



UNIVERZITET U NIŠU
MEDICINSKI FAKULTET



Mirjana V. Bošković

**PRAĆENJE BIOHEMIJSKIH PARAMETARA
ZAPALJENJA, OKSIDATIVNOG STRESA I APOPTOZE
U PLJUVAČCI PACIJENATA SA FIKSNIM I MOBILNIM
STOMATOLOŠKIM PROTETSKIM NADOKNADAMA**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Niš, 2016.



UNIVERSITY OF NIŠ
FACULTY OF MEDICINE



Mirjana V. Bošković

**MONITORING OF BIOCHEMICAL PARAMETERS
OF INFLAMMATION, OXIDATIVE STRESS AND
APOPTOSIS IN THE SALIVA OF PATIENTS WITH FIXED
AND MOBILE DENTAL PROSTHETIC RESTORATIONS**

DOCTORAL DISSERTATION

Niš, 2016.

Podaci o doktorskoj disertaciji

Mentor:	Prof. dr Dušan Sokolović, vanredni profesor, Univerzitet u Nišu, Medicinski fakultet
Naslov:	Praćenje biohemijskih parametara zapaljenja, oksidativnog stresa i apoptoze u pljuvački pacijenata sa fiksnim i mobilnim stomatološkim protetskim nadoknadama
Rezime:	<p>Gubitak zuba predstavlja veliki problem savremenog čoveka. Primena novih tehnologija i stomatoloških materijala u smislu izrade fiksnih ili mobilnih stomatoloških protetskih nadoknada utiče na promenu određenih biohemijskih parametara u pljuvački pacijenata. Smatra se da pojedini materijali u određenoj meri utiču na promenu kvaliteta i kvantiteta pljuvačke nakon postave u ustima. Prisustvo jona metala u usnoj duplji, kao slobodnih jona, predstavlja veliki potencijal za stvaranje faktora koji uzrokuju oksidativni stres. Naročiti negativni efekat je primećen kod legura koje se koriste u izradi fiksnih stomatoprotetskih nadoknada, jer izazivaju alergijske promene i hipersenzitivnost u usnoj duplji. Dokazano je da aplikacija stomatoprotetskih nadoknada dovodi do promena morfologije i redukciju pokretljivosti ćelija, značajnog uvećanja nivoa oksidativnog stresa, pojavu citokina i ćelijsku intoksikaciju. Prilikom postave fiksne stomatološke protetske nadoknade karakteristična je mnogo brža adaptacija pacijenta, nego kod postave mobilne stomatološke protetske nadoknade, kada često dolazi do pojave kliničkih znakova zapaljenja. Aplikacijom fiksnih stomatoloških protetskih nadoknada, dolazi do pojave oksidativnog stresa koji je manjeg intenziteta u pljuvački, nego primenom mobilnih stomatoloških protetskih nadoknada. Sličan odnos je dobijen i analizom parametara inflamacije i markera apoptoze u pljuvački ispitanika. Povećani parametri zapaljenja, oksidativnog stresa i apoptoze u pljuvački pacijenata usled aplikacije fiksnih stomatoprotetskih nadoknada, mnogo brže opadaju (normalizuju se) nego posle ugradnje mobilnih stomatoloških protetskih nadoknada. Analizirani biohemijski parametri su normalizovani nakon 30 dana od ugradnje fiksnih ili mobilnih stomatoloških protetskih nadoknada.</p>
Naučna oblast:	Stomatologija
Naučna disciplina:	Stomatološka protetika
Ključne reči:	pljuvačka, mobilna stomatološka protetska nadoknada, fiksna stomatološka protetska nadoknada, biohemijski parametri zapaljenja
UDK:	612.313:577.1):616.314-76/77 (043.3)
CERIF klasifikacija:	B 730, Odontologija, Stomatologija
Tip licence Kreativne zajednice:	CC BY-NC-ND

Data on Doctoral Dissertation

Doctoral Supervisor:	Prof. Dušan Sokolović, PhD, Associate Professor, University of Niš, Faculty of Medicine
Title:	Monitoring of biochemical parameters of inflammation, oxidative stress and apoptosis in the saliva of patients with fixed and mobile dental prosthetic restorations
Abstract:	<p>Tooth loss is a huge problem of the modern man. Use of new technologies and dental materials in the fabrication of fixed or mobile dental prosthetic appliances has an impact on the change of some of the biochemical parameters in the patient saliva. It is thought that to a degree, particular materials have an impact on the change of quality and quantity of saliva after their placement in the mouth cavity. The presence of metal ions as free ions in the mouth has got a large potential for the creation of factors that cause oxidative stress. A specially adverse effect has been observed with alloys used in the fabrication of fixed dental prosthetic appliances, since they cause allergic and hypersensitivity reactions in the mouth cavity. It has been shown that use of dental prosthetic appliances induces changes in the morphology and reduced motility of the cells, significant increase of oxidative stress, appearance of cytokines, and cell intoxication. With the placement of fixed dental prosthetic appliances patients tend to adapt to them much quicker than with mobile appliances, when the clinical signs of inflammation are much more common. With the application of fixed dental prosthetic appliances oxidative stress in the saliva is much less intense than with mobile appliances. A similar relationship has been found in the analysis of parameters of inflammation and markers of apoptosis in the saliva. Increased parameters of inflammation, oxidative stress, and apoptosis in the saliva of patients as the result of fixed dental prosthetic appliances, tend to normalize much more rapidly than with mobile appliances. The analyzed biochemical parameters normalize 30 days after the placement of fixed or mobile dental prosthetic appliances.</p>
Scientific Field:	Dentistry
Scientific Discipline:	Prosthetic dentistry
Key Words:	saliva, mobile dental prosthetic appliance, fixed dental prosthetic appliance, biochemical parametars of inflammation
UDC:	612.313:577.1):616.314-76/77 (043.3)
CERIF Classification:	B 730, Odontology, Dentistry
Creative Commons License Type:	CC BY-NC-ND

S A D R Ź A J

1. UVOD.....	1
1.1. Analiza biohemijskih markera pljuvačke u različitim oboljenjima usne duplje	2
1.1.1. Mogućnosti analiziranja pljuvačke u proceni rizika za nastanak zubnog karijesa	2
1.1.2. Biomarkeri pljuvačke i dijagnostikovanje parodontopatije.....	3
1.1.3. Biomarkeri pljuvačke u dijagnostikovanju infektivnih oboljenja	6
1.1.4. Mogućnosti ispitivanja pljuvačke u usnoj duplji pacijenata sa stomatološkim protetskim nadoknadama	7
1.2. Oksidativni stres u usnoj duplji.....	9
1.2.1. Slobodni kiseonični radikali	11
1.2.2. Slobodni radikali azota	12
1.2.3. Uloge reaktivnih kiseoničnih radikala	13
1.2.4. Lipidna peroksidacija	15
1.2.5. Uloga slobodnih radikala u patogenezi oboljenja usne duplje	17
1.2.5.1. Uloga slobodnih radikala u patogenezi inflamatornih oboljenja oralne sluzokože	17
1.2.5.2. Uloga slobodnih radikala u patogenezi oralnog karcinoma	18
1.3. Lokalni i sistemski parametri zapaljenja u pljuvački	20
1.4. Značaj apoptoze u oboljenjima usne duplje	21
2. CILJ RADA.....	23
3. MATERIJAL I METODE ISTRAŽIVANJA	24
3.1. Mesto izvođenja istraživanja.....	24
3.2. Uzimanje materijala za biohemijska ispitivanja	25
3.3. Biohemijske metode.....	26
3.4. Statističke metode	27

4. REZULTATI.....	28
5. DISKUSIJA	45
5.1. Analiza markera oksidativnog stresa (MDA, AOPP i CAT) u pljuvački pacijenata sa fiksnim i mobilnim stomatološkim protetskim nadoknadama	45
5.2. Analiza markera inflamacije u pljuvački pacijenata sa fiksnim i mobilnim stomatološkim protetskim nadoknadama.....	51
5.2.1. Analiza interleukina 6 u pljuvački pacijenata sa fiksnim i mobilnim stomatološkim protetskim nadoknadama	51
5.2.2. Analiza nivoa imunoglobulina A u pljuvački pacijenata sa fiksnim i mobilnim stomatološkim protetskim nadoknadama	52
5.2.3. Analiza visokosenzitivnog C-reaktivni proteina (CRP) u pljuvački pacijenata sa fiksnim i mobilnim stomatološkim protetskim nadoknada	52
5.3. Analiza određenih toksičnih efekata pojedinih supstanci iz fiksnih/mobilnih stomatoloških protetskih nadoknada na parametre oksidativnog stresa i parametre zapaljenja	53
5.4. Uloga dentalnih legura u nastanku oksidativnog stresa	56
6. ZAKLJUČCI.....	60
7. LITERATURA.....	62
BIOGRAFIJA AUTORA.....	82

1. UVOD

Pljuvačka je sekret pljuvačnih i mukoznih žlezda koji je u stalnom kontaktu sa tkivima usne duplje i koji je značajan za oralnu homeostazu. Uloge pljuvačke u održavanju oralnog zdravlja i njeni sastojci navedeni su u tabeli 1 i 2¹⁻³. Pljuvačka je biološki materijal, koja služi za uvođenje novih dijagnostičkih testova koji doprinose postavljanju pravovremene dijagnoze i razjašnjavanju patogeneze mnogih sistemskih oboljenja u medicini i stomatologiji. Poslednjih deset godina u literaturi se pominje više od 2.500 radova na temu velike važnosti upotrebe pljuvačke kao biološkog materijala, umesto krvnog seruma.

Tabela 1. Glavne funkcije pljuvačke

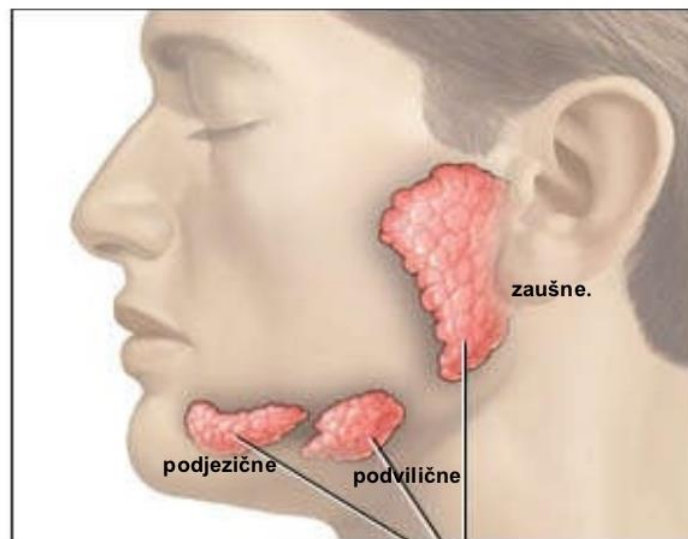
Funkcije pljuvačke	Komponente pljuvačke
Zaštita oralne sluzokože	mucini
Zaštita gleđi	prolinom bogati proteini
Remineralizacija gleđi	kalcijum, fosfati, fluoridi
Specifična antimikrobna zaštita oralne sredine	salivarni imunoglobulini
Održavanje pH na fiziološkom nivou	bikarbonati i fosfati

Tabela 2. Parametri koji se analiziraju u pljuvački

Kategorije	Parametri
Lekovi i metaboliti	alkohol, amfetamini, nikotin
Antitela	HIV, Helicobacter pylori
Metalni joni	Ni, Co, Cr, Cd, Hg, Pb
Produkti inflamacije	malondialdehyd, citokini, C reaktivni protein, faktor tumorske nekroze

Mnogi autori navode da ovaj sekret može biti pouzdan biološki materijal za dokazivanje pokazatelja sistemskih oboljenja i nadgledanje primene i efekata lekova, psihoaktivnih supstanci i hormona. Dosadašnja istraživanja su pokazala da se u pljuvački mogu analizirati razni parametri (lekovi i njihovi metaboliti, droge, antitela, toksični metali, medijatori zapaljenskih procesa, faktori rasta) čija se analiza rutinski sprovodi u krvnoj plazmi⁴⁻¹⁴.

Zbog toga što je u intimnom kontaktu sa tkivima usne duplje, pljuvačka održava i sva zbivanja u njima, bilo fiziološka, bilo patološka, pa je autori popularno nazivaju „ogledalom oralnog zdravlja“. Stoga analiziranje biohemijskog sastava pljuvačke može biti od posebnog značaja u stomatologiji radi procene rizika za nastanak, dijagnostikovanje, praćenje toka bolesti i kontrole rezultata primenjenog lečenja zubnog karijesa, parodontopatije, oralnih karcinoma i infektivnih oboljenja u usnoj duplji¹⁵⁻¹⁷.



Slika 1. Pljuvačne žlezde koje luče pljuvačku

1.1. ANALIZA BIOHEMIJSKIH MARKERA PLJUVAČKE U RAZLIČITIM OBOLJENJIMA USNE DUPLJE

1.1.1. Mogućnosti analiziranja pljuvačke u proceni rizika za nastanak zubnog karijesa

Zubni karijes je najčešće oralno oboljenje složene etiologije koje se javlja u svim životnim dobima. Dijagnoza zubnog karijesa postavlja se relativno lako na osnovu kliničkog i radiografskog pregleda. Analiziranje pljuvačke sa aspekta zubnog karijesa nije značajno u dijagnostici, kao što je slučaj sa parodontopatijom i drugim oralnim oboljenjima, već za procenu rizika nastanka ovog oboljenja. Na osnovu fizičko-hemijskih osobina pljuvačke (zapremina izlučene pljuvačke, puferski kapacitet), kao i mikrobiološkog monitoringa ovog sekreta (stepen kolonizacije oralne sredine kariogenim vrstama bakterija) otkrivaju se osobe kod ko-

jih postoji povećan rizik za nastanak karijesa. To omogućava pravovremenu primenu mera prevencija radi smanjenja nastanka novog oboljenja¹⁸⁻²⁵.

Količina izlučene pljuvačke zavisi od toga da li se luči nestimulisana ili stimulisana pljuvačka, a podleže i individualnim razlikama. Poznato je da količina izlučene pljuvačke direktno utiče na zubni karijes kod osoba sa rizikom za nastanak ovog oboljenja. Povećano lučenje pljuvačke omogućava efikasnije odstranjivanje zaostalih čestica hrane iz usne duplje (samočišćenje). Kako se sa povećanjem količine izlučene pljuvačke povećava i koncentracija bikarbonata, glavnih pufera pljuvačke, umanjuje se i štetan efekat kiselih proizvoda hrane. Količina izlučene pljuvačke određuje se merenjem količine izlučene stimulisane pljuvačke u određenom vremenskom intervalu, što je u proseku 0,7 – 1 ml u minuti. Smanjenje količine izlučene pljuvačke direktno utiče na povećani rizik za nastanak zubnog karijesa, što je posebno uočljivo kod osoba sa kserostomijom²²⁻²⁵.

Puferska uloga pljuvačke je sposobnost ovog sekreta da održava pH vrednost oralne sredine u fiziološkim vrednostima (pH 6,1 – 7,8), pri kojima ne dolazi do demineralizacije gleđi zuba. Na osnovu puferskog kapaciteta pljuvačke može se proceniti rizik za nastanak zubnog karijesa. Postoji više standardizovanih postupaka za određivanje puferskog kapaciteta pljuvačke koji su jednostavni za upotrebu u ambulantnim uslovima. Jedan od najčešće korišćenih testova je Dentobuff²⁶.

Takođe, u proceni rizika za nastanak zubnog karijesa značajno je i određivanje stepena zubnog karijesa kao i određivanje stepena kolonizacije usne duplje kariogenim vrstama bakterija (*Streptococcus mutans* i *Lactobacillus*). Ove vrste bakterija poseduju kariogene odlike, jer proizvodi njihovog metabolizma mogu doprineti nastanku početne kariozne lezije gleđi zuba, odnosno njenom širenju u dentin²⁷.

1.1.2. Biomarkeri pljuvačke i dijagnostikovanje parodontopatije

Parodontopatija je hronično oboljenje koje zahvata potporni aparat zuba, koje na kraju dovodi do gubitka zuba. Dijagnostikovanje parodontopatije se zasniva na kliničkim parametrima (indeks plaka, gingivalni indeks, dubina parodontalnog džepa, indeks krvavljenja, nivo pripojnog epitela, CPITN) i radiografskim parametrima (stepen gubitka alveolarne kosti). Ova klinička merenja su korisna za dijagnostikovanje parodontopatije, ali pružaju vrlo ograničene informacije u vezi sa subkliničkim oblicima oboljenja, prognozom ove bolesti i procenom efekta primenjene terapije. Analiza biohemijskog sastava pljuvačke može biti veoma značajna kao dopunski dijagnostički test. U pljuvački se mogu dokazati brojni biohemijski pokazatelji patološkog

procesa u parodontcijumu i to: aktivnost različitih enzima; koncentracija imunoglobulina, faktora rasta i antimikrobnih peptida; pokazatelji lipidne peroksidacije i oksidacionog oštećenja DNK molekula¹⁵⁻¹⁷.

Ispitivanje proteina pljuvačke primenom modifikovanih elektroforetskih metoda¹⁸ na osnovu razlike u elektroforetskoj pokretljivosti prema molekulskim masama i različitom pH gradijentu¹⁹ omogućava da se sagleda i oceni stanje parodontalnih tkiva u različitim stadijumima obolenja parodontcijuma. Ispitivanja primenom modifikovanih metoda na Pol-E filmu agaroze ukazuju na anodnu i katodnu elektroforetsku pokretljivost proteina parotidne pljuvačke i na isključivo anodnu pokretljivost proteinskih frakcija nestimulisane mešovite pljuvačke. Kisele proteinske frakcije iz submandibularne i sublingvalne žlezde na elektroforegramu i denzitogramu mešovite pljuvačke odgovaraju, po pokretljivosti, oblasti albumina. Enzim alfa-amilaza (pH 6,7) stimulisane parotidne i mešovite pljuvačke zauzima oblast beta globulina u odnosu na proteine humanog seruma zdravih osoba²²

Sa napredovanjem parodontopatije, što se ocenjuje vrednostima parodontalnih indeksa, smanjuje se broj razdvojenih frakcija, koje dobijaju nepravilan i замуćen izgled, što je naročito izraženo u terminalnom stadijumu oboljenja. Nepravilnosti se odnose na bazni glikoprotein Mr 21000 i Mr 35000 bogat prolinom, kao i kalcijum – precipitabilne glikoproteine pljuvačke podjezične žlezde, čija se zastupljenost u mešovitom sekretu sa napredovanjem parodontalnog oboljenja intenzivira. Frakcija kalcijum-precipitabilnih glikoproteina ima pokretljivost albumina normalnog humanog seruma i ne nalazi se u parotidnoj pljuvački²⁵.

Ispitivanja mešovite pljuvačke kod osoba sa različitim stadijumima parodontopatije pokazala su da se najveći broj proteinskih frakcija jasno i pravilno razdvojio u uzorcima uzetih od osoba sa zdravim parodontcijumom ili u uzorcima uzetih od osoba kod kojih je dijagnostikovano početni stadijum parodontopatije. Sa napredovanjem parodontalnog oboljenja smanjuje se broj frakcija proteina zone psA (postalbumina), a povećava se zastupljenost proteinskih frakcija u oblasti psT (posttransferina)²⁸.

Elektroforeza ukupnih proteina pljuvačke, iako pruža određene informacije, relativno je neprecizan analitički metod. Preciznije informacije mogu se dobiti analizom pojedinačnih proteina pljuvačke, a zbog njihove uloge u fiziološkim i patološkim procesima koji se odigravaju na nivou suptilnih promena strukture i konformacije proteina (proteomike) u parodontalnim tkivima. Zbog toga, brojni proteini pljuvačke mogu se smatrati potencijalnim pokazateljima aktivne parodontopatije¹⁴.

Od pljuvačnih proteina, mogućih pokazatelja parodontopatije, naročito se izdvajaju brojni enzimi, koji mogu da potiču od samih patogenih bakterija koje su odgovorne za nastanak ovog oboljenja. U pitanju su bakterijske proteinaze, koje su direktno odgovorne za razgradnju strukturnih proteina parodonta, posebno kolagena, kao što su: kolagenaza, želatinaza, arginin-proteinaza, lizin-cistein proteinaza, seril-proteinaza. Značajni su i hidrolitički enzimi oslobođeni iz neutrofilnih leukocita kao odgovor organizma na bakterijsku infekciju parodonta na lokalnom nivou – elastaza, katepsin G, katepsin D, mijeloporoskidaza. U pljuvački se analiziraju i intra-ćelijski enzimi, odgovorni za odigravanje metaboličkih procesa u ćelijama parodontocijuma, koji se pojačano oslobađaju iz oštećenih ćelija u pljuvačku: aminotransferaze (AST i ALT), laktat-dehidrogenaza (LDH), alkalna fosfataza (ALP), kisela fosfataza (ACP). Podaci iz literature pokazuju da pomenuti enzimi mogu biti pokazatelji akutnog patološkog procesa u parodontu, jer je njihova aktivnost bila značajno povećana u pljuvački osoba obolelih od parodontopatije u odnosu na zdrave ispitanike²⁷. Takođe, ovi enzimi mogu biti pokazatelji stepena aktivnosti parodontopatije, jer je ustanovljena pozitivna korelacija između njihove aktivnosti u pljuvački i vrednosti nekih kliničkih parametara (gingivalni indeks, indeks krvavljenja, dubina parodontalnog džepa). Obzirom na to da se aktivnost pojedinih enzima (oslobođenih iz leukocita) u pljuvački osoba obolelih od parodontopatije značajno smanjila posle primenjene terapije, autori ističu da ti enzimi mogu biti korisni i za procenu efekata lečenja pomenute bolesti^{16,17,28-31}.

Osim enzima, i ostali proteini pljuvačke (trombocitni i aktivirajući faktor, endotelni faktor rasta, hepatocitni faktor rasta, laktoferin, fibronektin) mogu se smatrati potencijalnim pokazateljima aktivne parodontopatije. Proteomika sve više postaje savremeni rani marker ćelijskih oštećenja u parodontopatiji. Tokom istraživanja ustanovljena je njihova povećana koncentracija u pljuvački obolelih osoba u odnosu na zdrave ispitanike. Naročito su zanimljivi proteini (cistatin i laktoferin) čija se koncentracija u pljuvački ispitanika obolelih od parodontopatije značajno smanjila posle lečenja, koji pokazuju da li se i na molekulskom nivou stišao patološki proces i u kojoj meri tako da mogu biti korisni markeri kliničkog toka i prognoze³².

Parodontalna oboljenja su, po pravilu, praćena kvantitativnim i kvalitativnim promenama imunoglobulina. Te promene se mogu pratiti analizom gingivalne tečnosti i pljuvačke. Određivanje nivoa pljuvačnih imunoglobulina je značajno, kako za postavljanje dijagnoze, tako i za prognozu parodontalnih oboljenja, kao i za praćenje efekata lečenja ovih oboljenja. Obzirom na to da u parodontalnim oboljenjima postoji selektivna distribucija pojedinih kategorija imunoglobulina, razvijeni su metodi za procenu njihovog sadržaja tokom oboljenja. Jednostavan Dot Blot Assay je pogodan za otkrivanje potklasa imunoglobulina G u pljuvački

i gingivalnoj tečnosti, a ELISA-test za otkrivanje potklasa imunoglobulina A. Određivanje nivoa ovih imunoglobulinskih izotipova u oralnim tečnostima je značajno u proceni stepena zapaljenja gingive³³.

Jedna od značajnih uloga pljuvačke u oralnoj homeostazi je antioksidaciona zaštita oralne sredine, što ovaj sekret obezbeđuje svojim specifičnim enzimima (pljuvačna peroksidaza, superoksid-dismutaza, glutation-peroksidaza i glutation-katalaza), kao i nekim neenzimskim antioksidansima (mokraćna kiselina, albumini, glutation). Ispitivanje antioksidacione sposobnosti pljuvačke osoba obolelih od parodontopatije pokazalo je da je ukupni antioksidacioni kapacitet ovog sekreta značajno smanjen u odnosu na zdrave ispitanike. U pljuvački je povećan sadržaj malondialdehida (MDA), poznatog pokazatelja stepena lipidne peroksidacije u tkivima, što govori u prilog tome da oksidacioni stres ima značajno mesto u patogenezi ove bolesti. Zbog toga se u prevenciji parodontopatije, pored ostalih poznatih mera, preporučuje i primena antioksidanasa, kao što su vitamini A,C,E i bioelement selen^{34,35}.

Laboratorijski dijagnostički test bi trebalo da bude visokospecifičan i osetljiv da bi bio validan za dijagnostikovanje nekog oboljenja. Obzirom na složenu etiopatogenezu parodontopatije, ispitivanje jednog sastojka pljuvačke bilo bi nedovoljno specifično i osetljivo za postavljanje dijagnoze, prognozu ili procenu efekata lečenja. Međutim, analiziranje više pljuvačnih pokazatelja obezbedilo bi preciznije informacije u vezi sa ovim oboljenjem^{39,40}.

1.1.3. Biomarkeri pljuvačke u dijagnostikovanju infektivnih oboljenja

Krvni serum predstavlja uzorak biološkog materijala koji se koristi u svakodnevnom, rutinskom dijagnostikovanju infektivnih oboljenja. Međutim, poslednjih decenija dvadesetog veka čine se veliki naponi da se krvni serum, zameni nekom drugom biološkim materijalo. Jedan od njih svakako može biti pljuvačka, naročito ako je inficirana oralna regija. Pljuvačku čine mnoge komponente koje predstavljaju činioce humoralne imunosti, ka što su: laktoferin, lizozim, peroksidaza, interferoni. Pored toga u pljuvački se nalaze antitela klase IgA, IgG i IgM, koje su značajne za serološko dijagnostikovanje infektivnih oboljenja^{41,42,43}.

1.1.4. Mogućnosti ispitivanja pljuvačke u usnoj duplji pacijenata sa stomatološkim protetskim nadoknadama

Gubitak zuba predstavlja veliki problem savremenog čoveka. Primena novih tehnologija i stomatoloških materijala u smislu izrade fiksnih ili mobilnih stomatoloških protetskih nadoknada utiče na promenu određenih biohemijskih parametara u pljuvački pacijenata⁴⁴. Prilikom aplikacije fiksne protetske nadoknade karakteristična je mnogo brža adaptacija pacijenta, nego kod postave mobilne protetske nadoknade, kada često dolazi do pojave kliničkih znakova zapaljenja. U ranijim istraživanjima je dokazano prisustvo slobodnih jona metala i molekula nevezanog akrilata u pljuvački⁴⁵. Smatra se da pojedini materijali u određenoj meri utiču na promenu kvaliteta i kvantiteta pljuvačke nakon postave u ustima⁴⁶.



Slika 2. Mobilna stomatološka protetska nadoknada

U oblasti stomatoloških nauka postoje mnoge studije koje su proučavale direktne efekte uzrokovane prisustvom i štetnim efektima slobodnih radikala⁴⁷. Pojedini autori su merili nivo oksidativnog stresa u serumu, pljuvački i gingivalnoj sulkusnoj tečnosti kod pacijenata kod kojih je dijagnostikovana hronična parodontopatija, nakon aplikacije fiksne i mobilne protetske nadoknade. Dokazano je da je nivo malondialdehida (MDA) – sekundarnog produkta lipidne peroksidacije, u pljuvački i gingivalnoj sulkusnoj tečnosti značajno veći kod ispitanika sa stomatološkim protetskim nadoknadama u odnosu na zdrave pacijente, što ukazuje da lipidna peroksidacija igra važnu ulogu u parodontalnoj patologiji⁴⁸.

Druge studije takođe su obuhvatile istraživanja nivoa inflamatornih parametara kod pacijenata sa parodontopatijom. Dokazano je da su parametri zapaljenja značajno povećani u krvi ispitanika kod kojih su aplikovane stomatološke protetske nadoknade⁴⁹.

Prisustvo jona metala u usnoj duplji kao slobodnih jona, predstavlja veliki potencijal za stvaranje faktora koji uzrokuju oksidativni stres. Naročiti negativni efekat je primećen kod legura na bazi nikla i hroma koje se koriste u izradi fiksnih stomatoloških protetskih nadoknada, jer izazivaju alergijske promene i hipersenzitivnost u usnoj duplji. Dokazano je da aplikacija stomatoloških protetskih nadoknada dovodi do promena morfologije i redukciju pokretljivosti ćelija, značajnog uvećanja nivoa oksidativnog stresa, pojavu citokina i ćelijsku intoksikaciju. U odnosu na legure kobalta i hroma, legure nikla i hroma pokazuju mnogo manju biokompatibilnost⁵⁰.



Slika 3. Metalo-keramički most ili fiksna stomatološka protetska nadoknada

Oksidativni stres i apoptoza su značajni u patogenezi mnogih stanja u usnoj duplji koja su uzrokovana slobodnim radikalima u koncentraciji koja uzrokuju bol i zapaljenje. Neki autori su pokušali da povežu pojavu bola u temporomandibularnim poremećajima sa merenjem biomarkera oksidativnog stresa (8–hidroksideoksiguanozin, malondialdehidi totalni antioksidativni kapacitet) u pljuvački i serumu⁵¹.

Neke druge studije su bile usmerene na *in vivo* istraživanja oksidativnog stresa uzrokovnog prisustvom metalnih jona iz legura koje se koriste za izradu žičanih kukica i ligatura kod parcijalnih mobilnih proteza i ortodontskih aparata⁵². One pokazuju da su ovi metalni joni potencijalni uzrok oksidativnog stresa zavisno od pH vrednosti sredine u usnoj duplji. Standardne žičane kukice od nikal-titanijum legura izazivaju najintenzivniji oksidativni stres, dok čelične kukice i kukice izrađene od legure titanijum-molibden pokazuju najniži nivo oksidativnog stresa. Ova visoka biokompatibilnost je u skladu sa mnogim ranijim studijama⁵³. Naime, žičane kukice u usnoj duplji su izložene hemijskim, biološkim i fizičkim uticajima koji uzro-

kuju oksidaciju metala. Kao posledica toga nastaje korozija i formiranje oksida ili organo-metalnih komponenti koje vode do poremećaja u ćelijskoj ravnoteži. Kobalt-hrom legure dovede do niske pokretljivosti ćelija, inhibicije ćelijskog rasta i visokog nivoa oksidativnog stresa. Zapaženo je da joni kobalta iz kobalt-hrom legure inhibiraju ćelijski rast, dok su joni nikla i kobalta zajedno odgovorni za mitohondrijalnu aktivnost kod humanih fibroblasta⁵⁵.

1.2. OKSIDATIVNI STRES U USNOJ DUPLJI

Oksidativni stres je definisao Helmut Sies 1985. godine kao poremećaj u kojem prevagu imaju slobodni radikali nad antioksidantima usled čega dolazi do oštećenja važnih ćelijskih makromolekula (proteina, lipida, ugljenih hidrata i DNK). Proces oksidacije je deo regulatornog biohemijškog funkcionisanja ljudskog tela u procesu stvaranja energije koja je neophodna za život. Tokom normalnih metaboličkih procesa dolazi do stvaranja slobodnih radikala, koji se uključuju u uobičajene biološke procese, ali isto tako mogu biti u nekontrolisanim uslovima uzrok i oksidativnog oštećenja ćelija⁵⁶. Slobodni radikali prema tome mogu imati fiziološku ili patološku ulogu u organizmu. Oksidativno oštećenje nastaje ili zbog povećane produkcije slobodnih radikala ili zbog nedovoljne efikasnosti antioksidativnog sistema zaštite

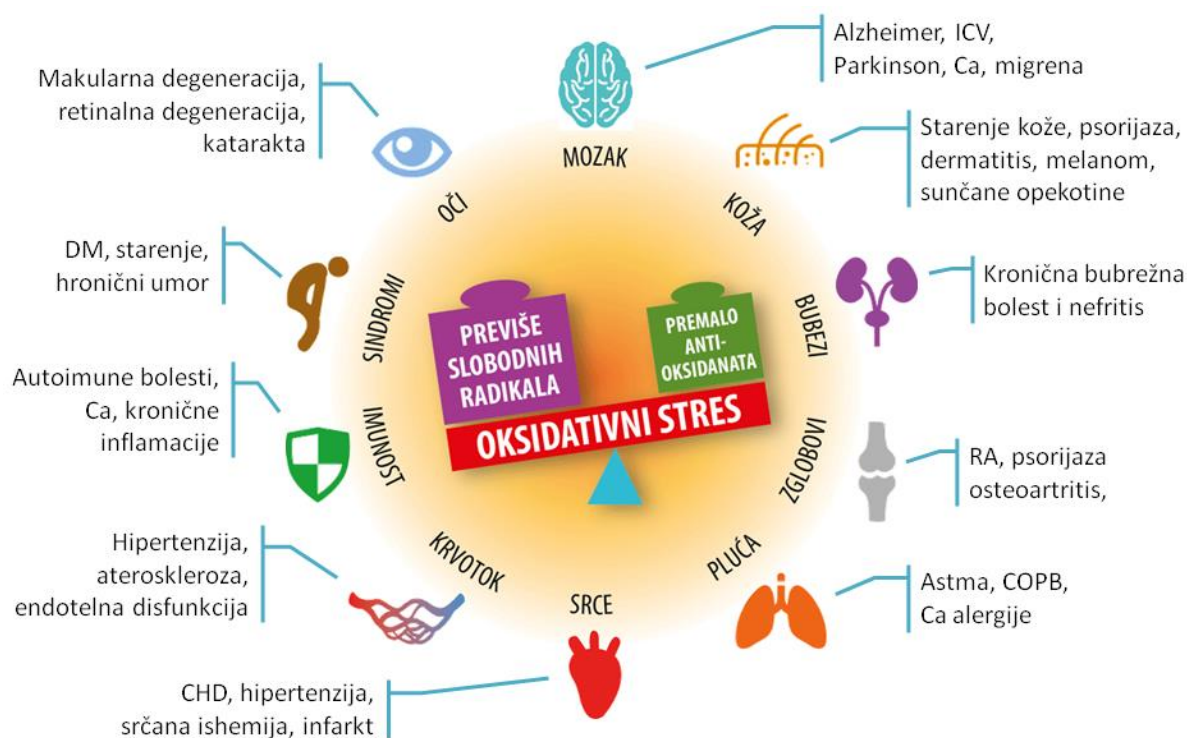
Slobodni radikali su atomi, atomske grupe ili molekuli koji sadrže jedan ili više nesparenih elektrona u poslednjoj molekulskoj, odnosno atomskoj orbitali. Nesporeni elektroni su uzrok njihove visoke reaktivnosti i nestabilnosti. Težeći da spare nesporene elektrone slobodni radikali se ponašaju kao snažni elektrofil. U reakciji sa supstratom odnosno donorom elektrona, slobodni radikali se redukuju (dobijaju elektron), a supstrat se oksidiše (gubi elektron) i postaje tzv. sekundarni slobodni radikal i otpočinje lanac radikalskih reakcija. Jednom pokrenut ovaj lanac ima osobinu prostornog i vremenskog širenja uz pojačavanje efekta⁵⁷.

Međutim, u situaciji povećanog stvaranja i/ili neadekvatnog uklanjanja slobodnih radikala dolazi do narušavanja redoks homeostaza ćelije i ispoljavanja negativnog efekta, odnosno nastanka oksidativnog stresa. Ovako stvoreni "višak" slobodnih radikala, dovodi do oštećenje ćelijskih lipida, proteina i nukleinskih kiselina. Osim toga, slobodni radikali mogu da menjaju signalnu transdukciju i ekspresiju gena, te na taj način doprinose patološkim procesima u organizmu⁵⁸.

Utvrđeno je da su slobodni radikali uključeni u patogenezu diabetes mellitusa, ateroskleroze, HIV infekcije, autoimunih, neurodegenerativnih, malignih, inflamatornih i mnogih drugih oboljenja (Lichen planus, afte, dinije i piroze). Oksidativni stres učestvuje i u procesu

starenja. Ćelijsko starenje je praćeno specifićnim funkcionalnim i morfološkim promenama, prouzrokovanim opadanjem i postepenim gašenjem mnogobrojnih ćelijskih procesa. U procesu starenja slabi prirodna antioksidativna sposobnost usled genetićki programirane redukcije u sintezi antioksidanasa, što potencira dejstvo slobodnih radikala⁵⁹.

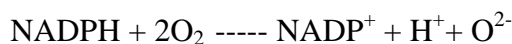
Termin reaktivne vrste se u literaturi sve više koristi umesto termina slobodni radikali imajući u vidu da su ovim pojmom obuhvaćene sve klase jedinjenja elektrofilnog karaktera visoke reaktivnosti. U zavisnosti od aktivnog centra oni se dele na reaktivne vrste sa kiseonikom (ROS), azotom (RNS), ugljenikom (RCS) i sumporom (RSS). Najznaćajnije reaktivne vrste u živim sistemima su reaktivne kiseonićne vrste (ROS) u koje se ubrajaju: superoksidni anjon (O⁻), hidroksil radikal (HO), peroksil radikal (ROO), alkoksil radikal (RO), hidroperoksil radikal (HOO), kao i neradikalske vrste: vodonik peroksid, hipohlorna kiselina, ozon, singletni kiseonik. U RNS se ubrajaju slobodno radikalske vrste kao što su nitroksilradikal (NO) i azot dioksid radikal (NO₂) kao i neradikalske vrste: azodioksid anjon, azot trioksid, nitronijum jon, peroksinirit anjon, alkil peroksinirit, nitroksil anjon, nitrozil katjon i nitril hlorid. U RCS spadaju alkil radikal (R), alkoksil radikal (RO), peroksil radikal (ROO), dok se u RSS ubrajaju tiil radikal (RS), glutatiil radikal (GS) i diglutatiil anjon radikal (GSSG). U proućavanju živih organizama najveći znaćaj imaju slobodni kiseonićni radikali (ROS) i reaktivna jedinjenja azota (RNS).



Slika 4. Oksidativni stres u oboljenjima razlićitih organa

1.2.1. Slobodni kiseonični radikali

Najznačajniji izvor stvaranja ROS svakako predstavlja proces ćelijskog disanja tj. oksidativne fosforilacije u mitohondrijama. Od ukupno unetog molekularnog kiseonika (O_2), 90% dospeva u mitohondrije, gde se tokom ćelijskog disanja, odvija četvero-elektronska redukcija O_2 do H_2O , a oslobođena energija se koristi za sintezu adenozin trifosfata (ATP). Usled slabih veza između elektrona i odgovarajućih enzima koji učestvuju u njihovom prenosu, dolazi do "curenja" elektrona i stvaranja ROS⁶⁰. Tokom ćelijskog disanja 2 % kiseonika ne podleže potpunoj redukciji do H_2O tj. učestvuje u stvaranju ROS. Zbog toga se mitohondrijalni respiratorni lanac smatra najznačajnijim izvorom O_2 . Superoksid se stvara i dejstvom NADPH kao prvi korak u reakciji fagocita tokom inflamacije, ali i u procesu apoptoze.



Superoksid anjon radikal nastaje i pri autooksidaciji flavina, pterina, kateholamina, kao i delovanjem spoljašnjih agenasa kao što je zračenje i delovanje citostatika. Može nastati i oksidacijom hemoglobina i mioglobina u methemoglobin i metmioglobin. U fiziološkim uslovima kiseonik ne izaziva toksične efekte, jer ga enzim superoksid dismutaza (SOD) transformiše u manje aktivan vodonik peroksid.



Glavno mesto stvaranja vodonik peroksida (H_2O_2) u ćelijama su peroksizomi. Vodonik peroksid poseduje brojne toksične efekte uprkos činjenici da predstavlja najstabilniji intermedijerni produkt redukcije kiseonika i iako ne predstavlja pravi slobodni radikal jer nema nesparenih elektrona. Katalaza razlaže vodonik peroksid do vode i kiseonika i na taj način smanjuje njegovu toksičnost. Oksidacija sulfhidrilnih grupa proteina u prisustvu H_2O_2 , ali i inicijacije procesa lipidne peroksidacije, u reakciji sa jonima metala dovodi do stvaranja izuzetno reaktivnog hidroksil radikala. Hidroksil radikal (HO) kao neutralni oblik hidroksil anjona predstavlja najreaktivniji intermedijerni produkt parcijalne redukcije kiseonika i ima veoma kratak poluživot, svega 10^{-9} s.

Toksičnost brojnih metala, kao što su kadmijum, arsen, nikel dr. pripisana je produkciji slobodnih radikala nastanku oksidativnog stresa. Toksični metali sa promenljivom valencom (npr. arsen) po unosu u organizam direktno dovode do stvaranja slobodnih radikala, dok oni koji imaju stabilnu valencu (npr. kadmijum) indirektno dovode do nastanka oksidativnog stresa. Interreaguju sa esencijalnim metalima (Cu, Fe, Se) na različitim nivoima, oni mogu da indirektno

usled suprimiranja antioksidativne odbrane doprinesu nastanku oksidativnog stresa. U situacijama kada dođe do oštećenja peroksizoma, veliki deo H_2O_2 se oslobađa u citoplazmu, indukujući stanje oksidativnog stresa u ćeliji⁶¹.

Vitamin C povećava bioraspoloživost Fe (oslobađa Fe iz depoa feritina), kao i što povećava njegovu resorpciju iz gastrointestinalnog trakta i time ga čini dostupnim da sa H_2O_2 (koga u oksidativnom stresu ima u povišenoj koncentraciji) produkuje HO. Tako je toksičnost H_2O_2 u prisustvu Fe povećana 10 do 1000 puta.

1.2.2. Slobodni radikali azota

Tokom normalnog metabolizma ćelije osim reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS) stvaraju se i azotni radikali (RNS). Azot monoksid (NO) nastaje oksidacijom L-arginina u prisustvu enzima azot monoksid sintetaza (NOS). U fiziološkim uslovima azot monoksid kontroliše razne ćelijske procese: tonus krvnih sudova, smanjuje adheziju i agregaciju trombocita, reguliše tonus glatkih i poprečno-prugastih mišića, učestvuje u neuroendokrinoj regulaciji; reguliše glad, bol i san⁶².

NO je neurotransmiter, a u imunom sistemu modulira citotoksičnost makrofaga. Pod određenim okolnostima NO učestvuje u izvesnim patofiziološkim procesima. Azot monoksid postoji u nekoliko hemijskih formi (NO^- , NO, NO^+) i zato ima širok dijapazon dejstva i bioloških funkcija. NO^+ i NO pokazuju zaštitna svojstva, za razliku od NO. U endotelnim ćelijama i makrofagima NO reaguje sa O_2 i gradi visoko reaktivno jedinjenje peroksinitrit (ONOO). Protonovanjem peroksinitrita nastaje peroksinitritna kiselina (ONOOH) koja je vrlo nestabilna i njeni degradacioni produkti, OH i NO_2 -azot dioksid radikal, vrlo aktivni radikali, doprinose sveukupnom citotoksičnom efektu⁶³.

Inicijalni efekti oštećenja ćelija uzrokovanih reakcijama slobodnih radikala, do skora su se u literaturi pripisivali hidroksil radikal (HO). Imajući u vidu da se reakcija između O_2 i NO odvija tri puta brže od reakcije feri-kompleksa sa O_2 , sve više se veruje sa termodinamičkog i kinetičkog aspekta, da je ključni oksidirajući agens neki od intermedijera izomeracije degradacionih produkata peroksinitritne kiseline do nitrita. Delovanje NO i ONOO na DNK može rezultirati apoptozom. Smatra se jednim od induktora nastanka aterosklerotičnih promena u krvnim sudovima, imajući u vidu da je metabolički intermedijer azot oksid koji se stvara u epitelijumu krvnih sudova⁶⁴.

1.2.3. Uloge reaktivnih kiseoničnih radikala

Kada su otkriveni, slobodni radikali su smatrani vrlo štetnim, ali se poslednjih dvadesetak godina sve više govori i o njihovim korisnim ulogama⁶⁵. Naime, za razliku od visokih koncentracija slobodnih radikala, što vodi u razvoj oksidativnog stresa koji je preduslov mnogobrojnih patoloških efekata, niske i umerene koncentracije ovih materija, koje nastaju sasvim normalno tokom metaboličke aktivnosti ćelije, igraju višestruko značajne uloge u mnogim reakcijama⁶⁶.

Neke od njih su: regulacija signalnih puteva unutar ćelije i među ćelijama, uloga hemostatikana i aktivatora leukocita, uloga u fagocitozi, zatim učesće u održavanju, promeni položaja i oblika ćelije, pomoć ćeliji tokom adaptacije i oporavka od oštećenja (npr. izazvanih fizičkim radom), uloga u normalnom ćelijskom rastu, programiranoj ćelijskoj smrti (apoptozi) i ćelijskom starenju, u sintezi esencijalnih bioloških jedinjenja i proizvodnji energije, kao i doprinos regulaciji vaskularnog tonusa, odnosno vaskularizacije tkiva⁶⁷.

Uloga u regulaciji signalnih puteva unutar ćelije podrazumeva, na primer, oksidaciju rianodinskih receptora, kojom superoksid-anjon radikal podstiče oslobađanje Ca^{2+} iz depoa u sarkoplazmatskom retikulumu skeletnomišićnih ćelija i na taj način modulira snagu voljnih mišićnih kontrakcija⁶⁸. Osim toga, i azot-oksid (NO), koga proizvode skeletni mišići, ima ulogu endogenog modulatora njihove kontraktilnosti. Naime, interakcijom sa rianodinskim receptorima ili posredstvom cGM, ovaj slobodni radikal takođe modulira oslobađanje Ca^{2+} iz sarkoplazmatskog retikuluma, tako da i on menja razdražljivost i kontraktilnost skeletnih mišića. Uz to, azot-oksid učestvuje u međućelijskoj signalizaciji i na druge načine. Funkcioniše kao jedan od neurotransmitera na sinapsama i doprinosi regulaciji vaskularnog tonusa, odnosno vaskularizaciji tkiva, tako što funkcionise kao lokalni vazodilatator⁶⁹. Učestvuje i u regulaciji angiogeneze, kontroli peristaltike, regulaciji reproduktivnih funkcija zarastanju površinskih rana, metabolizmu glukoze, aktivaciji mastocita, funkcionisanju srca.

Mnogi efekti slobodnih radikala mogu uslediti oslobađanjem ili aktivacijom sekundarnih medijatora inflamacije⁷⁰. Dosadašnje studije pokazuju da receptori za vezivanje brojnih peptidnih faktora rasta stimulišu produkciju ROS, kao i da je oksidativni prasak fagocita potreban za određeni aspekt signalizacije⁷¹. U tom smislu je potvrđena uloga oksidansa kod signalizacije koju obavljaju: insulinski faktori rasta – IGF, vaskularni endotelni faktor rasta – VEGF, faktor nekroze tumora – TNF i interleukin 1 β – IL-1 β . Dalji dokaz veze između nastanka ROS i prenosa signala pruža podatak da TRAF4, koji je sastavni deo TNF, prenosi signal tako što se vezuje direktno za komponentu kompleksa NADPH-oksidaza.

Budući da su reaktivne kiseonične vrste moćni hemoatraktanti i aktivatori leukocita, esencijalne su i za antimikrobnu aktivnost i uklanjanje ćelijskih ostataka. Razarenje tkiva pomoću slobodnih radikala, posebno sa hidroksilnim radikalom (OH^\cdot), stimuliše antimikrobnu aktivnost fagocitnih ćelija za vreme respiratornog praska. Za odbranu domaćina je posebno važna sposobnost neutrofilnih granulocita za produkciju ROS i njihovu specifičnu upotrebu u borbi protiv mikroorganizama⁷². Naime, leukociti proizvode slobodne kiseonične radikale tokom fagocitoze. Respiratorni prasak otpočinje odmah po unosu stranog tela u fagocit (npr. neutrofilni granulocit ili monocit), a podstiču ga neki citokini (npr. IL1 i TNF), pod dejstvom NADPH-oksidade, multienzimskog sistema koji generiše sintezu slobodnih kiseoničnih radikala.

U mitohondrijama fagocita dolazi do konverzije molekuskog kiseonika u slobodne radikale i neke neradikalske agense, odnosno u: superoksidni anjon radikal ($\text{O}_2^{\cdot-}$), hidroksilni radikal (OH^\cdot), hipohlorastu kiselinu (HOCl), vodonik-peroksid (H_2O_2) i singletni kiseonik (1O_2). Tako, aktivacijom NADPH-oksidade nastaje superoksid anjon radikal, a njegovom dismutacijom se dobijaju vodonik-peroksid i singletni kiseonik⁷³.

Istovremeno, lizozomalna mijeloperoksidaza (MPO) omogućava nastanak hipohloraste kiseline – HOCl , i hidroksilnog radikala – OH^\cdot . Njihova proizvodnja je neophodna, zato što omogućavaju uništavanje materije unete u fagozome. Ovo podstiču tako što oksidacijom inaktiviraju membranske lipide, najrazličitije intracelularne proteine (npr. enzime i receptore), genetski materijal (DNA i RNA) i sl. Superoksid anjon radikal, hipohlorasta kiselina i hidroksilni radikali mogu reagovati sa nezasićenim masnim kiselinama membranskih lipida, tako što iniciraju njihovu peroksidaciju⁷⁴.

Konačno, proizvedeni slobodni radikali, svaki na svoj način, doprinose liziranju bakterijskih ćelija u roku od 30 do 60 minuta, naravno, uz veliki utrošak kiseonika. Zato se kiseonični radikali i druge toksične vrste, proizvedene od strane NADPH-oksidade i MPO, smatraju direktno odgovornim za uništavanje mikroorganizama. Međutim, značajno je istaći da oni nisu dovoljni za uništavanje bakterija, već je za to najvažnije oslobađanje neutrofilnih proteaza⁷⁵.

Osim slobodnih radikala koje dobijaju zahvaljujući aktivnosti NADPH-oksidade i mijeloperoksidaze, makrofagi proizvode i citolitični azot-oksid koga koriste za uništavanje, ne samo bakterija, nego i malignih i tumorskih ćelija sopstvenog organizma. Iako sam nije jako toksičan, fagocitni azot-oksid je jako važan jer reaguje sa vodonik-peroksidom ili superoksidnim anjonom i tako omogućava proizvodnju jako toksičnog peroksinitritnog radikala (ONOO^\cdot) i azot(IV)-oksid radikala (NO_2^\cdot) koji ubijaju bakterije, gljivice, helminte i tumorske ćelije. Doprinos ROS koji nastaju u fagocitima nije samo u degradacija patogena i

oštećenih ćelija sopstvenih tkiva, nego i u tome što aktivirani fagociti oslobađaju ROS i da bi indukovali migraciju leukocita, jer su moćni hemoatraktanti i aktivatori ovih ćelija, i kako bi razvili inflamatorni odgovor, kojim otpočinje oslobađanje drugih inflamatornih medijatora, kao što su: eikosanoidi, citokini i proteaze⁷⁶.

Od ostalih fizioloških uloga slobodnih radikala treba istaći učešće u integrinima posredovanom, održavanju, promeni položaja i oblika ćelija⁷⁷. Osim toga, stimulacijom transkripcionih faktora (HSP1, NF-*κ*B), slobodni radikali kontrolišu gensku ekspresiju i tako podstiču sintezu proteina i normalan rast ćelija. Neosporno je da slobodni radikali pomažu adaptaciju i oporavak tkiva posle oštećenja na više načina. Naime, podstiču oštećene ćelije da uđu u programiranu ćelijsku smrt – apoptozu, a takođe indukuju privlačenje leukocita u oštećeno tkivo, aktiviraju ih i, kao što je već opisano, značajno učestvuju u njihovoj fagocitnoj ulozi. Na taj način, slobodni radikali potpomažu uklanjanje oštećenih ćelija iz tkiva i tako ubrzavaju njihov oporavak⁷⁸. Ako se tome doda i ulogu slobodnih radikala u podsticanju sinteze nekih biološki aktivnih jedinjenja (npr. NO, kao vazodilatatornog i angiogenog transmitera) i stimulaciji normalnog rasta ćelija, jasno je da su oni uključeni u kompletan tok oporavka tkiva, od uklanjanja oštećenih ćelija do njihove zamene novim. Međutim, ovde se mora istaći da, osim u uklanjanju oštećenih ćelija, slobodni radikali učestvuju i u ćelijskom starenju⁷⁹.

Slobodni radikali su uključeni i u proizvodnji energije. Tako, azot-oksidi imaju ulogu u metabolizmu glukoze. On je potreban i za diferencijaciju razvojnih oblika eritrocita, jer inhibira rast, diferencijaciju i hemoglobinizaciju primarnih ćelija eritrocitne loze. Ako imamo u vidu mnoštvo navedenih, potpuno fizioloških i veoma korisnih delovanja najrazličitijih slobodnih radikala, jasno je da su oni neophodni za život i opstanak, ali naravno, samo kada se sintetišu u normalnim količinama, jer čim njihova sinteza prevaziđe kapacitet tzv. antioksidativne odbrane organizma dolazi do oksidativnog stresa⁸⁰. On se manifestuje najrazličitijim oštećenjima biomolekula (proteina, DNK, lipida i ugljenih hidrata) i, shodno tome, vodi u seriju poremećaja funkcija različitih ćelija, tkiva, pa i kompletnog organizma⁸¹.

1.2.4. Lipidna peroksidacija

Lipidna peroksidacija je proces oksidativnog oštećenja lipida. Ćelijska membrana kao i membrane subćelijskih organela predstavljaju mesto gde otpočinje oksidativno oštećenje lipida, tj. lipidna peroksidacija (LPO) usled velike zastupljenosti lipida u njima. Kao posledica oštećenja lipida ćelijske membrane dolazi do smanjenje fluidnosti, povećane propustljivosti za jedno i dvovalentne jone, inaktivacije membranskih enzima i gubitka integriteta

membrane. Ruptura lizozomskih membrana oslobađa hidrolitičke enzime, što sveukupno dovodi do vitalnih ćelijskih poremećaja i na kraju do smrti ćelije^{82,83}. Ozbiljnost ćelijskog oštećenja zavisice od toga na kojim subćelijskim membranama (organele, jedro) se odvija lipidna peroksidacija.

Ovaj proces može biti započet enzimskim putem ili neenzimskim putem⁸⁴. Enzimski put podrazumeva delovanje lipooksigenaze, ciklooksigenaze i citohrom P450 katalizovane reakcije, dok neenzimski put predstavlja delovanje slobodnih radikala na nezasićene lipide membrana (autooksidacija i fotooksidacija)⁸⁵.

Produkti lipidne peroksidacije imaju dug poluživot, veoma su reaktivni, zbog čega mogu da utiču na brojne druge biomolekule, proteine i nukleinske kiseline. Zbog toga su oni proaterogeni, proinflamatorni, potencijalno toksični, mutageni i karcinogeni⁸⁶. Međutim, produkti lipidne peroksidacije imaju i neke biološke funkcije. Naime, oni učestvuju u intracelularnom prenošenju signala, regulaciji genske ekspresije, aktivaciji transkriptora i faktora rasta⁸⁷.

Peroksidacija polinezasićenih masnih kiselina (PNMK) protiče kroz tri stadijuma: inicijaciju, propagaciju i terminaciju. Proces inicijacije podrazumeva pokretanje lančanih reakcija, kada se generišu lipidni radikali ($R\cdot$ – alkil radikal). Propagaciona faza se nadovezuje na prethodnu i podrazumeva reakciju lipidnog radikala ($R\cdot$) sa molekularnim kiseonikom (O_2), pri čemu nastaje peroksil radikal ($ROO\cdot$). Peroksil radikal je nosilac dalje propagacije lipidne peroksidacije, koji brzo i lako reaguje sa sledećom masnom kiselinom. Lipidna peroksidacije se završava pretvaranjem vodonik peroksida u sekundarne neradikalne molekule – ugljen vodonike, aldehide, alkohole i ketone ili stvaranjem polimera. Prisustvo antioksidanta olakšava okončanje lančane reakcije, a konačni efekti lipidne peroksidacije zavisice od krajnjih produkata. Malondialdehid (MDA), terminalni produkt oksidativnog oštećenja PNMK, uanarsno se vezuje za proteine i fosfolipide membrane, čime se produbljuje oksidativno oštećenje biomolekula i priznat je kao validan marker LPO. Jedan od najznačajnijih mehanizama dejstva lipidne peroksidacije i hidroperoksida je njihov uticaj na homeostazu natrijuma i kalijuma. Oni aktiviraju Ca^{2+} -ATP-azu kao i Na^+ - K^+ - ATP-azu pri čemu dolazi do slobodnog prolaza Ca^{2+} jona u ćeliju što se inače ne dešava.

Poremećena koncentracija Ca^{2+} jona unutar i van ćelije dovodi do aktivacije intracelularnih hidrolaza čime se oštećuju membranski fosfolipidi, citoskelet i membranske subcelularne organele. Na ovaj način posebno dolazi do oštećenja mitohondrija. Merenje malondialdehida kao produkta lipidne peroksidacije najčešće se koristi kao pokazatelj inteziteta ovog procesa tj. mere oksidativnog stresa uopšte⁸⁸.

Istraživanja pokazuju da je nivo MDA povišen u tumoru pluća, dojke, želuca, grlića materice, u hroničnoj limfocitnoj leukemiji, u melanomu, u preeklampsiji, kod pacijenata sa aterosklerozom, dijabetesom, oboljenjima jetre, pacijenata sa Alchajmerovom bolešću, kod pušača, kao i kod lichen planusa, afti⁸⁹. Slobodni radikali mogu delovati direktno na protein ili oksidacija proteina može biti posledica oksidacije druge vrste molekula (lipida ili ugljenih hidrata). Tako na primer, procesi lipidne peroksidacije pored lipida deluju i na proteine⁹⁰.

Visoko reaktivni produkti lipidne peroksidacije reaguju sa slobodnim SH i NH₂ grupama aminokiselina, peptida, proteina i nukleotida što dovodi do izmenjene funkcije ovih molekula. Naime, jedan od produkata procesa lipidne peroksidacije-malondialdehid (MDA) može reagovati sa slobodnim amino grupama proteina i nukleinskih kiselina i dovesti do novog oštećenja ćelija.

1.2.5. Uloga slobodnih radikala u patogenezi oboljenja usne duplje

U odbrani tkiva usne duplje od štetnog delovanja slobodnih radikala veliki značaj imaju pljuvačka i gingivalna tečnost sa svojim antioksidantima. Sve dok postoji ravnoteža između produkcije slobodnih radikala i aktivnosti antioksidativnog sistema odbrane, ne dolazi do oksidativnog oštećenja oralnih tkiva. Međutim, u slučaju disbalansa između produkcije slobodnih radikala i smanjene sposobnosti antioksidanata prisutnih u usnoj duplji da ih neutrališu, dolazi do oksidativnog stresa, koji može biti biohemijska osnova za nastanak mnogih oralnih oboljenja.

1.2.5.1. Uloga slobodnih radikala u patogenezi inflamatornih oboljenja oralne sluzokože

Inflamacija oralnih tkiva prouzrokovana je različitim stimulansima, kao što su mehanički, hemijski ili infektivni agensi. Kao deo imunog odgovora organizma oslobađaju se inflamatorni medijatori koji omogućavaju hemotaksu odbrambenih ćelija na mesto inflamacije⁹¹. U odbrani oralnih tkiva od patogenih mikroorganizama „prvu liniju“ predstavljaju polimorfonuklearni leukociti (PMN). Interakcijom leukocita i bakterija pokreću se biohemijski i fiziološki procesi domaćina koji dovode do neutralisanja patogena, ali i mogućeg oštećenja lokalnog tkiva⁹². Polimorfonuklearni leukociti, indukovani patogenima, karakterišu se povećanom potrošnjom kiseonika i u njima se dešava prava „respiratorna eksplozija“, tj. povećana je produkcija slobodnih radikala (superoksid anjon, vodonik peroksid, hidroksilni radikal i dr). Oslobođeni radikali, oksidativnim mehanizmom narušavaju strukturu bakterijske ćelijske

membrane i na ovaj način „ubijaju“ bakterije⁹³. Međutim, tokom ove odbrambene reakcije, a posebno u uslovima hiperprodukcije radikala, može doći i do oksidativne modifikacije različitih biomolekula domaćina i oštećenja oralnih tkiva, kao neka vrsta „kolateralne štete“.

1.2.5.2. Uloga slobodnih radikala u patogenezi oralnog karcinoma

Oralni karcinomi su najčešći maligni tumori glave i vrata sa incidencom preko 300000 novih slučajeva godišnje u svetu. Karakterišu se visokim stepenom morbiditeta i mortaliteta (preko 50 %). Glavni indukujući agens ovog oboljenja je pušenje cigareta (više od 90 % obolelih su pušači). Različiti agensi duvanskog dima direktno i indirektno oštećuju epitelne ćelije oralne mukoze, što rezultuje njihovom mutacijom i malignom transformacijom⁹⁴.

Mehanizam direktnog oštećenja epitelnih ćelija oralne mukoze se odnosi na dejstvo toksičnih aldehida (akrolein i acetaldehid) prisutnih u duvanskom dimu. Međutim, u patogenezi oralnog karcinoma evidentno je ištetno delovanje ROS i RNS koji dovode do oksidativne modifikacije biomolekula, što vodi ka malignoj transformaciji epitelnih ćelija oralne mukoze.

Slobodni radikali duvanskog dima ne oštećuju direktno epitelne ćelije oralne mukoze, jer su nisko reaktivni (vodoni peroksid). Međutim, u salivi ovi nisko reaktivni slobodni radikali transformišu se u visoko reaktivne (hidroksi radikali). Ovo se dešava posredstvom jona metala promenljive valence (gvožđe) i askorbinske kiseline, čije se prisustvo dokazuje u salivi. Transformacija niskoreaktivnih slobodnih radikala duvanskog dima u prisustvu gvožđa salive u visokoreaktivne dešava se po principu Fentonove i Haber-Weissove reakcije⁹⁵.

Pored toga, pušenje cigareta uzrokuje i smanjenje antioksidativne zaštite tkiva usne duplje. U ovim uslovima su u prednosti slobodni radikali koji, zbog svoje izrazite reaktivnosti, mogu izvršiti oksidativnu modifikaciju DNK ćelija oralnih tkiva, što direktno vodi ka njihovoj malignoj alteraciji. Iz gore navedenog može se steći pogrešan zaključak da saliva svojim sastojcima nepovoljno utiče na održavanje integriteta oralnih tkiva, a upravo je suprotno. Brojni literaturni podaci govore o neprocenjivom značaju salive u održavanju oralne homeostaze (antioksidativna zaštita, specifična i nespecifična antimikrobna zaštita, samočišćenje oralne sredine, održavanje fizioloških vrednosti pH, zaštita zubne gleđi od demineralizacije, održavanje integriteta oralne mukoze i sprečavanje njene kolonizacije mikroorganizmima)⁹⁶.

Samo pod nepovoljnim okolnostima kao što je pušenje cigareta, saliva, na nesreću postaje „prooksidantni milje“ što rezultuje oksidativnim oštećenjem oralnih tkiva. Toksične komponente iz duvanskog dima utiču na promenu antioksidativnog kapaciteta oralne sredine, a posebno salive, kao sekreta koji je najčešće analiziran u istraživanjima ⁹⁷.

U duvanskom dimu je prisutan hidrogen cijanid (HCN) koji se u jetri metaboliše do sumpor cijanida (SCN). Zatim se joni SCN iz krvi transportuju do pljuvačnih žlezdi gde ultrafiltracijom dospevaju u salivu. Koncentracija SCN u salivi nepušača je od 0,3 – 1,5mM, dok je u salivi pušača 1.4-4mM, a što zavisi od broja cigareta popušanih u toku dana. Joni SCN u prisustvu oralne peroksidaze reaguju sa vodonik peroksidom u usnoj duplji. Međutim, ustanovljeno je da se aktivnost peroksidaze prisutne u usnoj duplji značajno smanjuje kod pušača, u odnosu na nepušače. Smanjene aktivnosti ovog enzima u oralnoj sredini kod pušača omogućava da vodonik-peroksid uz sadejstvo sa salivarnim gvožđem pređe u visoko reaktivni hidroksilni radikal. Pušenje cigareta ima za posledicu smanjenje koncentracije i ne-enzimskih antioksidanata u salivi, kao što je slučaj sa glutathionom. Autori ovo objašnjavaju interakcijom duvanskog dima i SH grupa glutathiona, kada se formiraju nefunkcionalni konjugati ⁹⁸.

Disbalans između povećane produkcije visokoreaktivnih slobodnih radikala i smanjene antioksidativne sposobnosti salive dovodi do oksidativne modifikacije biomolekula oralnih tkiva. Slobodni radikali indukuju oksidaciju polinezasićenih masnih kiselina fosfolipda u plazma membranama ćelija (lipidna peroksidacija)⁹⁹.

Uloga NO u patogenezi oralnih tumora je kompleksna, s obzirom da može imati stimulatívni i inhibítorni efekat na nastanak i tok ovih oboljenja, a što zavisi od njegove lokalne koncentracije. Istraživanja su ukazala na povećanu koncentraciju NO u krvnom serumu pacijenata obolelih od oralnog karcinoma, u odnosu na zdrave ispitanike. Takođe, brojne studije potvrđuju povećanu ekspresiju enzima NOS u tumorskom tkivu, kao i pozitivnu korelaciju njihove ekspresije i progresije tumora. Oksidativnom modifikacijom DNA posredstvom RNS kao krajnji proizvod nastaje 8-nitroguanin. U tkivu leukoplakije (prekancerozno oboljenje) dokazana je povećana koncentracija ovog biomarkera oksidativne modifikacije DNA indukovanu dejstvom NO.

1.3. LOKALNI I SISTEMSKI PARAMETRI ZAPALJENJA U PLJUVAČCI

IL-6 (interleukin 6) je inflamatorni citokin sa različitim biološkim funkcijama. Humani IL-6 je glikozilirani protein molekulske težine 26 kD. Gen za IL-6 je lociran na 7. hromozomu. Region promotora gena IL-6 sadrži važne elemente kontrole transkripcije koji su regulisani uz pomoć NF- κ B. Receptor za IL-6 se sastoji od 2 glikoproteinska lanca α i β . α lanac ima molekularnu težinu 80000, nema citoplazmatsku komponentu i veže se za β lanac molekularne težine 130000 koji prenosi signal u citoplazmu. Aktivirani monociti su glavni izvor IL-6 u krvi¹⁰⁰. Kada dodje do inflamacije usled prisustva određenih materijala koji se koriste za izradu stomatoloških protetskih nadoknada, monociti i makrofazi su prve reaktivne ćelije koje proizvode IL-6. IL-6 pre svega aktivira ekspresiju i aktivaciju T limfocita, aktivira diferencijaciju B limfocita i reguliše fazu akutnog odgovora¹⁰¹. Fibroblasti i neki tumori kao što je cervikalni karcinom i mijelom spontano stvaraju IL-6¹⁰².

IL-1b i TNF su glavni aktivatori ekspresije IL-6, kao i prostaglandini, adipokini i citokini koji takodje regulišu sintezu IL-6¹⁰³. Sada je poznato da IL-6 deluje i kao hormon što doprinosi nastanku oralnog karcinoma, lichen planusa, insulinskoj rezistenciji, mitohondrijalnoj aktivnosti, neuroendokrinoj regulaciji. Proizvode ga i aktivirani T i B limfociti, monociti, endotelne stanice, epitelne stanice, fibroblasti kao i ćelije nekih tumora. Njegova ekspresija uzrokovana je raznim stimulusima kao što su TNF, IL-1, faktor rasta iz trombocita i supstance koje aktiviraju B i T limfocite i makrofage¹⁰⁴.

Glavne aktivnosti IL-6 uključuju sinergistički efekat IL-1 i TNF kako bi se stimulisali T limfociti, izazvao odgovor proteina akutne faze u ćelijama jetre i centra za termoregulaciju u hipotalamusu, podsticaj za replikaciju B limfocita, njihovu diferencijaciju i proizvodnju imunoglobulina, aktivaciju hematopoeze i trombopoeze. IL-6 je takodje jako efektan u aktiviranju sinteze glikokortikoida i u stanju je nezavisno stimulisati aktivnost osteoklasta i rast keratinocita. Nivo IL-6 je značajno povećan kod pacijenata sa oralnim karcinomom¹⁰⁵. IL-6 oslobođen u toku inflamatornog odgovora dovodi do rasta tumora, dok tumor raste stimuliše inflamatorni odgovor rezultujući inflamatornu progresiju¹⁰⁶.

Imunoglobulini su prisutni i u pljuvački gde imaju ulogu zaštite, naročito IgA koga proizvode plazma ćelije pljuvačnih žlezda i čiji su najreprezentativniji tip imunoglobulina u pljuvački i koji sa subgingivalnom mikroflorom imaju zaštitnu ulogu protiv oralnih bakterija. IgA predstavlja prvu liniju odbrane domaćina protiv patogena i prolazi kroz mukoznu mem-

branu što pomaže u sprečavanju ulaska infektivnih mikroorganizama¹⁰⁷. Sekretorni IgA pomaže u održavanju integriteta oralnih površina tako što smanjuje vezivanje mikroba za epitel i površine zuba neutrališući: enzime, toksine i viruse; ili delujući u sinergiji sa drugim antibakterijskim faktorima kao što su lizozimi, laktoferin, salivarna peroksidaza i mucin. IgA može sprečiti prodiranje antigena(kao što su metalni joni) u oralnu mukozu. Formira prvu liniju odbrane protiv patogena u usnoj duplji¹⁰⁸. Obzirom da IgA igra važnu ulogu u zaštiti od patogena, antitela takođe štite od periodontalnih bolesti¹⁰⁹.

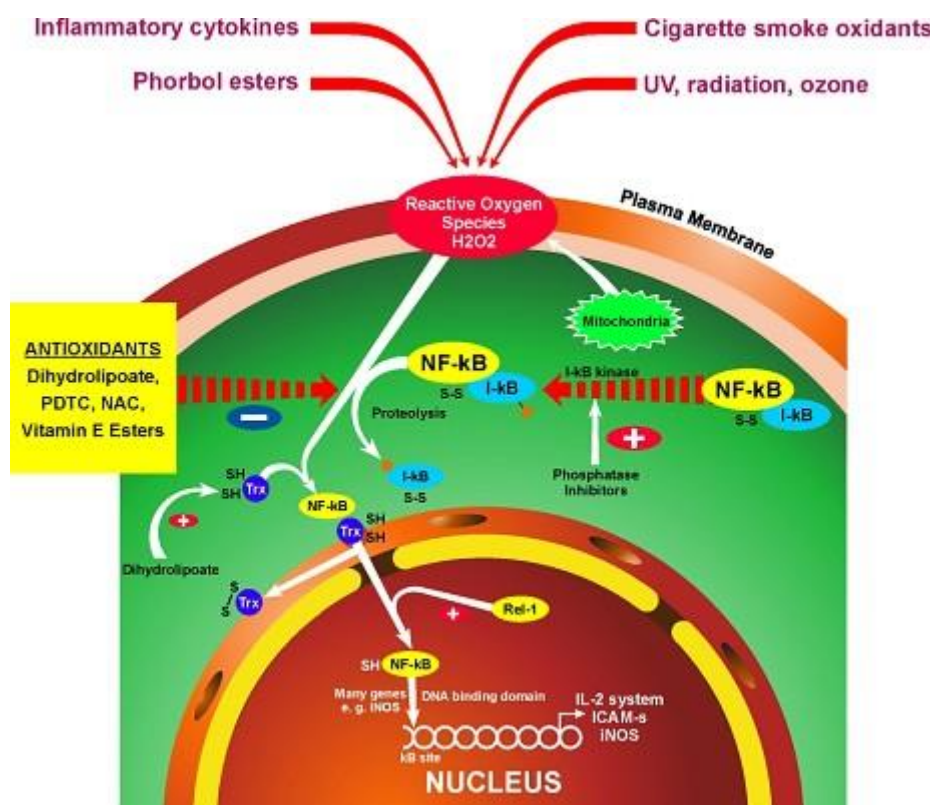
Smanjenje imunoglobulina u pljuvački može ukazati na povećan rizik oralne mukoze na patogene mikroorganizme uključujući periodontalne patogene¹¹⁰. Smanjen nivo IgA u pljuvački je u vezi sa povećanjem stepena gingivalne inflamacije¹¹¹. Brojne studije obaveštavaju o povećanom nivou IgA u akutnoj fazi i smanjenju u fazi remisije¹¹².

C-reaktivni protein (CRP) je marker inflamacije za koga je u brojnim prospektivnim studijama dokazano da predviđa nastanak infarkta miokarda, moždanog udara, perifernih arterijskih oboljenja i iznenadnu srčanu smrt kod naizgled zdravih muškaraca i žena^{113,114,115}. U pljuvački se može da promeni njegova koncentracija naročito u toku hronične parodontopatije i kao posledica prisutnosti metalnih jona i molekula akrilata koji su glavni sastojci stomatoloških materijala. Kao odgovor na povredu ili infekciju tkiva, CRP se sintetiše u jetri odnosno u hepatocitima. Produkcovanje stimulišu citokini, posebno interleukin IL-6, interleukin IL-1, faktor tumorske nekroze alfa¹¹⁶.

1.4. ZNAČAJ APOPTOZE U OBOLJENJIMA USNE DUPLJE

NF-kB označava naziv za grupu transkripcijskih faktora uključenih u regulaciju brojnih bioloških procesa. Postoje pet gena: NF-B1 (p50/105), NFB2(p52/100), RelA (p65), c-Rel i RelB¹¹⁷. Različiti okidači poput citokina, faktora rasta, prisustvo molekula akrilata u usnoj duplji ili metalnih jona mogu da podstaknu aktivaciju NF-B. Poznata su tri aktivacijska puta NF-kB; klasični, alternativni i atipični. Klasični put aktivacije NF-B posledica je odgovora na infekcije mikroorganizmima ili izlaganju proinflamatornim hemokinima. Alternativni put aktivacije dovodi do selektivne aktivacije p50:RelB dimera indukcijom p100 prekursora proteina, a njegova je aktivacija podstaknuta prisustvom molekula TNF. Alternativni put aktivacije je bitan za razvitak limfoidnih organa i stečenog imunološkog odgovora. Uloga NF-kB u tumorima može se posmatrati u sklopu regulacije apoptoze, procesa angiogeneze, sticanja osobina invazivnosti tumorskih ćelija, kao i u regulaciji ćelijskog ciklusa¹¹⁸. Aktiva-

cija NF- κ B može biti indukovana delovanjem citokina, hemokina, faktora rasta, adhezijskim molekulima, antigenim receptorima, ili drugim molekularnim putevima. NF- κ B reguliše pro-inflamatornu proizvodnju citokina, angažovanje leukocita ili preživljavanje ćelija, koje su važne da dođe do inflamatornog odgovora¹¹⁹. Takođe, antiapoptotička funkcija NF- κ B je prisutna u zaštiti od zapaljenja, utiče na opstanak epitelnih ćelija gingivalnog sulkusa i sluzokože usne duplje, a takođe održava inflamatorni odgovor aktivacijom leukocita¹²⁰. Nasuprot tome, NF- κ B može da promoviše apoptozu leukocita u određenim kontekstima i doprinosi rešavanju zapaljenja¹²¹.



Slika 5. Signalna transdukcija NF- κ B

2. CILJ RADA

Ciljevi ovog istraživanja su bili:

1. praćenje dinamike lokalnih i sistemskih parametara zapaljenja (C reaktivnog proteina, Interleukina 6 i Imunogloblina A) nakon aplikacije fiksnih ili mobilnih stomatoprotetskih nadoknada, u različitim vremenskim intervalima
2. procena nivoa oksidativnog strsa, kroz parametre oksidativne modifikacije proteina, lipida i enzima katalaze, nakon aplikacije fiksnih ili mobilnih stomatoprotetskih nadoknada u različitim vremenskim intervalima
3. analiza intenziteta apoptoze (merene kroz NF- κ B) u pljuvački ispitanika u različitim vremenskim intervalima, nakon aplikacije fiksnih ili mobilnih stomatoprotetskih nadoknada

3. MATERIJAL I METODE ISTRAŽIVANJA

3.1. MESTO IZVOĐENJA ISTRAŽIVANJA

Istraživanje je sprovedeno na Klinici za stomatologiju u Nišu, laboratoriji katedre za biohemiju, kao i Centu za biomedicinska istraživanja Medicinskog fakulteta u Nišu.

U istraživanje je uključeno 80 ispitanika, i to 40 kod kojih se ispituju efekti fiksnih proteza i 40 kod kojih se ispituju efekti mobilnih stomatoloških protetskih nadoknada na biohemijske parametre u pljuvački.

1) Za prvu grupu u istraživanju je odabrano **40 stomatoloških pacijenata**, koji do sada nisu imali u ustima nijednu protetsku nadoknadu (ni fiksnu ni mobilnu protetsku nadoknadu), a kod kojih je indicovana izrada fiksnih protetskih nadoknada.

Prvi uzorak pljuvačke, koji je uziman pre početka bilo kakve intervencije, se koristio kao kontrolna grupa. *Drugi uzorak* se uzimao 24 sata nakon brušenja zuba, zbog izbegavanja krvi u pljuvački. *Treći uzorak* pljuvačke se uzimao neposredno posle cementiranja *fiksne* protetske nadoknade. *Četvrti uzorak* se uzimao 24 sata nakon cementiranja. *Peti uzorak* se uzimao 7 dana nakon cementiranja, a *šesti* 30 dana nakon cementiranja.

2) Za prvu grupu u istraživanju je odabrano **još 40 stomatoloških pacijenata**, koji do sada nisu imali u ustima nijednu protetsku nadoknadu (ni fiksnu ni mobilnu protetsku nadoknadu), a kod kojih je indicovana mobilna protetska nadoknada.

Kod pacijenata kod kojih je neophodna izrada *mobilnih* nadoknada *prvi uzorak* se uzimao pre početka intervencije i koristio se kao kontrolna grupa. *Drugi uzorak* pljuvačke se uzimao neposredno nakon aplikacije proteze u usta pacijenta. *Treći uzorak* se uzimao 24 sata nakon predaje proteze. *Četvrti uzorak* pljuvačke se uzimao 7 dana nakon predaje proteze, a *peti uzorak* 30 dana nakon predaje proteze.

3.2. UZIMANJE MATERIJALA ZA BIOHEMIJSKA ISPITIVANJA

Svi uzorci pljuvačke su sakupljeni na sledeći način: uz pomoć cevčice pacijenti usmeravaju pljuvačku u ependorf epruvete. Da bi pospešili lučenje pljuvačke, pacijenti „misle“ na svoju omiljenu hranu i simuliraju pokrete žvakanja.

Ova metoda ima mnogo prednosti:

1. veća količina pljuvačke može da se sakupi relativno brzo (3-5 min)
2. potrebna količina se verifikuje vizuelno
3. dobijeni uzorak je mešavina svih salivarnih žlezdi
4. procedura je jednostavna i jeftina za upotrebu.

Uzimano je 2 ml pljuvačke nakon čega se ona zamrzavala na -80°C , što uzorke čuva od degradacije nekih salivarnih komponenti i sprečava aktivnost proteolitičkih enzima i rasta bakterija, i odmrzavana je neposredno pre određivanja biohemijskih parametara.

U pljuvački su određivani sledeći biohemijski parametri:

1. Oksidativnog stresa (koncentracija malondialdehida-MDA, produkti oksidacije proteina-AOPP, aktivnost enzima katalaze-CAT)
2. Apoptoze (NF- κ B)
3. Zapaljenja (visoko osetljivog C-reaktivnog proteina (hsCRP))
4. Salivatorni imunoglobulin A (IgA)
5. Salivatorni interleukin-6 (IL - 6)

Biološki materijal je uziman tokom redovnih stomatoloških aktivnosti za vreme izrade kako fiksnih tako i mobilnih stomatoloških protetskih nadoknada. Podaci koji su dokumentovani u cilju istraživanja obuhvataju: osnovne podatke pacijenta (godina rođenja i pol), vreme uzimanja uzoraka pljuvačke, metode obrade biološkog materijala. Radi lične dokumentacije ispitivača svaki uzorak je obeležen i ostaje samo u dokumentaciji ispitivača. Identitet ispitanika (zdravog ili pacijenta) ostao je anoniman.

Istraživanje je odobreno od strane Etičkog komiteta odlukom broj 01-6481-21 Medicinskog fakulteta u Nišu od 24.09.2013.godine.

3.3. BIOHEMIJSKE METODE

- a. **Koncentracija malondialdehida (MDA)** je određivana spektrofotometrijski po metodi Andreeve i sar. (1988)¹²². Ukupna koncentracija MDA je izražena u nmol/mg proteina
- b. **Koncentracija AOPP** u pljuvački je određivana spektrofotometrijskom metodom po Witku i sar (1996)¹²³, koja bazira na reakciji AOPP sa kalijum-jodidom u kiseloj sredini. Intenzitet boje se čita na 340 nm. Koncentracija se izražava u μ mol/mg hloramina T.
- c. **Aktivnost enzima katalaze (CAT)** određivana je spektrofotometrijski, po metodi Goth-a i sar. (1991)¹²⁴. Aktivnost katalaze je izražena u U/mg proteina.
- d. **Detektovanje NF- κ B** je obavljeno tako što su uzorci pljuvačke distribuirani u 96 bunarčića zajedno sa bikarbonatnim puferom pH 9,6. Posle 12 sati, uzorci su isprani 2 puta, a zatim i inkubirani sa anti - NF - κ B primarnim antitelima, isprana tri puta, i inkubirani sa FITC - konjugovanim sekundarnim antitelom. Intenzitet srednja fluorescencija (MFI; logaritamska skala) uzoraka je određen i analiziran na Victor TM višeslojnom čitaču (Perkin Elmer - Wallace, Wellesley, MA). Rezultati su dobijeni nakon oduzimanja vrednosti kontrolnih uzorka tretiranih sa sekundarnim antitelima i izražavani u mg proteina¹²⁵.
- e. **C-reaktivni protein** je određivan visokosenzitivnom metodom uz korišćenje komercijalnih imunoesej kitova Siemens Helathcar a testovi su rađeni na Behring Nefelometrijskom AnalizatoruII^{®126}. Ispitanici sa vrednostima visokosenzitivnog CRP (*highsensitiveCRP*, hs-CRP) > 10mg/L su isključeni iz studije s obzirom da takva vrednost hs-CRP ukazuje na postojanje akutne inflamatorne bolesti. Vrednosths-CRP < 1 mg/L, označavaju mali rizik za kardiovaskularne bolesti; od 1–3 mg/L = umereni rizik; od 3–10 mg/L=visoki rizik
- f. **Salivatorni interleukin-6 (IL-6)** je određivan ELISA metodom uuzorcima salive korišćenjem kvantitativnog sendvič imunoenzimskog testa (R&DSystemsInc, Mineapolis, MN, USA)¹²⁷.
- g. **Salivarni IgA**(RnD Systems, Minneapolis, USA) jeodređivan ELISA metodom u uzorcima salive korišćenjem kvantitativnog sendvič imunoenzimskog testa (R&D Systems Inc, Mineapolis, MN, USA)¹²⁸.

3.4. STATISTIČKE METODE

Kvantitativna statistička analiza je sprovedena na računaru. Za upisivanje, rangiranje, grupisanje, tabelarno i grafičko prikazivanje podataka korišćen je Excel program iz Microsoft Office 2007 programskog paketa. Proračuni su vršeni korišćenjem SPSS programa u verziji 18.0. U svim analizama je kao granica statističke značajnosti podrazumevana greška procene od 0,05 ili 5%.

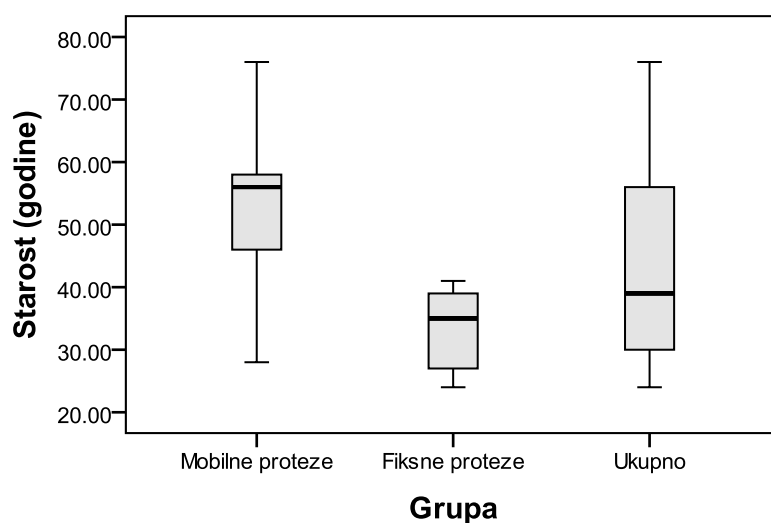
Poređenje vrednosti numeričkih obeležja između dve grupe ispitanika vršeno je Studentovim t testom ili Man-Vitni U testom (Mann-Whitney U test), kada distribucija vrednosti nije ispunjavala zahteve normalnog rasporeda. Testiranje normalnosti rasporeda vršeno je primenom Šapiro-Vilkovog (Shapiro-Wilk) testa.

Procena efekata vremena i vrste intervencije na promene vrednosti biohemijskih pokazatelja zapaljenja, nivoa oksidativnog stresa i intenziteta apoptoze u toku ispitivanja vršena je analizom varijanse za ponovljena merenja (Repeated Measures ANOVA).

4. REZULTATI

Prosečna starost svih ispitanika iznosila je $43,15 \pm 14,96$ godina, a kretala se od 24 do 76 godina, sa medijanom od 39 godina. Ispitanici sa mobilnim protezama imali su u proseku $52,70 \pm 4,82$ godine, a njihova starost se kretala od 28 do 76 godina, sa medijanom koja je iznosila 56 godina. Ispitanici sa fiksnim protezama su bili značajno mlađi (MannWhitneytest: $p=0,006$) i imali su u proseku $33,60 \pm 1,93$ godine, a njihova starost se kretala od 24 do 41 godine, sa medijanom od 35 godina (Grafikon 1).

Od svih ispitanika (80) njih 40 (50%) bili su pušači. Kod ispitanika sa mobilnim protezama bilo je 28 (70%) pušača, a kod ispitanika sa fiksnim protezama bilo je 12 (30%) pušača, ali Hi kvadrat test nije potvrdio da je razlika između grupa u zastupljenosti pušača bila statistički značajna u ispitivanom uzorku ($p=0,074$).



Grafikon 1. Starost ispitanika po grupama

Prikazane su vrednosti medijane, prvog i trećeg kvartila, minimalne i maksimalne vrednosti

Tabela 1. Vrednosti MDA (nmol/mg proteina)
kod ispitanika sa mobilnim i fiksnim protezama

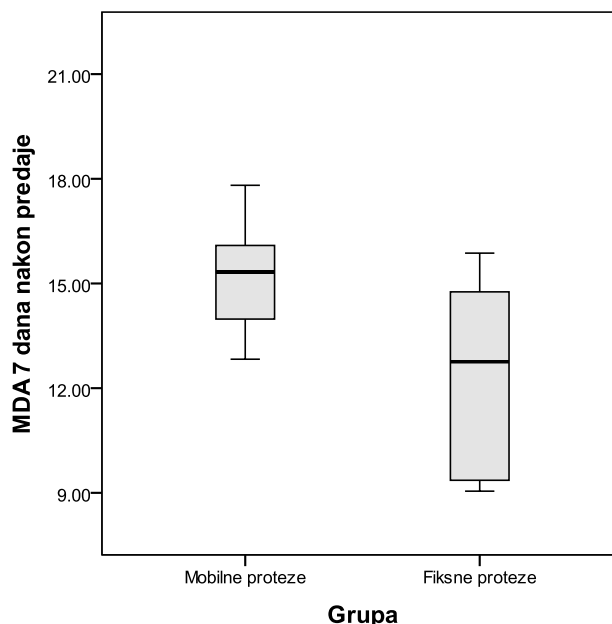
Merenje	Grupa		Ukupno (n=80)	Poređenje između grupa <i>P</i> vrednost
	Mobilne proteze (n=40)	Fiksne proteze (n=40)		
Pre intervencije	10,19±2,49	11,92±2,48	11,06±2,58	0,138
	11,04 (5,15-12,98)	11,39 (9,43-17,23)	11,31 (5,15-17,23)	
Nakon brušenja	-	11,80±5,99	11,80±5,99	-
		11,58 (1,56-23,53)	11,58 (1,56-23,53)	
Neposredno nakon predaje	11,38±5,92	11,51±4,11	11,45±4,96	0,957
	10,59 (4,89-21,7)	11,80 (3,93-19,71)	11,21 (3,93-21,70)	
24h nakon predaje	11,73±2,30	11,51±4,05	11,62±3,21	0,887
	11,85 (8,27-15,13)	11,43 (7,10-19,56)	11,75 (7,10-19,56)	
7 dana nakon predaje	15,63±2,34	12,53±2,56	14,08±2,87	0,011
	15,33 (12,83-20,97)	12,76 (9,05-15,87)	14,35 (9,05-20,97)	
30 dana nakon predaje	11,19±1,70	12,41±2,76	11,80±2,32	0,251
	10,88 (8,15-13,98)	12,41 (9,57-18,93)	11,62 (8,15-18,93)	

NAPOMENA: Vrednosti su prikazane kao Aritmetička sredina ± Standardna devijacija
i Medijana (Minimalna – Maksimalna vrednost)

U grupi sa mobilnim protezama prosečna vrednost MDA je pre intervencije iznosila 10,19±2,49 nmol/mg proteina, a kretala se od 5,15 do 12,98, dok je vrednost medijane iznosila 11,04 (Tabela 1). Nivo MDA je nakon intervencije rastao, a maksimalnu vrednost je dostigao 7 dana nakon predaje kada je prosečna vrednost MDA iznosila 15,63±2,34 nmol/mg proteina, kretala se od 12,83 do 20,97, dok je vrednost medijane iznosila 15,33. Prosečna vrednost MDA je 30 dana nakon predaje opala na 11,19±1,70 nmol/mg proteina, kretala se od 8,15 do 13,98, a vrednost medijane je iznosila 10,88.

U grupi sa fiksnim protezama prosečna vrednost MDA je pre intervencije iznosila 11,92±2,48 nmol/mg proteina, a kretala se od 9,43 do 17,23, dok je vrednost medijane iznosila 11,39. Nivo MDA je do 7 dana nakon predaje neznatno porastao i tada je prosečna vrednost MDA iznosila 12,53±2,56 nmol/mg proteina, kretala se od 9,05 do 15,87, dok je vrednost medijane iznosila 12,76. Prosečna vrednost MDA je do 30 dana nakon predaje ostala na gotovo istom nivou i tada je iznosila 12,41±2,76 nmol/mg proteina, kretala se od 9,57 do 18,93, a vrednost medijane je iznosila 12,41.

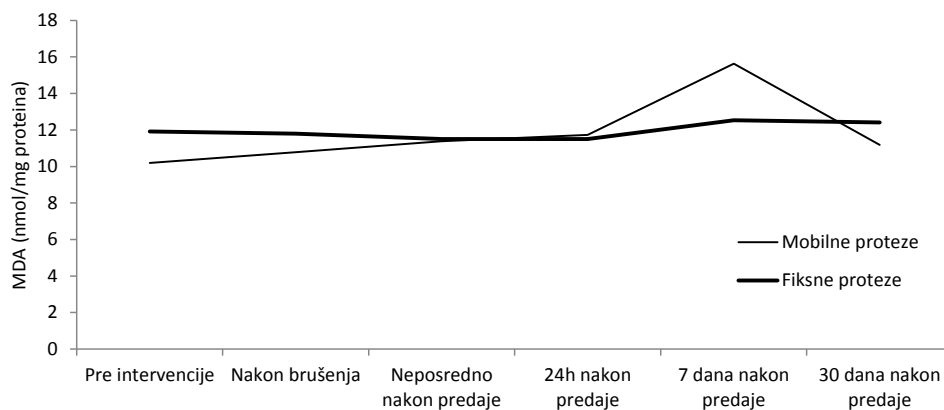
Vrednost MDA je 7 dana nakon predaje bila značajno veća kod ispitanika sa mobilnim protezama nego kod onih sa fiksnim protezama (t test: $p=0,011$; Tabela 1; Grafikon 2). Pri ostalim merenjima nisu potvrđene značajne razlike u nivoima MDA između poređenih grupa.



Grafikon 2. Vrednosti MDA kod poređenih grupa 7 dana nakon predaje

Prikazane su vrednosti medijane, prvog i trećeg kvartila, minimalne i maksimalne vrednosti

Analiza varijanse za ponovljena merenja pokazala je da su promene vrednosti MDA kod ispitanika sa mobilnim protezama u toku celokupnog praćenja bile statistički značajne ($p=0,048$; Grafikon 3; Tabela 2). Promene vrednosti MDA u grupi ispitanika sa fiksnim protezama nisu bile statistički značajne ($p=0,890$). Promene vrednosti MDA u toku celokupnog perioda praćenja se nisu dešavale na značajno različit način kod ispitanika sa mobilnim i fiksnim protezama ($p=0,603$).



Grafikon 3. Kretanje prosečnih vrednosti MDA u toku ispitivanja kod dve grupe pacijenata

Tabela 2. Procena efekata vremena i grupe na promene vrednosti MDA u toku celokupnog perioda praćenja, rezultati RM ANOVA-e

Faktor	P vrednost
Vreme u grupi sa mobilnim protezama	0,048
Vreme u grupi sa fiksnim protezama	0,890
Interakcija vremena i grupe kod svih ispitanika	0,603

Tabela 3. Vrednosti AOPP ($\mu\text{mol}/\text{mg}$) kod ispitanika sa mobilnim i fiksnim protezama

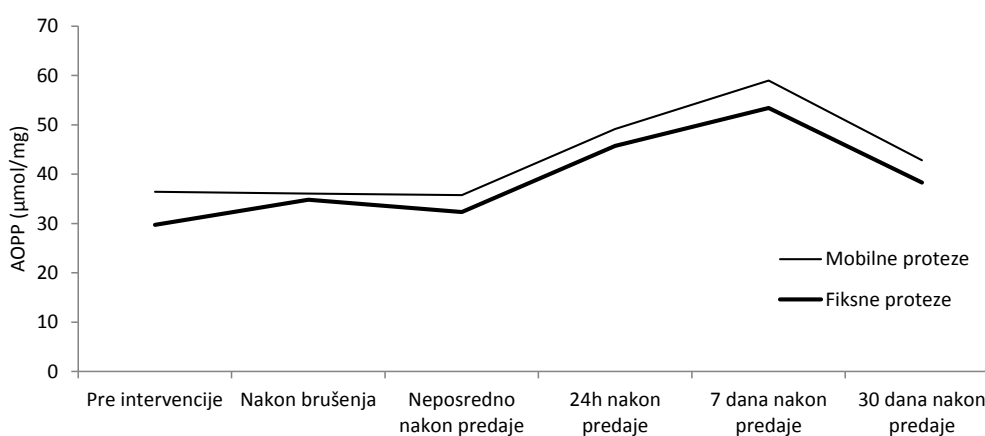
Merenje	Grupa		Ukupno (n=80)	Poređenje između grupa P vrednost
	Mobilne proteze (n=40)	Fiksne proteze (n=40)		
Pre intervencije	36,42±7,27	29,72±4,48	33,07±6,81	0,063
	35,77 (28,98-54,61)	30,98 (20,38-34,94)	32,35 (20,38-54,61)	
Nakon brušenja	-	34,83±17,69	34,83±17,69	-
		34,56 (5,09-74,67)	34,56 (5,09-74,67)	
Neposredno nakon predaje	35,74±5,84	32,36±8,37	34,05±7,23	0,308
	34,08 (30,12-48,80)	31,76 (14,96-49,19)	32,64 (14,96-49,19)	
24h nakon predaje	49,15±7,65	45,73±16,75	47,44±12,79	0,565
	49,47 (40,86-65,61)	39,93 (23,87-74,22)	43,40 (23,87-74,22)	
7 dana nakon predaje	59,00±6,31	53,41±8,02	56,21±7,59	0,101
	62,05 (46,19-64,99)	54,52 (36,46-64,27)	58,07 (36,46-64,99)	
30 dana nakon predaje	42,84±5,44	38,32±4,00	40,58±5,20	0,052
	44,07 (32,65-48,80)	38,34 (31,22-45,92)	40,33 (31,22-48,8)	

NAPOMENA: Vrednosti su prikazane kao Aritmetička sredina ± Standardna devijacija i Medijana (Minimalna – Maksimalna vrednost)

U grupi sa mobilnim protezama prosečna vrednost AOPP je pre intervencije iznosila $36,42 \pm 7,27 \mu\text{mol}/\text{mg}$, a kretala se od 28,98 do 54,61, dok je vrednost medijane iznosila 35,77 (Tabela 3). Nivo AOPP je nakon intervencije rastao, a maksimalnu vrednost je dostigao 7 dana nakon predaje kada je prosečna vrednost iznosila $59,00 \pm 6,31 \mu\text{mol}/\text{mg}$, kretala se od 46,19 do 64,99, dok je vrednost medijane iznosila 35,77. Prosečna vrednost AOPP je 30 dana nakon predaje opala na $42,84 \pm 5,44 \mu\text{mol}/\text{mg}$, kretala se od 32,65 do 48,80, a vrednost medijane je iznosila 44,07.

U grupi sa fiksnim protezama prosečna vrednost AOPP je pre intervencije iznosila $29,72 \pm 4,48$ $\mu\text{mol/mg}$, a kretala se od 20,38 do 34,94, dok je vrednost medijane iznosila 30,89. I u ovoj grupi je nivo AOPP nakon intervencije rastao, a maksimalnu vrednost je dostigao 7 dana nakon predaje kada je prosečna vrednost iznosila $53,41 \pm 8,02$ $\mu\text{mol/mg}$, kretala se od 36,46 do 64,27, dok je vrednost medijane iznosila 54,52. Prosečna vrednost AOPP je 30 dana nakon predaje opala na $38,32 \pm 4,00$ $\mu\text{mol/mg}$, kretala se od 31,22 do 45,92, a vrednost medijane je iznosila 38,34.

Pri svim merenjima nisu potvrđene značajne razlike u nivoima AOPP između poređenih grupa.



Grafikon 4. Kretanje prosečnih vrednosti AOPP u toku ispitivanja kod dve grupe pacijenata

Analiza varijanse za ponovljena merenja pokazala je da su promene vrednosti AOPP u toku celokupnog praćenja bile statistički značajne, kako kod ispitanika sa mobilnim protezama ($p < 0,001$; Grafikon 4; Tabela 4), tako i kod pacijenata sa fiksnim protezama ($p = 0,002$). Promene vrednosti AOPP u toku celokupnog perioda praćenja se nisu dešavale na značajno različit način kod ispitanika sa mobilnim i fiksnim protezama ($p = 0,052$).

Tabela 4. Procena efekata vremena i grupe na promene vrednosti AOPP u toku celokupnog perioda praćenja, rezultati RM ANOVA-e

Faktor	P vrednost
Vreme u grupi sa mobilnim protezama	<0,001
Vreme u grupi sa fiksnim protezama	0,002
Interakcija vremena i grupe kod svih ispitanika	0,052

Tabela 5. Vrednosti katalaze (U/mg proteina) kod ispitanika sa mobilnim i fiksnim protezama

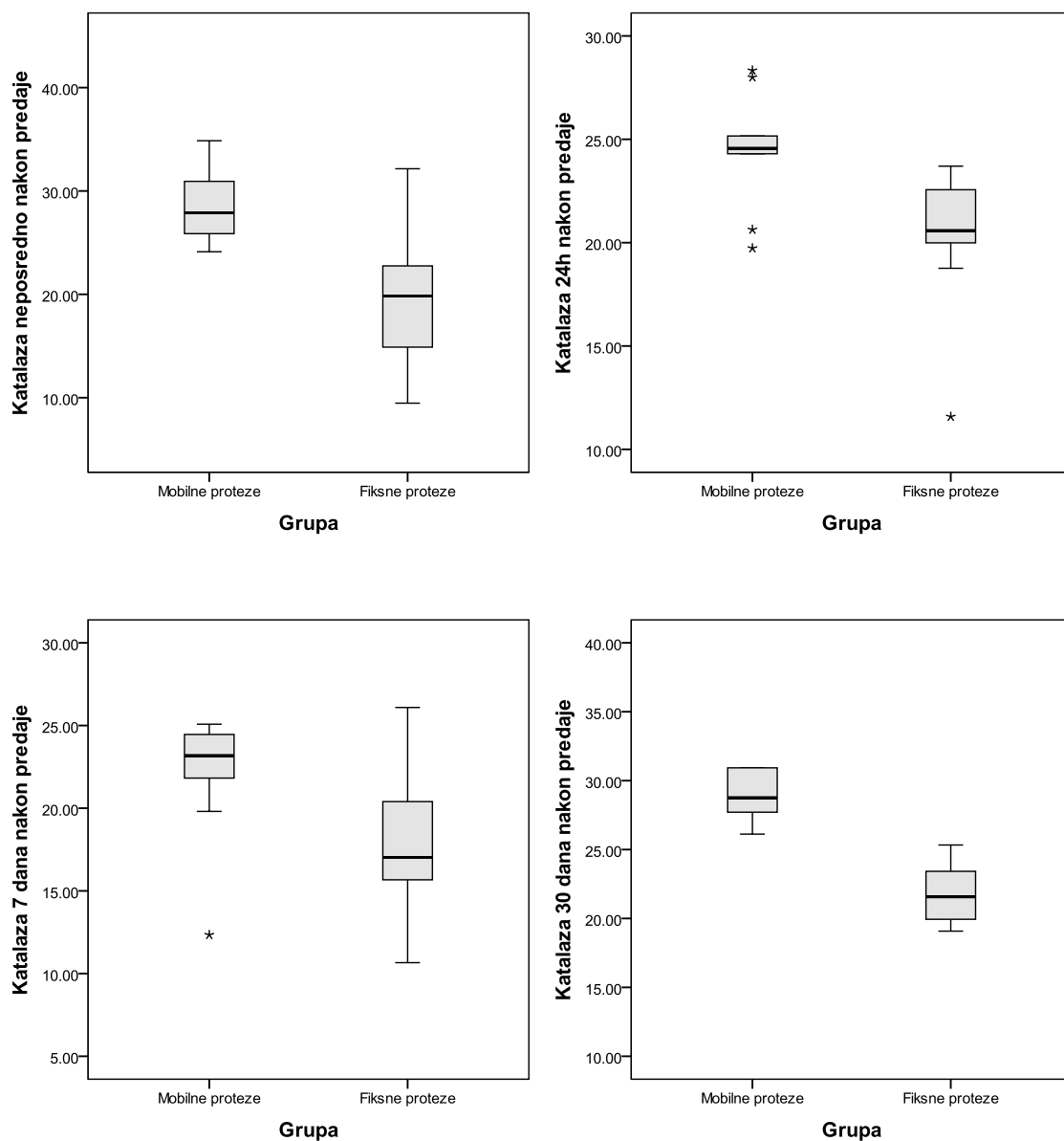
Merenje	Grupa		Ukupno (n=80)	Poređenje između grupa <i>P</i> vrednost
	Mobilne proteze (n=40)	Fiksne proteze (n=40)		
Pre intervencije	37,02±6,30 37,30 (30,64-52,07)	34,15±12,82 34,16 (10,30-56,77)	35,58±9,94 35,85 (10,30-56,77)	0,533
Nakon brušenja		16,21±7,34 16,16 (2,05-27,52)	16,21±7,34 16,16 (2,05-27,52)	-
Neposredno nakon predaje	28,60±3,57 27,89 (24,12-34,86)	21,16±10,12 19,84 (9,47-43,30)	24,88±8,31 25,68 (9,47-43,30)	0,042
24h nakon predaje	24,46±2,69 24,56 (19,73-28,33)	20,38±3,49 20,58 (11,58-23,70)	22,42±3,69 22,98 (11,58-28,33)	0,005
7 dana nakon predaje	22,57±4,37 23,18 (12,34-29,26)	17,08±5,10 17,02 (8,10-26,09)	19,82±5,41 20,73 (8,10-29,26)	0,019
30 dana nakon predaje	29,80±3,50 28,76 (26,12-35,86)	21,20±3,66 21,57 (12,51-25,33)	25,50±5,62 25,73 (12,51-35,86)	<0,001

NAPOMENA: Vrednosti su prikazane kao Aritmetička sredina ± Standardna devijacija i Medijana (Minimalna – Maksimalna vrednost)

U grupi sa mobilnim protezama prosečna vrednost katalaze je pre intervencije iznosila 37,02±6,30U/mg proteina, a kretala se od 30,64 do 52,07, dok je vrednost medijane iznosila 37,30 (Tabela 5). Nivo katalaze je nakon intervencije opadao, a minimalnu vrednost je dostigao 7 dana nakon predaje kada je prosečna vrednost iznosila 22,57±4,37U/mg proteina, kretala se od 12,34 do 29,26, dok je vrednost medijane iznosila 23,18. Prosečna vrednost katalaze je 30 dana nakon predaje porasla na 29,80±3,50 U/mg proteina, kretala se od 26,12 do 35,86, a vrednost medijane je iznosila 28,76.

U grupi sa fiksnim protezama prosečna vrednost katalaze je pre intervencije iznosila 34,15±12,82 U/mg proteina, a kretala se od 10,30 do 56,77, dok je vrednost medijane iznosila 34,16. Nivoi katalaze su posle intervencije naglo opali i već nakon brušenja dostigli najniže vrednosti koje su u proseku iznosile 16,21±7,34 U/mg proteina, kretale se od 2,05 do 27,52, dok je vrednost medijane iznosila 16,16. Do kraja perioda praćenja vrednosti katalaze su u ovoj grupi pacijenata, uz manje varijacije, zadržale nizak nivo.

Vrednosti katalaze su bile značajno veće kod pacijenata sa mobilnim protezama nego kod onih sa fiksnim protezama neposredno nakon predaje (t test: $p=0,042$; Tabela 5; Grafikon 5), 24h nakon predaje (Mann-Whitney test: $p=0,005$), 7 dana nakon predaje (t test: $p=0,019$) i 30 dana nakon predaje (t test: $p<0,001$).

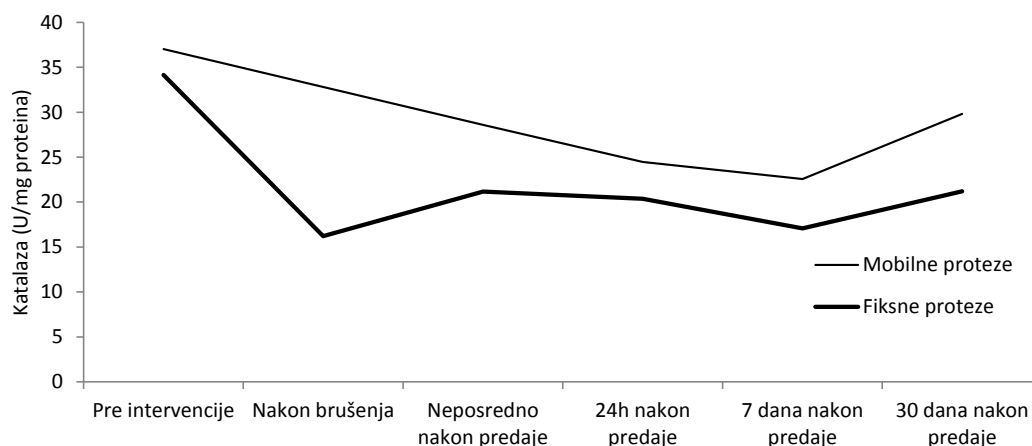


Grafikon 5. Vrednosti katalaze kod poređenih grupa

neposredno nakon predaje, 24h, 7 dana i 30 dana nakon predaje

Prikazane su vrednosti medijane, prvog i trećeg kvartila, minimalne i maksimalne vrednosti.

Zvezdicama su označene vrednosti koje su od medijane veće ili manje za više od dve interkvartilne razlike.



Grafikon 6. Kretanje prosečnih vrednosti katalaze u toku ispitivanja kod dve grupe pacijenata

Analiza varijanse za ponovljena merenja pokazala je da su promene vrednosti katalaze u toku celokupnog praćenja bile statistički značajne, kako kod ispitanika sa mobilnim protezama ($p < 0,001$; Grafikon 6; Tabela 6), tako i kod pacijenata sa fiksnim protezama ($p < 0,001$). Promene vrednosti katalaze u toku celokupnog perioda praćenja se nisu dešavale na značajno različit način kod ispitanika sa mobilnim i fiksnim protezama ($p = 0,597$).

Tabela 6. Procena efekata vremena i grupe na promene vrednosti katalaze u toku celokupnog perioda praćenja, rezultati RM ANOVA-e

Faktor	P vrednost
Vreme u grupi sa mobilnim protezama	<0,001
Vreme u grupi sa fiksnim protezama	<0,001
Interakcija vremena i grupe kod svih ispitanika	0,597

Tabela 7. Vrednosti NF- κ B kod ispitanika sa mobilnim i fiksnim protezama

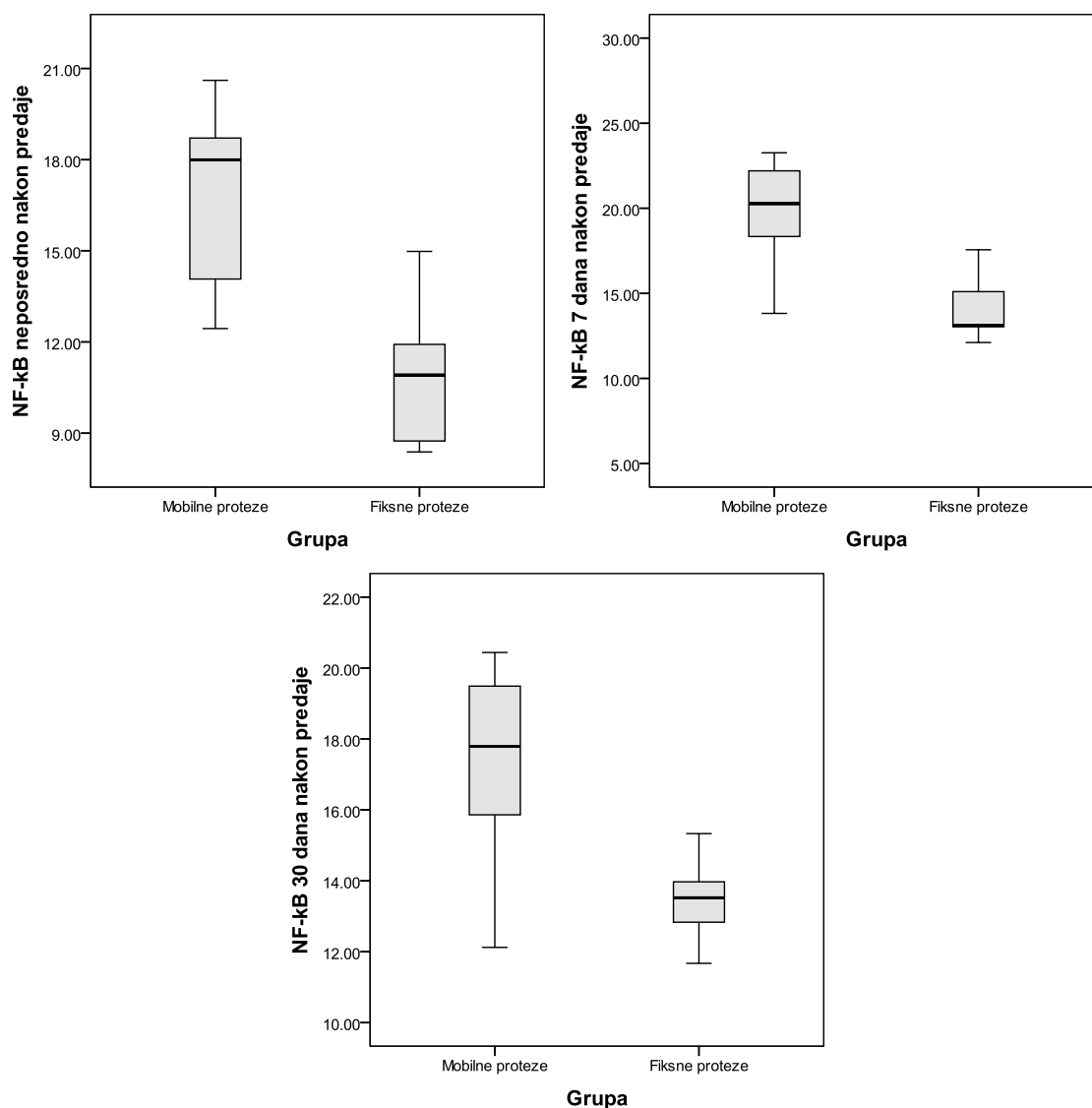
Merenje	Grupa		Ukupno (n=80)	Poređenje između grupa P vrednost
	Mobilne proteze (n=40)	Fiksne proteze (n=40)		
Pre intervencije	12,16 \pm 1,85 12,14 (9,60-15,20)	12,96 \pm 1,66 12,60 (10,95-14,98)	12,54 \pm 1,76 12,14 (9,60-15,20)	0,340
Nakon brušenja		9,29 \pm 4,26 11,61 (1,61-12,71)	9,29 \pm 4,26 11,61 (1,61-12,71)	-
Neposredno nakon predaje	16,80 \pm 2,72 18,00 (12,44-20,61)	11,28 \pm 2,49 10,91 (8,38-14,98)	14,18 \pm 3,81 14,07 (8,38-20,61)	<0,001
24h nakon predaje	18,36 \pm 3,09 17,23 (14,46-24,33)	18,72 \pm 4,61 16,94 (14,67-24,83)	18,53 \pm 3,78 17,00 (14,46-24,83)	0,841
7 dana nakon predaje	20,41 \pm 3,84 20,27 (13,82-28,28)	13,82 \pm 2,58 13,11 (8,91-17,56)	17,29 \pm 4,67 17,07 (8,91-28,28)	<0,001
30 dana nakon predaje	17,60 \pm 2,48 17,79 (12,12-20,44)	13,28 \pm 1,45 13,52 (10,56-15,33)	15,55 \pm 2,99 15,33 (10,56-20,44)	<0,001

NAPOMENA: Vrednosti su prikazane kao Aritmetička sredina \pm Standardna devijacija i Medijana (Minimalna – Maksimalna vrednost)

U grupi sa mobilnim protezama prosečna vrednost NF- κ B je pre intervencije iznosila 12,16 \pm 1,85, a kretala se od 9,60 do 15,20, dok je vrednost medijane iznosila 12,14 (Tabela 7). Prosečna vrednost NF- κ B je nakon intervencije rasla, a maksimum je dostigla 7 dana nakon predaje kada je prosečna vrednost iznosila 20,41 \pm 3,84, kretala se od 13,82 do 28,28, dok je vrednost medijane iznosila 20,27. Prosečna vrednost NF- κ B je 30 dana nakon predaje opala na 17,60 \pm 2,48, kretala se od 12,12 do 20,44, a vrednost medijane je iznosila 17,79.

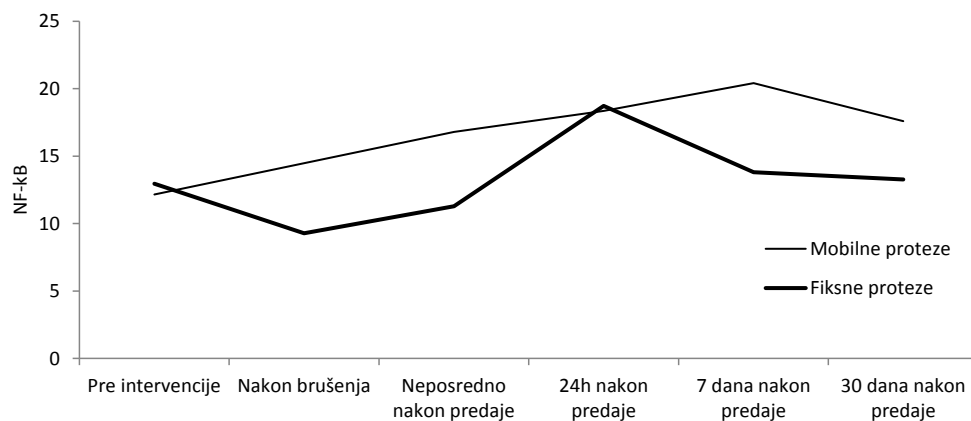
U grupi sa fiksnim protezama prosečna vrednost NF- κ B je pre intervencije iznosila 12,96 \pm 1,66, a kretala se od 10,95 do 14,98, dok je vrednost medijane iznosila 12,60. Vrednost NF- κ B je nakon brušenja opala na 9,29 \pm 4,26, da bi 24h nakon predaje porasla na 18,72 \pm 4,61, a zatim ponovo opala na 13,28 \pm 1,45 30 dana nakon predaje.

Vrednosti NF- κ B su bile značajno veće kod pacijenata sa mobilnim protezama nego kod onih sa fiksnim protezama neposredno nakon predaje (t test: p<0,001; Tabela 7; Grafikon 7), 7 dana nakon predaje (t test: p<0,001) i 30 dana nakon predaje (t test: p<0,001).



Grafikon 7. Vrednosti NF-κB kod poređenih grupa neposredno nakon predaje, 7 dana i 30 dana nakon predaje

Prikazane su vrednosti medijane, prvog i trećeg kvartila, minimalne i maksimalne vrednosti



Grafikon 8. Kretanje prosečnih vrednosti NF-κB u toku ispitivanja kod dve grupe pacijenata

Analiza varijanse za ponovljena merenja pokazala je da su promene vrednosti NF- κ Bu toku celokupnog praćenja bile statistički značajne, kako kod ispitanika sa mobilnim protezama ($p < 0,001$; Grafikon 8; Tabela 8), tako i kod pacijenata sa fiksnim protezama ($p < 0,001$). Promene vrednosti NF- κ Bu vremenu su se dešavale na značajno različit način kod ispitanika sa mobilnim i fiksnim protezama ($p < 0,001$).

Tabela 8. Procena efekata vremena i grupe na promene vrednosti NF- κ B u toku celokupnog perioda praćenja, rezultati RM ANOVA-e

Faktor	P vrednost
Vreme u grupi sa mobilnim protezama	<0,001
Vreme u grupi sa fiksnim protezama	<0,001
Interakcija vremena i grupe kod svih ispitanika	<0,001

Tabela 9. Vrednosti IL6 (pg/ml) kod ispitanika sa mobilnim i fiksnim protezama

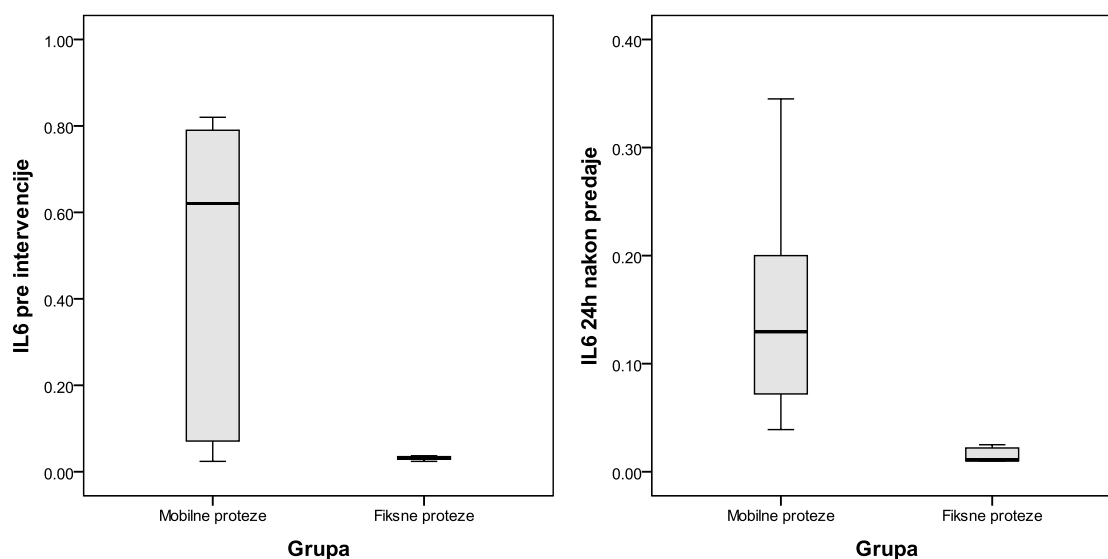
Merenje	Grupa		Ukupno (n=80)	Poređenje između grupa P vrednost
	Mobilne proteze (n=40)	Fiksne proteze (n=40)		
Pre intervencije	0,49±0,36	0,03±0,002	0,26±0,34	0,011
	0,62 (0,02-0,82)	0,03 (0,02-0,04)	0,04 (0,02-0,82)	
Nakon brušenja		0,15±0,04	0,15±0,04	-
		0,16 (0,10-0,19)	0,16 (0,10-0,19)	
Neposredno nakon predaje	0,15±0,20	0,02±0,01	0,08±0,15	0,150
	0,07 (0,02-0,55)	0,01 (0,01-0,03)	0,02 (0,01-0,55)	
24h nakon predaje	0,15±0,11	0,01±0,01	0,08±0,10	0,004
	0,13 (0,04-0,35)	0,02 (0,01-0,03)	0,03 (0,01-0,35)	
7 dana nakon predaje	0,15±0,14	0,03±0,01	0,09±0,11	0,072
	0,10 (0,02-0,36)	0,03 (0,02-0,04)	0,04 (0,02-0,36)	
30 dana nakon predaje	0,16±0,29	0,03±0,003	0,09±0,21	0,314
	0,03 (0,01-0,75)	0,03 (0,02-0,04)	0,03 (0,01-0,75)	

NAPOMENA: Vrednosti su prikazane kao Aritmetička sredina ± Standardna devijacija i Medijana (Minimalna – Maksimalna vrednost)

U grupi sa mobilnim protezama prosečna vrednost IL6 je pre intervencije iznosila $0,49 \pm 0,36$ pg/ml, a kretala se od 0,02 do 0,82, dok je vrednost medijane iznosila 0,62 (Tabela 9). Nivo IL6 je neposredno nakon predaje opao na $0,15 \pm 0,20$ pg/ml, vrednosti su se tada kretale od 0,02 do 0,55, sa medijanom od 0,07. Do kraja ispitivanja vrednosti IL6 su se kod pacijenata sa mobilnim protezama zadržale na gotovo istom nivou.

U grupi sa fiksnim protezama prosečna vrednost IL6 je pre intervencije iznosila $0,03 \pm 0,002$ pg/ml, a kretala se od 0,02 do 0,04, dok je vrednost medijane iznosila 0,03. Nivo IL6 je nakon brušenja porastao na $0,15 \pm 0,04$ pg/ml, da bi neposredno nakon predaje opao na $0,02 \pm 0,01$ pg/ml. Do kraja ispitivanja vrednosti IL6 su se kod pacijenata sa fiksnim protezama zadržale na gotovo istom nivou.

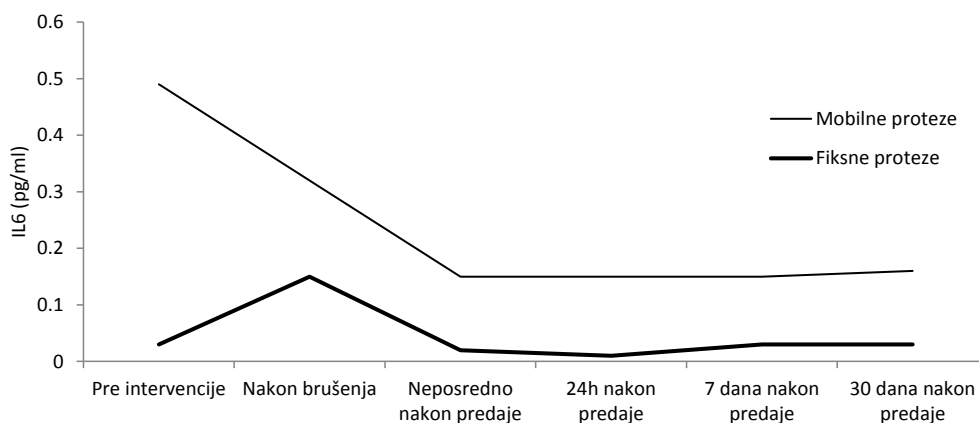
Vrednosti IL6 su bile značajno veće kod pacijenata sa mobilnim protezama nego kod onih sa fiksnim protezama pre intervencije (Mann-Whitney test: $p=0,011$; Tabela 9; Grafikon 9) i 24h nakon predaje (Mann-Whitney test: $p=0,004$).



Grafikon 9. Vrednosti IL6 kod poređenih grupa pre intervencije i 24h nakon predaje

Prikazane su vrednosti medijane, prvog i trećeg kvartila, minimalne i maksimalne vrednosti

Analiza varijanse za ponovljena merenja pokazala je da su promene vrednosti IL6 u toku celokupnog praćenja bile statistički značajne, kako kod ispitanika sa mobilnim protezama ($p=0,040$; Grafikon 10; Tabela 10), tako i kod pacijenata sa fiksnim protezama ($p<0,001$). Promene vrednosti IL6 u vremenu su se dešavale na značajno različit način kod ispitanika sa mobilnim i fiksnim protezama ($p=0,038$).



Grafikon 10. Kretanje prosečnih vrednosti IL6 u toku ispitivanja kod dve grupe pacijenata

Tabela 10. Procena efekata vremena i grupe na promene vrednosti IL6 u toku celokupnog perioda praćenja, rezultati RM ANOVA-e

Faktor	P vrednost
Vreme u grupi sa mobilnim protezama	0,040
Vreme u grupi sa fiksnim protezama	<0,001
Interakcija vremena i grupe kod svih ispitanika	0,038

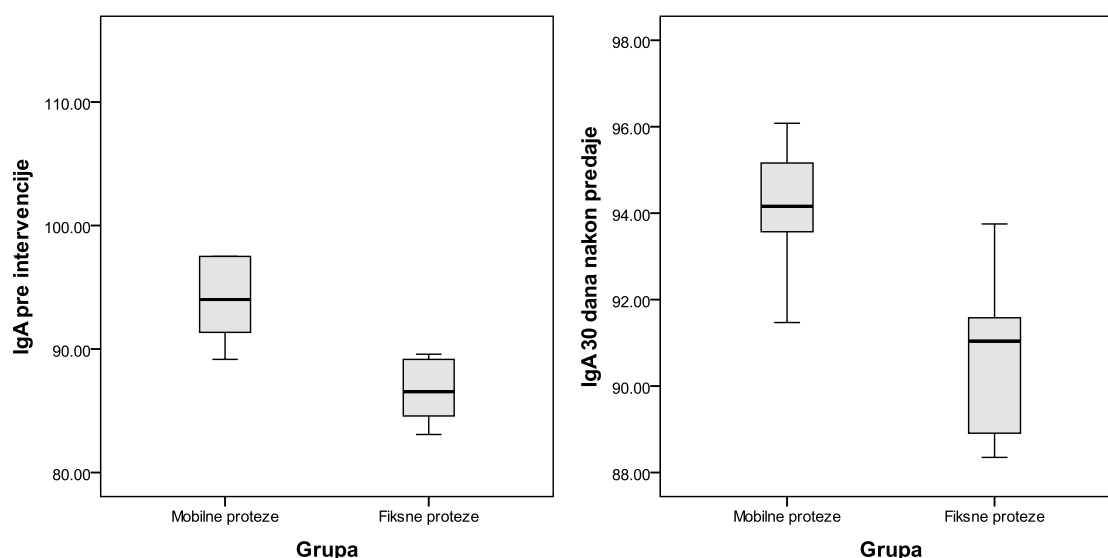
Tabela 11. Vrednosti IgA (mg/ml) kod ispitanika sa mobilnim i fiksnim protezama

Merenje	Grupa		Ukupno (n=80)	Poređenje između grupa P vrednost
	Mobilne proteze (n=40)	Fiksne proteze (n=40)		
Pre intervencije	96,07±7,63	86,58±2,67	91,33±7,37	0,017
	94,00 (89,16-110,42)	86,54 (83,08-89,58)	89,37 (83,08-110,42)	
Nakon brušenja	-	105,28±4,99	105,28±4,99	-
	-	104,54 (99,91-112,92)	104,54 (99,91-112,92)	
Neposredno nakon predaje	106,21±5,12	101,37±4,76	103,79±5,35	0,121
	106,78 (98,75-112,08)	101,04 (95,16-109,16)	102,88 (95,16-112,08)	
24h nakon predaje	101,17±6,10	97,61±4,52	99,39±5,45	0,278
	101,88 (93,66-108,33)	95,84 (93,33-105,0)	97,50 (93,33-108,33)	
7 dana nakon predaje	97,05±3,77	93,89±2,44	95,47±3,45	0,116
	96,83 (92,58-103,67)	92,47 (92,16-97,58)	95,48 (92,16-103,67)	
30 dana nakon predaje	94,10±1,57	90,78±1,95	92,44±2,42	0,009
	94,16 (91,47-96,08)	91,04 (88,35-93,75)	92,58 (88,35-96,08)	

NAPOMENA: Vrednosti su prikazane kao Aritmetička sredina ± Standardna devijacija i Medijana (Minimalna – Maksimalna vrednost)

U grupi sa mobilnim protezama prosečna vrednost IgA je pre intervencije iznosila $96,07 \pm 7,63$ mg/ml, a kretala se od 89,16 do 110,42, dok je vrednost medijane iznosila 94,00 (Tabela 11). Prosečan nivo IgA je neposredno nakon predaje porastao na $106,21 \pm 5,12$ mg/ml, a vrednost se kretala od 98,75 do 112,08, dok je vrednost medijane iznosila 106,78. Vrednosti IgA su zatim opadale, da bi 30 dana nakon predaje prosečan nivo iznosio $94,10 \pm 1,57$ mg/ml, kretao se od 91,47 do 96,08, a vrednost medijane je iznosila 94,16.

U grupi sa fiksnim protezama prosečna vrednost IgA je pre intervencije iznosila $86,58 \pm 2,67$ mg/ml, a kretala se od 83,08 do 89,58, dok je vrednost medijane iznosila 86,54. Prosečan nivo IgA je nakon brušenja porastao na $105,28 \pm 4,99$ mg/ml, a vrednost se kretala od 99,91 do 112,92, dok je vrednost medijane iznosila 104,54. Vrednosti IgA su zatim opadale, da bi 30 dana nakon predaje prosečan nivo iznosio $90,78 \pm 1,95$ mg/ml, kretao se od 88,35 do 93,75, a vrednost medijane je iznosila 91,04.

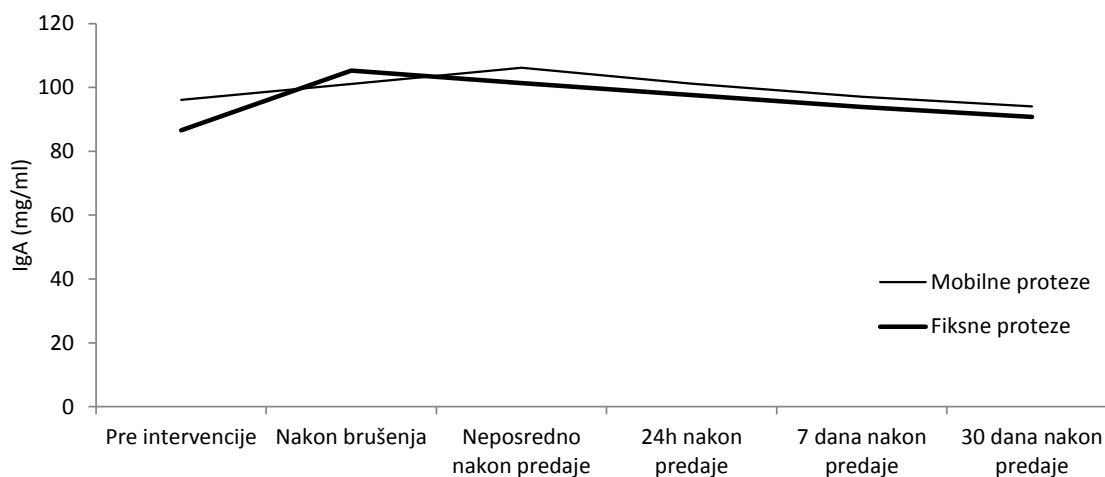


Grafikon 11. Vrednosti IgA kod poređenih grupa pre intervencije i 30 dana nakon predaje

Prikazane su vrednosti medijane, prvog i trećeg kvartila, minimalne i maksimalne vrednosti

Vrednost IgA je pre intervencije bila značajno veća kod ispitanika sa mobilnim protezama nego kod onih sa fiksnim protezama (t test: $p=0,017$; Tabela 11; Grafikon 11), kao i 30 dana nakon predaje (t test: $p=0,009$). Pri ostalim merenjima nisu potvrđene značajne razlike u nivoima IgA između poređenih grupa.

Analiza varijanse za ponovljena merenja pokazala je da su promene vrednosti IgA u toku celokupnog praćenja bile statistički značajne, kako kod ispitanika sa mobilnim protezama ($p < 0,001$; Grafikon 12; Tabela 12), tako i kod pacijenata sa fiksnim protezama ($p < 0,001$). Promene vrednosti IgA u vremenu se nisu dešavale na značajno različit način kod ispitanika sa mobilnim i fiksnim protezama ($p = 0,101$).



Grafikon 12. Kretanje prosečnih vrednosti IgA u toku ispitivanja kod dve grupe pacijenata

Tabela 12. Procena efekata vremena i grupe na promene vrednosti IgA u toku celokupnog perioda praćenja, rezultati RM ANOVA-e

Faktor	P vrednost
Vreme u grupi sa mobilnim protezama	<0,001
Vreme u grupi sa fiksnim protezama	<0,001
Interakcija vremena i grupe kod svih ispitanika	0,101

U grupi sa mobilnim protezama prosečna vrednost CRP je pre intervencije iznosila $0,04 \pm 0,03$ mg/L, a kretala se od 0,01 do 0,09, dok je vrednost medijane iznosila 0,04 (Tabela 13). Prosečan nivo CRP je neposredno nakon predaje porastao na $0,09 \pm 0,03$ mg/L, a vrednost se kretala od 0,05 do 0,16, dok je vrednost medijane iznosila 0,10. Vrednosti CRP su zatim opadale, da bi 30 dana nakon predaje prosečan nivo iznosio $0,04 \pm 0,02$ mg/L, kretao se od 0,01 do 0,08, a vrednost medijane je iznosila 0,03.

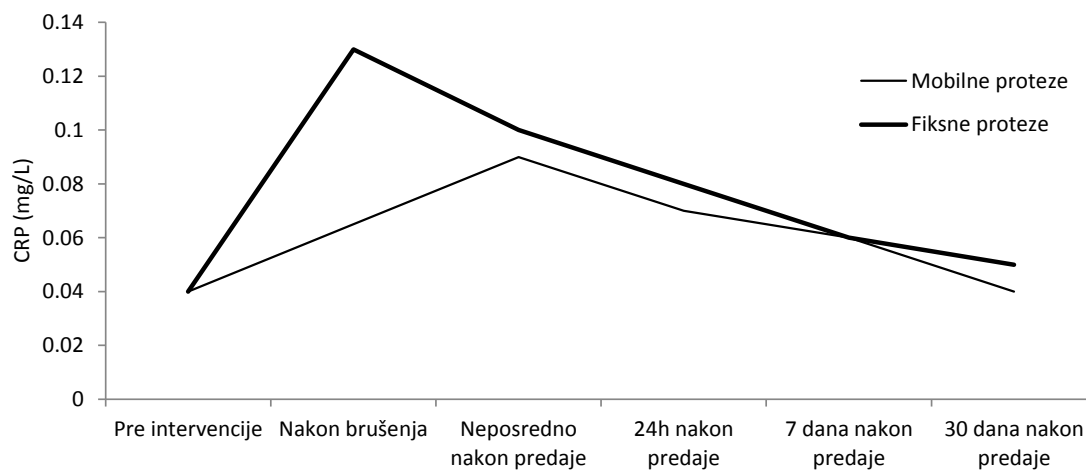
U grupi sa fiksnim protezama prosečna vrednost CRP je pre intervencije iznosila $0,04 \pm 0,02$ mg/L, a kretala se od 0,01 do 0,07, dok je vrednost medijane iznosila 0,04. Prosečan nivo CRP je nakon brušenja porastao na $0,13 \pm 0,04$ mg/L, a vrednost se kretala od 0,07 do 0,21, dok je vrednost medijane iznosila 0,12. Vrednosti CRP su zatim opadale, da bi 30 dana nakon predaje prosečan nivo iznosio $0,05 \pm 0,02$ mg/L, kretao se od 0,01 do 0,08, a vrednost medijane je iznosila 0,05. Pri svim merenjima nisu potvrđene statistički značajne razlike u nivoima CRP između poređenih grupa.

Tabela 13. Vrednosti CRP kod ispitanika sa mobilnim i fiksnim protezama

Merenje	Grupa		Ukupno (n=80)	Poređenje između grupa P vrednost
	Mobilne proteze (n=40)	Fiksne proteze (n=40)		
Pre intervencije	$0,04 \pm 0,03$ 0,04 (0,01-0,09)	$0,04 \pm 0,02$ 0,04 (0,01-0,07)	$0,04 \pm 0,02$ 0,04 (0,01-0,09)	0,874
Nakon brušenja	-	$0,13 \pm 0,04$ 0,12 (0,07-0,21)	$0,13 \pm 0,04$ 0,12 (0,07-0,21)	-
Neposredno nakon predaje	$0,09 \pm 0,03$ 0,10 (0,05-0,16)	$0,10 \pm 0,03$ 0,10 (0,05-0,15)	$0,10 \pm 0,03$ 0,10 (0,05-0,16)	0,515
24h nakon predaje	$0,07 \pm 0,03$ 0,07 (0,03-0,12)	$0,08 \pm 0,02$ 0,08 (0,04-0,12)	$0,08 \pm 0,02$ 0,08 (0,03-0,12)	0,334
7 dana nakon predaje	$0,06 \pm 0,02$ 0,06 (0,03-0,1)	$0,06 \pm 0,02$ 0,06 (0,02-0,1)	$0,06 \pm 0,02$ 0,06 (0,02-0,1)	0,749
30 dana nakon predaje	$0,04 \pm 0,02$ 0,03 (0,01-0,08)	$0,05 \pm 0,02$ 0,05 (0,01-0,08)	$0,04 \pm 0,02$ 0,04 (0,01-0,08)	0,251

NAPOMENA: Vrednosti su prikazane kao Aritmetička sredina \pm Standardna devijacija i Medijana (Minimalna – Maksimalna vrednost)

Analiza varijanse za ponovljena merenja pokazala je da su promene vrednosti CRP u toku celokupnog praćenja bile statistički značajne, kako kod ispitanika sa mobilnim protezama ($p < 0,001$; Grafikon 13; Tabela 14), tako i kod pacijenata sa fiksnim protezama ($p < 0,001$). Promene vrednosti CRP u vremenu se nisu dešavale na značajno različit način kod ispitanika sa mobilnim i fiksnim protezama ($p = 0,370$).



Grafikon 13. Kretanje prosečnih vrednosti CRP u toku ispitivanja kod dve grupe pacijenata

Tabela 14. Procena efekata vremena i grupe na promene vrednosti CRP

u toku celokupnog perioda praćenja, rezultati RM ANOVA-e

Faktor	P vrednost
Vreme u grupi sa mobilnim protezama	<0,001
Vreme u grupi sa fiksnim protezama	<0,001
Interakcija vremena i grupe kod svih ispitanika	0,370

5. DISKUSIJA

5.1. ANALIZA MARKERA OKSIDATIVNOG STRESA (MDA, AOPP I CAT) U PLJUVAČCI PACIJENATA SA FIKSNIM I MOBILNIM STOMATOLOŠKIM PROTETSKIM NADOKNADAMA

Rezultati istraživanja su pokazali da prilikom aplikacije fiksnih i mobilnih stomatoloških protetskih nadoknada dolazi do kvantitativnih promena parametara oksidativnog stresa. Metalni joni i molekuli akrilata imaju veliki potencijal u izazivanju inflamatornog odgovora. U grupi pacijenata sa mobilnim stomatološkim protetskim nadoknadama nivo malondialdehida (MDA), kao parametra lipidne peroksidacije je nakon intervencije rastao i maksimalnu vrednost je dostigao 7 dana nakon predaje proteze da bi nakon 30 dana nakon predaje vrednost opala. Sa druge strane, u grupi pacijenata sa fiksnim stomatološkim protetskim nadoknadama nivo MDA je nakon 7 dana neznatno porastao da bi prosečna vrednost MDA nakon 30 dana ostala na istom nivou. Vrednost MDA je 7 dana nakon predaje proteza bila značajno veća kod pacijenata sa mobilnim stomatološkim protetskim nadoknadama.

U grupi pacijenata sa mobilnim stomatološkim protetskim nadoknadama nivo oksidativne modifikacije protein (AOPP) je nakon predaje proteze rastao i maksimalnu vrednost je dostigao za 7 dana da bi vrednost nakon 30 dana opala. Skoro isti rezultati su dobijeni i kod pacijenata sa fiksnim stomatološkim protetskim nadoknadama, tako da pri svim merenjima nisu potvrđene značajne razlike u nivou AOPP između poređenih grupa.

U grupi pacijenata sa mobilnim stomatološkim protetskim nadoknadama nivo katalaze (CAT) je nakon predaje proteze opadao, a minimalnu vrednost je dostigao 7 dana nakon postave proteze. U grupi pacijenata sa fiksnim stomatološkim protetskim nadoknadama nivoi katalaze su posle prve intervencije naglo opali i već nakon brušenja zuba dostigli najniže vrednosti. Do kraja perioda praćenja vrednosti katalaze su u ovoj grupi pacijenata zadržale nizak nivo. Vrednosti katalaze su bile značajno veće kod pacijenata sa mobilnim stomatološkim protetskim nadoknadama nego kod onih fiksnim neposredno nakon predaje. Primena novih tehnologija i stomatoloških materijala u smislu izrade fiksnih ili mobilnih stomatoloških protetskih nadoknada utiče na promenu određenih biohemijskih parametara u pljuvački pacijenata. Prilikom aplikacije fiksne protetske nadoknade karakteristična je mnogo brža adaptacija pacijenta, nego kod postave mobilne protetske nadoknade, kada često dolazi

do pojave kliničkih znakova zapaljenja. Podataka o parametrima oksidativnog stresa nakon postave fiksne ili mobilne stomatološke protetske nadoknade nema u dostupnoj literaturi, ali su markeri oksidativnog stresa i njihova dinamika praćeni u nizu drugih stomatoloških entiteta.

Veliki broj postojećih studija je pokazalo da oksidativni stres može da uzrokuje patološke procese u usnoj duplji zahvatajući kako meka tako i čvrsta tkiva. Naročito je izložen spoljnim agensima potporni aparat zuba iz razloga prisustva bakterijskog i oalnog biofilma. Međutim, proces nastanka promena je takav da izaziva određene aktivnosti imunskog sistema stvarajući polimorfne leukocite, što dovodi do akutne inflamacije kada se otpuštaju produkti oksidativnog stresa¹²⁹. Kao rezultat postojanja neravnoteže između prisustva slobodnih radikala i antioksidativnih materija, oksidativni stres može da dovede do patoloških stanja na nivou parodonta, mekih i tvrdih tkiva usne duplje, ali i do drugih bolesti kao što je reumatoidni artritis¹³⁰, akutna respiratorna insuficijencija¹³¹, AIDS¹³², Alchajmje-rova bolest¹³³ i Parkinsonova bolest¹³⁴.

Antioksidativni odbrambeni sistem igra važnu ulogu u usnoj duplji. Dva bitna elementa su salivarna peroksidaza i mijeloperoksidaza¹³⁵. Salivarna peroksidaza katalizira tiocijanatni jon peroksidacije i generiše oksidativne produkte koji su izuzetno aktivni u inhibiciji rasta i metabolizma mikroorganizama. Sa druge strane, mijeloperoksidaza katalizira jone hlora i pretvara ga u hipohlorit, izazivajući rasep peptidnih veza, što ima za posledicu stvaranje formacija niske molekularne težine. Na ovaj način nastaje hloramin koji ima izuzetan baktericidni efekat. Prema mnogim autorima, mijeloperoksidaza se akumulira tokom spavanja kada je nizak protok pljuvačke, uklanjajući polimorfonuklearne neutrofile.

Gingivalna sulkusna tečnost je eksudat periodontalnog tkiva je sličan po sastavu kao pljuvačka. Ulazeći u dublja tkiva mogu se naći i produkti lokalnog metabolizma. Ukupni antioksidativni kapacitet je indikator zdravlja periodoncijuma. Ovo je dokazano u studiji Čapla i saradnika (2007)¹²⁹ koji su merili ukupni antioksidativni potencijal gingivalne sulkusne tečnosti kod 17 pacijenata sa blago izraženim hroničnom parodontopatijom i 18 pacijenata sa ozbiljnom hroničnom parodontopatijom u odnosu na 32 zdrave osobe. Ova studija je pokazala da je ukupni antioksidativni potencijal niži kod obolelih od parodontopatije u odnosu na zdrave ispitanike.

Ashby¹³⁶ je analizirao produkte slobodnih radikala na nivou gingivalne sulkusne tečnosti i stanovišta je da pronađeni slobodni radikali mogu učestvovati u nastanku

oksidativnog stresa, što je u skladu sa ovim istraživanjima. Istraživao je ulogu glutathion-peroksidaze i mijeloperoksidaze koji predstavljaju dva glikoproteina važna u nastanku oksidativnog stresa. Takođe, predmet njihovog istraživanja je bila i uloga interleukina 1 beta koji spada u proinflamatorne citokine i koji ima ulogu u regulaciji inflamatorne i imunološke reakcije parodontalnog tkiva kod ljudi. Oni su sakupili gingivalnu sulkusnu tečnost kod 27 pacijenata starosti od 24-62 godine. Ukupno je kod 19 pacijenata dijagnostikovana parodontopatija, dok je 8 pacijenata bilo zdravo i korišćeno kao kontrolna grupa. Korišćen je Elisa test kada je u odnosu na zdrave ispitanike došlo do značajnog povećanja parametara kao što su glutathion peroksidaza, laktoferin, mijeloperoksidaza i interleukin 1 beta. Pre svega, ove materije su pozitivno reagovala na periodoncijum i prisustvo plaka. Prisustvo ovih markera oksidativnog stresa je u čvrstoj korelaciji sa mnogim bolestima, a delimično i sa neravnotežom između nivoa mijeloperoksidaze-interleukina 1 beta i nivoa glutathionperoksidaze-laktoferin, što rezultuje oštećenjem tkiva i generisanjem patogenih supstanci u usnoj duplji.

Druga studija¹³⁷ je obrađivala nastanak pro-inflamatornih i markera oksidativnog stresa u gingivalnom tkivu kod pacijenata koji boluju od hronične parodontopatije. Ukupno je 18 pacijenata podeljeno u dve grupe: eksperimentalna i kontrolna. U obe grupe pacijenata su praćeni sledeći parametri: katalaza, glutathion-peroksidaza, glutathion-S-transferaza, glutathion reduktaza, ukupni glutathion, redoks glutathion, glutathion oksidaza i mijeloperoksidaza. Ova studija je pokazala, kod pacijenata sa parodontopatijom, značajno uvećanje mijeloperoksidaze, glutathion peroksidaze, glutathion-S-transferaze u odnosu na kontrolnu grupu, pokazujući korelaciju oksidativnog stresa i parodontopatije.

Prema tome, istraživanja usmerena na analizu antioksidativnog potencijala pljuvačke i seruma kod pacijenata sa parodontopatijom su izuzetno korisna u određivanju povezanosti bolesti lokalizovane u usnoj duplji i oksidativnog stresa, a naročito ka analizi poremećene ravnoteže između nivoa slobodnih radikala i antioksidanasa. Ovo je podržano i rezultatima Diaba i saradnika(2003)¹³⁸ koji su upoređivali antioksidativnu aktivnost pljuvačke kod 17 pacijenata sa periodontalnom bolešću, aktivnost nakon terapijskog tretmana i u odnosu na 20 zdravih ispitanika. Rezultati pokazuju da zdravi ispitanici imaju veću efikasnost (40-50%) u uklanjanju in-viro generisanih slobodnih radikala. Kod pacijenata sa parodontopatijom, antioksidativni potencijal pljuvačke je značajno manji, iako je nivo tri antioksidanasa (mokraćna kiselina, albumini i askorbinska kiselina) ostao približno isti.

Druga studija¹³⁹ je bila fokusirana na evaluaciju ukupnog antioksidativnog potencijala u serumu 30 subjekata kod kojih je klinički dijagnostikovano periodontitis i 30 zdravih ispitanika korišćenjem spektrofotometrije. Nivo antioksidativne zaštite je skoro duplo veći kod zdravih subjekata u odnosu na obolele, pokazujući da se antioksidativna mogućnost smanjuje sa parodontopatijom i ukazuje na negativnu korelaciju sa parodontalnim parametrima.

U zadnjih nekoliko godina usna duplja i okolne strukture su bile u fokusu istraživanja povezanosti direktnog oštećenja tkiva i produkcije slobodnih radikala. Malondialdehid (MDA) je jedan od najizučavanijih produkata peroksidacije i koji se povećava u prisustvu slobodnih radikala. U studiji¹⁴⁰ nivo MDA i ukupnog antioksidativnog potencijala u serumu, pljuvački i gingivalnoj sulkusnoj tečnosti je meren kod 36 pacijenata (19 muškaraca i 17 žena), starosti između 32-55 koji boluju od hronične parodontopatije i 28 zdravih ispitanika (13 muškaraca i 15 žena, starosti 29-51). Rezultati pokazuju da su nivoi MDA u pljuvački, gingivalnoj sulkusnoj tečnosti i ukupnog antioksidativnog potencijala značajno veći u grupi obolelih pacijenata u odnosu na kontrolnu grupu. To pokazuje da lipidna peroksidacija igra važnu ulogu u patologiji periodoncijuma. Međutim, nema značajne razlike u nivou MDA između dve opservirane grupe, što pokazuje da je nivo MDA niži u pljuvački i viši u gingivalnoj sulkusnoj tečnosti. Ovakvi rezultati su apsolutno identični sa istraživanjima u ovoj studiji. Mitohondrijalna DNK je takođe reprezentativni biomarker oksidativnog stresa kod pacijenata sa periodontitisom sudeći po studiji Canakčija¹⁴¹. U ovoj studiji, uzorci krvi i gingivalnog tkiva su sakupljeni kod 30 pacijenata sa hroničnom parodontopatijom i kod 30 zdravih ispitanika. Mogućnost brisanja mitohondrijalne DNK je notirana u 80% pacijenata, dok kod zdravih subjekata nije dokazano brisanje DNK-a, pokazujući da hiperprodukcija slobodnih radikala može da uzrokuje oštećenje na ovom nivou¹⁴².

Fiaši i saradnici¹⁴³ su upoređivali nivo glutathion-reduktaze u tumoru i u krvi, askorbinske kiseline, kao i nivo antioksidativnih enzima u tumorskom tkivu skvamoznog karcinoma, zbog boljeg razumevanja genotoksične i mutagene uloge slobodnih radikala. U tom smislu, studija je obuhvatila 18 pacijenata koji boluju od skvamoznog karcinoma i 20 zdravih ispitanika gde su upoređivani nivoi glutathion reduktaze, superoksid dizmutaze i glutathion peroksidaze. Pacijenti oboleli od oralnog skvamoznog karcinoma imaju povećan nivo glutathion reduktaze, glutathion peroksidaze, askorbinske kiseline, a smanjeni nivo superoksid dizmutaze u tumorskom tkivu i okolnoj zdravoj sluzokoži. Sa druge strane svi ovi parametri su značajno manji u krvi pacijenata sa oralnim karcinomom u odnosu na zdrave

ispitanike. Iz ovoga se može zaključiti da je antioksidativna zaštita ograničena u borbi protiv neoplastične degeneracije iako u ovom slučaju, zvuči paradoksalno, antioksidativna rezerva štiti tumorsko tkivo od nekroze i ćelijske apoptoze.

Hipoteza o programiranom korišćenju antioksidativnih komponenata u redukciji frekvencije oralnih maligniteta je često potvrđivana. Studija Manoharana i saradnika¹⁴⁴ je obuhvatila istraživanje plazme i količine tiobarbituratne kiseline, vitamina E, glutation-reduktaze, aktivnost superoksid dizmutaze, katalaze i glutationperoksidaze. Ova studija je obuhvatila 48 pacijenata, obolelih od oralnog karcinoma u različitim stadijumima, koji su podeljeni u grupe od po 16 pacijenata (stadijum II, III i IV) u odnosu na zdrave ispitanike sličnog uzrasta i pola. U studiji je dokazana povećana lipidna peroksidacija i umanjenje anti-enzimske aktivnosti, što je u skladu sa rezultatima koji su prezentovani u ovom istraživanju.

Ma i saradnici¹⁴⁵ su proučavali oštećenje DNK u oralnom epitelu kod 19 pacijenata obolelih od oralne leukoplakije korišćenjem dvostruko označene imunofluorescentne imunohistohemije. Oni zaključuju da u leukoplastičnom tkivu, kao i u displastičnom epitelu i okolnom zapaljenski izmenjenom tkivu, gomilanje 8-nitroguanina predstavlja oštećenje DNK uzrokovano azot-oksidom i 8-oksi-7,8-dihidro-2-deoksiguanozinom, koji je uslovio oštećenje DNK. Nijedna od ovih imunoloških reakcija nije identifikovana u normalnoj sluzokoži, dok je azot-oksid sintetaza, enzim koji pokazuje oštećenje ćelije, prisutan u leukoplastičnom tkivu. Takođe, histohemijska ispitivanja su pokazala prisustvo proliferativnog antigena i p53 gena.

Patologija usne duplje uzrokovana oksidativnim stresom obuhvata i Waldejerov tonzilarni prsten kao žlezdano tkivo. U tom smislu, dve studije su opisale povezanost između hipertrofije i patloških stanja limfnom tkiva i slobodnih radikala. Dogruer i saradnici¹⁴⁶ su istraživali 29 dece koja su obolela od adenotonzilarne hipertrofije u odnosu na zdrave ispitanike starosti u proseku 50 godina. Svi pacijenti su takođe imali probleme sa spavanjem kao posledicu tonzilektomije nakon opšte anestezije. Uzimana je venska krv četiri nedelje nakon operacije i mereni su nivoi malondialdehida, superoksid dismutaze, glutation peroksidaze i katalaze. Rezultati pokazuju da je nivo malondialdehida i enzima bio veoma visok preoperativni, ali se postoperativno taj nivo normalizovao. Ove činjenice pokazuju da postoji neravnoteža između oksidacije i antioksidacije kod mlađih pacijenata koji boluju od adenotonzilarne hipertrofije, a hirurški tretman u potpunosti dovodi do fiziološke ravnoteže.

Kiroglu i saradnici¹⁴⁷ su, takođe, sprovedli slična istraživanja na 20 dece koja boluju od hroničnog adenotonzilita i 19 dece koja imaju adenotonzilarnu hipertrofiju i koja su predviđena za tonzilektomiju. Upoređivan je nivo malondiladehida i katalaze preoperativno u serumu i eritrocitima. Svi ispitivani parametri su bili značajno viši od očekivanih, pokazujući da oba patološka stanja imaju slične mehanizme nastanka. Ovakvi rezultati su u skladu sa rezultatima ove studije.

Yilmaz i saradnici¹⁴⁸ su upoređivali 38 dece sa hroničnim tonzilitisom i adenoidnom hipertrofijom (predviđena za tonzilektomiju) sa 23 zdravih ispitanika. Mereni su nivoi cirkulišućeg retinola, beta-karotena, alfa tokoferola, likopena, superoksid dismutaze, askorbinske kiseline, glutation peroksidaze i malondialdehida pre operacije i jedan mesec nakon. Rezultati pokazuju u obe grupe povećanje nivoa antioksidanasa i smanjenje slobodnih radikala pre i posle intervencije, ali nikada nije postignuta ravnoteža kao kod zdravih ispitanika. U zaključku se može reći da oksidativni stres u dečijoj populaciji može da naruši ravnotežu u oro-limfatičnom tkivu, ali se nikada ne vraća u normalan nivo nakon uklanjanja patološkog tkiva.

U svojoj studiji su Zang i saradnici¹⁴⁹ određivali nivo oštećenja DNK-a u ćelijama humane oralne sluzokože kod 25 pušača i 25 zdravih ispitanika. Ova studija je koristila monoklonalna antitela specifična za vezu malondialdehid-DNK gde je dokazana visoka značajnost oštećenja DNK-a. Sa druge strane nešto modifikovana studija Yamamota¹⁵⁰ izvedena je na miševima koji su hranjeni hranom sa visokim nivoom holesterola i kod kojih je meren nivo flogogenih supstanci (lipolosaharida i proteina) u gingivalnom slukusu i uticaj ishrane na steatozu, inflamaciju i slobodne radikale u jetri. Ovaj fenomen je kvantifikovan merenjem nivoa heksanol-lizina, kao simptoma steatoze i inflamacije, i koncentracije 8-hidroksideoksiguanozina u parenhimu jetre. Masne promene zajedno sa ovakvom ishranom i visokim nivoom lipidne oksidacije mogu da dovedu do sistemskih poremećaja na eksperimentalnom nivou, što može biti potvrđeno i u kliničkim studijama na ljudima.

Na nivou usne šupljine pokretljivost zuba i reabsorpcija mlečnih zuba, važna u oblasti ortodontije, eksperimentalne studije pokazuju korelaciju između reabsorpcije, mangan-zavisne superoksid dismutaze i lipoperoksidacije¹⁵¹. Ortodonska pokretljivost zuba¹⁵² može biti u funkciji lokalne aktivnosti azot-oksida i l-arginina. Prema Poplawskom¹⁵³ uretan-dimetakrilat, koji se koristi u ortodontske i protetske svrhe, može biti uzrok oksidativnog stresa koji izaziva oštećenje DNK-a i leukocita u oralnoj sluzokoži. Na ovaj način on je protivteža vitaminu C kao jakom antioksidansu.

Mor i saradnici¹⁵⁴ su u svojoj studiji o zubnim pastama razmatrali potencijalne uzroke lezija mekih tkiva, što je već potvrđeno u eksperimentalnim studijama na keratinocitima koji su izloženi deterdžentima. Uvećane koncentracije pluronske kiseline pokazuju efekte slobodnih radikala, koji postoje in vivo i neutrališu se protokom pljuvačke. Ova istraživanja potvrđuju postojanje antioksidanasa na fiziološkom nivou koji imaju efekta u odbrani od spoljnih uticaja.

5.2. ANALIZA MARKERA INFLAMACIJE U PLJUVAČCI PACIJENATA SA FIKSNIM I MOBILNIM STOMATOLOŠKIM PROTETSKIM NADOKNADAMA

Istraživanja parametara inflamacije kod pacijenata su obuhvatila merenja: interleukina 6, imunoglobulina A, katalaze i visoko-osetljivog CRP.

5.2.1. Analiza interleukina 6 u pljuvački pacijenata

sa fiksnim i mobilnim stomatološkim protetskim nadoknadama

U grupi pacijenata sa mobilnim stomatološkim potetskim nadoknadama nivo interleukina 6 je neposredno nakon predaje proteze opao i do kraja ispitivanja vrednosti ovog parametra su se kod ovih pacijenata zadržale na gotovo istom nivou. Sa druge strane, nivo interleukina 6 je u grupi pacijenata sa fiksnim stomatološkim protetskim nadoknadama odmah nakon brušenja porastao, da bi neposredno nakon cementiranja nivo opao. Vrednosti intereleukina 6 su bile značajno veće kod pacijenata sa mobilnim stomatološkim protetskim nadoknadama. Kada dođe do inflamacije monociti i makrofazi su prve reaktivne ćelije koje proizvode IL-6. IL-6 pre svega aktivira ekspresiju i aktivaciju T limfocita, aktivira diferencijaciju B limfocita i reguliše fazu akutnog odgovora¹⁵⁵. Nivo IL-6 je značajno povećan kod pacijenata sa oralnim karcinomom¹⁵⁶. IL-6 oslobođen u toku inflamatornog odgovora dovodi do rasta tumora, dok tumor raste stimuliše inflamatorni odgovor rezultujući inflamatornu progresiju¹⁵⁷.

5.2.2. Analiza nivoa imunoglobulina A u pljuvački pacijenata sa fiksnim i mobilnim stomatološkim protetskim nadoknadama

U grupi pacijenata sa mobilnim stomatološkim protetskim nadoknadama prosečan nivo IgA je neposredno nakon predaje porastao da bi vrednosti sa vremenom opadale. Slični rezultati su i u grupi pacijenata sa fiksnim stomatološkim protetskim nadoknadama kada je najveći nivo IgA bio neposredno nakon brušenja da bi nakon 30 dana njegova vrednost bila kao na početku merenja. Vrednost IgA je pre predaje proteze bila veća kod pacijenata sa mobilnim stomatološkim protetskim nadoknadama. Pri ostalim meenjima nisu potvrđene značajne razlike u nivoima IgA između poređenih grupa. Avivi i saradnici¹⁴⁶ su u svojoj studiji istraživali oštećenja uzrokovana oralnim mukozitom kod 25 pacijenata, a koji su tretirani lekom Melphalan i transplantacijom kosti. Trećeg i sedmog dana nakon transplantacije su merili sekretorni IgA i ukupni antioksidativni kapacitet, dok je oštećenje mukoze ispitivano merenjem albumina i karbonilnih grupa. Jatrogeni mukozitis, meren trećeg i sedmog dana nakon transplantacije, pokazuje značajno smanjenje sekretornog IgA, ukupnog antioksidativnog kapaciteta i mokraćne kiseline. U prilog ovome ide, bez sumnje, neophodnost primene antioksidativne terapije kao zaštitne mere kod jatrogenog oštećenja sluzokože. Smanjen nivo IgA u pljuvački je u vezi sa povećanjem stepena gingivalne inflamacije¹⁵⁸. Brojne studije obaveštavaju o povećanom nivou IgA u akutnoj fazi i smanjenju u fazi remisije¹⁵⁹.

5.2.3. Analiza visokosenzitivnog C-reaktivni proteina (CRP) u pljuvački pacijenata sa fiksnim i mobilnim stomatološkim protetskim nadoknadama

U grupi pacijenata sa mobilnim stomatološkim protetskim nadoknadama prosečan nivo C-reaktivnog proteina (CRP) je neposredno nakon predaje proteze porastao što ukazuje na veliki inflamatorni potencijal mobilnih proteza, da bi vrednosti nakon 30 dana od predaje proteze opadale. Takođe, vrednosti CRP u grupi sa fiksnim stomatološkim protetskim nadoknadama su porasle neposredno nakon brušenja zuba. Vrednosti CRP su zatim opadale da bi 30 dana nakon predaje bile u nivou proseka. Povećanje nivoa CRP u pljuvački označava prisustvo osnovnog zapaljenskog procesa i najčešće je kod parodontopatije. Mobilne proteze su u direktnoj vezi sa inflamacijom oralne sluzokože što je uobičajeno stanje čak kod 35-50% osoba koje nose mobilne proteze. Nošenje proteza, posebno tokom noći, predstavlja glavni uzrok ovakvog stanja.

5.3. ANALIZA ODREĐENIH TOKSIČNIH EFEKATA POJEDINIH SUPSTANCI IZ FIKSNIH/MOBILNIH STOMATOLOŠKIH PROTETSKIH NADOKNADA NA PARAMETRE OKSIDATIVNOG STRESA I PARAMETRE ZAPALJENJA

Prilikom postave fiksne stomatološke protetske nadoknade karakteristična je mnogo brža adaptacija pacijenta, nego kod postave mobilne protetske nadoknade, kada često dolazi do pojave kliničkih znakova zapaljenja. Može se reći da aplikacijom fiksnih stomatoloških protetskih nadoknada, dolazi do pojave oksidativnog stresa koji je manjeg intenziteta u pljuvački, nego primenom mobilnih proteza. Sličan odnos je dobijen i analizom parametara inflamacije i markera apoptoze u pljuvački ispitanika. Takođe povećani parametri zapaljenja, oksidativnog stresa i apoptoze u pljuvački pacijenata usled aplikacije fiksnih stomatoprotetskih nadoknada, mnogo brže opadaju (normalizovati se) nego posle ugradnje mobilnih stomatoloških protetskih nadoknada. Analizirani biohemijski parametri su normalizovani nakon 30 dana od ugradnje proteza.

Polimerizacija polimetilmetakrilata koji se koristi za izradu mobilnih stomatoloških protetskih nadoknada predstavlja reakciju aktivacije inicijatora kao što je benzil-peroksid, koji se može da razloži na različite načine, kao što su: toplotna polimerizacija^{160,161} ili mikrotalasna polimerizacija^{162,164,165} Takođe se to može da izvede dodavanjem hemijskog aktivatora kao što je dimetil-p-toluidin uz određenu temperaturu^{164,166} ili svetlosnom polimerizacijom¹⁶⁷. Polimerizacija predstavlja proces pretvaranja metilmetakrilata u polimetilmetakrilat. U toku procesa polimerizacije ne dolazi do pretvaranja kompletnog monomera u polimer, tako da se u pljuvački može registrovati nevezani monomer. Njegova koncentracija zavisi od metode i uslova polimerizacije. Rezidualni monomer zaostaje i može biti izlužen u pljuvačku^{163,167}. Izluženi rezidualni monomer se smatra izuzetno odgovornim za pojavu citotoksičnosti u in vitro uslovima¹⁶⁸ i pojavu alergijskih reakcija.

Citotoksični efekat baze mobilne proteze zavisi od nekoliko faktora kao što su: odnos prah – tečnost, vreme čuvanja, metod i ciklus polimerizacije. Odnos polimera prema monomeru, ili odnos praha i tečnosti, je važan faktor u nastanku citotoksičnosti akrilatne baze. Jorge i saradnici¹⁶⁸ su istraživali odnos monomera prema polimeru na nivo rezidualnog monomera i zaključili da odnos 5:3 pokazuje niži nivo rezidualnog monomera u pljuvački nego ako je odnos 4:3. Slično tome, Kedjarune¹⁷⁵ je pronašao da veća količina monomera u mešavini izaziva veći nivo rezidualnog monomera u pljuvački i prema tome veću citotoksičnost.

Vreme čuvanja akrilata igra važnu ulogu u nastanku citotoksičnosti akrilata za zubne proteze. Lee i saradnici¹⁶⁶ ukazuju da je citotoksični efekat akrilata bio veći u prvih 24 časa nakon polimerizacije i da se smanjuje sa vremenom. Takođe, autori zaključuju da duže zadržavanja proteze u vlažnoj sredini umanjuje citotoksični efekat. Citotoksični efekat se može da dešava nekoliko dana nakon polimerizacije, ali je minimalizovan ukoliko se čuva proteza u vodi 24 časa¹⁶⁷. Predpostavka je da se toksične supstance otpuštaju u medijum u prvih 24 časa. Prema tome, preporuka je da se akrilatne proteze pre predaje pacijentu potapaju u vodu najmanje 24 časa. Takođe predlažu da proteze budu najpre potopljene u vodi 60 minuta na 50⁰C zbog redukcije monomera i umanjenja toksičnog potencijala naročito kod autopolimerizovanog akrilata¹⁶⁸. Hipersenzitivna reakcija ispitivanih pacijenata je smanjena ukoliko su proteze bile potopljene u toploj vodi. Prema ovim autorima, smanjenje količine rezidualnog monomera nakon ove procedure direktno utiče i na smanjenje nivoa slobodnih radikala. Potapanjem proteze u toplu vodu molekuli monomera difunduju veoma brzo, povećavaju nivo slobodnih radikala i vode u reakciju polimerizacije. Slični rezultati su prezentovani od strane Burala i saradnika¹⁷⁰ koji su istraživali efekat postpolimerizacije, koncentraciju rezidualnog metilmetakrilata i in vitro citotoksičnost autopolimerizirajućeg akrilata. Autori zaključuju da postpolimerizacija toplotom autopolimerizirajućeg akrilata potapanjem u vodu na 60⁰ C u trajanju od 30 minuta je klinički prihvatljiva i preporučuje se za smanjenje otpuštanja rezidualnog metakrilata.

Zavisno od temperature polimerizacije i vremena trajanja, različite količine rezidualnog monomera zaostaju i utiču na citotoksičnost. Kedjarune i saradnici¹⁷⁵ su ispitivali količinu rezidualnog monomera u odnosu na vreme polimerizacije i zaključili da duže vreme polimerizacije smanjuje citotoksičnost. U definiciji idealnog ciklusa polimerizacije akrilata Harison i Hugget¹⁷⁷ su istraživali efekte na 23 mobilne akrilatne proteze. Rezultati pokazuju da inkubacija proteze u trajanju od sedam sati na 70⁰C i podizanje temperature jedan sat na 100⁰C je idealna, jer predviđa maksimalnu konverziju rezidualnog monomera.

Metod polimerizacije je vrlo važan ako ne i odlučujući u izazivanju citotoksičnosti akrilata za zubne proteze. Zisis¹⁷² je ukazao na manji citotoksični efekat kod toplopolimerizirajućih akrilata u odnosu na samovezujuće što je u skladu i sa rezultatima Čaveza i saradnika¹⁷¹ koji su sistematski obradili ovu problematiku. Citotoksični efekti su hemijski aktivirani i utiču na gingivalne fibroblaste¹⁷⁶.

Akrilati za bazu proteze takođe imaju biodegradacioni efekat. Promene hemijskih, fizičkih i mehaničkih karakteristika akrilata u uslovima koji su prisutni u usnoj duplji se definišu kao biodegradacija tkiva. Klinički najznačajnije posledice akrilata je produkcija

potencijalno toksičnih agenasa koji mogu da izazovu niz bioloških odgovora ćelija i tkiva koja se nalaze u usnoj duplji. Degradacija polimera se ne dešava izolovano već pod uticajem faktora kao što su pljuvačka, oralni mikroorganizmi i mastikacija¹⁷⁰.

Pljuvačka, kao produkt pljuvačnih žlezdi, sadrži komponente koje učestvuju u biodegradaciji akrilata¹⁷⁸. Voda je najznačajniji deo pljuvačke i bitan faktor u degradaciji. Polimerne strukture i dentalni materijali mogu biti hemijski delimično razgrađeni kroz dva mehanizma: hidroliza i enzimski reakcija¹⁷⁹⁻¹⁸¹. Salivarni enzimi mogu da razgrađuju polimere „napadom“ na bočne lance, produkcijom potencijalno štetnih metaboličkih produkata, kao i promenom strukture. Sastav monomera je glavni faktor u determinaciji stepena degradacije, posebno kada su za to odgovorni enzimi. Različite esteraze koje su prisutne u pljuvački mogu da izazovu esterifikaciju metakrilata^{182,183}. Uticaj degradacije pod dejstvom enzima manifestuje se smanjenjem površinske tvrdoće i otpornosti na habanje.

Interakcije između oralnih mikroorganizama i polimera se odvijaju u smislu površinskog efekta koji je uzrokovan kolonizacijom bakterija i to povećanjem hrapavosti¹⁸⁴. Većina mikroorganizama koji su prisutni, naročito koji su odgovorni za karijes, parodontopatiju i stomatitis izazvan protezama, mogu da „prežive“ samo ukoliko se adheriraju na palatinalnu površinu proteze i počnu da formiraju kolonije¹⁸⁵. Adhezija bakterija na površine čvrstih zubnih tkiva je praćena akumulacijom dentalnog plaka. Hrapavost ili glatkoća površine koja se postiže procesom poliranja je najvažnija u ovom procesu¹⁸⁶. Promene u ovom pogledu utiču na nivo bakterijske adhezije. Takođe, tanak biofilm između ploče proteze i sluzokože utiče na bakterijsku akumulaciju i formiranje plaka na glatkim površinama¹⁸⁷.

Biodegradacija materijala u usnoj šupljini može biti indukovana i njegovim zamorom koji je uzrokovan prisustvom mastikatornih sila. Stalno prisustvo mehaničkih oštećenja materijala dovodi do progresivne degradacije i izazivanja pucanja veštačke smole što utiče na pojavu štetnih materija u pljuvački. Mastikacija može da izazove negativne sile smicanja i istezanja akrilata^{188,189}.

Otpuštanje komponenata iz akrilata, kao posledica biodegradacije je bila česta tema mnogih istraživača. Uglavnom su istraživanja svedena na eksperimentalne uslove u smislu izrade polimernih uzoraka akrilata raznih oblika i veličine koji su potapani u veštačku pljuvačku na temperaturi tela i tu čuvani u periodu od nekoliko sati do 1-2 meseca¹⁸⁰. U nekim studijama^{165,181} je istraživana difuzija rezidualnog monomera i drugih komponenata iz akrilatne baze proteze u ljudskoj ili veštačkoj pljuvački. Kedjarune¹⁷⁵ je koristio nestimulisanu ljudsku pljuvačku u istraživanju nivoa metilmetakrilata iz toplo i autopolimerizirajućeg akrilata. Tsuchiya¹⁹¹ je dokazao značajnu količinu formaldehida i metilmetakrilata u

pljuvački u in vivo uslovima koji su bili izluženi iz autopolimerizirajućeg akrilata. Takođe, Goncalves¹⁷³ i saradnici su pratili nivo rezidualnog metilmetakrilata kod 40 volontera kada su dokazane visoke koncentracije u prvih 24 časa, što je u skladu sa našim istraživanjima.

Izluživanje rezidualnog monomera ima uticaja na biokompatibilnost dentalnih materijala. Produkti biodegradacije su često jedini uzrok lokalne hemijske iritacije, osetljivosti i bola, labijalnog edema, inflamacije ili ulceracije sluzokože, sindrom gorućih usana i stomatita, kao isistemskih alergijskih reakcija. Ispitivanje rezidualnog monomera je različito, ali konačno izazivaju promene u ćelijskoj strukturi u smislu narušavanja integriteta ćelijske membrane ili enzimske aktivnosti i sintezi makromolekula¹⁹². Efekti metilmetakrilata se direktno dovode u vezu sa citotoksičnošću i oksidativnim stresom usled prisustva slobodnih radikala koji nastaju tokom procesa polimerizacije¹⁹³.

5.4. ULOGA DENTALNIH LEGURA U NASTANKU OKSIDATIVNOG STRESA

Biokompatibilnost i otpornost na koroziju metal-keramičkih legura je usko povezana. Toksičnost metal-keramičkih legura zavisi od različitih aspekata metalnih jona koji su odgovorni za koroziju: količina i kvalitet otpuštenih jona, eventualni sinergistički i antagonistički efekti otpuštenih jona, kao i dužina izloženosti kontakta sa okolnim tkivima¹⁹⁴. Otpušteni joni u toku korozije mogu biti otkriveni kao iznenađenje i mogu imati zbunjujući efekat¹⁹⁵. Takođe, ove metalne komponente mogu uzrokovati nepoželjni metalni ukus u ustima¹⁹⁶. Iz tih razloga pacijenti vrlo često zahtevaju uklanjanje ovih protetskih restauracija.

Mnoge studije pokazuju otpuštanje metalnih jona od visoko-plemenitih, plemenitih i neplemenitih dentalnih legura zavisno od uslova pH vrednosti koji su prisutni u usnoj duplji¹⁹⁷. Niska pH vrednost (kisela sredina) uvećava otpuštanje metalnih jona iz dentalnih legura. Ovaj efekat je naročito izražen kod dentalnih legura na bazi nikla. Dentalni plak je često adheriran za dentalne legure i kreira lokalno nisku pH vrednost. Ovaj uslov promoviše koroziju dentalnih legura dovodeći u pitanje njihovu biokompatibilnost¹⁹⁸.

Otpornost na koroziju svake legure je fundamentalno važna za njenu biokompatibilnost. Otpuštanje metalnih jona iz dentalne legure je usko povezano sa biološkim efektima kao što su: toksičnost, alergogenost i mutagenost. Određeni nivo korozionih produkata narušava biookruženje usne šupljine i može da dovede do reakcije gastrointestinalnog trakta i okolnog tkiva. Prema tome, sa biološkog stanovišta, najadekvatnije merenje korozionog

potencijala je identifikacija i kvantifikacija otpuštenih metalnih jona. Elementi kao što su berilijum, kadmijum, kobalt, hrom, bakar, gvožđe, nikal, paladijum i vanadijum su poznati kao toksični, alergijski i mutageni, pa iz tih razloga trebaju biti u izuzetno malim količinama u dentalnim legurama¹⁹⁹.

Nekoliko studija su se bavila merenjem otpuštenih metalnih jona iz dentalnih legura u različitim sastavima legura²⁰⁰. Za mnoge dentalne legure Ni je bio glavni prisutni element, dok drugi elementi kao Cr i Mo, koji su označeni kao manje toksični, su bili u manjoj koncentraciji. U komercijalnim dentalnim legurama količina za Cr i Mo je u nivou od 11 do 25 težinskih% i od 0 do 10 težinskih procenata. U već publikovanim studijama ukazuje se na zajednički uticaj ova dva metala u odnosu na otpornost na koroziju²⁰¹. To znači da dentalne legure koje sadrže nizak nivo Cr i Mo su više otporne na koroziju. Visok sadržaj Cr (25 težinskih %) je prisutan kod legura koje su izuzetno otporne na koroziju i gde je njegova distribucija ravnomerna. Može da se zaključi da ukoliko je težinski procenat za Cr između 16-20 uvećava se otpuštanje jona nikla bez obzira da li je sredina bazna ili kisela.

Plemeniti metali su poznati kao otporni na koroziju. Studije su pokazale da dentalne legure koje sadrže manje od 50% plemenitih metala gube sjaj, potamnjuju i korodiraju. Prema tome, biološki rizici mogu biti svedeni na minimum sa visoko-plemenitim i plemenitim legurama zbog toga što je količina otpuštenih jona niska. Uprkos tome, postoje suprostavljeni podaci o otpuštenim jonima zavisno od pH vrednosti, koji se razlikuju od okruženja testiranih dentalnih legura²⁰². Sa jedne strane se kaže da niska pH vrednost uzrokuje otpuštanje jona Au, dok sa druge strane je dokazano da plemenite legure nisu značajno ugrožene niskom pH vrednosti.

Titanijum i njegove legure su danas prihvaćene kao osnovni materijal za mnogostruku primenu zbog njihove kombinacije odličnih mehaničkih karakteristika i otpornosti na koroziju. Pre svega, najveći reaktivni potencijal u formiranju oksidnog sloja tokom livenja i lemljenja ima čist Ti. Postoji mnogo podataka o odličnoj biokompatibilnosti Ti i njegovih legura²⁰³. U stomatološkoj protetici Ti je korišćen za krunice i mostove, dentalne implantate, kao i za skeletirane proteze zbog odlične biokompatibilnosti. Iako Ti i njegove legure imaju hipoalergenski potencijal i poseduju dobre kliničke karakteristike kao i legure Au (tip III i IV), primena im je ograničena zbog visoke cene koštanja²⁰⁴.

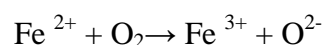
U okviru problematike ispitivanja uloge metala u nastanku oksidativnog stresa, Fe je sigurno jedan od najviše istraživanih jona. Na ulogu Fe u inicijaciji lipidne peroksidacije (LP)

ukazali su mnogi autori i dokazali da katalitički aktivno Fe katalizuje redoks reakcije između kiseonika i bioloških makromolekula. Ispitivanja Halliwella, Guteridgea, Imlaya i saradnika, kao i drugi in vitro eksperimenti²⁰⁵, ukazuju da helatizovano Fe deluje kao katalizator Fenton reakcije, olakšavajući konverziju O₂ i vodonik peroksida (H₂O₂) u hidroksi radikal (HO), koji može da reaguje sa različitim biomolekulima, poput lipida, protetina i DNK.

Većina autora se slaže da je uloga Fe u reakcijama koje se odvijaju u ćelijama esencijalna:

1. Za produkciju OH koji može da započne lipidnu oksidaciju ili oksidisati skoro bilo koji molekul prisutan u biološkim sistemima
2. Započinje reakcije slobodnih radikala razgradnjom peroksida.

In vitro eksperimenti su takođe potvrdili da Fe²⁺ jon ima sposobnost da redukuje molekularni kiseonik



In vitro i in vivo ispitivanja su pokazala da brojni antioksidansi imaju značajnu ulogu u prevenciji oštećenja organizma koja nastaju usled prooksidativnog efekta Fe. Među njima treba istaći ulogu deferoksamina, efikasnog helatnog agensa za Fe, koji deluje i kao antioksidans tako što kida lipidni lanac. Osim toga, dokazana je i pozitivna uloga vitamina C i E, kao i glutationa koji ima sposobnost da vezuje radikale, smanjuje perokside i da održava redoks stanje ćelije²⁰⁶.

Ima podataka i da brojni ksenobiotici, kao što su veoma toksični parakvat i dikvat, nitrofurantoin mogu da dovedu do oslobađanja Fe iz glavnog depo proteina – feritina ili transferina krvi, što vodi povećanom stvaranju reaktivnih vrsta kiseonika²⁰⁷. U okviru ispitivanja interakcija Fe u nastanku mikrozomalne lipidne peroksidacije dejstvom 2,3,7,8-tetrahlorodibenzo-p-dioksina, kao i ispitivanja japanskih naučnika koji su, ispitujući karcinogenost nitrilotriacetata su dokazali da helat Fe sa nitrilotriacetatom inicira lipidnu peroksidaciju.

Podaci iz literature ukazuju da Fe potencira i toksičnost etanola. Nil i Gilarte²⁰⁸ su ispitivali ulogu Fe u hepatocelularnim oštećenjima izazvanih etanolom i u ogleđima na pacovima i dobili biohemijske i morfološke dokaze povećanog hepatocelularnog oštećenja pri istovremenom davanju etanola i Fe.

Dosadašnji rezultati sugerišu da su Cr^{6+} i Cr^{3+} biološki aktivna oksidaciona stanja Cr koja su uključena u ciklus reakcija u kojim nastaju slobodni radikali²⁰⁹. Sam Cr^{6+} ne reaguje sa DNK in vitro ili izolovanim nukleusom, međutim, u prisustvu bioloških reduktanata, askorbata, cisteina, lipoinske kiseline, fruktoze, riboze i drugih nastaje Cr^{5+} koji u daljim reakcijama izaziva oksidativna oštećenja²¹⁰. *In vivo* ispitivanja ukazuju da redukciju Cr^{6+} jona favorizuju prvenstveno glutacion reduktaza, askorbat i flavoenzimi²¹¹. Nastali dugoživeći Cr^{5+} joni zatim reaguju sa H_2O_2 u Fentonovoj reakciji, gradeći veoma reaktivne OH^\cdot , čime bi se mogla objasniti i citotoksičnost Cr^{6+} ²¹². Redukovani oblik glutaciona, osim što i sam može izazvati oštećenje ćelije, može dalje da reaguje sa tiolnim grupama pri čemu nastaje O^{2-} . Superoksidni radikal može dalje da redukuje Cr^{6+} do Cr^{5+} koji zatim u reakciji sa H_2O_2 ponovo daje OH^\cdot . Petovalentni Cr se takođe može redukovati u prisustvu ćelijskih reduktanata pri čemu nastaje Cr^{4+} koji zatim ulazi u Fentonovu reakciju²¹³. Iako se donedavno smatralo da je Cr^{3+} netoksičan, novija istraživanja ukazuju da u prisustvu bioloških reaktanata može doći do njegove redukcije do Cr^{2+} koji takođe u Fentonovoj reakciji daje OH^\cdot ²¹⁴.

6. ZAKLJUČCI

Na osnovu sprovedenog istraživanja mogu se izvesti sledeći zaključci:

1. U grupi pacijenata sa mobilnim protezama vrednost MDA u pljuvačnici nakon intervencije rasla, maksimalnu vrednost je dostigla 7 dana nakon predaje, dok je u grupi pacijenata sa fiksnim protezama MDA neznatno porasla nakon 7 dana. Prosečna vrednost MDA se 30 dana nakon predaje vratila na gotovo isti nivo. Promene vrednosti MDA u toku celokupnog perioda praćenja se nisu dešavale na značajno različit način kod ispitanika sa mobilnim i fiksnim protezama.

2. U grupi pacijenata sa mobilnim i fiksnim protezama vrednost AOPP u pljuvačnici je nakon intervencije rasla, a maksimalnu vrednost je dostigla 7 dana nakon predaje. Prosečna vrednost AOPP je do 30 dana nakon predaje je opala, ali ne do početnih vrednosti. Promene vrednosti AOPP u toku celokupnog perioda praćenja se nisu dešavale na značajno različit način kod ispitanika sa mobilnim i fiksnim protezama.

3. U grupi pacijenata sa mobilnim i fiksnim protezama prosečna vrednost enzima katalaze u pljuvačnici je nakon intervencije opadala, dok je maksimalni pad zabeležen 7 dana nakon predaje. Prosečna vrednost katalaze je do 30 dana lagano rasla, ali ne do početnih vrednosti. Promene vrednosti katalaze u toku celokupnog perioda praćenja se nisu dešavale na značajno različit način kod ispitanika sa mobilnim i fiksnim protezama.

4. U grupi pacijenata sa mobilnim i fiksnim protezama prosečna vrednost NF- κ B u pljuvačnici nakon intervencije rasla, a maksimalnu vrednost je dostigla 7 dana nakon predaje. Prosečna vrednost NF- κ B je do 30 dana nakon predaje je opala, ali ne do početnih vrednosti. Promene vrednosti NF- κ B u vremenu su se dešavale na značajno različit način kod ispitanika sa mobilnim i fiksnim protezama, jer su bile značajno veće kod pacijenata sa mobilnim protezama nego kod onih sa fiksnim protezama neposredno nakon predaje.

5. U grupi pacijenata sa mobilnim i fiksnim protezama prosečna koncentracija IL-6 u pljuvačnici je nakon intervencije opadala. Promene vrednosti IL-6 u vremenu su se dešavale na značajno različit način kod ispitanika sa mobilnim i fiksnim protezama.

6. U grupi sa mobilnim i fiksnim protezama prosečna vrednost IgA je nakon predaje poteza porasla, da bi se vratila nakon 30 dana na gotovo početne vrednosti.

7. U grupi sa mobilnim i fiksnim protezama prosečna vrednost hsCRP je nakon predaje porasla, da bi se vratila na gotovo početne vrednosti nakon 30 dana.

7. LITERATURA

1. Đorđević V. Biohemijska oksidacija. U: Koraćević D, Bjelaković G, Đorđević V, Nikolić J, Pavlović D, Kocić G, editors. Biochemistry. Beograd: Savremena administracija; 2000. p. 678–705.
2. Đorđević V, Pavlović D, Kocić G. Biohemija slobodnih radikala. 1st ed. Niš: Sirius Print; 2000.
3. Hensley K, Robinson KA, Gabbita SP, Salsman S, Floyd RA. Reactive oxygen species, cell signaling, and cell injury. *Free Radic Biol Med* 2000; 28(10): 1456–62.
4. Brock GR, Butterworth CJ, Matthews JB, Chapple IL. Local and systemic total antioxidant capacity in periodontitis and health. *J Clin Periodontol* 2004; 31(7): 515–21.
5. Moore S, Calder KA, Miller NJ, Rice-Evans CA. Antioxidant activity of saliva and periodontal disease. *Free Radic Res* 1994; 21(6): 417–25.
6. Ozmeric N. Advances in periodontal disease markers. *Clin Chim Acta* 2004; 343 (1–2): 1–16.
7. Nagler RM, Klein I, Zarzhevsky N, Drigues N, Reznick AZ. Characterization of the differentiated antioxidant profile of human saliva. *Free Radic Biol Med* 2002; 32(3): 268–77.
8. Sculley DV, Langley-Evans SC. Salivary antioxidants and periodontal disease status. *Proc Nutr Soc* 2002; 61(1): 137–43.
9. Klein I, Nagler RM, Toffler R, van Der Vliet A, Reznick AZ. Effect of cigarette smoke on oral peroxidase activity in human saliva: role of hydrogen cyanide. *Free Radic Biol Med* 2003; 35(11): 1448–52.
10. Todorović T. Oralna bioemija. Beograd: Stručna knjiga; 2004.
11. Battino M, Ferreiro MS, Gallardo I, Newman HN, Bullon P. The antioxidant capacity of saliva. *J Clin Periodontol* 2002; 29(3): 189–94.

12. Pruitt KM, Kamau DN, Miller K, Mansson-Rahemtulla B, Rahemtulla F. Quantitative, standardized assays for determining the concentrations of bovine lactoperoxidase, human salivary peroxidase, and human myeloperoxidase. *Anal Biochem* 1990; 191(2): 278–86.
13. Nishioka T, Maki K, Kimura M, Takahama U. Determination of salivary peroxidase activity in human mixed whole saliva. *Arch Oral Biol* 2003; 48(5): 397–400.
14. Reznick AZ, Klein I, Eiserich JP, Cross CE, Nagler RM. Inhibition of oral peroxidase activity by cigarette smoke: in vivo and in vitro studies. *Free Radic Biol Med* 2003; 34(3): 377–84.
15. Karıncaoglu Y, Batcıoglu K, Erdem T, Esrefoglu M, Genc M. The levels of plasma and salivary antioxidants in the patient with recurrent aphthous stomatitis. *J Oral Pathol Med* 2005; 34(1): 7–12.
16. Scully DV, Langley-Evans SC. Periodontal disease is associated with lower antioxidant capacity in whole saliva and evidence of increased protein oxidation. *Clin Sci (Lond)* 2003; 105(2): 167–72.
17. Mandić B, Todorović T. Antioxidant status in oral cancer patients. *Oral Oncology* 2002; 8: 38–42.
18. Zappacosta B, Persichilli S, De Sole P, Mordente A, Giardina B. Effect of smoking one cigarette on antioxidant metabolites in the saliva of healthy smokers. *Arch Oral Biol* 1999; 44(6): 485–8.
19. Sugano N, Yokoyama K, Oshikawa M, Kumagai K, Takane M, Tanaka H, et al. Detection of *Streptococcus anginosus* and 8-hydroxydeoxyguanosine in saliva. *J Oral Sci* 2003; 45(4): 181–4.
20. Diab-Ladki R, Pellat B, Chahine R. Decrease in the total antioxidant activity of saliva in patients with periodontal diseases. *Clin Oral Investig* 2003; 7(2): 103–7.
21. Henskens YM, van der Weiden FA, van den Keibus PA, et al. Effect of periodontal treatment on the protein composition of whole and parotid saliva. *J Periodontol* 1996; 67: 205–12.

22. Cesco RT, Ito IY, Albuquerque RF. Levels of aspartate aminotransferase (AST) in saliva of patients with different periodontal conditions. *J Clin Periodontol* 2003; 30: 752–5.
23. Lamster IB, Kaufman E, Grbic JT, Winston LJ, Singer RE. Betaglucuronidase activity in saliva: relationship to clinical periodontal parameters. *J Periodontol* 2003; 74: 353–9.
24. Uitto VJ, Nieminen A, Coil J, Hurrtila H, Larjava H. Oral fluid elastase as an indicator of periodontal health. *J Clin Periodontol* 1996; 23: 30–7.
25. Garito ML, Prihoda TJ, McManus LM. Salivary PAF levels correlate with the severity of periodontal inflammation. *J Dent Res* 1995; 74: 1048–56.
26. Söderling E, Le Bell Y, Alanen P, Kirveskari P. Salivary buffer systems and the Dentobuff test. *Proc Finn Dent Soc* 1985; 81(5-6): 284–7.
27. Henskens YM, van den Keibus PA, Veerman EC, et al. Protein composition of whole and parotid saliva in healthy and periodontitis subjects. Determination of cystatin, albumin, amylase and IgA. *J Periodontol Res* 1996; 31: 57–65.
28. Jentsch H, Sievert Y, Gocke R. Lactoferrin and other markers from gingival crevicular fluid and saliva before and after periodontal treatment. *J Clin Periodontol* 2004; 31: 511–4.
29. Mizukawa N, Sugiyama K, Ueno T, Mishima K, Tagaki S, Sugahara T. Levels of human defensin-1 an antimicrobial peptide in saliva of patients with oral inflammation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endot* 1999; 87: 539–43.
30. Haegewald SJ. Salivary IgA in response to periodontal treatment. *Eur J Oral Sci* 2003; 111: 203–8.
31. Batino M, Ferreiro MS, Gallardo I, Newman HN, Bullon P. The antioxidant capacity of saliva. *J Clin Periodontol* 2002; 29: 189–94.
32. Broock GR, Butterworth CJ, Matthews JB, Chapple ILC. Local and systemic total antioxidant capacity in periodontitis and health. *J Clin Periodontol* 2004; 31: 515–21.
33. Diab-Ladki R, Pellat B, Chahine R. Decrease in the total antioxidant activity of saliva in patients with periodontal disease. *Clin Oral Investig* 2003; 7: 103–7.

34. Moore S, Calder KA, Miller NJ, Rice-Evans CA. Antioxidant activity of saliva and periodontal disease. *Free Radic Res* 1994; 21: 417–25.
35. Zappacosta B, Persichilli S, De Sole P, Mordente A, Giardina B. Effect of smoking one cigarette on antioxidant metabolites in the saliva of healthy smokers. *Arch Oral Biol* 1999; 44: 485–8.
36. Grant RM, Piwovar EM, Katongole-Mbidde. Comparison of saliva and serum for human immunodeficiency virus type 1 antibody testing in Uganda using a rapid recombinant assay. *Clin Diag Laboratory Immunol* 1996; 8: 640–4.
37. Nishainan P, Aziz N, Chung J, Detels R, Fahej JL. Oral fluids as an alternative to serum for measurement of markers of immune status. *Clin Diagn Immunol* 1998; 5: 507–12.
38. Holmstrom P, Synjjanen S, Laine B, Valle SL, Suni J. HIV antibodies in whole saliva detected by ELISA and Western blot assays. *J Med Virol* 1990; 732: 245–8.
39. Ramos J, Arce AY, Santos SI, Morones M, Mendoza J. Antigens and antibodies for HIV type 1 in serum, saliva and gingival fluid in patients with advanced disease [abstract]. *Int Conf AIDS*; 1994 Aug 7–12.
40. Nishimya H, Yamada M, Ueda T, Sakurai N. N-acetyl cysteine alleviates inflammatory reaction of oral epithelial cells to poly (methyl methacrylate) extract. *Acta Odontol Scand* 2015; 73: 616–25.
41. Schweickl H, Spagnuolo G, Schmalz G. Genetic and cellular toxicology of dental resin monomers. *J Dent Res* 2006; 85(10): 870–7.
42. Granger D, Kivlighan KT, Fortunato C, Harmon G, Hibel LC, Schwartz EB, Whembolua GL. Integration of salivary biomarkers into developmental and behaviorally-oriented research: problems and solutions for collecting specimens. *Physiol Behav* 2007; 92(4): 583–90.
43. Hafiz A. Principles and reactions of protein extraction, purification, and characterization. Boca Raton, London, New York, Washington, D.C.: CRC Press, Taylor & Francis Group; 2004.

44. Pendyala G, Thomas B, Kumari S. The challenge of antioxidants to free radicals in periodontitis. *J Indian Soc Periodontol* 2008; 12: 79–83.
45. Drummond JL. Degradation, fatigue and failure of resin dental composite materials. *J Dent Res* 2008; 87(8): 710–9.
46. Humphrey SP, Williamson RT. A review of saliva: normal composition, flow, and function. *J Prosthet Dent* 2001; 85: 162–9.
47. Greabu M, Battino M, Mohora M, et al. Saliva – a diagnostic window to the body, both in health and in disease. *J Med Life* 2009; 2: 124–32.
48. Krol K. Reactive oxygen species and antioxidant mechanisms in the pathogenesis of periodontitis. *Ann Acad Med Stetin* 2004; 50: 135–48. (In Polish)
49. Ashby MT. Inorganic chemistry of defensive peroxidases in the human oral cavity. *J Dent Res* 2008; 87: 900–14.
50. Jomova K, Valko M. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology* 2011; 283: 65–87
51. Richards R, McGregor N, Roberts T. Association between oxidative damage markers and self-reported temporomandibular dysfunction symptoms in patients with chronic fatigue syndrome. *J. Chronic Fatigue Syndrome* 2005; 12: 45–61.
52. Vannet VB, Mohebbian N, Wehrbein H. Toxicity of used orthodontic archwires assessed by three dimensional cell culture. *Eur J Orthod* 2006; 28: 426–32
53. Eliadeos T, Athanasion AE. In vivo aging of orthodontic alloys: implication for corrosion potential nickel release, and biocompatibility. *Angle Orthod* 2002; 72: 222–37.
54. Lu X, Bao X, Huang Y. Mechanisms of cytotoxicity of nickel ions based on gene expression profiles. *Biomaterials* 2009; 30: 141–8.
55. Trombetta D, Mondelo MR, Cimino F, Cristiani M. Toxic effect of nickel in an in vitro model of human oral epithelium. *Toxicol Lett* 2005; 159: 219–25
56. West JD, Marnett LJ. Endogenous reactive intermediates as modulators of cell signaling and cell death. *Chem Res Toxicol* 2006; 19: 173–94.

57. Chen Y, Azad MB, Gibson SB. Superoxide is the major reactive oxygen species regulating autophagy. *Cell Death Differ* 2009; 16: 1040–52.
58. Laguerre M, Leconte J, Villeneuve P. Evaluation of ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trend and challenges. *Prog Lipid Res* 2007; 46: 244–82.
59. Fernandez-Solari J, Prestifilippo JP, Vissio P, Ehrhart-Bornstein M, Bornstein SR, Rettori V, Elverdin JC. Anandamide injected into the lateral ventricle of the brain inhibits submandibular salivary secretion by attenuating parasympathetic neurotransmission. *Braz J Med Biol Res* 2009; 42: 537–44.
60. Ceaser EK, Moellering DR, Shiva A, Ramachandran A, Lander A, Venkartraman A, et al. Mechanisms of signal transduction mediated by oxidized lipids: the role of the electrophile-responsive proteome. *Biochem Soc T* 2004; 32: 151–5.
61. Miricesco D, Greaby M, Totan A, Didilescu A, Rădulescu R. The antioxidant potential of saliva: Clinical significance in oral diseases. *Ther Pharmacol Clin Toxicol* 2011; 15(2): 139–143
62. Poli G, Schaur RJ, Siems WG, Leonarduzzi G. 4-Hydroxynonenal: a membrane lipid oxidation product of medicinal interest. *Med Res Rev* 2008; 28: 569–631.
63. Noguchi N. Role of oxidative stress in adaptive responses in special reference to atherogenesis. *J Clin Biochem Nutr* 2008; 43: 131–8.
64. Preethi B, Pyati A, Dodawad R. Evaluation of flow rate, ph, buffering capacity, calcium, total protein and total antioxidant levels of saliva in caries free and caries active children - An in vivo study. *Biomed Res* 2010; 21(3): 289–94.
65. Barga G. Updating the mitochondrial free- radical theory of aging: an integrated view, key aspects and confounding concepts. *Antioxd Redox Signal* 2013; 19: 1420–45.
66. Barja G. Correlations with longevity and body size: to correct or not correct? *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2014; 69: 1096–8.
67. Beaulieu M, Schaefer HM. Rethinking the role of dietary antioxidants through the lens of self- medication. *Anim Behav* 2013; 86: 17–24.

68. Beaulieu M, Mboumba S, Willaume E, Kappeler PM, Charpentier MJ. The oxidative cost of unstable social dominance. *J Exp Biol* 2014; 217: 2629–32.
69. Blount JD, Vitikainen E I, Stott I, Cant MA. Oxidative shielding and the cost of reproduction. *Biol Rev Camb Philos Soc* 2016; 91(2); 483–97.
70. Cram D L, Blount JD, Young AJ. Oxidative status and social dominance in a wild cooperative breeder. *Funct Ecol* 2015; 29: 229–38.
71. Harper JM, Wang M, Galecki AT, Ro J, Williams JB, Miller RA. Fibroblasts from long-lived bird species are resistant to multiple forms of stress. *J Exp Biol* 2011; 214: 1902–10.
72. Isaksson C, Sheldon B, Uller T. The challenges of integrating oxidative stress into life-history biology. *Bioscience* 2011; 61: 194–202.
73. Passos JF, Nelson G, Wang C, Richter T, Simillion C, Proctor CJ, et al. Feedback between p21 and reactive oxygen production is necessary for cell senescence. *Mol Syst Biol* 2010; 6: 347.
74. Rodriguez KA, Osmulski PA, Pierce A, Weintraub ST, Gaczynska M, Buffenstein R. A cytosolic protein factor from the naked mole-rat activates proteasomes of other species and protects these from inhibition. *Biochim Biophys Acta* 2014; 1842: 2060–72.
75. Velando A, Torres R, Alonso-Alvarez C. Avoiding bad genes: oxidatively damaged DNA in the germ line and mate choice. *BioEssays* 2008; 30: 1212–9.
76. Veskokouk AS, Nikolaidis MG, Kyparos A, Kouretas D. Blood reflects tissue oxidative stress depending on biomarker and tissue studied. *Free Radic Biol Med* 2009; 47: 1371–4.
77. Yang DB, Xu YC, Wang DH, Speakman JR. Effects of reproduction on immunosuppression and oxidative damage, and hence support or otherwise for their roles as mechanisms underpinning life history trade-offs, are tissue and assay dependent. *J Exp Biol* 2013; 216: 4242–50.
78. Diolez P, Deschodt-Arsac V, Calmettes G, Gouspillou G, Arsac L, Dos Santos P, et al. Integrative methods for studying cardiac energetics. *Methods Mol Biol* 2015; 1264: 289–303. 10.1007/978-1-4939-2257-4_26

79. Gonzalez-Freire M, de Cabo R, Bernier M, Sollott SJ, Fabbri E, Navas P, et al. Reconsidering the role of mitochondria in aging. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2015; 70: 1334–42. 10.1093/gerona/glv070
80. Deminice R, Sicchieri T, Payao P. Blood and salivary oxidative stress biomarkers following an acute session of resistance exercise in humans. *Int J Sports Med* 2010; 31(9): 599–603.
81. Damirchi A, Kiani M, Jafarian V, Sariri R. Response of salivary peroxidase to exercise intensity. *Eur J Appl Physiol* 2010; 108: 1233–7.
82. Del Rio D, Stewart A, Pellegrini N. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutr Metab Cardiovasc* 2005; 15: 316–28.
83. Loguercio C, Federico A. Oxidative stress in viral and alcoholic hepatitis. *Free Radical Bio Med* 2003; 34: 1–10.
84. Delibas N, Ozcankaya R, Altuntas I. Clinical importance of erythrocyte malondialdehyde levels as a marker for cognitive deterioration in patients with dementia of Alzheimer type: a repeated study in 5-year interval. *Clin Biochem* 2002; 35: 137–41.
85. Leuratti C, Watson MA, Deag EJ, Welch A, Singh R, Gottschalg E, et al. Detection of malondialdehyde DNA adducts in human colorectal mucosa: relationship with diet and the presence of adenomas. *Cancer Epidem Biomar* 2002; 11: 267–73.
86. Zhang Y, Chen SY, Hsu T, Santella RM. Immunohistochemical detection of malondialdehyde-DNA adducts in human oral mucosa cells. *Carcinogenesis* 2002; 23: 207–11.
87. Mc Cord JM, Fridovich I. Free radicals and inflammation: protection of sinovial fluid by superoxide dismutase. *Science* 1974; 185: 529–31.
88. Halliwell B. Free radicals and antioxidants: a personal view. *Nutr Rev* 1994; 52: 253–65.
89. Faraci FM, Didion SP. Vascular protection: superoxide dismutase isoforms in the vessel wall. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24: 1367–73.

90. Prasad AS, Beck FWJ, Bao B, Snell D, Fitzgerald JT. Duration and severity of symptoms and levels of plasma interleukin-1 receptor antagonist, soluble tumor necrosis factor receptor and adhesion molecules in patients with common cold treated with zinc acetate. *J Infect Dis* 2008; 197: 795–802.
91. Mohr A, Buneker C, Gough RP, Zwacka RM. MnSOD protects colorectal cancer cells from TRAIL-induced apoptosis by inhibition of Smac/DIABLO release. *Oncogene* 2008; 27: 762–74.
92. Fukai T. Extracellular SOD and aged blood vessels. *Am J Physiol-Heart C* 2009; 297: 10–2.
93. Žorić L, Jovanović P. Oksidacioni stres u patogenezi očnih bolesti. Niš: Medicinski fakultet Niš, SVEN; 2006.
94. Cesaratto L, Vascotto C, Calligaris S, Tell G. The importance of redox state in liver damage. *Ann Hepatol* 2004; 3: 86–92.
95. Jozanov-Stankov O, Dobutović DB, Djuric J, Isenović ER. Okidativni stres kao činilac kod oboljevanja i patoloških poremećaja ljudi. *Apoll Med Aescul* 2007; 5: 31–6.
96. Rai B, Kharb S, Jain R, Anand SC. Salivary LPO product malonaldehyde in various dental diseases. *World J Med Sci* 2006; 1: 100–1.
97. Öztürk LK, Furuncuoglu H, Atala MH, Uluköylü O. Association between dental-oral health in young adults and salivary glutathione, lipid peroxidation and sialic acid levels and carbonic anhydrase activity. *Braz J Med Biol Res* 2008; 41(11): 956–9.
98. Hodosy J, Celec P. Daytime of sampling, tooth-brushing and ascorbic acid influence salivary thiobarbituric acid reacting substances - a potential clinical marker of gingival status. *Dis Markers* 2005; 21: 203–7.
99. Tothova L, Celecova V, Celec P. Salivary markers of oxidative stress and their relation to periodontal and dental status in children. *Dis Markers*. 2013; 34: 9–15.
100. Oppenheim JJ. Clinical application of cytokines. Oxford Univ Press, 1993.
101. Kishimoto T. Interleukin-6: discovery of a pleiotropic cytokine. *Arthritis Res Ther* 2006; 8 Suppl 2: s2.

102. Heinrich PC, Castell JV, Andus T. Interleukin-6 and the acute phase response. *Biochem J* 1990; 265(3): 621–36.
103. Garcia-Zubiri C, Citures MJ, Yebra-Bango M. Contribution of monocytes to overproduction of interleukin-6 in a case of cardiac myxoma. *Am J Med Sci* 2009; 338(4): 336–7.
104. Rohleder H, Aringer M, Boentert M. Role of interleukin-6 in stress, sleep and fatigue. *Ann N Y Acad Sci* 2012; 1261: 88–96.
105. Chang KP, Kao HK, Wu CC, Fang KH, Chang YL, Huang YC, Liu SC, Cheng MN. Pretreatment interleukin-6 serum levels are associated with patient survival for oral cavity squamous cell carcinoma. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2013; 148(5): 786–91.
106. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature* 2002; 420(6917): 860–7.
107. Griesel AG, Germishuys PJ. Salivary immunoglobulin A levels of persons who have stopped smoking. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1999; 87(2): 170–3.
108. Marcotte H, Lavoie MC. Oral microbial ecology and the role of salivary immunoglobulin A. *Microbiol Mol Biol Rev* 1998; 62(1): 71–109.
109. Branco-de-Almeida LS, Alves CM, Lopes FF, Pereira Ade F, Guerra RN, Pereira AL. Salivary IgA and periodontal treatment needs in diabetic patients. *Braz Oral Res* 2011; 25(6): 550–5.
110. Albandar JM, Streckfus CF, Adesanya MR, Winn DM Cigar, pipe, and cigarette smoking as risk factors for periodontal disease and tooth loss. *J Periodontol* 2000; 71(12): 1874–81.
111. Rashkova MP, Toncheva AA Gingival disease and secretory immunoglobulin a in non-stimulated saliva in children. *Folia Med* 2010; 52(4): 48–55.
112. Pakfetrat A, Falaki F, Sankian M, Abbaszadeh H. Salivary immunoglobulin A in patients with recurrent aphtous ulceration. *J Appl Sci* 2010; 10: 3117–21.

113. Miricescu D, Greabu M, Totan A, Didilescu A, Radulescu R. The antioxidant potential of saliva: clinical significance in oral diseases. *Ther, Pharmacol Clin Toxicol* 2011; 15: 139–43.
114. Halliwell B. Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. *Am J Med* 1991; 91(3C): 14S-22S.
115. Christodoulides N, Mohanty S, Miller CS, Langub MC, Floriano PN, Dharshan P, Ali MF, Bernard B, Romanovicz D, Anslyn E, Fox PC, McDevitt JT. Application of microchip assay system for the measurement of C-reactive protein in human saliva. *Lab Chip* 2005; 5(3): 261–9.
116. Rao NL, Shetty S, D'Souza J, Prasad RM, Vishal B, Shariff MH, Raghavendra U. Saliva C-reactive protein levels in patients with acute urticaria. *Biomedl Res* 2011; 22(1): 90–92.
117. Bonizzi G, Karin M. The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol* 2004; 25: 280–8.
118. Hoshino K, Sugiyama T, Matsumoto M, Tanaka T, Saito M, et al. IkappaB kinase-alpha is critical for interferon-alpha production induced by Toll-like receptors 7 and 9. *Nature* 2006; 440: 949–53.
119. Lu LF, Gondek DC, Scott ZA, Noelle RJ. NF kappa B-inducing kinase deficiency results in the development of a subset of regulatory T cells, which shows a hyperproliferative activity upon glucocorticoid-induced TNF receptor family-related gene stimulation. *J Immunol* 2005; 175: 1651–7.
120. Shin YH, Namkoong E, Choi S, Bae JS, Jin M, Hwang SM, Arote R, Choi SY, Park K. Capsaicin regulates the NF-κB pathway in salivary gland inflammation. *J Dent Res* 2013; 92(6): 547–52.
121. Aota K, Azuma M, Tamatani T, Yamashita T, Ashida Y, Sato M. Stable inhibition of NF-kappa B in salivary gland cells does not enhance sensitivity to TNF-alpha-induced apoptosis due to upregulation of TRAF-1 expression. *Exp Cell Res* 2002; 276(1): 111–9.
122. Andreeva LI, Kozhemiakin LA, Kishkun AA. Modification of the method of determining lipid peroxidation in a test using thiobarbituric acid. *Lab Delo* 1988; 11: 41–3. (in Russian)

123. Witko-Sarsat V, Friedlander M, Capeillère-Blandin C, Nguyen-Khoa T, Nguyen AT, Zingraff J, Jungers P, Descamps-Latscha B. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney Int* 1996; 49: 1304–5.
124. Goth L. A simple method for determination of serum catalase activity and revision reference range. *Clin Chim Acta* 1991; 196: 143–52.
125. Kocic G, Pavlovic R, Najman S, Nikolic G, Sokolovic D, Jevtovic-Stoimenov T, et al. Circulating ribonucleic acids and metabolic stress parameters may reflect progression of autoimmune or inflammatory conditions in juvenile type 1 diabetes. *ScientificWorldJournal* 2011; 11: 1496–508.
126. Pepys MB, Hirschfield GM. C-reactive protein: a critical update. *J Clin Invest* 2003; 111(12): 1805–12.
127. Gornowicz A, Bielawska A, Bielawski K, Grabowska SZ, Wójcicka A, Zalewska M, Maciorkowska E. Pro-inflammatory cytokines in saliva of adolescents with dental caries disease. *Ann Agric Environ Med* 2012; 19(4): 711–6.
128. Jafarzadeh A, Sadeghi M, Karam GA, Vazirinejad R. Salivary IgA and IgE levels in healthy subjects: relation to age and gender. *Braz Oral Res* 2010; 24(1): 21–7.
129. Chapple IL, Brock GR, Milward MR, Ling N, Matthews JB. Compromised GCF total antioxidant capacity in periodontitis: cause or effect? *J Clin Periodontol* 2007; 34: 103–10.
130. McCord JM. Free radicals and inflammation: protection of synovial fluid by superoxide dismutase. *Science* 1974; 185: 529–31.
131. Tate RM, Vanbenthuyzen KM, Shasby DM, McMurtry IF, Repine JE. Oxygen-radical-mediated permeability edema and vasoconstriction in isolated perfused rabbit lungs. *Am Rev Respir Dis* 1982; 126: 802–6.
132. Droge W, Eck HP, Naher H, Pekar U, Daniel V. Abnormal amino-acid concentrations in the blood of patients with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) may contribute to the immunological defect. *Biol Chem Hoppe Seyler* 1988; 369: 143–8.
133. Zhu X, Su B, Wang X, Smith MA, Perry G. Causes of oxidative stress in Alzheimer disease. *Cell Mol Life Sci* 2007; 64: 2202–10.

134. Zhang Y, Dawson VL, Dawson TM. Oxidative stress and genetics in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* 2000; 7: 240–50.
135. Greabu M, Battino M, Mohora M, Totan A, Didilescu A, Spinu T, et al. Saliva – a diagnostic window to the body, both in health and in disease. *J Med Life* 2009; 2: 124–32.
136. Ashby MT. Inorganic chemistry of defensive peroxidases in the human oral cavity. *J Dent Res* 2008; 87: 900–14.
137. Borges I Jr, Moreira EA, Filho DW, de Oliveira TB, da Silva MB, Frode TS. Proinflammatory and oxidative stress markers in patients with periodontal disease. *Mediators Inflamm* 2007; 2007: 45794.
138. Diab-Ladki R, Pellat B, Chahine R. Decrease in the total antioxidant activity of saliva in patients with periodontal diseases. *Clin Oral Investig* 2003; 7: 103–7.
139. Pendyala G, Thomas B, Kumari S. The challenge of antioxidants to free radicals in periodontitis. *J Indian Soc Periodontol* 2008; 12: 79–83.
140. Akalin FA, Baltacioglu E, Alver A, Karabulut E. Lipid peroxidation levels and total oxidant status in serum, saliva and gingival crevicular fluid in patients with chronic periodontitis. *J Clin Periodontol* 2007; 34: 558–65.
141. Canakci CF, Tatar A, Canakci V, Cicek Y, Oztas S, Orbak R. New evidence of premature oxidative DNA damage: mitochondrial DNA deletion in gingival tissue of patients with periodontitis. *J Periodontol* 2006; 77: 1894–900.
142. Sharma M, Rajappa M, et al. Oxidant-antioxidant status in Indian patients with carcinoma of posterior one-third of tongue. *Cancer Biomark* 2009; 5: 253–60.
143. Fiaschi AI, Cozzolino A, Ruggiero G, Giorgi G. Glutathione, ascorbic acid and antioxidant enzymes in the tumor tissue and blood of patients with oral squamous cell carcinoma. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2005; 9: 361–7.
144. Manoharan S, Kolanjiappan K, Suresh K, Panjamurthy K. Lipid peroxidation & antioxidants status in patients with oral squamous cell carcinoma. *Indian J Med Res* 2005; 122: 529–34.
145. Ma N, Tagawa T, Hiraku Y, Murata M, Ding X, Kawanishi S. 8-Nitroguanine formation in oral leukoplakia, a premalignant lesion. *Nitric Oxide* 2006; 14: 137–43.

146. Avivi I, Avraham S, Koren-Michowitz M, Oral integrity and salivary profile in myeloma patients undergoing highdose therapy followed by autologous SCT. *Bone Marrow Transplant* 2009; 43: 801–6.
147. Dođruer ZN1, Unal M, Eskandari G, Pata YS, Akbař Y, Cevik T, Cimen MY. Malondialdehyde and antioxidant enzymes in children with obstructiveadenotonsillar hypertrophy. *Clin Biochem* 2004; 37(8): 718–21.
148. Kiroglu AF, Noyan T, Oger M, Kara T. Oxidants and antioxidants in tonsillar and adenoidal tissue in chronicadenotonsillitis and adenotonsillar hypertrophy in children. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2006; 70: 35–8.
149. Yilmaz T, Kocan EG, Besler HT. The role of oxidants and antioxidants in chronic tonsillitis and adenoid hypertrophy in children. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2004; 68(8): 1053–8.
150. Zhang Y, Chen SY, Hsu T, Santella RM. Immunohistochemical detection of malondialdehyde-DNA adducts in human oral mucosa cells. *Carcinogenesis* 2002; 23(1): 207–11.
151. Yamamoto T, Tomofuji T, Tamaki N, Ekuni D, Azuma T, Sanbe T. Effects of topical application of lipopolysaccharide and proteases on hepatic injury induced by high-cholesterol diet in rats. *J Periodontal Res* 2010; 45(1): 129–35.
152. Arai K, Kato N, Miura M, Oguchi H. Oxygen metabolism in roots resorbing granulated tissue from bovine deciduous teeth, from the aspects of superoxide dismutase,lactate dehydrogenase, and lipid peroxidation. *Shoni Shikagaku Zasshi* 1989; 27: 487–93.
153. Shirazi M, Nilforoushan D, Alghasi H, Dehpour AR. The role of nitric oxide in orthodontic tooth movement in rats. *Angle Orthod* 2002; 72: 211–5.
154. Poplawski T, Loba K, Pawlowska E, Szczepanska J, Blasiak J. Genotoxicity of urethane dimethacrylate, a tooth restoration component. *Toxicol In Vitro* 2010; 24(3): 854–62.
155. Sistig S, Vucićević-Boras V, Lukac J, Kusić Z. Salivary IgA and IgG subclasses in oral mucosal diseases. *Oral Dis* 2002; 8(6): 282–6.

156. Edholm ES, Bengten E, Wilson M. Insights into the function of IgD. *Dev Comp Immunol* 2011; 35(12): 1309–16.
157. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature* 2002; 420(6917): 860–7.
158. Rashkova MP, Toncheva AA. Gingival disease and secretory immunoglobulin a in nonstimulated saliva in children. *Folia Med* 2010; 52(4): 48–55.
159. Pakferat A, Falaki F, Sankian M, Abbaszadeh H. Salivary immunoglobulin A in patients with eccuent aphtous ulceration. *J Appl Sci* 2010; 10: 3117–21.
160. Bayraktar G, Guvener B, Bural C, Uresin Y. Influence of polymerization method, curing process, and length of time of storage inwater on the residual methyl methacrylate content in dental acrylic resins. *J Biomed Mater Res Part B Appl Biomater* 2006; 76(2): 340–5.
161. Goldibi F, Asghari G. The level of residual monomer in acrylic denture base materials. *Res J Biol Sci* 2009; 4: 244–9
162. Celebi N, Yuzugullu B, Canay S, Yucel U. Effect of polymerization methods on the residual monomer level of acrylic resin denture base polymers. *Polym Adv Technol* 2008; 19: 201–6.
163. Bettencourt AF, Neves CB, de Almeida MS, Pinheiro LM, Oliveira SA, Lopes LP, Castro MF. Biodegradation of acrylic based resins: A review. *Dent Mater*, 2010; 26: 171–80.
164. Bartoloni JA, Murchison DF, Wofford DT, Sarkar NK. Degree of conversion in denture base materials for varied polymerization techniques. *J Oral Rehabil* 2000; 27(6): 488–93.
165. Azzarri MJ, Cortizo MS, Alessandrini JL. Effect of the curing conditions on the properties of an acrylic denture base resin microwave-polymerised. *J Dent* 2003; 31(7): 463–8.
166. Lee SY, Lai YL, Hsu TS. Influence of polymerization conditions on monomer elution and microhardness of autopolymerized polymethyl methacrylate resin. *Eur J Oral Sci* 2002; 110(2): 179–83
167. Ogle RE, Sorensen SE, Lewis EA. A new visible light-cured resin system applied to removable prosthodontics. *J Prosth Dent* 1986; 56(4): 497–506.

168. Jorge JH, Giampaolo ET, Machado AL, Vergani CE. Cytotoxicity of denture base acrylic resins: a literature review. *J Prosth Dent* 2003; 90(2): 190–3.
169. Bural C, Aktaş E, Deniz G, Ünlüçerçi Y, Kızılcın N, Bayraktar G. Effect of post polymerization heat-treatments on degree of conversion, leaching residual MMA and in vitro cytotoxicity of autopolymerizing acrylic repair resin. *Dent Mater* 2011; 27(11): 1135–43
170. Bural C, Aktaş E, Deniz G, Ünlüçerçi Y, Bayraktar G. Effect of leaching residual methyl methacrylate concentrations on in vitro cytotoxicity of heat polymerized denture base acrylic resin processed with different polymerization cycles. *J Appl Oral Sci* 2011; 19(4): 306–12.
171. Chaves CA, Machado AL, Vergani CE, de Souza RF, Giampaolo ET. Cytotoxicity of denture base and hardchairside relines materials: A systematic review. *J Prosth Dent* 2012; 107(2): 114–27.
172. Zissis A, Yannikakis S, Polyzois G, Harrison A. A long term study on residual monomer release from denture materials. *Eur J Prosthodont Restor Dent* 2008; 16(2): 81–4.
173. Gonçalves TS, de Menezes LM, Silva LE. Residual monomer of autopolymerized acrylic resin according to different manipulation and polishing methods. An in situ evaluation. *Angle Orthod* 2008; 78(4): 722–7.
174. Gonçalves TS, Morganti MA, Campos LC, Rizzato SM, Menezes LM. Allergy to autopolymerized acrylic resin in an orthodontic patient. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2006; 129(3): 431–5.
175. Kedjarune U, Charoenworalluk N, Koontongkaew S. Release of methyl methacrylate from heat-cured and autopolymerized resins: cytotoxicity testing related to residual monomer. *Aus Dent J* 1999; 44(1): 25–30.
176. Sheridan PJ, Koka S, Ewoldsen NO, Lefebvre CA, Lavin MT. Cytotoxicity of denture base resins. *Int J Prosthodont* 1997; 10(1): 73–7.
177. Harrison A, Huggett R. Effect of the curing cycle on residual monomer levels of acrylic resin denture base polymers. *J Dent* 1992; 20(6): 370–4

178. Santerre JP, Shajji L, Leung BW. Relation of dental composite formulations to their degradation and the release of hydrolyzed polymeric-resin-derived products. *Crit Rev Oral Biol Med* 2001; 12(2): 136–51.
179. Faltermeier A, Rosentritt M, Müssig D. Acrylic removable appliances: comparative evaluation of different postpolymerization methods. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2007; 131(3): 16–22.
180. Kawahara T, Nomura Y, Tanaka N, Teshima W, Okazaki M, Shintani H. Leachability of plasticizer and residual monomer from commercial temporary restorative resins. *J Dent* 2004; 32(4): 277–83.
181. Ferracane JL. Hygroscopic and hydrolytic effects in dental polymer networks. *Dent Mater* 2006; 2(3)2: 211–22.
182. Finer Y, Santerre JP. Salivary esterase activity and its association with the biodegradation of dental composites. *J Dent Res* 2004; 83(1): 22–6.
183. Lin BA, Jaffer F, Duff MD, Tang YW, Santerre JP. Identifying enzyme activities within human saliva which are relevant to dental resin composite biodegradation. *Biomaterials* 2005; 26(20): 4259–64.
184. Willershausen B, Callaway A, Ernst CP, Stender E. The influence of oral bacteria on the surfaces of resin-based dental restorative materials: an in vitro study. *Int Dent J* 1999; 49(4): 231–9.
185. Bollen CM, Lambrechts P, Quirynen M. Comparison of surface roughness of oral hard materials to the threshold surface roughness for bacterial plaque retention: a review of the literature. *Dent Mater* 1997; 13(4): 258–69.
186. Quirynen M, Marechal M, Busscher HJ, Weerkamp AH, Darius PL, van Steenberghe D. The influence of surface free energy and surface roughness on early plaque formation. An in vivo study in man. *J Clin Periodontol* 1990; 17(3): 138–44.
187. Morgan TD, Wilson M. The effects of surface roughness and type of denture acrylic on biofilm formation by *Streptococcus oralis* in constant depth film fermentor. *J Appl Microbiol* 2001; 91: 47–53.

188. Drummond J L. Degradation, fatigue and failure of resin dental composite materials. *J Dent Res* 2008; 87(8): 710–9.
189. Jepson NJ, McGill JT, McCabe JF. Influence of dietary simulating solvents on the viscoelasticity of temporary soft lining materials. *J Prosth Dent* 2000; 83(1): 25–31.
190. Boeckler AF, Morton D, Poser S, Dette KE. Release of dibenzoyl peroxide from polymethyl methacrylate denture base resins: an in vitro evaluation. *Dent Mater* 2008; 24(12): 1602–7.
191. Tsuchiya H, Hoshino Y, Tajima K, Takagi N. Leaching and cytotoxicity of formaldehyde and methyl methacrylate from acrylic resin denture base materials. *J Prosth Dent* 1994; 71(6): 618–24.
192. Huang, FM, Tai, KW, Hu, CC, Chang, YC. Cytotoxic effects of denture base materials on a permanent human oral epithelial cell line and on primary human oral fibroblasts in vitro. *Int J Prosthodont* 2001; 14: 439–43.
193. Bettencourt A, Fernandes A, Oliveira N, Monteiro J, Calado A, Castro M. Evaluation of cytotoxicity and oxidative stress induced by acrylic bone cement in Raw 264.7 macrophages. *Free Radic Biol Med* 2007; 43 Suppl. 1: S44.
194. Nierlich J, Papageorgiou SN, Bourauel C, Hültenschmidt R, Bayer S, Stark H, Keilig L. Corrosion behavior of dental alloys used for retention elements in prosthodontics. *Eur J Oral Sci* 2016; 124(3): 287–9
195. Alrabeah GO, Knowles JC, Petridis H. The effect of platform switching on the levels of metal ion release from different implant–abutment couples. *Int J Oral Sci* 2016; 8(2): 117–25.
196. Lee JJ, Song KY, Ahn SG, Choi JY, Seo JM, Park JM. Evaluation of effect of galvanic corrosion between nickel-chromium metal and titanium on ion release and cell toxicity. *J Adv Prosthodont* 2015; 7(2): 172–7.
197. Fage SW, Muris J, Jakobsen SS, Thyssen JP. Titanium: a review on exposure, release, penetration, allergy, epidemiology, and clinical reactivity. *Contact Dermatitis* 2016; 74(6): 323–45

198. Khaneh MM, Haghghat JN, Niknam O, Hormozi E, Rakhshan V. Effects of fixed orthodontic treatment using conventional (two-piece) versus metal injection moulding brackets on hair nickel and chromium levels: a double-blind randomized clinical trial. *Eur J Orthod* 2016. pii: cjw017
199. Tian M, Ma S, Niu L, Chen J. Gingival pigmentation by Ni-Cr-based metal ceramic crowns: A clinical report. *J Prosthet Dent* 2016; 115(1): 1–4
200. Garhammer P, Hiller KA, Reitingner T, Schmalz G. Metal content of saliva of patients with and without metal restorations. *Clin Oral Investig* 2004; 8(4): 238–42
201. Ramashanker S, Roopali G, Pooran C, Kaushal KA, Raghuwar DS. Quantitative analysis of leaching of different metals in human saliva from dental casting alloys: An *in vivo* study. *J Indian Prosthodont Soc* 2015; 15(3): 206–10.
202. Milheiro A, Nozaki K, Kleverlaan CJ, Muris J, Miura H, Feilzer AJ. In vitro cytotoxicity of metallic ions released from dental alloys. *Odontology* 2016; 104(2): 136–42.
203. Kardos TB Cellular responses to metal ions released from implants. *J Oral Implantol* 2014; 40(3): 294–8.
204. Yang X, Xiang N, Wei B. Effect of fluoride content on ion release from cast and selective laser melting-processed Co-Cr-Mo alloys. *J Prosthet Dent* 2014; 112(5): 1212–6.
205. Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radicals in biology and medicine. Oxford, UK: Oxford University Press; 1999.
206. Sharma B, Singh S, Siddiqi NJ. Biomedical implications of heavy metal induced imbalances in redox systems. *BioMed Res Int* 2014; 2014: 740–54.
207. Pourmand A, Al-tiae TK, Mazer-Amirshahi M. Perspective of lead toxicity, a comparison between the United States and Iran. *DARU J Pharm Sci* 2012; 20: 70.
208. Neal AP, Guilarte TR. Mechanism of lead and manganese neurotoxicity. *Toxic Res* 2013; 2: 99–114.

209. Gulson BL, Mizon KJ, Korsch MJ, Palmer JM, Donnelly JB. Mobilization of lead from human bone tissue during pregnancy and lactation—A summary of long-term research. *Sci Total Environ* 2003; 303: 79–104.
210. Navas-Acien A, Guallar E, Silbergeld EK, Rothenberg SJ. Pb exposure and cardiovascular disease—A systematic review. *Environ Health Perspect* 2007; 115: 472–82.
211. Poreba R, Gac P, Poreba M, Derkacz A, Pilecki W, Antonowicz-Juchniewicz J, Andrzejak R. Relationship between chronic exposure to lead, cadmium and manganese, blood pressure values and incidence of arterial hypertension. *Med Pr* 2010; 61: 5–14. (in Polish)
212. Flora G, Gupta D, Tiwari A. Toxicity of lead: A review with recent updates. *Interdiscip Toxicol* 2012; 5: 47–58.
213. Pastor N, Weinstein H, Jamison E, Brenowitz M. A detailed interpretation of OH radical footprints in a TBP–DNA complex reveals the role of dynamics in the mechanism of sequence specific binding. *J Mol Biol* 2000; 304: 55–68.
214. Sharma SK, Goloubinoff P, Christen P. Non-native proteins as newly identified targets of heavy metals and metalloids. In: Bánfalvi G, editor. *Cellular effects of heavy metals*. Heidelberg, Germany: Springer; 2011. pp. 263–274.

BIOGRAFIJA AUTORA

Dr Mirjana Bošković je rođena 02.02.1976 godine u Prokuplju, sa stalnim mestom boravka u Nišu. Osnovnu školu i gimnaziju - prirodno-matematički smer završila je u Prokuplju sa odličnim uspehom. Medicinski fakultet u Nišu, odsek stomatologija, upisala je školske 1995. godine, a diplomirala na istom odseku 2002. godine. Doktorske akademske studije - Bazična stomatologija na Medicinskom fakultetu u Nišu upisuje 2008. godine. Posедуje znanje engleskog jezika na nivou B2 i nemačkog jezika na nivou A1. Pohađala je dva praktična kursa iz oblasti novih tehnologija u stomatologiji u Internacionalnom centru za dentalnu edukaciju u Ivoclar-Vivadent, Liechtenstein. Glavne sfere naučnog istraživanja kandidata su bezmetalne restauracije u usnoj duplji, efekti jona metala u pljuvački, poremećaji temporomandibularnog zgloba. Nastavno-naučno veće Medicinskog fakulteta u Nišu je na sednici 13.03.2014 godine donelo odluku o usvajanju izveštaja komisije za predlog teme za izradu doktorske disertacije, pod naslovom „Praćenje biohemijskih parametara zapaljenja, oksidativnog stresa i apoptoze u pljuvački pacijenata sa fiksnim i mobilnim stomatološkim protetskim nadoknadama“ kandidata dr Mirjane Bošković. U toku svojih naučnih istraživanja dr Mirjana Bošković je objavila ukupno 12 radova od kojih su dva autorska u nacionalnim časopisima. Radovi su klasifikovani na sledeći način: 1 rad kategorije M21, 4 rada M23, 1 rad M 24 i 6 radova M51. Najvazniji radovi kandidata su

1. **Bošković M**, Stankovic S, Sokolovic D, Kocic G, Jevremovic D, Filipovic G, Ristic I. Biochemical and biological capacities of saliva in the diagnosis of oral health – literature data. *J Environ Protect Ecol* 2016; 17(3): 903–910. **IF: 0,838 (M23)**.
2. Stanković S, Vlajković S, **Bošković M**, Radenković G, Antić V, Jevremović D. Morphological and biomechanical features of the temporomandibular joint disc: An overview of recent findings. *Arch Oral Biol* 2013; 58 (10): 1475–1482. **IF: 1,796 (M21)**
3. **Bošković MV**. Treatment of abraded teeth using metal free ceramics and conventional metal-ceramic restorations. *Acta Stomatologica Naissi* 2012; 28(66): 724–730. **(M 51)**

ИЗЈАВА О АУТОРСТВУ

Изјављујем да је докторска дисертација, под насловом

Праћење биохемијских параметара запаљења, оксидативног стреса и апоптозе у пљувачци пацијената са фиксним и мобилним стоматолошким протетским надокнадама

која је одбрањена на Медицинском факултету Универзитета у Нишу:

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да ову дисертацију, ни у целини, нити у деловима, нисам пријављивао/ла на другим факултетима, нити универзитетима;
- да нисам повредио/ла ауторска права, нити злоупотребио/ла интелектуалну својину других лица.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци, који су у вези са ауторством и добијањем академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада, и то у каталогу Библиотеке, Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Нишу, као и у публикацијама Универзитета у Нишу.

У Нишу, _____ године

Потпис аутора дисертације:

(Мирјана В. Бошковић)

**ИЗЈАВА О ИСТОВЕТНОСТИ ЕЛЕКТРОНСКОГ И ШТАМПАНОГ ОБЛИКА
ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Наслов дисертације: **Праћење биохемијских параметара запаљења, оксидативног стреса и апоптозе у пљувачци пацијената са фиксним и мобилним стоматолошким протетским надокнадама**

Изјављујем да је електронски облик моје докторске дисертације, коју сам предао/ла за уношење у **Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу**, истоветан штампаном облику.

У Нишу, _____ године

Потпис аутора дисертације:

(Мирјана В. Бошковић)

ИЗЈАВА О КОРИШЋЕЊУ

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Никола Тесла“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу унесе моју докторску дисертацију, под насловом:

Праћење биохемијских параметара запаљења, оксидативног стреса и апоптозе у плувачци пацијената са фиксним и мобилним стоматолошким протетским надокнадама

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

Моју докторску дисертацију, унету у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, могу користити сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons), за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)

2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)

3. Ауторство – некомерцијално – без прераде (CC BY-NC-ND)

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)

5. Ауторство – без прераде (CC BY-ND)

6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

У Нишу, _____ године

Потпис аутора дисертације:

(Мирјана В. Бошковић)