima ($p < 0.05$). Takođe, poređenjem nivoa biohemijskih markera svojstvenih porođaju u uzorcima plazme između ispitanica sa različitim parodontalnim statusom pokazane su značajno više vrednosti TNF- α i PGE₂ kod ispitanica obolelih od parodontopatije u odnosu na ispitanice sa zdravim parodontalnim tkivima ($p < 0.05$). Činjenica da je 82% od ukupnog broja naših ispitanica obolelih od parodontopatije pripadalo PP grupi, navodi na razmišljanje da povišene vrednosti TNF- α i PGE₂ u plazmi mogu da se pripišu istovremeno patogenezi prevremenog porođaja i parodontopatije.

Korelacija kliničkih parametara korišćenih u evaluaciji stanja parodontcijuma i nivoa merenih medijatora zapaljenja je pokazala statistički značajnu pozitivnu korelaciju nivoa PGE₂ i IL-6 u gingivalnoj tečnosti sa svim merenim parametrima ($p < 0.01$). Nivo PGE₂ u plazmi porodilja je pokazao značajno pozitivnu korelaciju sa

dubinom sondiranja (DS), nivoom pripojnog epitela (NPE) i gingivalnim indeksom (GI) ($p < 0.01$). NPE i DS reprezentuju parametre čije su povišene vrednosti pokazatelji uznapredovale inflamacije i gubitka koštanog tkiva kod parodontopatije.

Međusobna korelacija ispitivanih medijatora zapaljenja je pokazala da su u TP grupi nivoi PGE2 i IL-6 u gingivalnoj tečnosti bili značajno pozitivno korelisani sa nivoom IL-1 β u plazmi, nivo IL-1 β u gingivalnoj tečnosti je bio značajno pozitivno korelasan sa nivoom IL-6 u plazmi i nivo TNF- α u GT je bio značajno negativno korelasan sa njegovim nivoom u plazmi ($p < 0.01$). U PP grupi nivo TNF- α je bio značajno pozitivno korelasan sa nivoom PGE2 u plazmi ($p < 0.01$).

Mikrobiološka analiza uzoraka subgingivalnog plaka porođenih žena je pokazala statistički značajno veću zastupljenost *P.gingivalis*, *A.actinomycetemcomitans* i *T.denticola* u grupi prevremeno porođenih žena u odnosu na grupu žena porođenih u terminu ($p < 0.05$). Rezultati naše studije su pokazali da su navedene parodontalne bakterije svojstvene parodontopatiji, bazirano na osnovu njihove distribucije u uslovima različitih stanja tkiva parodontocijuma. *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* i *Treponema denticola* su bile zastupljenije u većem procentu uzoraka subgingivalnog plaka ispitanica obolelih od parodontopatije u odnosu na uzorke subgingivalnog plaka ispitanica sa gingivitisom, kao i u odnosu na ispitanice sa klinički zdravim parodontocijumom. Korelisanjem nalaza parodontopatogenih bakterija i nivoa ispitivanih medijatora zapaljenja u GT i u perifernoj venskoj krvi postignuta je značajna pozitivna korelacija između nivoa IL-6 u GT i prisustva *P.gingivalis* i *T.denticola* u subgingivalnom plaku ($p < 0.01$), kao i između nivoa PGE2 u GT i nalaza *T.denticola* ($p < 0.05$).

Dobijeni rezultati ukazuju na sadejstvo parodontalnih bakterija i imunoloških mehanizama u parodontalnoj destrukciji. Parodontopatogene bakterije dentalnog plaka su glavni etiološki faktor parodontopatije i različitim mehanizmima ispoljavaju svoje patogeno dejstvo. Imune ćelije produkuju pro-inflamatorne medijatore, lokalno u tkivu gingive, kao odgovor na stimulaciju imunog sistema od strane bakterijskog endotoksina (LPS).

Tokom skoro dve decenije brojne studije su sprovedene sa ciljem da ispita povezanost nepovoljnih ishoda trudnoće, pre svega prevremenog porođaja i parodontopatije. Rezultati većine studija podržavaju teoriju da infekcija u parodontocijumu kao udaljena infekcija može uticati na prematuritet i rađanje dece male telesne mase.

Najpre, definisanje parodontopatije kao faktora rizika prevremenog porođaja u mnogim studijama je bazirano na postojanju većih vrednosti kliničkih parametara, pokazatelja parodontalne destrukcije, kod ispitanica koje su za ishod trudnoće imale prevremeni porođaj u odnose na one koje su porodile u terminu.

Rodonačelnikom ideje o potencijalnoj vezi infekcije u parodontocijumu i nepovoljnih ishoda trudnoće - prevremenog porođaja i rađanje dece male telesne mase, smatra se Steven Offenbacher. U studiji objavljenoj 1996. godine (Offenbacher i sar., 1996), Offenbacher i saradnici definišu, po prvi put, parodontopatiju kao faktor rizika za nastanak prevremenog porođaja. Rezultati ove studije su pokazali da su u grupi prevremeno porođenih žena, čija su odojčad imala telesnu masu manju od 2500 gr, srednja vrednost NPE bila značajno veća u odnosu na grupu žena porođenih u terminu i čija su novorođenčad bila normalne telesne mase. Takođe, procenjeno je da se 18.2% svih prevremenih porođaja mogao pripisati uticaju parodontopatije, kao i da je rizik za nastanak prevremenog porođaja kod ispitanica sa uznapredovalim fazama parodontopatije sedam puta veći u odnosu na one sa zdravim parodontocijumom.

Nakon ove prve objavljene studije, koja je plasirala parodontopatiju kao novi i značajan faktor rizika za nastanak nepovoljnih ishoda trudnoće – prevremenog porođaja i rađanja deca male telesne mase, stručna javnost je krenula sa proverama ove konstantacije. Brojne studije preseka i prospektivne studije su sprovedene u različitim populacijama i sa velikim uzorkom ispitivanih trudnica i/ili porodilja.

U saglasnosti sa našim rezultatima mnogi autori su takođe pokazali značajano veću zastupljenost parodontopatije i veće vrednosti kliničkih parametara, pokazatelja parodontalne destrukcije, kod prevremeno porođenih žena u poređenju sa ženama porođenim u terminu. Bošnjak i saradnici u svojoj studiji, na uzorku od 81 porodilje, su ustanovili kod prevremeno porođenih žena značajno veće vrednosti NPE i KNP u

poređenju sa ženama porođenim u terminu (Bosnjak i sar., 2006). Kod naših ispitanica su takodje ustanovljene veće vrednosti ovih parametara kao i DS, PI i GI u PP grupi u odnosu na TP grupu. Rezultati studije Bošnjaka i saradnika, sprovedene u periodu bliskom porođaju (do 48 h od porođaja), su pokazali i da su porodilje sa vrednostima NPE većim od 4 mm na više od 60% pregledanih površina zuba imale 8 puta veći rizik za nastanak prevremenog porođaja.

U studiji koja je obuhvatila 203 porodilje (Jarjaura i sar., 2005) parodontopatija je bila značajnije zastupljena kod prevremeno porođenih žena u odnosu na one porođene u terminu što je i pokazano i kod naših ispitanica. Klinički pregled parodontalnih tkiva u navedenim studijama je sproveden u bliskom periodu nakon porođaja (do 48 h) što je u skladu sa primenjenim protokolom u našoj studiji.

Signifikantna zastupljenost parodontopatije kod prevremeno porođenih žena je ustanovljena u studijama koje su imale i rigoroznije kriterijume za dijagnozu parodontopatije u odnosu na one primenjene u našoj studiji. Definisane parodontopatije u slučajevima prisustva četiri i više zuba sa dubinom sondiranja 4 i više milimetara udruženim sa NPE od 3 i više milimetara na istom mestu je primenjeno u mnogim studijama preseka koje ispitivale povezanost parodontopatije i prevremenog porođaja (Le i sar., 2007, Siqueira i sar., 2007, Santos-Pereira i sar. 2007, Gianella i sar., 2011, Piscoya i sar., 2012). Zajednički rezultati ovih studija ukazuju na značajnu zastupljenost parodontopatije i značajno veće vrednosti nivoa pripojnog epitela kod prevremeno porođenih žena u odnosu na one porođene u terminu.

U studiji sprovedenoj na uzorku od 3576 porođenih žena u Turskoj populaciji (Toygar i sar. 2007), kao zaključak istraživanja jasno se deklariše parodontopatija kao nezavistan faktor rizika za nastanak prevremenog porođaja. Gomes-Filho i Mumghamba u svojim studijama (Mumghamba i sar., 2007, Gomes-Filho i sar., 2007) utvrđuju da je rizik za nastanak prevremenog porođaja dva puta veći kod majki sa dijagnostikovanom parodontopatijom u odnosu na one sa zdravim parodontacijom. Istraživanje sprovedeno na uzorku od 586 žena u Jordanu (Khader i sar., 2009) je pokazalo da je stepen destrukcije parodontacijuma majke značajan faktor rizika za nastanak prevremenog porođaja .

U prospektivnoj studiji, na uzorku od 1313 trudnica, utvrđen je aproksimativno četiri puta veći rizik za nastanak prevremenog porođaja kod ispitanica obolelih od težih formi parodontopatije (Jeffcoat i sar., 2001). Offenbacher i saradnici u prospektivnoj studiji (Offenbacher i sar., 2006), na uzorku od 1020 trudnica na teritoriji Amerike kao i Agueda i saradnici (Agueda i sar., 2008), na uzorku od 1296 ispitanica na teritoriji Španije, zaključuju signifikantnu povezanost parodontopatije i prevremenog porođaja.

U suprotnosti sa rezultatima navedenih studija i rezultatima naše studije, odsustvo povezanosti parodontopatije i prevremenog porođaja je dokumentovano u naučnoj literaturi, u studijama preseka i u prospektivnim studijama (Lunardelli i sar., 2005, Nabet i sar., 2005, Vettore i sar., 2008, Srinivas i sar., 2009, Iwanga i sar., 2011).

Ograničenost metodologije nevedenih studija ogleda se u primeni samo kliničkih parametara u cilju određivanja stanja parodontalnih tkiva. Korak dalje u preciznijem definisanju odnosa stanja parodontocijuma i ishoda trudnoće predstavlja mikrobiološka analiza subgingivalnog dentalnog plaka trudnica ili porodilja.

Promene u hormonalnom statusu u toku trudnoće imaju uticaja i na parodontalna tkiva. Povišeni nivoi estrogena i progesterona u toku trudnoće su odraz fiziološke adaptacije organizma trudnice, ali takođe utiču i na sastav subgingivalne mikroflore, moduliraju imuni odgovor i stimulišu produkciju medijatora zapaljenja. Parodontalna tkiva, u toku gestacije, karakteriše ekstenzivan odgovor na biofilm što rezultira povećanom zastupljenošću gingivitisa. Utvrđeno je da dolazi do povećanje broja anaerobnih bakterija u subgingivalnom plaku u drugom trimestru trudnoće (Kornman i sar. 1982., Gursoy i sar. 2009). Međutim, smatra se da do intenziviranja inflamatornih procesa u gingivi trudnica dolazi zbog izmenjenog metabolizma tkiva usled hormonalnog disbalansa, a ne neminovno kao posledica povećanja bakterija (Hugoson i sar., 1970, O'Neil i sar. 1979, Gursoy i sar. 2008). Takođe, potvrđeno je da se tokom trudnoće, destrukcija parodontocijuma odvija brže, odnosno povećava se vrednost NPE koji predstavlja klinički parameter pokazatelj koštane destrukciju u toku parodontopatije.

Etiologija parodontopatije je polimikrobna. Gram negativne anaerobne bakterije koje kolonizuju subgingivalni dentalni plak se ističu parodontopatogenim potencijalom.

Brojna istraživanja su pokazala da su u subgingivalnom dentalnom plaku obolelih od parodontopatije najzastupljenije bakterije crvenog i narandžastog kompleksa, koje se takođe dovode i u vezu sa prevremenim porođajem. Prodor bakterija subgingivalnog regiona u cirkulaciju se odvija stalno. Ulcerisan epitel parodontalnog džepa se karakteriše značajno većom propustljivošću u odnosu na sulkusni epitel što uslovljava frekventniji prodor parodontalnih bakterija u cirkulaciju (Beck i sar. 1996). Transeminacija bakterija i njihovih produkata iz parodontalnog žarišta u fetoplacentalnu jedinicu hematogenim putem je najverovatniji mehanizam povezanosti parodontalnih bakterija i prevremenog porođaja (Davenport 2010).

U ovoj studiji, u uzorcima subgingivalnog plaka porodilja ispitivano je prisustvo genoma bakterija *P.gingivalis*, *P.intermedia* i *T.denticola* koje pripadaju crvenom i narandžastom kompleksu. Parodontopatogena bakterija *A.actinomycescomitans* pripada zelenom kompleksu, ali zbog dokazane udruženosti sa parodontopatijom i prevremenim porođajem je uključena u istraživanje.

Rezultati naše studije su pokazali statistički značajnu zastupljenost *P.gingivalis*, *A.actinomycescomitans* i *T.denticola* u subgingivalnom plaku prevremeno porođenih žena u poređenju sa ženama porođenim u terminu ($p < 0.05$). *P.intermedia* nije pokazala razliku u zastupljenosti između ispitivanih grupa ($p > 0.05$). U grupi prevremeno porođenih žena, u najvećem procentu je identifikovan genom bakterije *P.intermedia* (57.1%), zastupljenost *P.gingivalis* i *A.actinomycescomitans* je bila približno slična (35.7% i 39.3%), dok je *T.denticola* pokazala najmanju zastupljenost 28.6%. U TP grupi u najvećem procentu je takođe identifikovan genom bakterije *P.intermedia* (64.3%), zastupljenost *A.actinomycescomitans* je iznosila 17.9% dok je zastupljenost *P.gingivalis* i *T.denticola* bila 7.1%. Takođe, ispitivane parodontalne bakterije su pokazale svojstvenost parodontopatiji, bazirano na osnovu distribucija njihovih zastupljenosti.

Visoka zastupljenost parodontopatogene bakterije *P.intermediae* u uzorcima subgingivalnog plaka svih ispitivanih porodilja se može objasniti činjenicom da je ova bakterijska vrsta kao nutritivni izvor koristi progesteron i estradiol (Kornman i sar., 1982). Navedeni hormoni su značajno povišeni u serumu i lokalno u GT, a samim tim i

zastupljenost *P.intermediae*, u toku trudnoće u odnosu na postpartalni period (Tsai i sar., 1995).

Dörtbudak i saradnici (Dortbudak i sar., 2005) u istraživanju sprovedenom na uzorku od 36 žena sa rizikom za nastanak komplikacija trudnoće, su pokazali evidentnu zastupljenost parodontopatije od 83% kod prevremeno porođenih žena u odnosu na žene porođene u terminu (20%). Podaci navedene studije su u saglasnosti sa rezultatima naše studije gde je takođe parodontopatija skoro četverostruko više bila zastupljena u PP grupi u odnosu na TP grupu. Rezultati Dortbukove studije su pokazali da je zastupljenost bakterija narandžastog i crvenog kompleksa potvrđena u 100% uzoraka subgingivalnog plaka trudnica koje su za ishod trudnoće imale prevremeni porođaj, dok je procenat pozitivnih uzoraka u grupi žena porođenih u terminu bio značajno manji (18%). U odnosu na naše rezultate, identifikacija ispitivanih paropatogena u uzorcima svih porođenih žena se može objasniti, pored visoke zastupljenosti parodontopatije i činjenicom da autori nisu naveli kriterijume isključenja iz studije, odnosno nisu kontrolisali faktore rizika koji mogu uticati na sastav plaka subgingivalne regije. U sličnoj studiji, Usin i saradnici u svojoj studiji ukazuju na povezanost prisustva parodontopatogenih bakterija u parodontalnim džepovima mladih majki sa prevremenim porođajem i rađanjem dece male telesne mase (Usin i sar. 2014). U studiji Lin i saradnika u uzorcima subgingivalnog plaka 60 porodilja, prikupljenim do tri dana nakon porođaja, dokazano je prisustvo *P.gingivalis* u većem procentu prevremeno porođenih žena u odnosu na žene porođene u terminu, što je u saglasnosti sa nalazom naše studije (Lin i sar. 2009).

Nasuprot studijama čiji su rezultati govorili u prilog povezanosti mikroorganizama subgingivalnog plaka i prevremenog porođaja, sprovedena su i istraživanja koja su opovrgnula njihove zaključke. Buduneli i saradnici u svojoj studiji su ustanovili značajno višu zastupljenost *P.gingivalis*, *A.actinomycetemcomitans*, *P.intermedia*, *P.nigrescens* i *S.intermedius* u grupi žena porođenih u terminu u porođenju sa prevremeno porođenim ženama kao i približno slične vrednosti kliničkih paramatera između ispitivanih grupa (Buduneli i sar. 2005). Navedeni rezultati su u suprotnosti sa rezultatima naše studije.

5.1. Biohemijski markeri prevremenog porođaja u gingivalnoj tečnosti i u krvi

Zajednički rezultati brojnih studija neosporno potvrđuju visoku zastupljenost parodontopatije kod prevremeno porođenih žena. Na osnovu značajnih zastupljenosti parodontopatije i parodontopatogenih bakterija i većih vrednosti merenih kliničkih parametara, pokazatelja parodontalne destrukcije, kod prevremeno porođenih žena u odnosu na žene porođene u terminu, izvedeni su zaključci o povezanosti ova dva patološka stanja. Parodontopatija se nametnula kao novi faktor rizika ovog nepovoljnog ishoda gestacije i doprinela multifaktorijalnosti sindroma prevremenog porođaja. Međutim, verifikacija ove značajne činjenice, koja je unela novine u razumevanju patogeneze prematuriteta, je zahtevala potvrdu baziranu na složenijim metodama nego što su klinički pregled parodontalnih tkiva i mikrobiološka analiza subgingivalnog plaka.

Primena imunoloških testova koji su visokospecifični i senzitivni za dato oboljenje predstavlja imperativ kojim se teži u savremenoj medicini. Najznačajniji aspekt primene ovih testova je klinička iskoristivost, koja se ogleda u ranoj dijagnostici i prevenciji mnogih patoloških stanja.

Brojne studije su, kao svoj predmet istraživanja, imale identifikaciju biohemijskih markera karakterističnih za prevremeni porođaj. S obzirom da se kao najučestalijim prekursorom prevremenog porođaja sa intaktnim plodovim membranama ili nastalog usled pPPO smatra asimptomtska intrauterina infekcija, opravdano su najčešće bili ispitivani medijatori inflamacije. Medijatori zapaljenskih i imunskih reakcija - IL-1 β , IL-6, TNF- α i PGE2 su označeni kao biohemijski markeri - pokretači prevremenog porođaja (Thorsen i sar., 2001, Peltier 2003, Menon i sar., 2011).

Zaključak nedavnog objavljenog preglednog rada, na temu povezanosti medijatora zapaljenja u gingivalnoj tečnosti i nepovoljnih ishoda trudnoće, je da pozitivna asocijacija postoji (Stadelmann i sar., 2013). Međutim, predloženo je da, usled heterogenosti dizajna studija, ova pozitivna asocijacija zahteva potvrdu i razjašnjenje u budućim studijama, sa sistematičnijim pristupom.

U skladu sa tim predlogom, naša studija je dizajnirana da sistematski pregledno ispita uticaj inflamacije u parodontijumu na četiri biohemijskih markera porođaja. Naša studija je sprovedena u jednom vremenskom periodu, u homogenoj populaciji koja je uključivala ispitanice iste etničke pripadnosti, koje su se porodile u istoj bolnici i koje su bile sličnih godina starosti. Konceptirajući studiju na taj način, eventualni uticaj ovih faktora na rezultate istraživanja je bio redukovan. Takođe, s obzirom da je klinički pregled parodontalnih tkiva ispitanica bio sproveden od strane kalibriranog istraživača parodontologa, koji nije imao podatke o ishodu porođaja ispitanica, dodatno je doprinelo reproduktivnosti i preciznosti dobijenih rezultata.

Evaluacija biohemijskih markera u gingivalnoj tečnosti često predstavlja izazov. Ovaj dijagnostički uzorak je dostupan u značajno malom volumenu i manje je koncentrovan u poređenju sa drugim telesnim tečnostima, namenjenim za analizu od strane većine komercijalnih testova. U svrhu dobijanja što preciznijih podataka o koncentracijama ispitivnih medijatora u uzorcima gingivalne tečnosti ispitanica, pažljivo smo izabrali dijagnostičke testove. Primenjeni su komercijalni ELISA testovi sa visokom senzitivnošću koji su u mogućnosti da detektuju izuzetno niske nivoe ispitivanih markera. Stopa detektibilnosti svih merenih medijatora je bila 100 %, u oba ispitavana kompartmana, što ukazuje na preciznost primenjenog protokola ove studije.

U cilju evaluacije potencijalne povezanosti između prisutne inflamacije u parodontijumu i prevremenog porođaja, primarni kriterijum za grupisanje je bio početak porođaja. Utvrdili smo da su nivoi IL-6 i PGE2 u gingivalnoj tečnosti bili signifikantno povišeni kod prevremeno porođenih žena u odnosu na žene porođene u očekivanom terminu. Nivoi ispitivanih medijatora u plazmi ispitanica nisu pokazali razliku između eksperimentalne i kontrolne grupe.

S obzirom da su dobijeni podaci ovog istraživanja pokazali nehomogenost u zastupljenosti različitih stanja tkiva parodontijuma između prevremeno porođenih žena i žena porođenih u terminu, izvršeno je podgrupisanje porodilja u odnosu na parodontalni status. Ispitnice uključene u studiju su, nezavisno od toga da li su se porodile prevremeno ili u terminu, na osnovu kliničkog pregleda parodontalnih tkiva grupisane na one sa zdravim parodontalnim tkivima, gingivitisom ili parodontopatijom. Rezultati našeg istraživanja su pokazali da su nivoi IL-1 β , IL-6, TNF- α i PGE2 u

gingivalnoj tečnosti kao i nivoi TNF- α i PGE2 u plazmi ispitanica obolelih od parodontopatije bili značajno povišeni u odnosu na ispitanice sa zdravim parodontcijumom. Pored toga, novi IL-6 i PGE2 u gingivalnoj tečnosti su bili pozitivno korelisani sa svim merenim kliničkim parametrima, dok su nivoi PGE2 u plazmi bili pozitivno korelisani sa dubinom sondiranja i nivoom pripojnog epitela. Zbog nesrazmerne distribucije različitih stanja tkiva parodontcijuma unutar osnovnih studijskih grupa, nije bilo moguće sprovesti ovu vrstu statističke analize u okviru grupa. Važno je naglasiti da je 82 % od ukupnog broja obolelih od parodontopatije pripadalo grupi prevremeno porođenih žena. Moguće objašnjenje za postizanje još značajnije statističke razlike u nivoima medijatora u gingivalnoj tečnosti i plazmi se može odnositi na efekat razblaženja 7.1 % prevremeno porođenih ispitanica sa zdravim parodontcijumom koja je smanjila ukupnu koncentraciju citokina u grupi.

U ispitivanju direktnog uticaja inflamacije u parodontcijumu na sistemska oboljenja, najpouzdaniji pokazatelj je povezanost parodontalnih kliničkih parametara sa sistemskim nivoima korespondirajućih markera inflamacije. Izvodljivost utvrđivanja ove korelacije je često otežana, pre svega zbog toga što su sistemski nivoi medijatora zapaljenskih reakcija obično uslovljeni mnogo većim stimulansom kao što je akutno ili progresivno hronično oboljenje. Uslovljeno tim, utvrđivanje znatno povišenih nivoa zapaljenskih medijatora u cirkulaciji kod sistemski zdravih ispitanika je vrlo teško. To je bio slučaj u našoj studiji, ali takodje i nehomogenost u distribuciji parodontalnog statusa kao glavno ograničenje studije je uticalo na detekciju značajne razlike u nivoima u plazmi. Medjutim, utvrđivana je pozitivna korelacija između sistemskog nivoa PGE2, koji se smatra indikatorom porođaja i rutinski se koristi u artificalnoj indukciji, i DS i NPE - pokazateljima parodontalne destrukcije. Takodje, značajno pozitivna korelacija je pokazana i između nivoa PGE2 u plazmi i nivoa TNF- α – glavnim regulatorom inflamatorne osteoklastogeneze. Navedeni rezultati ukazuju da parodontalni status može imati uticaj na cirkulišuće nivoe medijatora porođaja i participirati u započinjanju porođaja. Ova konstantacija je bazirana na osnovu predloženog indirektnog mehanizmama povezanosti parodontopatije i prevremenog porođaja (Sanz i sar. 2013). Prema ovom mehanizmu, prodor medijatora inflamacije - pokretača porođaja iz inflamiranih parodontalnih tkiva u cirkulaciju povećava ukupne nivoe već prisutnih medijatora što dovodi do postizanja njihovih kritičnih koncentracija. Na taj način

postignuta kritična koncentracija medijatora porođaja, prisutna u fetoplacentalnoj jedinici, rezultira sledstvenim započinjanjem prevremenog porođaja.

U naučnoj literaturi dostupan je ograničen broj studija koje su se bavile evaluacijom povezanosti medijatora inflamacije u gingivalnoj tečnosti i/ili u plazmi/serumu sa prevremenim porođajem.

U okviru naše studije, primenom precizno definisanih kriterijuma isključenja i uključenja u studiju, nastojali smo da izbegnemo uticaj klinički evidentno prisutne sistemske infekcije, kao i bilo kog sistemskog oboljenja/stanja koje se dovodi u vezu sa prevremenim porođajem, na njegov nastanak. Važno je istaći da su iz studije isključene i sve ispitanice sa definisanim visokim faktorima rizika za nastanak prevremenog porođaja kao što su multiple trudnoće i trudnoće začete asistiranim reproduktivnim tehnikama.

Generalno posmatrajući, rezultati naše studije su u saglasnosti sa rezultatima drugih studija koje su ispitivale nivoe medijatora zapaljenja u GT i u krvi ispitanica koje su porodile prevremeno ili u terminu.

Prva studija, koja se bavila analizom imunoloških parametara svojstvenih i parodontopatiji i prevremenom porođaju, je sprovedena od strane Offenbachera i saradnika 1998. godine (Offenbacher i sar., 1998). Ova studija preseka je uključila relativno mali uzorak, koji se sastojao od 25 porodilja koje se su prevremeno porodile i čija su novorođenčad bila male telesne mase (< 2500 g) i 15 porodilja čija su novorođenčad bila normalne telesne mase. Rezultati nevedene studije su pružili mikrobiološke i imunološke dokaze o postojanju veze između inflamacije u parodontijumu i prevremenog porođaja. Rezultati analize ispitivanih imunoloških parametara su pokazali statistički značajno povišene nivoe PGE2 u GT i povišene, ali ne i značajno, nivoe IL-1 β u GT kod eksperimentalne u odnosu na kontrolnu grupu, što je identično rezultatima naše studije.

Analiza nivoa PGE2 i IL-1 β u GT i u serumu je sprovedena i u studiji preseka na uzorku od 128 ispitanica u Poljskoj (Konopka i sar., 2003). Od ukupnog broja ispitanica uključenih u ovo istraživanje, 84 je bilo prevremeno porođeno i njihova novorođenčad su bila male telesne mase a 44 žena je porođeno u terminu i novorođenčad su bila

normalne telesne mase. Rezultati su pokazali signifikantno veću zastupljenost parodontopatije i značajno povišene nivoe PGE2 i IL-1 β u gingivalnoj tečnosti kao i PGE2 u serumu prevremeno porođenih žena u poređenju sa kontrolnom grupom. Takođe, i u drugoj studiji sa sličnim metodološkim konceptom, utvrđeni su statistički značajno povišeni novi PGE2 u GT i lošiji parodontalni status prevremeno porođenih ispitanica u porođenju sa ispitanicama porođenim u terminu (Carta i sar., 2004). Slično rezultatima navedenih studija, naši rezultati su takođe pokazali značajno povišene nivoe PGE2 i povišene ali ne i značajno nivoe IL-1 β u GT prevremeno porođenih žena u odnosu na one porođene u terminu.

Važno je istaći da su se klinički pregled parodontalnih tkiva kao i uzorkovanje gingivalne tečnosti i periferne venske krvi ispitanica u navedenim studijama sprovodili neposredno pre početka porođaja ili u periodu do tri dana nakon, što je u skladu i sa protokolom naše studije. Međutim, mogući nedostaci navedenih studija se ogledaju u :

- Izostavljanju podataka o načinu procene gestacijske starosti trudnica u cilju potvrde prevremenog porođaja
- Nekomolisanju prisutnih poznatih faktora rizika za nastanak prevremenog porođaja
- Nejasnoj definiciji oboljenja parodoncijuma u studiji Offenbachera i Carta i saradnici u svojoj studiji su primenili neadekvatne dijagnostičke metode za procenu stanja parodoncijuma (CPITN indeks)

Nasuprot rezultatima istraživanja koji su ukazivali na postojanje povezanosti povišenih nivoa biohemijskih markera prevremenog porođaja u GT i parodontopatije, Noack i saradnici u svojoj studiji zaključuju da parodontopatija nije faktor rizika za nastanak prevremenog porođaja i rađanje dece male telesne mase. Rezultati ove studije su pokazali povišene, ali ne i značajno, nivoe IL-1 β u GT u eksperimentalnoj grupi u poređenju sa kontrolnom grupom (Noack i sar., 2005).

Hasegawa i saradnici su u okviru svoje studije analizirali nivoe IL-1 β , IL-6, IL-8 i TNF- α u serumu 84 ispitanica, 40 trudnica sa dijagnozom pretećeg prevremenog porođaja i 48 trudnica sa normalnim tokom trudnoće (Hasegawa i sar., 2003). Preteći prevremeni porođaj predstavlja kliničko stanje trudnice koje se karakteriše prevremenim

kontrakcijama materice i dilatacijom i skraćenjem grlića materice. Terapijski protokol pretećeg prevremenog porođaja podrazumeva primenu antibiotika i tokolitika i ima za cilj da suprimira infekciju u organizmu i da spreči prevremene kontrakcije. Međutim, i pored primenjenih terapijskih mera, značajan procenat rezultira prevremenim porođajem. Evaluacija nivoa proinflamatornih citokina u serumu ispitanica je vršena u toku drugog trimestra trudnoće. Rezultati ovog istraživanja su pokazali da se značajan procenat trudnica koje su bile u riziku od nastanka prevremenog porođaja, i pored primenjene terapije, prevremeno porodilo (45%). Značajno povišeni serumski nivoi IL-1 β i IL-8, kao i značajno veće srednje vrednosti kliničkih parametara pokazatelja destrukcije parodontijuma (DS i NPE) su bili prisutni kod žena sa pretećim PP u odnosu na žene sa normalnom trudnoćom i terminskim porođajem.

U pilot studiji (Tarannum i sar., 2011) koja je obuhvatila 22 ispitanice, izvršena je evaluacija nivoa PGE2 u GT i u serumu, uzetim neposredno po započinjanju porođaja i jedan mesec nakon porođaja. Rezultati ovog istraživanja su pokazali da, na samom početku procesa porođaja, značajno više vrednosti PGE2 su prisutne u serumu trudnica koje su se prevremeno porodile u poređenju sa trudnicama koje su porodile u terminu. Takođe, pozitivna korelacija ali ne i statistički značajna, je utvrđena između nivoa PGE2 u GT i u serumu, što je pokazala i korelacija u našoj studiji.

U nedavno objavljenoj prospektivnoj studiji Stadelmanna i saradnika (Stadelmann i sar., 2014), ispitivani su nivoi IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 i C-reaktivnog proteina (CRP) u GT žena sa prevremenim prematurnim prsnućem plodovih ovojnica (PPPOP) i žena sa nekomplikovanim trudnoćama. Nivoi citokina i CRP su ispitivani u različitim vremenskim periodima, između 20 i 35 nedelje trudnoće, do 48 časova nakon porođaja i 4-6 nedelja nakon porođaja. Rezultati su pokazali izraženiju inflamaciju parodontijuma kod žena sa PPPOP koja se smanjivala tokom vremena u obe studijske grupe. U periodu do 48 h nakon porođaja nivoi IL-1 β , IL-8 i CRP bili viši u kontrolnoj u odnosu na eksperimentalnu grupu. Rezultati ove studije su u suprotnosti sa rezultatima naše i većine studija koja se bavile uticajem proinflamatornih citokina na prevremeni porođaj.

5.2. Očekivani naučni doprinos

S obzirom da naša studija predstavlja jednu od malobrojnih studija koje su analizirale nivoe medijatora zapaljenskih reakcija, prisutnih lokalno u GT i sistemski u krvi porodilja, daje doprinos obogaćivanju znanja u oblasti prevremenog porođaja, parodontalne i medicine uopšte. Prema našim saznanjima, ovo je prva studija koja je analizirala nivoe četiri medijatora zapaljenski i imunskih reakcija u GT i u krvi, a koja je u okviru svog metodološkog koncepta isključila uticaj poznatih faktora rizika za prevremeni porođaj. Ovo istraživanje je pokazalo da su prevremeno porođene žene imale značajno veću zastupljenost parodontopatije, veće vrednosti svih merenih kliničkih parametara i povišene nivoe PGE2 i IL-6 u gingivalnoj tečnosti u poređenju sa ženama porođenim u terminu. Takođe, i pored toga što nivoi medijatora u plazmi nisu pokazali značajnu razliku između TP i PP grupe, važno je naglasiti da su ustanovljeni značajno povišeni nivoi TNF- α i PGE2 u plazmi porodilja obolelih od parodontopatije u poređenju sa onima sa zdravim parodontacijumom kao i i značajno pozitivna korelacija nivoa PGE2 u plazmi sa DS, NPE i GI i nivoom TNF- α u GT.

Parodontopatija, koje se ubraja u najzastupljenije bolesti današnjice, je multifaktorijalne prirode kao i prevremeni porođaj. Parodontopatija je hronično inflamatorno oboljenje i prevremeni porođaj u najvećem broju slučajeva ima inflamatornu etiopatogenezu. Možemo zaključiti da je inflamatorna komponenta zajednička nit koja povezuje ova dva patološka stanja. Infekcija parodontalnih tkiva može predstavljati značajan izvor medijatora inflamacije i lokalno i sistemski, što smo i potvrdili u ovoj studiji. Rezultati našeg istraživanja ukazuju na mogući uticaj parodontopatije, kao udaljene infekcije u organizmu, na povišenje nivoa medijatora inflamacije koji su ujedno i biohemijski markeri porođaja.

Dakle, povezanost parodontopatije i prevremenog porođaja se ogleda u istim, identifikovanim biohemijskim markerima svojstvenim ovim patološkim stanjima i zajedničkim faktorima rizika. U skladu sa činjenicom da i u odsustvu mnogobrojnih, definisanih faktora rizika u značajnom procentu (50%) dolazi do prematuriteta, parodontopatija se sve više nameće kao udaljena infekcija odnosno mogući izvor medijatora zapaljenja.

Imajući u obzir da se procenjuje globalno povećanje prevalence parodontopatije u narednom periodu (Kassebaum i sar., 2014), primena preventivnih mera u cilju očuvanja zdravlja kao i kontrola zapaljenja parodontalnih tkiva u toku trudnoće je od izuzetnog značaja. Sve veći broj studija predlažu primenu adekvatnog parodontalnog tretmana u toku trudnoće u cilju smanjenja rizika za nastanak prevremenog porođaja (Lopez i sar.,2015).

Da bi se utvrdio tačan patogenetski mehanizam povezanosti prevremenog porođaja i inflamacije u parodoncijumu, neophodne su dobro dizajnirane prospektivne studije sa velikim brojem ispitanica i parodontalnim statusom kao primarnim kriterijumom uključenja u studiju.

Potencijalni klinički značaj odnosno klinička iskoristivost našeg istraživanja se ogleda u tome da određivanje nivoa pro-inflamatornih citokina i PGE2 u gingivalnoj tečnosti i u krvi trudnica može predstavljati dijagnostičku proceduru korisnu u identifikaciji trudnica u riziku od pretećeg prevremenog porođaja.

Rana dijagnostika pretećeg prevremenog porođaja bi omogućila pravovremenu primenu odgovarajućeg terpijskog protokola u cilju odlaganja porođaja do postizanja intrauterine zrelosti fetusa i rađanja dece normalne telesne mase. Imperativ kojim se teži u obstetričkoj medicini je smanjenje stope prematuriteta i svih posledica koje sa sobom nosi ovaj vodeći problem u akušerstvu. I pored toga što je u stranoj naučnoj literaturi parodontopatija deklarirana kao visok faktor rizika za nastanak prevremenog porođaja, tačan patogenetski mehanizam povezanosti ova dva stanja i dalje je nedovoljno razjašnjen.

6. ZAKLJUČCI

Na osnovu rezultata dobijenih ispitivanjem nivoa IL-1 β , IL-6, TNF- α i PGE2 u gingivalnoj tečnosti i u perifernoj venskoj krvi kod prevremeno porođenih žena i žena porođenih u terminu mogu se izvesti sledeći zaključci:

- Nivoi PGE2 i IL-6 u gingivalnoj tečnosti su bili značajno povišeni kod prevremeno porođenih žena u odnosu na žene porođene u terminu. Nivoi IL-1 β i TNF- α u gingivalnoj tečnosti, kao i nivoi svih evaluiranih medijatora zapaljenja u perifernoj venskoj krvi nisu pokazali značajnu razliku između ispitivanih grupa.
- Nivoi IL-1 β , IL-6 i PGE2 u gingivalnoj tečnosti su bili značajno povišeni kod ispitanica obolelih od parodontopatije u odnosu na one sa klinički zdravim parodoncijumom. U gingivalnoj tečnosti ispitanica sa gingivitisom značajno su bili povišeni nivoi IL-1 β , IL-6, TNF- α u odnosu na ispitanice sa klinički zdravim parodoncijumom. Poredeći navedene medijatore između ispitanica sa gingivitisom i ispitanica sa klinički zdravim parodoncijumom nije nađena statistička značajnost. Procentualna zastupljenost pojedinih stanja parodoncijuma - parodontopatije, gingivitisa i zdravih parodontalnih tkiva u naših ispitanica porođenih u terminu je bila 14.3%, 32.1% i 53.6%, a u prevremeno porođenih ispitanica 64.3%, 28.6% i 7.1%.
- Od ispitivanih medijatora zapaljenja u perifernoj venskoj krvi nivoi TNF- α i PGE2 su bili značajno veći u ispitanica obolelih od parodontopatije u odnosu na ispitanice sa klinički zdravim parodoncijumom. Nivoi medijatora zapaljenja u krvi se nisu značajno razlikovali kada smo poredili njihove vrednosti između ispitanica sa gingivitisom i onih sa zdravim parodoncijumom, kao ni između ispitanica obolelih od parodontopatije i onih sa gingivitisom.

- *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* i *Treponema denticola* su bile zastupljene u većem procentu uzoraka subgingivalnog plaka prevremeno porođenih žena u odnosu na njihovu zastupljenost u uzorcima subgingivalnog plaka žena porođenih u terminu. Zastupljenost bakterije *P.intermedia* u subgingivalnom plaku se nije razlikovala između prevremeno porođenih žena i žena porođenih u terminu.
- *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* i *Treponema denticola* su bile zastupljenije u većem procentu uzoraka subgingivalnog plaka ispitanica obolelih od parodontopatije u odnosu na uzorke subgingivalnog plaka ispitanica sa gingivitisom, kao i u odnosu na ispitanice sa klinički zdravim parodontcijumom. Procenat uzoraka subgingivalnog plaka sa prisutnim navedenim mikroorganizmima se nije značajno razlikovao između ispitanica obolelih od parodontopatije i ispitanica sa gingivitisom. *P.intermedia* je bila zastupljenija u većem procentu uzoraka ispitanica sa klinički zdravim parodontcijumom u odnosu na na ispitanice sa gingivitisom. Zastupljenost *P.intermedia* u subgingivalnom plaku ispitanica obolelih od parodontopatije se nije značajno razlikovala u odnosu na ispitanice sa gingivitisom, kao i ni u odnosu na ispitanice sa klinički zdravim parodontcijumom.
- Komparativnom analizom u ovoj studiji ustanovili smo da su prevremeno porođene žene imale značajno veću zastupljenost parodontopatije, veće vrednosti svih kliničkih parametara stanja parodontcijuma i više nivoe PGE2 i IL-6 u gingivalnoj tečnosti u poređenju sa ženama porođenim u terminu. Takođe, ova studija je pokazala da su u plazmi ispitanica obe grupe obolelih od parodontopatije ustanovljeni povišeni nivoi PGE2 i TNF- α u porođenju sa ispitanicama sa zdravim parodontalnim tkivima.

Rezultati ove studije ukazuju na potencijalni uticaj parodontopatije na povišenje nivoa medijatora zapaljenja koji su ujedno i biohemijski markeri porođaja.

7. LITERATURA

Agueda A, Ramon JM, Manau C, Guerrero A, Echeverria JJ (2008). Periodontal disease as a risk factor for adverse pregnancy outcomes: a prospective cohort study. *J Clin Periodontol*; 35: 16–22.

Africa CW (2011). Oral colonization of Gram-negative anaerobes as a risk factor for preterm birth. *Virulence*; 2: 498-508.

Aimetti M, Perotto S, Castiglione A, Mariani GM, Ferrarotti F, Romano F (2015). Prevalence of periodontitis in an adult population from an urban area in North Italy: findings from a cross-sectional population-based epidemiological survey. *J Clin Periodontol*. doi: 10.1111/jcpe.12420.

Albandar JM, Tinoco EMB (2002). Global epidemiology of periodontal diseases in children and young persons. *Periodontol 2000*, 29: 153–176

Al-Harathi LS, Cullinan MP, Leichter JW, Thomson WM (2013). The impact of periodontitis on oral health-related quality of life: a review of the evidence from observational studies. *Aust. Dent. J.* 58: 274–277.

Ananth CV, Vintzileos AM (2006). Epidemiology of preterm birth and its clinical subtypes. *J Matern Fetal Neonatal Med*; 19: 773-82.

Armitage GC (1999). Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Annals of Periodontology* 4: 1–6.

Asikainen S. Occurrence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and spirochetes in relation to age in localized juvenile periodontitis (1986). *J Periodontol*; 57(9): 537-41.

Bearfield C, Davenport ES, Sivapathasundaram V, Allaker RP (2002). Possible association between amniotic fluid micro-organism infection and microflora in the mouth. *BJOG*; 109(5): 527-33.

Beck J, Garcia R, Heiss G, Vokonas PS, Offenbacher S (1996). Periodontal disease and cardiovascular disease. *J Periodontol*; 67:1123-1137.

Besedovsky HO, del Rey A (1996). Immune-neuro-endocrine interactions: facts and hypotheses. *Endocr Rev*;17(1):64-102.

Blencowe H, Cousens S , Chou D , Oestergaard M , Say L , Moller AB , Kinney M, Lawn J (2013). Born Too Soon: The global epidemiology of 15 million preterm births. *Reproductive Health*, 10(Suppl 1):S2. doi:10.1186/1742-4755-10-S1-S2

Bosnjak A, Relja T, Vucicevic-Boras V, Plasaj H, Plancak D (2006). Pre-term delivery and periodontal disease: a case-control study from Croatia. *J Clin Periodontol*; 33: 710–716.

Brouwer A, Groenendaal F, van Haastert IL, Rademaker K, Hanlo P, de Vries L (2008). Neurodevelopmental outcome of preterm infants with severe intraventricular hemorrhage and therapy for post-hemorrhagic ventricular dilatation. *J Pediatr*; 152(5): 648-654

Brown LJ, Loe H (1993). Prevalence, extent, severity and progression of periodontal disease. *Periodontol 2000*, 2: 57–71.

Buduneli N, Baylas H, Buduneli E, Türkoğlu O, Köse T, Dahlen G (2005). Periodontal infections and pre-term low birth weight: a case-control study. *J Clin Periodontol*; 32(2): 174-81.

Carta G, Persia G, Falciglia K, Iovenitti P (2004). Periodontal disease and poor obstetrical outcome. *Clin Exp Obstet Gynecol*; 31(1): 47–49.

Casey ML, Cox SM, Beutler B, Milewich L, MacDonald PC (1989). Cachectin/Tumor Necrosis factor- α formation in human decidua - potential role of cytokines in Infection-induced preterm labor. *J Clin Invest*; 83: 430-436.

Cekici A, Kantarci A, Hasturk H, Van Dyke TE (2014). Inflammatory and immune pathways in the pathogenesis of periodontal disease. *Periodontology 2000*; 64: 57–80.

Cerajewska TL, Davies M, West NX (2015). Periodontitis: a potential risk factor for Alzheimer's disease. *Br Dent J*; 218(1): 29-34.

Chaim W, Mazor M, Leiberman JR (1997). The relationship between bacterial vaginosis and preterm birth. A review. *Arch Gynecol Obstet*; 259(2): 51-58.

Challis JR (2001). Understanding pre-term birth. *Clin Invest Med*; 24: 60–7.

Chang HH, Larson J, Blencowe H, Spong CY, Howson CP, Cairns-Smith S, et al. (2013) Preventing preterm births: analysis of trends and potential reductions with interventions in 39 countries with very high human development index. *Lancet*, 381: 223–234.

Chávarry NGM, Vettore MV, Sansone C, Sheiham A (2009). The relationship between diabetes mellitus and destructive disease: a meta-analysis. *Oral Health Prev Dent*; 7: 107-127.

Choi BK, Moon SY, Cha JH, Kim KW, Yoo YJ (2005). Prostaglandin E(2) is a main mediator in receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand-dependent osteoclastogenesis induced by *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, and *Treponema socranskii*. *J Periodontol*; 76(5): 813-20.

Christiaens I, Zaragoza DB, Guilbert L, Robertson SA, Mitchell BF, Olson DM (2008). Inflammatory processes in preterm and term parturition. *J Reprod Immunol*; 79 (1): 50–57.

Cochran DL (2008). Inflammation and bone loss in periodontal disease. *J Periodontol*; 79(8 Suppl): 1569-76.

Collins JG, Smith MA, Arnold RR, Offenbacher S (1994). Effects of *Escherichia coli* and *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide on pregnancy outcome in the golden hamster. *Infect Immun*; 62(10): 4652–4655.

Collins JG, Windley HW 3rd, Arnold RR, Offenbacher S (1994). Effects of a *Porphyromonas gingivalis* infection on inflammatory mediator response and pregnancy outcome in hamsters. *Infect Immun*; 62(10): 4356–4361.

Goepfert AR, Goldenberg RL, Andrews WW et al (2001). The Preterm Prediction Study: association between cervical interleukin 6 concentration and spontaneous preterm birth. National Institute of Child Health and Human Development Maternal-Fetal Medicine Units Network. *Am J Obstet Gynecol*; 184(3): 483-8.

Copper RL, Goldenberg RL, Das A (1996). The preterm prediction study: maternal stress is associated with spontaneous preterm birth at less than thirty-five weeks' gestation. National Institute of Child Health and Human Development Maternal-Fetal Medicine Units Network. *Am J Obstet Gynecol*; 175:1286-92.

Gulati M, Anand V, Jain N, Anand B, Bahuguna R, Govila V, Rastogi P (2013). Essentials of periodontal medicine in preventive medicine. *Int J Prev Med*; 4(9): 988-94.

Cullinan MP, Hamlet SM, Westerman B, Palmer JE, Faddy MJ, Seymour GJ (2003). Acquisition and loss of *Porphyromonas gingivalis*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Prevotella intermedia* over a 5-year period: effect of a triclosan/copolymer dentifrice. *J Clin Periodontol*; 30(6): 532-41.

D'Aiuto F, Orlandi M, Gunsolley JC (2013). Evidence that periodontal treatment improves biomarkers and CVD outcomes. *J Clin Periodontol*. 40 (suppl. 14): S85–S105.

Dahlén G, Wikström M, Renvert S, Gmür R, Guggenheim B (1990). Biochemical and serological characterization of *Bacteroides intermedius* strains isolated from the deep periodontal pocket. *J Clin Microbiol*; 28(10): 2269-74.

Davenport ES (2010). Preterm low birthweight and the role of oral bacteria. *J Oral Microbiol*; 2: 10.3402/jom.v2i0.5779.

Dentino A, Lee S, Mailhot J, Hefti AF (2013). Principles of Periodontology. *Periodontol 2000*; 61: 16–53.

Dinarello CA (1988). Interleukin-1. *Dig Dis Sci*; 33(3 Suppl):25S-35S.

Dörtbudak O, Eberhardt R, Ulm M, Persson GR (2005). Periodontitis, a marker of risk in pregnancy for preterm birth. *J Clin Periodontol*. 32(1):45-52.

Dye BA (2012). Global periodontal disease epidemiology. *Periodontol 2000*; 58: 10–25.

Dzink JL, Socransky SS, Ebersole JL, Frey DE (1983). ELISA and conventional techniques for identification of black-pigmented *Bacteroides* isolated from periodontal pockets. *J Periodontal Res*. 1983 Jul;18(4):369-74.

Ercan E, Eratalay K, Deren O, Gur D, Ozyuncu O, Altun B, Kanli C, Ozdemir P, Akincibay H (2013). Evaluation of periodontal pathogens in amniotic fluid and the role of periodontal disease in pre-term birth and low birth weight. *Acta Odontol Scand*. 71(3-4):553-9

Fives-Taylor PM, Meyer DH, Mintz KP, Brissette C (1999). Virulence factors of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Periodontol 2000*; 20: 136-67.

Foschino Barbaro MP, Carpagnano GE, Spanevello A, Cagnazzo MG, Barnes PJ (2007). Inflammation, oxidative stress and systemic effects in mild chronic obstructive pulmonary disease. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 20(4):753-63.

Friedewald VE, Kornman KS, Beck JD, Genco R, Goldfine A, Libby P, Offenbacher S et al (2009). The American Journal of Cardiology and Journal of Periodontology Editors' Consensus: Periodontitis and Atherosclerotic Cardiovascular Disease. *Journal of Periodontology.* 80(7):1021-1032.

Ganzetti G, Campanati A, Santarelli A, Pozzi V, Molinelli E, Minnetti I, Brisigotti V, Procaccini M, Emanuelli M, Offidani A (2014). Periodontal disease: an oral manifestation of psoriasis or an occasional finding? *Drug Dev Res.* 75 Suppl 1:S46-9.

Geismar K, Enevold C, Sørensen LK, Gyntelberg F, Bendtzen K, Sigurd B, Holmstrup P (2008). Involvement of interleukin-1 genotypes in the association of coronary heart disease with periodontitis. *J Periodontol.* 79(12):2322-30

Gemmell E, Marshall RI, Seymour GJ (1997). Cytokines and prostaglandins in immune homeostasis and tissue destruction in periodontal disease. *Periodontol* 2000;14: 112-143.

Genco RJ (1992). Host responses in periodontal diseases: current concepts. *J Periodontol*; 63(4 Suppl): 338-55.

Giannella L, Giulini S, Cerami LB, La Marca A, Forabosco A, Volpe A (2011). Periodontal disease and nitric oxide levels in low risk women with preterm labor. *European Journal of Obstetrics Gynecology and Reproductive Biology* 158, 47–51.

Gibbs RS, Romero R, Hillier SL, Eschenbach DA, Sweet RL (1992). A review of premature birth and subclinical infection. *Am J Obstet Gynecol.* 166(5):1515-28.

Gyomorey S, Lye SJ, Gibb W, Challis JR (2000). Fetal-to-maternal progression of prostaglandin H(2) synthase-2 expression in ovine intrauterine tissues during the course of labor. *Biol Reprod.* 62(3):797-805.

Goncalves LF, Chaiworapongsa T, Romero R (2002). Intrauterine infection and prematurity. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev*; 8:3–13

Graves D (2008). Cytokines that promote periodontal tissue destruction. *J Periodontol* 79(8 Suppl):1585–1591

Grossi SG, Genco RJ (1998). Periodontal disease and diabetes mellitus: A two-way relationship. *Ann Periodontol*; 3: 51-61.

Greig PC, Murtha AP, Jimmerson CJ, Herbert WN, Roitman-Johnson B, Allen J (1997). Maternal serum interleukin-6 during pregnancy and during term and preterm labor. *Obstet Gynecol*; 90(3):465-9.

Gücer F, Balkanlı-Kaplan P, Yüksel M, Yüce MA, Türe M, Yardim T (2001). Maternal serum tumor necrosis factor-alpha in patients with preterm labor. *J Reprod Med*; 46(3): 232-6.

Gürsoy M, Kononen E, Gürsoy UK, Tervahartiala T, Pajukanta R, Sorsa T (2010). Periodontal status and neutrophilic enzyme levels in gingival crevicular fluid during pregnancy and postpartum. *J Periodontol*; 81:1790–1796.

Gürsoy M, Haraldsson G, Hyvönen M, Sorsa T, Pajukanta R, Könönen E (2009). Does the frequency of *Prevotella intermedia* increase during pregnancy? *Oral Microbiol Immunol*; 24: 299-303.

Gürsoy M, Pajukanta R, Sorsa T, Könönen E (2008). Clinical changes in periodontium during pregnancy and post-partum. *J Clin Periodontol*; 35: 576-583.

Gürsoy M, Kononen E, Gürsoy UK, Tervahartiala T, Pajukanta R, Sorsa T. (2010) Periodontal status and neutrophilic enzyme levels in gingival crevicular fluid during pregnancy and postpartum. *J Periodontol*; 81: 1790–1796.

Goldenberg RL, Hauth JC, Andrews WW (2002). Intrauterine infection and preterm delivery. *N Engl J Med*; 342: 1500–1507.

Gomes-Filho IS, Cruz SS, Rezende EJ, Dos Santos CA, Soledade KR, Magalhaes MA, de Azevedo AC, Trindade SC, Vianna MI, Passos JS, Cerqueira EM (2007). Exposure measurement in the association between periodontal disease and prematurity/low birth weight. *J Clin Periodontol*; 34: 957–963.

Gulati M, Anand V, Jain N, Anand B, Bahuguna R, Govila V, Rastogi P (2013). Essentials of periodontal medicine in preventive medicine. *Int J Prev Med*; 4(9): 988-94.

Haram K, Mortensen JH, Wollen AL (2003). Preterm delivery: an overview. *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica* 82: 687–704.

Hasegawa K, Furuichi Y, Shimotsu A, Nakamura M, Yoshinaga M, Kamimoto M, Hatae M, Maruyama I, Izumi Y (2003). Associations between systemic status, periodontal status, serum cytokine levels, and delivery outcomes in pregnant women with a diagnosis of threatened premature labor. *J Periodontol*; 74:1764-1770.

Heasman PA, Collins JG, Offenbacher S (1993). Changes in crevicular fluid levels of interleukin-1 beta, leukotriene B₄, prostaglandin E₂, thromboxane B₂ and tumour necrosis factor alpha in experimental gingivitis in humans. *J Periodontal Res*; 28(4):241–247.

Helmer H, Tretzmüller U, Brunbauer M, Kaider A, Husslein P, Knöfler M (2002). Production of oxytocin receptor and cytokines in primary uterine smooth muscle cells cultivated under inflammatory conditions. *J Soc Gynecol Investig*; 9(1): 15-21.

Hillier SL, Witkin SS, Krohn MA, Watts DH, Kiviat NB, Eschenbach DA (1993). The relationship of amniotic fluid cytokines and preterm delivery, amniotic fluid infection, histologic chorioamnionitis, and chorioamnion infection. *Obstet Gynecol*; 81(6): 941-8.

Hillier SL, Krohn MA, Rabe LK, Klebanoff SJ, Eschenbach DA (1993). The normal vaginal flora, H₂O₂-producing lactobacilli, and bacterial vaginosis in pregnant women. *Clinical Infectious Diseases*; 16: S273–S281.

Hitti J, Tarczy-Hornoch P, Murphy J, Hillier SL, Aura J, Eschenbach DA (2001). Amniotic fluid infection, cytokines, and adverse outcome among infants at 34 weeks' gestation or less. *Obstet Gynecol*; 98(6): 1080-8.

Holt SC, Ebersole JL (2005). *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, and *Tannerella forsythia*: the "red complex", a prototype polybacterial pathogenic consortium in periodontitis. *Periodontol 2000*; 38:72-122.

Horii Y, Muraguchi A, Suematsu S, Matsuda T, Yoshizaki K, Hirano T, Kishimoto T (1988). Regulation of BSF-2/IL-6 production by human mononuclear cells. Macrophage-dependent synthesis of BSF-2/IL-6 by T cells. *J Immunol*; 141(5): 1529-35.

Hu FB, Meigs JB, Li TY, Rifai N, Manson JE (2004). Inflammatory markers and risk of developing type 2 diabetes in women. *Diabetes*; 53(3): 693-700.

Hugoson A (1970). Gingival inflammation and female sex hormones. A clinical investigation of pregnant women and experimental studies in dogs. *J Periodontal Res*; 5(Suppl.): 1-18.

Ide M, Papapanou PN (2013). Epidemiology of association between maternal periodontal disease and adverse pregnancy outcomes – systematic review. *J Clin Periodontol*; 40 (suppl. 14): S181–S194.

Iliodromiti Z, Antonakopoulos N, Sifakis S, Tsikouras P, Daniilidis A, Dafopoulos K, Botsis D, Vrachnis N (2012). Endocrine, paracrine, and autocrine placental mediators in labor. *Hormones (Athens)*;11(4):397-409.

Inglis SR (1997). Biochemical markers predictive of preterm delivery. *Infect Dis Obstet Gynecol*; 5: 158–164.

Jackson RA, Gibson KA, Wu YW, Croughan MS (2004). Perinatal outcomes in singletons following in vitro fertilization: a meta-analysis. *Obstet Gynecol*; 103(3): 551-63.

Jarjoura K, Devine PC, Perez-Delboy A, Herrera-Abreu M, D'Alton M, Papapanou PN (2005). Markers of periodontal infection and preterm birth. *Am J Obstet Gynecol*; 192(2): 513-9.

Jeffcoat MK, Geurs NC, Reddy MS, Cliver SP, Goldenberg RL, Hauth JC (2001). Periodontal infection and preterm birth: results of a prospective study. *J Am Dent Assoc*; 132(7): 875-80.

Jun JK, Yoon BH, Romero R, Kim M, Moon JB, Ki SH, Park JS (2000). Interleukin 6 determinations in cervical fluid have diagnostic and prognostic value in preterm premature rupture of membranes. *Am J Obstet Gynecol*; 183(4): 868-73

Kaplan JB, Perry MB, Maclean LL, Furgang D, Wilson ME, Fine DH (2001). Structural and genetic analyses of O-polysaccharide from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotype f. *Infect Immun*. 69: 5375–5384.

Kase JS, Visintainer P (2007). The relationship between congenital malformations and preterm birth. *J Perinat Med*; 35(6): 538-42.

Kassebaum NJ, Bernabé E, Dahiya M, Bhandari B, Murray CJ, Marcenes W (2014). Global burden of severe periodontitis in 1990-2010: a systematic review and meta-regression. *J Dent Res*; 93(11): 1045-1053.

Khader Y, Al shishani L, Obeidat B, Khassawneh M, Burgan S, Amarin ZO, Alomari M, Alkafajei A (2009). Maternal periodontal status and preterm low birth weight delivery: a case-control study. *Archives of Gynecology and Obstetrics*; 279: 165–169.

Khalesi N, Shariat M, Fallahi M, Rostamian G (2015). Evaluation of risk factors for retinopathy in preterm infant: a case-control study in a referral hospital in Iran. *Minerva Pediatr*; 67(3): 231-7.

Kholy KE, Genco RJ, Van Dyke TE (2015). Oral infections and cardiovascular disease. *Trends Endocrinol Metab*. doi: 10.1016/j.tem.2015.03.001.

Kiili M, Cox SW, Chen HY, Wahlgren J, Maisi P, Eley BM, Salo T, Sorsa T (2002). Collagenase-2 (MMP-8) and collagenase-3 (MMP-13) in adult periodontitis: molecular forms and levels in gingival crevicular fluid and immunolocalisation in gingival tissue. *J Clin Periodontol*; 29(3) :224-32.

Konopka T, Rutkowska M, Hirnle L, Kopec W, Karolewska E (2003). The secretion of prostaglandin E2 and interleukin 1-beta in women with periodontal diseases and preterm low-birth-weight. *Bull Group Int Rech Sci Stomatol Odontol*; 45(1):18–28.

Kornman KS, Loesche WJ (1982). Effects of estradiol and progesterone on *Bacteroides melaninogenicus* and *Bacteroides gingivalis*. *Infect Immun*; 35: 256-263.

Koziel J, Mydel P, Potempa J (2014). The link between periodontal disease and rheumatoid arthritis: an updated review. *Curr Rheumatol Rep*; 16(3): 408 doi: 10.1007/s11926-014-0408-9

Kubota T, Itagaki M, Hoshino C, Nagata M, Morozumi T, Kobayashi T, Takagi R, Yoshie H (2008). Altered gene expression levels of matrix metalloproteinases and their inhibitors in periodontitis-affected gingival tissue. *J Periodontol*; 79(1): 166-73.

Lawn JE, Kerber K, Enweronu-Laryea C, Cousens S (2010). 3.6 million neonatal deaths - what is progressing and what is not? *Semin Perinatol*; 34:371-386.

Le HT, Jareinpituk S, Kaewkungwal J, Pitiphat W (2007). Increased risk of preterm birth among non- smoking, non- alcohol drinking women with maternal periodontitis. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*; 38(3): 586-93.

Leitich H, Bodner-Adler B, Brunbauer M, Kaider A, Egarter C, Husslein P (2003). Bacterial vaginosis as a risk factor for preterm delivery: a meta-analysis. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 189: 139–147

Lettieri L, Vintzileos AM, Rodis JF, Albin SM, Salafia CM (1993). Does "idiopathic" preterm labor resulting in preterm birth exist? *Am J Obstet Gynecol*; 168(5): 1480–5.

Lin D, Smith MA, John Elter J, Champagne C, Downey CL, Beck J, Offenbacher S (2003). Porphyromonas gingivalis Infection in Pregnant Mice Is Associated with Placental Dissemination, an Increase in the Placental Th1/Th2 Cytokine Ratio, and Fetal Growth Restriction *Infect Immun*; 71(9): 5163–5168.

Lin Y, Tian ZR, Chen HB, Tai BJ, Jiang H, Du MQ (2009). Study on maternal periodontal diseases of the relationships between porphyromonas gingivalis, serum pro-inflammatory mediators and preterm low birth weight. *Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi*; 27(6): 595-8.

Liu YCG, Lerner UH, Teng YTA (2010). Cytokine responses against periodontal infection: protective and destructive roles. *Periodontology 2000*; 52: 163–206

López NJ, Smith PC, Gutierrez J (2002). Higher risk of preterm birth and low birth weight in women with periodontal disease. *Journal of Dental Research*; 81: 58–63.

López NJ, Uribe S, Martinez B (2015). Effect of periodontal treatment on preterm birth rate: a systematic review of meta-analyses. *Periodontol 2000*; 67(1): 87-130.

Löe H, Silness J (1963). Periodontal disease in pregnancy. *Acta Odontologica Scandinavica*; Vol. 21, pp. 533-551.

Löe H, Brown LJ (1991) Early onset periodontitis in the United States of America. *J Periodontol*; 62(10): 608-16.

Lourenço TGB, Heller D, Silva-Boghossian CM, Cotton SL, Paster BJ, Colombo APV (2014). Microbial signature profiles of periodontally healthy and diseased patients. *J Clin Periodontol*; 41: 1027–1036.

Madianos PN, Lief S, Murtha AP, Boggess KA, Auten RL Jr, Beck JD, Offenbacher S (2001). Maternal periodontitis and prematurity. Part II: Maternal infection and fetal exposure. *Ann Periodontol*; 6(1): 175-82.

Madianos PN, Bobetsis YA, Offenbacher S (2013). Adverse pregnancy outcomes (APOs) and periodontal disease: pathogenic mechanisms. *J Clin Periodontol*; 84(4Suppl.): S170-S180.

Martius J, Eschenbach DA (1990). The role of bacterial vaginosis as cause of amniotic fluid infection. Chorioamnionitis and prematurity - a review. *Arch Gynecol Obstet*; 247(1): 1–13.

McCormick MC (1985). The contribution of low birth weight to infant mortality and childhood morbidity *N Engl J Med*; 312: 82–90

McDonald HM, O'Loughlin JA, Vigneswaran R, Jolley PT, McDonald PJ (1994). Bacterial vaginosis in pregnancy and efficacy of short-course oral metronidazole treatment: a randomized controlled trial. *Obstet Gynecol*; 84:343-8.

Menon R, Torloni MR, Voltolini C, Torricelli M, Merialdi M, Betran AP, Widmer et al. (2011). Biomarkers of spontaneous preterm birth: An overview of the literature in the last four decades. *Reproductive Sciences*; 18 (11): 1046-1070.

Meikle MC, Atkinson SJ, Ward RV, Murphy G, Reynolds JJ (1989). Gingival fibroblasts degrade type I collagen films when stimulated with tumor necrosis factor and interleukin 1: evidence that breakdown is mediated by metalloproteinases. *J Periodontal Res*; 24(3): 207-13.

Moore WE, Holdeman LV, Cato EP, Smibert RM, Burmeister JA, Palcanis KG, Ranney RR (1985). Comparative bacteriology of juvenile periodontitis. *Infect Immun*; 48: 507–19.

Mumghamba EG, Manji KP (2007). Maternal oral health status and preterm low birth weight at Muhimbili National Hospital, Tanzania: a case-control study. *BMC Oral Health*; 7: 8.

Nagasawa T, Kiji M, Yashiro R, Hormdee D, Lu H, Kunze M et al (2007). Roles of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand (RANKL) and osteoprotegerin in periodontal health and disease. *Periodontology 2000*; 43: 65–84.

Nakashima T, Kobayashi Y, Yamasaki S, Kawakami A, Eguchi K, Sasaki H, Sakai H. (2000). Protein expression and functional difference of membrane-bound and soluble receptor activator of NF-kappaB ligand: modulation of the expression by osteotropic factors and cytokines. *Biochemical and Biophysical Research Communications*; 275: 768–775.

Newman MG, Grinenco V, Weiner M, Angel I, Karge H, Nisengard R (1978). Predominant microbiota associated with periodontal health in the aged. *J Periodontol*; 49: 553–9.

Noack B, Klingenberg J, Weigelt J, Hoffmann T (2005). Periodontal status and preterm low birth weight: a case control study. *J Periodontal Res*; 40(4): 339–345.

Novak MJ (1999). Necrotizing ulcerative periodontitis. *Ann Periodontol*; 4(1): 74-8.

Novy MJ, Liggins GC (1980). Role of prostaglandins, prostacyclin, and thromboxanes in the physiologic control of the uterus and in parturition. *Semin Perinatol*; 4(1): 45-66.

Nunes F, Rodrigues R, Meirinho M (1999). Randomized comparison between intravaginal misoprostol and dinoprostone for cervical ripening and induction of labor. *Am J Obstet Gynecol*; 181:626-9.

Offenbacher S, Odle BM, Green MD, Mayambala CS, Smith MA, Fritz ME, van Dyke TE, Yeh KC, Sena FJ (1990). Inhibition of human periodontal prostaglandin E2 synthesis with selected agents. *Agents Actions*; 29(3-4): 232-8.

Offenbacher S, Katz V, Fertik G, Collins J, Boyd D, Maynor G, McKaig R, Beck J (1996). Periodontal infection as a possible risk factor for preterm low birth weight. *J Periodontol*; 67(10 Suppl): 1103-13

Offenbacher S, Jared HL, O'Reilly PG, Wells SR, Salvi GE, Lawrence HP, Socransky SS, Beck JD (1998). Potential pathogenic mechanisms of periodontitis associated pregnancy complications. *Ann Periodontol*; 3(1): 233–250.

Offenbacher S, Boggess KA, Murtha AP, Jared HL, Lieff S, McKaig RG, Mauriello SM, Moss KL, Beck JD (2006). Progressive periodontal disease and risk of very preterm delivery. *Obstet Gynecol*; 107(1): 29-36.

Olson DM (2003). The role of prostaglandins in the initiation of parturition. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*; 17(5) : 717–730.

Olson DM, Ammann C (2007). Role of the prostaglandins in labour and prostaglandin receptor inhibitors in the prevention of preterm labour. *Front Biosci*; 12: 1329-43.

O'Neil TC (1979). Plasma female sex-hormone levels and gingivitis in pregnancy. *J Periodontol*. 50:279-282.

Öztekin G, Baser U, Kucukcoskun M, Tanrikulu-Kucuk S, Ademoglu E, Isik G, Ozkan G, Yalcin F, Kiyani E (2014). The association between periodontal disease and chronic obstructive pulmonary disease: a case control study. *COPD*; 11(4): 424-30.

Page RC (1991). The role of inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontal disease. *J Periodontal Res*; ;26(3 Pt 2):230-42.

Page RC, Kornman KS (1997). The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. *Periodontol 2000*; 14:9-11.

Payne JB, Golub LM, Thiele GM, Mikuls TR (2015). The Link Between Periodontitis and Rheumatoid Arthritis: A Periodontist's Perspective. *Curr Oral Health Rep*; 2:20-29.

Papapanou PN (1999). Epidemiology of periodontal diseases: An update. *J Int Acad Periodontol*;1:110-116.

Peltier MR (2003). Immunology of term and preterm labor. *Reproductive Biology and Endocrinology*; 1: 122 doi:10.1186/1477-7827-1-122

Petersen PE (2003). The World Oral Health Report 2003: Continuous improvement of oral health in the 21st century - The approach of the WHO Global Oral Health Programme. *Community Dent Oral Epidemiol*; 31(Suppl. 1):3-24.

Petersen PE, Ogawa H (2005). Strengthening the Prevention of Periodontal Disease: The WHO Approach. *J Periodontol*; 76, No. 12: 2187-2193.

Petkovic AB, Matić SM, Stamatović NV, Vojvodić DV, Todorović TM, Lazić ZR, Kozomara RJ (2010). Proinflammatory cytokines (IL-1b and TNF-a) and chemokines (IL-8 and MIP-1a) as markers of peri-implant tissue condition. *International Journal of Oral and Maxillofacial Implants*; 39: 478–485.

Pfizenmaier K, Wajant H, Grell M (1996). Tumor necrosis factors in 1996. *Cytokine Growth Factor Rev*; 7(3): 271-7.

Pike KC, Lucas JS (2014). Respiratory consequences of late preterm birth. *Paediatr Respir Rev*: S1526-0542(14)00143-2.

Pihlstrom BL, Michalowicz BS, Johnson NW (2005). Periodontal diseases. *Lancet*; 366(9499): 1809-20.

Piscoya MD, Ximenes RA, Silva GM, Jamelli SR, Coutinho SB (2012). Maternal periodontitis as a risk factor for prematurity. *Pediatr Int*; 54(1):6 8-75.

Prasanna SJ (2011). Causal relationship between periodontitis and chronic obstructive pulmonary disease. *Journal of Indian Society of Periodontology*; 15(4): 359-365.

Romero R, Quintero E, Oyarzun et al (1988). Intraamniotic infection and the onset of labor in preterm premature rupture of the membranes *Am J Obstet Gynecol*; 159: 661–666

Romero R, Durum S, Dinarello CA, Oyarzun E, Hobbins JC, Mitchell MD (1989). Interleukin-1 stimulates prostaglandin biosynthesis by human amnion. *Prostaglandins*; 37: 13–22.

Romero R, Sepulveda W, Kenney JS, Archer LE, Allison AC, Sehgal PB (1992). Interleukin 6 determination in the detection of microbial invasion of the amniotic cavity. *Ciba Found Symp*; 167: 205–220.

Romero R, Sibai B, Caritis S, Paul R, Depp R, Rosen M et al (1993). Antibiotic treatment of preterm labor with intact membranes: a multicenter, randomized, double-blinded, placebo-controlled trial. *Am J Obstet Gynecol*. 169:764-74.

Romero R, Dey SK, Fisher SJ. Preterm labor: one syndrome, many causes (2014). *Science*; 345(6198):760-5.

Roshna T, Nandakumar K (2012). Generalized Aggressive Periodontitis and Its Treatment Options: Case Reports and Review of the Literature. *Case Reports in Medicine*, vol. 2012, Article ID 535321, 17 pages, doi:10.1155/2012/535321.

Saito S, Kasahara T, Kato Y, Ishihara Y, Ichijo M (1993). Elevation of amniotic fluid interleukin 6 (IL-6), IL-8 and granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) in term and preterm parturition. *Original Research Article Cytokine*; 5(1): 81-88.

Santos-Pereira SA, Giraldo PC, Saba-Chujfi E, Amaral RLG, Morais SS, Fachini AM, Goncalves AKS (2007). Chronic periodontitis and pre-term labour in Brazilian pregnant women: an association to be analysed. *J Clin Periodontol*; 34: 208 -213.

Sanz M, Kornman K, and on behalf of working group 3 of the joint EFP/AAP workshop (2013). Periodontitis and adverse pregnancy outcomes: consensus report of the Joint EFP/AAP Workshop on Periodontitis and Systemic Diseases. *J Clin Periodontol*; 40 (Suppl. 14): S164–S169.

Saffi MA, Furtado MV, Polanczyk CA, Montenegro MM, Ribeiro IW, Kampits C, Haas AN, Rösing CK, Rabelo-Silva ER (2015). Relationship between vascular endothelium and periodontal disease in atherosclerotic lesions: Review article. *World J Cardiol*; 7(1): 26-30.

Saugstad OD (2006). Oxygen and retinopathy of prematurity. *J Perinatol*; 26 (Suppl) 1:S46-50.

Scannapieco FA, Shay K (2014). Oral health disparities in older adults: oral bacteria, inflammation, and aspiration pneumonia. *Dent Clin North Am*; 58(4): 771-82.

Schulz S, Schlitt A, Lutze A, Lischewski S, Seifert T, Dudakliwa T, Gawe R, Werdan K, Hofmann B, Gläser C, Schaller HG, Reichert S (2012). The importance of genetic variants in TNF α for periodontal disease in a cohort of coronary patients. *J Clin Periodontol*; 39(8): 699-706.

Seymour G, Taylor J (2004). Shouts and whispers: an introduction to immunoregulation in periodontal disease. *Periodontol 2000*; 35: 9-13.

Silness J, Loe H (1964). Correlation between oral hygiene and periodontal condition. *Acta Odontol Scand*; 22: 121-135.

Silosi I, Cojocaru M, Foia L, Boldeanu MV, Petrescu F, Surlin P, Biciusca V (2015). Significance of circulating and crevicular matrix metalloproteinase-9 in rheumatoid arthritis-chronic periodontitis association. *J Immunol Res*; doi: 10.1155/2015/218060.

Siqueira FM, Cota LO, Costa JE, Haddad JP, Lana AM, Costa FO (2007). Intrauterine growth restriction, low birth weight, and preterm birth: adverse pregnancy outcomes and their association with maternal periodontitis. *J Periodontol*; 78(12): 2266-76.

Shikawa I, Nakashima K, Koeski T, Nagasawa T, Watanabe H, Arakawa S, Nitta H, Nishihara T (1997). Induction of the immune response to periodontopathic bacteria and its role in the pathogenesis of periodontitis. *Periodontology 2000*; 14: 79–111.

Sheu JJ, Lin HC (2013). Association between multiple sclerosis and chronic periodontitis: a population-based pilot study. *European Journal of Neurology*; 20: 1053–1059.

Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL (1998). Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol*. 25: 134–44.

Stadelmann P, Alessandri R, Eick S, Salvi GE, Surbek D, Sculean A (2013). The potential association between gingival crevicular fluid inflammatory mediators and adverse pregnancy outcomes: a systematic review. *Clin Oral Invest*; 17: 1453–1463.

Stadelmann P, Eick S, Salvi GE, Surbek D, Mohr S, Bürgin W, Christoph A (2014). Ramseier and Anton Sculean. Increased periodontal inflammation in women with preterm premature rupture of membranes. *Clinical Oral Investigations*; doi 10.1007/s00784-014-1371-6

Stamm JW (1986). Epidemiology of gingivitis. *J Clin Periodontol*;13(5): 360-70.

Stashenko P, Dewhirst FE, Peros WJ, Kent RL, Ago JM (1987). Synergistic interactions between interleukin 1, tumor necrosis factor, and lymphotoxin in bone resorption. *J Immunol*;138(5): 1464-8.

Struch F, Dau M, Schwahn C, Biffar R, Kocher T, Meisel P. Interleukin-1 gene polymorphism, diabetes, and periodontitis: results from the Study of Health in Pomerania (SHIP) (2008). *J Periodontol*; 79(3): 501-7.

Tarannum F, Faizuddin M, Madaiah H (2011). Gingival crevicular fluid prostaglandin E2 level as a predictor of preterm low birth weight: a pilot investigation. *J Oral Sci*; 53(3): 293–300.

Tatakis DN (1993). Interleukin-1 and bone metabolism: a review. *J Periodontol*; 64(5 Suppl):416-31.

Taylor JJ, Preshaw PM, Lalla E (2013). A review of the evidence for pathogenic mechanisms that may link periodontitis and diabetes. *J Clin Periodontol*; 40 (suppl. 14): S113–S134.

Thorsen P, Schendel DE, Deshpande AD, Vogel I, Dudley Đ, Olsen J (2001). Identification of biological/biochemical marker(s) for preterm delivery. *Paediatric and Perinatal Epidemiology*; 15: 90–103.

Toygar HU, Seydaoglu G, Kurklu S, Guzeldemir E, Arpak N (2007). Periodontal health and adverse pregnancy outcome in 3576 Turkish women. *Journal of Periodontology* 78: 2081–2094.

Tonetti MS (2009). Periodontitis and risk for atherosclerosis: an update on intervention trials. *Journal of Clinical Periodontology*; 36(supp.10): 15-19.

Tsai CC, Chen KS (1995). A study on sex hormones in gingival crevicular fluid and black pigmented bacteria in subgingival plaque of pregnant women. *Gaoxiong Yi Xue Ke Xue Za Zhi*; 11(5): 265-73.

Van Dyke TE, van Winkelhoff AJ (2013). Infection and inflammatory mechanisms. *J Clin Periodontol*; 40(suppl. 14): S1–S7.

Van Snick J (1990). Interleukin-6: an overview. *Annu Rev Immunol*; 8:253-78.

Usin MM, Menso J, Rodríguez VI, González A, Tabares S, Parodi R, Sembaj A. Association between maternal periodontitis and preterm and/or low birth weight infants in normal pregnancies. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2014 Dec 10:1-5

Velisavljev-Filipović G (2010). Intrakranijalno krvarenje i neuropsihicke osobine prevremeno rodene dece. (Doktorska disertacija). Novi Sad: Medicinski fakultet Novi Sad;

Vettore MV, Leal Md, Leão AT, da Silva AM, Lamarca GA, Sheiham A (2008). The relationship between periodontitis and preterm low birthweight. *J Dent Res*; 87(1): 73-8.

Xiao LM, Yan YX, Xie CJ, Fan WH, Xuan DY, Wang CX, Chen L, Sun SY, Xie BY, Zhang JC (2009). Association among interleukin-6 gene polymorphism, diabetes and periodontitis in a Chinese population. *Oral Dis*; 15(8): 547-53.

Wadhwa PD, Sandman CA, Garite TJ (2001). The neurobiology of stress in human pregnancy: implications for prematurity and development of the fetal central nervous system. *Prog Brain Res*; 133:131-42

Walsh MC, Szeffler S, Davis J, et al (2006). Summary proceedings from the bronchopulmonary dysplasia group. *Pediatrics*; 117(3 Pt 2):S52-S56.

Williams C, Davenport E, Sterne J, et al (2000). Mechanisms of risk in preterm low-birthweight infants. *Periodontology 2000*; 23: 142–150.

Whittle WL, Holloway AC, Lye SJ, Gibb W, Challis JR (2000). Prostaglandin production at the onset of ovine parturition is regulated by both estrogen-independent and estrogen-dependent pathways. *Endocrinology*; 141(10): 3783-91.

World Health Organization (1977). *Manual of the International Statistical Classification of Diseases, Injuries, and Causes of Death. 9th Rev, p. 773.* Geneva: World Health Organization.

World Health Organization (2006). *Neonatal and Perinatal Mortality: Country, Regional and Global Estimates.* Geneva: World Health Organization.

Yücel ÖÖ, Ezel Berker E, Mesci L, Eratalay K, Tepe E, Tezcan I (2015). Analysis of TNF- α (-308) polymorphism and gingival crevicular fluid TNF- α levels in aggressive and chronic periodontitis: A preliminary report. *Cytokine*; 72(2): 173-177.

Biografija

Dr Neda Perunović rođena je u Zaječaru, 16.11.1982. godine. Osnovnu i srednju zubotehničku školu je završila u Beogradu, sa odličnim uspehom. Diplomirala je 2007. godine na Stomatološkom fakultetu u Beogradu sa prosečnom ocenom 8.93. Nakon pripravničkog staža obavljenog na klinikama Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu, položila je stručni ispit 2009. godine.

Prvu godinu doktorskih akademskih studija iz naučne oblasti Parodontologija je upisala školske 2008/2009 godine na Stomatološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu. Položila je sve ispite predviđene planom i programom akademskih doktorskih studija sa prosečnom ocenom 9.81. Tokom doktorskih studija bila je angažovana u izvođenju praktične nastave na predmetima Parodontologija i Oralna medicina. Saradnik je na dva projekta Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja republike Srbije (br. 17507 "Genetička kontrola i molekularni mehanizmi u malignim, inflamatornim i razvojnim patologijama orofacijalne regije" i br.41008 "Interakcija etiopatogenetskih mehanizama parodontopatije i periimplantitisa sa sistemskim bolestima današnjice")

Dr Neda Perunović je aktivan učesnik brojnih skupova nacionalnog i međunarodnog sadržaja gde je prezentovala 7 naučnih radova (poster prezentacije). Dr Perunović je do sada objavila 5 naučnih radova, od kojih su 4 u međunarodnim časopisima (SCI lista). Član je srpskog lekarskog društva (SLD) (sekcija za parodontologiju).

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Неда Перуновић

број индекса 9/08

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Нивои IL-1 β , IL-6, TNF- α , PGE2 у гингивалној течности и у крви превремено

порођених жена са пародонтитисом

- 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, 6.10.2015.

Неда Перуновић

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Неда Перуновић

Број индекса 9/08

Студијски програм Докторске студије

Наслов рада Нивои IL-1 β , IL-6, TNF- α , PGE2 у гингивалној течности и у крви превремено
порођених жена са пародонтитисом

Ментор Професор др Саша Чакић

Потписани/а Неда Перуновић

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, 6.10.2015.

Неда Перуновић

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

Наслов рада Нивои IL-1 β , IL-6, TNF- α , PGE2 у гингивалној течности и у крви превремено порођених жена са пародонтитисом

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, 6.10.2015.

Неда Терундевић

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.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Неда Перуновић

број индекса 9/08

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Нивои IL-1 β , IL-6, TNF- α , PGE2 у гингивалној течности и у крви превремено

порођених жена са пародонтитисом

- 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, 6.10.2015.

Неда Перуновић

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Неда Перуновић

Број индекса 9/08

Студијски програм Докторске студије

Наслов рада Нивои IL-1 β , IL-6, TNF- α , PGE2 у гингивалној течности и у крви превремено
порођених жена са пародонтитисом

Ментор Професор др Саша Чакић

Потписани/а Неда Перуновић

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, 6.10.2015.

Неда Перуновић

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

Наслов рада Нивои IL-1 β , IL-6, TNF- α , PGE2 у гингивалној течности и у крви превремено порођених жена са пародонтитисом

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, 6.10.2015.

Неда Терундевић

1. Ауторство - Дозвољавање 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. Дозвољавање 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. Дозвољавање 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. Дозвољавање 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. Дозвољавање 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. Дозвољавање 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.