

UNIVERZITET U BEOGRADU  
STOMATOLOŠKI FAKULTET

Katarina Z. Jovanović

**OPRAVDANOST PRIMENE HLORHEKSIDIN-  
DIGLUKONATA U OKVIRU  
KONZERVATIVNOG LEČENJA OBOLELIH OD  
PARODONTITISA – KLINIČKA, BIOHEMIJSKA  
I MIKROBIOLOŠKA STUDIJA**

Doktorska disertacija

Beograd, 2023.

UNIVERSITY OF BELGRADE  
SCHOOL OF DENTAL MEDICINE

Katarina Z. Jovanović

**CHLORHEXIDINE-DIGLUCONAT IN THE  
NONSURGICAL TREATMENT OF PATIENTS  
WITH PERIODONTITIS – CLINICAL,  
BIOCHEMICAL AND MICROBIOLOGICAL  
STUDY**

Doctoral dissertation

Belgrade, 2023.

**Mentor:**

---

dr sc. Saša Čakić, redovni profesor  
Univerzitet u Beogradu - Stomatološki fakultet

**Mentor:**

---

dr sc. Miloš Hadži Mihailović, redovni profesor  
Univerzitet u Beogradu - Stomatološki fakultet

**Članovi komisije:**

---

dr Jelena Milašin, redovni profesor  
Univerzitet u Beogradu - Stomatološki fakultet

---

dr sc. Dragan Stanimirović, vanredni profesor  
Univerzitet u Beogradu - Stomatološki fakultet

---

dr sc. Ljubinka Nikolić, naučni saradnik  
Univerzitet u Beogradu - Medicinski fakultet

---

dr sc. Jelena Lečić, docent  
Univerzitet u Istočnom Sarajevu - Medicinski fakultet

---

dr sc. Olivera Govedarica, docent  
Univerzitet u Istočnom Sarajevu - Medicinski fakultet

**Svojom odlukom broj \_\_\_\_\_ od \_\_\_\_\_ 2023. godine, Veće naučnih oblasti medicinskih nauka Univerziteta u Beogradu je potvrdilo da kandidat Katarina Z. Jovanović može da pristupi javnoj odbrani svoje doktorske disertacije pod naslovom: „Opravdanost primene hlorheksidin-diglukonata u okviru konzervativnog lečenja obolelih od parodontitisa – klinička, biohemijska i mikrobiološka studija“.**

**Datum i mesto javne odbrane:** \_\_\_\_\_

*Veliku zahvalnost dugujem mojim mentorima prof. dr Saši Čakiću i prof. dr Milošu Hadži Mihailoviću na pomoći tokom realizacije tehničkih elemenata doktorske disertacije, kao i pruženoj prilici da kao deo njihovog tima napredujem u naučnom svetu.*

*Naročitu zahvalnost dugujem prof. dr Jeleni Milašin, koja je svojim nesebičnim zalaganjem i požrtvovanjem pomogla da se realizuje ovo kompleksno istraživanje, na tehničkoj podršci, kao i za безусловnu pomoć pruženu u rešavanju mnogih naučnih dilema na koje sam nailazila.*

*Neizmernu zahvalnost dugujem dr sc. Emini Čolak, koja je svojim učestvovanjem pomogla realizaciju izvođenja ovog istraživanja, kao i pomoći tokom sprovođenja eksperimenta i podršci koju mi je pružila stručnim savetima u toku pisanja.*

*Veliko hvala svim saradnicima, članovima Laboratorije za bazična istraživanja Stomatološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, naročito dr sc. Jeleni Čarkić i dr sc. Nađi Nikolić, na savetima i pomoći prilikom rada u laboratorijskim uslovima.*

*Ogromnu zahvalnost dugujem svojoj prijateljici i kolegici dr sc. Jeleni Radovanović Dimitrijević, naučnom saradniku, zaposlenoj u Laboratoriji za radiobiologiju i molekularnu genetiku, Instituta za nuklearne nauke „Vinča”, Instituta od nacionalnog značaja za republiku Srbiju, Univerziteta u Beogradu (Beograd, Srbija), koja mi je svojim nesebičnim savetima i zalaganjem pomogla u pisanju disertacije.*

*Zahvaljujem se prijateljima, koji su imali veru u mene da ću uspeti u svojoj želji da se ostvarim i u naučnom svetu.*

*Hvala mojoj porodici, tati Zvonimiru, bratu Vladimiru, majci i mom životnom saputniku Radetu, na pruženoj podršci, razumevanju i strpljenju koje su mi pružili tokom svih ovih godina.*

*Doktorsku disertaciju posvećujem mojoj majci Danici, mojoj zvezdi vodilji, koja mi je bila i ostala najveća podrška u životu, pri svakom mom koraku obrazovanja.*

## Opravdanost primene hlorheksidin-diglukonata u okviru konzervativnog lečenja obolelih od parodontitisa - klinička, biohemijska i mikrobiološka studija

### Sažetak

Parodontitis je najučestalije oralno inflamatorno oboljenje koje prema skorašnjim istraživanjima pogađa do 50% svetske populacije i nastaje složenim interakcijama koje se odigravaju između periopatogenih mikroorganizama dentalnog plaka i imunološkog odgovora domaćina. Veoma visoka prevalenca parodontitisa ukazuje na veliki socioekonomski značaj pravovremene dijagnostike i individualnog pristupa u tretiranju ovog oboljenja. Mikrobiološka etiologija parodontitisa, dovela je do upotrebe različitih antimikrobnih agenasa, kao adjuvantne terapije konzervativnom lečenju. Rastvori hlorheksidin-diglukonata različitih koncentracija se koriste godinama unazad i do danas se smatraju zlatnim standardom u kategoriji najefikasnijih antiplak i antiseptičnih sredstava. Savremeno shvatanje patogeneze parodontitisa, zasniva se i na shvatanju uloge koju imaju slobodni radikali u sklopu oksidativnog stresa u čitavom procesu nastanka i progresije ove bolesti. Takođe, povezanost inflamatornog procesa u parodonticijumu sa nivoom parametara oksidativnog stresa i antioksidanasa u salivi, svakodnevno okupira sve veću pažnju istraživača.

Hipoteza ove doktorske disertacije jeste da će lokalna primena 0,12% rastvora hlorheksidin-diglukonata kao adjuvantne terapije konzervativnom lečenju sistemski zdravih osoba obolelih od parodontitisa, na kontrolnim merenjima nakon dva meseca, efikasnije delovati na status kliničkih parametara, zatim umanjiti salivarne markere koji su pokazatelji oksidativnog stresa, a aktivnosti antioksidativnih markera pojačati, umanjiti nivoe salivarnih inflamatornih enzima kao i kvantitativno i kvalitativno poboljšati mikrobiološki sastav subgingivalnog dentalnog plaka, u poređenju sa samo konzervativnim tretmanom. U skladu sa postavljenom hipotezom, osnovni ciljevi ove disertacije su evaluacija uticaja dva različita konzervativna terapijska protokola na mikrobiološki sastav subgingivalnog dentalnog plaka, kliničke parametre, biohemijske pokazatelje inflamacije i parametre redoks statusa u salivi.

Rezultati ove doktorske disertacije pokazali su da je primena samo konzervativne terapije uticala na smanjenje koncentracije oba oksidativna markera (malondialdehida i 8-hidroksi-2-deoksiguanozina), ali i povećala antioksidativnu aktivnost mokraćne kiseline u salivi i poboljšala sve parodontalne indekse (sem indeksa mekih naslaga). Sa druge strane, kombinovani protokol uticao je na umanjjenje koncentracije salivarnih markera oksidativnog stresa (malondialdehida), inflamatornih enzima (alanin aminotransferaze, alkalne fosfataze i gamaglutamil transferaze), zatim poboljšao status svih kliničkih parametara, smanjio ukupni broj svih ispitivanih bakterijskih sojeva i smanjio distribuciju *Treponema denticola* i *Tannerella forsythia* u uzorcima subgingivalnog dentalnog plaka, dva meseca nakon završenog tretmana.

Na osnovu rezultata ove disertacije možemo zaključiti da je kombinovani protokol pokazao veću efikasnost na smanjenje ukupnog broja svih ispitivanih mikroorganizama, ali i uticao na smanjenu distribuciju sojeva *Treponema denticola* i *Tannerella forsythia* u odnosu na samo konzervativnu terapiju u uzorcima subgingivalnog dentalnog plaka. Pored toga, zahvaljujući hlorheksidin-diglukonatu iz kombinovanog protokola, potencirano je antioksidativno delovanje glutation peroksidaze i mokraćne kiseline u salivi. Rezultati ove disertacije mogu biti vredni daljih ispitivanja međusobne povezanosti navedenih faktora, obzirom na čestu upotrebu hlorheksidin-diglukonata u svakodnevnoj stomatološkoj praksi.

**Ključne reči:** parodontitis, hlorheksidin-diglukonat, oksidativni stres, inflamatorni enzimi, saliva, konzervativna terapija, antioksidansi, periopatogeni mikroorganizmi

**Naučna oblast:** Kliničke stomatološke nauke

**Uža naučna oblast:** Parodontologija i oralna medicina

# **Chlorhexidine-digluconat in the nonsurgical treatment of patients with periodontitis – clinical, biochemical and microbiological study**

## **Abstract**

Periodontitis represents one of the most common oral inflammatory diseases, and according to recent investigations, approximately 50% of the world population has been affected. Periodontitis occurs when pathogen microorganisms of dental plaque and the immune response of the host interreact. The high prevalence of periodontitis suggests its great social and economical significance, and it is of absolute importance an adequate periodontitis diagnosis and individual therapy. Compound periodontitis microbiological etiology requires the use of various antimicrobial agents, as well as additional conservative therapy. Various concentrations of chlorhexidine-digluconate solutions have been used for decades, and are considered as gold standard due to its well established local antiplaque and antiseptic efficiency. Modern understanding of periodontitis pathology implements the understanding of free radicals participation and oxidative stress within periodontitis occurrence and progression. Further, the link between inflammatory processes in the periodontium and oxidative and antioxidative parameters in saliva has been the focus of interest.

The hypothesis of this doctoral dissertation is that adjunctive use of 0.12% chlorhexidine-digluconate as additional conservative therapy for periodontitis in systematic healthy patients, on controls two months after, would be more effective on clinical parameters, decrease qualitative and quantitative of periopathogens from subgingival plaque, decrease oxidative stress parameters and inflammatory enzymes, and increase antioxidative biomarkers in saliva, in comparison to individual under conservative treatment only. Following the hypothesis, the main objectives of this dissertation are to investigate the influence of two different presented conservative therapy protocols on clinical parameters, microbiological status of subgingival plaque, biochemical inflammatory markers, and redox status parameters in saliva.

The present study results showed that the application of only conservative therapy has decreased both oxidative biomarkers (*malondialdehyde* and *8-hydroxy-2-deoxyguanosine*) and increased antioxidative activity of uric acid in saliva and improved the status of all periodontal indexes (besides *Debris index* - Green-Vermillion). Combined protocol with chlorhexidine-digluconate decreased oxidative stress biomarkers (*malondialdehyde*) and inflammatory enzymes (*alanine aminotransferase*, *alkaline phosphatase*, and *gamma-glutamyl transferase*) in saliva, ameliorated all clinical parameters and reduced the total bacteria count, and decreased *Treponema denticola* and *Tannerella forsythia* distribution in subgingival plaque, two months after application.

According to the results of this doctoral dissertation, we can conclude that the combined protocol with chlorhexidine-digluconate showed enhanced efficiency in reducing the total bacteria count of all examined microorganisms, as well as lowering *Treponema denticola* and *Tannerella forsythia* distribution in subgingival dental plaque, compared to only conservative therapy. Additionally, chlorhexidine-digluconate enhanced glutathione peroxidase and uric acid antioxidative features in saliva. The results of this doctoral dissertation could contribute to future investigations, keeping in mind the frequent use of chlorhexidine-digluconate in ordinary dental practice.

**Keywords:** periodontitis, chlorhexidine-digluconate, oxidative stress, inflammatory enzymes, saliva, conservative therapy, antioxidants biomarkers, periopathogenic microorganisms

**Scientific field:** Clinical dental sciences

**Scientific subfield:** Periodontology and oral medicine

## SPISAK SKRAĆENICA

AO - antioksidansi

APS - amonijum persulfate (engl. *ammonium persulfate*)

GPx - glutation-peroksidaza

EDTA - etilen diamin tetra sirćetna kiselina

HH - hlorheksidin - diglukonat

KT - konzervativna terapija

MDA - malondialdehid

MK - mokraćna kiselina

OS - oksidativni stress

PAGE - poliakrilamidna gel elektroforeza (engl. *polyacrilamide gel electrophoresis*)

PCR - reakcija lančane polimeraze (engl. *Polymerase Chain Reaction*)

PMN - polimorfonuklenarni leukociti

PUFA - polinezasićene masne kiseline (engl. *polyunsaturated fatty acids*)

RNS - reaktivne azotne vrste (engl. *reactive nitrogen species*)

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

SOD - superoksid dismutaza

SR - slobodni radikali

TAS - totalni antioksidativni status (engl. *total antioxidant status*)

TEMED - tetrametiletilendiamin

8-OHdG - 8-hidroksi-2-deoksiguanozin



# Sadržaj:

1. UVOD .....	1
1.1 Gingivitis.....	1
1.1.1 Klasifikacija gingivitisa .....	1
1.1.2 Klinički, radiološki i biološki znaci i simptomi gingivitisa .....	1
1.2 Parodontopatije .....	2
1.2.1 Etiologija parodontopatija.....	2
1.2.2 Klasifikacija parodontopatije i nomenklatura .....	5
1.2.3 Terapija parodontitisa.....	7
1.2.4 Uloga inflamatornih enzima u patogenezi parodontitisa .....	8
1.3 Slobodni radikali i oksidativni stres .....	10
1.3.1 Slobodni radikali .....	10
1.3.2 Polimorfonuklearni leukociti (PMN) .....	13
1.3.3 Respiratorni prasak .....	14
1.3.4 Proces lipidne peroksidacije.....	14
1.3.5 Marker oksidativnog stresa .....	15
1.4 Antioksidativna zaštita .....	16
1.4.1 Klasifikacija antioksidativne zaštite.....	16
1.4.2 Klasifikacija antioksidanasa prema mehanizmu dejstva.....	17
1.4.3 Ukupni antioksidativni status.....	17
1.5 Uloga oksidativnog stresa u patogenezi parodontitisa .....	18
1.6 Antioksidativna uloga salive .....	19
1.6.1 Podela salivarnih antioksidanasa .....	20
1.6.2 Prednosti upotrebe salive u dijagnostičke svrhe .....	20
2. HIPOTEZA I CILJEVI ISTRAŽIVANJA .....	21
3. MATERIJAL I METODE .....	23
3.1 Hemikalije i reagensi .....	23
3.2 Eksperimentalni protokol.....	23
3.3 Terapijski protokol .....	25
3.3.1 Terapijski protokol u prvoj grupi ispitanika.....	25
3.3.2 Terapijski protokol u drugoj grupi ispitanika.....	25
3.4 Klinička merenja .....	26
3.5 Prikupljanje uzoraka pljuvačke .....	27
3.6 Prikupljanje uzoraka subgingivalnog dentalnog plaka .....	27
3.7 Detekcija mikroorganizama .....	28
3.7.1 Detekcija mikroorganizama reakcijom lančane polimeraze (engl. <i>Polymerase Chain Reaction</i> - PCR) .....	28

3.7.2 Kvantifikacija mikroorganizama metodom real - time PCR.....	32
3.8 Biohemijska ispitivanja.....	33
3.8.1 Određivanje redoks statusa .....	33
3.8.2 Određivanje koncentracije inflamatornih enzima .....	34
3.9 Statistička analiza.....	34
3.9.1 Statistička analiza mikrobioloških podataka.....	34
3.9.2 Statistička analiza biohemijskih i kliničkih podataka .....	34
4. REZULTATI.....	36
4.1 Deskriptivna analiza.....	36
4.1.1 Deskriptivna analiza sociodemografskih karakteristika (starost i pušački status) između obolelih od parodontitisa i ispitanika sa zdravim parodontcijumom .....	36
4.1.2 Deskriptivna analiza kliničkih parametara između obolelih od parodontitisa i ispitanika sa zdravim parodontcijumom .....	37
4.1.3 Deskriptivna analiza markera redoks statusa (oksidativnih i antioksidativnih) između obolelih od parodontitisa i ispitanika sa zdravim parodontcijumom .....	38
4.1.4 Deskriptivna analiza biohemijskih parametara (inflamatornih enzima) između obolelih od parodontitisa i ispitanika sa zdravim parodontcijumom pre terapije .....	38
4.1.5 Deskriptivna analiza detekcije <i>Porphyromonas gingivalis</i> , <i>Treponema denticola</i> , <i>Eikenella corrodens</i> , <i>Tannarella forsythia</i> i <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> - između obolelih od parodontitisa i ispitanika sa zdravim parodontcijumom pre terapije .....	40
4.1.6 Deskriptivna analiza kliničkih karakteristika unutar grupa (KT+HH, KT i Z grupa) pre terapije.....	41
4.1.7 Deskriptivna analiza markera redoks statusa (oksidativnih i antioksidativnih), unutar grupa (KT+HH, KT i Z grupa) pre terapije.....	42
4.1.8 Deskriptivna analiza biohemijskih parametara unutar grupa (KT+HH, KT i Z grupa) pre terapije.....	43
4.2 Analitička statistika .....	44
4.2.1 Analitička statistika kliničkih parametara unutar eksperimentalnih grupa .....	44
4.2.2 Analitička statistika parametara redoks statusa unutar eksperimentalnih grupa.....	46
4.2.3 Analitička statistika biohemijskih parametara unutar eksperimentalnih grupa .....	47
4.2.4 Analitička statistika mikrobioloških parametara unutar eksperimentalnih grupa.....	48
4.2.5 Analitička statistika parametara redoks statusa između eksperimentalnih grupa pre i posle terapije.....	50
4.2.6 Analiza promena vrednosti kliničkih parametara između eksperimentalnih grupa posle terapije.....	51
4.2.7 Analiza promena vrednosti markera redoks statusa između eksperimentalnih grupa posle terapije.....	52
4.2.8 Analiza promena vrednosti biohemijskih parametara između eksperimentalnih grupa posle terapije.....	53
4.2.9 Analiza promena distribucije periopatogenih bakterija između grupa posle terapije .....	54
4.3 Korelacione analize.....	55
5. DISKUSIJA .....	79

5.1 Uticaj dva ispitivana terapijska protokola konzervativnog lečenja na parametre redoks statusa .....	80
5.1.1 Uticaj dva terapijska protokola konzervativnog lečenja na koncentracije salivarnog 8-hidroksi-2-deoksiguanozina .....	81
5.1.2 Uticaj dva terapijska protokola konzervativnog lečenja na koncentracije malondialdehida .....	82
5.1.3 Uticaj dva terapijska protokola konzervativnog lečenja na totalni antioksidativni status .....	82
5.1.4 Uticaj dva terapijska protokola konzervativnog lečenja na aktivnost mokraćne kiseline .....	83
5.1.5 Uticaj dva terapijska protokola konzervativnog lečenja na aktivnost superoksid dizmutaze .....	84
5.1.6 Uticaj dva terapijska protokola konzervativnog lečenja na aktivnost glutacion peroksidaze .....	84
5.2 Uticaj dva terapijska protokola konzervativnog lečenja na aktivnost inflamatornih enzima ..	85
5.2.1 Uticaj dva terapijska protokola konzervativnog lečenja na aktivnost alkalne fosfataze ..	85
5.2.2 Uticaj dva terapijska protokola konzervativnog lečenja na aktivnost aspartat aminotransferaze .....	85
5.2.3 Uticaj dva terapijska protokola konzervativnog lečenja na aktivnost alanin aminotransferaze .....	86
5.2.4 Uticaj dva terapijska protokola konzervativnog lečenja na aktivnost laktat dehidrogenaze .....	86
5.2.5 Uticaj dva terapijska protokola konzervativnog lečenja na aktivnost kreatin kinaze .....	87
5.2.6 Uticaj dva terapijska protokola konzervativnog lečenja na aktivnost gama glutamil transferaze .....	87
5.3 Uticaj dva terapijska protokola konzervativnog lečenja na zastupljenost peripatogenih sojeva .....	88
5.3.1 Uticaj dva terapijska protokola konzervativnog lečenja na zastupljenost <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> .....	88
5.3.2 Uticaj dva terapijska protokola konzervativnog lečenja na zastupljenost <i>Porphyromonas gingivalis</i> .....	89
5.3.3 Uticaj dva terapijska protokola konzervativnog lečenja na zastupljenost <i>Tannerella forsythia</i> .....	89
5.3.4 Uticaj dva terapijska protokola konzervativnog lečenja na zastupljenost <i>Eikenella corrodens</i> .....	90
5.3.5 Uticaj dva terapijska protokola konzervativnog lečenja na zastupljenost <i>Treponema denticola</i> .....	91
5.3.6 Uticaj dva terapijska protokola konzervativnog lečenja na ukupan broj peripatogenih mikroorganizama .....	91
5.4 Uticaj dva terapijska protokola konzervativnog lečenja na parodontalni status .....	92
6. ZAKLJUČCI .....	94
7. LITERATURA .....	96
8. BIOGRAFIJA .....	110

# 1. UVOD

Prema definiciji Svetske Zdravstvene Organizacije (SZO), zdravlje se definiše kao „stanje potpunog fizičkog, mentalnog i socijalnog blagostanja, a ne samo odsustvo bolesti ili slabosti“ (WHO, 1948). Na osnovu ove definicije, proizilazi zaključak da parodontalno zdravlje treba definisati kao stanje bez inflamatorne parodontalne bolesti koje omogućava pojedincu da normalno funkcioniše i izbegne posledice (mentalne i fizičke) usled trenutne ili prethodne bolesti. Takođe, na osnovu opšte definicije zdravlja, parodontalno zdravlje treba da bude zasnovano na odsustvu bolesti, u odnosu na entitete kao što su gingivitis, parodontitis ili druga parodontalna oboljenja, a može podrazumevati i pacijente koji su imali istoriju uspešnog izlečenja navedenih oboljenja i koji mogu da održavaju svoju denticiju bez kliničkih znakova gingivalne inflamacije. Pored svega navedenog, parodontalno zdravlje podrazumeva i homostazu imunološkog sistema, tj. balans bioloških i inflamatornih markera koji imaju važne uloge u patogenezi parodontalnih oboljenja (Lang i Bartold, 2018).

## 1.1 Gingivitis

### 1.1.1 Klasifikacija gingivitisa

Na osnovu preporuke članova Američke akademije parodontologije i Evropskog udruženja parodontologa iz 2018.godine, usvojena je podela gingivitisa na dve kategorije:

1. Gingivitis izazvani dentalnim plakom - definišu se kao inflamatorne lezije koje nastaju kao rezultat interakcije dentalnog plaka i imenskog inflamatornog odgovora domaćina, koje zahvataju samo gingivu, odnosno ne zahvataju ostatak parodonticijuma (cement, periodontalna vlakna, alveolarnu kost). Takav vid inflamacije je reverzibilnog karaktera ukoliko se što ranije pristupi kauzalnom tretmanu koji podrazumeva uklanjanje dentalnog plaka lokalizovanog na marginalnoj gingivi i apikalno od nje.
2. Gingivitis koji nisu izazvani dentalnim plakom - definišu se kao niz stanja koja nisu uzrokovana dentalnim plakom i samim tim njegovo uklanjanje ne dovodi do izlečenja. Takve lezije mogu biti posledica sistemskog stanja ili mogu biti lokalizovane samo u usnoj duplji (I. L. C. Chapple i sar., 2018), a mogu nastati kao posledica:
  - genetskih poremećaja ( hereditarna gingivalna fibromatoza);
  - specifičnih infekcija (bakterijskog, virusnog, gljivičnog porekla);
  - inflamatornih i imunskih stanja (reakcije hipersenzitivnosti, autimunskih bolesti kože i mukoznih membrana, granulomatoznih inflamatornih lezija);
  - reaktivnih procesa;
  - neoplazmi;
  - endokrinih, nutritivnih i metaboličkih bolesti;
  - traumatskih lezija (fizičkog, hemijskog i termalnog porekla);
  - gingivalne pigmentacije (Lang i Bartold, 2018).

### 1.1.2 Klinički, radiološki i biološki znaci i simptomi gingivitisa

Klinički znaci gingivitisa manifestuju se u vidu:

- otoka gingive, koji dovodi do gubitka oštre ivice gingive i do gubitka sitnozrnaste strukture;
- krvarenja i nelagodnosti pri nežnom sondiranju;
- crvenila (Slika 2)

Simptomi koje pacijenti najčešće navode su:

- krvarenje iz desni (metalni ili promenjen ukus u ustima);
- bol;
- neprijatan zadah;
- poteškoće prilikom jela;
- izgled otečenih crvenih desni;
- umanjen kvalitet života zbog svega navedenog.

Radiografski snimci se ne mogu koristiti za dijagnostikovanje gingivitisa (I. L. C. Chapple i sar., 2018).

Murakami i sar., (2018) uradili su reviziju sistema klasifikacije gingivitisa koja se primenjivala još od 1999. godine., gde su između ostalog doneli i zaključak da je gingivitis izazvan dentalnim plakom zapravo inflamatorni odgovor gingive koji nastaje kao rezultat akumulacije bakterijskog plaka koji se nalazi u nivou i ispod ivice gingive. Iako ne izaziva direktno gubitak zuba, lečenje gingivitisa spada u primarne preventivne strategije u sprečavanju nastanka parodontitisa. Naime, epidemiološki podaci ukazuju da se gingivitis izazvan dentalnim plakom može javiti u svim starosnim grupama kod populacije sa stalnom dencijom i svakako se ova bolest smatra najčešćom formom parodontalnih oboljenja.

## **1.2 Parodontopatije**

### **1.2.1 Etiologija parodontopatija**

Parodontopatija je hronično multifaktorijalno inflamatorno oboljenje koje zahvata tkiva parodontijuma i nastaje kao kompleksna interakcija između periopatogenih mikroorganizama i imunskog odgovora domaćina. Ova bolest izazvana je od strane mikroorganizama iz dentalnog plaka, a u nastavku patogeneze, usled aktivacije i hiperaktivnosti lekocita, kao i različitih generacija citokina i matriks metaloproteinaza, dolazi do destrukcije periodontalnih tkiva (AlMoharib i sar., 2014). Iako je parodontopatija inicirana od strane mikroorganizama dentalnog plaka, destruktivni karakter bolesti u najvećoj meri je posledica prenaplašenog imunskog odgovora domaćina na ove mikroorganizme (Cekici i sar., 2014).

#### **1.2.1.1 Dentalni plak**

U sastav matriksa dentalnog plaka ulaze različite materije kao što su ugljeni hidrati, proteini, nukleinske kiseline, lipidi i drugi makromolekuli koji potiču delom od bakterija a delom od različitih materija koje potiču iz usne duplje pacijenta. Uloga ovih makromolekula i dalje nije u potpunosti ispitana. Ovi polimeri akumuliraju se kada se na površinu zuba kolonizuju mikrobne ćelije. U prvih dva sata od kolonizacije, bakterije su retko rasute po površini gleđi, tako da ih je praktično nemoguće detektovati. Tek nakon dva sata, male količine matriksa biofilma mogu se detektovati pomoću elektronskog mikroskopa. Pretpostavlja se da se matriks menja prilikom tranzicije iz biofilma sa ivica desni koje su zdrave u subgingivalni dentalni plak koji se povezuje sa parodontopatijama. Svakako, karakterizacija i proučavanje ovih makromolekula može dovesti do novih terapijskih pristupa i boljoj kontroli dentalnog plaka prilikom podvrgavanja pacijenata parodontalnoj terapiji. Zato su novija istraživanja usmerena ka proučavanju inhibicije funkcije matriksa dentalnog plaka (Bowen i sar., 2018; Cieplik, 2022; Valm, 2019).

Tokom poslednje dve decenije postalo je jasno da je raznolikost mikroorganizama povezanih sa parodontitisom velika i da u procesu nastanka parodontopatije učestvuju nekoliko stotina različitih vrsta i podvrsta (Mombelli, 2018).

Mikroorganizmi predstavljaju najvažniji deo dentalnog plaka. Iz tog razloga, mikrobnii biofilm je dugo i opsežno proučavan i pokazano je da u njegovom sastavu kod jedne osobe može da se nađe i preko 150 vrsta različitih mikroorganizama, dok je identifikovano preko 800 vrsti različitih mikroorganizama samo u okviru dentalnog plaka (Lourenço i sar., 2014). Debata koja se odnosi na to koje su vrste posebno virulentne i koje mogu da izazovu početak ove bolesti se vodi decenijama i dan danas nije završena. U te patogene vrste ubrajaju se različite gram negativne anaerobne bakterije, spirohete, pa čak i virusi, ali se pretpostavlja da ni jedan mikroorganizam nije pojedinačni uzročnik, već njihov sinergizam (Feres, F Teles, R. Teles, L. C Figueiredo, 2017).

Iako je opšteprihvaćen stav da parodontitisi nastaju kao rezultat polimikrobne infekcije, još 1996.godine postignut je dogovor da su *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* i *Tannerella forsythia* sigurni periopatogeni mikroorganizmi, a zatim je taj stav i potvrđen ponovo dvadeset godina kasnije na 5. Evropskoj radionici iz parodontologije (Sanz i Quirynen, 2005). Tada su pored navedenih mikroorganizama uvršćene još i *Prevotella intermedia* i *Treponema denticola*. Osim navedenih mikroorganizama i *Eikenella corrodens* se povezuje sa stepenom kliničke slike parodontitisa (Nickles i sar., 2016). Međutim, bez obzira na veliki broj istraživanja koje su do sada obavljena, još uvek nisu utvrđene sve vrste periopatogenih mikroorganizama koji imaju ulogu u etiologiji parodontitisa.

### 1.2.1.2 Periopatogeni mikroorganizmi

#### *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* je gram negativna bakterija, sferičnog oblika, fakultativni je anaerob i predstavlja jednog od glavnih uzročnika lokalizovane juvenilne kao i agresivne parodontopatije kod odraslih. Ima nekoliko faktora virulencije (endotoksin, leukotoksini dr) (Slika 1a) (Kesic i sar., 2008).

#### *Porphyromonas gingivalis*

*Porphyromonas gingivalis* je anaerobna, gram negativna, crno pigmentisana bakterija i produkuje crni pigment. Ova bakterija ima nekoliko mehanizama virulencije. Jedan od faktora virulencije je ugljeno-hidratni omotač koji prevenira opsonizaciju komplementom, čime se omogućava inhibicija fagocitoze i uništavanje neutrofila (Slika 1b) (Holt i sar., 1999).

#### *Tannerella forsythia*

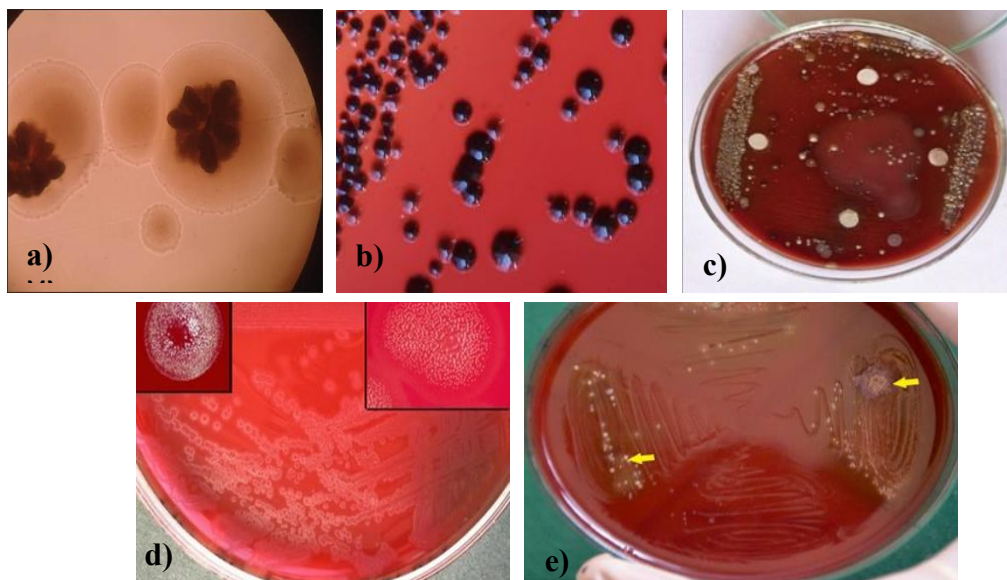
*Tannerella forsythia* je gram negativna, anaerobna bakterija koja se povezuje sa različitim formama oboljenja parodonticijuma, uključujući gingivitis, ali i hronične i agresivne forme parodontopatija, o čemu svedoče brojne studije. Ova bakterija ima nekoliko faktora virulencije koji direktnim ili indirektnim mehanizmima aktiviraju imunski odgovor domaćina i tako deluju u nastanku parodontopatije (Slika 1c) (Sharma, 2010; Tanner i Izard, 2006; Zwickl i sar., 2020).

#### *Eikenella corrodens*

*Eikenella corrodens* je fakultativna gram negativna bakterija koja je ujedno i saprofit intestinalne, genitalne i oralne sluzokože (Decker, 1986). Primarna ekološka niša ovog mikroorganizma unutar oralne šupljine je upravo dentalni plak, prisutan i kod periodontalno zdravih osoba, ali i kod pacijenata sa parodontopatijom. Ovaj patogen se često može izolovati u supra i subgingivalnom dentalnom plaku kod zdravih osoba (Slika 1d) (C. K. Chen i Wilson, 1992).

## *Treponema denticola*

*Treponema denticola* je gram negativna, obavezno anaerobna i veoma pokretna bakterija koja je veoma povezana za nastankom i razvitkom parodontopatije. Pripada tzv. crvenom kompleksu (engl. *red complex*) gde poseduje nekoliko faktora virulencije, čime direktno deluje na imunski odgovor pacijenata (Slika 1e) (Darveau, 2010).



**Slika 1.** a) Kolonije bakterije *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, uveličanje 10X (transluentna kolonija sa centralno lokalizovanim jedrom oblika zvezde); b) Kolonije bakterije *Porphyromonas gingivalis* na krvnom agaru; c) Kolonije *Tannerella forsythia* na krvnom agaru; d) Kolonije bakterije *Eikenella corrodens* na krvnom agaru; e) Kolonije bakterije *Treponema denticola* na krvnom agaru. Slike preuzete iz: a) (Nanaiah i sar., 2013); b) (Nakayama, 2015); c) (Bankur i sar., 2014); d) (Mühlhauser, 2013); e) (Moolya i sar., 2014).

### Lokalni i opšti akcesorni etiološki faktori

Osim dentalnog plaka koji je glavni etiološki faktor u nastanku parodontitisa, postoje i akcesorni etiološki faktori koji se dele na lokalne i opšte.

#### 1.2.1.3 Lokalni akcesorni etiološki faktori parodontopatije

Lokalni akcesorni etiološki faktori olakšavaju i ubrzavaju formiranje, retenciju i akumulaciju dentalnog plaka a istovremeno otežavaju ili onemogućavaju njegovo uklanjanje u toku održavanja oralne higijene i tako deluju indirektno. U ove faktore ubrajaju se: druge naslage na zubima, jatrogeni faktori, impakcija hrane, loše navike, morfološka i anatomska odstupanja mekih i koštanog tkiva, zatim traumatska okluzija koja ubrzava razvoj i povećava obim patoloških promena u parodontocijumu u toku parodontitisa.

#### 1.2.1.4 Opšti akcesorni etiološki faktori parodontopatije

Opšti akcesorni etiološki faktori utiču na smanjenje otpornosti parodontocijuma prema delovanju mikroorganizama dentalnog plaka. Na taj način olakšavaju delovanje produkata dentalnog plaka i pojavu inflamacije u parodontocijumu, utičući istovremeno i na progresiju parodontitisa.

U opšte akcesorne etiološke faktore spadaju: nutritivni faktori, oboljenja endokrinog sistema, hematološka oboljenja, imunološki poremećaji i drugi opšti faktori (Dimitrijević i sar., 2011).

## 1.2.2 Klasifikacija parodontopatije i nomenklatura

Decenijama unazad, klasifikacija parodontopatija se mnogo puta menjala. Najčešće prihvaćeni sistemi klasifikacije parodontalne bolesti bili su oni iz Američke Akademije za Parodontologiju (engl. *American Academy of Periodontology*). Tokom većeg dela prošlog veka, Akademija se borila da identifikuje i klasifikuje različite oblike parodontalne bolesti sa napretkom istraživanja i saznanja iz ove oblasti. Ovo je dovelo do čestih revizija i izmena u klasifikaciji ovog oboljenja, samim tim i konfuzije među kliničkim stomatolozima. Iz tog razloga, klasifikacije se ne smatraju trajnom strukturom, već prilagodljivom, koja se menja i razvija uporedo sa novim saznanjima (Highfield, 2009).

Parodontopatija se može javiti u svim uzrastima, počevši od ranog detinjstva (agresivna parodontopatija), ali i u srednjoj i poznoj starosnoj dobi (hronična parodontopatija, ranije „parodontopatija odraslih“).

Epidemiološki podaci, kao i iskustva kliničara širom sveta su ukazali na to da se hronična forma parodontopatije ne mora ispoljiti samo kod pacijenata starije životne dobi, već i kod adolescenata, zbog čega je termin „parodontopatija odraslih“ promenjen kasnije u „hronična parodontopatija“. Dugo se polemisalo i o toj nomenklaturi, obzirom da se dovodilo u pitanje termin „hronična“, kao forma bolesti koja bi se interpretirala kao potencijalno neizlečiva, ali je na kraju ipak bio prihvaćen i korišćen dugi niz godina (Armitage, 1999). Tradicionalno, ova forma bolesti je daleko češća, a karakteriše je spor i postepen gubitak parodontalnog tkiva (Slika 3a). Na osnovu izveštaja iz 1999. godine, utvrđeno je da se hronična parodontopatija može javiti u lokalizovanoj ili generalizovanoj formi, u zavisnosti od toga koliki je procenat zahvaćenog područja parodonticijuma. Pod lokalizovanom hroničnom parodontopatijom se smatra forma bolesti kada je patološkim procesom zahvaćeno manje od 30 %, dok se pod generalizovanom hroničnom parodontopatijom smatra forma bolesti kada je zahvaćeno više od 30% parodontalnog tkiva (Brown i Löe, 1993; Highfield, 2009).

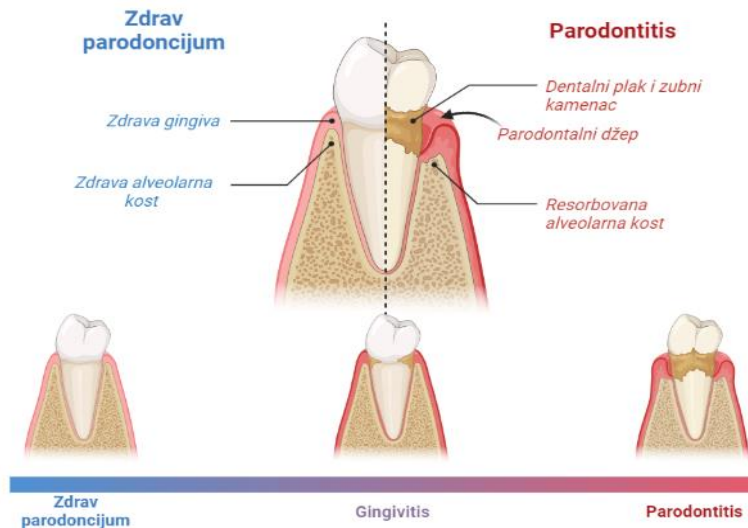
### 1.2.2.1 Hronična parodontopatija

Izveštajem radne grupe iz 2018. godine, održanoj na Svetskoj radionici o klasifikaciji parodontalnih i peri-implantatnih bolesti i stanja, usvojena je promena dotadašnje primenjivane klasifikacije ove bolesti, koja je upotrebljavana preko dve decenije. Naime, usvojena je nova šema klasifikacije parodontopatije, u kojoj su oblici bolesti koji su ranije bili prepoznati kao „hronični“ ili „agresivni“ grupisani u jedinstvenu kategoriju pod nazivom „parodontitis“, gde su na dalje okarakterisani na osnovu multidimenzijalnog sistema ocenjivanja i graduisanja stepena oboljenja. Nekrotizirajuće parodontalne bolesti čiji karakterističan klinički fenotip uključuje tipične karakteristike (nekroza papile, krvarenje i bol) i povezane su sa oštećenjem imunskog odgovora domaćina, ostaju posebna kategorija parodontopatije (Papapanou i sar., 2018) (Slika 3c).

Na osnovu savremene dijagnostike, klinička slika hronične parodontopatije (parodontitisa) se ispoljava kroz 7 osnovnih znakova:

1. inflamacija gingive;
2. ogolićenje korena zuba;
3. parodontalni džepovi (koji su i patognomonični znak parodontopatije);
4. eksudat u parodontalnim džepovima;
5. subgingivalni konkrementi na površini korena zuba u parodontalnim džepovima;
6. labavljenje zuba;
7. patološka migracija zuba (Slika 2) (Dimitrijević i sar., 2011).





**Slika 2.** Ilustracija izgleda zdravog parodontijuma, gingivitisa i parodontitisa. Slika je nacrtana uz pomoć sajta BioRender.com (2020).

### 1.2.2.2 Agresivna parodontopatija

Nasuprot hroničnoj formi, agresivna parodontopatija (ranije „rana parodontopatija”, engl. „*early onset periodontitis*”) najčešće se javlja kod dece i adolescenata, zahvata prve stalne molare i centralne sekutiće. Promena nomenklature bila je nametnuta činjenicom da od ove forme parodontopatije mogu da obole i osobe koje su starije od 30 godina. Agresivnu parodontopatiju karakteriše brza progresija i za kratak vremenski period može doći do obimnog gubitka parodontalnog tkiva i velikog broja zuba. Prema epidemiološkim podacima, od ove forme parodontopatije češće oboljevaju osobe ženskog pola od muškaraca, pri čemu simptomi najčešće počinju u pubertetu (Armitage, 2004).

#### Lokalizovana forma agresivne parodontopatije

Karakteristike lokalizovane forme agresivne parodontopatije:

- početak bolesti oko puberteta;
- zahvaćeni prvi molari i incizivi sa interproksimalnim gubitkom periodoncijuma, na najmanje dva stalna zuba (od kojih je jedan obavezno prvi molar), uključujući ne više od još dva zuba (koji ne pripadaju molarima ili incizivima);
- izrazito jak odgovor serumskih antitela na infektivne agense.

#### Generalizovana forma agresivne parodontopatije

Karakteristike generalizovane forme agresivne parodontopatije:

- uglavnom oboljevanju osobe mlađe od 30 godina, ali se bolest može ispoljiti i kod starijih osoba;
- slab odgovor serumskih antitela na infektivne agense;
- izražena destruktivna priroda bolesti koja dovodi do gubitka peridontalnog tkiva;
- generalizovani gubitak interoksimalnog periodontalnog tkiva koji zahvata najmanje tri stalna zuba (osim prvih molara i inciziva) (Highfield, 2009) (Slika 3b).

Značajno je istaći da parodontitis može biti povezan i sa određenim sistemskim bolestima poput kardiovaskularnih oboljenja, endokrinoloških oboljenja (dijabetes melitus), a ima i uticaj na ishod trudnoće (prevremeni porođaj, mala težina novorođenčeta, preeklampsija i dr.) (M. A. Nazir, 2017).



**Slika 3.** a) prikaz generalizovanog hroničnog parodontitisa; b) prikaz generalizovanog agresivnog parodontitisa; c) prikaz ulceronekrozne parodontopatije. Slike preuzete iz: a) (Cafiero i Matarasso, 2013); b) (Roshna i Nandakumar, 2012); c) (Batista i sar., 1999)

### 1.2.3 Terapija parodontitisa

#### 1.2.3.1 Konzervativna terapija parodontitisa

Obzirom da razvoj i napredovanje parodontitisa zavisi između ostalog i od prisustva patogenih mikroorganizama u supra/subgingivalnom dentalnom plaku, stoga je glavni cilj konzervativne parodontalne terapije njegovo eliminisanje, kako sa površine zuba, tako i iz periodontalnih džepova. Na taj način se smanjuje dubina džepova i zapaljenje (krvarenje prilikom sondiranja) i na kraju zaustavljanje progresije bolesti. Danas je opšte prihvaćen stav da mehaničko uklanjanje subgingivalnog plaka pomoću ručnih i ultrazvučnih/zvučnih aparata, predstavljaju najvažniji korak u lečenju parodontitisa koji dovode u velikoj većini slučajeva, do uspešnih kliničkih ishoda. Međutim, u određenim kliničkim situacijama, kao što su prisustvo dubokih parodontalnih džepova ili dubokih furkacija, mehaničko uklanjanje subgingivalnog plaka je teško i često nepotpuno (Iorio-Siciliano i sar., 2021). Još pre dve decenije, pojedini istraživači su ukazali na ograničenu mogućnost mehaničkih metoda za uklanjanje dentalnog plaka u terapiji parodontalnih džepova dubljih od 4 mm. U jednoj od tih studiji je pokazano da se broj bakterija ne menja značajno kao i da je nemoguće potpuno ukloniti plak i kalkuluse primenom samo kauzalne terapije (KT) (M. i sar., 2002).

#### 1.2.3.2 Hlorheksidin-diglukonat u terapiji parodontitisa

Gingivitis i parodontitis spadaju u infektivna oboljenja sa visokom prevalencom u ljudskoj populaciji. Samim tim, neophodno je da doktori stomatologije adekvatno procene faktore rizika za nastanak ovih oboljenja i na vreme sprovedu odgovarajuću terapiju.

S obzirom na činjenicu da su određeni mikroorganizmi dentalnog plaka, osnovni etiološki faktor odgovorni za nastanak parodontitisa, jasno je da se postavlja pitanje primene različitih antimikrobnih agenasa u lečenju navedenih oboljenja.

Iako se mnogi proizvodi koriste za kontrolu plaka i gingivitisa, hlorheksidin-diglukonat (HH) je jedan od najšire korišćenih i najviše istraživanih antiseptika. Upravo zbog tih činjenica HH se do danas smatra najefikasnijim antiseptičnim rastvorom za ispiranje usne duplje sa širokim spektrom delovanja na gram pozitivne i gram negativne bakterije, gljivice, dermatofite i neke lipofilne viruse. Svoje antibakterijsko dejstvo ispoljava narušavanjem ćelijske membrane bakterija pri čemu hlorheksidin molekuli, povećavaju permeabilnost što dovodi do citolize. Tako HH igra ključnu ulogu u stomatologiji i koristi se kako za lečenje tako i za prevenciju parodontitisa, čime je i zaslužio svoj epitet zlatnog standarda (Thangavelu i sar., 2020).

Antimikrobno dejstvo HH je dozno zavisno. Hlorheksidin-diglukonat pri niskim koncentracijama (0,02% - 0,06%) ima bakteriostatsko dejstvo, dok pri većim koncentracijama (> 0,12%) deluje baktericidno. Pozitivno naelektrisani kraj hlorheksidin molekula vezuje se za površinu zuba, dok se negativno naelektrisani kraj vezuje sa bakterijskom membranom (Karpiński i Szkaradkiewicz, 2015). Ukoliko se koristi duže od dve nedelje najčešće izaziva prebojavanje zuba, jezika i plombi (kompozitnih i glas jonomera). Takođe, može da izazove iritacije sluzokože usne duplje kao i poremećaje čula ukusa, međutim ovi simptomi su prolaznog karaktera i nestaju nakon prestanka terapije (Solderer i sar., 2019; Van Strydonck i sar., 2012).

Hlorheksidin-diglukonat je dostupan u različitim formama poput gelova, čipova sa produženim oslobađanjem, sprejeva, lakova i rastvora za ispiranje usta. Takođe se nalazi i u pastama kao i koncima za zube. Smatra se bezbednim jedinjenjem, sa minimalnim tranzitornim lokalnim i sistemskim nuspojavama (Solderer i sar., 2019).

Dokazano je da dovodi do redukcije broja bakterija kao što su : *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas Gingivalis*, *Prevotella Intermedia*, *Fusobacterium Nucleatum* itd. Prema nekim autorima adjuvantna primena rastvora HH u sklopu konzervativne terapije može značajno da poboljša tok bolesti obolelih od gingivitisa i parodontitisa (Escribano i sar., 2010; Karpiński i Szkaradkiewicz, 2015).

#### **1.2.4 Uloga inflamatornih enzima u patogenezi parodontitisa**

Odgovor organizma domaćina na inflamaciju koja nastaje u toku parodontitisa podrazumeva i produkciju različitih vrsta enzima koji se oslobađaju iz stromalnih, epitelijalnih, inflamatornih i bakterijskih ćelija (Kaufman i Lamster, 2000).

U toku inflamacije dolazi do povećanog permeabiliteta ćelijskih membrana i samim tim dolazi do povećanog izlaska ovih enzima (koji su strogo intracelularni) u ekstracelularni prostor. Osim toga, povećava se i stepen nekroze ćelija koja prati proces inflamacije i posledično dolazi do dekompozicije ćelija i intracelularnih organela (gde se takođe nalazi deo ovih enzima), izlaženje istih u ekstracelularni prostor i povećanje koncentracije ovih enzima u salivi (Ozmeric, 2004).

Medijatori koji su proizvedeni kao imunski odgovor domaćina koji doprinosi uništavanju tkiva su: proteinaze, citokini i prostaglandini. Pored njih, još jedna važna klasa molekula koja ima vodeću ulogu u procesima koji su zaduženi za degradaciju tkiva su enzimi koji proizvode parodontopatogeni mikroorganizmi, a to su: kolagen degradirajući enzimi, enzimi slični elastazi, proteaze slične tripsinu, aminopeptidaze i dipeptidilpeptidaze (McCulloch, 1994).

#### **Inflamatorni enzimi**

Enzimi koji su uključeni u proces apoptoze i oštećenja ćelija u toku inflamacije su, između ostalih i: aspartat aminotransferaza (AST), alanin aminotransferaza (ALT), alkalna fosfataza (ALP), gama glutamil transferaza (GGT), laktat dehidrogenaza (LDH), kreatin kinaza (CK) i dr. (Ozmeric, 2004).

Normalna aktivnost ovih enzima neophodna je za pravilno funkcionisanje gingive i periodoncijuma. Promene aktivnosti ovih enzima reflektuju metaboličke promene koje se dešavaju u gingivi i periodoncijumu u toku inflamacije.

Korelacije između salivarnih biomarkera i kliničkih karakteristika parodontitisa se procenjuju sa tri različita aspekta: inflamacije, degradacije kolagena i gubitka kosti. Enzimi koji predstavljaju biomarkere hronične inflamacije (AST, ALT, ALP, GGT, LDH, CK i dr.) se lako mogu detektovati u uzorcima ukupne mešovite salive kod pacijenata sa parodontitisom (Todorovic i sar., 2006).

#### **1.2.4.1 Značaj alkalne fosfataze i uloga u parodontitisu**

Alkalna fosfataza je enzim koji igra posebno važnu ulogu u metabolizmu alveolarne kosti, ali i biološkom funkcionisanju cementa i periodontalnog ligamenta. ALP se najvećim delom sintetiše u kosti, tako da se smatra najvažnijim markerom prilikom procene gustine kostiju u toku dijagnostikovanja osteoporoze. Stoga se povećanje nivoa ALP u toku parodontitisa može objasniti činjenicom da nastaje upravo zbog intenzivnog gubitka alveolarne kosti u toku ove bolesti (Ross i sar., 2000).

#### **1.2.4.2 Značaj aspartat aminotransferaze i uloga u parodontitisu**

Aspartat aminotransferaza je enzim koji oslobađanju nekrotične ćelije i njegovo povećanje je povezano sa destrukcijom parodontalnog tkiva (Oringer i sar., 2001). Zapravo AST spada u transaminaze koje se smatraju zlatnim standardom za biomarkere visoke senzitivnosti koji su pokazatelji oštećenja jetre (Schomaker i sar., 2013). Nalazi se i drugim tkivima, poput srca, mišića, bubrega, pluća i mozga (Luke i sar., 2015).

#### **1.2.4.3 Značaj alanin aminotransferaze i uloga u parodontitisu**

Alanin aminotransferaza je enzim koji je katalizator u transferu  $\text{NH}_2$  grupe sa L-alanina na alfa-ketoglutarat, stvarajući piruvat i L-glutamat, koji predstavljaju važne reakcije u ciklusu trikarboksilne kiseline (takođe poznati kao Krebsov ciklus). ALT se nalazi u intracelularnoj tečnosti hepatocita i vrednosti ovog enzima u serumu se prvenstveno koriste za otkrivanje bolesti jetre (hepatitis, steatohepatitis, autoimunihepatitis), celijakije, povrede mišića, kao i hronične virusne infekcije. Nivo ALT se povećava u serumu u toku ekstremnih fizičkih napora, povećanog unosa alkohola, određenih lekova i metaboličkog sindroma (Z. Liu i sar., 2014).

#### **1.2.4.4 Značaj laktat dehidrogenaze i uloga u parodontitisu**

Laktat dehidrogenaza je sveprisutni enzim, katalizira reakciju proizvodnje laktata putem smanjenja piruvata tokom anaerobne glikolize. Većina tkiva sadrži pet LDH izoenzima, koji iako kataliziraju istu reakciju, imaju više molekularnih oblika. LDH je intraćelijski enzim, oslobađa se u procesima ćelijskog metabolizma, čime ujedno i predstavlja pouzdan indikator ćelijskog oštećenja (Nagler i sar., 2001).

#### **1.2.4.5 Značaj kreatin kinaze i uloga u parodontitisu**

Kreatin kinaza je enzim koji se nalazi u svim kičmenjacima. Katalizira reverzibilnu reakciju kreatina i ATP, formirajući fosfokreatin i ADP. Fosfokreatin se može posmatrati kao rezervoar „visokoenergetskog fosfata” koji je u stanju da snabde ATP (primarni izvor energije u bioenergetici). Shodno tome, CK igra značajnu ulogu u energetske homeostazi ćelija, i od kliničkog je značaja s obzirom da se njegov nivo rutinski koristi u dijagnozi akutnog infarkta miokarda. Prvi put je identifikovan 1928.godine i od tada se ispituje u različitim granama medicine (McLeish i Kenyon, 2005).

### 1.2.4.6 Značaj gama glutamil transferaze i uloga u parodontitisu

Gama glutamil transferaza je enzim koji se rutinski koristi kao dijagnostički marker za otkrivanje bolesti jetre i žučnih puteva. Gama glutamil transferaza je prisutna u ćelijskim membranama mnogih tkiva uključujući bubrege, žučne puteve, pankreas, žučnu kesu, slezinu, srce, mozak. Stanja koja povećavaju serumske vrednosti GGT, kao što su opstruktivna bolest jetre i visoka konzumacija alkohola, dovode do povećane proizvodnje slobodnih radikala i rizika od redukcije ovog enzima (Whitfield, 2001). Nivoi seruma GGT u okviru njegovog normalnog opsega mogu ukazati na oksidativne nusproizvode arahidonske kiseline (F2-izoprostane) ali i na markere inflamacije (fibrinogen i C-reaktivni protein) u odnosu na njegove vrednosti (Lee i sar., 2004).

## 1.3 Slobodni radikali i oksidativni stres

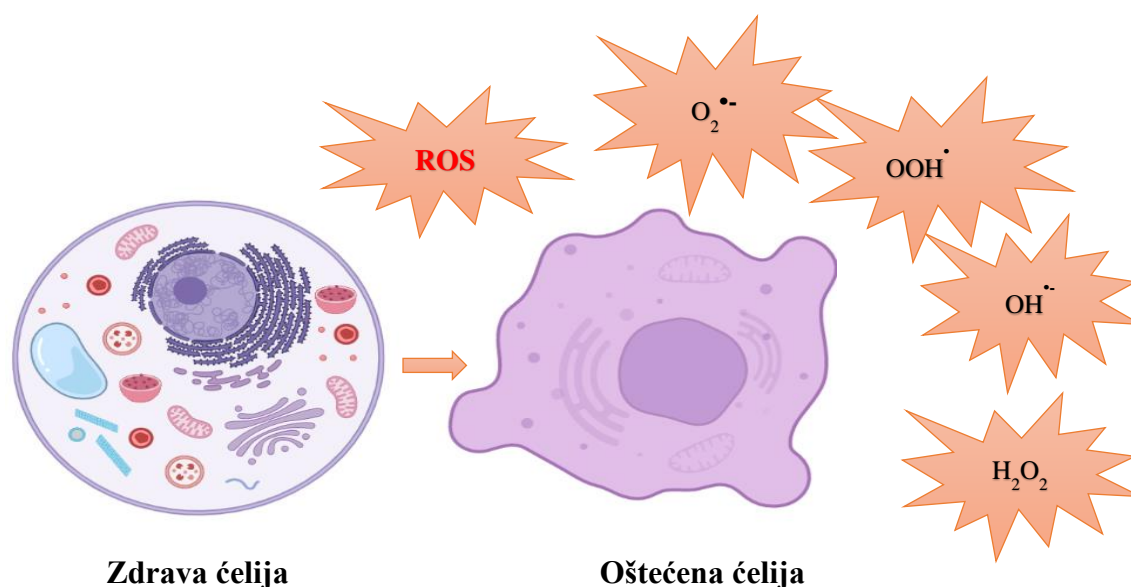
### 1.3.1 Slobodni radikali

Slobodni radikali (SR) su definisani kao atomi, grupa atoma ili molekul koji imaju jedan ili više nesparenih elektrona u poslednjoj orbitali zbog čega predstavljaju vrlo reaktivna jedinjenja, pri čemu deluju kao antioksidansi shodno njihovoj tendenciji da spare takve elektrone.

#### 1.3.1.1 Reaktivne kiseonične vrste (engl. *reactive oxygen species* ROS)

Slobodnim radikalima u biološkim sistemima pripadaju uglavnom derivati kiseonika:

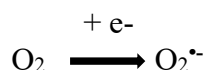
- superoksid anjon radikal ( $O_2^{\bullet-}$ );
- vodonik peroksid ( $H_2O_2$ );
- hidroksilni radikal ( $OH^{\bullet}$ );
- perhidroksi radikal ( $OOH^{\bullet}$ );
- alkoksi radikal ( $RO^{\bullet}$ );
- peroksi radikal ( $ROO^{\bullet}$ ) (Slika 4) (Todorović i sar., 2005).



**Slika 4.** Ilustracija štetnog delovanja ROS na ćelijskom nivou. ROS - reaktivne kiseonične vrste (engl. *reactive oxygen species*);  $O_2^{\bullet-}$  - superoksid anjon radikal;  $OOH^{\bullet}$  - perhidroksi radikal;  $OH^{\bullet}$  - hidroksilni radikal;  $H_2O_2$  - vodonik peroksid. Slika je nacrtana uz pomoć sajta BioRender.com (2020).

## Superoksid anjon radikal

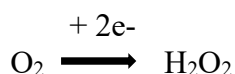
Superoksidni anjon radikal nastaje redukcijom jednog elektrona molekuskog kiseonika. Ovaj fenomen odigrava se u mnogim autooksidacionim reakcijama i u lancu transporta elektrona. Prolazi kroz dizmutaciju da bi se formirao  $H_2O_2$  spontano ili enzimskom katalizom i preteča je formacije OH koja se katalizuje metalom.



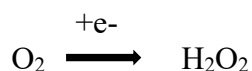
## Vodonik peroksid

Mehanizmi nastanka ovog radikala su:

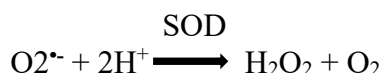
- Redukcijom dva elektrona molekuskog kiseonika:



- Direktnom redukcijom jednog elektrona molekuskog kiseonika:



- Dizmutacijom superoksid anjon radikala dejstvom enzima superoksid dizmutaze (SOD):

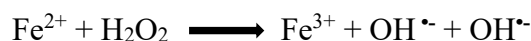


Vodonik peroksid je rastvorljiv u lipidima i ima sposobnost difuzije kroz membrane.

## Hidroksilni radikal

Hidroksilni radikal nastaje redukcijom tri elektrona, što se može odigrati putem:

- Fentonove reakcije ( $H_2O_2$  reaguje sa jonima metala ( $Fe^{2+}$  ili  $Cu^{2+}$ ) pri čemu nastaju hidrioksilni radikali:



- Raspadanjem peroksinitita.

Izuzetno je reaktivan molekul, napada većinu ćelijskih komponenti.

**Perhidroksi radikal se formira u reakcijama radikala sa ćelijskim komponentama kao što su lipidi i nukleobaze.**

**Alkoksi radikal i peroksi radikal** spadaju u organske radikale sa centralnom pozicijom kiseonika. Lipidni oblici učestvuju u lipidno-peroksidacionim reakcijama. Nastaju u prisustvo kiseonika radikalnim dodatkom duplih veza ili apstrakciji vodonika (Lobo i sar., 2010).

### 1.3.1.2 Reaktivne azotne vrste (engl. *reactive nitrogen species* RNS)

Druga vrsta SR je azotnog porekla i tu spadaju :

- azot- monoksid ( $NO^{\bullet}$ );
- azot-dioksid ( $NO_2$ );
- peroksinitrit ( $ONOO^{\bullet -}$ ) (Sabry, 2013).

## Azot-monoksid

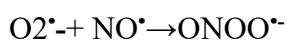
Azot-monoksid radikal se proizvodi u višim organizmima oksidacijom jednog od terminalnih atoma guanidonitrogena L-arginina. Ovaj proces je katalizovan enzimom azot-monoksid sintazom (engl. *nitric oxide synthase*). U zavisnosti od mikro okruženja, NO• se može konvertovati u razne druge RNS kao što su: azotnijumski katjon (NO<sup>+</sup>), nitroksil anjon (NO<sup>-</sup>) ili ONOO<sup>-</sup> (Dröge, 2002). NO• je endogeni molekul kratkotrajnog životnog veka, koji kao esencijalni signalni molekul igra višestruke uloge u fiziologiji sisara. Ostvaruje ulogu u različitim fiziološkim procesima kao što su kardiovaskularna homeostaza, neuronski prenos, imunomodulacija i rast tumora. Nedovoljna proizvodnja NO• povezana je sa nekoliko patoloških procesa, zbog čega se u tretiranju pojedinih oboljenja (kardiovaskularnih, respiratornih poremećaja, zaceljivanje rana, imunološki odgovor na infekciju i rak) upravo i koriste donori za NO• (Alimoradi i sar., 2019; Zhou i sar., 2016).

## Azot-dioksid

Azot-dioksid je slobodan radikal formiran in vivo, koji je u početku prepoznat kao zagađivač vazduha i dugo je proučavan u aspektima vezanim za zdravlje životne sredine i njegovim oksidativnim efektima na biomolekule (Gamon i Wille, 2016). Može da se podvrgne ili oksidaciji jednog elektrona pri čemu nastaje nitronijumski katjon (NO<sub>2</sub><sup>+</sup>) ili redukciji jednog elektrona pri čemu nastaje nitrit (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>). NO<sub>2</sub> se može proizvesti endogeno, različitim biohemijskih reakcijama, ali se takođe može formirati egzogeno s obzirom da se radi o jednom atmosferskom zagađivaču koji je zapravo rezultat sagorevanja fosilnih goriva i fotohemijskog smoga (Sauerbeck i sar., 2000). Značajne koncentracije NO<sub>2</sub> takođe mogu biti prisutni u duvanskom dimu, što je pokazano u studiji gde je detektovan u epitelijalnim ćelijama pluća, kod ispitanika koji su inhalirali ovaj molekul (Gamon i Wille, 2016). NO<sub>2</sub> takođe brzo reaguje i sa drugim radikalima, na primer sa NO•, pri čemu formira N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. NO<sub>2</sub> kao snažan oksidans i nitratni molekul može da reaguje sa nekoliko molekula u biološkim sistemima (proteini i lipidi). Sposoban je da prođe kroz različite vrste reakcija, uključujući rekombinaciju sa drugim radikalima, pored nezasićenih veza i prenosa elektrona (Augusto i sar., 2002).

## Peroksinitrit

Peroksinitrit je reaktivni biološki oksidans. Glavna reakcija koja vodi ka formiranju peroksinitrita u biološkim sistemima je difuzijom kontrolisana reakcija dva radikala azot-oksida (O<sub>2</sub><sup>-</sup> i NO).



Kratkotrajnog je životnog veka. U oblasti biohemije, termin „peroksinitrit“ obuhvata zapravo zbir dve blisko povezane vrste: peroksinitrit anjon (ONOO<sup>-</sup>) i njegove konjugovane kiseline, peroksinitritnu kiselinu (ONOOH) (Ferrer-Sueta i sar., 2018). Formiranje ONOO<sup>-</sup> u biološkim sistemima uzrokuje potencijalnu citotoksičnu ulogu, što su opisali mnogobrojni naučnici, gde je čak ukazano na to da raspadanje ovog molekula može da generiše jak oksidantski efekat, sa reaktivnošću slično onom u hidroksilnom radikal (Beckman i sar., 1990; Radi i sar., 1991).

**Reaktivne kiseonične i azotne vrste**, bilo endogenog ili egzogenog porekla, veoma lako mogu da napadnu sve klase makromolekula (proteine, lipide, DNK) (Van Dyke i Serhan, 2003). ROS mogu da prouzrokuju oštećenje tkiva na celularnom nivou (modifikacijom proteina, lipida, DNK) i time da dovedu do ćelijske nekroze i apoptoze. Poremećeni oksidativno-reduktivni sistem posreduje povećanju lipidne peroksidacije, promeni antioksidativnih enzimskih aktivnosti kao i umanjenom delovanju neenzimskih endogenih antioksidanata, što može da se detektuje već i u presimptomatskoj fazi mnogih bolesti. Stoga, oni mogu predstavljati markere izmenjene metaboličke i fiziološke

homeostaze. U skladu sa tim, sa stanovišta rutinske svakodnevne kliničko-dijagnostičke prakse, bilo bi dragoceno rutinsko analiziranje parametara oksidativnog stresa (OS) u različitim biološkim materijalima u cilju rane dijagnostike, prevencije i unapređivanja terapije (Đukić i sar., 2008).

## **Reakcije u kojima se stvaraju SR**

Svi SR se kontinuirano stvaraju u malim količinama u ćelijama kao „nusprodukti“ metabolizma tokom enzimskih i neenzimskih reakcija.

### **Enzimske reakcije u kojima se stvaraju slobodni radikali**

- procesi oksidativne fosforilacije u mitohondrijama (na nivou respiratornog lanca, tokom odigravanja tzv. „ćelijskog disanja”);
- proces sinteze prostaglandina;
- proces fagocitoze u leukocitima;
- sistemi citochroma P-450.

### **Neenzimske reakcije u kojima se stvaraju slobodni radikali**

Neenzimske reakcije kiseonika sa organskim jedinjenima, kao i jonizirane reakcije, takođe mogu da dovedu do stvaranja SR (T. Liu i sar., 1999).

Elektrofilna svojstva SR čine osnovu njihove visoke reaktivnosti. U reakcijama sa biomolekulima prolaze kroz oksidaciju i kroz donaciju sopstvenih elektrona, pri čemu oni sami postaju novi tzv. „sekundarni radikali” koji nastavljaju radikalnu lančanu reakciju i podržavaju prostornu i vremensko zavisnu propagaciju oksidativnog stresa, i samim tim dovode do oštećenja ćelija, tj. tkiva (Halliwell B., 1994).

## **Izvori slobodnih radikala**

### **Endogena proizvodnja SR**

Mehanizmi endogene proizvodnje SR uključuju različite ćelijske organele u kojima je potrošnja kiseonika velika (kao što su mitohondrije, peroksizomi, endoplazmatski retikulum) kao i ksantin oksidaze, tokom procesa inflamacije i fagocitoze, vežbanja, ishemije/reperfuzijskih povreda.

### **Egzogena proizvodnja SR**

Mehanizam egzogene proizvodnje SR se odvija tokom izloženosti zagađenoj životnoj sredini i nepovoljnim uslovima (npr. jonizacija, UV zračenje, pušenje, alkohol, teški metali, različiti lekovi, visoke temperature itd.) (Lobo i sar., 2010; Phaniendra i sar., 2015).

## **1.3.2 Polimorfonuklearni leukociti (PMN)**

Polimorfonuklearni leukociti su prva linija odbrane oralnih tkiva od patogenih mikroorganizama. Interakcije leukocita sa bakterijama pokreću različite odbrambene biohemijske i fiziološke procese koji dovode do uništenja patogena, ali dovode i do respiratornog praska (engl. „*respiratory burst*”) u PMN, uz posledičnu proizvodnju slobodnih radikala (ROS i/ili RNS) i lokalnog oštećenja tkiva.



Slobodni radikali uzrokuju lipidnu peroksidaciju u tkivu, oštećenje proteina i DNK, enzimsku oksidaciju kao i stimulaciju proinflammatoryh citokina. Između ostalog, PMN oslobađaju i proteolitičke enzime i dovode do destrukcije periodontalnih tkiva (Kantarci i sar., 2003; Kundalić i sar., 2016).

U fiziološkim uslovima produkciju ROS efikasno neutrališu antioksidansi koji preveniraju oštećenja tkiva izazvana njihovim uticajem. Kada nastane inflamacija, produkcija SR drastično raste, uglavnom zbog ćelija urođenog imunskog sistema, poput neutrofila i makrofaga. Međutim, ako urođeni imuni sistem istroši svoj kapacitet ili njegova odbrambena funkcija postane ograničena, onda se aktiviraju ćelije stečenog imunog sistema, tzv. specifične T i B ćelije. Ako je ovaj proces produžen ili neefikasan, napreduje do hronične inflamacije, što je povezano sa mnogim bolestima (Mittal i sar., 2014).

### 1.3.3 Respiratorni prasak

Tokom infekcije, javlja se oslobađanje proinflammatoryh medijatora, pri čemu vaskularni endotelijum signalizira cirkulišućim neutrofilima da migriraju i pređu endotelijalnu barijeru. Neutrofilu potom migriraju prema mestu infekcije, prepoznaju patogen i ingestijom ga uvuku u svoju vakuolu. Prilikom tog procesa fagocitoze, neutrofilu proizvode i oslobađaju veoma velike količine antibakterijskih peptida, proteaza i ROS. Intenzivna proizvodnja ROS koja se zapravo zove „respiratorni, tj. kiseonični prasak”, karakteriše se značajnom potrošnjom kiseonika, aktivacijom  $\text{NADPH} + \text{H}^+$ , kao i  $\text{NADH} + \text{H}^+$  zavisnih oksidaza u ćelijskoj membrani fagocita, kao i aktivacijom heksozomonofosfatnog puta.  $\text{NADPH}$  oksidaza ili  $\text{NOX}_2$  je enzim odgovoran za proizvodnju superoksida anjona, što dovodi do stvaranja drugih ROS (El-Benna i sar., 2016).

### 1.3.4 Proces lipidne peroksidacije

Lipidna peroksidacija predstavlja najizraženiji negativni efekat delovanja SR. Predstavlja autokatalitički, progresivan proces koji je ireverzibilnog karaktera. Lipidni peroksidi se proizvode u mnogim ćelijskim procesima i mogu poslužiti kao signalni molekuli kroz post-translacione modifikacije proteina. Njihova biosinteza može se odigrati enzimskim ili neenzimskim procesima (Higdon i sar., 2012).

#### 1.3.4.1 Mehanizam dejstva lipidnih peroksida

Lipidni peroksidi vrše svoje toksične efekte kroz dva mehanizma:

- pošto su lipidi odgovorni za održavanje integriteta ćelijskih membrana, opsežna peroksidacija lipida menja sklop, kompoziciju, strukturu i dinamiku lipidnih membrana;
- kao visoko reaktivna jedinjenja, lipidni peroksidi su takođe u stanju da propagiraju dalju sintezu ROS, ili pak da se razgrade u reaktivne supstance sposobne da izvrše ukrštanje (engl. *crosslinking*) sa DNK i proteinima.

Lipidnom peroksidacijom prevashodno se oksidiraju polinezasićene masne kiseline (engl. „*polyunsaturated fatty acids*” PUFA). To su zapravo masne kiseline dugih lanaca sa više dvostrukih veza, uključujući linoleičnu i arahidonsku kiselinu. U prvom koraku oksidacije, atom vodonika se uklanja iz metilen ugljenika, premošćavajući dve duple veze. Slaba C-H veza i stabilnost rezultata bisaličnog radikala, pokreće dalju selektivnost u uklanjanju atoma vodonika. Takav novonastali sistem omogućava lipidima da se izomerizuju u termodinamički stabilniji izomer, formirajući konjugovani dien koji reaguje sa molekularnim kiseonikom i formiraju lipid peroksid (Gaschler i Stockwell, 2017).

Proizvodi lipidne peroksidacije se obično koriste kao biomarkeri OS. Lipidna peroksidacija stvara mnoštvo relativno stabilnih krajnjih proizvoda raspadanja, uglavnom  $\alpha$  i  $\beta$ -nezasićene reaktivne aldehide kao što je malondialdehid (MDA). U poređenju sa slobodnim radikalima, aldehidi su relativno stabilni i mogu da se uvuku u ćeliju ili čak pobegnu iz ćelije i napadnu mete daleko od mesta prvobitnog događaja (Čolak, 2008).

### 1.3.5 Markeri oksidativnog stresa

#### 1.3.5.1 Malondialdehid

Malondialdehid predstavlja marker lipidne oksidacije. Nastaje razgradnjom nezasićenih masnih kiselina (predominantno arahidonske kiseline) kao i kada je prisutan u visokoj koncentraciji, gde brzo reaguje sa slobodnim amino grupama lipoproteina male gustine pri čemu se stvaraju MDA modifikovani proteini. Modifikacija proteina od strane MDA izaziva promenu njihovih bioloških svojstava. Štaviše, proteini modifikovani od MDA su imunogeni. Biciklični peroksidni posrednici linoleničkih i arahidonskih kiselina utiču na porast MDA, koji se obično detektuje kao tiobarbiturična kiselina (Dalle-Donne i sar., 2006; Stocker i Keaney, 2004).

#### 1.3.5.2 8-hidroksi-2-deoksiguanozin

Još jedan od parametara koji predstavlja marker OS je 8-hidroksi-2-deoksiguanozin (8-OHdG), koji nastaje oksidacijom guanina od oštećene DNK. Takođe, može se koristiti kao marker za procenu oksidativnih oštećenja DNK kod mnogih bolesti (rak, neurodegenerativne bolesti, dijabetes, aterosklerotične kardiovaskularne bolesti i reumatoidni artritis, parodontitisa i dr.) (Varghese i sar., 2020).

### Fenton hemija

Neenzimska peroksidacija lipida je proces u kojem posreduju obe vrste radikala (ROS i RNS). Ovaj proces se odvija u tri faze:

1. faza inicijacije;
2. faza propagacije;
3. faza terminacije.

Inicijacioni korak je proces koji generiše radikalna jedinjenja od neradikalnih molekula. U ćelijama se to postiže korišćenjem gvožđa i ređe, bakra. Čelijsko gvožđe je pod strogom regulativom u ćelijama. Iako je većina gvožđa vezana u FeS klasterima, ili uskladištena u proteinskom feritinu, ipak, postoji mala količina gvožđa koja je labavo ligatisana (vezana) i sposobna da učestvuje u redoks reakcijama (Breuer i sar., 2008). Ove redoks reakcije koje katalizuje labilno vezano gvožđe, kolektivno se nazivaju „Fenton hemija” i predstavljaju niz reakcija gde to gvožđe reaguje sa endogeno proizvedenim vodonik peroksidom ili superoksidom u cilju stvaranja ROS (Chang i sar., 1992).

U prvoj fazi Fenton hemije, fero gvožđe ( $\text{Fe}^{2+}$ ) redukcijom vodonik peroksida, oksidira na feri gvožđe ( $\text{Fe}^{3+}$ ) stvarajući hidroksidni anjon i visoko reaktivni hidroksilni radikal.



Ako je dostupan još jedan ekvivalent vodonik peroksidu, feri gvožđe se može vratiti na svoje fero stanje i stvoriti  $\text{ROO}^\bullet$ . Pošto se završi prva faza (inicijacija), lipidna peroksidacija se nastavlja u drugu fazu (propagacija).

I hidroksilni i peroksilni radikal proizvedeni u Fenton reakciji su u stanju da privuku vodonik iz membrane bisalilicnog metilena PUFA, stvarajući stabilan, ugljenični radikal koji može da reaguje sa molekularnim kiseonikom u rastvoru, formirajući ROO, što može da privuče drugi vodonik iz drugog bisalilicnog metilena, stvarajući lipidni peroksid (ROOH) i još jedan ugljenično centriran radikal koji može da reaguje sa kiseonikom. Radikalna jedinjenja koja potpomažu stvaranje novih radikala smatraju se glavnim obeležjima u toku faze propagacije. Zbog tog fenomena se neenzimska lipidna peroksidacija posmatra kao lančana reakcija.

Ukoliko je koncentracija radikala dovoljno visoka da dva radikala mogu da reaguju jedan sa drugim, oni će formirati novu vezu između njih, eliminišući radikale. Molekuli koji su u stanju da doniraju elektrone radikalnim jedinjenjima, a da sami ne postanu radikali, mogu da prekinu fazu propagacije. Ovi molekuli se zovu antioksidansi (AO) i predstavljaju primarni mehanizam odbrane od nekontrolisane lipidne peroksidacije i drugih oksidacijskih oštećenja (Reyhani i sar., 2019).

## 1.4 Antioksidativna zaštita

### 1.4.1 Klasifikacija antioksidativne zaštite

**Antioksidativna zaštita deli se na:**

- enzimsku antioksidativnu zaštitu
- neenzimsku antioksidativnu zaštitu

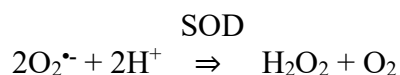
#### 1.4.1.1 Enzimski antioksidansi

- superoksid dizmutaza (SOD);
- katalaza;
- glutacion peroksidaza (GPx);
- glutacion reduktaze;
- DNK reparatorni enzimi i dr.

#### 1.4.1.2 Neenzimski antioksidansi

- mokraćna kiselina (MK);
- albumin;
- vitamin C (askorbinska kiselina);
- vitamin E ( $\alpha$  tokoferol);
- vitamin A (karotenoidi);
- redukovani glutacion;
- polifenoli (flavenoidi) (Y. Wang i sar., 2017).

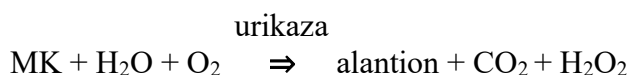
Superoksid dizmutaza katalizuje reakciju dizmutacije superoksid anjon radikala u vodonik peroksid i kiseonik. U toku ove reakcije jedan  $O_2^{\bullet-}$  se oksiduje u  $O_2$ , a drugi  $O_2^{\bullet-}$  se redukuje u  $H_2O_2$ ;



Kod eukariotskih organizama, prisutne su tri izoforme SOD: Cu, Zn-zavisna-SOD (citozolni enzim), Mn-zavisna-SOD (lokalizovana u matriksu mitohondrija) i ekstracelularna SOD (Todorović i sar., 2005).

Funkcija **GPx** je da neutrališe slobodne kiseonične radikale. Glutation peroksidaza je intraćelijski antioksidans koji redukuje vodonik peroksid (kao i lipidne perokside) u H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, u cilju umanjenja njegovog štetnog dejstva. Biološki sistemi su razvili više mehanizama za redukovanje lipidnih peroksida, gde je posebno važan GPx kao klasa enzima ključna upravo u tom procesu. Postoji osam GPx izoformi kod ljudi i sve su sa različitim specifičnostima i distribucijom po tkivima (Gaschler i Stockwell, 2017). Glutation peroksidaza su kao porodica enzima homologni selenocisteinima - koje sadrže sisari (GPx1). GPx1 je enzim koji koristi redukovani glutation (GSH) kao obavezan kosupstrat u procesu redukcije vodonik peroksida u H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, pri čemu se formira oksidovani glutation (GSSG). Enzim glutation reduktaza (GR) obnavlja GSSG u GSH koristeći NADPH kao izvor redukujućih ekvivalenata, pri čemu održava ćelijske rezerve NADPH-a (Lubos i sar., 2011).

**Mokraćna kiselina** - Ptice, gmizavci i primati (isključujući ljude), sadrže enzim urikazu koji katalizira oksidaciju MK. Delovanjem urikaze, MK se može oksidovati u alantoin i iskoristiti za stvaranje CO<sub>2</sub> i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.



Međutim, zbog defektnosti gena koji ne može da se transkribuje, ljudima nedostaje enzim urat oksidaza. Stoga MK predstavlja konačni metabolit nukleinskih kiselina proizvedenih ćelijskim metabolizmom i varenjem hrane. Nivo MK se održava u relativno stabilnom stanju njegovom naizmeničnom proizvodnjom i izlučivanjem. Mokraćna kiselina je važan AO u ljudskom telu, što je u prethodnim godinama istraživanja, u međuvremenu i potvrđeno. Održavanje nivoa MK na referentnom nivou je važno ne samo zato što MK ima vitalnu ulogu u funkcionisanju ljudskog tela, već zato što više ili niže vrednosti MK mogu da pokrenu ili utiču na niz bolesti (Q. Wang i sar., 2020).

#### 1.4.2 Klasifikacija antioksidanasa prema mehanizmu dejstva

**Prema mehanizmu dejstva, antioksidansi se dele na:**

**Antioksidanse koji prekidaju lančanu reakciju** (uklanjaju ROS) i u njih spadaju:

- antioksidansi malih molekula (jedinjenja rastvorljiva u vodi: vitamin C, glutation; jedinjenja rastvorljiva u mastima: vitamin E, karoten, itd). Oni ometaju fazu propagacije lanaca;
- enzimske antioksidanse (SOD, katalaza, GPx).

**Antioksidanse koji deluju preventivno** - redukuju prvu fazu (inicijacije) lanaca i u njih spadaju: albumin, transferin, ceruloplasmin, feritin (vezuju ROS kako bi zaštitili esencijalne proteine). Ovaj tip antioksidativnih sistema sprečava nekontrolisano formiranje SR ili inhibiraju njihove reakcije sa biološkim molekulima (Somogyi i sar., 2007).

#### 1.4.3 Ukupni antioksidativni status

Činjenica je da merenje vrednosti pojedinačnih molekula koji spadaju u antioksidativne markere, ponekad može dati nekompletnu sliku, zbog toga što oni funkcionišu po principu lančanih reakcija. Zbog toga se analiza ukupnog antioksidativnog statusa (engl. „*total antioxidant status*” *TAS*) smatra relevantnijom (Baltacioğlu i sar., 2014). Ukupni antioksidativnim statusom se smatra kumulativno delovanje svih AO prisutnih u plazmi i drugim telesnim tečnostima, čime se obezbeđuje njihova merljivost. Ukupni antioksidativni status se odnosi na celokupni spektar antioksidativnih aktivnosti protiv raznih ROS i RNS (Prior i sar., 2005).

Antioksidativna merenja još uvek nisu uvršćena u standardnim protokolima u dijagnostici i lečenju uprkos naučnim dokazima u promenama serumskih antioksidativnih kapaciteta kod određenih bolesti (npr. sveukupni TAS izmeren u serumu, povećan je značajno kod pacijenata sa dijalizom i hroničnim otkazivanja bubrega zbog visokih vrednosti urata) (Apak i sar., 2016).

## 1.5 Uloga oksidativnog stresa u patogenezi parodontitisa

U fiziološkim uslovima koncentracije SR su niskih vrednosti. Međutim, njihova koncentracija može akutno da se poveća tokom brojnih ćelijskih procesa uključujući eritropoezu, respiratornu kontrolu i tokom puteva transdukcije signala stimulisanih raznovrsnim faktorima rasta i citokinima. Kada je prisutna visoka koncentracija SR, to direktno i indirektno utiče na proteine, lipide i hromatin i može da izmeni puteve transdukcije signala i ekspresiju gena. Kako su njihovi efekti raznovrsni, mogu da doprinesu promovisanju patofizioloških procesa u organizmu.

Povećana proizvodnja SR i/ili nedovoljna antioksidativna odbrana rezultira stvaranje OS u ćelijama. Produženi i/ili intenzivni oksidativni atak može da prevaziđe antioksidativni odbranu ćelija što vodi ka akumuliranom oštećenju makromolekula i gubitka funkcije ćelije, oštećenja ćelijske membrane i na kraju do smrti ćelije. Oksidativni stres kao patofiziološki mehanizam je potvrđen u mnogim patološkim stanjima, starenju i trovanjima. Osim toga, OS se javlja tokom preteranog fizičkog napora, zatim kao posledica pušenja, izloženosti zagađenoj životnoj sredini i ksenobioticima (Ray i sar., 2012).

Poslednjih godina postoji sve više dokaza koji ukazuju na ulogu ROS u uspostavljanju okruženja izloženog dejstvu OS, koje zapravo potajno leži u patogenezi širokog spektra hroničnih bolesti, među kojima se nalazi i parodontitis (Buczko i sar., 2015). Prema studiji iz 2017. godine, parodontitis spada među 11 najzastupljenijih stanja u svetu, čija se rasprostranjenost kreće od 20% do 50% odrasle populacije (Vos i sar., 2017). Progresija parodontitisa smatra se interakcijom između inflamatornog i imunološkog odgovora izazvanog periopatogenim mikroorganizmima (Page i Kornman, 1997), međutim osnovni mehanizam nastanka i dalje ostaje nepotpuno otkriven, što otežava ranu detekciju, prevenciju i kontrolu bolesti.

Perzistiranje dentalnog plaka na površini zuba kao i njegova migracija u okolne parodontalne džepove dovodi do regrutovanja leukocita, pretežno PMN, od krvotoka do mesta infekcije. Infiltracija PMN (koja predstavlja 50% - 70% ukupne leukocitne infiltracije) je prva linija odbrane od bakterijskih patogena sadržanih u dentalnom plaku (Landzberg i sar., 2015). Polimorfonuklearni leukociti igraju suštinsku ulogu u parodontalnom zdravlju i u urođenom imunom sistemu, kao ćelije koje prve deluju kroz nekoliko jedinstvenih odbrambenih mehanizama, uključujući degranulaciju, hemotaksu, fagocitozu i oslobađanje ROS. „Hiperaktivnost” PMN je povezana sa parodontitisom (Dias i sar., 2011).

Sa druge strane, ROS se sa svojim antimikrobnim delovanjem može smatrati „mačem sa dve oštrice” jer može da pomogne u uništavanju patogenih mikroorganizama u homeostazi, ali isto tako mogu postati i citotoksični za ćelije domaćina kada se preterano aktiviraju. Reaktivne vrste kiseonika igraju važnu ulogu u signalizaciji ćelija, regulaciji gena i antimikrobne odbrane, ali prevelika aktivnost ROS dovodi do povećanog opterećenja oksidanata zajedno sa izmenjenim ili smanjenim TAS, što rezultira nastankom OS unutar zahvaćenih tkiva, i dalje dovodi do patoloških promena i samim tim do uništavanja tkiva domaćina (i otuda se posledično javlja gubitak zuba kod parodontitisa) (Almerich-Silla i sar., 2015; G. P. Wang, 2015).

Tokom fagocitoze, SR (naročito  $O_2^{\cdot-}$ ,  $H_2O_2$ , i  $OH^{\cdot-}$ ), koji su krajnji proizvodi mitohondrijskog respiratornog praska u PMN, deluju uglavnom kroz lipidnu peroksidaciju, ali mogu delovati i kroz oštećenje proteina i DNK (Su i sar., 2009). To dovodi do narušavanja oksidativne ravnoteže koja pokreće proinflamatorne mehanizme kao i osteoklastogenezu, koja zatim dovodi do gubitka kostiju (najdominantnija karakteristika kod pacijenata sa parodontitisom) (Boyce i Xing, 2007).

Konačno, kroz direktno oštećenje ekstraćelijskog vezivnog tkiva, ROS je odgovoran za gubitak pripojnog epitela koji dovodi do periodontalnog oštećenja (Aboodi i sar., 2011). Destruktivni obrazac, koji karakteriše parodontitis kao bolest koja utiče na potporna tkiva zuba je u stvari posledica aktivnog uništavanja vezivnog tkiva i progresivne resorpcije kostiju nastale kroz prisustvo različitih stimulativnih faktora u plazmi; ovi faktori proizilaze iz povećanog respiratornog praska u PMN (i produkcije ROS) i takođe mogu da izmene i produže životni vek neutrofila kod pacijenata sa parodontitisom (Dias i sar., 2011). U skladu sa tim, proizvodnja ROS je povezana sa povećanom ekspresijom proinflatornih citokina koji su odgovorni, kako direktno tako i indirektno, za uništavanje vezivnog tkiva i resorpciju kostiju. Međutim, iako se uništavanje mineralizovanih i nemineralizovanih tkiva javlja istovremeno, specifični proinflatorni molekuli su povezani sa oštećenjem jedne ili obe vrste tkiva (Graves, 2008).

## **Uloga salive u antioksidativnoj zaštiti**

Saliva predstavlja biološku tečnost koju stvaraju u najvećem procentu (93%) tri para glavnih pljuvačnih žlezda (parotidna, submandibularna i sublingvalna), dok preostala zapremina (7%) potiče iz mnogobrojnih manjih submukoznih pljuvačnih žlezda (Proctor, 2016).

Saliva predstavlja mešavinu različitih elemenata, u čijem sastavu u 99% ulazi voda, a ostalih 1% čine organski i neorganski molekuli poput proteina, elektrolita, gingivo- sulkusna tečnost, serum, ćelije, bakterije i ostaci hrane (Llena-Puy, 2006). Veoma je važna tečnost koja se može koristiti kao uzorak za dijagnostiku ali i kontrolu lečenja raznih sistemskih bolesti.

## **Osnovne funkcije salive**

Saliva ima nekoliko uloga, među kojima su najvažnija održavanje homeostaze svih tkiva usne duplje, što se obezbeđuje kroz njene osnovne funkcije kao što su:

1. samočišćenje usne duplje;
2. zaštitna uloga:
  - širok spektar antimikrobnih aktivnosti (antibakterijska, antivirusna, fungicidna),
  - puferska uloga,
  - uloga u formiranju stečene pelikule gleđi,
  - zaštita od demineralizacije gleđi,
3. uloga u žvakanju, gutanju i govoru;
4. uloga u metabolizmu vode;
5. ekskretorna uloga;
6. uloga u održavanju stabilnosti protetskih nadoknada u usnoj duplji;
7. uloga u funkciji čula ukusa;
8. antikancerogena uloga;
9. antioksidativna uloga (Leite i sar., 2012).

## **1.6 Antioksidativna uloga salive**

Na osnovu strukturnih i funkcionalnih karakteristika saliva ima veoma važnu ulogu u zaštiti oralnih tkiva od štetnog delovanja SR obzirom da su u njoj prisutni neenzimski i enzimski antioksidansi.

## **1.6.1 Podela salivarnih antioksidanasa**

### **1.6.1.1 Enzimski salivarni antioksidansi**

U enzimске salivarne antioksidanse spadaju uglavnom peroksidaze (SOD, GPx, oralna peroksidaza, katalaza).

### **1.6.1.2 Neenzimski salivarni antioksidansi**

U neenzimске salivarne antioksidanse spadaju (mokraćna kiselina, glutation, albumin, sialna kiselina, vitamin C kao egzogena komponenta i dr.). Enzimski salivarni AO su odgovorni za direktno neutralisanje SR, dok neenzimski salivarni AO neutrališu sekundarne oksidativne proizvode (Novakovic i sar., 2014).

## **1.6.2 Prednosti upotrebe salive u dijagnostičke svrhe**

Velika prednost korišćenja salive se ogleda u tome što predstavlja dijagnostički materijal „u realnom vremenu“, ali i činjenica da se veoma jednostavno prikuplja. Za razliku od uzorkovanja krvi i opravdanog straha od igle kod velikog broja pacijenata, prikupljanje salive predstavlja neinvazivnu dijagnostičku metodu za ispitanike. Razlika u količini produkcije salive nastaje usled različitih faktora, kao što su: doba dana, vreme prikupljanja uzorka, temperatura, individualna hidratacija ispitanika kao i njegovo opšte fizičko i emocionalno stanje (Korte i Kinney, 2016).

Prikupljanje salive ne zahteva specijalnu opremu i tehniku. Ova metoda je brza i komforna, kako za pacijenta tako i za doktora.

Na osnovu naše trenutne interpretacije složenosti parodontitisa, identifikacija jednog dijagnostičkog markera za sve forme ove bolesti deluje iluzionistički, ali obzirom da rano otkrivanje bolesti igra ključnu ulogu u uspešnoj terapiji, istraživači su i dalje veoma posvećeni potrazi za dijagnostičkim biomarkerima sa visokom osetljivošću i specifičnošću, čijom bi se upotrebom parodontalni rizik identifikovao i pre pojave većih kliničkih oštećenja (Loos i Tjoa, 2005).

Stoga, istraživanja biomarkera u parodontologiji su i dalje usmerena ka razvijanju savremenih dijagnostičkih testova koji bi imali značajan uticaj na ranu dijagnostiku parodontitisa, odabiru terapijskog modaliteta, što bi naravno uticalo i na sam ishod terapije ali i na druge zdravstvene benefite kako za pacijenta tako i za zdravstveni sistem. Na polju dijagnostike parodontalnih oboljenja, proučavani su uglavnom biomarkeri iz oralnih tečnosti (gingivo-cervikalna tečnost i saliva) (Ghallab, 2018).

Do sada, prema raspoloživim podacima, nije objavljena ni jedna studija koja ispituje parametre oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite u salivi kod sistemski zdravih pacijenata sa parodontitisom koji su tretirani konzervativnom terapijom, kao i kombinacijom konzervativne terapije sa lokalnom primenom rastvora hlorheksidin-diglukonata određene koncentracije.

## 2. HIPOTEZA I CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Oblast istraživanja ove doktorske disertacije obuhvata uticaj 0,12% rastvora hlorheksidin-diglukonata na bihemijske pokazatelje inflamacije i oksidativnog stresa iz salive; ispitivanje uticaja hlorheksidin-diglukonata (kvantitativna i kvalitativna analiza) na periopatogene mikroorganizme iz uzoraka subgingivalnog dentalnog plaka; ispitivanje uticaja hlorheksidin-diglukonata na kliničke parametre kod pacijenata sa parodontitisom. Ovo istraživanje bi bilo od značaja zbog potvrde neophodnosti njegove primene u rutinskim protokolima lečenja sistemski zdravih osoba koji boluju od parodontitisa. Pretpostavljeno je da će adjuvantna primena 0,12% rastvora hlorheksidin-diglukonata uz konzervativnu terapiju kod obolelih od parodontitisa, uticati na poboljšanje kliničkih parametara, zatim da će umanjiti markere koji ukazuju na oksidativni stres i inflamaciju u salivi, ali i uticati na promenu u sastavu i broju periopatogenih mikroorganizama u sastavu subgingivalnog dentalnog plaka.

### Ciljevi istraživanja:

- ❖ Ispitivanje razlike u nivoima pokazatelja oksidativnog stresa i antioksidanasa (malondialdehida, 8-hidroksi-2-deoksiguanozina, glutation peroksidaze, superoksid dismutase i mokraćne kiseline), kao i u ukupnog antioksidativnog statusa salive kod:
  - obolelih od parodontitisa pre i nakon sprovedene konzervativne parodontološke terapije uz dodatnu terapiju rastvorom 0,12 % hlorheksidin-diglukonata (1. grupa);
  - obolelih od parodontitisa pre i nakon sprovedene konzervativne terapije uobičajenim višeseansnim postupkom (2. grupa);
  - ispitanika sa klinički zdravim parodontcijumom (3.grupa).
- ❖ Evaluacija kliničkih parametara kod:
  - 1 i 2. grupe pacijenata pre i nakon primenjene terapije;
  - 3. grupe ispitanika.
- ❖ Ispitivanja korelacije malondialdehida, 8-hidroksi-2-deoksiguanozina, glutation peroksidaze, superoksid dismutase, mokraćne kiseline i ukupnog antioksidativnog statusa salive sa kliničkim parametrima stanja parodontcijuma:
  - pre i nakon sprovedene terapije kod 1. i 2. grupe pacijenata.
- ❖ Evaluacija razlika u nivoima enzimskih pokazatelja hronične inflamacije (aspartat aminotransferaze, alanin aminotransferaze, alkalne fosfataze, gama glutamil transferaze, laktat dehidrogenaze i kreatin kinaze) kod:
  - 1 i 2. grupe pacijenata pre sprovedene terapije;
  - 1. i 2. grupe pacijenata nakon sprovedene terapije;
  - 3. grupe ispitanika.
- ❖ Ispitivanje korelacija aspartat aminotransferaze, alanin aminotransferaze, alkalne fosfataze, gama glutamil transferaze, laktat dehidrogenaze i kreatin kinaze sa kliničkim parametrima stanja parodontcijuma kod:
  - 1. i 2. grupe pacijenata pre i nakon primenjene terapije.
- ❖ Identifikacija periopatogenih bakterija: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Eikenella corrodens* i *Treponema denticola*, metodom „polymerase chain reaction” (PCR) i prajmerima specifičnim za svaki mikroorganizam, u uzorcima subgingivalnog dentalnog plaka kod:
  - 1. i 2. grupe pacijenata pre i posle sprovedene terapije;
  - 3. grupe ispitanika.



- ❖ Određivanje kvantitativnog sastava u uzorcima subgingivalnog dentalnog plaka za bakterije: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Eikenella corrodens* i *Treponema denticola*, metodom „quantitative real-time polymerase chain reaction” (qRT-PCR) kod:
  - 1. grupe pacijenata pre i posle sprovedene terapije;
  - 2. grupe pacijenata pre i posle sprovedene terapije;
  - 3. grupe ispitanika.
- ❖ Procena razlike u efikasnosti dve primenjene terapije kod 1. i 2. grupe pacijenata na osnovu kliničkih parametara, biohemijskih parametara oksidativnog stresa i inflamacije, mikrobioloških parametara kao i na osnovu njihovih međusobnih korelacija.

### 3. MATERIJAL I METODE

#### 3.1 Hemikalije i reagensi

Hemikalije i reagensi koji su korišćeni u sklopu istraživanja za ovu doktorsku disertaciju su: rastvor hlorheksidin-diglukonata (0,12% *Hibideks DAP*® Galenika AD, Beograd, Srbija), rastvor natrijum hidroksida, rastvor Tris hlorovodonične kiseline i rastvor magnezijum hlorida; PCR pufer (*MBI Fermentas*, Litvanija), DreamTaq DNK polimeraza (*Thermo Fisher Scientific*™, Waltham, MA, Sjedinjene Američke Države). *SYBR Green PCR Master Mix, Maxima* (RTC, Vilnius, Litvanija); etilen diamin tetra sirćetna kiselina (EDTA), tris (hidroximetil) aminometan, borna kiselina, akrilamid/bis-akrilamid, tetrametiletildiamin (*TEMED, Bio-Rad, Sigma-Aldrich*), amonijum persulfat (APS). Hemikalije firme (*RANDOX Laboratories Ltd.*, Velika Britanija) korišćeni su za određivanje parametara redoks statusa poput GPx i SOD; za određivanje aktivnosti TAS korišćen je reagens *Total Antioxidant Status (TAS)* firme *Randox (RANDOX Laboratories Ltd., Velika Britanija)*; za određivanje koncentracije MK korišćen je komercijalni *QuantiChrom™ Uric Acid Assay Kit (BioAssay Systems, Hayward, Sjedinjene Američke Države)*; za MDA je korišćen (*Abcam (ab118970) Lipid Peroxidation MD) Assay kit*), dok je za 8-OHdG korišćen (*ELISA test KOG-200SE, New 8-OHdG Chec ELISA KIT, Japan Institute for the Control of Aging - JaICA*).

#### 3.2 Eksperimentalni protokol

Istraživanje je sprovedeno na Klinici za parodontologiju i oralnu medicinu Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu; Centrifugiranje uzoraka pljuvačke, zamrzavanje i skladištenje urađeno je u Laboratoriji za bazična istraživanja, Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu kao i Centru za medicinsku biohemiju Kliničkog centra Srbije. Za izvođenje istraživanja dobijena je saglasnost Etičkog odbora Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu (broj 36/4).

U studiju je bilo uključeno 60 ispitanika, oba pola, starosti od 25-55 godina, podeljenih u tri grupe:

- 1. eksperimentalna grupa sastojala se od 20 pacijenata obolelih od parodontitisa kod kojih je pored konzervativne terapije primenjen i 0,12% rastvor hlorheksidin-diglukonata (KT+HH grupa);
- 2. eksperimentalna grupa sastojala se od 20 pacijenata obolelih od parodontitisa kod kojih je bila primenjena samo konzervativna terapija (KT grupa);
- 3. grupa sastojala se od 20 ispitanika sa klinički zdravim parodontcijumom (Z grupa).

Dijagnoza parodontitisa je definisana na osnovu anamneze, kliničkog pregleda i analize radiografskog snimka prema kriterijumima američke Akademije za parodontologiju (Armitage, 1999).

Razvrstavanje ispitanika u jednu od dve navedene test grupe se obavilo metodom „proste randomizacije”- razvrstavanje na osnovu izvlačenja slučajnih brojeva. Brojevi od 1-40 su biti napisani na papiru i presavijeni tako da ni pacijent ni istraživač nisu videli o kom broju se radi. Svi ispitanici koji su izvukli parni broj su bili svrstani u 1. test grupu. Svi ispitanici koji su izvukli neparni broj bili su svrstani u 2. test grupu.

**Kriterijumi za uključenje ispitanika u istraživanje za 1. i 2. test grupu (pacijenti oboleli od parodontitisa):**

- da imaju 25 i više godina;
- da budu sistemski zdravi;
- da nisu u periodu trudnoće i laktacije;
- da imaju prisustvo parodontalnih džepova dubine 5 i više milimetara;

- da imaju više od 15 zuba (ne računajući treće molare);
- da tri meseca unazad od momenta uzorkovanja nisu uzimali antibiotsku terapiju;
- da tri meseca unazad od momenta uzorkovanja nisu imali nikakav parodontološki tretman;
- da tri meseca unazad nisu koristili suplemente poput vitamina C i E;
- da tri meseca unazad nisu bili na restriktivnim dijetama;
- da tri meseca unazad nisu uzimali antioksidativnu suplementaciju (u bilo kom obliku).

### **Kriterijumi za uključenje ispitanika u istraživanje za 3. grupu (ispitanici sa klinički zdravim parodontcijumom):**

- da imaju 25 i više godina;
- da dubina sondiranja bude manja od 3 mm, a nivo pripojnog epitela 0 mm;
- da imaju potpuno odsustvo inflamacije gingive;
- izostanak krvarenja na provokaciju nakon sondiranja;
- da imaju više od 20 zuba (ne računajući treće molare);
- da budu sistemski zdravi;
- da nisu u periodu trudnoće i laktacije;
- da tri meseca unazad od momenta uzorkovanja nisu uzimali antibiotsku terapiju;
- da tri meseca unazad od momenta uzorkovanja nisu uzimali suplemente poput vitamina C i E;
- da tri meseca unazad od momenta uzorkovanja nisu uzimali antioksidativnu suplementaciju (u bilo kom obliku).

### **Kriterijumi za isključenje ispitanika iz istraživanja:**

- pacijenti sa sistemskim oboljenjima;
- trudnice i dojilje zbog specifičnog hormonskog statusa;
- pacijenti koji su iz bilo kog razloga bili na restriktivnim dijetama u poslednja 3 meseca;
- pacijenti koji su uzimali vitaminske preparate u bilo kom obliku u poslednja 3 meseca;
- pacijenti koji su imali parodontološki tretman u poslednja 3 meseca;
- pacijenti koji su uzimali antibiotsku terapiju u poslednja 3 meseca;
- pacijenti sa veoma lošom oralnom higijenom.

Svi ispitanici su pre početka istraživanja bili u potpunosti obavešteni i usmenim i pisanim putem o svim detaljima istraživanja (cilj, metode terapije kao i način prikupljanja uzoraka, broj dolazaka) i potpisali učestvovanje u istom. Svi lični podaci pacijenata, podaci o njihovom zdravstvenom stanju kao i primenjenim procedurama tokom ovog ispitivanja su registrovani u kompjuterskoj bazi podataka i zaštićeni sistemom šifrovanja, tako da je identitet svakog ispitanika strogo sačuvan. Pristup ovim podacima imala je samo dr stom. Katarina Jovanović (glavni istraživač).

Nakon što su svi ispitanici pročitali i potpisali pristanak za učestvovanje u istraživanju, primenjeni su sledeći postupci:

- stomatološki pregled (sve tri grupe ispitanika);
- prikupljenje salive (sve tri grupe ispitanika);
- prikupljenje uzoraka subgingivalnog dentalnog plaka iz parodontalnog džepa (1. i 2. test grupa ispitanika), odnosno gingivalnog sulkusa (3. grupa ispitanika);
- primena konzervativne parodontološke terapije u više seansi (1. i 2. test grupa ispitanika), kao i savetovanje za dodatni deo terapije (primena rastvor hlorheksidin-diglukonata nakon pranja zuba) samo pacijentima 1. grupe ispitanika.

Klinički pregled, određivanje kliničkih parametara kao i terapiju svih pacijenata uključenih u istraživanje je sprovodio isti stomatolog.

### 3.3 Terapijski protokol

Pacijenti 1. i 2. grupe su tokom ovog istraživanja dolazili šest puta. Ispitanici 3. grupe su bili na pregledu samo jednom. Sve posete obavile su se na Klinici za parodontologiju i oralnu medicinu Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu. U toku te posete urađena je provera kriterijuma za uključivanje ispitanika u istraživanje, upoznavanje pacijenata sa svrhom, tokom i načinom istraživanja.

U istraživački karton su uneti sledeći podaci:

- a) lični podaci (inicijali ispitanika, pol, godina rođenja, stručna sprema i kontakt telefon);
- b) anamneza (opšte zdravstveno stanje, pušački status);
- c) klinički pregled (određen status zuba kao i parodontološka merenja - inspekcijom i sondiranjem graduisanom parodontalnom sondom).

#### 3.3.1 Terapijski protokol u prvoj grupi ispitanika

U prvoj grupi ispitanika primenjena je KT na uobičajen višeseanski način. Kauzalna parodontološka terapija podrazumevala je sledeće postupke:

- identifikaciju dentalnog plaka (instrumentacijom sa parodontalnom sondom);
- motivisanje i obučavanje pacijenata o pravilnom održavanju oralne higijene;
- uklanjanje supra i subgingivalnih čvrstih naslaga (ultrazvučnim aparatom);
- uklanjanje mekih naslaga i poliranje površina zuba (četkicama i pastom za poliranje);
- obradu parodontalnih džepova (specijalizovane kirete po Gracy-ju);
- kontrolu postignutih rezultata.

Obrada parodontalnih džepova se obavljala u posetama koje su zakazivane na svakih nedelju dana. Prilikom svake posete ispitanicima KT+HH grupe bio je obrađen po jedan kvadrant zuba, uz stalnu remotivaciju za pravilno održavanje oralne higijene.

Radno polje bilo je anestetizirano lokalno infiltracionom, odnosno sprovodnom anestezijom (2% lidokainom sa adrenalinom, 1:100000). Za odstranjivanje slobodnog sadržaja parodontalnog džepa korišćen je fiziološki rastvor.

Ispitanicima ove grupe dodatno je savetovano da u naredne dve nedelje obavezno dva puta dnevno (ujutru i uveče) - nakon pranja zuba mućkaju u ustima 60 sekundi, 15 ml rastvora HH (*Hibideks DAP® 0,12% rastvor*, Galenika AD, Beograd, Srbija) i da minimum 30 minuta nakon toga ništa ne jedu i ne piju.

#### 3.3.2 Terapijski protokol u drugoj grupi ispitanika

U drugoj grupi ispitanika je primenjivana samo kauzalna parodontološka terapija. Prilikom svake posete ispitanicima KT grupe bio je obrađen po jedan kvadrant zuba, uz stalnu remotivaciju za pravilno održavanje oralne higijene.

Radno polje bilo je anestetizirano lokalno infiltracionom, odnosno sprovodnom anestezijom (2% lidokainom sa adrenalinom, 1:100000). Za odstranjivanje slobodnog sadržaja parodontalnog džepa korišćen je fiziološki rastvor.

Kontrola za 1. i 2. grupu je obavljena posle dva meseca nakon završene terapije, gde se ponovilo uzimanje uzoraka salive kao i subgingivalnog dentalnog plaka i ista klinička merenja koja su rađena i u prvoj poseti pre terapije.

### 3.4 Klinička merenja

Kliničko stanje parodontalnih tkiva kao i nivo oralne higijene određivani su primenom sledećih indeksa i parametara:

- Plak indeks (PI) po Silnes-Lou (Silness- Løe, 1967.) bodovao se na sledeći način:
  - 0 bodova - nema prisutnog plaka u gingivalnoj trećini krunice zuba;
  - 1 bod - tanak sloj dentalnog plaka prisutan u predelu ivice gingive i na okolnoj gingivalnoj trećini krunice zuba, klinički nije uočljiv (otkriva se povlačenjem vrha sonde u ovoj regiji zuba);
  - 2 boda - umerena akumulacija dentalnog plaka, vidljiva golim okom, lokalizovana na ivici gingive i na površini zuba u njenom susedstvu, i/ili male količine dentalnog plaka prisutnog u gingivalnom sulkusu, odnosno parodontalnom džepu;
  - 3 boda - izražena akumulacija dentalnog plaka koji prekriva ivicu gingive i okolnu površinu zuba ali je njime potpuno ispunjen i gingivalni sulkus, odnosno gingivalni ili parodontalni džep.
- Gingivalni indeks GI (Løe-Silness, 1967.) bodovao se na sledeći način:
  - 0 bodova - predstavlja zdravu gingivu. Gingiva je čvrsta, bledoružičaste boje, sitnozrnaste površine. Po posušivanju gingiva je bez sjaja, sa papilom u interdentalnom prostoru;
  - 1 bod - predstavlja blagu inflamaciju. Ivica gingive je blago crvenije boje nego uobičajeno. Prisutan je blag edem, međutim nema krvarenja nakon blage provokacije parodontalnom sondom;
  - 2 boda - predstavlja umerenu inflamaciju. Gingiva je crvene boje sa izraženim edemom i uvećanjem slobodne gingive i interdentalnih papila. Pozitivno krvarenje iz gingive na sondiranje parodontalnom sondom;
  - 3 boda - predstavlja jaku inflamaciju. Gingiva je veoma crvene ili crvenoplavičaste (lividne) boje. Slobodna gingiva i papile jako uvećane. Javlja se spontano krvarenje, moguće prisutne ulceracije na gingivi.
- Indeks krvarenja gingive IKG (engl. *pupilla bleeding index* PBI, Muhlemann-Sonn 1977.) – koristi se za registrovanje krvarenja gingive. Za provociranje krvarenja je korišćena parodontalna sonda, gde je sondiran prvo distalni, zatim i mezijalni deo gingivalnog sulkusa, počevši od baze papile, pa sve do njenog vrha. Bodovanje se vršilo na sledeći način:
  - 0 bodova - nakon sondiranja nema krvarenja;
  - 1 bod - krvarenje se javlja u vidu tačke, samo na jednom mestu nakon sondiranja;
  - 2 boda - krvarenje se javlja u vidu linije duž ivice gingive;
  - 3 boda - odmah nakon sondiranja, javlja se tzv. „kapljasto” krvarenje (interdentalni prostor se takođe napuni krvlju);
  - 4 boda - odmah nakon sondiranja pojavljuje se profuzno krvarenje, a takođe se krv preliva i van interdentalnog prostora i gingivalnog sulkusa.
- Indeks mekih naslaga IMN (Greene-Vermilion) bodovao se na sledeći način:
  - 0 bodova - nema prisutnih mekih naslaga;
  - 1 bod - meke naslage pokrivaju do 1/3 površine zuba;
  - 2 boda - meke naslage pokrivaju od 1/3 do 2/3 površine zuba;
  - 3 boda - meke naslage pokrivaju od 1/3 do 2/3 površine zuba.
- Indeks zubnog kamenca IZK (Greene-Vermilion) bodovao se na sledeći način:
  - 0 bodova - nema prisutnog zubnog kamenca;
  - 1 bod - zubni kamenac pokriva do 1/3 površine zuba;
  - 2 boda - zubni kamenac pokriva od 1/3 do 2/3 površine zuba;
  - 3 boda - zubni kamenac pokriva više od 2/3 površine zuba.

- Indeks labavljanja zuba (ILZ) Klinike za parodontologiju i oralnu medicinu Stomatološkog fakulteta u Beogradu (1975.), bodovao se na sledeći način:
  - 0 bodova - labavljanje zuba ne postoji (predstavlja fiziološko koje se klinički ne može uočiti);
  - 1 bod - najmanje vidljivo labavljanje zuba, do 0,2 mm u buko-oralnom pravcu;
  - 2 boda - labavljanje zuba od 0,2 – 1 mm u buko-oralnom pravcu;
  - 3 boda - labavljanje zuba od 1 - 2 mm u buko-oralnom pravcu;
  - 4 boda - labavljanje zuba je > 2 mm u bilo kom smeru, mastikacija znatno otežana;
  - 5 boda - predstavlja terminalno labavljanje zuba, uz migraciju i velike funkcionalne smetnje.
- Dubina sondiranja (DS) parodontalnih džepova - predstavlja dijagnostički postupak gde se parodontalnom sondom određuje lokalizacija pripojnog epitela u odnosu na gleđno-cementnu granicu. Izražava se u milimetrima.
- Nivo pripojnog epitela (NPE) podrazumeva rastojanje od gleđno cementne granice do mesta gde se zaustavio vrh parodontalne sonde postavljene u parodontalni džep pod lakim pritiskom. Izražava se u milimetrima.

Svi parodontološki indeksi su se merili u šest tačaka za svaki zub i to: mezijalni i distalni brid i sredina vestibularne i oralne strane svakog postojećeg zuba. Prilikom ovih merenja korišćena je parodontalna sonda po Williamsu (*Hu-Friedy*, Chicago, IL, Sjedinjene Američke Države).

Ispitanici su pre određivanja PI običnom vodom prvo dobro promućkali i isprali usta kako bi se uklonile sve eventualno prisutne meke naslage a potom su se zubi osušili vazduhom i nakon toga se pristupilo pregledu.

### 3.5 Prikupljanje uzoraka pljuvačke

Kod pacijenata 1. i 2. grupe saliva je uzorkovana tokom prve posete, kao i osam nedelja posle završene terapije. Kod pacijenata 3. grupe saliva se uzorkovala jednokratno tokom prve, ujedno i jedine posete za te ispitanike. Svi uzorci su uzeti ujutru, pre jela. Pacijentima je rečeno da ne piju, ne puše, niti žvaću žvakaću gumu pre uzimanja uzoraka. Mešovita nestimulisana saliva (2ml) je sakupljena pomoću specijalnih saliveta (*Salivette*<sup>®</sup>, Sarstedt, Nemačka), između 9.00 i 12.00 sati prepodne. Salivete su postavljane u podjezični prostor pacijenta sa zatvorenim ustima tokom jednog minuta. Uzorci salive su zatim preneti u laboratoriju, gde su centrifugirani (*Hettich Universal 320R*, *ARES Scientific*, Nemačka) na 4000 obrtaja tokom 10 minuta i zamrznuti na -20 ° C do daljih analiza.

### 3.6 Prikupljanje uzoraka subgingivalnog dentalnog plaka

Nakon prikupljanja salive uzeti su uzorci subgingivalnog dentalnog plaka iz prostora parodontalnih džepova, odnosno gingivalnog sulkusa kod sve tri grupe ispitanika i to na sledeći način:

- uzorci subgingivalnog dentalnog plaka su se uzimali sa četiri reprezentativna mesta sterilnim endodontskim papirnim poenima (#30, *Mailfer*, Balligues, Švajcarska). Reprezentativna mesta su ona sa najvećom dubinom sondiranja u svakom kvadrantu kod obolelih od parodontitisa, odnosno bukomezijalne površine prvih stalnih molara kod ispitanika sa klinički zdravim parodontcijumom;
- supragingivalni dentalni plak uklonjen je kiretom na zubima koji su odabrani za uzorkovanje, a zatim su se ti zubi izolovali vaterolnoma radi sprečavanja kontaminacije uzoraka salivom;
- po dva papirna poena su plasirana do dna u svaki selektovani parodontalni prostor (gingivalni sulkus kod zdravih, odnosno parodontalni džep kod pacijenata sa parodontitisom), na po 60 sekundi. Zatim su oba papirna poena iz istog mesta uzorkovanja prebačena u zajedničku sterilnu epruveticu (*Eppendorf tube*, Ismaning, Nemačka), u kojoj se nalazilo 1 ml transportne tečnosti (engl., *Reduced Transport Fluid*” RTF) (Syed i Loesche 1972.). Ista procedura primenjena je za svako selektovano mesto uzorkovanja, za svakog pacijenta;
- uzorci su zamrznuti na -72°C i čuvani do daljih analiza.

Iz uzoraka je izvršena identifikacija navedenih bakterija (PCR), kao i njihova kvantifikacija (qRT-PCR) prema već određenim protokolima, uz korišćenje komercijalnih kitova. Prema uputstvu proizvođača, ukupna bakterijska DNA je izolovana iz uzoraka korišćenjem QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Nemačka).

### 3.7 Detekcija mikroorganizama

Molekularno-genetička ispitivanja vršena su kroz tri faze:

1. izolacija bakterijske DNK;
2. umnožavanje određenih sekvenci gena putem lančane reakcije polimeraze;
3. potvrđivanje prisustva (vizualizacija) bakterijske DNK proveravana je vertikalnom gel elektroforezom na poliakrilamidnom gelu (PAGE).

#### Izolacija bakterijske DNK

Sterilne tubice (*Eppendorf tube*, Ismaning, Nemačka) u kojima su se nalazili uzorci biološkog materijala koji su prikupljeni sterilnim endodontskim papirnim, bile su zapremine 1,5 ml. U svaku tubu dodato je 300  $\mu$ l 50mM rastvora NaOH. Nakon toga, tube su zatvorene postavljene u vorteks aparat na 10 sekundi. Zatim su uzorci stavljeni u termomikser (na temperaturi od 95°C, u trajanju od 5 minuta). Nakon toga, papirni poeni su izvađeni iz tuba. Zatim je u svaki uzorak dodato 30  $\mu$ l 1M rastvora Tris HCl (pH 8), a potom su tube postavljene u centrifugu (na 13000 obrtaja, u trajanju od 120 sekundi). Tako dobijen supernatant, u kom se potencijalno nalazila bakterijska DNK, korišćen je za PCR analizu.

#### 3.7.1 Detekcija mikroorganizama reakcijom lančane polimeraze (engl. *Polymerase Chain Reaction* - PCR)

Ova metoda se danas veoma često koristi u različitim medicinskim istraživanjima, kao što su: dijagnostika naslednih oboljenja, funkcionalna analiza gena, identifikacije uzročnika različitog porekla (bakterije, virusi itd.) različitih infekcija, kao i u forenzičkoj medicini u cilju utvrđivanja očinstva. U molekularnoj biologiji ova metoda se koristi u cilju umnožavanja jednog ili nekoliko lanaca DNK i dobijanja velikog broja kopija određene sekvence gena. Sekvence su merenje u stotinama hiljada ili milionima (Saik i sar., 1987).

##### 3.7.1.1 Faze odvijanja PCR metode

PCR metoda u stvari predstavlja simuliranje DNK replikacije u in vitro uslovima. PCR metoda zasniva se na tri procesa koji se sukcesivno ponavljaju:

1. laboratorijska (in vitro) denaturacija dvolančane DNK matrice;
2. hibridizacija, tj. aniling (engl. „*annealing*”) prajmera sa matricom na osnovu komplementarnosti baza;
3. ekstenzija prajmera DNK polimerazom.

U tom procesu učestvuje termostabilna polimeraza. Enzim koji je najčešće korišćen je Taq polimeraza. Po ovom enzimu je metoda i dobila naziv, a izolovan je iz bakterije *Thermus aquaticus*. Za ovu reakciju, pored enzima, neophodni su i specifični prajmeri. Prajmeri sadrže sekvence koje su komplementarne regionu nukleinske kiseline koji želimo da umnožimo i na taj način omogućavaju selektivnost reakcije i specifičnost reakcije. Prajmeri se hibridizuju za specifične sekvence DNK po principu komplementarnosti i ograničavaju produkt koji je željeni a koji biva kasnije i umnožavan. Kako PCR analiza dalje napreduje, lanci DNK koji su novostvoreni postaju šabloni za replikaciju, zbog čega se količina amplifikata eksponencijalno umnožava.

Da bi PCR reakcija mogla da se izvede, u rastvor je (pored prajmera i polimeraze) neophodno da se dodaju i nukleotidi, kao i određena hemijska jedinjenja (poput magnezijum - hlorida i pufera) koja imaju ulogu da optimizuju uslove za amplifikaciju.

Prisustvo 16S ribozomalne DNK od sledećih bakterija: *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, *Eikenella corrodens*, *Tannerella forsythia* i *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* je detektovana standardnom PCR metodom. Za potrebe ovog istraživanja, korišćena je PCR reakciona smeša:

- 1x PCR puffer (*MBI Fermentas*, Litvanija);
- 1,5 mM rastvor MgCl<sub>2</sub> dNTPs (nukleotidi);
- prajmeri u koncentraciji od 0,2 µM;
- jedna jedinica DreamTaq DNA polimeraza;
- 5 µl supernatanta izolovanog procesom izolacije.

Sekvence svih korišćenih prajmera, temperature pod kojima su se odigrale hibridizacije i dužina proizvoda (bp) PCR reakcije nalazi se u Tabeli 1.

Finalna zapremina rastvora koji je bio pripremljen za analizu iznosila je 25 µl za svaki uzorak. Za amplifikaciju je korišćen PCR aparat *PeqStar*, *PeqLab* (Erlangen, Nemačka).

**Tabela 1.** Sekvence prajmera, temperatura hibridizacije i dužina proizvoda PCR reakcije

Bakterija	Sekvence prajmera (5' – 3')	Temperatura hibridizacije (°C)	Dužina (bp)
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	Fwd AGGCAGCTTGCCATACTGCG	55	400
	Rv ACTGTTAGCAACTACCGATGT		
<i>Treponema denticola</i>	Fwd TAATACCGAATGTGCTCATTACAT	60	316
	Rv TCAAAGAAGCATTCCCTCTTCTTCTTA		
<i>Eikenella corrodens</i>	Fwd CTAATACCGCATAACGTCCTAAG	55	688
	Rv CTAATAAGCAATCAAGTTGCC		
<i>Tannerella forsythia</i>	Fwd GCGTATGTAACCTGCCCGCA	55	600
	Rv TGCTTCAGTGTCAGTTATACCT		
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	Fwd GCTAATACCGCGTAGAGTCGG	55	500
	Rv ATTCACACCTCACTTAAAGGT		

bp (bazni parovi)

Umnožavanje sekvence DNK izvedeno je u sledeće tri faze:

I faza - Aktivacija polimeraze. Kako bi se izvela ova faza i aktivirala Taq polimeraza, bilo je neophodno zagrejati rastvor na na 95°C u trajanju od 3 minuta. Takođe, ova faza podrazumevala je i inicijalnu denaturaciju DNK molekula.

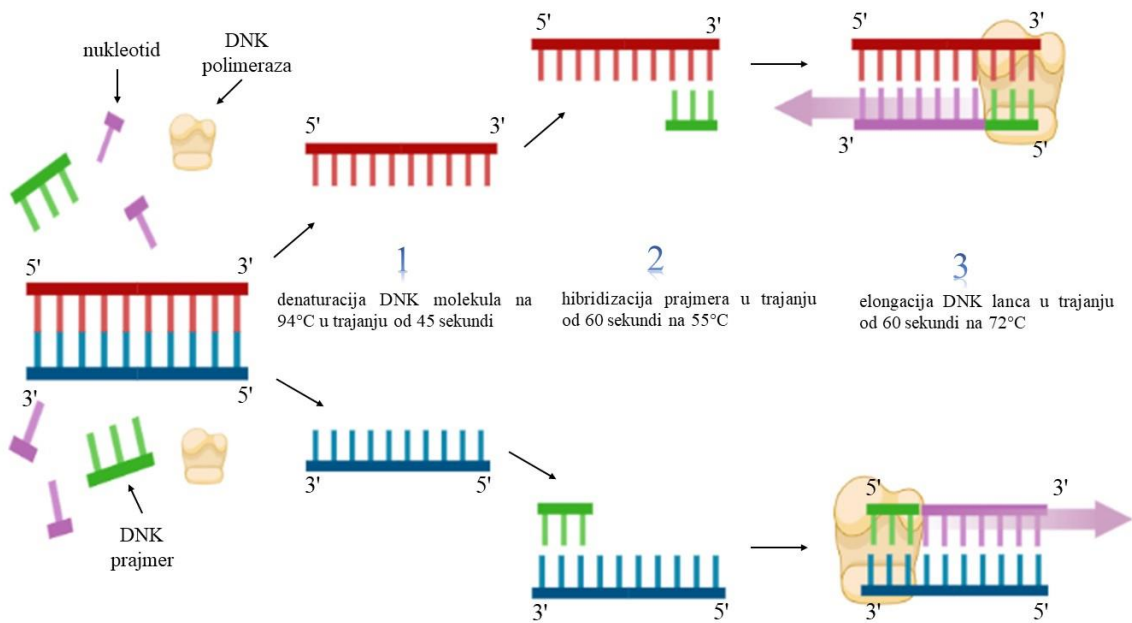
II faza - Nakon aktivacije polimeraze, usledilo je 35 ciklusa koji su podrazumevali nekoliko koraka:

1. denaturaciju DNK molekula na 94°C u trajanju od 45 sekundi;
2. hibridizaciju prajmera u trajanju od 60 sekundi na 55°C;
3. elongaciju lanca DNK u trajanju od 60 sekundi na 72°C.

Svi uslovi pod kojim se odigravala II faza prikazani su na Slici 5.

III faza - Finalna elongacija lanaca u trajanju od 5 minuta na temperaturi od 72°C.





**Slika 5.** Prikaz II faze umnožavanja sekvence DNK u toku odvijanja reakcije lančane polimeraze (PCR metode). PCR - reakcija lančane polimeraze (engl. „*Polymerase Chain Reaction*”). Slika je nacrtana uz pomoć sajta BioRender.com (2020).

Za sve grupe uzoraka koje su analizirane u PCR aparatu, korišćene su negativne i pozitivne kontrole. Dodavanje izolovane DNK referentnih sojeva dobijenih iz *American Type Culture Collection* (ATCC): *P. gingivalis* (ATCC 33277), *T. denticola* (ATCC 35405), *E. corrodens* (ATCC 23834), *T. forsythia* (ATCC 43037) i *A. actinomycetemcomitans* (ATCC 33384) su korišćeni kao pozitivne kontrole. Kod negativnih kontrolnih uzoraka, dodata je ista zapremina destilovane vode, umesto bakterijske DNK.

Opseg određene dužine (dužina baznih parova BP) potvrdila je prisustvo mikroorganizama u uzorcima.

### 3.7.1.2 Poliakrilamidna gel elektroforeza ( engl. „*polyacrilamide gel electrophoresis*”)

Gel elektroforeza predstavlja jednu od osnovnih laboratorijskih tehnika koja se koristi u različitim biološkim disciplinama, a zasniva se na metodi separacije makromolekula (kao što su npr. DNK, RNK i proteini), u cilju proučavanja njihovih fizičkih karakteristika, zahvaljujući njihovoj elektroforetskoj pokretljivosti. Elektroforetska pokretljivost je zavisna od dužine, prostornog rasporeda i količine naelektrisanja molekula. Svi ovi faktori utiču upravo na nejednaku pokretljivost ispitivanog molekula kroz gel.

Osnovni princip PAGE metode se zasniva na odvajanju analita propuštanjem kroz pore poliakrilamidnog gela pomoću električne struje. Prilikom izvođenja ove metode, primenjuju se različiti mediji i mehanizmi. Obzirom da je DNK molekul negativno naelektrisan zbog posedovanja velikog broja fosfatnih grupa koje su jonizovane, te ga u toku elektroforeze usmeravaju od negativne elektrode (katode) ka pozitivnoj elektrodi (anodi). Da bi se ovo postiglo, mešavina akrilamid-bisakrilamida se polimerizuje (poliakrilamid) dodavanjem amonijum persulfata (APS). Reakcija, koju katalizuje tetrametiletilendiamin (TEMED), formira mrežastu strukturu sa porama kroz koje analiti mogu da se kreću. Što je veći procenat ukupnog akrilamida uključenog u gel, to je manja veličina pora i shodno tome će moći da prolaze samo DNK molekuli manje veličine.

Manje veličine pora, takođe smanjuju brzinu kojom mali DNK molekuli mogu da se kreću kroz gel, poboljšavajući njihovu rezoluciju i sprečavajući ih da brzo otiču u pufer kada se primeni struja (Green i Sambrook, 2020).

Sastav 8% PAGE čine:

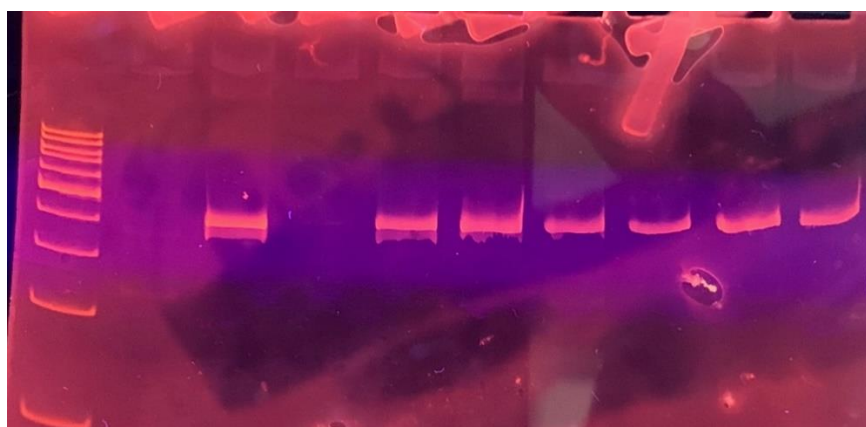
- TBE pufer
- Akrilamid / bis-akrilamid (40 %)
- APS (10 %)
- TEMED (Tabela 2).

**Tabela 2.** 8% poliakrilamidni gel (sastojci i zapremine)

ddH <sub>2</sub> O	3,96 ml
5 x TBE pufer	1,3 ml
Akrilamid / bis-akrilamid (40 %)	1,3 ml
APS (10 %)	45 µl
TEMED	8,4 µl

TBE pufer (engl. *Tris base*+ *boric acid*+ *EDTA*); APS (engl. *ammonium persulfate*)

Elektroforeza je trajala 60 minuta, pri konstantnom naponu struje od 220V u 1x TBE puferu. Nakon elektroforeze, gelovi su potoljeni u rastvor etidijum-bromida. Etidijum-bromid vezuje lance nukleinske kiseline i omogućava laku vizuelizaciju rezultata na UV transiluminatoru, što se manifestuje poput svetlećih traka (Slika 6).



**Slika 6.** Vizualizacija PCR produkta dužine 400 bp u uzorcima broj 2, 4, 5, 6, 7, 8 i 9, što predstavlja potvrdu prisustva soja *Porphyromonas gingivalis*. bp - bazni parovi

### 3.7.2 Kvantifikacija mikroorganizama metodom real - time PCR

Ukupna količina bakterija je kvantifikovana primenom qRT – PCR (engl., „*quantitative real-time polymerase chain reaction*”) metode, koja je ranije opisana (Brajović i sar., 2016). Amplifikacija visoko konzerviranih ciljnih sekvenci 16S rRNK je izvedena pomoću *SensiFAST SYBR® Hi-ROX* Kita (*Bioline Reagents Ltd*, London, Velika Britanija) i korišćenjem sledećih prajmera: Fw 5'-TCCTACGGGAGCACAGT'-3 i Rv 5'GGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTT-3'. Da bi se izvela ova metoda neophodna su dva parametra:

- veličina bakterijskog genoma;
- broj kopija 16S rDNK unutar ćelije.

Amplifikacija ciljnih sekvenci za 16S rRNA izvedena je korišćenjem SYBR Green PCR Master Mix, Maxima (*RTC*, Vilnius, Litvanija), a kontrolisana je u aparatu Line-Gene PCR (*Hangzhou Bioer Technology Co., Ltd*, Šangaj, Kina).

Finalna zapremina PCR reakcione smeše svakog pojedinačnog uzorka iznosila je ukupno 25 µl, je u čiji je sastav ulazilo:

- 12,5 µl of SYBR Green master mix;
- 0,2 µM svakog prajmera;
- 50 ng bakterijske DNK.

#### 3.7.2.1 Faze odvijanja real-time PCR metode

Umnožavanje sekvence DNK izvedeno je u sledeće tri faze:

I faza - Aktivacija polimeraze. Kako bi se izvela ova faza i aktivirala Taq polimeraza, bilo je neophodno zagrejati rastvor na na 94°C u trajanju od 10 minuta. Takođe, ova faza podrazumevala je i inicijalnu denaturaciju DNK molekula.

II faza - Nakon aktivacije polimeraze, usledilo je 40 ciklusa koji su podrazumevali nekoliko koraka:

- denaturaciju DNK molekula na 94°C u trajanju od 60 sekundi;
- hibridizaciju prajmera u trajanju od 60 sekundi na 60°C;
- elongaciju lanca DNK u trajanju od 90 sekundi na 72°C.

III faza - Finalna elongacija lanaca u trajanju od 5 minuta na temperaturi od 72°C.

Da bi se procenila specifičnost amplifikacije, izvršena je analiza krive topljenja. Svaki uzorak je analiziran dva puta.

U okviru ove doktorske disertacije, referentni soj koji se koristio za analizu standardne krive bio je *Prevotella melaninogenica* (ATCC 25845) a rezultati su izraženi kao ukupan broj kopije gena. Prema podacima o genomu *P. melaninogenica* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome>), veličina genoma od 3,17 Mb je pretvorena u veličinu od 3,24 fg (jedna kopija genoma). Ovo je postignuto upotrebom sledeće formule: Težina DNK u (pg) = veličini genoma (bp)  $\times 1,023 \times 10^9$ . Naime, polazeći od pretpostavke da 3,24 fg DNK predstavlja jednu ćeliju (tj. jednu kopiju genoma), a upravo ta vrste Prevotela ima najviše dva rDNK operona, DNK u standardnim uzorcima su razblaženi od 32,4 fg DNK (što odgovara 20 operona rDNK), do 32,4 ng DNK (što odgovara  $2 \times 10^7$  operona rDNK). Za procenjivanje broja kopija gena rDNK u ispitivanim uzorcima, u svakom ciklusu bili su uključeni standardni uzorci, sa serijama čije su DNK od *P. melaninogenica* bile 10 puta razblažene.

## 3.8 Biohemijska ispitivanja

### 3.8.1 Određivanje redoks statusa

U uzorcima salive određeni su sledeći parametri oksidativnog statusa: enzimski antioksidativni biomarkeri (aktivnost SOD i GPx); neenzimski antioksidativni biomarkeri: MK i TAS. Dodatno, kao biomarkeri oksidativnog oštećenja tkiva, odnosno lipidne peroksidacije, određene su koncentracije za MDA i 8-OHdG.

#### 3.8.1.1 Određivanje koncentracije malondialdehida

Koncentracija MDA određena je spektrometrijski. Lipidna peroksidacija predstavlja oksidativnu degradaciju lipida. U toj reakciji slobodni radikali preuzimaju elektrone od molekula lipida (najčešće su to lipidi ćelijskih membrana) pri čemu nastaju lipidni peroksidi. Lipidnom peroksidacijom nastaju reaktivni aldehidi kao što su MDA i 4-hidroksi-nonenal (4-HNE). U osnovi, radi se o reakciji slobodne MDA sa tiobarbiturnom kiselinom (TBA) pri čemu nastaje kompleks roze boje (MDA-TBA), koji se kvantifikuje spektrofotometrijski prilikom apsorbance od 3 ml obojenog sloja na talasnoj dužini od 335 nm (Buege i Aust, 1978). Koncentracija MDA izražavana je u  $\mu\text{mol}$  po litru.

#### 3.8.1.2 Određivanje koncentracije 8-hidroksi-2-deoksiguanozina

Koncentracija 8-OHdG određena je primenom enzimskog imunoadsorpcionog testa (engl. „*Enzyme-linked immunoabsorbent assay*” ELISA ). Ovaj test podrazumeva korišćenje mikroploče na kojoj se nalazi 96 bunarčića koji su premazani primarnim i sekundarnim antitelima specifičnim za 8-OHdG. Minimalne detekcione granice po uslovima proizvođača su 0,125 ng/ml. Kolorimetrijska detekcija substrata je izvršena pomoću spektrofotometrije čija je apsorbance na talasnoj dužini od 450 nm. Intenzitet dobijene boje je obrnuto proporcionalan koncentraciji 8-OHdG u uzorcima, pri čemu su koncentracije uzoraka izračunate pomoću standardne krive (Tabatabaei i Ahmed, 2022). Koncentracija 8-OHdG izražavana je u ng po mililitru.

#### 3.8.1.3 Određivanje aktivnosti glutation peroksidaze

Aktivnost GPx određena je UV metodom (Paglia i Valentine). Princip metode je bio da GPx katalizuje oksidaciju glutationa pomoću kumen-hidroperoksida. U prisustvu glutation reduktaze i NADPH oksidovani glutation odmah se konvertuje u redukovani, što je praćeno oksidacijom NADPH u NADP<sup>+</sup> (Paglia i Valentine, 1967). Jedinica aktivnost GPx je (U) i izražava se po mililitru ili litru.

#### 3.8.1.4 Određivanje aktivnosti superoksid dismutaze

Aktivnost SOD je merena enzimskom kolorimetrijskom metodom. Ova metoda koristi ksantin i ksantin oksidazu (XOD) za stvaranje superoksidnih radikala. Dobijeni radikali reaguju sa 2-(4-jodofenil)-3-(4nitrofenol)-5-feniltetrazolium hloridom (INT) i daju crveno obojeni formazan. Aktivnost SOD je proporcionalna stepenu inhibicije ove reakcije. Jedinica aktivnosti SOD je (U) i njena vrednost izražava se po mililitru ili litru. Jedna jedinica SOD smanjuje redukciju INT-a za 50% u uslovima pod koji se izvodi ova reakcija (Goldstein i sar., 1988).

#### 3.8.1.5 Određivanje totalnog antioksidativnog statusa

Vrednost ukupnog antioksidativnog statusa u salivi je merena kolorimetrijskom metodom. Princip metode bio je sledeći: ABTS® (2,2'-azino-di-etilbenzothiazoline sulfonat) se inkubira sa peroksidazom i vodom da bi se dobio ketonski radikal ABTS® +. Ovako se dobija relativno stabilna plavo zelena boja koja se meri na 600 nm. Antioksidansi u dodatom uzorku prouzrokuju supresiju stvaranja ove boje. Stepenu supresije je proporcionalan koncentraciji antioksidanasa u ispitivanom uzorku (N. J. Miller i sar., 1993). Rezultati su izraženi u  $\mu\text{mol}$  po litru.

### 3.8.1.6 Određivanje koncentracije mokraćne kiseline

Koncentracije MK su određivane kolorimetrijskom metodom. Princip metode je da gvožđe reaguje sa MK i 2,4,6-tripiridil-s-triazinom, generišući kompleks plave boje. Nivo MK je direktno proporcionalan intenzitetu boje uzoraka, koja se kvantifikuje na talasnoj dužini na 590 nm (Maciejczyk i sar., 2022). Dobijeni rezultati izraženi su u  $\mu\text{mol}$  po litru.

### 3.8.2 Određivanje koncentracije inflamatornih enzima

U uzorcima salive su takođe određene i vrednosti enzima: aspartat aminotransferaze (AST), alanin aminotransferaze (ALT), alkalne fosfataze (ALP), gama glutamil transferaze (GGT), laktat dehidrogenaze (LDH) i kreatin kinaze (CK). Aktivnosti navedenih enzima su određivane spektrofotometrijskom metodom (Beckman Coulter) standardnim laboratorijskim testovima na aparatu (*Olympus AU600, Beckman Coulter, Brea, Sjedinjene Američke Države*). Jedinica aktivnosti svih ovih enzima je (U) i izražava se po litru (Bowers i sar., 1980).

## 3.9 Statistička analiza

Za statističku analizu prikupljenih podataka korišćene su različite metode deskriptivne i analitičke statistike.

### 3.9.1 Statistička analiza mikrobioloških podataka

Za statističku analizu i grafički prikaz podataka vezanih za peripatogene sojeve, korišćen je program Statistical Package for Social Science (*SPSS software package, version 20.0; SPSS Inc., Čikago, Illinois, Sjedinjene Američke Države*). Broj kopija gena u svakom ispitivanom uzorku određen je upoređivanjem CT vrednosti/broja kopije gena standardne krive. Kategoričke varijable bile su predstavljene kao frekvencija određene kategorije. Statističke značajnosti između kategoričkih varijabli analizirane su pomoću MekNemar-ovog testa (*McNemar Test*) - korišćen za varijable pre i posle terapije ili Pirson-ovog Hi kvadrat testa (*Pearson's Chi-square test*) (za varijable u dva nezavisna uzorka). U zavisnosti od raspodele podataka (normalna ili različita od normalne, što je utvrđivano Kolmogorov Smirnov testom (*Kolmogorov-Smirnov test*), poređenja su izvršena korišćenjem neparametarskog Vilkoksonovog testa (*non-parametric Wilcoxon Signed Ranks Test*) za varijable pre i posle terapije ili korišćenjem neparametarskog Man-Vitnijevog testa (*nonparametric Mann-Whitney U test*) za varijable u dva nezavisna uzorka. Svi rezultati su posmatrani kao statistički značajni za dobijenu vrednost  $p < 0,05$ .

### 3.9.2 Statistička analiza biohemijskih i kliničkih podataka

Statističke analize podataka i grafičkih prikaza vezanih za kliničke, biohemijske markere inflamacije kao i parametre redoks statusa, urađene su korišćenjem statističkog softverskog paketa, *PASW Statistics 18® (SPSS, Hong Kong, Ltd., Hong Kong)*. Za sve promenljive koje su predstavljene kao učestalost određenih kategorija, statistička značajnost proveravana je primenom  $\chi^2$  testa. Kontinuirane varijable prikazane su kao srednja vrednost, standardna devijacija (SD) i medijana, a za kategorijske varijable prikazane su apsolutni brojevi i procenti. Kontinuirane varijable upoređivane su korišćenjem neparametarskog Vilkoksonovog testa (*Wilcoxon Signed Ranks test*), za promenljive pre i posle intervencije ili neparametarskog Man-Vitnijevog testa (*nonparametric Mann-Whitney U test*), za promenljive u dva nezavisna uzorka, kao i Studentovog t testa (*Studentov t- Test*) kojim se utvrđuje da li se srednja vrednost dve grupe podataka značajno razlikuju jedna od druge. Normalnost distribucije podataka testirana je pomoću Kolmogorov Smirnov testa (*Kolmogorov-Smirnov test*).

U proceni korelacija između parametara korišćen je Pirsonov koeficijent korelacije (*Pearson's correlation coefficient*) kod parametarske distribucije podataka, dok je kod neparametarske distribucije podataka korišćen Spirmanov koeficijent korelacije (*Spearman's correlation coefficient*). Naknadna *post hoc* poređenja između pojedinih grupa izvedena su primenom Man-Vitnijevog testa (*Mann-Whitney U test*).

Statistički značajna razlika procenjivana je na minimalnom nivou  $p < 0,05$  (\* $p < 0,05$ ), pri čemu su utvrđena tri nivoa statističke značajnosti:

- umerena statistički značajna razlika, gde je  $p < 0,01$  (\*\* $p < 0,01$ )
- visoka statistički značajna razlika  $p < 0,001$  (\*\* $p < 0,001$ )
- vrlo visoka statistički značajna razlika  $p < 0,0001$  (\*\* $p < 0,0001$ ).

## 4. REZULTATI

Prvo poređenje ispitivanih grupa u okviru deskriptivne analize rezultata, urađeno je tako što su obe grupe pacijenata obolelih od parodontitisa (KT+HH grupa i KT grupa) spojene u jednu grupu nazvanu „pacijenti sa parodontitisom”, dok su ostali ispitanici svrstani u grupu nazvanu „pacijenti sa zdravim parodontijumom” (Tabele 3-7).

### 4.1 Deskriptivna analiza

#### 4.1.1 Deskriptivna analiza sociodemografskih karakteristika (starost i pušački status) između obolelih od parodontitisa i ispitanika sa zdravim parodontijumom

U Tabeli 3. prikazane su osnovne sociodemografske karakteristike (starost i pušački status) ispitivanih grupa.

Ispitanici 1. i 2. eksperimentalne grupe bili su značajno stariji nego zdrave osobe, odnosno srednja vrednost starosti pacijenata koji su bolovali od parodontitisa iznosila je 51,2 godina, a ispitanika sa zdravim parodontijumom iznosila je 35,5 godina. Nije bilo statistički značajne razlike između ispitivanih grupa u pogledu pušačkog statusa.

**Tabela 3.** Sociodemografske karakteristike ispitivanih grupa pacijenata (pacijenti sa zdravim parodontijumom i pacijenti sa parodontitisom).

Grupa	Pacijenti sa zdravim parodontijumom	Pacijenti sa parodontitisom	p vrednost
Starost: srednja vrednost godina $\pm$ SD	35,5 $\pm$ 9,66	51,2 $\pm$ 9,50	<b>&lt;0,001</b> ***(#)
<b>Pušački status –</b>			
<b>*n (%)</b>			
Ne	15 (75,0)	21 (52,5)	0,080(##)
Da	5 (25,0)	19 (47,5)	

# t-test ; ##  $\chi^2$  test ; statistička značajnost je boldirana; \*\*\*p < 0,001; \*n (%) predstavlja broj (procenat) ispitanika koji poseduju sociodemografsku karakteristiku (pušački status: NE je predstavljalo nepušačku naviku, DA je predstavljalo pušačku naviku).

#### 4.1.2 Deskriptivna analiza kliničkih parametara između obolelih od parodontitisa i ispitanika sa zdravim parodontcijumom

Zapaža se da postoje visoko statističke značajne razlike ( $p < 0,001$ ) između pacijenata sa zdravim parodontcijumom i pacijenata sa parodontitisom (u pogledu svih kliničkih parametara) gde su pacijenti sa parodontitisom imali značajno više vrednosti ovih parametara u odnosu na ispitanike sa zdravim parodontcijumom pre terapije. Jedino za indeks labavljanja zuba, iako su pacijenti sa parodontitisom imali višu vrednost ovog kliničkog parametra, ta razlika nije bila na novou statističke značajnosti između pacijenata sa parodontitisom i onih sa zdravim parodontcijumom pre terapije (Tabela 4).

**Tabela 4.** Deskriptivna analiza kliničkih parametara ispitivanih grupa (pacijenti sa zdravim parodontcijumom i pacijenti sa parodontitisom) pre terapije.

Klinički parametri	Pacijenti sa zdravim parodontcijumom	Pacijenti sa parodontitisom	p vrednost
	Medijana (interkvartilni raspon)		
<b>PI</b>	0,29 (0,2-0,6)	1,13 (0,4-3,9)	<b>&lt;0,001***</b>
<b>GI</b>	0,24 (0,1-1,0)	1,44 (0,2-3,9)	<b>&lt;0,001***</b>
<b>IKG</b>	0,29 (0,0-0,6)	1,18 (0,3-2,8)	<b>&lt;0,001***</b>
<b>IMN</b>	0,33 (0,0-0,8)	0,75 (0,0-2,0)	<b>&lt;0,001***</b>
<b>IZK</b>	0,33 (0,0-0,8)	0,50 (0,0-1,7)	<b>&lt;0,001***</b>
<b>ILZ</b>	0,55 (0,2-1,7)	0,98 (0,1-4,3)	0,710
<b>DS (mm)</b>	1,70 (1,9-2,9)	3,41 (2,7-4,8)	<b>&lt;0,001***</b>
<b>NPE (mm)</b>	0,90 (0,0-0,8)	1,89 (1-3,5)	<b>&lt;0,001***</b>

*Mann-Whitney* test; statistička značajnost je boldirana; \*\*\* $p < 0,001$ ; vrednosti su prikazane kao medijana i interkvartilni opseg (minimalna i maksimalna vrednost parametra unutar grupe). Plak indeks (PI); Gingivalni indeks (GI); Indeks krvarenja gingive (IKG); Indeks mekih naslaga (IMN); Indeks zubnog kamenca (IZK); Indeks labavljanja zuba (ILZ); Dubina sondiranja (DS); Nivo pripojnog epitela (NPE).



#### 4.1.3 Deskriptivna analiza markera redoks statusa (oksidativnih i antioksidativnih) između obolelih od parodontitisa i ispitanika sa zdravim parodontcijumom

Istraživanjem je ustanovljeno da za koncentracije MDA i 8-OHdG, kao i za aktivnost GPx postoje statistički značajne razlike (pacijenti sa parodontitisom imaju više vrednosti od ispitanika sa zdravim parodontcijumom) pre terapije ( $p < 0,001$ ). Iako pacijenti sa parodontitisom imaju više vrednosti za aktivnost SOD i TAS, kao i za vrednosti MK, ne postoje statistički značajne razlike između ispitivanih grupa pre terapije (Tabela 5).

**Tabela 5.** Prikaz markera redoks statusa (oksidativnih i antioksidativnih), ispitivanih grupa (pacijenti sa zdravim parodontcijumom i pacijenti sa parodontitisom) pre terapije.

Markeri redoks statusa	Pacijenti sa zdravim parodontcijumom	Pacijenti sa parodontitisom	p-vrednost
	Medijana (interkvartilni raspon)		
MDA ( $\mu\text{mol/l}$ ) <sup>#</sup>	5,43 (3,1-16)	12,36 (2,8-16,2)	< <b>0,001</b> ***
8-OHdG (ng/ml) <sup>#</sup>	7,08 (3,5-23,1)	38,30 (13,1-97,6)	< <b>0,001</b> ***
SOD (U/ml) <sup>##</sup>	0,64 (0,2-2,0)	0,77 (0,2-1,7)	0,880
GPx (U/l) <sup>#</sup>	2,00 (0,0-4,0)	6,00 (1,0-21,0)	< <b>0,001</b> ***
TAS ( $\mu\text{mol/l}$ ) <sup>##</sup>	0,49 (0,3-1,0)	0,60 (0,3-1,0)	0,130
MK ( $\mu\text{mol/l}$ ) <sup>##</sup>	95,50 (49-262)	104,50 (0-349)	0,720

<sup>#</sup>Mann-Whitney test; <sup>##</sup> t-test; statistička značajnost je boldirana; \*\*\* $p < 0,001$ ; vrednosti su prikazane kao medijana i interkvartilni opseg (minimalna i maksimalna vrednost parametra unutar grupe). Malondialdehid (MDA); 8-hidroksi-2-deoksiguanozin (8-OHdG); Superoksid dismutaza (SOD); Glutation peroksidaza (GPx); Totalni antioksidativni status (TAS); Mokraćna kiselina (MK).

#### 4.1.4 Deskriptivna analiza biohemijskih parametara (inflamatornih enzima) između obolelih od parodontitisa i ispitanika sa zdravim parodontcijumom pre terapije

Istraživanjem je ustanovljeno da su vrednosti ALT statistički značajno povišene kod pacijenata sa parodontitisom u odnosu na ispitanike sa zdravim parodontcijumom pre terapije ( $p = 0,026$ ).

U pogledu AST enzima, ne postoji značajna razlika između pacijenata sa parodontitisom i zdravih ispitanika ( $p = 0,260$ ).

Nadalje, u pogledu vrednosti ALP enzima, postoji veoma visoka statistička značajnost (povišene vrednosti na račun pacijenata sa parodontitisom) u odnosu na ispitanike sa zdravim parodontcijumom ( $p < 0,0001$ ).

Zatim, istraživanjem je ustanovljeno da osobe sa parodontitisom imaju veće vrednosti GGT, ali razlika nije statistički značajna ( $p = 0,31$ ).

Rezultati su takođe pokazali da kada su u pitanju vrednosti LDH, postoji statistički značajna razlika (pacijenti sa parodontitisom imaju značajno povišene vrednosti) u odnosu na ispitanike sa zdravim parodontijumom pre terapije ( $p = 0,001$ ). Istraživanjem je još i ustanovljeno da pacijenti sa parodontitisom imaju veće vrednosti CK u odnosu na ispitanike sa zdravim parodontijumom pre terapije, ali razlika nije statistički značajna ( $p = 0,380$ ) (Tabela 6).

**Tabela 6.** Prikaz biohemijskih parametara ispitivanih grupa (pacijenti sa zdravim parodontijumom i pacijenti sa parodontitisom) pre terapije.

Biohemijski parametri	Pacijenti sa zdravim parodontijumom	Pacijenti sa parodontitisom	p-vrednost
	Broj (%)		
<b>ALT (U/l)</b>			
Normalna vrednost	33 (82,5%)	11(55,0%)	<b>0,026*</b>
Povišena vrednost	7 (17,5%)	9 (45,0%)	
<b>AST (U/l)</b>			
Normalna vrednost	7 (35,0%)	19 (47,5%)	0,260
Povišena vrednost	13 (65,0%)	21 (52,5%)	
<b>ALP (U/l)</b>			
Normalna vrednost	13 (65,0%)	1 (2,5%)	<b>&lt; 0,0001****</b>
Povišena vrednost	7 (35,0%)	39 (97,5%)	
<b>GGT (U/l)</b>			
Normalna vrednost	14 (70,0%)	24 (60,0%)	0,320
Povišena vrednost	6 (30,0%)	16 (40,0%)	
<b>LDH (U/l)</b>			
Normalna vrednost	8 (40,0%)	2 (5,0%)	<b>0,001**</b>
Povišena vrednost	12 (60,0%)	38 (95,0%)	
<b>CK (U/l)</b>			
Normalna vrednost	7 (35,0%)	11 (27,5%)	0,380
Povišena vrednost	13 (65,0%)	29 (72,5%)	

$\chi^2$  test; statistička značajnost je boldirana; \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ ; Broj (%) - broj, odnosno procenat pacijenata u okviru grupe sa normalnim/povišenim vrednostima određenog biohemijskog parametra. Aspartat aminotransferaza (AST); Alanin aminotransferaza (ALT); Alkalne fosfataza (ALP); Gama glutamil transferaza (GGT); Laktat dehidrogenaza (LDH); Kreatin kinaza (CK).

#### 4.1.5 Deskriptivna analiza detekcije *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, *Eikenella corrodens*, *Tannerella forsythia* i *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* - između obolelih od parodontitisa i ispitanika sa zdravim parodontcijumom pre terapije

Istraživanjem je ustanovljeno da su *T. denticola*, *E. corrodens* i *T. forsythia* statistički značajno bile prisutne češće kod pacijenata sa parodontitisom ( $p < 0,001$ ). Za sojeve *P. gingivalis* i *A. actinomycetemcomitans* nisu uočene statistički značajne razlike između ove dve grupe, premda su oba bakterijska soja detektovana kod većeg broja pacijenata koji boluju od parodontitisa, nego kod ispitanika sa zdravim parodontcijumom pre terapije (Tabela 7).

**Tabela 7.** Detekcija *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, *Eikenella corrodens*, *Tannerella forsythia* i *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, ispitivanih grupa (pacijenti sa zdravim parodontcijumom i pacijenti sa parodontitisom) pre terapije.

Bakterijski sojevi	Pacijenti sa zdravim parodontcijumom	Pacijenti sa parodontitisom	p vrednost
	Broj (%)*		
<i>P. gingivalis</i>	17 (85,0)	37 (97,4)	0,114
<i>T. denticola</i>	0 (0,0)	20 (52,6)	< <b>0,001</b> ***
<i>E. corrodens</i>	10 (50,0)	34 (89,5)	< <b>0,001</b> ***
<i>T. forsythia</i>	4 (20)	35 (92,1)	< <b>0,001</b> ***
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	14 (70)	33 (89,2)	0,075

$\chi^2$  test; statistička značajnost je boldirana; \*\*\* $p < 0,001$ ; Broj (%)\*-broj, odnosno procenat uzoraka (pacijenata) kod kojih je potvrđeno prisustvo bakterijskog soja unutar grupe. *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*); *Treponema denticola* (*T. denticola*); *Eikenella corrodens* (*E. corrodens*); *Tannerella forsythia* (*T. forsythia*); *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A. actinomycetemcomitans*).

#### 4.1.6 Deskriptivna analiza kliničkih karakteristika unutar grupa (KT+HH, KT i Z grupa) pre terapije

Tabela 8 prikazuje vrednosti kliničkih parametara u sve tri grupe ispitanika (KT+HH, KT i Z grupa). Istraživanjem je ustanovljeno da su srednje vrednosti svih ispitivanih kliničkih parametara (PI, GI, IKG, IMN, IZK, ILZ, DS, NPE) bile više u obe grupe pacijenata obolelih od parodontitisa u odnosu na ispitanike sa zdravim parodontcijumom pre terapije.

**Tabela 8.** Prikaz vrednosti kliničkih parametara u okviru svih grupa ispitanika (KT+HH, KT i Z) pre terapije.

Klinički parametri	KT+HH grupa	KT grupa	Z grupa
<b>PI</b>	1,18 0,6-2,64	1,075 0,37-3,84	0,285 0,16-0,62
<b>GI</b>	1,45 0,15-2,66	1,415 0,81-3,87	0,265 0,13-0,95
<b>IKG</b>	1,175 0,32-2,06	1,19 0,28-2,77	0,29 0,3-0,59
<b>IMN</b>	0,75 0,0-2,0	0,60 0,0-1,0	0,33 0,0-0,83
<b>IZK</b>	0,585 0,16-1,66	0,5 0,0-1,0	0,33 0,0-0,83
<b>ILZ</b>	0,925 0,2-2,1	1,11 0,11-4,27	0,55 0,16-1,7
<b>DS (mm)</b>	3,5 2,78-4,29	1,855 0,95-3,23	1,7 1,28-2,94
<b>NPE (mm)</b>	1,91 1,17-3,48	1,495 0,0-3,48	0,09 0,0-0,75

*Kruskal-Wallis test.* Vrednosti su prikazane kao medijana i interkvartilni opseg (minimalna i maksimalna vrednost). KT+HH grupa (pacijenti koji su tretirani konzervativnom terapijom i hlorheksidin-diglukonatom); KT grupa (pacijenti koji su tretirani samo konzervativnom terapijom); Z grupa (ispitanici sa zdravim parodontcijumom). Plak indeks (PI) Gingivalni indeks (GI); Indeks krvarenja gingive (IKG); Indeks mekih naslaga (IMN); Indeks zubnog kamenca (IZK); Indeks labavljanja zuba (ILZ); Dubina sondiranja (DS); Nivo pripojnog epitela (NPE).

#### 4.1.7 Deskriptivna analiza markera redoks statusa (oksidativnih i antioksidativnih), unutar grupa (KT+HH, KT i Z grupa) pre terapije.

U Tabeli 9 su prikazane vrednosti markera redoks statusa MDA, 8-OHdG, SOD, GPx, TAS i MK unutar grupa (KT+HH, KT i Z) pre terapije.

Analizom je ustanovljeno da su srednje vrednosti za koncentracije MDA više u obe grupe pacijenata sa parodontitisom pre terapije (12,7 za KT+HH grupu bolesnih; 11,88 za KT grupu). Nadalje, srednje vrednosti za koncentracije 8-OHdG, kao i za aktivnosti GPx i TAS bile su više u obe grupe pacijenata sa parodontitisom (KT+HH grupa i KT grupa) u odnosu na ispitanike Z grupe pre terapije. Rezultati pokazuju da je srednja vrednost aktivnosti SOD u Z grupi imala vrlo bliske vrednosti sa KT grupom pre terapije (Z grupa 0,64; KT grupa 0,69). Slično, viša srednja vrednost MK zapažena je kod zdravih osoba (95,5), nego kod pripadnika KT grupe (18,5), dok je KT+HH grupa imala najviše srednje vrednosti istog parametra pre terapije (138,5) (Tabela 9).

**Tabela 9.** Prikaz vrednosti markera redoks statusa u svim grupama ispitanika (KT+HH, KT i Z) pre terapije.

Markeri redoks statusa	KT+HH grupa	KT grupa	Z grupa
<b>MDA</b> (μmol/l)	12,7 2,8-16,16	11,88 9,66-14,4	5,43 3,12-16,0
<b>8-OHdG</b> (ng/ml)	30,950 1,1-49,6	73,3 16,2-97,6	7,075 3,5-23,1
<b>SOD</b> (U/ml)	0,795 0,28-1,73	0,69 0,23-1,55	0,64 0,24-2,06
<b>GPx</b> (U/l)	5,0 1,0-12,0	7,0 1,0-21,0	2,0 0,0-2,0
<b>TAS</b> (μmol/l)	0,6 0,33-1,02	0,59 0,36-0,97	0,49 0,25-0,99
<b>MK</b> (μmol/l)	138,5 70-349	18,5 0-349	95,5 49-262

*Kruskal-Wallis test.* Vrednosti su prikazane kao medijana i interkvartilni opseg; KT+HH grupa (pacijenti koji su tretirani konzervativnom terapijom i hlorheksidin-diglukonatom); KT grupa (pacijenti koji su tretirani samo konzervativnom terapijom); Z grupa (ispitanici sa zdravim parodontcijumom). Malondialdehid (MDA); 8-hidroksi-2-deoksiguanozin (8-OHdG); Superoksid dismutaza (SOD); Glutation peroksidaza (GPx); Totalni antioksidativni status (TAS); Mokraćna kiselina (MK).

#### 4.1.8 Deskriptivna analiza biohemijskih parametara unutar grupa (KT+HH, KT i Z grupa) pre terapije

Analizom je ustanovljeno da su medijane svih biohemijskih parametara više u obe eksperimentalne grupe pacijenata sa parodontitisom pre terapije, u poređenju sa grupom ispitanika koji su imali zdrav parodonticijum (Tabela 10).

**Tabela 10.** Prikaz vrednosti biohemijskih parametara u svim grupama ispitanika (KT+HH, KT i Z) pre terapije.

Biohemijski parametri	KT+HH grupa	KT grupa	Z grupa
<b>ALT</b> (U/l)	0,65 0,8-2,74	0,30 0,47-3,48	0,13 0,11-0,26
<b>AST</b> (U/l)	0,65 0,19-2,33	0,05 0,18-3,78	0,01 0,13-0,59
<b>ALP</b> (U/l)	0,65 0,23-2,60	2,25 0,82-2,77	0,22 0,14-0,95
<b>GGT</b> (U/l)	0,35 0,14-2,20	0,70 0,11-1,11	0,24 0,01-0,38
<b>LDH</b> (U/l)	3,20 0,61-1,66	2,60 0,11-1,0	1,42 0,01-0,16
<b>CK</b> (U/l)	1,10 2,87-4,92	0,74 0,59-3,32	0,33 1,10-2,49

*Kruskal-Wallis test.* Vrednosti su prikazane kao medijana i interkvartilni opseg; KT+HH grupa (pacijenti koji su tretirani konzervativnom terapijom i hlorheksidin-diglukonatom); KT grupa (pacijenti koji su tretirani samo konzervativnom terapijom); Z grupa (ispitanici sa zdravim parodonticijumom). Aspartat aminotransferaza (AST); Alanin aminotransferaza (ALT); Alkalne fosfataza (ALP); Gama glutamil transferaza (GGT); Laktat dehidrogenaza (LDH); Kreatin kinaza (CK).

## 4.2 Analitička statistika

### Poređenje homogenosti sociodemografskih karakteristika između eksperimentalnih grupa (KT+HH i KT) pre terapije

Analizom podataka, u odnosu na sociodemografske karakteristike (pušačke navike i starost), nisu utvrđene statističke značajnosti između eksperimentalnih grupa, što ukazuje da su obe ispitivane grupe obolelih od parodontitisa bile homogene za oba testa (i za  $\chi^2$  i za *t-test*,  $p > 0,05$ ) (Tabela 11).

**Tabela 11.** Analiza homogenosti uzoraka iz KT+HH grupe i KT grupe (prema pušačkim navikama i uzrastu)

Grupa	Pušački status <sup>##</sup>		Srednja vrednost godina <sup>#</sup>	p vrednost	
	Da *n (%)	Ne *n (%)			
<b>KT+HH</b>	10 (50,0)	10 (50,0)	50,8	0,50 <sup>##</sup>	0,769 <sup>#</sup>
<b>KT</b>	11 (55,0)	9 (45,0)	51,7		

<sup>#</sup> t-test; <sup>##</sup>  $\chi^2$  test; statistička značajnost je boldirana;  $p < 0,5$ . KT+HH grupa (pacijenti koji su tretirani konzervativnom terapijom i hlorheksidin-diglukonatom); KT grupa (pacijenti koji su tretirani samo konzervativnom terapijom). \*n (%) - predstavlja broj, odnosno procenat ispitanika unutar grupe koji su ispoljili sociodemografsku karakteristiku.

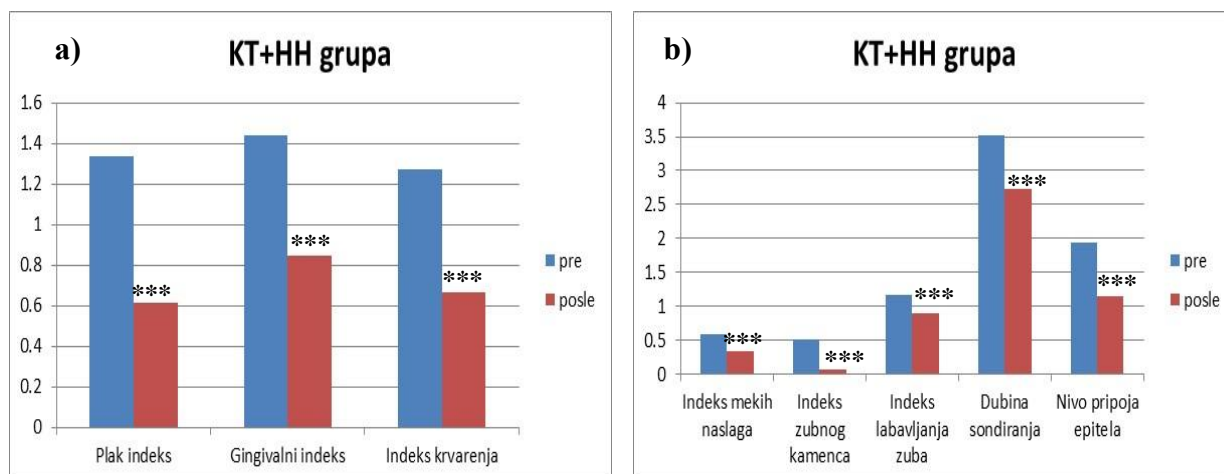
#### 4.2.1 Analitička statistika kliničkih parametara unutar eksperimentalnih grupa

##### 4.2.1.1 Analiza vrednosti kliničkih parametara unutar KT+HH grupe, pre i posle terapije

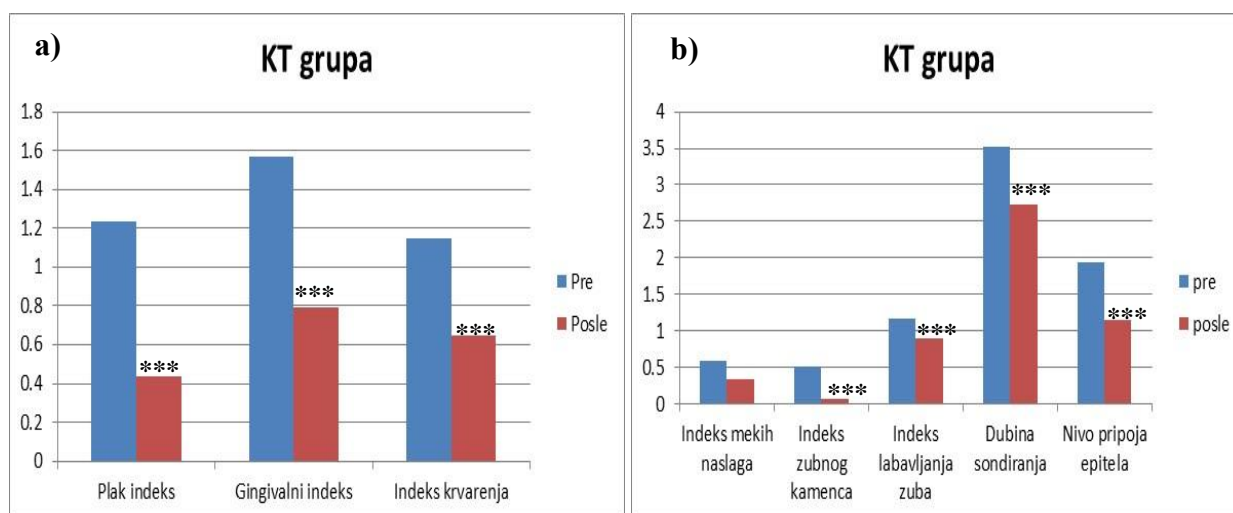
U KT+HH grupi ispitanika, došlo je do visoko statistički značajnog smanjenja vrednosti svih ispitivanih kliničkih parametara nakon primenjene terapije ( $p < 0,001$ ) (Slika 7).

##### 4.2.1.2 Analiza vrednosti kliničkih parametara unutar KT grupe pre i posle terapije

Vrednosti kliničkih parametara u KT grupi ispitanika su se visoko statistički značajno smanjile za PI, GI, IKG, IZK, ILZ, DS i NPE ( $p < 0,001$ ), dok za IMN smanjenje vrednosti je bilo na nivou statističke značajnosti ( $p < 0,05$ ) (Slika 8).



**Slika 7.** a) prikaz promena vrednosti PI, GI I IKG unutar KT+HH grupe pre i posle terapije; b) promena vrednosti IMN, IZK, ILZ, DS i NPE unutar KT+HH grupe pre i posle terapije. *Wilcoxon test*; \* $p < 0,05$  ; \*\*\* $p < 0,001$ ; Y osa izražava vrednosti za svaki parodontološki indeks koji se nalazi na X osi na obe slike. KT+HH grupa (pacijenti koji su tretirani konzervativnom terapijom i hlorheksidin-diglukonatom); Plak indeks (PI); Gingivalni indeks (GI); Indeks krvarenja gingive (IKG); Indeks mekih naslaga (IMN); Indeks zubnog kamenca (IZK); Indeks labavljanja zuba (ILZ); Dubina sondiranja (DS); Nivo pripojnog epitela (NPE).



**Slika 8.** a) prikaz promena vrednosti PI,GI i IKG unutar KT grupe pre i posle terapije; b) promena vrednosti IMN, IZK, ILZ, DS i NPE unutar KT grupe pre i posle terapije. *Wilcoxon test*; \*\*\* $p < 0,001$ ; Y osa izražava vrednosti parodontoloških indeksa koji se nalaze na X osi na obe slike. KT grupa (pacijenti koji su tretirani samo konzervativnom terapijom). Plak indeks (PI); Gingivalni indeks (GI); Indeks krvarenja gingive (IKG); Indeks mekih naslaga (IMN); Indeks zubnog kamenca (IZK); Indeks labavljanja zuba (ILZ); Dubina sondiranja (DS); Nivo pripojnog epitela (NPE).



## 4.2.2 Analitička statistika parametara redoks statusa unutar eksperimentalnih grupa

### 4.2.2.1 Analiza promena vrednosti markera redoks statusa (oksidativnih i antioksidativnih), unutar eksperimentalnih grupa (KT+HH i KT) pre i posle terapije

Tabela 12 prikazuje promene vrednosti markera redoks statusa (oksidativnih i antioksidativnih), unutar grupa (KT+HH i KT) pre i posle terapije. U KT+HH grupi došlo je do visoko statistički značajnog smanjenja vrednosti za MDA ( $p < 0,001$ ), dok je za aktivnost SOD na granici statističke značajnosti u istoj grupi ( $p = 0,05$ ). U KT grupi ispitanika, došlo je do visoko statistički značajnog smanjenja koncentracija MDA i 8-OHdG ( $p < 0,001$ ), dok je za MK uočeno statistički značajno povećanje vrednosti u istoj grupi posle terapije ( $p = 0,003$ ). Kod ostalih parametara nije došlo do statistički značajnog smanjenja posle primenjene terapije.

**Tabela 12.** Prikaz promena vrednosti markera redoks statusa (oksidativnih i antioksidativnih), unutar eksperimentalnih grupa (KT+HH i KT) pre i posle terapije.

Markeri redoks statusa	KT+HH grupa			KT grupa		
	pre	posle	p	pre	posle	p
MDA ( $\mu\text{mol/l}$ )	11,212	4,512	<b>&lt; 0,001***</b>	11,794	5,41	<b>&lt; 0,001***</b>
8-OHdG (ng/ml)	32,733	29,479	0,557	60,982	22,05	<b>&lt; 0,001***</b>
SOD (U/ml)	0,853	0,651	0,05	0,755	0,549	0,930
GPx (U/l)	5,452	4,553	0,477	7,252	6,900	0,970
TAS ( $\mu\text{mol/l}$ )	0,606	0,569	0,627	0,609	0,656	0,204
MK ( $\mu\text{mol/l}$ )	151,35	141,9	0,852	58,253	125,60	<b>0,003**</b>

*Wilcoxon test*; statistička značajnost je boldirana; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; KT+HH grupa (pacijenti koji su tretirani konzervativnom terapijom i hlorheksidin-diglukonatom); KT grupa (pacijenti koji su tretirani samo konzervativnom terapijom). Malondialdehid (MDA); 8-hidroksi-2-deoksiguanozin (8-OHdG); Superoksid dismutaza (SOD); Glutation peroksidaza (GPx); Totalni antioksidativni status (TAS); Mokraćna kiselina (MK).

### 4.2.3 Analitička statistika biohemijskih parametara unutar eksperimentalnih grupa

#### 4.2.3.1 Analiza promena vrednosti biohemijskih parametara unutar eksperimentalnih grupa (KT+HH i KT) pre i posle terapije

U KT+HH grupi uočena su značajna smanjenja vrednosti biohemijskih parametara ALT, ALP i GGT ( $p = 0,014$ ,  $p = 0,003$ ;  $p = 0,013$ ), nakon primenjene terapije. U KT grupi ispitanika nisu uočene značajne promene vrednosti ni za jedan biohemijski parametar nakon primenjene terapije (Tabela 13).

**Tabela 13. Prikaz promena vrednosti biohemijskih parametara unutar grupa (KT+HH i KT) pre i posle terapije.**

Biohemijski parametri	KT+HH grupa			KT grupa		
	Pre	Posle	p	Pre	Posle	p
AST (U/l)	0,30	0,75	0,056	0,65	0,95	0,057
ALT (U/l)	0,35	0,05	<b>0,014*</b>	0,65	0,21	0,142
ALP (U/l)	2,25	1,65	<b>0,003**</b>	1,80	1,95	0,317
GGT (U/l)	0,70	0,10	<b>0,013*</b>	0,35	0,32	0,796
LDH (U/l)	2,60	2,50	0,725	3,20	2,74	0,131
CK (U/l)	0,74	0,90	0,593	1,10	1,41	0,204

*Wilcoxon test*; statistička značajnost je boldirana; \* $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; KT+HH grupa (pacijenti koji su tretirani konzervativnom terapijom i hlorheksidin-diglukonatom); KT grupa (pacijenti koji su tretirani samo konzervativnom terapijom). Aspartat aminotransferaza (AST); Alanin aminotransferaza (ALT); Alkalna fosfataza (ALP); Gama glutamil transferaza (GGT); Laktat dehidrogenaza (LDH); Kreatin kinaza (CK).

#### 4.2.4 Analitička statistika mikrobioloških parametara unutar eksperimentalnih grupa

##### 4.2.4.1 Analiza promene incidence periopatogenih mikroorganizama unutar eksperimentalnih grupa, pre i posle terapije

U Tabeli 14 su prikazane promene u distribuciji periopatogenih mikroorganizama izolovanih iz subgingivalnog dentalnog plaka (*P. gingivalis*, *T. denticola*, *E. corrodens*, *T. forsythia* i *A. actinomycetemcomitans*) pre terapije i dva meseca nakon primenjene terapije kod obe grupe ispitanika. Istraživanjem je ustanovljeno da se incidenca mikroorganizama smanjila prateći oba protokola lečenja, ali bez dostizanja statistički značajne razlike u grupi koja je bila tretirana samo konzervativnom terapijom. Međutim, u grupi ispitanika koji su pored konzervativne terapije primenjivali i hlorheksidin-diglukonat, od pet analiziranih bakterijskih vrsta, dve su pokazale statistički značajno smanjenje incidence nakon tretmana: *T. denticola* ( $p = 0,008$ ) i *T. forsythia* ( $p = 0,016$ ).

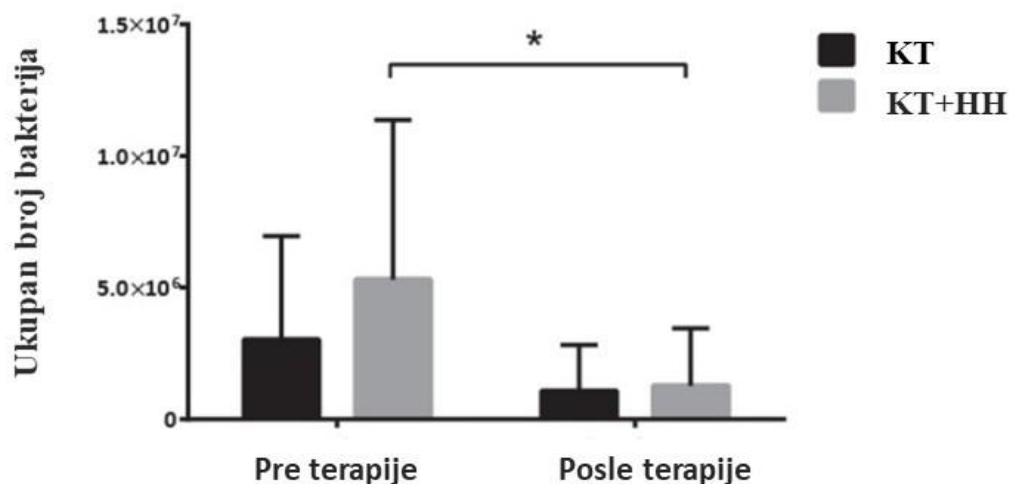
**Tabela 14.** Distributivne promene periopatogenih bakterija u subgingivalnom dentalnom plaku unutar grupa (KT+HH i KT), pre i posle terapije.

Bakterijski sojevi	Grupe	Pre terapije	Posle terapije	p vrednost
		n* (%)	n* (%)	
<i>P. gingivalis</i>	KT	19 (100%)	16 (84,2%)	0,251
	KT+HH	18 (94,7%)	17 (89,5%)	1
<i>T. denticola</i>	KT	8 (42,1%)	4 (21,1%)	0,289
	KT+HH	12 (63,2%)	3 (15,8%)	<b>0,008**</b>
<i>E. corrodens</i>	KT	16 (84,2%)	13 (68,4%)	0,250
	KT+HH	18 (94,7%)	16 (84,2%)	1
<i>T. forsythia</i>	KT	16 (84,2%)	9 (47,4%)	0,650
	KT+HH	19 (100%)	11 (57,9%)	<b>0,016*</b>
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	KT	18 (94,7%)	15 (78,9%)	0,375
	KT+HH	15 (78,9%)	13 (68,4%)	1

*McNemar Test*; \*n (%) - broj, odnosno procenat pozitivnih uzoraka; statistička značajnost je boldirana; \* $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; KT+HH grupa (pacijenti koji su tretirani konzervativnom terapijom i hlorheksidin diglukonom); KT grupa (pacijenti koji su tretirani samo konzervativnom terapijom). *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*); *Treponema denticola* (*T. denticola*); *Eikenella corrodens* (*E. corrodens*); *Tannerella forsythia* (*T. forsythia*); *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A. actinomycetemcomitans*).

#### 4.2.4.2 Kvantifikacija mikroorganizama unutar eksperimentalnih grupa

U grupi ispitanika koji su pored konzervativne terapije primenjivali i hlorheksidin-diglukonat primećeno je da je dva meseca posle terapije došlo do značajnog smanjenja ukupnog broja ispitivanih mikroorganizama (sa  $5,30 \times 10^6 \pm 6,06 \times 10^6$  na  $1,28 \times 10^6 \pm 2,18 \times 10^6$ ,  $p = 0,002$ ), dok to nije bio slučaj u grupi ispitanika koji su bili podvrgnuti samo konzervativnoj terapiji (od  $3,02 \times 10^6 \pm 3,94 \times 10^6$  do  $1,07 \times 10^6 \pm 1,74 \times 10^6$ ,  $p = 0,094$ ) (Slika 9).



**Slika 9.** Prevalenca mikroorganizama predstavljena je kao ukupan broj bakterija, pre terapije i dva meseca nakon završetka terapije u eksperimentalnim grupama (KT i KT+HH). KT+HH grupa (pacijenti koji su tretirani konzervativnom terapijom i hlorheksidin-diglukonomatom); KT grupa (pacijenti koji su tretirani samo konzervativnom terapijom); *Wilcoxon test*.

#### 4.2.5 Analitička statistika parametara redoks statusa između eksperimentalnih grupa pre i posle terapije

Istraživanjem je ustanovljeno statistički značajno smanjenje koncentracije 8-OHdG u salivi ispitanika u KT grupi posle terapije ( $p = 0,022$ ). Takođe, došlo je do statistički značajnog smanjenja aktivnosti GPx u salivi ispitanika koji su pripadali KT+HH grupi posle terapije ( $p = 0,024$ ) (Tabela 15).

**Tabela 15.** Prikaz promena vrednosti markera redoks statusa između eksperimentalnih grupa pre i posle terapije.

Markeri redoks statusa	KT+HH grupa	KT grupa	p vrednost	KT+HH grupa	KT grupa	p vrednost
	Pre terapije			Posle terapije		
MDA ( $\mu\text{mol/l}$ )	11,212	11,794	0,501	4,512	5,412	0,103
<b>8-OHdG</b> (ng/ml)	32,733	60,982	<b>0,001**</b>	29,479	22,05	<b>0,022*</b>
SOD (U/ml)	0,853	0,755	0,369	0,651	0,549	0,640
GPx (U/l)	5,45	7,25	0,211	4,551	6,901	<b>0,024*</b>
TAS ( $\mu\text{mol/l}$ )	0,606	0,609	1,000	0,569	0,656	0,056
MK ( $\mu\text{mol/l}$ )	151,35	58,2	<b>&lt; 0,001***</b>	141,9	125,60	0,341

*Mann-Whitney U test*; statistička značajnost je boldirana; \* $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; KT+HH grupa (pacijenti koji su tretirani konzervativnom terapijom i hlorheksidin-diglukonatom); KT grupa (pacijenti koji su tretirani samo konzervativnom terapijom). Malondialdehid (MDA); 8-hidroksi-2-deoksiguanozin (8-OHdG); Superoksid dismutaza (SOD); Glutation peroksidaza (GPx); Totalni antioksidativni status (TAS); Mokraćna kiselina (MK).

#### 4.2.6 Analiza promena vrednosti kliničkih parametara između eksperimentalnih grupa posle terapije

Analizom je ustanovljena statistički značajno smanjenje plak indeksa, gingivalnog indeksa i indeksa mekih naslaga kod obe grupe ispitanika posle primenjene terapije (za PI: u obe grupe  $p = 0,000$ ; za GI: u KT+HH grupi  $p = 0,010$ ; u KT grupi  $p = 0,003$ ; za IMN: u KT+HH grupi  $p = 0,000$ ; u KT grupi  $p = 0,005$ ). Daljom analizom, potvrđeno je da su se vrednosti za indeks krvarenja gingive kao i indeks labavljanja zuba značajno smanjili samo u KT grupi posle terapije (za oba indeksa  $p = 0,000$ ). Istraživanjem nisu uočene značajne promene u vrednostima ostalih parodontalnih indeksa, odnosno kliničkih parametara posle terapije ni u jednoj eksperimentalnoj grupi (Tabela 16).

**Tabela 16.** Prikaz promena vrednosti kliničkih parametara između eksperimentalnih grupa (KT+HH i KT) posle terapije.

Klinički parametri	KT+HH grupa	KT grupa
<b>PI</b>		
r	1,000	1,000
<b>p vrednost</b>	<b>0,000*</b>	<b>0,000*</b>
<b>GI</b>		
r	0,559	0,622
<b>p vrednost</b>	<b>0,010*</b>	<b>0,003*</b>
<b>IKG</b>		
r	0,357	0,826
<b>p vrednost</b>	0,122	<b>0,000*</b>
<b>IMN</b>		
r	0,752	0,601
<b>p vrednost</b>	<b>0,000*</b>	<b>0,005*</b>
<b>IZK</b>		
r	0,188	0,037
<b>p vrednost</b>	0,427	0,878
<b>ILZ</b>		
r	0,442	0,796
<b>p vrednost</b>	0,051	<b>0,000*</b>
<b>DS (mm)</b>		
r	0,016	0,195
<b>p vrednost</b>	0,947	0,410
<b>NPE (mm)</b>		
r	0,252	0,294
<b>p vrednost</b>	0,284	0,208

*Mann-Whitney U test*; statistička značajnost je boldirana; r- koeficijent korelacije; \* $p < 0,05$ . KT+HH grupa (pacijenti koji su tretirani konzervativnom terapijom i hlorheksidin-diglukonatom); KT grupa (pacijenti koji su tretirani samo konzervativnom terapijom). Plak indeks (PI); Gingivalni indeks (GI); Indeks krvarenja gingive (IKG); Indeks mekih naslaga (IMN); Indeks zubnog kamenca (IZK); Indeks labavljanja zuba (ILZ); Dubina sondiranja (DS); Nivo pripojnog epitela (NPE).

#### 4.2.7 Analiza promena vrednosti markera redoks statusa između eksperimentalnih grupa posle terapije

Analizom je uočeno da je došlo do statistički značajnog smanjenja koncentracije 8-OHdG kod KT grupe posle primenjene terapije ( $p = 0,022$ ). Nadalje, istraživanjem je ustanovljeno i potvrđeno da se aktivnost GPx statistički značajno smanjila posle primenjene terapije u KT+HH grupi ispitanika ( $p = 0,024$ ). Zatim, daljim istraživanjem je uočeno da se koncentracija MK značajno smanjila u grupi ispitanika koji su pored konzervativne terapije koristili i hlorheksidin-diglukonat ( $p = 0,000$ ). Istraživanjem nisu uočene značajne promene u koncentraciji MDA kao ni u aktivnosti SOD i TAS, ni u jednoj eksperimentalnoj grupi posle primenjene terapije (Tabela 17).

**Tabela 17.** Prikaz promena vrednosti markera redoks statusa između grupa (KT+HH i KT) posle terapije.

Markeri redoks statusa	KT+HH grupa	KT grupa
<b>MDA</b> ( $\mu\text{mol/l}$ )		
<b>r</b>	0,496	0,099
<b>p vrednost</b>	0,501	0,103
<b>8-OHdG</b> (ng/ml)		
<b>r</b>	0,001	0,023
<b>p vrednost</b>	0,091	<b>0,022*</b>
<b>SOD</b> (U/ml)		
<b>r</b>	0,365	0,636
<b>p vrednost</b>	0,369	0,640
<b>GPx</b> (U/l)		
<b>r</b>	0,206	0,024
<b>p vrednost</b>	<b>0,024*</b>	0,211
<b>TAS</b> ( $\mu\text{mol/l}$ )		
<b>r</b>	1,000	0,056
<b>p vrednost</b>	1,000	0,056
<b>MK</b> ( $\mu\text{mol/l}$ )		
<b>r</b>	<b>0,000</b>	0,330
<b>p vrednost</b>	<b>0,000*</b>	0,341

*Mann-Whitney U test*; statistička značajnost je boldirana; r- koeficijent korelacije; \* $p < 0,05$ . KT+HH grupa (pacijenti koji su tretirani konzervativnom terapijom i hlorheksidin-diglukonom); KT grupa (pacijenti koji su tretirani samo konzervativnom terapijom). Malondialdehid (MDA); 8-hidroksi-2-deoksiguanozin (8-OHdG); Superoksid dismutaza (SOD); Glutation peroksidaza (GPx); Totalni antioksidativni status (TAS); Mokraćna kiselina (MK).

#### 4.2.8 Analiza promena vrednosti biohemijskih parametara između eksperimentalnih grupa posle terapije

Tabela 18 prikazuje promene vrednosti biohemijskih parametara posle primenjene terapije između obe grupe pacijenata. Istraživanjem je uočeno statistički značajno povećanje vrednosti enzima AST u grupi pacijenata koji su pored konzervativne terapije koristili i hlorheksidin-diglukonat, što nije slučaj i kod pacijenata kod kojih je bila primenjena samo konzervativna terapija ( $p = 0,040$ ). Istraživanjem nisu uočene značajne promene vrednosti alanin aminotransferaze, alkalne fosfataze, gama glutamil transferaze, laktat dehidrogenaze kao i kreatin kinaze, posle primenjene terapije ni u jednoj eksperimentalnoj grupi pacijenata.

**Tabela 18.** Prikaz promena vrednosti biohemijskih parametara između grupa (KT+HH i KT) posle terapije.

Biohemijski parametri	KT+HH grupa	KT grupa
<b>AST (U/l)</b>		
<b>r</b>	0,028	0,228
<b>p vrednost</b>	<b>0,040*</b>	0,283
<b>ALT (U/l)</b>		
<b>r</b>	0,035	0,340
<b>p vrednost</b>	0,165	0,461
<b>ALP (U/l)</b>		
<b>r</b>	0,000	0,023
<b>p vrednost</b>	0,056	0,113
<b>GGT (U/l)</b>		
<b>r</b>	0,167	0,529
<b>p vrednost</b>	0,231	0,728
<b>LDH (U/l)</b>		
<b>r</b>	0,065	0,703
<b>p vrednost</b>	0,076	0,728
<b>CK (U/l)</b>		
<b>r</b>	0,045	0,091
<b>p vrednost</b>	0,070	0,107

*Mann-Whitney U test*; statistička značajnost je boldirana; r- koeficijent korelacije; \* $p < 0,05$ . KT+HH grupa (pacijenti koji su tretirani konzervativnom terapijom i hlorheksidin diglukonom); KT grupa (pacijenti koji su tretirani samo konzervativnom terapijom). Aspartat aminotransferaza (AST); Alanin aminotransferaza (ALT); Alkalna fosfataza (ALP); Gama glutamil transferaza (GGT); Laktat dehidrogenaza (LDH); Kreatin kinaza (CK).



#### 4.2.9 Analiza promena distribucije periopatogenih bakterija između grupa posle terapije

Analiza promena distribucije periopatogenih sojeva posle terapije između obe eksperimentalne grupe prikazana je u Tabeli 19. Statističkom analizom je ustanovljeno da se distribucija bakterijskih sojeva *T. denticola* i *T. forsythia* značajno smanjila samo u grupi pacijenata koji su primenjivali HH uz konzervativnu terapiju (za *T. denticola*  $p = 0,041$ ; za *T. forsythia*  $p = 0,035$ ). Istraživanjem nisu uočene značajne promene u distribuciji, odnosno nije uočeno statistički značajno smanjenje preostalih ispitivanih bakterijskih sojeva posle terapije između eksperimentalnih grupa.

**Tabela 19.** Prikaz promena distribucije periopatogenih bakterija između grupa (KT+HH i KT) posle terapije.

Bakterijski sojevi	KT+HH grupa	KT grupa
<i>P. gingivalis</i>		
<b>r</b>	0,317	0,590
<b>p vrednost</b>	0,795	0,753
<i>T. denticola</i>		
<b>r</b>	0,200	1,000
<b>p vrednost</b>	<b>0,041*</b>	1,000
<i>E. corrodens</i>		
<b>r</b>	0,297	0,382
<b>p vrednost</b>	0,583	0,538
<i>T. forsythia</i>		
<b>r</b>	0,075	0,635
<b>p vrednost</b>	<b>0,035*</b>	0,685
<i>A. actinomycetemcomitans</i>		
<b>r</b>	0,271	0,463
<b>p vrednost</b>	0,558	0,584

*Mann-Whitney U test*; statistička značajnost je boldirana; r- koeficijent korelacije; \* $p < 0,05$ . KT+HH grupa (pacijenti koji su tretirani konzervativnom terapijom i hlorheksidin diglukonom); KT grupa (pacijenti koji su tretirani samo konzervativnom terapijom). *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*); *Treponema denticola* (*T. denticola*); *Eikenella corrodens* (*E. corrodens*); *Tannerella forsythia* (*T. forsythia*); *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A. actinomycetemcomitans*).

### 4.3 Korelacione analize

#### Korelacije kliničkih parametara sa markerima redoks statusa u KT+HH grupi pre terapije

U okviru ove doktorske disertacije uočeno je da postoji statistički značajna negativna korelacija između vrednosti NPE i koncentracije 8-OHdG u KT+HH grupi ispitanika pre terapije ( $r = 0,576$ ;  $p = 0,012$ ). Ostali klinički parametri nisu pokazali postojanje statistički značajnih korelacija sa drugim markerima redoks statusa pre terapije unutar KT+HH grupe (Tabela 20).

**Tabela 20.** Prikaz korelacija kliničkih parametara sa markerima redoks statusa u KT+HH grupi pre terapije.

Klinički parametri		Markeri redoks statusa				
		MDA ( $\mu\text{mol/l}$ )	8-OHdG (ng/ml)	SOD (U/ml)	GPx (U/l)	TAS ( $\mu\text{mol/l}$ )
<b>PI</b>	r	-0,181	-0,267	0,345	-0,122	0,086
	p vrednost	0,473	0,285	0,136	0,608	0,719
<b>GI</b>	r	-0,075	-0,080	0,105	0,191	0,035
	p vrednost	0,766	0,752	0,660	0,419	0,882
<b>IKG</b>	r	-0,005	-0,003	0,123	0,314	0,054
	p vrednost	0,984	0,992	0,605	0,177	0,821
<b>IMN</b>	r	-0,107	-0,444	0,355	0,085	-0,123
	p vrednost	0,672	0,065	0,124	0,723	0,606
<b>IZK</b>	r	-0,009	-0,443	0,033	-0,263	0,083
	p vrednost	0,970	0,066	0,892	0,262	0,727
<b>ILZ</b>	r	-0,003	0,236	0,244	0,084	0,109
	p vrednost	0,990	0,346	0,301	0,726	0,647
<b>DS (mm)</b>	r	0,424	-0,014	0,108	-0,203	-0,050
	p vrednost	0,079	0,956	0,650	0,390	0,834
<b>NPE (mm)</b>	r	-0,038	-0,576**	0,226	0,014	-0,156
	p vrednost	0,880	<b>0,012</b>	0,339	0,953	0,512

*Pearson Correlation*; statistička značajnost je boldirana; r- koeficijent korelacije;  $p < 0,05$ ; \*pozitivna korelacija; \*\* negativna korelacija. KT+HH grupa (pacijenti koji su tretirani konzervativnom terapijom i hlorheksidin-diglukonatom). Malondialdehid (MDA); 8-hidroksi-2-deoksiguanozin (8-OHdG); Superoksid dismutaza (SOD); Glutation peroksidaza (GPx); Totalni antioksidativni status (TAS); Plak indeks (PI) Gingivalni indeks (GI); Indeks krvarenja gingive (IKG); Indeks mekih naslaga (IMN); Indeks zubnog kamenca (IZK); Indeks labavljanja zuba (ILZ); Dubina sondiranja (DS); Nivo pripojnog epitela (NPE).

## Korelacija kliničkih parametara sa markerima redoks statusa u KT+HH grupi posle terapije

Ustanovljeno je postojanje statistički značajne negativne korelacije između vrednosti GI sa koncentracijom MDA ( $r = -0,495$ ,  $p = 0,043$ ), kao i između vrednosti IZK i aktivnosti SOD ( $r = 0,665$ ,  $p = 0,001$ ) u KT+HH grupi pacijenata, posle terapije. Nadalje, istraživanjem je ustanovljeno postojanje statistički značajne pozitivne korelacije između vrednosti IZK i koncentracije MDA ( $r = 0,489$ ,  $p = 0,046$ ), kao i između vrednosti ILZ i aktivnosti GPx ( $r = 0,503$ ,  $p = 0,024$ ) u KT+HH grupi, posle terapije. Ostali klinički parametri nisu pokazali postojanje statistički značajnih korelacija sa markerima redoks statusa posle terapije u KT+HH grupi ispitanika (Tabela 21).

**Tabela 21.** Prikaz korelacija kliničkih parametara sa markerima redoks statusa u KT+HH grupi posle terapije.

Klinički parametri		Markeri redoks statusa				
		MDA ( $\mu\text{mol/l}$ )	8-OHdG (ng/ml)	SOD (U/ml)	GPx (U/l)	TAS ( $\mu\text{mol/l}$ )
<b>PI</b>	r	-0,174	0,287	0,283	0,085	-0,138
	p vrednost	0,504	0,248	0,227	0,723	0,561
<b>GI</b>	r	<b>-0,495**</b>	0,067	0,257	-0,131	0,147
	p vrednost	<b>0,043</b>	0,793	0,273	0,582	0,535
<b>IKG</b>	r	-0,223	0,365	0,050	0,412	0,223
	p vrednost	0,390	0,136	0,835	0,071	0,345
<b>IMN</b>	r	-0,167	0,080	0,027	0,081	-0,002
	p vrednost	0,521	0,752	0,912	0,733	0,995
<b>IZK</b>	r	<b>0,489*</b>	0,133	<b>-0,665**</b>	0,115	-0,019
	p vrednost	<b>0,046</b>	0,598	<b>0,001</b>	0,629	0,935
<b>ILZ</b>	r	0,442	0,465	-0,223	<b>0,503*</b>	-0,089
	p vrednost	0,075	0,052	0,344	<b>0,024</b>	0,708
<b>DS (mm)</b>	r	-0,179	0,044	0,294	0,082	-0,134
	p vrednost	0,492	0,863	0,209	0,732	0,574
<b>NPE (mm)</b>	r	-0,117	0,294	-0,107	-0,017	0,296
	p vrednost	0,656	0,236	0,655	0,945	0,204

*Pearson Correlation*; statistička značajnost je boldirana; r- koeficijent korelacije;  $p < 0,05$ ; \*pozitivna korelacija; \*\* negativna korelacija. KT+HH grupa (pacijenti koji su tretirani konzervativnom terapijom i hlorheksidin-diglukonatom). Malondialdehid (MDA); 8-hidroksi-2-deoksiguanozin (8-OHdG); Superoksid dismutaza (SOD); Glutation peroksidaza (GPx); Totalni antioksidativni status (TAS); Plak indeks (PI) Gingivalni indeks (GI); Indeks krvarenja gingive (IKG); Indeks mekih naslaga (IMN); Indeks zubnog kamenca (IZK); Indeks labavljanja zuba (ILZ); Dubina sondiranja (DS); Nivo pripojnog epitela (NPE).

## Korelacije kliničkih parametara sa markerima redoks statusa u KT grupi pre terapije

Potvrđena je statistički značajna pozitivna korelacija između vrednosti ILZ i aktivnosti GPx u KT grupi pre terapije ( $r = 0,444$ ,  $p = 0,050$ ). Uočena je još jedna statistički značajna pozitivna korelacija između vrednosti DS i TAS salive u KT grupi pre terapije ( $r = 0,444$ ,  $p = 0,022$ ). Ostali klinički parametri nisu pokazali statistički značajne korelacije sa markerima redoks statusa pre terapije u KT grupi ispitanika (Tabela 22).

**Tabela 22.** Prikaz korelacija kliničkih parametara sa markerima redoks statusa u KT grupi pre terapije.

Klinički parametri	Markeri redoks statusa				
	MDA ( $\mu\text{mol/l}$ )	8-OHdG ( $\text{ng/ml}$ )	SOD (U/ml)	GPx (U/l)	TAS ( $\mu\text{mol/l}$ )
<b>PI</b>	0,415	0,156	-0,400	-0,004	0,338
r					
p vrednost	0,087	0,550	0,080	0,985	0,145
<b>GI</b>					
r	0,159	-0,354	-0,285	0,105	0,061
p vrednost	0,530	0,163	0,223	0,659	0,797
<b>IKG</b>					
r	0,433	-0,161	-0,212	-0,152	0,148
p vrednost	0,073	0,537	0,370	0,523	0,534
<b>IMN</b>					
r	0,197	0,040	-0,114	-0,089	0,195
p vrednost	0,433	0,879	0,631	0,710	0,409
<b>IZK</b>					
r	0,181	0,135	-0,288	-0,367	0,046
p vrednost	0,473	0,605	0,218	0,112	0,848
<b>ILZ</b>					
r	0,086	0,326	0,112	<b>0,444*</b>	0,334
p vrednost	0,733	0,202	0,640	<b>0,050</b>	0,150
<b>DS (mm)</b>					
r	0,150	0,346	-0,318	0,127	<b>0,444*</b>
p vrednost	0,553	0,174	0,172	0,595	<b>0,022</b>
<b>NPE (mm)</b>					
r	0,196	0,072	0,007	0,051	0,366
p vrednost	0,436	0,783	0,975	0,833	0,113

*Pearson Correlation*; statistička značajnost je boldirana; r- koeficijent korelacije;  $p < 0,05$ ; \*pozitivna korelacija; \*\* negativna korelacija. KT grupa (pacijenti koji su tretirani samo konzervativnom terapijom). Malondialdehid (MDA); 8-hidroksi-2-deoksiguanozin (8-OHdG); Superoksid dismutaza (SOD); Glutation peroksidaza (GPx); Totalni antioksidativni status (TAS); Plak indeks (PI) Gingivalni indeks (GI); Indeks krvarenja gingive (IKG); Indeks mekih naslaga (IMN); Indeks zubnog kamenca (IZK); Indeks labavljanja zuba (ILZ); Dubina sondiranja (DS); Nivo pripojnog epitela (NPE).

## Korelacije kliničkih parametara sa markerima redoks statusa u KT grupi posle terapije

Ustanovljeno je postojanje statistički značajne pozitivne korelacije između vrednosti ILZ i aktivnosti GPx, kao i između istog indeksa i TAS salive u KT grupi posle terapije ( $r = 0,472$ ,  $p = 0,036$ ;  $r = 0,530$ ,  $p = 0,016$ ). Ostali klinički parametri nisu pokazali statistički značajne korelacije sa markerima redoks statusa posle terapije u KT grupi ispitanika (Tabela 23).

**Tabela 23.** Prikaz korelacija kliničkih parametara sa markerima redoks statusa u KT grupi posle terapije.

Klinički parametri	Markeri oksidativnog statusa				
	MDA ( $\mu\text{mol/l}$ )	8-OHdG (ng/ml)	SOD (U/ml)	GPx (U/l)	TAS ( $\mu\text{mol/l}$ )
<b>PI</b>					
r	0,001	0,283	0,036	0,333	0,174
p vrednost	0,996	0,255	0,879	0,151	0,462
<b>GI</b>					
r	0,112	0,324	0,098	-0,082	-0,146
p vrednost	0,658	0,189	0,682	0,731	0,538
<b>IKG</b>					
r	0,000	0,158	0,090	0,101	0,071
p vrednost	0,999	0,531	0,705	0,672	0,767
<b>IMN</b>					
r	-0,222	-0,038	0,028	0,057	0,123
p vrednost	0,376	0,883	0,907	0,811	0,604
<b>IZK</b>					
r	-0,160	-0,110	0,271	-0,223	-0,090
p vrednost	0,525	0,664	0,248	0,345	0,706
<b>ILZ</b>					
r	-0,103	-0,118	-0,311	<b>0,472*</b>	<b>0,530*</b>
p vrednost	0,683	0,642	0,181	<b>0,036</b>	<b>0,016</b>
<b>DS (mm)</b>					
r	0,169	0,343	0,009	-0,029	-0,328
p vrednost	0,502	0,164	0,971	0,902	0,158
<b>NPE (mm)</b>					
r	0,119	0,183	0,030	0,072	0,176
p vrednost	0,639	0,466	0,900	0,763	0,458

*Pearson Correlation*; statistička značajnost je boldirana; r- koeficijent korelacije;  $p < 0,05$ ; \*pozitivna korelacija; \*\* negativna korelacija. KT grupa (pacijenti koji su tretirani samo konzervativnom terapijom). Malondialdehid (MDA); 8-hidroksi-2-deoksiguanozin (8-OHdG); Superoksid dismutaza (SOD); Glutation peroksidaza (GPx); Totalni antioksidativni status(TAS); Plak indeks (PI) Gingivalni indeks (GI); Indeks krvarenja gingive (IKG); Indeks mekih naslaga (IMN); Indeks zubnog kamena (IZK); Indeks labavljanja zuba (ILZ); Dubina sondiranja (DS); Nivo pripojnog epitela (NPE).

## Korelacije kliničkih i biohemijskih parametara u grupi KT+HH pre primene terapije

Korelacionom analizom, ustanovljeno je postojanje statistički značajne negativne korelacije između vrednosti IMN i CK pre terapije u KT+HH grupi ispitanika ( $r = -0,526$ ,  $p = 0,017$ ). Dalje, korelacionom analizom je utvrđena statistički značajna pozitivna korelacija između vrednosti DS i aktivnosti enzima LDH u KT+HH grupi pre terapije ( $r = 0,513$ ,  $p = 0,021$ ). Ostali klinički parametri nisu pokazali statistički značajne korelacije sa preostalim biohemijskim parametrima u istoj grupi pre primene terapije (Tabela 24).

**Tabela 24.** Prikaz kliničkih i biohemijskih parametara u grupi KT+HH pre primene terapije.

Klinički parametri	Biohemijski parametri					
	AST (U/l)	ALT (U/l)	ALP (U/l)	GGT (U/l)	LDH (U/l)	CK (U/l)
<b>PI</b>						
r	0,247	0,001	-0,119	0,133	-0,158	-0,238
p vrednost	0,293	0,997	0,617	0,576	0,505	0,311
<b>GI</b>						
r	0,289	-0,200	0,028	-0,020	0,150	-0,291
p vrednost	0,216	0,398	0,908	0,934	0,527	0,213
<b>IKG</b>						
r	0,106	-0,014	0,160	0,168	0,049	-0,154
p vrednost	0,658	0,953	0,501	0,480	0,836	0,517
<b>IMN</b>						
r	0,166	-0,278	-0,280	-0,219	0,052	<b>0,526**</b>
p vrednost	0,485	0,236	0,232	0,354	0,828	<b>0,017</b>
<b>IZK</b>						
r	0,016	-0,170	-0,329	0,211	-0,049	-0,037
p vrednost	0,946	0,478	0,157	0,372	0,837	0,876
<b>ILZ</b>						
r	-0,178	0,156	0,282	0,274	0,075	-0,184
p vrednost	0,452	0,511	0,908	0,243	0,754	0,436
<b>DS (mm)</b>						
r	-0,294	-0,163	-0,259	-0,305	<b>0,513*</b>	-0,341
p vrednost	0,209	0,493	0,270	0,191	<b>0,021</b>	0,141
<b>NPE (mm)</b>						
r	-0,065	-0,08,	-0,422	0,150	0,120	-0,259
p vrednost	0,786	0,735	0,063	0,528	0,613	0,270

Statistička značajnost je boldirana; r- koeficijent korelacije;  $p < 0,05$ ; \*pozitivna korelacija; \*\* negativna korelacija. KT+HH grupa (pacijenti koji su tretirani konzervativnom terapijom i hlorheksidin-diglukonatom). Plak indeks (PI); Gingivalni indeks (GI); Indeks krvarenja gingive (IKG); Indeks mekih naslaga (IMN); Indeks zubnog kamenca (IZK); Indeks labavljanja zuba (ILZ); Dubina sondiranja (DS); Nivo pripojnog epitela (NPE); Aspartat aminotransferaza (AST); Alanin aminotransferaza (ALT); Alkalna fosfataza (ALP); Gama glutamil transferaza (GGT); Laktat dehidrogenaza (LDH); Kreatin kinaza (CK).

## **Korelacije kliničkih i biohemijskih parametara u grupi KT+HH posle primene terapije**

Analizom korelacija utvrđeno je postojanje statistički značajne negativne korelacije između vrednosti GI i CK posle primenjene terapije u KT+HH grupi ispitanika ( $r = -0,464$ ,  $p = 0,039$ ). Daljom analizom, ustanovljene su i statistički značajne negativne korelacije između vrednosti DS i GGT, kao i između DS i CK u istoj grupi ispitanika posle terapije ( $r = -0,601$ ,  $p = 0,005$ ;  $r = -0,487$ ,  $p = 0,030$ ). Vrednost DS je pokazala statističku značajnost u vidu pozitivne korelacije sa LDH ( $r = 0,574$ ,  $p = 0,008$ ) u KT+HH grupi ispitanika posle terapije. Statistički značajna negativna korelacija je ustanovljena za vrednost NPE i ALP u istoj grupi posle terapije ( $r = 0,442$ ,  $p = 0,051$ ). Ostali klinički parametri nisu pokazali statistički značajne korelacije sa preostalim biohemijskim parametrima posle primenjenje terapije u KT+HH grupi ispitanika (Tabela 25).

**Tabela 25.** Prikaz korelacija kliničkih i biohemijskih parametara u grupi KT+HH posle primene terapije.

Klinički parametri	Biohemijski parametri						
		AST (U/l)	ALT (U/l)	ALP (U/l)	GGT (U/l)	LDH (U/l)	CK (U/l)
<b>PI</b>	r	0,112	0,024	- 0,037	0,098	-0,141	-0,257
	p	0,639	0,919	0,876	0,682	0,553	0,274
<b>GI</b>	r	0,205	-0,158	-0,022	-0,253	0,153	<b>-0,464**</b>
	p	0,386	0,507	0,928	0,281	0,519	<b>0,039</b>
<b>IKG</b>	r	0,145	-0,171	0,092	-0,129	0,217	-0,250
	p	0,543	0,471	0,698	0,589	0,358	0,287
<b>IMN</b>	r	0,339	0,139	0,150	0,014	-0,164	-0,288
	p	0,143	0,559	0,528	0,952	0,489	0,219
<b>IZK</b>	r	0,106	0,025	-0,098	0,382	0,035	-0,130
	p	0,656	0,917	0,680	0,096	0,883	0,586
<b>ILZ</b>	r	-0,323	0,246	-0,059	0,252	0,048	-0,186
	p	0,165	0,295	0,805	0,284	0,841	0,433
<b>DS (mm)</b>	r	- 0,121	-0,278	-0,069	<b>-0,601**</b>	<b>0,574*</b>	<b>-0,487**</b>
	p	0,610	0,235	0,772	<b>0,005</b>	<b>0,008</b>	<b>0,030</b>
<b>NPE (mm)</b>	r	- 0,044	-0,051	<b>-0,442**</b>	0,058	0,217	-0,401
	p	0,853	0,832	<b>0,051</b>	0,809	0,359	0,080

Statistička značajnost je boldirana; r- koeficijent korelacije;  $p < 0,05$ ; \*pozitivna korelacija; \*\* negativna korelacija. KT+HH grupa (pacijenti koji su tretirani konzervativnom terapijom i hlorheksidin-diglukonatom). Plak indeks (PI); Gingivalni indeks (GI); Indeks krvarenja gingive (IKG); Indeks mekih naslaga (IMN); Indeks zubnog kamenca (IZK); Indeks labavljanja zuba (ILZ); Dubina sondiranja (DS); Nivo pripojnog epitela (NPE); Aspartat aminotransferaza (AST); Alanin aminotransferaza (ALT); Alkalna fosfataza (ALP); Gama glutamil transferaza (GGT); Laktat dehidrogenaza (LDH); Kreatin kinaza (CK).



## Korelacije kliničkih i biohemijskih parametara u KT grupi pre primene terapije

U okviru istraživanja ove doktorske disertacije, utvrđeno je postojanje statistički značajne pozitivne korelacije između vrednosti PI i AST, kao i između PI i enzima LDH pre primenjene terapije u KT grupi ispitanika ( $r = 0,047$ ,  $p = 0,034$ ;  $r = 0,516$ ,  $p = 0,020$ ). Daljom korelacionom analizom, utvrđeno je postojanje i statistički značajne negativne korelacije između vrednosti GI i CK ( $r = -0,559$ ,  $p = 0,007$ ), kao i statistički značajnih pozitivnih korelacija između istog indeksa i vrednosti enzima AST, ALP i GGT pre primenjene terapije u KT grupi ispitanika ( $r = 0,063$ ,  $p = 0,003$ ;  $r = 0,510$ ,  $p = 0,022$ ;  $r = 0,545$ ,  $p = 0,013$ ). Ustanovljene su i statistički značajne negativne korelacije između vrednosti ILZ, kao i enzima AST i GGT u KT grupi pre primenjene terapije ( $r = -0,500$ ,  $p = 0,025$ ;  $r = -0,575$ ,  $p = 0,008$ ). Ostali klinički parametri nisu pokazali statistički značajne korelacije sa preostalim biohemijskim parametrima u KT grupi pre primenjene terapije (Tabela 26).

**Tabela 26.** Prikaz korelacija kliničkih i biohemijskih parametara u KT grupi pre primene terapije

Klinički parametri	Biohemijski parametri					
	AST (U/l)	ALT (U/l)	ALP (U/l)	GGT (U/l)	LDH (U/l)	CK (U/l)
<b>PI</b>						
r	<b>0,047*</b>	-0,060	0,351	0,364	<b>0,516*</b>	-0,449
p vrednost	<b>0,034</b>	0,803	0,129	0,115	<b>0,020</b>	0,054
<b>GI</b>						
r	<b>0,063*</b>	-0,159	<b>0,510*</b>	<b>0,545*</b>	0,353	<b>-0,599**</b>
p vrednost	<b>0,003</b>	0,503	<b>0,022</b>	<b>0,013</b>	0,127	<b>0,007</b>
<b>IKG</b>						
r	0,159	0,219	0,336	0,221	0,165	-0,249
p vrednost	0,503	0,354	0,147	0,350	0,487	0,304
<b>IMN</b>						
r	0,028	0,080	0,361	0,025	0,362	-0,120
p vrednost	0,907	0,737	0,118	0,916	0,117	0,626
<b>IZK</b>						
r	0,001	0,282	0,345	-0,016	-0,034	0,066
p vrednost	0,997	0,228	0,136	0,946	0,887	0,789
<b>ILZ</b>						
r	<b>-0,500**</b>	0,159	-0,317	<b>-0,575**</b>	-0,164	0,400
p vrednost	<b>0,025</b>	0,503	0,173	<b>0,008</b>	0,489	0,090
<b>DS (mm)</b>						
r	-0,034	0,040	-0,004	-0,225	0,187	0,217
p vrednost	0,887	0,868	0,998	0,341	0,429	0,372
<b>NPE (mm)</b>						
r	0,177	0,139	0,315	0,103	0,274	-0,203
p vrednost	0,456	0,558	0,176	0,656	0,242	0,404

*Spearman's Correlation*; statistička značajnost je boldirana; r- koeficijent korelacije;  $p < 0,05$ ; \*pozitivna korelacija; \*\*negativna korelacija. KT grupa (pacijenti koji su tretirani samo konzervativnom terapijom). Plak indeks (PI) Gingivalni indeks (GI); Indeks krvarenja gingive (IKG); Indeks mekih naslaga (IMN); Indeks zubnog kamenca (IZK); Indeks labavljanja zuba (ILZ); Dubina sondiranja (DS); Nivo pripojnog epitela (NPE); Aspartat aminotransferaza (AST); Alanin aminotransferaza (ALT); Alkalna fosfataza (ALP); Gama glutamil transferaza (GGT); Laktat dehidrogenaza (LDH); Kreatin kinaza (CK).

## Korelacije kliničkih i biohemijskih parametara u KT grupi posle primene terapije

Analizom je utvrđeno postojanje statistički značajne pozitivne korelacije između vrednosti GI i enzima AST, GGT i LDH posle primenjene terapije u KT grupi ispitanika ( $r = 0,554, p = 0,011$ ;  $r = 0,492, p = 0,027$ ;  $r = 0,636, p = 0,003$ ). Nadalje, za isti indeks potvrđena je i statistički značajna negativna korelacija sa aktivnošću enzima CK ( $r = -0,613, p = 0,010$ ) u KT grupi ispitanika posle terapije. Vrednost IKG je u pozitivnoj korelaciji sa aktivnostima enzima ALP i LDH ( $r = 0,496, p = 0,016$ ;  $r = 0,595, p = 0,006$ ) dok je isti indeks u statistički značajnoj negativnoj korelaciji sa CK ( $r = -0,577, p = 0,010$ ) u KT grupi pacijenata posle terapije. Pozitivna korelacija je utvrđena i između vrednosti IMN i LDH u KT grupi posle terapije ( $r = 0,433, p = 0,056$ ). Takođe, ustanovljena je pozitivna korelacija između vrednosti IZK i ALT ( $r = 0,497, p = 0,026$ ) u istoj grupi posle terapije. Vrednost ILZ je u statistički značajnoj negativnoj korelaciji sa vrednostima enzima AST i GGT za pacijente u KT grupi posle primenjene terapije ( $r = -0,469, p = 0,037$ ;  $r = -0,543, p = 0,013$ ). Pozitivna korelacija je ustanovljena između vrednosti NPE i LDH za ispitanike u KT grupi posle terapije ( $r = 0,491, p = 0,028$ ). Ostali klinički parametri nisu pokazali značajne korelacije sa preostalim biohemijskim parametrima, posle terapije u KT grupi pacijenata (Tabela 27).

**Tabela 27.** Prikaz korelacija kliničkih i biohemijskih parametara u KT grupi posle primene terapije

Klinički parametri	Biohemijski parametri					
	AST (U/l)	ALT (U/l)	ALP (U/l)	GGT (U/l)	LDH (U/l)	CK (U/l)
<b>PI</b>						
r	0,246	0,179	0,323	0,213	0,260	-0,303
p vrednost	0,295	0,450	0,165	0,367	0,267	0,207
<b>GI</b>						
r	<b>0,554*</b>	0,060	0,411	<b>0,492*</b>	<b>0,636*</b>	<b>-0,613**</b>
p vrednost	<b>0,011</b>	0,803	0,072	<b>0,027</b>	<b>0,003</b>	<b>0,01</b>
<b>IKG</b>						
r	0,325	0,179	<b>0,496*</b>	0,377	<b>0,595</b>	<b>-0,577**</b>
p vrednost	0,163	0,450	<b>0,026</b>	0,101	<b>0,006</b>	<b>0,010</b>
<b>IMN</b>						
r	-0,044	0,203	0,136	-0,007	<b>0,433</b>	-0,294
p vrednost	0,855	0,390	0,588	0,976	<b>0,056</b>	0,223
<b>IZK</b>						
r	-0,076	<b>0,497*</b>	0,365	0,389	0,124	-0,035
p vrednost	0,750	<b>0,026</b>	0,114	0,090	0,604	0,888
<b>ILZ</b>						
r	<b>-0,469**</b>	0,179	-0,201	<b>-0,543**</b>	-0,100	0,405
p vrednost	<b>0,037</b>	0,450	0,396	<b>0,013</b>	0,676	0,085
<b>DS (mm)</b>						
r	0,382	-0,318	0,162	0,251	0,411	-0,194
p vrednost	0,097	0,171	0,494	0,286	0,072	0,426
<b>NPE (mm)</b>						
r	0,220	-0,179	0,123	0,156	<b>0,491*</b>	-0,270
p vrednost	0,351	0,450	0,605	0,512	<b>0,028</b>	0,264

*Spearman's Correlation*; statistička značajnost je boldirana; r- koeficijent korelacije;  $p < 0,05$ ; \*pozitivna korelacija; \*\*negativna korelacija. KT grupa (pacijenti koji su tretirani samo konzervativnom terapijom). Plak indeks (PI); Gingivalni indeks (GI); Indeks krvarenja gingive (IKG); Indeks mekih naslaga (IMN); Indeks zubnog kamenca (IZK); Indeks labavljanja zuba (ILZ); Dubina sondiranja (DS); Nivo pripojnog epitela (NPE); Aspartat aminotransferaza (AST); Alanin aminotransferaza (ALT); Alkalna fosfataza (ALP); Gama glutamil transferaza (GGT); Laktat dehidrogenaza (LDH); Kreatin kinaza (CK).

## Korelacije peripatogenih mikroorganizama između grupa (KT+HH i KT) pre terapije

Tabela 28 prikazuje distribuciju periopatogenih sojeva unutar grupa (KT+HH i KT) kao i korelaciju istoimenih sojeva između eksperimentalnih grupa pre terapije. Analizom je ustanovljeno da nije postojala statistički značajna razlika u broju pozitivnih uzoraka kod kojih je potvrđeno prisustvo ispitivanih bakterija između grupa (KT+HH i KT) pre primenjene terapije.

**Tabela 28.** Prikaz distribucije peripatogenih mikroorganizama unutar grupa i njihove korelacije između grupa (KT+HH i KT) pre terapije.

Bakterijski soj	KT+HH grupa	KT grupa	p vrednost
	ne/da	ne/da	
<i>P. gingivalis</i>	0/18	1/19	1,000
<i>T. denticola</i>	8/12	12/8	0,330
<i>E. corrodens</i>	2/18	4/16	0,597
<i>T. forsythia</i>	0/19	4/16	0,229
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	5/15	2/18	0,557

*Chi-square test*; ne/da - predstavlja broj uzoraka unutar grupe koji su negativni, tj. pozitivni na prisustvo bakterijskog soja; statistička značajnost je boldirana;  $p < 0,05$ . KT+HH grupa (pacijenti koji su tretirani konzervativnom terapijom i hlorheksidin-diglukonatom). KT grupa (pacijenti koji su tretirani samo konzervativnom terapijom). *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*); *Treponema denticola* (*T. denticola*); *Eikenella corrodens* (*E. corrodens*); *Tannerella forsythia* (*T. forsythia*); *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A. actinomycetemcomitans*).

## Korelacije peripatogenih mikroorganizama između grupa (KT+HH i KT) posle terapije

Tabela 29 prikazuje distribuciju periopatogenih sojeva unutar grupa (KT+HH i KT) kao i korelaciju istoimenih sojeva između eksperimentalnih grupa posle terapije. Analizom je ustanovljeno da je postojala statistički značajna razlika u broju pozitivnih uzoraka u smislu smanjene distribucije za sojeve *T. denticola* i *T. forsythia* u KT+HH posle primenjene terapije (za *T. denticola*  $p = 0,008$ ; za *T. forsythia*  $p = 0,016$ ). Ostali mikroorganizmi nisu pokazali značajno smanjenje distribucije između dve eksperimentalne grupe, dva meseca nakon primenjene terapije.

**Tabela 29.** Prikaz distribucije peripatogenih mikroorganizama unutar grupa i njihove korelacije između grupa (KT+HH i KT) posle terapije.

Bakterijski soj	KT+HH grupa	KT grupa	p vrednost
	ne/da	ne/da	
<i>P. gingivalis</i>	3/17	4/16	1,000
<i>T. denticola</i>	17/3*	16/4	<b>0,008</b>
<i>E. corrodens</i>	4/16	7/13	1,000
<i>T. forsythia</i>	8/11*	11/9	<b>0,016</b>
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	7/13	5/15	1,000

*Chi-square test*; ne/da - predstavlja broj uzoraka unutar grupe koji su negativni, tj. pozitivni na prisustvo bakterijskog soja; statistička značajnost je boldirana; \* $p < 0,05$ . KT+HH grupa (pacijenti koji su tretirani konzervativnom terapijom i hlorheksidin diglukonatom). KT grupa (pacijenti koji su tretirani samo konzervativnom terapijom). *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*); *Treponema denticola* (*T. denticola*); *Eikenella corrodens* (*E. corrodens*); *Tannerella forsythia* (*T. forsythia*); *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A. actinomycetemcomitans*).

## Korelacije markera redoks statusa sa biohemijskim parametrima u KT+HH grupi pre terapije

Korelacionom analizom, utvrđeno je postojanje statistički značajne pozitivne korelacije koncentracije MDA i aktivnosti enzima AST ( $r = -0,517$ ,  $p = 0,028$ ) u KT+HH grupi pre terapije. Pozitivna korelacija je potvrđena između koncentracije 8-OHdG i GGT u istoj grupi pre terapije ( $r = 0,508$ ,  $p = 0,043$ ). Nadalje, analizom je potvrđena i negativna korelacija između TAS salive i LDH pre terapije u KT+HH grupi ( $r = -0,456$ ,  $p = 0,043$ ). Svi ostali markeri redoks statusa nisu bili u značajnoj korelaciji sa preostalim biohemijskim parametrima u KT+HH grupi pre terapije (Tabela 30).

**Tabela 30.** Prikaz korelacija markera redoks statusa sa biohemijskim parametrima u KT+HH grupi pre terapije.

Markeri redoks statusa		Biohemijski parametri					
		AST (U/l)	ALT (U/l)	ALP (U/l)	GGT (U/l)	LDH (U/l)	CK (U/l)
MDA ( $\mu\text{mol/l}$ )	r	<b>0,517*</b>	0,084	-0,129	-0,139	0,088	-0,254
	p	<b>0,028</b>	0,741	0,611	0,581	0,729	0,308
8-OHdG ( $\mu\text{mol/l}$ )	r	0,104	0,031	0,193	<b>0,508*</b>	-0,109	-0,195
	p	0,681	0,906	0,443	<b>0,031</b>	0,667	0,438
SOD (U/ml)	r	0,007	-0,072	0,214	-0,226	0,294	-0,205
	p	0,978	0,764	0,364	0,338	0,208	0,386
GPx (U/l)	r	-0,264	-0,361	-0,214	-0,102	0,128	0,076
	p	0,261	0,119	0,365	0,671	0,591	0,751
TAS ( $\mu\text{mol/l}$ )	r	0,215	0,425	-0,145	0,069	<b>-0,456**</b>	0,374
	p	0,362	0,062	0,543	0,774	<b>0,043</b>	0,104
MK ( $\mu\text{mol/l}$ )	r	0,303	0,275	0,154	0,118	-0,443	0,327
	p	0,194	0,241	0,518	0,621	0,051	0,159

Statistička značajnost je boldirana; r- koeficijent korelacije;  $p < 0,05$ ; \*pozitivna korelacija; \*\*negativna korelacija. KT+HH grupa (pacijenti koji su tretirani konzervativnom terapijom i hlorheksidin diglukonom). Malondialdehid (MDA); 8-hidroksi-2-deoksiguanozin (8-OHdG); Superoksid dismutaza (SOD); Glutation peroksidaza (GPx); Totalni antioksidativni status (TAS); Mokraćna kiselina (MK); Aspartat aminotransferaza (AST); Alanin aminotransferaza (ALT); Alkalna fosfataza (ALP); Gama glutamil transferaza (GGT); Laktat dehidrogenaza (LDH); Kreatin kinaza (CK).

## Korelacije markera redoks statusa sa periopatogenim sojevima u KT+HH grupi pre terapije.

U tabeli 31 su prikazane korelacije markera redoks statusa sa periopatogenim sojevima u okviru grupe KT+HH pre primenjene terapije. Istraživanjem je ustanovljeno postojanje statistički značajne negativne korelacije između koncentracije MK i sojeva *T. denticola* i *A. actinomycetemcomitans* ( $r = -0,487$ ,  $p = 0,035$ ;  $r = -0,501$ ,  $p = 0,029$ ). Nisu utvrđene korelacione značajnosti između preostalih markera redoks statusa i drugih periopatogenih sojeva u KT+HH grupi pre primenjene terapije.

**Tabela 31.** Prikaz korelacija markera redoks statusa sa periopatogenim sojevima u KT+HH grupi pre terapije.

Markeri redoks statusa		Bakterijski sojevi				
		<i>P. gingivalis</i>	<i>T. denticola</i>	<i>E. corrodens</i>	<i>T. forsythia</i>	<i>A. actinomycetemcomitans</i>
MDA (μmol/l)	r		-0,217	-0,063	0,063	0,255
	p	/	0,404	0,811	0,812	0,323
8-OHdG (ng/ml)	r		0,385	0,063	0,284	-0,231
	p	/	0,127	0,813	0,271	0,375
SOD (U/ml)	r		-0,058	-0,119	-0,092	0
	p	/	0,812	0,629	0,707	1
GPx (U/l)	r		0,059	0,199	-0,027	0,152
	p	/	0,811	0,414	0,914	0,536
TAS (μmol/l)	r		-0,253	0,026	-0,356	-0,159
	p	/	0,295	0,915	0,134	0,285
MK (μmol/l)	r		<b>-0,487**</b>	0	<b>-0,501**</b>	-0,215
	p	/	<b>0,035</b>	1	<b>0,029</b>	0,376

Statistička značajnost je boldirana; r - koeficijent korelacije;  $p < 0,05$ ; \*pozitivna korelacija; \*\*negativna korelacija. KT+HH grupa (pacijenti koji su tretirani konzervativnom terapijom i hlorheksidin-diglukonatom). Malondialdehid (MDA); 8-hidroksi-2-deoksiguanozin (8-OHdG); Superoksid dismutaza (SOD); Glutation peroksidaza (GPx); Totalni antioksidativni status (TAS); Mokraćna kiselina (MK); *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*); *Treponema denticola* (*T. denticola*); *Eikenella corrodens* (*E. corrodens*); *Tannerella forsythia* (*T. forsythia*); *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A. actinomycetemcomitans*). / Korelacije za *P. gingivalis* se nisu mogle statistički obraditi jer su parametri imali iste vrednosti.

## Korelacije biohemijskih parametara sa periopatogenim sojevima u KT+HH grupi pre terapije.

Korelacionom analizom, potvrđena je statistički značajna negativna korelacija aktivnosti CK sa sojem *A. actinomycetemcomitans* u okviru KT+HH grupe pacijenata pre primenjene terapije ( $r = -0,484$ ,  $p = 0,036$ ). Ostali biohemijski parametri nisu pokazali značajne korelacije sa periopatogenim sojevima pre terapije kod ispitanika KT+HH grupe (Tabela 32).

**Tabela 32.** Prikaz korelacija biohemijskih parametara sa periopatogenim sojevima u KT+HH grupi pre terapije.

Biohemijski parametri		Bakterijski sojevi				
		<i>P. gingivalis</i>	<i>T. denticola</i>	<i>E. corrodens</i>	<i>T. forsythia</i>	<i>A. actinomycetemcomitans</i>
AST (U/l)	r		0,045	-0,413	-0,061	-0,400
	p	/	0,854	0,078	0,803	0,091
ALT (U/l)	r		0,289	-0,136	0,255	-0,417
	p	/	0,231	0,578	0,291	0,076
ALP (U/l)	r		0,309	-0,374	0,075	-0,415
	p	/	0,197	0,115	0,761	0,077
GGT (U/l)	r		0,013	-0,051	0,257	-0,364
	p	/	0,959	0,835	0,288	0,126
LDH (U/l)	r		-0,041	-0,222	0,111	0,409
	p	/	0,867	0,361	0,651	0,082
CK (U/l)	r		0,027	0,408	-0,222	<b>-0,484**</b>
	p	/	0,911	0,083	0,361	<b>0,036</b>

Statistička značajnost je boldirana; r-koeficijent korelacije;  $p < 0,05$ ; \*pozitivna korelacija; \*\*negativna korelacija. KT+HH grupa (pacijenti koji su tretirani konzervativnom terapijom i hlorheksidin-diglukonatom). Aspartat aminotransferaza (AST); Alanin aminotransferaza (ALT); Alkalna fosfataza (ALP); Gama glutamil transferaza (GGT); Laktat dehidrogenaza (LDH); Kreatin kinaza (CK); *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*); *Treponema denticola* (*T. denticola*); *Eikenella corrodens* (*E. corrodens*); *Tannerella forsythia* (*T. forsythia*); *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A. actinomycetemcomitans*). / Korelacije za *P. gingivalis* nisu mogle statistički da se obrade, parametri su imali iste vrednosti.



## Korelacije markera redoks statusa sa biohemijskim parametrima u KT+HH grupi posle terapije

Korelacije markera redoks statusa sa biohemijskim parametrima unutar KT+HH grupe posle terapije su prikazani u Tabeli 33. Ustanovljeno je postojanje statistički značajne negativne korelacije aktivnosti GPx i AST u KT+HH grupi posle primenjene terapije ( $r = -0,646$ ,  $p = 0,003$ ). Ostali markeri redoks statusa nisu pokazali značajne korelacije sa preostalim biohemijskim parametrima unutar te grupe posle primenjenog terapijskog protokola.

**Tabela 33.** Prikaz korelacija markera redoks statusa sa biohemijskim parametrima u KT+HH grupi posle terapije.

Markeri redoks statusa		Biohemijski parametri					
		AST (U/l)	ALT (U/l)	ALP (U/l)	GGT (U/l)	LDH (U/l)	CK (U/l)
MDA ( $\mu\text{mol/l}$ )	r	-0,335	0,017	-	-0,028	-0,043	-0,425
	p	0,205	0,949	-	0,918	0,874	0,101
8-OHdG (ng/ml)	r	-0,353	0,113	0,408	-0,398	0,056	-0,113
	p	0,165	0,665	0,104	0,113	0,831	0,666
SOD (U/ml)	r	0,051	-0,083	0,086	-0,200	0,098	-0,091
	p	0,840	0,737	0,726	0,413	0,689	0,714
GPx (U/l)	r	<b>-0,646**</b>	-0,121	0,221	-0,002	-0,313	-0,108
	p	<b>0,003</b>	0,621	0,363	0,993	0,192	0,661
TAS ( $\mu\text{mol/l}$ )	r	0,252	0,189	-0,301	0,037	-0,021	0,003
	p	0,297	0,439	0,211	0,880	0,935	0,991
MK ( $\mu\text{mol/l}$ )	r	0,331	0,259	-0,086	-0,221	0,256	0,141
	p	0,168	0,284	0,726	0,363	0,290	0,565

Statistička značajnost je boldirana; r- koeficijent korelacije;  $p < 0,05$ ; \*pozitivna korelacija; \*\*negativna korelacija. KT+HH grupa (pacijenti koji su tretirani konzervativnom terapijom i hlorheksidin-diglukonatom). Malondialdehid (MDA); 8-hidroksi-2-deoksiguanozin (8-OHdG); Superoksid dismutaza (SOD); Glutation peroksidaza (GPx); Totalni antioksidativni status (TAS); Mokraćna kiselina (MK); Aspartat aminotransferaza (AST); Alanin aminotransferaza (ALT); Alkalna fosfataza (ALP); Gama glutamil transferaza (GGT); Laktat dehidrogenaza (LDH); Kreatin kinaza (CK).

## Korelacije markera redoks statusa sa periopatogenim sojevima u KT+HH grupi posle terapije.

Totalni antioksidativni status salive je u značajnoj negativnoj korelaciji sa sojem *A. actinomycetemcomitans* ( $r = -0,670$ ,  $p = 0,002$ ), dok je koncentracija MK takođe u negativnoj korelaciji sa istim bakterijskim sojem u KT+HH grupi ispitanika posle primenjene terapije ( $r = -0,670$ ,  $p = 0,002$ ). Ostali markeri redoks statusa nisu bili u značajnoj korelaciji sa drugim ispitivanim periopatogenim sojevima posle terapije u KT+HH grupi pacijenata (Tabela 34).

**Tabela 34.** Prikaz korelacija markera redoks statusa sa peripatogenim sojevima u KT+HH grupi posle terapije.

Markeri redoks statusa		Bakterijski sojevi				
		<i>P. gingivalis</i>	<i>T. denticola</i>	<i>E. corrodens</i>	<i>T. forsythia</i>	<i>A. actinomycetemcomitans</i>
MDA ( $\mu\text{mol/l}$ )	r	-0,272	0,182	0,327	0,247	0,174
	p	0,326	0,517	0,234	0,374	0,534
8-OHdG (ng/ml)	r	0,087	-0,164	-0,249	0,027	-0,188
	p	0,749	0,544	0,353	0,921	0,486
SOD (U/ml)	r	0,201	0,187	-0,419	-0,396	0
	p	0,423	0,458	0,084	0,103	1
GPx (U/l)	r	-0,282	-0,400	-0,074	-0,088	0,186
	p	0,257	0,100	0,770	0,727	0,460
TAS ( $\mu\text{mol/l}$ )	r	-0,215	-0,331	-0,299	-0,139	<b>-0,670**</b>
	p	0,391	0,181	0,228	0,582	<b>0,002</b>
MK ( $\mu\text{mol/l}$ )	r	-0,043	-0,331	-0,418	-0,139	<b>-0,670**</b>
	p	0,865	0,180	0,084	0,582	<b>0,002</b>

Statistička značajnost je boldirana; r- koeficijent korelacije;  $p < 0,05$ ; \*pozitivna korelacija; \*\*negativna korelacija. KT+HH grupa (pacijenti koji su tretirani konzervativnom terapijom i hlorheksidin-diglukonatom). Malondialdehid (MDA); 8-hidroksi-2-deoksiguanozin (8-OHdG); Superoksid dismutaza (SOD); Glutation peroksidaza (GPx); Totalni antioksidativni status (TAS); Mokraćna kiselina (MK); *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*); *Treponema denticola* (*T. denticola*); *Eikenella corrodens* (*E. corrodens*); *Tannerella forsythia* (*T. forsythia*); *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A. actinomycetemcomitans*).

## Korelacije biohemijskih parametara sa periopatogenim sojevima u KT+HH grupi posle terapije.

Analizom je utvrđeno postojanje statistički značajne pozitivne korelacije aktivnosti ALP i bakterijskog soja *P. gingivalis* posle terapije u KT+HH grupi ispitanika ( $r = 0,540$ ,  $p = 0,025$ ). Takođe, postojanje statistički značajne korelacije je potvrđeno i između aktivnosti LDH i bakterijskog soja *T. forsythia* u istoj grupi ispitanika posle primenjene terapije ( $r = 0,503$ ,  $p = 0,041$ ). Statistički značajna negativna korelacija je potvrđena za aktivnost GGT i bakterijskog soja *P. gingivalis* posle terapije u KT+HH grupi ispitanika ( $r = -0,639$ ,  $p = 0,006$ ). Nisu utvrđene značajne korelacije između preostalih biohemijskih parametara i drugih bakterijskih sojeva (Tabela 35).

**Tabela 35.** Prikaz korelacija biohemijskih parametara sa periopatogenim sojevima u KT+HH grupi posle terapije.

Biohemijski parametri		Bakterijski sojevi				
		<i>P. gingivalis</i>	<i>T. denticola</i>	<i>E. corrodens</i>	<i>T. forsythia</i>	<i>A. actinomycetemcomitans</i>
AST (U/l)	r	0,017	0,276	0	0,026	-0,207
	p	0,948	0,284	1	0,921	0,426
ALT (U/l)	r	-0,107	-0,257	-0,019	-0,033	-0,107
	p	0,683	0,321	0,942	0,901	0,683
ALP (U/l)	r	<b>0,540*</b>	0,116	-0,139	0,265	-0,116
	p	<b>0,025</b>	0,658	0,596	0,304	0,658
GGT (U/l)	r	<b>-0,639**</b>	-0,213	0,255	-0,145	0,213
	p	<b>0,006</b>	0,412	0,323	0,581	0,412
LDH (U/l)	r	0,444	0,345	0,044	<b>0,503*</b>	-0,362
	p	0,074	0,174	0,866	<b>0,041</b>	0,153
CK (U/l)	r	0,034	0,186	0,455	0,309	0,084
	p	0,898	0,475	0,066	0,227	0,747

Statistička značajnost je boldirana; r- koeficijent korelacije;  $p < 0,05$ ; \*pozitivna korelacija; \*\*negativna korelacija. KT+HH grupa (pacijenti koji su tretirani konzervativnom terapijom i hlorheksidin-diglukonatom). Aspartat aminotransferaza (AST); Alanin aminotransferaza (ALT); Alkalna fosfataza (ALP); Gama glutamil transferaza (GGT); Laktat dehidrogenaza (LDH); Kreatin kinaza (CK); *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*); *Treponema denticola* (*T. denticola*); *Eikenella corrodens* (*E. corrodens*); *Tannerella forsythia* (*T. forsythia*); *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A. actinomycetemcomitans*).

## Korelacije markera redoks statusa sa biohemijskim parametrima u KT grupi pre terapije

Analizom je uočeno postojanje statistički značajne pozitivne korelacije između vrednosti enzima LDH sa aktivnošću GPx kao i sa TAS salive, unutar KT grupe ispitanika pre terapije ( $r=0,457$ ,  $p=0,043$ ;  $r=0,641$ ,  $p=0,002$ ). Daljom analizom, ustanovljena je statistički značajna negativna korelacija između koncentracije MK sa vrednostima AST, ALP, GGT kao i sa LDH, dok je isti enzim bio u pozitivnoj korelaciji sa vrednostima CK pre terapije u KT grupi ispitanika ( $r=-0,797$ ,  $p=0,001$ ;  $r=-0,463$ ,  $p=0,041$ ;  $r=-0,779$ ,  $p=0,001$ ;  $r=-0,652$ ,  $p=0,002$ ;  $r=0,721$ ,  $p=0,001$ ). Preostali markeri redoks statusa nisu pokazali značajne korelacije sa drugim ispitivanim biohemijskim parametrima (Tabela 36).

**Tabela 36.** Prikaz korelacija markera redoks statusa sa biohemijskim parametrima u KT grupi pre terapije.

Markeri redoks statusa	Biohemijski parametri						
		AST (U/l)	ALT (U/l)	ALP (U/l)	GGT (U/l)	LDH (U/l)	CK (U/l)
MDA ( $\mu\text{mol/l}$ )	r	0,081	-0,187	-0,056	-0,008	0,464	-0,251
	p	0,752	0,457	0,825	0,974	0,052	0,331
8-OHdG (ng/ml)	r	-0,068	0,306	-0,324	-0,208	0,121	-0,003
	p	0,794	0,232	0,204	0,422	0,643	0,991
SOD (U/ml)	r	-0,231	0,279	-0,267	-0,009	-0,341	0,029
	p	0,326	0,234	0,256	0,971	0,142	0,905
GPx (U/l)	r	-0,136	-0,121	-0,069	-0,158	<b>0,457*</b>	-0,169
	p	0,567	0,614	0,772	0,506	<b>0,043</b>	0,489
TAS ( $\mu\text{mol/l}$ )	r	0,234	-0,239	0,332	0,062	<b>0,641*</b>	-0,353
	p	0,321	0,310	0,153	0,796	<b>0,002</b>	0,138
MK ( $\mu\text{mol/l}$ )	r	<b>-0,797**</b>	0,122	<b>-0,463**</b>	<b>-0,779**</b>	<b>-0,652**</b>	<b>0,721*</b>
	p	<b>0,001</b>	0,608	<b>0,041</b>	<b>0,001</b>	<b>0,002</b>	<b>0,001</b>

Statistička značajnost je boldirana; r- koeficijent korelacije;  $p < 0,05$ ; \*pozitivna korelacija; \*\*negativna korelacija. KT grupa (pacijenti koji su tretirani samo konzervativnom terapijom). Malondialdehid (MDA); 8-hidroksi-2-deoksiguanozin (8-OHdG); Superoksid dismutaza (SOD); Glutation peroksidaza (GPx); Totalni antioksidativni status (TAS); Mokraćna kiselina (MK); Aspartat aminotransferaza (AST); Alanin aminotransferaza (ALT); Alkalna fosfataza (ALP); Gama glutamil transferaza (GGT); Laktat dehidrogenaza (LDH); Kreatin kinaza (CK).

## Korelacije markera redoks statusa sa periopatogenim sojevima u KT grupi pre terapije.

Statistička analiza potvrdila je postojanje značajne negativne korelacije između aktivnosti GPx i bakterijskog soja *A. actinomycetemcomitans* pre terapije u KT grupi ispitanika. Preostali markeri redoks statusa nisu bili u značajnim korelacijama sa ostalim bakterijskim sojevima u KT grupi ispitanika pre terapije (Tabela 37).

**Tabela 37.** Prikaz korelacija markera redoks statusa sa peripatogenim sojevima u KT grupi pre terapije.

Markeri redoks statusa	Bakterijski sojevi					
		<i>P. gingivalis</i>	<i>T. denticola</i>	<i>E. corrodens</i>	<i>T. forsythia</i>	<i>A. actinomycetemcomitans</i>
MDA (μmol/l)	r	-0,257	0,429	-0,071	/	-0,347
	p	0,303	0,076	0,782	/	0,173
8-OHdG (ng/ml)	r	0,051	-0,085	0,102	/	-0,017
	p	0,846	0,744	0,697	/	0,949
SOD (U/ml)	r	0,388	-0,289	0,194	/	0,345
	p	0,101	0,231	0,427	/	0,161
GPx (U/l)	r	0,303	-0,091	-0,303	/	<b>-0,563**</b>
	p	0,208	0,714	0,208	/	<b>0,015</b>
TAS (μmol/l)	r	-0,172	0,219	-0,043	/	-0,446
	p	0,481	0,367	0,861	/	0,064
MK (μmol/l)	r	-0,353	-0,112	-0,265	/	0,029
	p	0,138	0,647	0,273	/	0,908

Statistička značajnost je boldirana; r- koeficijent korelacije; p < 0,05; \*pozitivna korelacija; \*\*negativna korelacija. KT grupa (pacijenti koji su tretirani samo konzervativnom terapijom). Malondialdehid (MDA); 8-hidroksi-2-deoksiguanozin (8-OHdG); Superoksid dismutaza (SOD); Glutation peroksidaza (GPx); Totalni antioksidativni status (TAS); Mokraćna kiselina (MK); *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*); *Treponema denticola* (*T. denticola*); *Eikenella corrodens* (*E. corrodens*); *Tannerella forsythia* (*T. forsythia*); *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A. actinomycetemcomitans*). Napomena/ -Korelacije za *T. forsythia* nisu mogle statistički da se obrade, parametri su imali iste vrednosti.

## Korelacije biohemijskih parametara sa periopatogenim sojevima u KT+HH grupi posle terapije.

Statističkom analizom nije ustanovljena ni jedna značajna korelacija između biohemijskih parametara i ispitivanih bakterijskih sojeva u KT grupi ispitanika pre terapije (Tabela 38).

**Tabela 38.** Prikaz korelacija biohemijskih parametara sa periopatogenim sojevima u KT grupi pre terapije.

Biohemijski parametri		Bakterijski sojevi				
		<i>P. gingivalis</i>	<i>T. denticola</i>	<i>E. corrodens</i>	<i>T. forsythia</i>	<i>A. actinomycetemcomitans</i>
AST (U/l)	r	0,318	0,399	0,113	/	-0,151
	p	0,185	0,091	0,644	/	0,551
ALT (U/l)	r	0,056	-0,309	0,056	/	0,108
	p	0,821	0,199	0,821	/	0,668
ALP (U/l)	r	0,126	0,408	0,126	/	-0,381
	p	0,608	0,083	0,608	/	0,119
GGT (U/l)	r	0,234	0,238	0,234	/	0,063
	p	0,335	0,326	0,335	/	0,805
LDH (U/l)	r	0,158	0,346	0,158	/	-0,303
	p	0,517	0,147	0,517	/	0,221
CK (U/l)	r	-0,431	-0,394	-0,127	/	0,237
	p	0,074	0,106	0,616	/	0,361

Statistička značajnost je boldirana; r- koeficijent korelacije;  $p < 0,05$ ; \*pozitivna korelacija; \*\*negativna korelacija. KT grupa (pacijenti koji su tretirani samo konzervativnom terapijom). Malondialdehid (MDA); Aspartat aminotransferaza (AST); Alanin aminotransferaza (ALT); Alkalna fosfataza (ALP); Gama glutamil transferaza (GGT); Laktat dehidrogenaza (LDH); Kreatin kinaza (CK); *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*); *Treponema denticola* (*T. denticola*); *Eikenella corrodens* (*E. corrodens*); *Tannerella forsythia* (*T. forsythia*); *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A. actinomycetemcomitans*). Napomena / Korelacije za *T. forsythia* nisu mogle statistički da se obrade, parametri su imali iste vrednosti.

## Korelacije markera redoks statusa sa biohemijskim parametrima u KT grupi posle terapije.

Potvrđena je statistički značajna pozitivna korelacija između aktivnosti SOD i LDH u KT grupi ispitanika posle terapije ( $r = 0,507$ ,  $p = 0,023$ ). Svi ostali markeri redoks statusa nisu bili u značajnim korelacijama sa drugim biohemijskim parametrima (Tabela 39).

**Tabela 39.** Prikaz korelacija markera redoks statusa sa biohemijskim parametrima u KT grupi posle terapije.

Markeri redoks statusa		Biohemijski parametri					
		AST (U/l)	ALT (U/l)	ALP (U/l)	GGT (U/l)	LDH (U/l)	CK (U/l)
MDA ( $\mu\text{mol/l}$ )	r	0,067	0,022	-0,125	0,409	-0,362	-0,143
	p	0,792	0,931	0,621	0,092	0,141	0,571
8-OHdG (ng/ml)	r	-0,303	-0,209	0,159	-0,119	0,035	0,031
	p	0,221	0,406	0,528	0,637	0,891	0,903
SOD (U/ml)	r	-0,373	0,018	0,191	-0,087	<b>0,507*</b>	0,159
	p	0,105	0,939	0,421	0,716	<b>0,023</b>	0,502
GPx (U/l)	r	-0,075	0,366	-0,119	0,161	0,099	-0,216
	p	0,752	0,113	0,618	0,501	0,679	0,361
TAS ( $\mu\text{mol/l}$ )	r	0,049	0,282	-0,346	-0,261	0,127	0,356
	p	0,838	0,229	0,136	0,268	0,594	0,123
MK ( $\mu\text{mol/l}$ )	r	-0,071	0,264	-0,264	-0,173	0,131	0,271
	p	0,768	0,261	0,261	0,465	0,585	0,247

Statistička značajnost je boldirana; r- koeficijent korelacije;  $p < 0,05$ ; \*pozitivna korelacija; \*\*negativna korelacija. KT grupa (pacijenti koji su tretirani samo konzervativnom terapijom). Malondialdehid (MDA); 8-hidroksi-2-deoksiguanozin (8-OHdG); Superoksid dismutaza (SOD); Glutation peroksidaza (GPx); Totalni antioksidativni status (TAS); Mokraćna kiselina (MK). Aspartat aminotransferaza (AST); Alanin aminotransferaza (ALT); Alkalna fosfataza (ALP); Gama glutamil transferaza (GGT); Laktat dehidrogenaza (LDH); Kreatin kinaza (CK).

## Korelacije markera redoks statusa sa biohemijskim parametrima u KT grupi posle terapije.

Istraživanjem je ustanovljena statistički značajna negativna korelacija između koncentracije MDA i bakterijskog soja *E. corrodens* posle terapije u KT grupi ispitanika ( $r = -0,485$ ,  $p = 0,049$ ). Svi drugi markeri redoks statusa nisu pokazali značajne korelacije sa drugim bakterijskim sojevima posle terapije u KT grupi ispitanika (Tabela 40).

**Tabela 40.** Prikaz korelacija markera redoks statusa sa peripatogenim sojevima u KT grupi posle terapije.

Markeri redoks statusa	Bakterijski sojevi					
		<i>P. gingivalis</i>	<i>T. denticola</i>	<i>E. corrodens</i>	<i>T. forsythia</i>	<i>A. actinomycetemcomitans</i>
MDA ( $\mu\text{mol/l}$ )	r	-0,255	0,123	<b>-0,485**</b>	0,293	0,059
	p	0,323	0,650	<b>0,049</b>	0,254	0,829
8-OHdG (ng/ml)	r	0,281	0,287	-0,093	0,305	-0,176
	p	0,275	0,281	0,722	0,234	0,515
SOD (U/ml)	r	0,111	-0,158	-0,145	0,175	-0,068
	p	0,655	0,531	0,553	0,473	0,788
GPx (U/l)	r	-0,095	0,130	0,133	-0,313	-0,126
	p	0,700	0,606	0,588	0,191	0,619
TAS ( $\mu\text{mol/l}$ )	r	-0,188	-0,101	0,079	-0,311	-0,182
	p	0,441	0,691	0,748	0,194	0,470
MK ( $\mu\text{mol/l}$ )	r	-0,094	-0,014	0,132	-0,272	-0,068
	p	0,702	0,955	0,591	0,259	0,788

Statistička značajnost je boldirana; r- koeficijent korelacije;  $p < 0,05$ ; \*pozitivna korelacija; \*\*negativna korelacija. KT grupa (pacijenti koji su tretirani samo konzervativnom terapijom). Malondialdehid (MDA); Malondialdehid (MDA); 8-hidroksi-2-deoksiguanozin (8-OHdG); Superoksid dismutaza (SOD); Glutation peroksidaza (GPx); Totalni antioksidativni status (TAS); Mokraćna kiselina (MK); *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*); *Treponema denticola* (*T. denticola*); *Eikenella corrodens* (*E. corrodens*); *Tannerella forsythia* (*T. forsythia*); *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A. actinomycetemcomitans*).



## Korelacije biohemijskih parametara sa periopatogenim sojevima u KT grupi posle terapije.

Statistička analiza potvrdila je postojanje pozitivne korelacije između vrednosti AST i bakterijskog soja *A. actinomycetemcomitans* posle terapije u KT grupi pacijenata ( $r = 0,473$ ,  $p = 0,047$ ). Daljom analizom, potvrđena je i značajna pozitivna korelacija između vrednosti ALP kao i bakterijskog soja *P. gingivalis* ( $r = 0,505$ ,  $p = 0,027$ ). Nadalje, ustanovljena je značajna negativna korelacija između aktivnosti CK i bakterijskog soja *T. denticola* ( $r = -0,502$ ,  $p = 0,034$ ). Između preostalih bakterijskih sojeva i biohemijskih parametara nisu dokazane značajne korelacije (Tabela 41).

**Tabela 41.** Prikaz korelacija biohemijskih parametara sa periopatogenim sojevima u KT grupi posle terapije.

Biohemijski parametri	Bakterijski sojevi					
		<i>P. gingivalis</i>	<i>T. denticola</i>	<i>E. corrodens</i>	<i>T. forsythia</i>	<i>A. actinomycetemcomitans</i>
AST (U/l)	r	0,035	0,113	0,178	0,088	<b>0,473*</b>
	p	0,886	0,655	0,466	0,721	<b>0,047</b>
ALT (U/l)	r	-0,094	-0,051	0,031	0,209	0
	p	0,703	0,841	0,898	0,391	1
ALP (U/l)	r	<b>0,505*</b>	0,316	0,327	0,109	0,250
	p	<b>0,027</b>	0,201	0,172	0,658	0,317
GGT (U/l)	r	0,118	-0,158	0,149	0,293	0,250
	p	0,631	0,531	0,544	0,224	0,317
LDH (U/l)	r	-0,130	-0,059	-0,164	-0,212	-0,460
	p	0,596	0,815	0,503	0,384	0,055
CK (U/l)	r	-0,266	<b>-0,501**</b>	-0,266	0,124	-0,389
	p	0,271	<b>0,034</b>	0,271	0,613	0,111

Statistička značajnost je boldirana; r- koeficijent korelacije;  $p < 0,05$ ; \*pozitivna korelacija; \*\*negativna korelacija. KT grupa (pacijenti koji su tretirani samo konzervativnom terapijom). Malondialdehid (MDA); Aspartat aminotransferaza (AST); Alanin aminotransferaza (ALT); Alkalna fosfataza (ALP); Gama glutamil transferaza (GGT); Laktat dehidrogenaza (LDH); Kreatin kinaza (CK); *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*); *Treponema denticola* (*T. denticola*); *Eikenella corrodens* (*E. corrodens*); *Tannerella forsythia* (*T. forsythia*); *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A. actinomycetemcomitans*).

## 5. DISKUSIJA

Parodontitis je najučestalije oralno inflamatorno oboljenje koje prema skorašnjim istraživanjima pogađa oko 20-50% svetske populacije (M. Nazir i sar., 2020). Zbog tako visoke učestalosti, parodontitis je i dalje u velikom fokusu interesovanja istraživača.

Pored dentalnog plaka koji spada u osnovne etiološke faktore, postoje i akcesorni, međutim dokazano je da oni nemaju direktnu ulogu u nastanku oboljenja, već doprinose otežanom održavanju oralne higijene i smanjenoj otpornosti periodontalnih tkiva na dejstvo mikroorganizama i na taj način indirektno potpomažu progresiju oboljenja.

Ova studija se sastoji od četiri celine. Prva celina odnosi se na uticaj dva različita terapijska protokola u okviru konzervativnog lečenja, na kliničke parametre pacijenata obolelih od parodontitisa razvrstanih u dve eksperimentalne grupe. Druga celina odnosi se na uticaj dva različita terapijska protokola u okviru konzervativnog lečenja, na biohemijske parametre inflamacije pacijenata obolelih od parodontitisa razvrstanih u dve eksperimentalne grupe. Treća celina odnosi se na uticaj dva različita terapijska protokola, na markere oksidativnog statusa u okviru konzervativnog lečenja pacijenata obolelih od parodontitisa razvrstanih u dve eksperimentalne grupe. Četvrta celina odnosi se na uticaj dva različita terapijska protokola na peripatogene mikroorganizme u okviru konzervativnog lečenja pacijenata obolelih od parodontitisa razvrstanih u dve eksperimentalne grupe. Prvi terapijski protokol je podrazumevao primenu konzervativne terapije i rastvora HH, dok je drugi terapijski protokol podrazumevao primenu samo konzervativne terapije.

Dijagnostički postupak kod parodontitisa se sastoji od uzimanja anamneze, kliničkog pregleda pacijenta i analize radiografskog snimka. Standardni parametri koji služe za postavljanje dijagnoze parodontitisa (dubina parodontalnih džepova, krvarenje na provokaciju, nivo propojnog epitela, radiografski snimci i dr.) uglavnom nam služe kao indikatori za procenu stepena oštećenja parodontalnih tkiva, ali ne i za trenutnu aktivnost bolesti (AlMoharib i sar., 2014). Merenje ovih kliničkih parametara ima ograničen prognostički značaj, pa se zbog toga poslednjih godina fokus prebacio na ispitivanje oralnih fluida kao alternativni dijagnostički i prognostički pristup parodontitisu (Kinney i sar., 2011). Sve više se daje na značaju salivi, koja ima potencijal da reflektuje trenutnu aktivnost i stepen bolesti, što predstavlja prednost u obezbeđivanju informacija koje se odnose na procenu rizika i praćenje ili progresiju parodontitisa (Miller i sar., 2010). Cilj kliničkog dela istraživanja bio je da verifikuje koji od dva terapijska protola konzervativnog lečenja pacijenata obolelih od parodontitisa će se pokazati efikasnijim u odnosu na status kliničkih parametara.

S obzirom na činjenicu da se određeni mikroorganizmi dentalnog plaka smatraju osnovnim etiološkim faktor odgovornim za nastanak parodontitisa, u okviru ove doktorske disertacije ispitivani su sojevi: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Eikenella corrodens* i *Treponema denticola*, koji se smatraju izrazito potentnim patogenima u etiologiji parodontitisa. Faktori bakterijske virulencije direktno izazivaju oštećenja i degradaciju tkiva domaćina ili izazivaju oslobađanje bioloških medijatora iz ćelija tkiva domaćina i na taj način indirektno izazivaju oštećenja tkiva.

Iz tog razloga, jedan od ciljeva eksperimenta bio je da ispitamo uticaj dva različita terapijska protokola konzervativnog lečenja na distribuciju i prevalencu ovih bakterijskih sojeva između dve eksperimentalne grupe pacijenata. U tu svrhu korišćene su metode PCR i qRT-PCR, koje su u naučno istraživačkom smislu decenijama najprimenjivnije metode kojima se verifikuje i kvantifikuje prisustvo DNK molekula (Luo i sar., 2020). Cilj mikrobiološke studije bio je da identifikacijom promene u distribuciji mikroorganizama dobijemo potvrdu o tome koji od dva primenjenja konzervativna terapijska protokola je efikasniji u tretiranju sistemski zdravih pacijenata obolelih od parodontitisa. S obzirom na mikrobiološku etiologiju parodontitisa, u ovom istraživanju ispitan je upravo uticaj rastvora HH u okviru konzervativnog lečenja navedenog oboljenja radi potvrde opravdanosti njegove primene u rutinskim protokolima.

Osim mikrobioloških etioloških faktora, i dalje se svakodnevnim istraživanjima razjašnjava uloga imunskog odgovora domaćina u patogenezi ovog oboljenja. Kako parodontitis predstavlja inflamatorno oboljenje, te tako odgovor organizma domaćina podrazumeva i produkciju i oslobađanje različitih vrsta enzima. Najvažniji inflamatorni enzimi su: AST, ALT, ALP, GGT, LDH, CK. Inflamatorne promene koje se dešavaju u toku parodontitisa se reflektuju i kroz promene aktivnosti ovih enzima. Navedeni enzimi su pokazatelji većeg stepena oštećenja ćelija i njihova povećana aktivnost u salivi je upravo posledica njihovog pojačanog oslobađanja iz oštećenih ćelija mekih tkiva parodonticijuma i odraz metaboličkih promena u inflamiranoj gingivi (Kaufman i Lamster, 2000; Ozmeric, 2004). Iz tih razloga, kao jedan od ciljeva eksperimenta bio je da ispitamo upravo promene vrednosti ovih enzima u eksperimentalnim grupama pre i posle primenjena dva različita protokola terapije, kako bismo utvrdili koji je od njih efikasniji u lečenju parodontitisa.

S obzirom da su enzimi, proteini i imunoglobulini najzastupljeniji molekuli u salivi, njihova upotreba kao salivarnih biomarkera odavno je prepoznata i svakodnevno okupira pažnju istraživača.

U patogenezi parodontitisa, SR i OS, takođe igraju veoma značajnu ulogu. Slobodni radikali se često formiraju kao metabolički nus-proizvodi i njihovo preterano stvaranje dovodi do oštećenja ćelija i razvoja OS. Oksidativni stres se definiše kao disbalans između prekomerne proizvodnje ROS i njegove neadekvatne eliminacije delovanjem antioksidanata. Stoga se krajni produkti raspadanja ROS kao i aktivnost enzimskih i neenzimskih antioksidanata smatraju idealnim parametrima koji služe za procenu posledica OS, važnog mehanizma u patološkom procesu parodontitisa. Antioksidansi su supstance koje smanjuju dejstvo SR i predstavljaju specifičnu odbranu koja štiti organizam od njihovog štetnog dejstva. Antioksidansi igraju važnu ulogu u zaštiti oralnih tkiva od štetnih efekata SR. Slobodni radikali igraju važnu ulogu u patogenezi mnogih sistemskih bolesti ali i bolesti lokalizovanih u usnoj duplji. Disbalans između proizvodnje SR i salivarnih AO može da izazove OS, što se smatra osnovom za razvoj parodontitisa (M. Chen i sar., 2019; Kundalić i sar., 2016; Miricescu i sar., 2014).

Imajući u vidu aktuelnost ove teme, u našoj eksperimentalnoj studiji nameravali smo da ispitamo uticaj dva različita konzervativna terapijska protokola lečenja sistemski zdravih osoba obolelih od parodontitisa na markere oksidativnog statusa (oksidativne i antioksidativne). Jedna od hipoteza ove disertacije, jeste upravo da će primena HH u okviru adjuvantne KT, umanjiti dejstvo OS, što će se manifestovati kroz smanjenje svih oksidativnih parametara kao što su MDA, 8-OHdG, ali imati i uticaja na potenciranje delovanja antioksidativnih parametara poput SOD, GPx, TAS i MK u salivi.

Na osnovu sociodemografskih karakteristika (srednja vrednost godina i pušački status), nije postojala statistički značajna razlika između eksperimentalnih grupa, što ukazuje na izuzetnu homogenost grupa.

## **5.1 Uticaj dva ispitivana terapijska protokola konzervativnog lečenja na parametre redoks statusa**

Do sada je objavljen veliki broj studija koje se bave proučavanjem markera oksidativnog oštećenja i antioksidantne zaštite kod pacijenata sa parodontitisom, a dosta manji broj onih studija koje se bave evaluacijom raznih oksidativnih parametara i markera antioksidantne zaštite pre i posle nekog tretmana kod ovih pacijenata. U zavisnosti od načina dizajniranja studije i od izbora parametara koji se prate, dobijeni rezultati se značajno razlikuju od studije do studije. Ono što je zajedničko u tim studijama jeste vidljivo povećanje vrednosti parametara oksidativnog oštećenja: MDA i 8-OHdG kod ispitanika sa parodontitisom, bilo da je reč o studijama preseka ili se radi o „follow-up“ studijama, u kojima se prati kretanje tih parametara od pre terapije do izvesnog vremena posle terapije (Guentsch i sar., 2008; Kurgan i sar., 2015).

Značajan je broj studija koje su ispitale razne markere oksidativnog oštećenja i antioksidativne zaštite kod pacijenata sa parodontitisom koji su podvrgnuti jednoj vrsti terapije, bilo da se radi o konzervativnoj terapiji ili o primeni antioksidantne terapije u različitim oblicima (tablete, kapsule, gel itd) i različitim sadržajem (Arora i sar., 2013; Hendek i sar., 2015; Önder i sar., 2017). Meta studija novijeg datuma, objedinila je samo studije u kojima su pacijenti oboleli od parodontitisa ali udruženi sa određenom sistemskom bolešću (najčešće diabetesom tip 2), kao jednim od oboljenja savremenog doba, sa veoma visokom prevalencom na globalnom nivou, a naročito u razvijenim zemljama sveta (Mizutani i sar., 2021), dok smo u ovoj disertaciji uključili samo pacijente koji su bili sistemski zdravi. U proteklih nekoliko godina, dobijeni rezultati su pokazali jaku povezanost između OS i parodontitisa. Bolje razumevanje ove povezanosti svim istraživačima može dati dublji uvid u patogenezu parodontitisa, odnos koje ovo oboljenje ima sa inflamacijom, kao i terapijskom strategijom koja će se svakom pacijentu individualno prilagoditi (Y. Wang i sar., 2017).

### **5.1.1 Uticaj dva terapijska protokola konzervativnog lečenja na koncentracije salivarnog 8-hidroksi-2-deoksiguanozina**

8-hidroksi-2-deoksiguanozin predstavlja stabilan proizvod, koji se izlučuje u telesnim tečnostima kao posledica reparacije DNK, čime se zapravo smatra važnim markerom oštećenja DNK, odnosno oksidativnog stresa (Omari Shekaftik i Nasirzadeh, 2021). Povišene vrednosti 8-OHdG su potvrđene kod pacijenata obolelih od parodontitisa u poređenju sa zdravima i dokazane u dosta studija koje su se bavile analizom ovog oksidativnog markera kako iz krvi, tako i iz salive (C. F. Canakci i sar., 2009; Konopka i sar., 2007). Istraživanje koje je sprovedla Miricescu i sar. (2014), koje je uključivalo 20 pacijenata obolelih od parodontitisa i 20 ispitanika sa zdravim parodontijumom, gde su svi ispitanici bili sistemski zdravi (kao i u našem istraživanju), pokazalo je značajno više vrednosti 8-OHdG kod pacijenata sa parodontitisom u odnosu na ispitanike sa zdravim parodontijumom. Slični rezultati su dobijeni u našoj studiji, gde je u okviru analiza pokazano da su obe grupe pacijenata obolele od parodontitisa imale statistički značajne više vrednosti koncentracija 8-OHdG u odnosu na zdrave ispitanike (u KT grupi ispitanika čak 10x više vrednosti nego kod Z grupe). Takođe, analizom promena koncentracije 8-OHdG unutar obe eksperimentalne grupe, pokazano je da su se vrednosti ovog oksidativnog markera smanjile u obe grupe, ali sa statističkom značajnošću samo kod pacijenata koji su bili tretirani KT. Rezultati slični ovom, potvrđeni su u studiji novijeg datuma, gde se koncentracija i salivarnog i serumskog 8-OHdG signifikantno smanjila u grupi pacijenata obolelih od parodontitisa na kontroli 3 meseca nakon konzervativne terapije (Gautam i sar., 2022). Nadalje, korelaciona analiza između obe eksperimentalne grupe je pokazala da su se posle terapije značajno smanjile koncentracije 8-OHdG samo u grupi tretiranoj KT. Slični rezultati su dobijeni u studijama koje su potvrdile značajno više koncentracije salivarnog 8-OHdG kod obolelih od parodontitisa, pri čemu su iste smanjene uspešnim antiinflamatornim (konzervativnim) tretmanom, međutim u svim tim studijama su pacijenti bili izloženi istim konzervativnim terapijskim protokolom i poređeni su rezultati u odnosu na ispitanike sa zdravim parodontijumom (Kurgan i sar., 2015; Öngöz Dede i sar., 2013; Podzimek i sar., 2019).

Korelacionom analizom potvrđena je i pozitivna korelacija koncentracije 8-OHdG sa vrednošću GGT u grupi koji su pored konzervativne terapije koristili i HH, što ukazuje da ovaj biohemijski parametar može biti pokazatelj intenziteta inflamacije u parodontijumu, što je slučaj kod pacijenata sa parodontitisom.

### 5.1.2 Uticaj dva terapijska protokola konzervativnog lečenja na koncentracije malondialdehida

Malondialdehid predstavlja krajnji proizvod lipidne peroksidacije, veoma važan pokazatelj OS, ujedno i najispitivaniji produkt lipidne peroksidacije kod obolelih od parodontitisa (Ahmadi-Motamayel i sar., 2017). Motamayel i sar. u toj studiji nisu upoređivali terapijske protokole, već su uporedili koncentracije MDA između obolelih od parodontitisa i ispitanika sa zdravim parodontijumom, gde su dobili potvrdu da su serumski i salivarni nivoi ovog enzima značajno povišeni kod pacijenata sa parodontitisom. U ovoj doktorskoj disertaciji statistički značajno povišene koncentracije MDA su zabeležene u salivi obe grupe pacijenata obolelih od parodontitisa u poređenju sa ispitanicima koji su imali zdrav parodontijum. Slični rezultati dobijeni su i u studiji u kojoj je bilo obuhvaćeno 32 periodontalno zdravih osoba (obolelih od dijabetes melitus tip 2), 35 pacijenata obolelih od parodontitisa (dijabetes melitus tip 2), zatim 26 sistemski zdravih (obolelih od parodontitisa) i sistemski zdravih (sa zdravim parodontijumom). Rezultati te studije pokazali su povišene koncentracije MDA kod svih pacijenata obolelih od parodontitisa (Altıngöz i sar., 2021). Dalje, u ovoj doktorskoj disertaciji došlo je do značajnog smanjenja koncentracija MDA u obe eksperimentalne grupe posle primenjene terapije. Slični rezultati su dobijeni u studiji u kojoj je bilo uključeno 48 pacijenata obolelih od parodontitisa i 35 ispitanika sa zdravim parodontijumom (svi sistemski zdravi), gde su koncentracije MDA bile povišene kod obolelih od parodontitisa, dok su se koncentracije istog enzima statistički značajno smanjile nakon konzervativne terapije (D. Wei i sar., 2010). Korelacionom statistikom u ovoj doktorskoj disertaciji, ustanovljena je značajna pozitivna korelacija između koncentracije MDA i vrednosti AST u KT+HH grupi pre terapije, što ukazuje na povezanost oba markera u inflamatornim stanjima poput parodontitisa. Takođe, u ovoj disertaciji je potvrđena statistički značajna negativna korelacija između koncentracije MDA i bakterijskog soja *E. corrodens*, posle terapije u grupi koja je bila tretirana samo KT. Ovaj rezultat ukazuje na to da je u KT grupi, koja nije bila tretirana i HH, došlo do povećane distribucije ovog peripatogenog soja posle terapije.

### 5.1.3 Uticaj dva terapijska protokola konzervativnog lečenja na totalni antioksidativni status

Pošto dosadašnji podaci ukazuju na to da slobodni radikali (ROS) kao i antioksidativni sistemi deluju pre udruženo, nego samostalno, te tako istraživanja i merenja individualne antioksidativne aktivnosti mogu da dovedu istraživače u zabludu i usmere ih na neadekvatnu interpretaciju celokupnog antioksidativnog statusa (Hegde i sar., 2013). Zato se TAS definiše kao mol oksidanata neutralizovan jednim litrom rastvora koji služi kao biomarker koji meri ukupni antioksidativni potencijal telesnih tečnosti, pa i salive. Povećan antioksidativni kapacitet može biti posledica adaptivnog odgovora na dugoročno povećan oksidativni stres. S druge strane, smanjenje antioksidativnog kapaciteta nije nužno nepoželjno stanje kada je proizvodnja ROS smanjena. Rezultati antioksidativnog statusa bi stoga trebalo da se tumače vrlo oprezno (Tóthová i sar., 2015). Shodno tim činjenicama, kod pacijenata obolelih od parodontitisa se očekuju povećane vrednosti TAS. U okviru naše studije dobijeni su slični rezultati, tj. pacijenti koji su imali zdrav parodontijum su imali niže vrednosti TAS u odnosu na obolele od parodontitisa, međutim bez statističke značajnosti. Takav rezultat nam svakako ukazuje da su pacijenti oboleli od parodontitisa bili izloženi delovanju OS. Slični rezultati dobijeni su u studiji koja je primenila KT na pacijentima koji su imali parodontitis i gingivitis, gde je nakon ordiniranog terapijskog protokola došlo do značajnog smanjenja vrednosti TAS u prvih mesec dana od završetka lečenja (Kim i sar., 2010). Oprečni rezultati dobijeni su u studiji u kojoj je bilo uključeno 21 ispitanik koji su imali zdrav parodontijum i 42 pacijenata obolelih od parodontitisa, gde su nakon konzervativne terapije u eksperimentalnoj grupi potvrđene statistički značajne više vrednosti TAS (Novakovic i sar., 2014). Takođe, u našoj studiji posmatranjem promena vrednosti TAS unutar eksperimentalnih grupa pre i posle terapije, nije došlo do statističke značajnosti ni u jednoj od grupa.

U okviru korelacionih analiza TAS je pozitivno korelirao sa vrednostima DS u KT grupi pre terapije. Pozitivna korelacija je utvrđena između TAS i vrednosti ILZ, u KT grupi posle terapije, dok ni sa jednim drugim kliničkim parametrom TAS nije korelirao ni pre ni posle terapije. Statistički značajna negativna korelacija između TAS i aktivnosti enzima LDH je ustanovljena u KT+HH grupi pre terapije, dok je posle terapije u istoj grupi TAS takođe negativno korelirao sa bakterijskim sojem *A. actinomycetemcomitans*. TAS je pozitivno korelirao sa enzimom LDH u KT grupi pre terapije. Autori jedne studije su nakon prilagođavanja uzrasta i antioksidativnog unosa, multivarijantnom analizom ipak pokazali pozitivnu korelaciju između salivarnog TAS i parodontalnog statusa kroz CPITN skor (Su i sar, 2009). Ključna razlika među šarolikim rezultatima bi mogla da leži u dinamici bolesti koja bi mogla da se razlikuje od studije do studije, a koja se retko navodi.

Dakle, ako imamo u vidu da je uočen nedostatak statistički značajnih promena vrednosti TAS unutar grupa pre i posle terapije, kao i nedostatak statističke značajnosti između obe eksperimentalne grupe posle terapije, možemo zaključiti da TAS nije adekvatan marker za procenu uticaja HH u smislu veće efikasnosti na redoks status.

Razlozi ovih neslaganja u oprečno dobijenim rezultatima za vrednosti TAS u svim ovim studijama se mogu objasniti i razlikama u korišćenim analitičkim metodama, ali i u pred-analitičkoj fazi. Takođe, oprečnost u rezultatima nam može ukazati da se TAS u salivi možda ne može koristiti kao reprezentativni marker oksidativnog stresa kod pacijenata obolelih od parodontitisa.

#### **5.1.4 Uticaj dva terapijska protokola konzervativnog lečenja na aktivnost mokraćne kiseline**

Mokraćna kiselina predstavlja krajnji proizvod metabolizma purinskih nukleotida. Kod čoveka MK nema mogućnost dalje razgradnje, zbog nedostatka enzima urikaze, pa dalja reapsorpcija koja se odvija na nivou tubula bubrega, obezbeđuje dovoljno visoku koncentraciju MK koja se može detektovati u krvnoj plazmi. Međutim, prisustvo MK u salivi nije u potpunosti razjašnjeno. Pretpostavlja se da se urati pasivnom difuzijom transportuju iz cirkulacije u salivu, gde joj je koncentracija svakako niža nego u krvnoj plazmi. Mokraćna kiselina, ugrubo čini otprilike polovinu antioksidativne sposobnosti plazme (Lobo i sar., 2010), ali se smatra i jednim od glavnih AO salive, jer zauzima antioksidativno učešće u oko 70% ukupnog salivarnog TAS (Battino i sar., 2002; Nagler i sar., 2002). U mnogim studijama, ispitivane su vrednosti MK kod pacijenata koji boluju od parodontitisa. U nekim studijama utvrđene su značajno više vrednosti ovog antioksidansa kod pacijenata koji boluju od parodontitisa, nego kod pacijenata sa zdravim parodontijumom, što je navelo ove istraživače da sugerišu da se MK može koristiti kao lako detektujući posrednik zapaljenja kod ovog oboljenja (Banu i sar, 2015; Gharbi i sar., 2019). Slični rezultati dobijeni su u sklopu ovog istraživanja, gde su uočene više vrednosti MK kod pacijenata obolelih od parodontitisa nego kod ispitanika sa zdravim parodontijumom, ali bez statističke značajnosti. Međutim, u jednoj studiji dobijeni su potpuno suprotni rezultati, odnosno salivarna vrednost MK bila je znatno niža kod pacijenata obolelih od parodontitisa, u poređenju sa ispitanicima koji su imali zdrav parodontijum (Diab-Ladki i sar, 2003). Ovakvi rezultati se mogu objasniti „potrošnjom“ ovog AO u pokušajima da neutrališe SR, čija se koncentracija inače mnogostruko povećava u toku ovog oboljenja. U okviru ove doktorske disertacije, daljom statističkom analizom unutar grupa, ustanovljeno je značajno smanjenje vrednosti MK posle terapije u okviru KT grupe, međutim korelaciona analiza između obe eksperimentalne grupe potvrdila je statistički značajno smanjenje vrednosti MK u grupi pacijenata koji su primenjivali i HH. U KT+H grupi pre terapije uočene su negativne korelacije između MK sa peripatogenim sojevima *T. denticola* i *T. forsythia*, dok je posle terapije uočena negativna korelacija sa bakterijskim sojem *A. actinomycetemcomitans*. U KT grupi pre terapije, ustanovljenje su brojne negativne korelacije između MK sa enzimima AST, ALP, GGT i LDH, dok je sa CK korelacija bila pozitivna.

### **5.1.5 Uticaj dva terapijska protokola konzervativnog lečenja na aktivnost superoksid dizmutaze**

Superoksid dizmutaza pripada enzimskim salivarnim AO i ima veoma važnu ulogu u neutralizovanju štetnih efekata koje proizvedu SR. Antioksidansi, od kojih se mnogi oslobađaju lokalno na mesta zapaljenja od strane PMN i /ili drugih ćelija, mogu da obezbede zaštitu od štetnog delovanja ROS. Kod zdravih organizama ravnoteža se održava interakcijom oksidanata i AO. U patološkim stanjima, poput parodontitisa, homeostaza se gubi i nadvladaju oksidansi. U tkivima sisara, najznačajniji antioksidans je SOD, koji katalizuje reakciju dizmutacije anjon radikala u  $H_2O_2$  i  $O_2$  (D. Wei i sar., 2010). Zbog toga je fokus istraživača poslednjih godina upravo usmeren na ispitivanje aktivnosti SOD u mnogim inflamatornim stanjima, pa i kod obolelih od parodontitisa. Rezultati su vrlo različiti i razlikuju se od studije do studije. Naime, u studiji u kojoj su bili uključeni pacijenti sa parodontitisom i sa zdravim parodontcijumom, analizirana je aktivnost SOD iz gingivalnog tkiva i GCF, gde su autori dobili značajno povišenu aktivnost SOD kod pacijenata obolelih od parodontitisa iz gingivalnih uzoraka, ali ne i iz GCF u poređenju sa kontrolnom grupom. Ovakav rezultat nam ukazuje da se aktivnost SOD povećava sa napredovanjem inflamacije (Akalin i sar., 2005). Slični rezultati, dobijeni u okviru ove doktorske disertacije, pokazali su veću aktivnost SOD pre terapije kod obolelih od parodontitisa, u poređenju sa ispitanicima koji su imali zdrav parodontcijum, međutim bez statističke značajnosti. Oprečni rezultati, dobijeni su u studiji koja je uključila pre-eklamptične žene koje su imale parodontitis, gde je uočena značajno smanjena aktivnost SOD u salivi, GCF i serumu, (V. Canakci i sar., 2007). Dalji rezultati u ovom istraživanju, potvrdili su da nije bilo statistički značajnih razlika u aktivnosti SOD unutar obe eksperimentalne grupe pre i posle primenjenog tretmana (u grupi koja je pored konzervativne terapije primenjivala i HH, aktivnost SOD je bila na granici statističke značajnosti posle primenjenog tretmana). Sa druge strane, pak domaći autori koji su u studiju uključili 21 pacijenta obolelog od parodontitisa, nakon konzervativnog lečenja su dobili statistički značajno smanjenje aktivnosti SOD (Novaković i sar., 2013). Nadalje, korelacionom analizom u ovoj disertaciji, između eksperimentalnih grupa nije uočena statistička značajna aktivnosti SOD posle primenjene terapije. Posle terapije, aktivnost SOD je u negativnoj korelaciji sa vrednostima ILZ u KT+HH grupi. U grupi koja je bila tretirana samo konzervativnom terapijom, potvrđena je pozitivna korelacija između aktivnosti SOD i enzima LDH nakon terapije.

### **5.1.6 Uticaj dva terapijska protokola konzervativnog lečenja na aktivnost glutathion peroksidaze**

Glutathion peroksidaza pripada takođe enzimskim salivarnim antioksidansima i ima veoma važnu ulogu u neutralizovanju štetnih efekata koje proizvedu SR (P. F. Wei i sar., 2004). Glutathion peroksidaza je enzim koji sadrži selen koji detoksikuje vodonik peroksid i druge perokside koristeći glutathion kao redukujući agens. Matés i sar., (1999) su objavili da je genska ekspresija GPx regulisana od strane  $H_2O_2$  i drugih ROS. Međutim, pokazalo se i da neki parodontopatogeni mikroorganizmi imaju kapacitet da iskoriste glutathion ili cistein kao izvor za formiranje vodonik sulfida, što posledično može da dovede do povećanog oslobađanja proinflamatornih citokina koji mogu da izazovu oštećenje tkiva koje se javlja i u toku parodontitisa (I. L. Chapple, 1997). U ovom istraživanju, ispitanici obe eksperimentalne grupe koji su oboleli od parodontitisa su imali statistički značajno veću aktivnost GPx u poređenju sa ispitanicima sa zdravim parodontcijumom, pre terapije. Pojedini autori objašnjavaju ovu pojavu kompenzatornim antioksidativnim mehanizmom koji nastaje kao odgovor na povećanje organskih peroksida pod dejstvom SR na parodontalna tkiva (Borges i sar., 2007). Slični rezultati dobijeni su u studiji koja je uključila obolele od parodontitisa i ispitanike sa zdravim parodontcijumom, gde je potvrđena statistički značajna veća aktivnost GPx pre terapije kod obolelih od parodontitisa u poređenju sa zdravima (Novakovic i sar., 2014).

Međutim, u toj istoj studiji je kod pacijenata obolelih od parodontitisa nakon konzervativnog tretmana došlo do značajnog povećanja aktivnosti GPx, dok je u ovoj doktorskoj disertaciji, statističkom analizom utvrđeno da se aktivnost GPx u okviru obe eksperimentalne grupe posle terapije smanjila, ali bez statističke značajnosti (u okviru grupe koja je primenjivala i HH, smanjenje je bilo veće). U još jednoj studiji su autori dokazali statističko povećanje aktivnosti GPx kod pacijenata obolelih od parodontitisa nakon konzervativnog tretmana (Bazyar i sar., 2020). Drugačiji rezultati, dobijeni su u studiji koja je analizirala razliku u parametrima oksidativnog statusa, između zdravih, obolelih od gingivitisa i parodontitisa. U toj studiji je aktivnost GPx bila statistički smanjena kod pacijenata koji su oboleli od parodontitisa u poređenju sa ostalim grupama (Kluknavská i sar., 2021). Nadalje, u sklopu ovog istraživanja, korelaciona analiza između eksperimentalnih grupa utvrdila je da je u grupi koja je pored konzervativne terapije koristila i HH statistički značajno smanjena aktivnost GPx u odnosu na grupu koja je bila tretirana samo konzervativnom terapijom. Daljim korelacionim analizama, utvrđena je pozitivna korelacija između aktivnosti GPx i ILZ u grupi koja je koristila i HH posle terapije. U KT grupi i pre i posle terapije potvrđena je pozitivna korelacija između aktivnosti GPx sa ILZ. Grupa koja je primenjivala i HH je pokazala negativnu korelaciju između aktivnosti GPx i AST posle primenjene terapije. Pozitivna korelacija je potvrđena za aktivnost GPx i LDH u KT grupi pre terapije. Sa druge strane, aktivnost GPx je u KT grupi pokazala negativnu korelaciju sa bakterijskim sojem *A. actinomycetemcomitans* pre terapije.

## **5.2 Uticaj dva terapijska protokola konzervativnog lečenja na aktivnost inflamatornih enzima**

### **5.2.1 Uticaj dva terapijska protokola konzervativnog lečenja na aktivnost alkalne fosfataze**

Mnogi istraživači dokazali su da je ukupna aktivnost ALP višestruko veća kod pacijenata sa parodontitisom, u poređenju sa pacijentima koji su imali gingivitis ili zdrav parodoncijum (Risteska i sar., 2021; Malhotra i sar., 2010; Totan i sar., 2006). Slični podaci, dobijeni su u okviru ove doktorske disertacije, gde su statistički značajno veće vrednosti ALP imali pacijenti oboleli od parodontitisa u obe eksperimentalne grupe, u odnosu na ispitanike sa zdravim parodoncijumom. U grupi koja je pored KT koristila i HH, došlo je do statistički značajnog smanjenja aktivnosti ALP posle terapije, dok to nije bio slučaj u grupi koja je bila tretirana samo konzervativnom terapijom. Možemo zaključiti da je primena rastvora HH uticala na značajno smanjenje ovog inflamatornog enzima. Korelacionom analizom između eksperimentalnih grupa, posle terapije, uočeno je da se aktivnost ALP u grupi koja je koristila HH smanjila (na granici statističke značajnosti). Aktivnost ALP je u KT+HH grupi pokazala značajnu negativnu korelaciju sa NPE posle terapije. U KT grupi je aktivnost ALP pozitivno korelirala sa GI pre terapije, što nam ukazuje na povezanost težine kliničke slike sa inflamacijom u parodoncijumu. U KT grupi posle terapije, uočena je pozitivna korelacija aktivnosti ALP i IKG, što potvrđuje poboljšanje kliničkih parametara primenom konzervativne terapije koja ujedno smanjuje inflamatorni proces u parodoncijumu. Daljim korelacionim analizama, uočena je pozitivna spona između aktivnosti ALP kao inflamatornog enzima i peripatogenog soja *P. gingivalis* posle primenjene terapije u obe eksperimentalne grupe. U KT grupi pre terapije, aktivnost ALP je bila u negativnoj korelaciji sa MK.

### **5.2.2 Uticaj dva terapijska protokola konzervativnog lečenja na aktivnost aspartat aminotransferaze**

Rezultati istraživanja su ukazali na povećanje nivog ovog enzima u salivi u toku destrukcije periodontalnog tkiva koja se odigrava kod pacijenata sa parodontitisom u odnosu na osobe koje imaju zdrav parodoncijum (Todorovic i sar., 2006; Totan i sar., 2006).



U okviru našeg istraživanja, obe eksperimentalne grupe pacijenata koji su oboleli od parodontitisa su imale povišene vrednosti AST pre terapije, u poređenju sa ispitanicima koji su imali zdrav parodontijum, ali bez statističke značajnosti. Statističkom analizom, pokazano je da se desila promena vrednosti AST u okviru grupa pre i posle terapije u smislu povećanja aktivnosti ovog enzima kod obe grupe, ali bez statističke značajnosti (kod obe grupe rezultat je bio na granici statističke značajnosti). Korelacionom analizom je utvrđeno je da je aktivnost AST u grupi koja je pored konzervativne terapije koristila i HH značajno porasla posle primenjenog tretmana, u poređenju sa KT grupom. Daljom korelacijom analizom, utvrđena je i pozitivna korelacija AST sa PI, GI, ali i negativna korelacija sa ILZ u KT grupi pre terapije. Posle primenjene terapije, u KT grupi je takođe prisutna pozitivna korelacija AST sa GI, kao i ista negativna korelacija sa ILZ. Aktivnost AST je pokazala značajnu negativnu korelaciju sa sa aktivnošću antioksidansa GPx u grupi koja je koristila i HH, posle primenjenog tretmana. Aktivnost AST je u negativnoj korelaciji sa mokraćnom kiselinom u KT grupi pre terapije. Posle terapije u KT grupi, postojala je pozitivna korelacija AST sa bakterijskim sojem *A. actinomycetemcomitans*.

### **5.2.3 Uticaj dva terapijska protokola konzervativnog lečenja na aktivnost alanin aminotransferaze**

Kada je reč o parodontitisu, povećan nivo ovog enzima reflektuje ćelijska oštećenja i metaboličke promene u inflamiranom gingivalnom tkivu. Pojedine studije su pokazale da su vrednosti ALT povišene kod inflamacije, što je i slučaj kod pacijenata koji boluju od parodontitisa. Utvrđeni su značajno veći nivoi ALT u salivi kod pacijenata sa gingivitisom i parodontitisom u poređenju sa onima koji su imali zdrav parodontijum, što ukazuje da aktivnost ovog enzima u salivi reflektuje inflamaciju i destrukciju parodontalnog tkiva, ukazujući na njihovu potencijalnu upotrebu kao veoma važnih kliničkih markera (Dabra i sar., 2012; Wiener i sar., 2016). Slični rezultati, dobijeni su u okviru ove doktorske disertacije, gde su statistički značajno veće vrednosti ALT imali pacijenti oboleli od parodontitisa u obe eksperimentalne grupe u odnosu na ispitanike sa zdravim parodontijumom. Posle primenjenog tretmana u grupi koja je koristila i HH je došlo do statistički značajnog smanjenja aktivnosti ALT, dok to nije bio slučaj kod pacijenata koji su bili podvrgnuti samo konzervativnim lečenjem. Ovi podaci mogu da ukažu na veću efikasnost kombinovane terapije hlorheksidinom u svetlu smanjenja aktivnosti zapaljenskih faktora (poput ALT), koji imaju značajnu ulogu u patogenezi parodontitisa. Korelacionom analizom između obe eksperimentalne grupe, nisu uočene statističke značajnosti posle primenjenog tretmana za vrednosti ALT. Pozitivna korelacija je potvrđena između aktivnosti ALT i IZK u KT grupi posle tretmana, što nam svakako ukazuje na značaj primene konzervativne terapije u poboljšanju parametara kliničkog statusa obolelih od parodontitisa.

### **5.2.4 Uticaj dva terapijska protokola konzervativnog lečenja na aktivnost laktat dehidrogenaze**

Povećana aktivnost LDH u gingivalnoj cervikalnoj tečnosti i salivi je posledica povećanog oslobađanja ovog enzima od strane oštećenih ćelija mekih tkiva parodontijuma i odraz metaboličkih promena u upaljenoj gingivi (Kaufman i Lamster, 2000; Ozmeric, 2004). Na primer, intenzivna inflamacija u pljuvačnim žlezdama izazvana periopatogenim bakterijama može izazvati ovo enzimsko oslobađanje (Todorovic i sar., 2006). Takođe, nivo LDH je povećan kod pacijenata sa parodontitisom u odnosu na pacijente sa zdravim parodontijumom, šta može dovesti do toga da jednog dana ovaj enzim bude odličan kandidat u funkciji epidemiološkog biomarkera za ovu bolest (Di Lenardo i sar., 2019). Slični rezultati, dobijeni su u okviru ove doktorske disertacije, gde su statistički značajno veće vrednosti LDH imali pacijenti oboleli od parodontitisa u obe eksperimentalne grupe u odnosu na ispitanike sa zdravim parodontijumom. Unutar obe eksperimentalne grupe se smanjila aktivnost LDH posle terapije, međutim bez statističke značajnosti.

Takođe, korelacionom analizom nije potvrđena značajnost posle terapije između dva različita protokola lečenja. Aktivnost LDH je pozitivno korelirala sa DS posle terapije kod pacijenata koji su primenjivali i HH u okviru lečenja. Ovakvi rezultati nam ukazuju na značajniju reparaciju oštećenih ćelija, potenciranu indirektnim delovanjem rastvora hlorheksidina kao dodatka konzervativnom lečenju, odnosno poboljšanju kliničkog statusa obolelih od parodontitisa. Pozitivna korelacija je uočena između aktivnosti LDH i PI u KT grupi pre terapije, dok je u istoj grupi posle terapije potvrđena takođe pozitivna korelacija istog enzima sa vrednostima GI, IKG, IMN i NPE, što nam svakako potvrđuje njegovu ulogu inflamatornog markera. Nadalje, negativna korelacija je prisutna između aktivnosti LDH i TAS pre terapije u KT+HH grupi. Ustanovljena je pozitivna korelacija ovog enzima sa periatogenim sojem *T. forsythia* posle terapije u grupi koja je primenjivala i HH uz konzervativno lečenje. Daljim analizama, ustanovljenje su i pozitivne korelacije pre terapije između aktivnosti LDH sa GPx i TAS, dok je sa mokraćnom kiselinom ta korelacija bila negativna.

### 5.2.5 Uticaj dva terapijska protokola konzervativnog lečenja na aktivnost kreatin kinaze

Povećana aktivnost CK u salivi ukazuje na patološki promene koje se nalaze u mekim tkivima, pre svega u gingivi. Ovo je verovatno posledica patoloških procesa u periodoncijumu odakle se ovaj intracelularni enzim pojačano oslobađa upravo u salivu. Ova činjenica bi u budućnosti mogla da dovede do upotrebe salivarnih dijagnostičkih testovi kojima bi kliničarima, neinvazivnom i jednostavnom metodom ukazala na početni stadijum parodontitisa, kada je u pitanju ovaj enzim (Todorovic i sar, 2006). Naravno, postoje brojne studije u kojima su se ispitivale vrednosti CK (iz krvi, salive) i u kojima su dokazane povećane vrednosti CK kod pacijenata sa parodontitisom u poređenju sa pacijentima koji su imali zdrav parodoncijum (Alshail i sar., 2016; Di Lenardo i sar, 2019). U našem istraživanju, vrednosti CK su bile više kod obolelih od parodontitisa, u poređenju sa ispitanicima koji su imali zdrav parodoncijum, međutim bez statističke značajnosti. Daljom statističkom analizom unutar eksperimentalnih grupa, potvrđeno je da su se vrednosti CK povećale posle terapije u obe grupe, ali bez statističke značajnosti. Nadalje, korelacionom analizom je uočeno da posle terapije između obe eksperimentalne grupe nije došlo do statistički značajne promene. U KT+HH grupi pre terapije, postojala je značajna negativna korelacija vrednosti CK sa indeksom mekih naslaga. Posle terapije u istoj grupi je primećena takođe negativna korelacija CK sa gingivalnim indeksom i dubinom sondiranja. U KT grupi pre terapije vrednost CK je negativno korelirala sa gingivalnim indeksom dok je posle terapije, takođe potvrđena negativna korelacija ovog enzima opet sa gingivalnim indeksom, ali i sa indeksom krvarenja gingive. Vrednost CK je negativno korelirala u KT+HH grupi pre terapije sa periopatogenim sojem *A. actinomycetemcomitans*. U KT grupi pre terapije, potvrđena je pozitivna korelacija CK sa mokraćnom kiselinom, dok je posle terapije ovaj enzim pozitivno korelirao sa periopatogenim sojem *T. denticola*.

### 5.2.6 Uticaj dva terapijska protokola konzervativnog lečenja na aktivnost gama glutamil transferaze

Protetkih godina postalo je sve jasnije da je GGT mnogo više od markera za bolesti jetre i da ima potencijalnu ulogu markera i u drugim inflamatornim oboljenjima. Merenje oksidativnog stresa u ćeliji zavisi od izuzetno osetljivih komercijalnih kitova i precizne kvantifikacije. Slobodni radikali su toliko reaktivni i kratkotrajni da direktno merenje obično nije moguće. Zbog toga se ROS uglavnom indirektno mere, nakon formiranja oksidativnih nusproizvoda lipida, proteina i nukleinskih kiselina. GGT je antioksidant koji sprečava štetne posledice ROS. Oštećenje ćelija jetre i žučnih puteva dovodi do oslobađanja GGT u serum, koji ulazi u cirkulaciju, otuda se naziva „enzim koji curi” (engl. „leaking enzyme”) i zato se povišene vrednosti GGT u serumu smatraju pouzdanim pokazateljem destruktivne aktivnosti (Dabra i sar., 2012). Za pokazivanje prisustva OS danas se koriste razni biomarkeri, među kojima je i GGT (Sreeram i sar., 2015).

U našem istraživanju, vrednosti GGT su bile više kod obolelih od parodontitisa, u poređenju sa ispitanicima koji su imali zdrav parodontijum, međutim bez statističke značajnosti. Daljom statističkom analizom unutar eksperimentalnih grupa, ustanovljeno je da se vrednost GGT značajno smanjila u grupi koja je koristila i HH, dok to nije bio slučaj u grupi pacijenata koji su bili tretirani samo konzervativnom terapijom. U okviru ove doktorske disertacije, korelacionom analizom je uočeno da između obe eksperimentalne grupe posle terapije nije došlo do statistički značajne promene. Druge korelacione analize, pokazale su značajnu negativnu povezanost GGT sa dubinom sondiranja u KT+HH grupi posle terapije. Sa druge strane, u KT grupi pacijenata i pre i posle terapije ustanovljene su iste korelacije značajnosti (pozitivne korelacije GGT sa gingivalnim indeksom, ali i negativne korelacije ovog enzima sa indeksom labavljanja zuba). U KT+HH grupi pre terapije, uočena je značajna pozitivna korelacija između vrednosti GGT i koncentracije 8-OHdG. Posle terapije u istoj grupi pacijenata, GGT je negativno korelirao sa *P. gingivalis*. Pre terapije, u KT grupi je potvrđena negativna korelacija sa mokraćnom kiselinom.

## 5.3 Uticaj dva terapijska protokola konzervativnog lečenja na zastupljenost peripatogenih sojeva

### 5.3.1 Uticaj dva terapijska protokola konzervativnog lečenja na zastupljenost *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

Ova bakterija poseduje leukotoksin (najvažniji faktor virulencije) zahvaljujući čemu ima sposobnost da uništi PMN i monocyte iz periferne krvi i na taj način direktno napada imunski sistem domaćina. Endotoksin (engl., *imunosupresion factor*) je drugi najvažniji faktor virulencije ove bakterije, zbog čega ima sposobnost da modulira imunski odgovor domaćina i doprinese destrukciji tkiva. Ovaj peripatogeni bakterijski soj učestvuje u procesu resorpcije alveolarne kosti, delovanjem preko lipopolisaharida koji stimulišu makrofage da oslobode interleukine IL-1, IL-1 $\beta$  i faktor nekroze tumora (engl., *tumor necrosis factor* TNF) (Baehni i sar., 1979; Saglie i sar., 1990). Njeno prisustvo u parodontalnim džepovima obično se povezuje sa agresivnim oblikom parodontopatije (Slots i Listgarten, 1988). U okviru našeg istraživanja, u obe grupe pacijenata koji su imali parodontitis distribucija *A. actinomycetemcomitans* je bila veća u odnosu na ispitanike sa zdravim parodontijumom, ali bez statističke značajnosti. Prateći rezultate pre i posle terapije, ustanovljeno je da se incidenca ovog mikroorganizama smanjila prateći oba protokola lečenja, ali bez dostizanja statistički značajne razlike između dve eksperimentalne grupe. Izostanak statističke značajnosti, bez obzira na smanjenje distribucije ove bakterije u obe grupe posle terapije, možemo objasniti činjenicom da eksperimentalne grupe nisu bile apsolutno homogene prema polu i starosnoj dobi. Ove podatke potvrđuje i studija čiji su rezultati ukazali da je distribucija *A. actinomycetemcomitans* u obrnutoj korelaciji sa godinama (češća prisutnost u uzorcima mlađih osoba), a u direktnoj relaciji sa polom (veća zastupljenost kod osoba ženskog pola) (Cortelli i sar., 2010). Ono što je pretragom dostupne literature evidentno, je da su većinom objavljene studije koje ispituju terapijske protokole različite od našeg, odnosno ispitivane su različite adjuvantne supstance ili metode koje su korišćene kao dodatak KT. Jedna od takvih studija novijeg datuma ispitivala je uticaj fotodinamske terapije kao dodatka KT na pacijentima koji su oboleli od parodontitisa. Rezultati dobijeni u toj studiji, slični su našim rezultatima, odnosno pokazali su da se distribucija bakterijskog soja *A. actinomycetemcomitans* značajno smanjila 3 meseca nakon primene kombinovane terapije u poređenju sa samo konzervativnom terapijom (Aabed i sar., 2022). U našoj studiji, u KT+HH grupi pre terapije, utvrđena je značajna negativna korelacija između *A. actinomycetemcomitans* i CK, dok je posle terapije ovaj bakterijski soj negativno korelirao i sa aktivnošću TAS i MK. U KT grupi pre terapije, ova bakterija je negativno korelirala sa aktivnošću GPx, dok je posle terapije pozitivna korelacija primećena sa vrednostima AST.

### 5.3.2 Uticaj dva terapijska protokola konzervativnog lečenja na zastupljenost *Porphyromonas gingivalis*

*Porphyromonas gingivalis* poseduje više faktora virulencije: proteaze koje degradiraju hijaluronsku kiselinu, imunoglobuline i kolagena vlakna; endotoksine, citotoksine i adhezine koji mogu da deluju direktno na peridoncijum, dovodeći do zapaljenske reakcije i posledičnog razaranja koštanog tkiva, tipičnim za parodontopatije (Holt i sar., 1999). U našem istraživanju, obe eksperimentalne grupe pacijenata obelilih od parodontitisa su imale veću distribuciju periopatogenog bakterijskog soja *P. gingivalis*, u odnosu na ispitanike sa zdravim parodontcijumom, ali bez statistički značajne razlike. Statističkom analizom u okviru eksperimentalnih grupa, uočeno je smanjenje incidence ovog soja, međutim bez statističke značajnosti pre i posle primene dva različita terapijska protokola. Korelaciona analiza između obe eksperimentalne grupe, nije pokazala statističku značajnost posle primenjene terapije. Međutim, postoje i studije u kojima je smanjenje *P. gingivalis* posle konzervativne terapije potvrđeno na značajnom nivou.

Dve kliničko-mikrobiološke studije novijeg datuma, ispitivale su uticaj konzervativne terapije između ostalog i na pacijentima obolelim od parodontitisa. U studijama su bila različiti vremenski periodi kontrolnih merenja (45 dana u jednoj studiji; 3 i 6 meseci u drugoj studiji), ali u obe studije je potvrđeno statističko značajno smanjenje distribucije *P. gingivalis* nakon konzervativne terapije (Cosgarea i sar., 2019; Moura i sar., 2021). U našoj studiji, u KT+HH grupi, dva meseca posle terapije uočena je pozitivna korelacija između *P. gingivalis* i vrednosti ALP. Ovakvi rezultati se mogu objasniti time da se zahvaljujući dejstvu HH u sklopu KT, smanjenjem incidence ove bakterije ujedno smanjuje i delovanje faktora virulencije (naročito proinflamatornih) koje ovaj soj poseduje, te se posledično smanjio i nivo inflamatornog enzima ALP. U istoj grupi je uočena i negativna korelacija ovog bakterijskog soja sa GGT u KT+HH grupi posle primenjene terapije. Primećena je pozitivna korelacija *P. gingivalis* sa istim enzimom (ALP) i u KT grupi posle terapije, što dodatno potvrđuje uticaj KT na smanjenje proinflamatornih faktora virulencije koje ova bakterija poseduje i kojima indirektno podstiče inflamatorni odgovor u toku patogeneze parodontitisa.

### 5.3.3 Uticaj dva terapijska protokola konzervativnog lečenja na zastupljenost *Tannerella forsythia*

*Tannerella forsythia* poseduje nekoliko faktora virulencije. Ovaj peripatogeni bakterijski soj nema mogućnost metabolisanja ugljenih hidrata, odnosno svojim proteaznim enzimima razgrađuje proteine domaćina i narušava integritet parodontalnog tkiva. Istovremeno, proizvodi glikozidaze, enzime odgovorne za degradaciju proteoglikana i oligosaharida, što aktivno doprinosi patogenezi parodontopatije. Takođe, preko adhezina, lako se vezuje za ćelije domaćina, a onda i zahvaljujući lipoproteinima koji ulaze u sastav membrane ove bakterije, dovodi do aktivacije imunskog odgovora domaćina, lučenjem proinflamatornih citokina (IL-6 i TNF- $\alpha$ ), ili uzrokuje apoptozu ćelije dejstvom preko površinskih lipoproteina (Tanner i Izard, 2006; Sharma, 2010; Zwickl i sar., 2020). Tokom progresije parodontitisa, promene u fiziologiji domaćina mogu značajno da utiču na mikrobiološku zajednicu dentalnog plaka i tako promene obrazac njihovog delovanja. U takvom scenariju, neke patogene bakterijske vrste deluju kao ključni igrači u mikrobiološkoj zajednici, čime se smatraju pokretačima čitave kaskade patoloških reakcija koje slede u toku patogeneze parodontitisa. *T. forsythia* upravo spada u te pokretače (Kuntal i sar., 2019). Ova bakterija je važan patogen povezan sa parodontitisom, može da inicira uništavanje gingivalnog tkiva i resorpciju alveolarne kosti (Chukkapalli i sar., 2015). Kang i sar., (2021) potvrdili su ovu teoriju, u njihovoj studiji koja je pokazala da je *T. forsythia* jedan od glavnih bakterijskih sojeva koji je pokretač progresije parodontitisa, kao i da se njena prevalenca može smanjiti značajno primenom i samo konzervativnog tretmana.

U okviru ove doktorske disertacije, uočena je statistički značajna veća distribucija *T. forsythia* kod obe eksperimentalne grupe pacijenata koji boluju od parodontitisa u odnosu na ispitanike sa zdravim parodontijumom. Ovi rezultati su u skladu sa nalazima drugih autora, koji povezuju težinu oboljenja sa statistički većom prevalencom *T. forsythia* kod uznapredovalog parodontitisa u odnosu na zdraviji parodontijum (Wara-aswapati i sar., 2009). Daljom analizom, praćenjem promena unutar eksperimentalnih grupa, potvrđeno je da se posle primenjene terapije u grupi koja je primenjivala i HH, statistički značajno smanjila distribucija periopatogenog soja *T. forsythia*. Drugačiji rezultati, dobijeni su u kliničko-mikrobiološkoj studiji u kojima su pacijenti oboleli od parodontitisa tretirani različitom kombinovanom KT. Pacijenti su podeljeni u tri grupe, što je podrazumevalo primenu 0,9% rastvora natrijum hlorida, 0,12% rastvora HH i 7,5% rastvor povidon joda u sklopu subgingivalne irigacije u toku izvođenja KT. Rezultati te studije, ukazali su da nije došlo do značajnog smanjenja u ukupnoj distribuciji *T. forsythia* ni u jednoj eksperimentalnoj grupi (kontrole posle 3 i 12 meseci), kao i da korelacionom analizom nije ustanovljeno statističko značajno smanjenje ukupne distribucije ovog soja posle terapije između svih grupa (Krück i sar., 2012). U našoj studiji smo daljom korelacionom analizom između obe eksperimentalne grupe, dobili značajno smanjenje distribucije ovog soja nakon primenjene terapije, samo u grupi koja je primenjivala HH, ukazujući na činjenicu da je KT u kombinaciji sa rastvorom HH postigla veće efekte u eradikaciji ovog mikroorganizma. U KT+HH grupi, pre terapije utvrđena je negativna korelacija *T. forsythia* sa aktivnošću MK, dok je u istoj grupi ali nakon terapije ovaj bakterijski soj pokazao pozitivnu korelaciju sa vrednostima LDH. Ovi rezultati se mogu objasniti činjenicom da se smanjenjem prevalencije ove bakterije, smanjuje delovanje virulentih faktora poput lipoproteina, te dolazi do posledično manjeg lučenja proinformativnih citokina i na kraju smanjenog delovanja inflamatornog enzima poput LDH.

#### **5.3.4 Uticaj dva terapijska protokola konzervativnog lečenja na zastupljenost *Eikenella corrodens***

*Eikenella corrodens* poseduje nekoliko faktora virulencije, koji su još pre nekoliko decenija dokazani. Među najvažnijim faktorima virulencije ovog patogena ubrajaju se: lipopolisaharidi (indukuju resorpciju kosti, stimulišu sintezu i oslobađanje TNF i IL-1); egzopolisaharidni sloj (ispoljava antifagocitnu aktivnost), adhezini (omogućavaju patogenu lakšu adheziju za receptorske ćelije domaćina) (C. K. Chen i Wilson, 1992). U ovoj studiji, ustanovljeno je da su svi pacijenti koji su oboleli od parodontitisa imali statistički značajno veću distribuciju bakterijskog soja *E. corrodens*, nego ispitanici koji nisu imali oboljenje parodontijuma. Nalazi slični našim, potvrđeni su u jednoj mikrobiološkoj studiji, koja je ispitivala prevalencu i distribuciju pet periopatogenih sojeva u uzorcima subgingivalnog dentalnog plaka, u odnosu na DS i njihove međusobne korelacije kod pacijenata sa parodontitisom. Rezultati u toj studiji pokazali da je *E. corrodens* kod svih ispitanika uključenih u istraživanje, imala najveću prevalencu u odnosu na druge sojeve, ali je uočena i linearna korelacija svih periopatogenih sojeva (između ostalog i *E. corrodens*) kod svih ispitivanih uzorka koji su imali DS > 5 mm (Wolff i sar., 1993). Međutim, evidentan je nedostatak studija koje su se bavile ispitivanjem uticaja HH rastvora u sklopu konzervativne parodontološke terapije, kao i studija novijeg datuma koje bi ispitivale ovaj periopatogeni soj i njegovu ulogu u patogenezi parodontitisa, u odnosu na različite vrste konzervativnih protokola. Pretraživanjem literature, postoje podaci o studijama koje su uglavnom ispitivale uticaj različitih lokalnih antimikrobnih proizvoda ili fotodinamske terapije u kombinaciji sa konzervativnom terapijom, u poređenju sa samo konzervativnom terapijom (Chondros i sar., 2009). U jednoj takvoj studiji, došli su do potvrde da nije postojala statistička razlika između dva terapijska protokola, odnosno da adjuvantna primena tetraciklinskih vlakana inkorporiranih u prethodne konzervativno tretirane parodontalne džepove nije doprinela značajnijem smanjenju ovog soja u odnosu na samo konzervativnu terapiju. Čak je došlo do povećane prevalencije *E. corrodens* na kontrolama posle 3 i 6 meseci, u odnosu na period pre početka terapije (Wong i sar., 1999). Slični rezultati dobijeni su u našoj studiji, gde korelacionom analizom između dva terapijska protokola nije uočena značajnost posle primenjene terapije kada je u pitanju distribucija *E. corrodens*.

U okviru našeg istraživanja, posle terapije, unutar obe eksperimentalne grupe distribucija *E. corrodens* se smanjila, ali ne na nivou statističke značajnosti. Dalje analize, potvrdile su samo jednu značajnu korelaciju ove bakterije (sa koncentracijom MDA) unutar KT grupe posle terapije.

### **5.3.5 Uticaj dva terapijska protokola konzervativnog lečenja na zastupljenost *Treponema denticola***

*Treponema denticola* proizvodi lipopolisaharide, kao i različite produkte metabolizma koji su potencijalno toksični. Posедуje adhezine kojima se lakše povezuje sa drugim bakterijama, čime ova koagregacija ima veoma važnu ulogu u progresiji parodontopatije. Takođe se pomoću adhezina vezuje i za fibroblaste u gingivi i dovodi do njihove destrukcije. Proteinaze, kao još jedan od faktora virulencije ovog patogena omogućavaju da ispolji značajan uticaj na modulaciju imunskog odgovora domaćina (Holt i Ebersole, 2005). U našoj studiji, od svih ispitivanih bakterijskih sojeva, jedino je ova bakterija imala apsolutnu distribuciju kod svih pacijenata koji imaju parodontitis, dok ni jedan zdrav ispitanik nije imao prisustvo iste bakterije u uzorcima. Statistička analiza, pokazala je značajno smanjenje distribucije ove bakterije posle terapije samo u grupi pacijenata koji su pored konzervativne terapije primenjivali i rastvor HH.

Ovakvi rezultati ukazuju na činjenicu da je KT u kombinaciji sa rastvorom HH postigla bolje efekte u eradikaciji ovog mikroorganizma. Ovakve činjenice, potvrđuju i rezultati prethodno objavljenje mikrobiološke studije u kojoj se potvrdila izuzetna efikasnost HH kao lokalnog antiseptika u različitim laboratorijskim uslovima (Haffajee i sar., 2008). Nalazi slični našim, potvrđeni su u kliničko-mikrobiološkoj studiji koja je ispitivala na pacijentima obolelim od parodontitisa efikasnost dva terapijska protokola, odnosno KT u odnosu na kombinovanu terapiju (koja je podrazumevala primenu KT i sistemske upotrebe antibiotika). Podaci u toj studiji su pokazali da je 12 meseci nakon terapije, kombinovana terapija dovela do značajnog smanjenja distribucije *T. denticola* u poređenju samo sa konzervativnom terapijom (Cosgarea i sar., 2020). U drugim kliničko-mikrobiološkim studijama, podaci ukazuju da smanjenje distribucije *T. denticola* nakon konzervativne terapije postoji, ali ne na nivou statističke značajnosti (niti unutar grupa, niti u korelacionim analizama između grupa). Međutim u jednoj takvoj studiji, opet je korišćena druga vrsta konzervativnog protokola, odnosno FMD (engl., *Full mouth disinfection*) (Peralta i sar., 2020) a kontrole su se vršile posle 3, 6 i 9 meseci od završetka terapije. U našem istraživanju, korelacionom analizom između obe eksperimentalne grupe posle terapije, uočeno je statistički značajno smanjenje distribucije *T. denticola* u grupi koja je koristila HH kao dodatak konzervativnoj terapiji. U KT+HH grupi pre terapije, ustanovljena je značajna negativna korelacija ove bakterije sa aktivnošću MK. Posle terapije, u KT grupi isti soj je pokazao značajnu negativnu korelaciju sa CK.

### **5.3.6 Uticaj dva terapijska protokola konzervativnog lečenja na ukupan broj periopatogenih mikroorganizama**

U sklopu ove doktorske disertacije, rezultati ukazuju da je smanjenje ukupnog broja bakterija potvrđeno na kontroli posle dva meseca i u KT+HH i KT grupi, ali je razlika bila značajna samo u grupi koja je primenjivala rastvor HH. Ovakve rezultate potvrđuju i rezultati nedavno objavljene studije autora Dorina i sar., (2019), premda je u njihovoj studiji HH bio u formi gela, a ne u vidu rastvora za ispiranje usta. Naime, uključili su 25 pacijenata obolelih od parodontitisa i podelili ih u dve eksperimentalne grupe. Jedna grupa je bila tretirana kombinacijom KT i HH gela, dok je druga tretirana samo KT. Na kontroli posle 15 dana od završene terapije, rezultati su pokazali statistički značajno smanjenje ukupnog broja bakterija, u grupi podvrgnutoj kombinovanoj terapiji, dok u grupi tretiranoj samo KT smanjenje nije bilo značajno. Ovo ukazuje da uprkos nekim mogućim neželjenim efektima, HH vredi razmotriti kao dodatak KT u tretmanu parodontonisa.

Na osnovu ovih, kao i naših rezultata, možemo svakako reći da je kombinovana terapija koja je podrazumevala primenu i rastvora hlorheksidina kao dodatka konzervativnoj terapiji, doprinela smanjenju prevalence ispitivanih periopatogenih sojeva, te tako ukazuje na značaj njegove rutinske primene kod pacijenata obolelih od parodontitisa, u poređenju sa primenjivanjem samo konzervativnog protokola. Naši rezultati su u potpunosti u saglasnosti sa onima do kojih su došli i Calderini i sar., (2013) koji su kao dodatak KT koristili i dve različite formulacije irigacionog gela HH (hlorheksidin-diglukonat sa hlorheksidin-dihidrohloridom u jednoj grupi; hlorheksidin-glukonat u kontrolnoj grupi) i ustanovili smanjenje broja svih analiziranih bakterijskih vrsta sa obe HH formulacije.

## 5.4 Uticaj dva terapijska protokola konzervativnog lečenja na parodontalni status

U ovom istraživanju pratili smo evaluaciju kliničkih parametara, odnosno različitih parodontalnih indeksa u svim grupama na početku terapije, zatim i dva meseca nakon terapije, unutar grupa, kao i između obe eksperimentalne grupe, kako bismo dobili verifikaciju koji terapijski protokol je efikasniji u tretiranju pacijenata koji boluju od parodontitisa.

U našem istraživanju, svi klinički parametri (osim ILZ) su pre terapije, kod svih pacijenata sa parodontitisom imali statistički značajno više vrednosti u poređenju sa ispitanicima koji su imali zdrav parodontijum. U skorašnjoj studiji, kineski autori su potvrdili značajno smanjenje vrednosti NPE i DS u grupi pacijenata obolelih od parodontitisa, 6 nedelja nakon konzervativnog tretmana (Ding i sar., 2022). Autori meta analize objavljene 2021.godine, koja je uključila studije koje su ispitivale različite vrste AO poput melatonina, propolisa, omega 3 masnih kiselina i sl., sugerišu da je kombinovana primena ovih supstanci uticala na značajno poboljšanje parodontalnog statusa, a naročito na smanjenje vrednosti DS u odnosu na samo primenjenu KT (Mizutani i sar., 2021). Proučavajući podatke sumirane u meta analizi autora Castro i sar., (2019), evidentno je da su do tada autori objavljivali studije koje su uglavnom vršile evaluaciju pojedinih kliničkih parametara (najčešće GI, PI, NPE i DS). U našem istraživanju ispitivane su vrednosti znatno većeg broja različitih indeksa koji mogu dati detaljniji uvid u stanje parodontijuma kod pacijenata obolelih od parodontitisa i uticaj dva različita terapijska protokola na svaki od njih. Rezultati te meta studije su bili vrlo heterogeni (vrednosti NPE bile značajno niže u studijama koje su uključivale kombinovanu terapiju u poređenju sa primenom samo KT; vrednosti PI bez značajne razlike na kontrolama do mesec dana, dok su na kontrolama posle 3 meseca i više, značajno niže posle primene kombinovane terapije; vrednosti GI na kontrola vršenim do 3 meseca značajno niže primenom kombinovane terapije, u odnosu sa samo KT; vrednosti DS na kontrola vršenim do mesec dana, pokazale su značajno niže vrednosti primenom kombinovane terapije u odnosu na samo KT; vrednost IKG bila značajno niža na kontrolama vršenim do mesec dana nakon primenjene kombinovane u odnosu na samo KT). Ono što je još evidentno u istoj meta studiji, jeste da su ispitivani različiti AO poput likopena, listova zelenog čaja, biljnih ulja, melatonina, vitamina A i C, ali ne i rastvora HH. U našem istraživanju, u obe eksperimentalne grupe je došlo do visoko statistički značajnog smanjenja svih ispitivanih kliničkih parametara nakon terapije, međutim za vrednost IMN u grupi koja je primenjivala samo KT smanjenje je bilo na nivou granice statističke značajnosti. Ovakav rezultat nam svakako ukazuje na značaj primene HH kao antiplak sredstva. Klinička studija koja je dobila slične rezultate, ispitivala je tri različita protokola lečenja (samo KT, kombinovanu KT sa rastvorom 0,2 % HH, kao i KT sa rastvorom 1,5% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), nakon 15, 30 i 90 dana, na pacijentima obolelim od parodontitisa. Dobijeni rezultati u toj studiji, pokazali su da je primena HH bila efikasnija u odnosu na ostale terapijske protokole u smislu redukcije vrednosti GI i DS, kao i na poboljšanje NPE, ali bez statističke značajnosti (Rashed, 2016).

Dalje korelacione analize u našem istraživanju, pokazale su u KT+HH grupi pre terapije negativnu korelaciju između vrednosti NPE i koncentracije 8-OHdG. Posle terapije u istoj grupi negativna korelacija potvrđena je između GI i koncentracije MDA, aktivnosti SOD i IZK, zatim pozitivne korelacije za koncentraciju MDA i IZK, ali i za aktivnosti GPx i ILZ. U KT grupi pre terapije utvrđene su dve pozitivne korelacije (između aktivnosti GPx i ILZ, kao i aktivnosti TAS i DS). U istoj grupi, posle terapije ustanovljene su takođe dve pozitivne korelacije (za aktivnost GPx i ILZ, kao u između aktivnosti TAS i ILZ).

U grupi koja je primenjivala i HH, posle terapije su uočene brojne značajne korelacije, poput negativne za vrednost CK sa GI i DS. Dalje analize, pokazale su takođe negativne korelacije između NPE sa ALP, zatim između DS sa GGT, dok je DS u pozitivnoj korelaciji sa LDH.

U grupi koja je tretirana samo konzervativnom terapijom, posle terapije postojale su brojne značajne korelacije sa biohemijskim parametrima, poput pozitivne između GI sa vrednostima AST, GGT i LDH, dok je isti indeks negativno korelirao sa CK. Pozitivne korelacije su uočene između IKG sa enzimima ALP i LDH, dok je isti indeks negativno korelirao sa CK. Indeks mekih naslaga je bio u pozitivnoj korelaciji sa LDH, kao i IZK sa ALT. Indeks labavljanja zuba je negativno korelirao sa enzimima AST i GGT. Nivo pripojnog epitela je u pozitivnoj korelaciji sa LDH.



## 6. ZAKLJUČCI

Uzimajući u obzir kliničke, biohemijske i mikrobiološke rezultate koji su dobijeni i prikazani u okviru ove doktorske disertacije, izvode se sledeći zaključci:

1. Lokalna primena 0,12% rastvorom hlorheksidin-diglukonata uz konzervativnu terapiju, uticala je na značajno smanjenje svih kliničkih parametara, dva meseca nakon terapije.
2. Primena samo konzervativne terapije, uticala je na smanjenje svih kliničkih parametara, osim indeksa mekih naslaga, dva meseca nakon terapije.
3. U grupi pacijenata koji su pored konzervativne terapije koristili i 0,12 % rastvor-hlorheksidin diglukonata, potvrđeno je značajno smanjenje koncentracije oksidativnog parametra malondialdehida, dva meseca nakon terapije, čime je HH pokazao i potvrdio antioksidativni potencijal.
4. Primena samo konzervativne terapije, uticala je na smanjenje koncentracije oba oksidativna parametra (malondialdehida i 8-hidroksi-2-deoksiguanozina) dva meseca nakon terapije, dok je isti terapijski protokol doveo i do značajnog povećanja aktivnosti mokraćne kiseline, što predstavlja potvrdu antioksidativnog potencijala ovog biohemijskog parametra u salivi .
5. Primena 0,12 % rastvora hlorheksidin-diglukonata kao dodatka konzervativnoj terapiji, uticala je na smanjenje vrednosti inflamatornih enzima (alanin aminotransferaze, alkalne fosfataze i gama glutamil transferaze) dva meseca nakon primenjene terapije, dok primena samo konzervativnog tretmana, nije uticala na značajno smanjenje ispitivanih inflamatornih enzima.
6. Primena oba konzervativna terapijska protokola, uticala su na smanjenje incidence svih ispitivanih peripatogenih sojeva, nakon terapije, ali bez statističke značajnosti u grupi koja je bila tretirana samo konzervativnom terapijom. Primena kombinovanog protokola, odnosno 0,12% rastvora hlorheksidin-diglukonata kao dodatka konzervativnoj terapiji, uticala je na značajno smanjenje incidence za sojeve *Treponema denticola* i *Tannerella forsythia*.
7. Primena oba konzervativna terapijska protokola, uticala su na smanjenje ukupnog broja svih ispitivanih peripatogenih sojeva, dva meseca nakon terapije, ali bez statističke značajnosti u grupi koja je bila tretirana samo konzervativnom terapijom. U grupi pacijenata koji su pored konzervativne terapije koristili i 0,12 % rastvor hlorheksidin-diglukonata, potvrđeno je značajno smanjenje ukupnog broja svih ispitivanih peripatogenih sojeva, dva meseca nakon terapije, čime je HH potvrdio antimikrobni potencijal.
8. Korelacione analize između oba terapijska protokola nakon završenih tretmana lečenja, potvrdile su da je:
  - konzervativna terapija uticala na značajnije poboljšanje kliničkog statusa za veći broj ispitivanih parodontalnih indeksa (plak indeks, gingivalni ideks, indeks krvarenja gingive, indeks mekih naslaga i indeks labavljanja zuba) u odnosu na kombinovanu terapiju (plak indeks, gingivalni ideks i indeks mekih naslaga);
  - oksidativno delovanje 8-hidroksi-2-deoksiguanozin značajno umanjeno primenom samo konzervativnog tretmana;
  - aktivnost glutation peroksidaze značajno smanjena kombinovanom terapijom (0,12 % rastvor hlorheksidin-diglukonata i konzervativnog tretmana), čime je HH ispoljio efekat potenciranja antioksidativne zaštite;
  - aktivnost mokraćne kiseline značajno smanjena samo kombinovanom primenom 0,12 % rastvor hlorheksidin-diglukonata i konzervativne terapije;
  - aktivnost aspartat aminotransferaze značajno porasla u grupi pacijenata koji su bili podvrgnuti kombinovanom terapijskom protokolu;
  - značajno smanjenje prisustva sojeva *Treponema denticola* i *Tannerella forsythia* potvrđeno nakon primene kombinovanog protokola.

Na osnovu iznetih rezultata u okviru ove doktorske disertacije, zaključuje se da je kombinovana primena 0,12 % rastvora hlorheksidin-diglukonata kao dodatka konzervativnoj terapiji, pokazala veću efikasnost u potenciranju delovanja antioksidativnih parametara poput glutation peroksidaze i mokraćne kiseline u salivi u odnosu na primenu samo konzervativnog tretmana. Kombinovani protokol je takođe doveo do značajnijeg smanjenja ukupnog broja mikroorganizama kao i do zastupljenosti sojeva *Treponema denticola* i *Tannerella forsythia* u subgingivalnom dentalnom plaku, u poređenju sa primenom samo konzervativnog tretmana lečenja pacijenata obolelih od parodontitisa.

## 7. LITERATURA

1. Aabed, K., Moubayed, N., BinShabaib, M. S., & ALHarthi, S. S. (2022). Is a single session of antimicrobial photodynamic therapy as an adjuvant to non-surgical scaling and root planing effective in reducing periodontal inflammation and subgingival presence of *Porphyromonas gingivalis* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 38, 102847. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2022.102847>
2. Aboodi, G. M., Goldberg, M. B., & Glogauer, M. (2011). Refractory periodontitis population characterized by a hyperactive oral neutrophil phenotype. *Journal of Periodontology*, 82(5), 726–733. <https://doi.org/10.1902/jop.2010.100508>
3. Ahmadi-Motamayel, F., Goodarzi, M. T., Jamshidi, Z., & Kebriaei, R. (2017). Evaluation of salivary and serum antioxidant and oxidative stress statuses in patients with chronic periodontitis: A case-control study. *Frontiers in Physiology*, 8(MAR), 6–11. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00189>
4. Akalin, F. A., Toklu, E., & Renda, N. (2005). Analysis of superoxide dismutase activity levels in gingiva and gingival crevicular fluid in patients with chronic periodontitis and periodontally healthy controls. *Journal of Clinical Periodontology*, 32(3), 238–243. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2005.00669.x>
5. Alimoradi, H., Greish, K., Gamble, A. B., & Giles, G. I. (2019). Controlled Delivery of Nitric Oxide for Cancer Therapy. *Pharmaceutical Nanotechnology*, 7(4), 279–303. <https://doi.org/10.2174/2211738507666190429111306>
6. Almerich-Silla, J. M., Montiel-Company, J. M., Pastor, S., Serrano, F., Puig-Silla, M., & Dasí, F. (2015). Oxidative Stress Parameters in Saliva and Its Association with Periodontal Disease and Types of Bacteria. *Disease Markers*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/653537>
7. AlMoharib, H. S., AlMubarak, A., AlRowis, R., Geevarghese, A., Preethanath, R. S., & Anil, S. (2014). Oral fluid based biomarkers in periodontal disease: part 1. Saliva. *Journal of international oral health : JIOH*, 6(4), 95–103. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25214743> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4148585>
8. Alshail, F., Aljohar, A., & Alshehri, M. (2016). Periodontal status and serum creatine kinase levels among young soccer players: A preliminary report. *Nigerian Journal of Clinical Practice*, 19(5), 655–658. <https://doi.org/10.4103/1119-3077.188708>
9. Altıngöz, S. M., Kurgan, Ş., Önder, C., Serdar, M. A., Ünlütürk, U., Uyanık, M., Başkal, N., Tatakis, D. N., & Günhan, M. (2021). Salivary and serum oxidative stress biomarkers and advanced glycation end products in periodontitis patients with or without diabetes: A cross-sectional study. *Journal of Periodontology*, 92(9), 1274–1285. <https://doi.org/10.1002/JPER.20-0406>
10. Apak, R., Özyürek, M., Güçlü, K., & Çapanoğlu, E. (2016). Antioxidant activity/capacity measurement. 1. Classification, physicochemical principles, mechanisms, and electron transfer (ET)-based assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(5), 997–1027. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b04739>
11. Armitage, G. C. (1999). Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Annals of Periodontology*, 4(1), 1–6. <https://doi.org/10.1902/annals.1999.4.1.1>
12. Armitage, G. C. (2004). Periodontal diagnoses and classification of periodontal diseases. *Periodontology 2000*, 34, 9–21. <https://doi.org/10.1046/j.0906-6713.2002.003421.x>
13. Arora, N., Avula, H., & Avula, J. K. (2013). The adjunctive use of systemic antioxidant therapy (lycopene) in nonsurgical treatment of chronic periodontitis: a short-term evaluation. *Quintessence international (Berlin, Germany : 1985)*, 44(6), 395–405. <https://doi.org/10.3290/j.qi.a29188>

14. Augusto, O., Bonini, M. G., Amanso, A. M., Linares, E., Santos, C. C. X., & De Menezes, S. L. (2002). Nitrogen dioxide and carbonate radical anion: two emerging radicals in biology. *Free Radical Biology & Medicine*, 32(9), 841–859. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(02\)00786-4](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(02)00786-4)
15. Baehni, P., Tsai, C. C., McArthur, W. P., Hammond, B. F., & Taichman, N. S. (1979). Interaction of inflammatory cells and oral microorganisms. VIII. Detection of leukotoxic activity of a plaque-derived gram-negative microorganism. *Infection and Immunity*, 24(1), 233–243. <https://doi.org/10.1128/iai.24.1.233-243.1979>
16. Baltacıoğlu, E., Yuva, P., Aydın, G., Alver, A., Kahraman, C., Karabulut, E., & Akalın, F. A. (2014). Lipid Peroxidation Levels and Total Oxidant/Antioxidant Status in Serum and Saliva From Patients With Chronic and Aggressive Periodontitis. Oxidative Stress Index: A New Biomarker for Periodontal Disease? *Journal of Periodontology*, 85(10), 1432–1441. <https://doi.org/10.1902/jop.2014.130654>
17. Bankur, P. K., Nayak, A., Bhat, K., Bankur, R., Naik, R., & Rajpoot, N. (2014). Comparison of culture and polymerase chain reaction techniques in the identification of *Tannerella forsythia* in periodontal health and disease, an in vitro study. *Journal of Indian Society of Periodontology*, 18(2), 155–160. <https://doi.org/10.4103/0972-124X.131312>
18. Banu, S., Jabir, N. R., Mohan, R., Manjunath, N. C., Kamal, M. A., Kumar, K. R. V., Zaidi, S. K., Khan, M. S., & Tabrez, S. (2015). Correlation of Toll-like receptor 4, interleukin-18, transaminases, and uric acid in patients with chronic periodontitis and healthy adults. *Journal of Periodontology*, 86(3), 431–439. <https://doi.org/10.1902/jop.2014.140414>
19. Batista, E. L., Novaes, A. B., Calvano, L. M., Do Prado, E. A., Goudouris, E. S., & Batista, F. C. (1999). Necrotizing ulcerative periodontitis associated with severe congenital immunodeficiency in a prepubescent subject: Clinical findings and response to intravenous immunoglobulin treatment. *Journal of Clinical Periodontology*, 26(8), 499–504. <https://doi.org/10.1034/j.1600-051X.1999.260802.x>
20. Battino, M., Ferreiro, M. S., Gallardo, I., Newman, H. N., & Bullon, P. (2002). The antioxidant capacity of saliva. *Journal of Clinical Periodontology*, 29(3), 189–194. <https://doi.org/10.1034/j.1600-051x.2002.290301x.x>
21. Bazyar, H., Maghsoumi-Norouzabad, L., Yarahmadi, M., Gholinezhad, H., Moradi, L., Salehi, P., Haghighi-Zadeh, M. H., & Zare Javid, A. (2020). The impacts of synbiotic supplementation on periodontal indices and biomarkers of oxidative stress in type 2 diabetes mellitus patients with chronic periodontitis under non-surgical periodontal therapy. A double-blind, placebo-controlled trial. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy*, 13, 19–29. <https://doi.org/10.2147/DMSO.S230060>
22. Beckman, J. S., Beckman, T. W., Chen, J., Marshall, P. A., & Freeman, B. A. (1990). Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(4), 1620–1624. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.4.1620>
23. Borges, I. J., Moreira, E. A. M., Filho, D. W., de Oliveira, T. B., da Silva, M. B. S., & Fröde, T. S. (2007). Proinflammatory and oxidative stress markers in patients with periodontal disease. *Mediators of Inflammation*, 2007, 45794. <https://doi.org/10.1155/2007/45794>
24. Bowen, W. H., Burne, R. A., Wu, H., & Koo, H. (2018). Oral Biofilms: Pathogens, Matrix, and Polymicrobial Interactions in Microenvironments. *Trends in Microbiology*, 26(3), 229–242. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2017.09.008>
25. Bowers, G. N., Bergmeyer, H. U., Horder, M., & Moss, D. W. (1980). International Federation of Clinical Chemistry. Committee on Standards. Expert Panel on Enzymes. Approved recommendation (1978) on IFCC methods for the measurement of catalytic concentration of enzymes (Part 1). *Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry*, 18(May 2014), 89–95. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/498526>
26. Boyce, B. F., & Xing, L. (2007). Biology of RANK, RANKL, and osteoprotegerin. *Arthritis Research & Therapy*, 9 Suppl 1(Suppl 1), S1. <https://doi.org/10.1186/ar2165>

27. Brajović, G., Popović, B., Puletić, M., Kostić, M., & Milašin, J. (2016). Estimation of total bacteria by real-time PCR in patients with periodontal disease. *Srpski Arhiv za Celokupno Lekarstvo*, 144(1–2), 10–14. <https://doi.org/10.2298/SARH1602010B>
28. Breuer, W., Shvartsman, M., & Cabantchik, Z. I. (2008). Intracellular labile iron. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 40(3), 350–354. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2007.03.010>
29. Brown, L. J., & Löe, H. (1993). Prevalence, extent, severity and progression of periodontal disease. *Periodontology 2000*, 2, 57–71. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.1993.tb00220.x>
30. Buczko, P., Zalewska, A., & Szarmach, I. (2015). Saliva and oxidative stress in oral cavity and in some systemic disorders. *Journal of Physiology and Pharmacology: An Official Journal of the Polish Physiological Society*, 66(1), 3–9.
31. Buege, J. A., & Aust, S. D. (1978). Microsomal lipid peroxidation. *Methods in Enzymology*, 52, 302–310. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(78\)52032-6](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(78)52032-6)
32. Cafiero, C., & Matarasso, S. (2013). Predictive, preventive, personalised and participatory periodontology: „the 5Ps age“ has already started. *EPMA Journal*, 4(1), 1. <https://doi.org/10.1186/1878-5085-4-16>
33. Calderini, A., Pantaleo, G., Rossi, A., Gazzolo, D., & Polizzi, E. (2013). Adjunctive effect of chlorhexidine antiseptics in mechanical periodontal treatment: first results of a preliminary case series. *International Journal of Dental Hygiene*, 11(3), 180–185. <https://doi.org/10.1111/idh.12009>
34. Canakci, C. F., Cicek, Y., Yildirim, A., Sezer, U., & Canakci, V. (2009). Increased Levels of 8-Hydroxydeoxyguanosine and Malondialdehyde and its Relationship with Antioxidant Enzymes in Saliva of Periodontitis Patients. *European Journal of Dentistry*, 03(02), 100–106. <https://doi.org/10.1055/s-0039-1697415>
35. Canakci, V., Yildirim, A., Canakci, C. F., Eltas, A., Cicek, Y., & Canakci, H. (2007). Total antioxidant capacity and antioxidant enzymes in serum, saliva, and gingival crevicular fluid of preeclamptic women with and without periodontal disease. *Journal of Periodontology*, 78(8), 1602–1611. <https://doi.org/10.1902/jop.2007.060469>
36. Castro, M. M. L., Duarte, N. N., Nascimento, P. C., Magno, M. B., Fagundes, N. C. F., Flores-Mir, C., Monteiro, M. C., Rösing, C. K., Maia, L. C., & Lima, R. R. (2019). Antioxidants as Adjuvants in Periodontitis Treatment: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/9187978>
37. Cekici, A., Kantarci, A., Hasturk, H., & Van Dyke, T. E. (2014). Inflammatory and immune pathways in the pathogenesis of periodontal disease. *Periodontology 2000*, 64(1), 57–80. <https://doi.org/10.1111/prd.12002>
38. Chang, D. H. L., Crowson, S. S., & Williamson, J. B. (1992). *Lipid Peroxidation: Chemical Mechanism, Biological Implications and Analytical Determination*. 3–30. <http://patft.uspto.gov/netacgi/nph-Parser?Sect1=PTO2&Sect2=HITOFF&p=1&u=/netahtml/PTO/search-bool.html&r=12&f=G&l=50&co1=AND&d=PTXT&s1=D331,419&OS=D331,419&RS=D331,419>
39. Chapple, I. L. (1997). Reactive oxygen species and antioxidants in inflammatory diseases. *Journal of Clinical Periodontology*, 24(5), 287–296. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051x.1997.tb00760.x>
40. Chapple, I. L. C., Mealey, B. L., Van Dyke, T. E., Bartold, P. M., Dommisch, H., Eickholz, P., Geisinger, M. L., Genco, R. J., Glogauer, M., Goldstein, M., Griffin, T. J., Holmstrup, P., Johnson, G. K., Kapila, Y., Lang, N. P., Meyle, J., Murakami, S., Plemmons, J., Romito, G. A., ... Yoshie, H. (2018). Periodontal health and gingival diseases and conditions on an intact and a reduced periodontium: Consensus report of workgroup 1 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *Journal of periodontology*, 89(December 2017), S74–S84. <https://doi.org/10.1002/JPER.17-0719>

41. Chen, C. K., & Wilson, M. E. (1992). *Eikenella corrodens* in human oral and non-oral infections: a review. *Journal of Periodontology*, 63(12), 941–953. <https://doi.org/10.1902/jop.1992.63.12.941>
42. Chen, M., Cai, W., Zhao, S., Shi, L., Chen, Y., Li, X., Sun, X., Mao, Y., He, B., Hou, Y., Zhou, Y., Zhou, Q., Ma, J., & Huang, S. (2019). Oxidative stress-related biomarkers in saliva and gingival crevicular fluid associated with chronic periodontitis: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Clinical Periodontology*, 46(6), 608–622. <https://doi.org/10.1111/jcpe.13112>
43. Chondros, P., Nikolidakis, D., Christodoulides, N., Rössler, R., Gutknecht, N., & Sculean, A. (2009). Photodynamic therapy as adjunct to non-surgical periodontal treatment in patients on periodontal maintenance: a randomized controlled clinical trial. *Lasers in Medical Science*, 24(5), 681–688. <https://doi.org/10.1007/s10103-008-0565-z>
44. Chukkapalli, S. S., Rivera-Kweh, M. F., Velsko, I. M., Chen, H., Zheng, D., Bhattacharyya, I., Gangula, P. R., Lucas, A. R., & Kesavalu, L. (2015). Chronic oral infection with major periodontal bacteria *Tannerella forsythia* modulates systemic atherosclerosis risk factors and inflammatory markers. *Pathogens and Disease*, 73(3), 1–12. <https://doi.org/10.1093/femspd/ftv009>
45. Cieplik, F. (2022). *The dental plaque biofilm matrix*. 86(1), 32–56. <https://doi.org/10.1111/prd.12361>.The
46. Ćolak, E. (2008). New markers of oxidative damage to macromolecules. *Journal of Medical Biochemistry*, 27(1), 1–16. <https://doi.org/10.2478/v10011-007-0049-x>
47. Cortelli, J. R., Roman-Torres, C. V. G., Aquino, D. R., Franco, G. C. N., Costa, F. O., & Cortelli, S. C. (2010). Occurrence of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in Brazilians with chronic periodontitis. *Brazilian Oral Research*, 24(2), 217–223. <https://doi.org/10.1590/S1806-83242010000200015>
48. Cosgarea, R., Eick, S., Jepsen, S., Arweiler, N. B., Juncar, R., Tristiu, R., Salvi, G. E., Heumann, C., & Sculean, A. (2020). Microbiological and host-derived biomarker evaluation following non-surgical periodontal therapy with short-term administration of systemic antimicrobials: secondary outcomes of an RCT. *Scientific Reports*, 10(1), 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-73054-8>
49. Cosgarea, R., Tristiu, R., Dumitru, R. B., Arweiler, N. B., Rednic, S., Sirbu, C. I., Lascu, L., Sculean, A., & Eick, S. (2019). Effects of non-surgical periodontal therapy on periodontal laboratory and clinical data as well as on disease activity in patients with rheumatoid arthritis. *Clinical Oral Investigations*, 23(1), 141–151. <https://doi.org/10.1007/s00784-018-2420-3>
50. Dabra, S., China, K., & Kaushik, A. (2012). Salivary enzymes as diagnostic markers for detection of gingival/periodontal disease and their correlation with the severity of the disease. *Journal of Indian Society of Periodontology*, 16(3), 358–364. <https://doi.org/10.4103/0972-124X.100911>
51. Dalle-Donne, I., Rossi, R., Colombo, R., Giustarini, D., & Milzani, A. (2006). Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clinical Chemistry*, 52(4), 601–623. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2005.061408>
52. Darveau, R. P. (2010). Periodontitis: A polymicrobial disruption of host homeostasis. *Nature Reviews Microbiology*, 8(7), 481–490. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2337>
53. Decker, M. D. (1986). *Eikenella corrodens*. *Infection Control: IC*, 7(1), 36–41. <https://doi.org/10.1017/s0195941700063797>
54. Di Lenardo, D., Silva, F. R. P. Da, De Carvalho França, L. F., Carvalho, J. D. S., Alves, E. H. P., & Vasconcelos, D. F. P. (2019). Evaluation of Biochemical Parameters Present in the Saliva of Patients with Chronic Periodontitis: Results from a Meta-Analysis. *Genetic Testing and Molecular Biomarkers*, 23(4), 255–263. <https://doi.org/10.1089/gtmb.2017.0272>
55. Diab-Ladki, R., Pellat, B., & Chahine, R. (2003). Decrease in the total antioxidant activity of saliva in patients with periodontal diseases. *Clinical oral investigations*, 7(2), 103–107. <https://doi.org/10.1007/s00784-003-0208-5>

56. Dias, I. H. K., Matthews, J. B., Chapple, I. L. C., Wright, H. J., Dunston, C. R., & Griffiths, H. R. (2011). Activation of the neutrophil respiratory burst by plasma from periodontitis patients is mediated by pro-inflammatory cytokines. *Journal of Clinical Periodontology*, *38*(1), 1–7. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2010.01628.x>
57. Ding, N., Luo, M., Wen, Y. H., Li, R. Y., & Bao, Q. Y. (2022). The Effects of Non-Surgical Periodontitis Therapy on the Clinical Features and Serological Parameters of Patients Suffering from Rheumatoid Arthritis as Well as Chronic Periodontitis. *Journal of Inflammation Research*, *15*(June 2021), 177–185. <https://doi.org/10.2147/JIR.S326896>
58. Dorina, L., Annalisa, P., Ornella, D., Alessandro, B., Liliana, O., Marco, G., Michele, D. G., & Valentina, C. (2019). The use of a new chemical device based on silver and cationic surfactants as a new approach for daily oral hygiene: A preliminary study on a group of periodontal patients. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, *33*. <https://doi.org/10.1177/2058738419868101>
59. Dröge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews*, *82*(1), 47–95. <https://doi.org/10.1152/physrev.00018.2001>
60. Đukić, M., Ninković, M., & Jovanović, M. (2008). Oxidative stress - Clinical diagnostic significance. *Journal of Medical Biochemistry*, *27*(4), 409–425. <https://doi.org/10.2478/v10011-008-0024-1>
61. El-Benna, J., Hurtado-Nedelec, M., Marzaioli, V., Marie, J. C., Gougerot-Pocidallo, M. A., & Dang, P. M. C. (2016). Priming of the neutrophil respiratory burst: role in host defense and inflammation. *Immunological Reviews*, *273*(1), 180–193. <https://doi.org/10.1111/imr.12447>
62. Escribano, M., Herrera, D., Morante, S., Teughels, W., Quirynen, M., & Sanz, M. (2010). Efficacy of a low-concentration chlorhexidine mouth rinse in non-compliant periodontitis patients attending a supportive periodontal care programme: A randomized clinical trial. *Journal of Clinical Periodontology*, *37*(3), 266–275. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2009.01521.x>
63. Feres, F Teles, R. Teles, L. C Figueiredo, M. F. (2017). The subgingival periodontal microbiota in the aging mouth Magda. *Physiology & behavior*, *176*(1), 139–148. <https://doi.org/10.1111/prd.12136>.The
64. Ferrer-Sueta, G., Campolo, N., Trujillo, M., Bartesaghi, S., Carballal, S., Romero, N., Alvarez, B., & Radi, R. (2018). Biochemistry of Peroxynitrite and Protein Tyrosine Nitration. *Chemical Reviews*, *118*(3), 1338–1408. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00568>
65. Gamon, L. F., & Wille, U. (2016). Oxidative Damage of Biomolecules by the Environmental Pollutants NO<sub>2</sub>(•) and NO<sub>3</sub>(•). *Accounts of Chemical Research*, *49*(10), 2136–2145. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.6b00219>
66. Gaschler, M. M., & Stockwell, B. R. (2017). Lipid peroxidation in cell death. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *482*(3), 419–425. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.10.086>
67. Gautam, A., Mittal, N., Mishra, S. P., Singh, T. B., & Chandra, A. (2022). Evaluation of the effect of nonsurgical periodontal therapy on malondialdehyde and 8-hydroxy deoxyguanosine levels in chronic periodontitis. *Indian Journal of Dental Research : Official Publication of Indian Society for Dental Research*, *33*(1), 41–45. [https://doi.org/10.4103/ijdr.ijdr\\_912\\_21](https://doi.org/10.4103/ijdr.ijdr_912_21)
68. Ghallab, N. A. (2018). Diagnostic potential and future directions of biomarkers in gingival crevicular fluid and saliva of periodontal diseases: Review of the current evidence. *Archives of Oral Biology*, *87*(December 2017), 115–124. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2017.12.022>
69. Gharbi, A., Hamila, A., Bouguezzi, A., Dandana, A., Ferchichi, S., Chandad, F., Guezguez, L., & Miled, A. (2019). Biochemical parameters and oxidative stress markers in Tunisian patients with periodontal disease. *BMC Oral Health*, *19*(1), 4–9. <https://doi.org/10.1186/s12903-019-0912-4>

70. Goldstein, S., Michel, C., Bors, W., Saran, M., & Czapski, G. (1988). A critical reevaluation of some assay methods for superoxide dismutase activity. *Free Radical Biology and Medicine*, 4(5), 295–303. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(88\)90050-0](https://doi.org/10.1016/0891-5849(88)90050-0)
71. Graves, D. (2008). Cytokines that promote periodontal tissue destruction. *Journal of Periodontology*, 79(8 Suppl), 1585–1591. <https://doi.org/10.1902/jop.2008.080183>
72. Green, M. R., & Sambrook, J. (2020). Polyacrylamide Gel Electrophoresis. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2020(12), 525–532. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot100412>
73. Guentsch, A., Preshaw, P. M., Bremer-Streck, S., Klinger, G., Glockmann, E., & Sigusch, B. W. (2008). Lipid peroxidation and antioxidant activity in saliva of periodontitis patients: Effect of smoking and periodontal treatment. *Clinical Oral Investigations*, 12(4), 345–352. <https://doi.org/10.1007/s00784-008-0202-z>
74. Haffajee, A. D., Yaskell, T., & Socransky, S. S. (2008). Antimicrobial effectiveness of an herbal mouthrinse compared with an essential oil and a chlorhexidine mouthrinse. *Journal of the American Dental Association (1939)*, 139(5), 606–611. <https://doi.org/10.14219/jada.archive.2008.0222>
75. Halliwell B. (1994). Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *FREE RADICALS AND ANTIOXIDANTS*, 344, 721–724.
76. Hegde, M. N., Hegde, N. D., Ashok, A., & Shetty, S. (2013). Evaluation of total antioxidant capacity of saliva and serum in caries-free and caries-active adults: an in-vivo study. *Indian Journal of Dental Research : Official Publication of Indian Society for Dental Research*, 24(2), 164–167. <https://doi.org/10.4103/0970-9290.116670>
77. Hendek, M. K., Erdemir, E. O., Kisa, U., & Ozcan, G. (2015). Effect of Initial Periodontal Therapy on Oxidative Stress Markers in Gingival Crevicular Fluid, Saliva, and Serum in Smokers and Non-Smokers With Chronic Periodontitis. *Journal of Periodontology*, 86(2), 273–282. <https://doi.org/10.1902/jop.2014.140338>
78. Higdon, A., Diers, A. R., Oh, J. Y., Landar, A., & Darley-Usmar, V. M. (2012). Cell signalling by reactive lipid species: new concepts and molecular mechanisms. *The Biochemical Journal*, 442(3), 453–464. <https://doi.org/10.1042/BJ20111752>
79. Highfield, J. (2009). Diagnosis and classification of periodontal disease. *Australian Dental Journal*, 54, S11–S26. <https://doi.org/10.1111/j.1834-7819.2009.01140.x>
80. Holt, S. C., & Ebersole, J. L. (2005). Porphyromonas gingivalis, Treponema denticola, and Tannerella forsythia: The „red complex“, a prototype polybacterial pathogenic consortium in periodontitis. *Periodontology 2000*, 38, 72–122. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2005.00113.x>
81. Holt, S. C., Kesavalu, L., Walker, S., & Genco, C. A. (1999). Virulence factors of Porphyromonas gingivalis. *Periodontology 2000*, 20, 168–238. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.1999.tb00162.x>
82. Iorio-Siciliano, V., Ramaglia, L., Isola, G., Blasi, A., Salvi, G. E., & Sculean, A. (2021). Changes in clinical parameters following adjunctive local sodium hypochlorite gel in minimally invasive nonsurgical therapy (MINST) of periodontal pockets: a 6-month randomized controlled clinical trial. *Clinical Oral Investigations*, 25(9), 5331–5340. <https://doi.org/10.1007/s00784-021-03841-8>
83. Kang, Y., Sun, B., Chen, Y., Lou, Y., Zheng, M., & Li, Z. (2021). Dental Plaque Microbial Resistomes of Periodontal Health and Disease and Their Changes after Scaling and Root Planing Therapy. *mSphere*, 6(4), 1–20. <https://doi.org/10.1128/msphere.00162-21>
84. Kantarci, A., Oyaizu, K., & Van Dyke, T. E. (2003). Neutrophil-mediated tissue injury in periodontal disease pathogenesis: findings from localized aggressive periodontitis. *Journal of Periodontology*, 74(1), 66–75. <https://doi.org/10.1902/jop.2003.74.1.66>
85. Karpiński, T. M., & Szkaradkiewicz, A. K. (2015). Chlorhexidine - Pharmacobiological activity and application. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 19(7), 1321–1326.



86. Kaufman, E., & Lamster, I. B. (2000). Analysis of saliva for periodontal disease. Analysis of saliva may offer a cost-effective approach to assessment of periodontal disease in large populations. *J Clin Periodontol* *J Clin Periodontol C Munksgaard*, 27(27), 453–465.
87. Kesic, Milasin, Igetic, & Obradovic. (2008). Microbial etiology of periodontal disease - Mini Review. *Medicine and Biology*, 15(1), 1–6.
88. Kim, S. C., Kim, O. S., Kim, O. J., Kim, Y. J., & Chung, H. J. (2010). Antioxidant profile of whole saliva after scaling and root planing in periodontal disease. *Journal of Periodontal and Implant Science*, 40(4), 164–171. <https://doi.org/10.5051/jpis.2010.40.4.164>
89. Kinney, J. S., Morelli, T., Braun, T., Ramseier, C. A., Herr, A. E., Sugai, J. V., Shelburne, C. E., Rayburn, L. A., Singh, A. K., & Giannobile, W. V. (2011). Saliva/pathogen biomarker signatures and periodontal disease progression. *Journal of Dental Research*, 90(6), 752–758. <https://doi.org/10.1177/0022034511399908>
90. Kluknavská, J., Krajčíková, K., Bolerázka, B., Mašlanková, J., Ohlasová, J., Timková, S., Drotárová, Z., & Vašková, J. (2021). Possible prognostic biomarkers of periodontitis in saliva. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 25(8), 3154–3161. [https://doi.org/10.26355/eurrev\\_202104\\_25724](https://doi.org/10.26355/eurrev_202104_25724)
91. Konopka, T., Król, K., Kopeć, W., & Gerber, H. (2007). Total antioxidant status and 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine levels in gingival and peripheral blood of periodontitis patients. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 55(6), 417–422. <https://doi.org/10.1007/s00005-007-0047-1>
92. Korte, D. L., & Kinney, J. (2016). Personalized medicine: An update of salivary biomarkers for periodontal diseases. *Periodontology* 2000, 70(1), 26–37. <https://doi.org/10.1111/prd.12103>
93. Krück, C., Eick, S., Knöfler, G. U., Purschwitz, R. E., & Jentsch, H. F. R. (2012). Clinical and Microbiologic Results 12 Months After Scaling and Root Planing With Different Irrigation Solutions in Patients With Moderate Chronic Periodontitis: A Pilot Randomized Trial. *Journal of Periodontology*, 83(3), 312–320. <https://doi.org/10.1902/jop.2011.110044>
94. Kundalić, J., Pavlović, D., Jevtović-Stoimenov, T., Cvetković, T., Obradović, R., Kesić, L., Pejčić, A., Kundalić, B., & Stošić, N. (2016). Oxidative Stress in the Pathogenesis of Periodontal Disease. *Acta Medica Medianae*, 2, 66–72. <https://doi.org/10.5633/amm.2016.0409>
95. Kuntal, B. K., Chandrakar, P., Sadhu, S., & Mande, S. S. (2019). 'NetShift': a methodology for understanding 'driver microbes' from healthy and disease microbiome datasets. *ISME Journal*, 13(2), 442–454. <https://doi.org/10.1038/s41396-018-0291-x>
96. Kurgan, S., Önder, C., Altıngöz, S. M., Bağış, N., Uyanik, M., Serdar, M. A., & Kantarci, A. (2015). High sensitivity detection of salivary 8-hydroxy deoxyguanosine levels in patients with chronic periodontitis. *Journal of Periodontal Research*, 50(6), 766–774. <https://doi.org/10.1111/jre.12263>
97. Landzberg, M., Doering, H., Aboodi, G. M., Tenenbaum, H. C., & Glogauer, M. (2015). Quantifying oral inflammatory load: oral neutrophil counts in periodontal health and disease. *Journal of Periodontal Research*, 50(3), 330–336. <https://doi.org/10.1111/jre.12211>
98. Lang, N. P., & Bartold, P. M. (2018). Periodontal health. *Journal of periodontology*, 89(August 2016), S9–S16. <https://doi.org/10.1002/JPER.16-0517>
99. Lee, D.-H., Blomhoff, R., & Jacobs, D. R. J. (2004). Is serum gamma glutamyltransferase a marker of oxidative stress? *Free Radical Research*, 38(6), 535–539. <https://doi.org/10.1080/10715760410001694026>
100. Leite, M. F., Ferreira, N. F. D. A., Shitsuka, C. D. W. M., Lima, A. M., Masuyama, M. M., Sant'Anna, G. R., Yamaguti, P. M., Polotow, T. G., & De Barros, M. P. (2012). Effect of topical application of fluoride gel NaF 2% on enzymatic and non-enzymatic antioxidant parameters of saliva. *Archives of Oral Biology*, 57(6), 630–635. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2011.10.022>

101. Liu, T., Stern, A., Roberts, L. J., & Morrow, J. D. (1999). The isoprostanes: novel prostaglandin-like products of the free radical-catalyzed peroxidation of arachidonic acid. *Journal of Biomedical Science*, 6(4), 226–235. <https://doi.org/10.1007/BF02253564>
102. Liu, Z., Que, S., Xu, J., & Peng, T. (2014). Alanine aminotransferase-old biomarker and new concept: A review. *International Journal of Medical Sciences*, 11(9), 925–935. <https://doi.org/10.7150/ijms.8951>
103. Llana-Puy, C. (2006). The rôle of saliva in maintaining oral health and as an aid to diagnosis. *Medicina Oral, Patologia Oral y Cirugia Bucal*, 11(5), E449-55.
104. Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., & Chandra, N. (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy Reviews*, 4(8), 118–126. <https://doi.org/10.4103/0973-7847.70902>
105. Loos, B. G., & Tjoa, S. (2005). Host-derived diagnostic markers for periodontitis: Do they exist in gingival crevice fluid? *Periodontology 2000*, 39, 53–72. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2005.00129.x>
106. Lourenço, T. G. B., Heller, D., Silva-Boghossian, C. M., Cotton, S. L., Paster, B. J., & Colombo, A. P. V. (2014). Microbial signature profiles of periodontally healthy and diseased patients. *Journal of Clinical Periodontology*, 41(11), 1027–1036. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12302>
107. Lubos, E., Loscalzo, J., & Handy, D. E. (2011). Glutathione peroxidase-1 in health and disease: From molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxidants and Redox Signaling*, 15(7), 1957–1997. <https://doi.org/10.1089/ars.2010.3586>
108. Luke, R., Khan, S. N., Iqbal, P. S., Soman, R. R., Chakkarayan, J., & Krishnan, V. (2015). Estimation of Specific Salivary Enzymatic Biomarkers in Individuals with Gingivitis and Chronic Periodontitis: A Clinical and Biochemical Study. *Journal of international oral health : JIOH*, 7(9), 54–57. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26435618> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4589720>
109. Luo, G., Zhang, J., Zhang, S., Hu, B., Hu, L., & Huang, Z. (2020). *Since January 2020 Elsevier has created a COVID-19 resource centre with free information in English and Mandarin on the novel coronavirus COVID- 19 . The COVID-19 resource centre is hosted on Elsevier Connect , the company 's public news and information . January.*
110. M., Q., W., T., M., D. S., & D., van S. (2002). Topical antiseptics and antibiotics in the initial therapy of chronic adult periodontitis: microbiological aspects. *Periodontology 2000*, 28, 72–90. <http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L35681506>
111. Maciejczyk, M., Nesterowicz, M., Zalewska, A., Biedrzycki, G., Gerreth, P., Hojan, K., & Gerreth, K. (2022). Salivary Xanthine Oxidase as a Potential Biomarker in Stroke Diagnostics. *Frontiers in Immunology*, 13(May), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.897413>
112. Malhotra, R., Grover, V., Kapoor, A., & Kapur, R. (2010). Alkaline phosphatase as a periodontal disease marker. *Indian Journal of Dental Research : Official Publication of Indian Society for Dental Research*, 21(4), 531–536. <https://doi.org/10.4103/0970-9290.74209>
113. Matés, J. M., Pérez-Gómez, C., & Núñez de Castro, I. (1999). Antioxidant enzymes and human diseases. *Clinical Biochemistry*, 32(8), 595–603. [https://doi.org/10.1016/s0009-9120\(99\)00075-2](https://doi.org/10.1016/s0009-9120(99)00075-2)
114. McCulloch, C. A. (1994). Host enzymes in gingival crevicular fluid as diagnostic indicators of periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology*, 21(7), 497–506. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051x.1994.tb00414.x>
115. McLeish, M. J., & Kenyon, G. L. (2005). Relating structure to mechanism in creatine kinase. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 40(1), 1–20. <https://doi.org/10.1080/10409230590918577>

116. Miller, C. S., Foley, J. D., Bailey, A. L., Campell, C. L., Humphries, R. L., Christodoulides, N., Floriano, P. N., Simmons, G., Bhagwandin, B., Jacobson, J. W., Redding, S. W., Ebersole, J. L., & McDevitt, J. T. (2010). Current developments in salivary diagnostics. *Biomarkers in Medicine*, 4(1), 171–189. <https://doi.org/10.2217/bmm.09.68>
117. Miller, N. J., Rice-Evans, C., Davies, M. J., Gopinathan, V., & Milner, A. (1993). A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clinical Science*, 84(4), 407–412. <https://doi.org/10.1042/cs0840407>
118. Miricescu, D., Totan, A., Calenic, B., Mocanu, B., Didilescu, A., Mohora, M., Spinu, T., & Greabu, M. (2014). Salivary biomarkers: Relationship between oxidative stress and alveolar bone loss in chronic periodontitis. *Acta Odontologica Scandinavica*, 72(1), 42–47. <https://doi.org/10.3109/00016357.2013.795659>
119. Mittal, M., Siddiqui, M. R., Tran, K., Reddy, S. P., & Malik, A. B. (2014). Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury. *Antioxidants and Redox Signaling*, 20(7), 1126–1167. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.5149>
120. Mizutani, K., Buranasin, P., Mikami, R., Takeda, K., Kido, D., Watanabe, K., Takemura, S., Nakagawa, K., Kominato, H., Saito, N., Hattori, A., & Iwata, T. (2021). Effects of antioxidant in adjunct with periodontal therapy in patients with type 2 diabetes: A systematic review and meta-analysis. *Antioxidants*, 10(8), 1–15. <https://doi.org/10.3390/antiox10081304>
121. Mombelli, A. (2018). Microbial colonization of the periodontal pocket and its significance for periodontal therapy. *Periodontology 2000*, 76(1), 85–96. <https://doi.org/10.1111/prd.12147>
122. Moolya, N. N., Shetty, A., Gupta, N., Gupta, A., Jalan, V., & Sharma, R. (2014). Orthodontic bracket designs and their impact on microbial profile and periodontal disease: A clinical trial. *Journal of Orthodontic Science*, 3(4), 125–131. <https://doi.org/10.4103/2278-0203.143233>
123. Moura, M. F., Cota, L. O. M., Silva, T. A., Cortelli, S. C., Ferreira, G. A., López, M. M., Cortelli, J. R., & Costa, F. O. (2021). Clinical and microbiological effects of non-surgical periodontal treatment in individuals with rheumatoid arthritis: a controlled clinical trial. *Odontology*, 109(2), 484–493. <https://doi.org/10.1007/s10266-020-00566-0>
124. Mühlhauser, M. (2013). [Eikenella corrodens]. *Revista chilena de infectologia : organo oficial de la Sociedad Chilena de Infectologia*, 30(2), 163–164. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182013000200007>
125. Murakami, S., Mealey, B. L., Mariotti, A., & Chapple, I. L. C. (2018). Dental plaque-induced gingival conditions. *Journal of periodontology*, 89(February 2017), S17–S27. <https://doi.org/10.1002/JPER.17-0095>
126. Nagler, R. M., Klein, I., Zarzhevsky, N., Drigues, N., & Reznick, A. Z. (2002). Characterization of the differentiated antioxidant profile of human saliva. *Free Radical Biology & Medicine*, 32(3), 268–277. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(01\)00806-1](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(01)00806-1)
127. Nagler, R. M., Lischinsky, S., Diamond, E., Klein, I., & Reznick, A. Z. (2001). New insights into salivary lactate dehydrogenase of human subjects. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 137(5), 363–369. <https://doi.org/10.1067/mlc.2001.114710>
128. Nakayama, K. (2015). Porphyromonas gingivalis and related bacteria: from colonial pigmentation to the type IX secretion system and gliding motility. *Journal of Periodontal Research*, 50(1), 1–8. <https://doi.org/10.1111/jre.12255>
129. Nanaiah, K. P., Nagarathna, D. V., & Manjunath, N. (2013). Prevalence of periodontitis among the adolescents aged 15-18 years in Mangalore City: An epidemiological and microbiological study. *Journal of Indian Society of Periodontology*, 17(6), 784–789. <https://doi.org/10.4103/0972-124X.124507>
130. Nazir, M. A. (2017). Prevalence of periodontal disease, its association with systemic diseases and prevention. *International Journal of Health Sciences*, 11(2), 72–80.
131. Nazir, M., Al-Ansari, A., Al-Khalifa, K., Alhareky, M., Gaffar, B., & Almas, K. (2020). Global Prevalence of Periodontal Disease and Lack of Its Surveillance. *Scientific World Journal*, 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/2146160>

132. Nickles, K., Scharf, S., Röllke, L., Mayer, I., Mayer, M., & Eickholz, P. (2016). Detection of subgingival periodontal pathogens--comparison of two sampling strategies. *Clinical Oral Investigations*, *20*(3), 571–579. <https://doi.org/10.1007/s00784-015-1530-4>
133. Novaković, N., Čakić, S., Todorović, T., Andjelski Raičević, B., Dožić, I., Petrović, V., Perunović, N., Špadijer Gostović, S., Kadović Sretenović, J., & Čolak, E. (2013). Antioxidative status of saliva before and after non-surgical periodontal treatment. *Srpski Arhiv za Celokupno Lekarstvo*, *141*(3–4), 163–168. <https://doi.org/10.2298/SARH1304163N>
134. Novakovic, N., Todorovic, T., Rakic, M., Milinkovic, I., Dozic, I., Jankovic, S., Aleksic, Z., & Cakic, S. (2014a). Salivary antioxidants as periodontal biomarkers in evaluation of tissue status and treatment outcome. *Journal of Periodontal Research*, *49*(1), 129–136. <https://doi.org/10.1111/jre.12088>
135. Novakovic, N., Todorovic, T., Rakic, M., Milinkovic, I., Dozic, I., Jankovic, S., Aleksic, Z., & Cakic, S. (2014b). Salivary antioxidants as periodontal biomarkers in evaluation of tissue status and treatment outcome. *Journal of Periodontal Research*, *49*(1), 129–136. <https://doi.org/10.1111/jre.12088>
136. Omari Shekaftik, S., & Nasirzadeh, N. (2021). 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) as a biomarker of oxidative DNA damage induced by occupational exposure to nanomaterials: a systematic review. *Nanotoxicology*, *15*(6), 850–864. <https://doi.org/10.1080/17435390.2021.1936254>
137. Önder, C., Kurgan, Ş., Altıngöz, S. M., Bağış, N., Uyanık, M., Serdar, M. A., Kantarcı, A., & Günhan, M. (2017). Impact of non-surgical periodontal therapy on saliva and serum levels of markers of oxidative stress. *Clinical Oral Investigations*, *21*(6), 1961–1969. <https://doi.org/10.1007/s00784-016-1984-z>
138. Öngöz Dede, F., Özden, F. O., & Avcı, B. (2013). 8-Hydroxy-Deoxyguanosine Levels in Gingival Crevicular Fluid and Saliva in Patients With Chronic Periodontitis After Initial Periodontal Treatment. *Journal of Periodontology*, *84*(6), 821–828. <https://doi.org/10.1902/jop.2012.120195>
139. Oringer, R. J., Howell, T. H., Nevins, M. L., Reasner, D. S., Davis, G. H., Sekler, J., & Fiorellini, J. P. (2001). Relationship Between Crevicular Aspartate Aminotransferase Levels and Periodontal Disease Progression. *Journal of Periodontology*, *72*(1), 17–24. <https://doi.org/10.1902/jop.2001.72.1.17>
140. Ozmeric, N. (2004). Advances in periodontal disease markers. *Clinica Chimica Acta*, *343*(1–2), 1–16. <https://doi.org/10.1016/j.cccn.2004.01.022>
141. Page, R. C., & Kornman, K. S. (1997). The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. *Periodontology 2000*, *14*, 9–11. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.1997.tb00189.x>
142. Paglia, D. E., & Valentine, W. N. (1967). Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, *70*(1), 158–169.
143. Papapanou, P. N., Sanz, M., Buduneli, N., Dietrich, T., Feres, M., Fine, D. H., Flemmig, T. F., Garcia, R., Giannobile, W. V., Graziani, F., Greenwell, H., Herrera, D., Kao, R. T., Kebschull, M., Kinane, D. F., Kirkwood, K. L., Kocher, T., Kornman, K. S., Kumar, P. S., ... Tonetti, M. S. (2018). Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *Journal of Clinical Periodontology*, *45*(December 2017), S162–S170. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12946>
144. Peralta, F. da S., Cortelli, S. C., Rovai, E. S., Aquino, D. R., Miranda, T. B., Costa, F. O., & Cortelli, J. R. (2020). Clinical and microbiological evaluation of non-surgical periodontal therapy in obese and non-obese individuals with periodontitis: A 9-month prospective longitudinal study. *Journal of Applied Oral Science*, *28*, 1–9. <https://doi.org/10.1590/1678-7757-2019-0694>

145. Phaniendra, A., Jestadi, D. B., & Periyasamy, L. (2015). Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 30(1), 11–26. <https://doi.org/10.1007/s12291-014-0446-0>
146. Podzimek, S., Vondrackova, L., Duskova, J., Janatova, T., Broukal, Z., Boia, S., Boariu, M., Baderca, F., Rusu, D., Muntean, D., Horhat, F., Boia, E.-R., Borza, C., Anghel, A., & Stratul, Ş.-I. (2019). Clinical, microbiological and oxidative stress evaluation of periodontitis patients treated with two regimens of systemic antibiotics, adjunctive to non-surgical therapy. A placebo-controlled randomized clinical trial. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 2016, 5001–5015. <https://doi.org/10.1155/2016/9179632>
147. Prior, R. L., Wu, X., & Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(10), 4290–4302. <https://doi.org/10.1021/jf0502698>
148. Proctor, G. B. (2016). The physiology of salivary secretion. *Periodontology 2000*, 70(1), 11–25. <https://doi.org/10.1111/prd.12116>
149. Radi, R., Beckman, J. S., Bush, K. M., & Freeman, B. A. (1991). Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 288(2), 481–487. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(91\)90224-7](https://doi.org/10.1016/0003-9861(91)90224-7)
150. Rashed, H. T. (2016). Evaluation of the effect of hydrogen peroxide as a mouthwash in comparison with chlorhexidine in chronic periodontitis patients: A clinical study. *Journal of International Society of Preventive and Community Dentistry*, 6(3), 206–212. <https://doi.org/10.4103/2231-0762.183114>
151. Ray, P. D., Huang, B. W., & Tsuji, Y. (2012). Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cellular Signalling*, 24(5), 981–990. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2012.01.008>
152. Reyhani, A., McKenzie, T. G., Fu, Q., & Qiao, G. G. (2019). Fenton-Chemistry-Mediated Radical Polymerization. *Macromolecular Rapid Communications*, 40(18), 1–16. <https://doi.org/10.1002/marc.201900220>
153. Risteska, N., Poposki, B., Ivanovski, K., Dirjanska, K., Ristoska, S., & Saveski, M. (2021). Diagnostic and Prognostic Markers of Periodontal Disease. *Prilozi*, 42(3), 89–95. <https://doi.org/10.2478/prilozi-2021-0039>
154. Roshna, T., & Nandakumar, K. (2012). Generalized aggressive periodontitis and its treatment options: Case reports and review of the literature. *Case Reports in Medicine*, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/535321>
155. Ross, P. D., Kress, B. C., Parson, R. E., Wasnich, R. D., Armour, K. A., & Mizrahi, I. A. (2000). Serum bone alkaline phosphatase and calcaneus bone density predict fractures: A prospective study. *Osteoporosis International*, 11(1), 76–82. <https://doi.org/10.1007/s001980050009>
156. Sabry, B. (2013). Biochemistry of free radicals and oxidative stress. *Y Science International* (Tom 1, Broj 5, strp. 111–117).
157. Saglie, F. R., Simon, K., Merrill, J., & Koeffler, H. P. (1990). Lipopolysaccharide from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* stimulates macrophages to produce interleukin-1 and tumor necrosis factor mRNA and protein. *Oral Microbiology and Immunology*, 5(5), 256–262. <https://doi.org/10.1111/j.1399-302x.1990.tb00422.x>
158. Saik, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., & Erlich, H. A. (1987). Primer-directed-enzymatic-ampl-2c8f276d-b217-4991-883d-ec142c027656. *Science*, 239(29), 487–491.
159. Sanz, M., & Quirynen, M. (2005). Advances in the aetiology of periodontitis: Group A Consensus report of the 5th European Workshop in Periodontology. *Journal of Clinical Periodontology*, 32(SUPPL. 6), 54–56. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2005.00827.x>

160. Sauerbeck, G., Parkin, C. S., Houston, S., Whall, C., Newton, A., & Carlyle, J. (2000). Nitrogen dioxide and particle pollution near trunk roads and in towns of the south Midlands in England. *The Journal of the Royal Society for the Promotion of Health*, 120(3), 183–187. <https://doi.org/10.1177/146642400012000308>
161. Schomaker, S., Warner, R., Bock, J., Johnson, K., Potter, D., Van Winkle, J., & Aubrecht, J. (2013). Assessment of emerging biomarkers of liver injury in human subjects. *Toxicological Sciences*, 132(2), 276–283. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kft009>
162. Sharma, A. (2010). Virulence mechanisms of tannerella forsythia. *Periodontology 2000*, 54(1), 106–116. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2009.00332.x>
163. Slots, J., & Listgarten, M. A. (1988). Bacteroides gingivalis, Bacteroides intermedius and Actinobacillus actinomycetemcomitans in human periodontal diseases. *Journal of Clinical Periodontology*, 15(2), 85–93. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051x.1988.tb00999.x>
164. Solderer, A., Kaufmann, M., Hofer, D., Wiedemeier, D., Attin, T., & Schmidlin, P. R. (2019). Efficacy of chlorhexidine rinses after periodontal or implant surgery: a systematic review. *Clinical Oral Investigations*, 23(1), 21–32. <https://doi.org/10.1007/s00784-018-2761-y>
165. Somogyi, A., Rosta, K., Pusztai, P., Tulassay, Z., & Nagy, G. (2007). Antioxidant measurements. *Physiological Measurement*, 28(4). <https://doi.org/10.1088/0967-3334/28/4/R01>
166. Sreeram, M., Suryakar, A. N., & Dani, N. H. (2015). Is gamma-glutamyl transpeptidase a biomarker for oxidative stress in periodontitis? *Journal of Indian Society of Periodontology*, 19(2), 150–154. <https://doi.org/10.4103/0972-124X.149032>
167. Stocker, R., & Keaney, J. F. J. (2004). Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiological Reviews*, 84(4), 1381–1478. <https://doi.org/10.1152/physrev.00047.2003>
168. Su, H., Gornitsky, M., Velly, A. M., Yu, H., Benarroch, M., & Schipper, H. M. (2009). Salivary DNA, lipid, and protein oxidation in nonsmokers with periodontal disease. *Free Radical Biology and Medicine*, 46(7), 914–921. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.01.008>
169. Tabatabaei, M. S., & Ahmed, M. (2022). Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 2508, 115–134. [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2376-3\\_10](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2376-3_10)
170. Tanner, A. C. R., & Izard, J. (2006). Tannerella forsythia, a periodontal pathogen entering the genomic era. *Periodontology 2000*, 42(1), 88–113. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2006.00184.x>
171. Thangavelu, A., Kaspar, S. S., Kathirvelu, R. P., Srinivasan, B., Srinivasan, S., & Sundram, R. (2020). Chlorhexidine: An Elixir for Periodontics. *Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences*, 12(Suppl 1), S57–S59. [https://doi.org/10.4103/jpbs.JPBS\\_162\\_20](https://doi.org/10.4103/jpbs.JPBS_162_20)
172. Todorović, T., Doži, I., Mandi, B., & Marjanovi, M. (2005). Antioksidativna uloga pljuva č ke u o č uvanju zdravlja usta. 62(2), 575–579.
173. Todorovic, T., Dozic, I., Barrero, M. V., Ljuskovic, B., Pejovic, J., Marjanovic, M., & Knezevic, M. (2006). Salivary enzymes and periodontal disease. *Medicina Oral, Patologia Oral y Cirugia Bucal*, 11(2), 81–85.
174. Totan, A., Greabu, M., Totan, C., & Spinu, T. (2006). Salivary aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase and alkaline phosphatase: Possible markers in periodontal diseases? *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 44(5), 612–615. <https://doi.org/10.1515/CCLM.2006.096>
175. Tóthová, L., Kamodyová, N., Červenka, T., & Celec, P. (2015). Salivary markers of oxidative stress in oral diseases. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 5(OCT). <https://doi.org/10.3389/fcimb.2015.00073>
176. Valm, A. M. (2019). The Structure of Dental Plaque Microbial Communities in the Transition from Health to Dental Caries and Periodontal Disease. *Journal of Molecular Biology*, 431(16), 2957–2969. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.05.016>

177. Van Dyke, T. E., & Serhan, C. N. (2003). Resolution of inflammation: a new paradigm for the pathogenesis of periodontal diseases. *Journal of Dental Research*, 82(2), 82–90. <https://doi.org/10.1177/154405910308200202>
178. Van Strydonck, D. A. C., Slot, D. E., Van Der Velden, U., & Van Der Weijden, F. (2012). Effect of a chlorhexidine mouthrinse on plaque, gingival inflammation and staining in gingivitis patients: A systematic review. *Journal of Clinical Periodontology*, 39(11), 1042–1055. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2012.01883.x>
179. Varghese, J., Bhat, V., Chianeh, Y. R., Kamath, V., Husain, N. A. H., & Özcan, M. (2020). Salivary 8-hydroxyguanosine levels in smokers and non-smokers with chronic periodontitis. *Odontology*. <https://doi.org/10.1007/s10266-020-00496-x>
180. Varoni, E., Tarce, M., Lodi, G., & Carrassi, A. (2012). Chlorhexidine (CHX) in dentistry: state of the art. *Minerva Stomatologica*, 61(9), 399–419.
181. Vos Theo, Amanuel Alemu Abajobir, Kalkidan Hassen Abate, C. A., Abbas, K. M., & Foad Abd-Allah, Rizwan Suliankatchi Abdulkader, Abdishakur M Abdulle, Teshome Abuka Abebo, Semaw Ferede Abera, Victor Aboyans, Laith J Abu-Raddad, I. N. A. (2017). Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 328 diseases and injuries for 195 countries, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet (London, England)*, 390(10100), 1211–1259. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)32154-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)32154-2)
182. Wang, G. P. (2015). Defining functional signatures of dysbiosis in periodontitis progression. *Genome Medicine*, 7(1), 40. <https://doi.org/10.1186/s13073-015-0165-z>
183. Wang, Q., Wen, X., & Kong, J. (2020). Recent Progress on Uric Acid Detection: A Review. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 50(4), 359–375. <https://doi.org/10.1080/10408347.2019.1637711>
184. Wang, Y., Andrukhov, O., & Rausch-Fan, X. (2017). Oxidative stress and antioxidant system in periodontitis. *Frontiers in Physiology*, 8(NOV), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00910>
185. Wara-aswapati, N., Pitiphat, W., Chanchaimongkon, L., Taweechaisupapong, S., Boch, J. A., & Ishikawa, I. (2009). Red bacterial complex is associated with the severity of chronic periodontitis in a Thai population. *Oral Diseases*, 15(5), 354–359. <https://doi.org/10.1111/j.1601-0825.2009.01562.x>
186. Wei, D., Zhang, X. L., Wang, Y. Z., Yang, C. X., & Chen, G. (2010). Lipid peroxidation levels, total oxidant status and superoxide dismutase in serum, saliva and gingival crevicular fluid in chronic periodontitis patients before and after periodontal therapy. *Australian Dental Journal*, 55(1), 70–78. <https://doi.org/10.1111/j.1834-7819.2009.01123.x>
187. Wei, P. F., Ho, K. Y., Ho, Y. P., Wu, Y. M., Yang, Y. H., & Tsai, C. C. (2004). The investigation of glutathione peroxidase, lactoferrin, myeloperoxidase and interleukin-1 $\beta$  in gingival crevicular fluid: Implications for oxidative stress in human periodontal diseases. *Journal of Periodontal Research*, 39(5), 287–293. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.2004.00744.x>
188. Whitfield, J. B. (2001). Gamma glutamyl transferase. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 38(4), 263–355. <https://doi.org/10.1080/20014091084227>
189. WHO (1948). (1948). Preamble to the Constitution of the World Health Organization as adopted by the International Health Conference, New York, 19-22 June, 1946 ; signed on 22 July 1946 by the representatives of 61 States (Official Records of the World Health Organization, no. [http://www.who.int/governance/eb/who\\_constitution\\_en.pdf](http://www.who.int/governance/eb/who_constitution_en.pdf). <https://cir.nii.ac.jp/crid/1571135651334103680.bib?lang=en>
190. Wiener, R. C., Sambamoorthi, U., & Jurevic, R. J. (2016). Association of Alanine Aminotransferase and Periodontitis: A Cross-Sectional Analysis - NHANES 2009-2012. *International Journal of Inflammation*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/3901402>

191. Wolff, L. F., Aepli, D. M., Pihlstrom, B., Anderson, L., Stoltenberg, J., Osborn, J., Hardie, N., Shelburne, C., & Fischer, G. (1993). Natural distribution of 5 bacteria associated with periodontal disease. *Journal of Clinical Periodontology*, 20(10), 699–706. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051x.1993.tb00694.x>
192. Wong, M.-Y., Lu, C.-L., Liu, C.-M., & Hou, L.-T. (1999). Microbiological Response of Localized Sites with Recurrent Periodontitis in Maintenance Patients Treated with Tetracycline Fibers. *Journal of Periodontology*, 70(8), 861–868. <https://doi.org/10.1902/jop.1999.70.8.861>
193. Zhou, X., Zhang, J., Feng, G., Shen, J., Kong, D., & Zhao, Q. (2016). Nitric Oxide-Releasing Biomaterials for Biomedical Applications. *Current Medicinal Chemistry*, 23(24), 2579–2601. <https://doi.org/10.2174/0929867323666160729104647>
194. Zwickl, N. F., Stralis-Pavese, N., Schäffer, C., Dohm, J. C., & Himmelbauer, H. (2020). Comparative genome characterization of the periodontal pathogen *Tannerella forsythia*. *BMC Genomics*, 21(1), 1–18. <https://doi.org/10.1186/s12864-020-6535-y>



## 8. BIOGRAFIJA

Katarina Jovanović rođena je 16. juna 1989. godine u Beogradu, gde je završila osnovnu školu kao dobitnik Vukove diplome. U Beogradu je završila srednju Medicinsku školu "Beograd", takođe kao dobitnik Vukove diplome. Osnovne integrisane studije na Stomatološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu upisala je 2008/2009. godine, a završila septembra 2014. godine sa prosečnom ocenom 8,80 i time stekla zvanje doktor stomatologije. Tokom studija bila je autor studentskog rada „Analiza bezubih vilica sa protetskog aspekta”, koji je predstavljen na Kongresu studenata biomedicinskih nauka 2012. godine. pod mentorstvom prof. dr Radeta Živkovića (Klinika za stomatološku protetiku). Nakon završenih studija, pripravnički staž obavila je na Stomatološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu i u okviru doma zdravlja Stari Grad. Novembra 2015.godine položila je stručni ispit za doktora stomatologije.

Doktorske akademske studije na Stomatološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu je upisala školske 2015/2016. godine. U okviru doktorske disertacije proučavala je uticaj hlorheksidin-diglukonata na biohemijske pokazatelje inflamacije i oksidativnog stresa iz salive, zatim njegov uticaj na kvalitativni i kvantitativni sastav peripatogenih mikroorganizama iz dentalnog plaka, kao i na kliničke parametre kod pacijenata sa parodontitisom.

Nakon završenih studija, bavila se stomatologijom dve godine kroz privatnu praksu, a od 2016. godine karijeru nastavlja u farmaceutskoj industriji u statusu Stručno medicinskog predstavnika. Od 2019. godine je stalno zaposlena u Galenici gde se bavi stručno medicinskim segmentom sa lekarima u okviru različitih specijalističkih grana medicine.

Autor je publikacije rada na temu „Detection and quantification of pathogenic microorganisms in patients with chronic periodontitis before and after treatment with chlorhexidine digluconate” koji je objavljen u časopisu međunarodnog značaja.

## Izjava o autorstvu

Ime i prezime autora: Katarina Jovanović

Broj indeksa: 4002/2015

### Izjavljujem

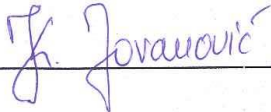
da je doktorska disertacija pod naslovom

**„Opravdanost primene hlorheksidin-diglukonata u okviru konzervativnog lečenja obolelih od parodontitisa - klinička, biohemijska i mikrobiološka studija”.**

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada;
- da disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za sticanje druge diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova;
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio/la autorska prava i koristio/la intelektualnu svojinu drugih lica.

**Potpis autora**

U Beogradu, 27.03.2023.

  
\_\_\_\_\_

## Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora: Katarina Jovanović

Broj indeksa: 4002/2015

Studijski program: doktorske akademske studije, modul Bazična i klinička istraživanja u stomatologiji.

Naslov rada: „**Opravdanost primene hlorheksidin-diglukonata u okviru konzervativnog lečenja obolelih od parodontitisa - klinička, biohemijska i mikrobiološka studija**”.

Mentor: prof. dr Saša Čakić

Mentor: prof. dr Miloš Hadži Mihailović


Izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la radi pohranjivanja u **Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog naziva doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

**Potpis autora**

U Beogradu, 27.03.2023.



### Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

**„Opravdanost primene hlorheksidin-diglukonata u okviru konzervativnog lečenja obolelih od parodontitisa - klinička, biohemijska i mikrobiološka studija“**

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim prilogima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalnom repozitoriju Univerziteta u Beogradu i dostupnu u otvorenom pristupu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo (CC BY)
2. Autorstvo - nekomercijalno (CC BY-NC)
3. Autorstvo - nekomercijalno - bez prerada (CC BY-NC-ND)
4. Autorstvo - nekomercijalno - deliti pod istim uslovima (CC BY-NC-SA)
5. Autorstvo - bez prerada (CC BY-ND)
6. Autorstvo - deliti pod istim uslovima (CC BY-SA)

Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci.

(Kratak opis licenci je sastavni deo ove izjave).

**Potpis autora**

U Beogradu, 27. 03. 2023.

Z. Jovanović

**1. Autorstvo.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence, čak i u komercijalne svrhe. Ovo je najslobodnija od svih licenci

**2. Autorstvo – nekomercijalno.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.

**3. Autorstvo - nekomercijalno - bez prerada.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela. U odnosu na sve ostale licence, ovom licencom se ograničava najveći obim prava korišćenja dela.

**4. Autorstvo - nekomercijalno - deliti pod istim uslovima.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence, i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada.

**5. Autorstvo - bez prerada.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.

**6. Autorstvo - deliti pod istim uslovima.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence, i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela. Slična je softverskim licencama, odnosno licencama otvorenog koda.