



UNIVERZITET U NIŠU
MEDICINSKI FAKULTET



Predrag N. Janošević

**UTICAJ TERAPIJE FIKSNIM ORTODONTSKIM APARATIMA
NA PARODONCIJUM I DIJAGNOSTIČKI POTENCIJAL
BIOHEMIJSKIH PARAMETARA ZAPALJENJA**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Niš, 2016.



UNIVERSITY OF NIŠ
FACULTY OF MEDICINE



Predrag N. Janošević

**INFLUENCE OF FIXED ORTHODONTIC APPLIANCES
THERAPY ON PERIODONTIUM AND DIAGNOSTIC POTENTIAL
OF BIOCHEMICAL PARAMETERS OF INFLAMMATION**

DOCTORAL DISSERTATION

Niš, 2016.

Podaci o doktorskoj disertaciji

Mentor:	Prof. dr Ivana Stojanović Univerzitet u Nišu, Medicinski fakultet
Naslov:	Uticaj terapije fiksnim ortodontskim aparatima na parodontcijum i dijagnostički potencijal biohemijskih parametara zapaljenja
Rezime:	<p>U sprovedenom istraživanju praćeno je zapaljenjskog stanja gingive i parodontcijuma u prvih 6 meseci ortodontske terapije fiksnim aparatima na osnovu određivanja kliničkih (PI, SBI i CPITN) i biohemijskih parametara (NO_2+NO_3, RANKL i $\text{TNF-}\alpha$) u pljuvaćci i GST i njihovih međusobnih korelacija pre početka, 3 i 6 meseci nakon početka terapije. Utvrđivan je i uticaj auto- i svetlosno polimerizujućih materijala za lepljenje bravica na kulture mišjih fibroblasta i makrofaga. Rezultati istraživanja ukazuju da je prisutan statistički znaćajan porast vrednosti svih praćenih kliničkih parametara 3 i 6 meseci nakon početka u poređenju sa vrednostima pre početka terapije. Postoji statistički znaćajan porast koncentracija NO_2+NO_3 i RANKL u GST i koncentracije NO_2+NO_3 u pljuvaćci 3 i 6 meseci nakon početka ortodontske terapije u poređenju sa vrednostima pre početka terapije. Statistićki znaćajne, pozitivne i veoma izražene korelacije utvrđene su između koncentracije NO_2+NO_3 u GST i u pljuvaćci 3 meseca nakon početka terapije.</p> <p>Postoji statistički znaćajan pad vijabilnosti ćelija pri dejstvu svih ispitivanih koncentracija ekstrakata AP materijala. Postoji statistički znaćajan pad vijabilnosti ćelija samo pri dejstvu 100% ekstrakata SP materijala.</p> <p>U kulturi makrofaga izloženih suspenzijama AP materiala izraženi su znaci ćeliske apoptoze. U kulturi makrofaga izloženih suspenzijama SP materijal dominiraju znaci fagocitoze. Na osnovu dobijenih rezultata u sprovedenom istraživanju može se zaključiti da je u toku prvih 6 meseci ortodontske terapije fiksnim aparatima evidentno pogoršanje stanja zdravlja gingive, da se koncentracije RANKL u GST i koncentracije NO_2+NO_3 u GST i pljuvaćci mogu koristiti za praćenje zapaljenjskog stanja gingive kod ortodontskih pacijenata u terapiji fiksnim aparatima, da pljuvaćka i GST mogu poslužiti kao pouzdani medijumi za praćenje zapaljenja gingive kod ortodontskih pacijenata. Takođe, možemo zaključiti da postoji veće citotoksićno dejstvo AP u odnosu na SP materijale.</p>
Naućna oblast:	Stomatologija
Naućna disciplina:	Ortopedija vilica, parodontologija, biohemija
Ključne reći:	terapija fiksnim ortodontskim aparatima, gingivalno zapaljenje, biohemijski medijatori zapaljenja
UDK:	616.314-089.23:616.311.2-002-074(043.3)

CERIF
klasifikacija:

B 730 Odontologija, stomatologija

Tip licence
Kreativne
zajednice:

CC BY-NC-ND

Data on Doctoral Dissertation

Doctoral Supervisor:	Prof. Ivana Stojanović, Ph.D. University of Niš, Faculty of Medicine
Title:	Influence of fixed orthodontic appliances therapy on periodontium and diagnostic potential of biochemical parameters of inflammation
Abstract:	<p>In the conducted research, inflammatory conditions of the gingiva and periodontium were followed up in the first six months of the orthodontic therapy, using fixed appliances, based on the determination of the clinical (PI, SBI and CPITN) and biochemical (NO_2+NO_3, RANKL and $\text{TNF-}\alpha$) parameters in saliva and GCF, and their correlations before, as well as three and six months after the beginning of therapy. The influence of the self- and light-cured bonding materials on the cultures of mouse fibroblasts and macrophages was also determined. The results of our research show that there is a statistically significant increase in the values of all the monitored clinical parameters at months three and six after the beginning of therapy compared to baseline. There was a statistically significant increase in the concentration of NO_2+NO_3 and RANKL in GCF and in the concentration of NO_2+NO_3 in saliva at months three and six after the beginning of therapy. Statistically significant, positive, and highly expressed correlations were found between the concentration of NO_2+NO_3 in GCF and saliva three months after the beginning of therapy.</p> <p>There was a statistically significant decrease in cell viability during the effect of all the examined extract concentrations of self-cured materials. There was a statistically significant decrease in cell viability only upon the influence of 100% extract of the light-cured materials.</p> <p>In the culture of macrophages exposed to the self-cured material suspensions, the signs of apoptosis were visible. The signs of phagocytosis were prevalent in the culture of macrophages exposed to the light-cured material suspensions.</p> <p>Based on the obtained results, it can be concluded that in the first six months of the therapy with fixed appliances, deterioration in gingival inflammation was apparent. In addition, the concentrations of RANKL in GCF as well as the concentrations of NO_2+NO_3 in GCF and saliva can be used in the follow-up of inflammatory conditions of the gingival in orthodontic patients treated with fixed appliances; saliva and GCF can serve as reliable media in the follow-up of gingival inflammation in these patients. We can also conclude that there is a higher cytotoxic effect of the self-cured compared to light-cured materials.</p>
Scientific Field:	Dentistry
Scientific Discipline:	Orthodontics, periodontology, biochemistry
Key Words:	Fixed orthodontics appliances therapy, gingival inflammation, biochemical parameters of inflammation
UDC:	616.314-089.23:616.311.2-002-074(043.3)

CERIF
Classification:

B 730 Odontology, Dentistry

Creative
Commons
License Type:

CC BY-NC-ND

Sadržaj

1. UVOD	1
2. PREGLED LITERATURE	3
2.1. Anatomija i histologija parodonticijuma	3
2.1.1. Gingiva.....	3
2.1.2. Periodoncijum	7
2.1.3. Cement	8
2.1.4. Alveolarna kost	8
2.2. Dentalni plak	10
2.3. Gingivo -parodontalna bolest	11
2.3.1. Patogenetske promene na gingivi kod gingivitisa	12
2.4. Ortodontska terapija fiksnim aparatima	13
2.4.1. Ortodontska sila i pomeranje zuba.....	16
2.4.1.1. Mehanotransdukcija.....	18
2.5. Pljuvačka	18
2.6. Gingivalna sulkusna tečnost.....	20
2.7. Mikrobiološka osnova parodontalnih oboljenja	21
2.8. Azot monoksid	23
2.8.1. Azot monoksid i gingivo-parodontalna bolest.....	25
2.9. Nuklearni faktor kappa B, RANKL i OPG	26
2.9.1. RANKL i gingivo- parodontalna bolest.....	28
2.9.2. B i T limfociti kao primarni izvori RANKL u koštanim lezijama kod parodontalne bolesti	29
2.9.3. Osteoblasti, osteoklasti i ekspresija RANKL u parodontalnom tkivu	31
2.9.4. Makrofagi i ekspresija RANKL u parodontalnom tkivu.....	31
2.10. Citokini.....	33
2.11. Faktor tumorske nekroze- α	34
2.11.1. TNF- α i parodontalna bolest	37
2.12. Biokompatibilnost ortodontskih materijala za lepljenje bravica.....	39
3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	43

4. MATERIJAL I METODE	44
4.1. Određivanje kliničkih parametara za procenu stanja gingive i biohemijskih parametara u GST i pljuvački pacijenata u terapiji fiksnim ortodontskim aparatima.....	44
4.1.1. Pacijenti.....	44
4.1.2. Klinička procedura.....	44
4.1.3. Određivanje kliničkih parametara.....	45
4.1.4. Uzorkovanje GST.....	45
4.1.5. Uzorkovanje pljuvačke.....	45
4.1.6. Biohemijske analize.....	45
4.2. <i>In vitro</i> metode ispitivanja AP i SP materijala na ćelijskim kulturama fibroblasta i makrofaga.....	46
4.2.1. Ćelijske linije.....	46
4.2.2. Priprema materijala AP i SP za ispitivanje na ćelijama u kulturi.....	48
4.2.3. Kultivisanje ćelija.....	48
4.2.4. Pasaža ćelija.....	48
4.2.5. Priprema ćelija za ispitivanje.....	49
4.2.6. Esej vijabilnosti/citotoksičnosti.....	49
4.2.7. Esej proliferacije/citostatičnosti.....	50
4.2.8. MTT test.....	50
4.2.9. Test fagocitoze.....	51
4.2.10. Svetlosna mikroskopija.....	51
4.3. Statistička obrada rezultata.....	52
5. REZULTATI	53
5.1. Klinički i biohemijski parametri u praćenju parodontalnog stanja kod pacijenata u terapiji fiksnim ortodontskim aparatima.....	53
5.1.1. Klinički parametri u praćenju parodontalnog stanja kod pacijenata u terapiji fiksnim ortodontskim aparatima.....	53
5.1.2. Biohemijski parametri u praćenju parodontalnog stanja kod pacijenata u terapiji fiksnim ortodontskim aparatima.....	55
5.1.3. Korelacije i promene ispitivanih kliničkih i biohemijskih parametra.....	58
5.2. Rezultati ispitivanja efekata različitih koncentracija ekstrakata materijala za lepljenje bravica na vijabilnost i proliferaciju L929 ćelija.....	62
5.2.1. Efekat različitih koncentracija jednodnevnog ekstrakta ispitivanih materijala na vijabilnost L929 ćelija.....	62
5.2.2. Efekat različitih koncentracija jednodnevnog ekstrakta ispitivanih materijala na proliferaciju L929 ćelija.....	63

5.2.3. Efekat različitih koncentracija trodnevnog ekstrakta ispitivanih materijala na vijabilnost L929 ćelija.....	64
5.2.4. Efekat različitih koncentracija trodnevnog ekstrakta ispitivanih materijala na proliferaciju L 929 ćelija.....	66
5.2.5. Efekat različitih koncentracija sedmodnevnog ekstrakta ispitivanih materijala na vijabilnost L929 ćelija.....	67
5.2.6. Efekat različitih koncentracija sedmodnevnog ekstrakta ispitivanih materijala na proliferaciju L929 ćelija.....	68
5.3. Rezultati ispitivanja vijabilnosti i proliferacije ćelija u istim koncentracijama ekstrakata za zadati tip materijala u zavisnosti od perioda ekstrakcije	70
5.3.1. Uticaj ispitivanih koncentracija ekstrakta AP materijala na vijabilnost ćelija u zavisnosti od perioda ekstrakcije.....	70
5.3.2. Uticaj zadatih koncentracija ekstrakta SP materijala na vijabilnost ćelija u zavisnosti od perioda ekstrakcije.....	70
5.3.3. Uticaj ispitivanih koncentracija ekstrakta AP materijala na proliferaciju ćelija u zavisnosti od perioda ekstrakcije.....	71
5.3.4. Uticaj ispitivanih koncentracija ekstrakta SP materijala na proliferaciju ćelija u zavisnosti od perioda ekstrakcije.....	72
5.4. Rezultati mikroskopske analize fagocitoze čestica AP i SP materijala od strane makrofaga linije RAW 264.7.....	73
6. DISKUSIJA	80
6.1. Klinički i biohemijski parametri u praćenju parodontalnog stanja kod pacijenata u terapiji fiksnim ortodontskim aparatima	80
6.1.1. Praćenje parodontalnog stanja preko kliničkih parametara kod pacijenata u terapiji fiksnim ortodontskim aparatima.....	80
6.1.2. Azot monoksid - medijator zapaljenja u toku ortodontske terapije.....	81
6.1.3. Značaj TNF- α i RANKL u proceni stanja gingive u toku ortodontske terapije.....	86
6.2. Citotoksičnost materijala za lepljenje bravica.....	92
7. ZAKLJUČCI.....	97
8. LITERATURA.....	99
BIOGRAFIJA AUTORA	119

1. UVOD

Terapija fiksnim ortodontskim aparatima počinje da se razvija još u XVIII veku. Najveći doprinos njenom razvoju dao je Angle krajem XIX i početkom XX veka, tako da se i u osnovi današnje, savremene ortodontske terapije nalaze obrisi njegovih ideja.

Do danas je razvijen veliki broj tehnika lečenja fiksnim aparatima, ali je tehnika pravog luka (Straight wire appliance - SWA) najrasprostranjenija. Suština ove tehnike leži u potpuno programiranim bravicama, koje se lepe na sekutiće, očnjake i premolare, dok se na molare lepe tube ili se cementiraju prstenovi.

Ortodontska terapija fiksnim aparatima podrazumeva interakciju bravica i ortodontskih lukova koji ih povezuju. Ona je danas široko zastupljena, obzirom na dobre rezultate u korekciji različitih tipova malokluzija. Njena efikasnost leži u tome što obezbeđuje dejstvo kontinuirane i dobro kontrolisane sile na zube. Prosek trajanja terapije je godinu i po dana, mada neretko traje i duže¹.

Negativna strana primene fiksnih ortodontskih aparata je otežano sprovođenje adekvatne oralne higijene. Postoji povećan broj retencionih mesta za zadržavanje dentalnog plaka, a remeti se i proces samočišćenja. Corbacho de Melo i saradnici (2012) ukazuju da pozicija bravice ispod ivice gingive može usloviti mehaničku iritaciju, retenciju dentalnog plaka i uticati na pojavu i pogoršavanje gingivalnog zapaljenja². Svakako je važno imati u vidu i stepen biokompatibilnosti primenjenih ortodontskih materijala za lepljenje bravica. Oni mogu predstavljati rizik za parodontijum obzirom na blizinu gingivalne tečnosti i gingivalnog sulkusa. Biokompatibilnost je sa druge strane važna i zbog mogućeg štetnog uticaja ne samo na pacijenta, već i na medicinsko osoblje koje sa njim radi što je dokazano u ranijim studijama^{3,4}.

Postoji dosta polemika o uticaju ovakve terapije, uglavnom primenjene na mladim osobama na zdravlje parodontijuma. Brojne su studije potvrdile postojanje i pogoršavanje zapaljenskog procesa na gingivi i parodontijumu ovih pacijenata⁵⁻⁷. Mikrobiološka osnova oboljenja gingive i parodontijuma je odavno poznata. Mikroorganizmi dentalnog plaka deluju na dva načina. Oni direktno oštećuju tkivo, ali takođe provociraju oslobađanje brojnih medijatora zapaljenja (citokini i prostanglandini) koji zatim dovode do oštećenja.

Bakterijski lipopolisaharidi pokreću monocite, polimorfonuklearne leukocite, makrofage, ali i druge ćelije na produkciju zapaljenskih medijatora⁸.

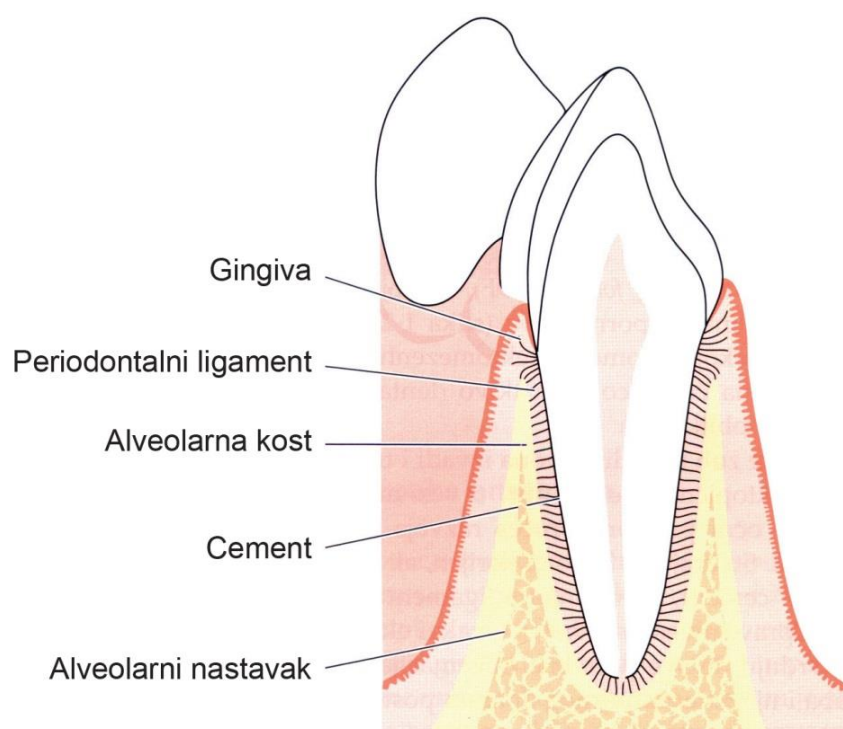
Rana dijagnoza i terapija gingivo- parodontalnih bolesti su stoga jako važne obzirom na ireverzibilan karakter istih.

Tradicionalne kliničke metode, kao što su merenje dubine džepova ili pojave krvarenja na sondiranje, utvrđivanje gubitka epitelnog pripoja, određivanje plak indeksa i radiografija su korisne u određivanju prisustva i posledica, ali ne i trenutne faze aktivnosti bolesti. Upravo zato i postoji potreba za razvijanjem nekih novih dijagnostičkih testova koji bi preciznije identifikovali aktivnost, stepen progresije bolesti, ali i efekte primenjene terapije. Danas je aktuelno ispitivanje mogućnosti kvantifikacije i objektivnog merenja zapaljenskih biomarkera u gingivalnoj sulkusnoj tečnosti (GST) ili pljuvački. U literaturi nema podataka o sprovođenju studija koje bi pokušale da identifikuju i kvantifikuju biomarkere zapaljenja parodoncijuma kod pacijenata u terapiji fiksnim aparatima. Pronalaženje ovakvih biohemijskih parametara bi bilo od velike važnosti, obzirom na konstantan trend porasta broja ortodontskih pacijenata.

2. PREGLED LITERATURE

2.1. Anatomija i histologija parodontijuma

Parodontijum čine tkiva koja zajedno pružaju potporu zubima. U parodont se ubrajaju gingiva, cement, periodontijum i alveolarnu kost (Slika 1). Sva ova tkiva su razvojno, topografski i funkcionalno u tesnoj vezi. U Evropi je prihvaćen prefiks „paro”, pa se potporni aparat zuba označava kao parodontijum. U engleskom govornom području zadržao se prefiks „perio”, a koristi se naziv periodontijum (Peri – okolo, odons – zub).



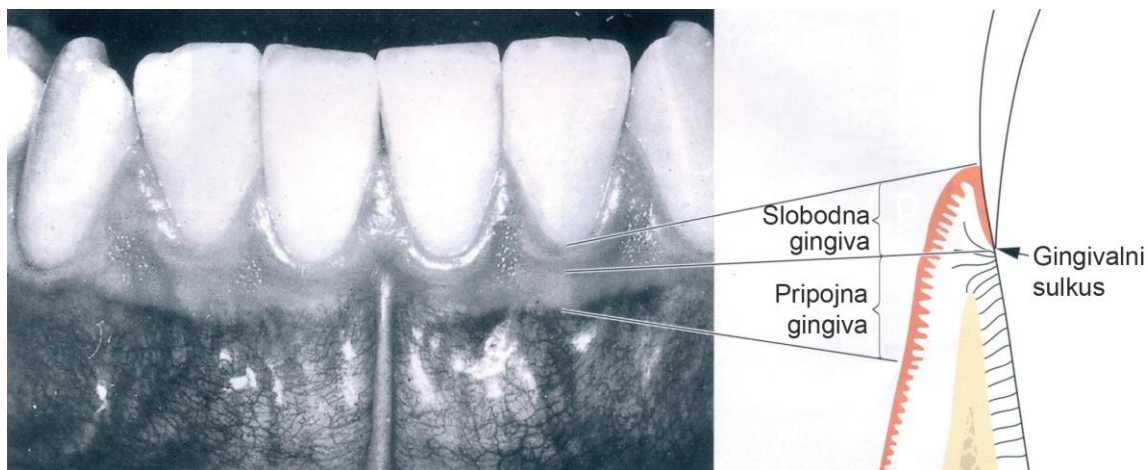
Slika 1. Građa parodontijuma ⁹.

2.1.1. Gingiva

Gingiva je deo oralne sluzokože koji obuhvata vrat zuba i prekriva deo alveolarne kosti. Deli se na slobodnu, interdentalnu i pripojnu gingivu.

Slobodna ili marginalna gingiva nije pripojena za podlogu. Ona u vidu kragne obuhvata vrat zuba i nastavlja se u interdentalnu papilu. U apikalnom smeru prelazi u pripojnu gingivu. Na ovom prelazu može se uočiti gingivalna brazda koja se javlja zbog posebnog i različitog rasporeda gingivalnih vlakana (Slika 2). Jedna grupa vlakana se pruža u apikalnom smeru,

dok se druga grupa pruža u koronarnom smeru. Deo gingive koji je smešten između i nije podupret vlaknima je u stvari gingivalna brazda. Rastojanje od ivice gingive do gingivalne brazde iznosi u proseku 1,5 mm. To je približno i dubina gingivalnog sulkusa jer se smatra da se gingivalna brazda nalazi u nivou dna gingivalnog sulkusa

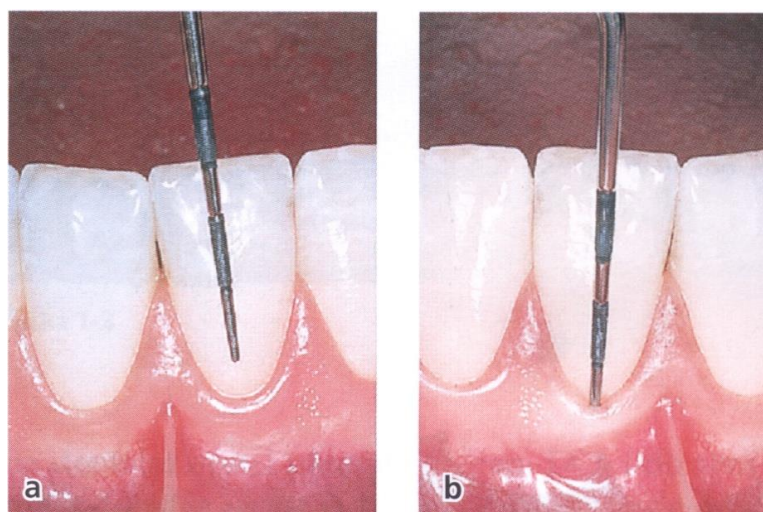


Slika 2. Slobodna i pripojna gingiva⁹.

Na slobodnoj gingivi razlikujemo spoljnu ili oralnu površinu prekrivenu oralnim epitelom gingive i unutrašnju površinu koju prekriva sulkusni epitel. Ivica gingive je najkoronarniji deo gde se spajaju unutrašnja i spoljašnja površina slobodne gingive⁹.

Debljina slobodne gingive varira. Nekada je jako tanka i podseća na sečivo noža.

Gingivalni sulkus je žljeb koji se nalazi sa unutrašnje strane slobodne gingive i kružno se pruža oko zuba (Slika 3).



Slika 3. Gingivalni sulkus⁹.

Interdentalna gingiva (interdentalna papila) ispunjava prostor između zuba. Sastoji se od vestibularnog i oralnog dela. Ta dva dela su međusobno povezana mostom koji je ulegnut i odgovara kontaktnoj tački odnosno kontaktnoj površini. Izuzetak je zona sekutića gde ne postoje pomenuta ulegnuća, a interdentalna papila je oblika kupe.

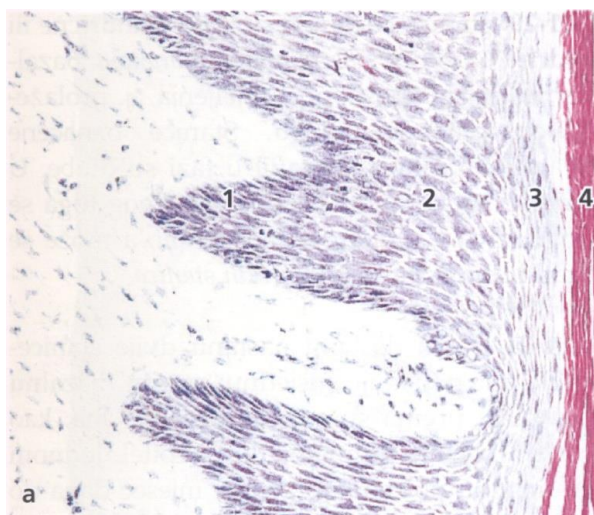
Pripojna gingiva predstavlja deo gingive koji je čvrst, rezilijentan, čvrsto pripojen za podlogu i nepokretan. U apikalnom smeru se pruža do mukogingivalne linije, a u koronarnom prelazi u slobodnu gingivu bez jasne granice. Svetloružičaste je boje, a struktura joj je zrnasta za razliku od pokretne sluzokože koja je glatka i tamnije boje. Na palatinalnoj strani maksile pripojna gingiva se nejasno nastavlja u sluzokožu tvrdog nepca koja ima slične karakteristike kao pripojna gingiva.

Na pripojnoj gingivi se razlikuje deo koji je pripojen za cement i deo koji je pripojen za alveolarnu kost. Širina pripojne gingive varira od 0,5 do 9 milimetara a prosečno je šira u gornjoj u odnosu na donju vilicu. Najšira je u predelu frontalnih zuba. Uzana pripojna gingiva podrazumeva nepovoljniju prognozu parodontopatije. Zrnasta struktura pripojne gingive se u slučaju zapaljenja gubi. Boja gingive zavisi od debljine epitela, stepena orožavanja, broja krvnih sudova i njihove blizine površini gingive. Na boju gingive utiče i prisustvo ćelija koje sadrže melanin, kao i dubina uzupčavanja papila krzna u epitelu.

Kod osoba tamnog tena, posebno osoba crne rase gingiva ima tamniju boju, a na njoj se vide slabije i manje izražene mrlje mrke boje. Sastoji se iz epitela i krzna između kojih je bazalna membrana. Epitel je pločastoslojevit i orožava. Ne orožava jedino unutrašnji deo slobodne gingive okrenut ka zubu, pripojni epitel gingive kao i vrh interdentalne papile.

Oralni epitel gingive se sastoji iz: bazalnog sloja (stratum germinativum s. basale), spinoznog sloja (stratum spinosum s. malpighi), zrnastog sloja (stratum granulosum s. intermedium) i rožastog sloja (stratum corneum).

Bazalni sloj leži na bazalnoj membrani, a ćelije su kockastog oblika, brzo se dele i migriranjem ka površini zamenjuju ćelije koje se odlubljuju deskvamacijom.



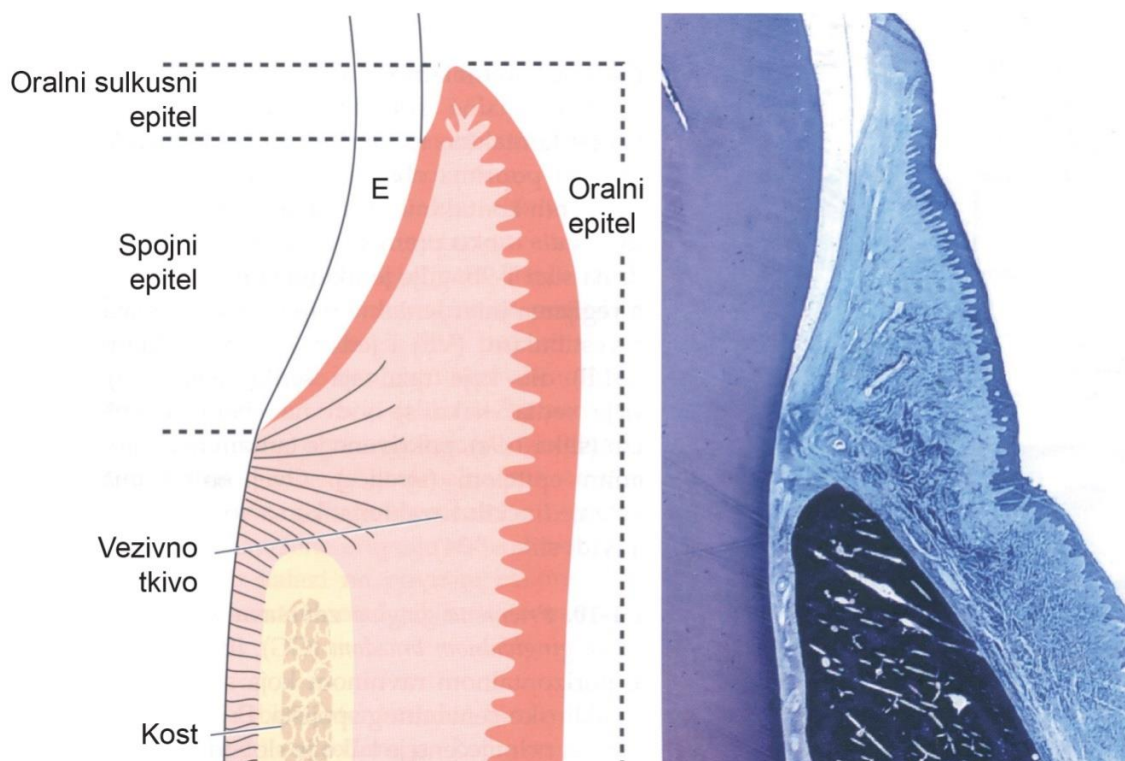
Slika 4. Histološka građa oralnog epitela koji prekriva slobodnu gingivu

1. Stratum basale; 2. Stratum spinosum;
3. Stratum granulosum; 4. Stratum corneum⁹.

Spinozni sloj je najdeblji i sastoji se od višegaonih ili zvezdastih ćelija. **Zrnasti sloj** sačinjavaju pljosnate ćelije sa citoplazmom bogatom keratohijalinskim granulama. **Rožast sloj** se sastoji od velikog broja spljoštenih ćelija koje sadrže veliku količinu keratina (Slika 4). Na površini epitela ove ćelije se pretvaraju u spljoštane ljsupe tj skvame. Zahvaljujući keratozi, površina gingive je jako otporna na mehaničke i hemijske agense¹⁰. Deoba ćelija i obnavljanje epitela se vrši u bazalnom i spinoznom sloju epitela. Potpuna obnova epitela gingive se izvrši za jedan do šest dana. Sulkusni epitel je pločastoslojevite građe, ali ne orožava. On je iste građe kao i oralni epitel sa razlikom što nema rožasti i zrnast sloj ćelija. Zato je znatno tanji od oralnog epitela. Pripojni epitel se razlikuje od oralnog i sulkusnog epitela po tome što je tanji a intercelularni prostori su veći.

Bazalna membrana čini granicu između epitela i krzna gingive. Produkt je ćelija bazalnog sloja epitela sastoji se od fibrila u glikoproteinskoj osnovi. Sastoji se iz lamine lucidae i lamine densae. Vlakna koja polaze iz krzna delom se završavaju u bazalnoj membrani i pojačavaju vezu između krzna i epitela.

Granica između oralnog epitela i vezivnog tkiva koje leži ispod njega ima talasasti izgled. Delovi vezivnog tkiva koji ulaze u epital nazivaju se papile vezivnog tkiva i međusobno su odvojene epitelnim grebenovima. Karakterističan morfološki nalaz oralnog epitela i oralnog sulkusnog epitela je prisutnost papila vezivnog tkiva, dok one ne postoje kod spojnog epitela.



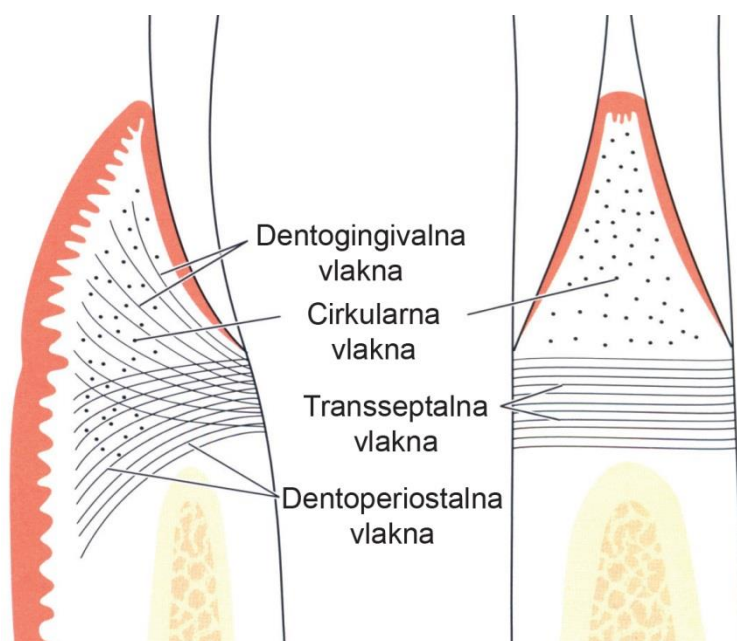
Slika 5. Šematski prikaz i slika histološkog preseka gingive⁹.

2.1.2. Periodoncijum

Periodoncijum je smešten u periodontalnom prostoru, okružuje koren zuba i pričvršćuje ga za alveolarnu čašicu. Ovaj prostor je u proseku širok 0,18 mm, a ova širina se starenjem smanjuje, oblikom podseća na peščani sat. Prema krunici zuba prelazi u vezivno tkivo gingive, a u apikalnoj regiji nastavlja se na tkivo pulpe. Preko otvora u kompakti zida alveolarne čašice u kontaktu je i sa sržnim delom alveolarne kosti. Čitav parodoncijum se ishranjuje preko a. maxilaris od krvnih sudova koji ulaze kroz foramen apikale i krvnih sudova gingive. Venski sudovi periodoncijuma se prazne pod dejstvom pritiska žvakanja¹¹.

U sastav periodoncijuma ulaze: vlakna, ćelije, krvni, limfni sudovi i nervi. Svi oni su unronjeni u ekstracelularnu supstancu. Kolagena vlakna su grupisana u snopove i predstavljaju glavnu masu tkiva periodoncijuma. Ona su grupisana u snopove, pri čemu su talasasta, a ne zategnuta. Pri delovanju mastikatornih sila ona se ispravljaju i zatežu i na taj način amortizuju mastikatorne sile. Ova vlakna se mogu podeliti na gingivalnu i alveolarnu grupu.

Gingivalnu grupu čine: slobodna, transseptalna, cirkularna, longitudinalna, i alveolo-gingivalna vlakna (Slika 6). Cirkularna vlakna su smeštena u slobodnoj gingivi i obilaze oko zuba kao prsten, dentogingivalna vlakna su usidrena u cementu i kao lepeza usmerena prema slobodnoj gingivi. Dentoperiostalna vlakna polaze iz cementa takođe, ali su usmerena apikalno preko vestibularnog i oralnog koštanog grebena i završavaju se u pripojnoj gingivi. Transseptalna vlakna polaze iz supraalveolarnog cementa, prolaze kroz interdentalni septum i završavaju se u cementu susednog zuba⁹.



Slika 6. Gingivalna grupa vlakana⁹.

Alveolarnu grupu kolagenih vlakana čine: vlakna alveolarnog grebena, horizontalna, kosa, apikalna i interradičularna vlakna.

2.1.3. Cement

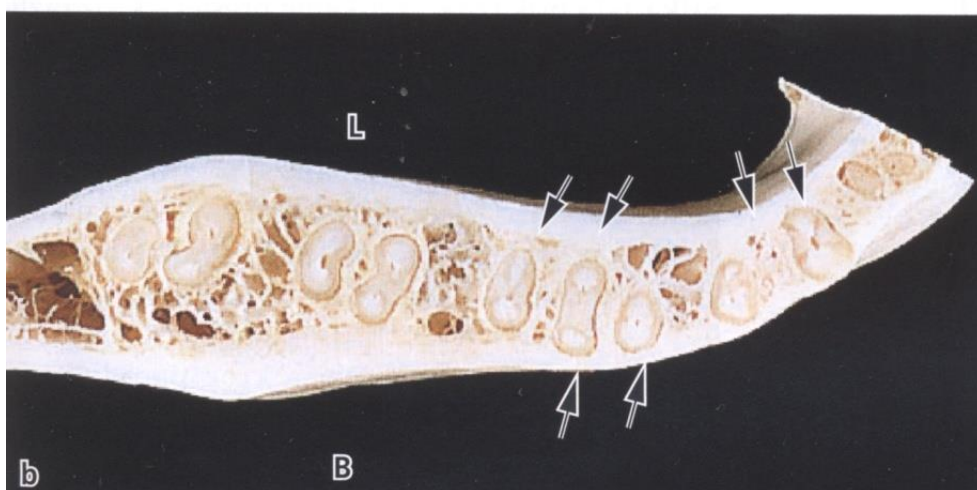
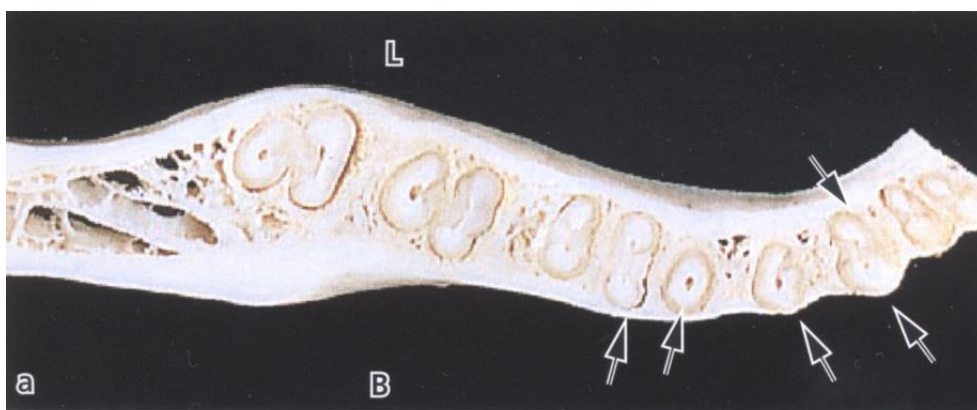
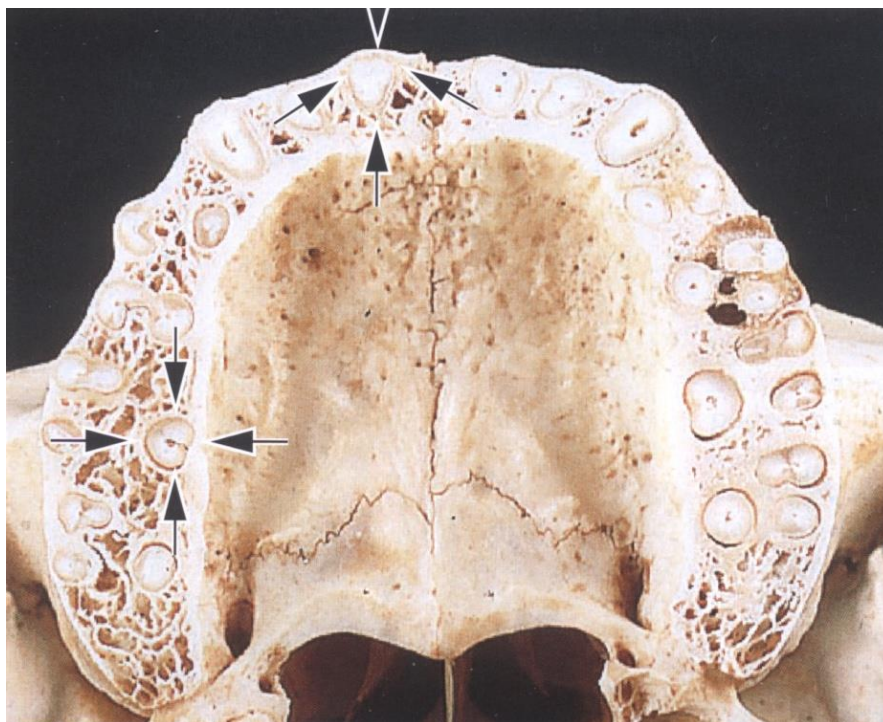
Cement je mineralizovano vezivno tivo koje pokriva spoljašnju površinu korena zuba, od vrata do vrha korena. Glavni neorganski sastojak cementa je hidroksiapatit. U oko 60% slučajeva cement prelazi preko gleđi u uskom sloju na spoju krunice i korena dok se u 30% slučajeva dodiruju, a u 10% postoji razmak između njih. Cement je mekši od gleđi i dentina.

Histološki se razlikuju dve vrste cementa: primarni (acelularni) i sekundarni (celularni). Funkcije obe vrste su iste. Acelularni cement se nalazi u cervikalne dve trećine korena zuba, on ne sadrži ćelije i znatno ga je manje od celularnog cementa. Celularni cement se nalazi najviše u apikalnoj polovini korena, kao i u bifurkacijama zuba¹². Prema tome da li sadrži kolagene fibrile cement delimo na fibrilarni i afibrilarni. Fibrile se iz cementa nastavljaju na kolagena vlakna periodoncijuma koja su usađena u cement.

2.1.4. Alveolarna kost

Alveolarni nastavak je deo maksile odnosno mandibule koji podupire zubne alveole. On se razvija zajedno sa razvojem i nicanjem zuba, a kada dođe do gubitka zuba on se polako resorbuje. Alveolarna kost obuhvata najveći deo korenova zuba. Između alveolarne kosti i ostalog dela vilice ne postoji jasna granica. Sastoji se iz dve ploče kompaktne kosti između kojih je spongioza u kojoj su usađene zubne čašice, alveole dentales (Slika 7). Na vestibularnoj površini kompakte vide se izbočenja koja odgovaraju korenovima zuba (juga alveolaria). Zid alveolarne čašice (endostalna lamina) naziva se i prava alveolarna kost. On se sastoji od ploče kompaktne kosti sa mnogobrojnim otvorima kroz koje prolaze: krvni, limfni sudovi i nervi. Ploča kosti u smeru od periodoncijuma ka spongiozi, ima dve zone. U prvu su usađeni krajevi periodontalnih vlakana (Sharpeyeva vlakna) i nju nazivamo vlaknasta kost. Druga zona se naziva lamelarna kost, bliža je spongiozi i ne sadrži šarpejeva vlakna.

Već je istaknuto da alveolarna čašica liči na peščani sat, pri čemu je najuža u predelu hipomokliona (deo korena zuba u predelu prelaska srednje u apikalnu trećinu korena). Spongiozne kosti ima više sa oralne nego sa vestibularne strane. Spongiozu čine koštane gredice - trabekule između kojih su koštana srž, krvni sudovi i nervi⁹.



Slika 7. Poprečni presek maksilarnog i mandibularnog alveolarnog nastavka u visini sredine korena zuba⁹.

2.2. Dentalni plak

Nagomilavanje bakterija na čvrstim površinama nije fenomen vezan isključivo za stomatologiju. Biofilmovi su svuda prisutni i prekrivaju sve površine uronjene u vodenu sredinu. Biofilmovi su zaštita bakterijama koje ih nastanjuju od antimikrobnih agenasa. Dentalni plak je klasičan biofilm u čiji sastav ulaze bakterije i matriks u koji su one uronjene.

Gleđ je u prirodnim uslovima pokrivena tankom pelikulom koju sačinjavaju glikoproteini (mucin) iz pljuvačke. Pelikula ima ulogu u selektivnom prijanjanju bakterija. Pelikulu prvo naseljavaju bakterije slične kokama pored kojih se nalaze epitelne ćelije i polimorfonuklearni leukociti. Nekoliko sati nakon prijanjanja za pelikulu kreće proliferacija ćelija i stvaranje manjih kolonija morfološki sličnih mikroorganizama. Nastavlja se nastanjivanje pelikule mikroorganizmima, tako da za nekoliko dana već postoji složen sastav dentalnog plaka. Odlika zrelog plaka je i prisustvo mrtvih bakterija koje predstavljaju dodatnu hranjivu osnovu za okolne bakterijske kolonije¹³.

Dentalni plak koji se nagomilao nakon 24 h sastoji se uglavnom od streptokoka *Streptococcus sanguinis* je najvažniji od tih organizama. U sledećoj fazi raste broj Gram pozitivnih štapićastih bakterija. Na kraju njihov broj se toliko povećava da postaju dominantne u odnosu na streptokoke. Površinski receptori nataloženih Gram pozitivnih koka i bacila omogućavaju dalje prijanjanje Gram negativnih organizama sa slabijom sposobnošću adheriranja. Nagomilavanje dentalnog plaka po gingivalnom rubu dovodi do zapaljenskog procesa na gingivi, što može dodatno uticati na sastav plaka. Usled dobre prokrvljenosti upaljena gingiva često krvari što dovodi do porasta bakterija sa povećanim parodontopatogenim potencijalom. Zbog sposobnosti da enzimski vare proteine mnoge bakterije dentalnog plaka i ne zavise od prisustva ugljenih hidrata. Takve bakterije ne stvaraju ekstracelularne polimere i nagomilavaju samo plak koji ne prijanja čvrsto uz površine parodontalnog džepa. U plaku parodontalnih lezija dominiraju Gram negativne anaerobne štapićaste bakterije, pogotovu anaerobne spirohete.

Starenje i sazrevanje dentalnog plaka podrazumeva porast sekundarne kolonizacije Gram negativnih i strogo anaerobnih bakterija, što doprinosi značajnom povećanju njegove patogenosti⁹.

2.3. Gingivo -parodontalna bolest

Parodontalna bolest je zapaljenski proces tkiva parodontijuma (gingiva, alveolarna kost, cement, periodontalna vlakna) koji pogađa pojedinačna ili multipna mesta u usnoj duplji. Pod parodontalnom bolešću podrazumevamo sve od najranijih stadijuma marginalnog gingivitisa do najznapredovalijih destruktivnih parodontitisa, sa gubitkom vezivnog tkiva, pripojnog epitela i kosti, što rezultuje klaćenjem i gubitkom zuba u završnim stadijumima bolesti. Zapaljenske parodontalne bolesti se karakterišu periodima aktivnosti i periodima remisije¹⁴. To su hronične bolesti sa dugim tokom ukoliko se adekvatno ne leče¹⁵.

Gingivitis je početni stadijum parodontalne bolesti i karakteriše se: promenom oblika, veličine, boje, konzistencije gingive, kao i krvarenjem na stimulus ili spontano kod jače izraženog zapaljenja. U najvećem broju slučajeva nastaje kao rezultat izlaganja dentalnom plaku nagomilanom oko zuba, mada može nastati i usled hemijske i mehaničke iritacije, kao rezultat hormonskog disbalansa ili primene određenih lekova.

Bakterijski rastvorljivi produkti igraju važnu ulogu u patogenezi hroničnih zapaljenjskih bolesti. Destrukcija parodontijuma je verovatno rezultat udruženog dejstva bakterijskih produkata i odgovora domaćina na bakterije i njihove produkte. Zapaljenjski odgovor dovodi do ulcerisanja gingive oko zuba, što omogućuje prolazak bakterija i njihovih produkata u sistemsku cirkulaciju. Na taj način ove infekcije mogu narušiti i opšte zdravlje i dovesti do mnogih sistemskih bolesti.

Lezije gingive prouzrokovane gingivitisom mogu biti dugo stabilne i ne moraju nikada progredirati u ozbiljna oštećenja parodontijuma koja bi rezultirala gubitkom zuba. U literaturi se čak ova dva stadijuma parodontalne bolesti često smatraju odvojenim bolestima s objašnjenjem da bakterijski plak prouzrokuje gingivitis, ali da stepen izraženosti odgovora domaćina određuje hoće li se ili neće razviti hronični parodontitis. Kinane i Attstrom (2005) su u preglednom radu procenjivali epidemiološke podatke vezane za gingivitis i hroničan parodontitis i nezavisnost ovih dve bolesti doveli u pitanje¹⁶.

Gingivitis se razvija brzo i postaje očigledan nakon samo nekoliko dana ili nedelja izloženosti dentalnom plaku dok hronični parodontitis zahteva znatno duži vremenski period izlaganja plaku i kamencu kako bi se ispoljio. Procenat nelečenih gingivitisa koji će preći u hronični parodontitis za sada je nepoznat¹⁷.

Tradicionalne metode procene parodontalnog statusa podrazumevaju kliničke metode merenja dubine parodontalnih džepova, određivanje parodontalnih indeksa, i radiografska ispitivanja. Ova ispitivanja upućuju na rezultate destrukcije parodontalnog tkiva nastale kao

posledice aktivnosti parodontalne bolesti. Konvencionalni parametri nisu u mogućnosti da ukažu na intenzitet trenutne aktivnosti bolesti.

Novija biohemijska istraživanja pljuvačke i GST imaju za cilj istraživanje markera zapaljenja koji bi ukazali na tačan nivo aktivnosti, kao i na stadijum progresije parodontalne bolesti u momentu ispitivanja¹⁵. Pomenuti naponi dobijaju na posebnom značaju ako se uzmu u obzir istraživanja koja ukazuju na povezanost rizika i napredovanja parodontalne bolesti sa brzinom starenja celog organizma¹⁸.

2.3.1. Patogenetske promene na gingivi kod gingivitisa

Gingiva je zbog svog anatomskog položaja primarna zaštita ostalog parodonticijuma. Pošto je konstantno izložena agensima usne duplje i patogenima dentalnog plaka neprestano traje odbrana od njih. Zaštitni mehanizmi su veoma često nedovoljni, pa nastaje zapaljenje i razvoj destruktivnih procesa u njoj. Gingivalni epitel ima visoku sposobnost regeneracije. Epitel je pločasto slojevit sa izraženom keratinizacijom i kao takav je jako otporan. Ostala parodontalna tkiva su visoko diferentovana, tako da regeneracija nije značajna. Zbog toga što epitel gingivalnog sulkusa ne orožava, on je najosetljivije mesto gingive. Kada dođe do oštećenja epitela gingive savladan je prvi mehanizam odbrane i to je uvod u parodontopatiju.

Primarna oštećenja gingive najčešće nastaju na delu interdentalne papile ispod kontaktne tačke pošto je on pokriven epitelom koji ne orožava. Primarna oštećenja gingive nastaju usled dejstva bakterijskih toksina i enzima. Početna oštećenja dovode dalje do zapaljivih promena i zaštitnih reakcija organizma koje slede. Zaštitne reakcije mogu biti nespecifične i specifične.

Nespecifična zaštita se odvija fagocitozom koju vrše neutrofilni granulociti, monociti i makrofagi, dok je specifičan vid zaštite zaštita antitelima. Neutrofili su mikrofagociti i oni su prva linija odbrane. Oni prolaze kroz zidove kapilara diapedezom i ameboidnim pokretima dospevaju na mesto oštećenja. Tako nastaje ćelijski infiltrat koji je vidljiv i golim okom kao uvećanje slobodne gingive. Nakon neutrofila na mestu oštećenja se pojavljuju monociti kao makrofagociti. To su jako velike ćelije koje se sporo kreću tako da se u infiltratu javljaju kasnije. Pomenute ćelije fagocituju strane materije i razgrađuju ih na taj način što se oko njih u citoplazmi formiraju citoplazmatične granule sa enzimima lizozimi. Ovo je nespecifičan vid zaštite zato što nema diferencijacije.

Kada nespecifična zaštita ostane nemoćna uključuje se specifičan vid zaštite. Ovaj vid zaštite karakteriše diferencijacija i zavisna je od vrste antigena. Odvija se uz učešće limfocita.

U kontaktu sa antigenom limfociti se diferenciraju u dve populacije: plazmocite (B limfocite) i T limfocite. Plazmociti se koncentrišu perivaskularno i u blizini bazalne membrane, ali može ih biti i duž kolagenih vlakana. Može se desiti da usled izražene infiltracije ove ćelije potisnu, a kasnije i u potpunosti destruiraju vezivno tkivo.

Reakcija ranog senzibiliteta se odvija odmah nakon kontakta sa antigenom, dok se reakcija kasnog senzibiliteta odvija minimalno 24 h nakon izlaganja antigenu. Reakcija ranog senzibiliteta podrazumeva produkciju imunoglobulina IgA, IgG, IgM, IgD, koji su zatim slobodni u krvotoku kao cirkulišuća antitela. Plazma ćelije uvek stvaraju isti imunoglobulin na određeni antigen. Imunoglobulin E učestvuje u ranom tipu senzibiliteta, on se izrazito vezuje za ćelije bazofile i mastocite. Bazofili imaju veliko jedro bogato granulama koje su pune histaminom, serotoninom, bradikininom i brojnim proteolitičkim enzimima. Mastociti su slični neutrofilima, ali su uvek prisutni u tkivu. Plazmociti produkuju IgE koji se zatim vežu za opnu mastocita, oštećuju ih i tada dolazi do njihove degranulacije. Oslobođen histamin dovodi do povećanja permeabilnosti krvnih sudova i edema, heparin antikoagulacionim dejstvom dalje potencira krvarenje gingive. Umesto rešavanja zapaljenja nastaje njegovo produblјivanje.

Reakcija poznog senzibiliteta se karakteriše učešćem senzibilisanih limfocita. Oni direktno napadaju antigene. Limfociti produkuju antitela koja ostaju u njima i na membrani kao receptori kojima hvataju antigene i uništavaju ih. Ovo postižu oslobađanjem brojnih medijatora koji perforiraju zid bakterije, ali oštećuju i okolno tkivo gingive i produblјuju zapaljenje.

Senzibilisani limfociti luče i limfotoksine u kontaktu sa antigenima koji inhibiraju migraciju makrofaga, kao i druge medijatore koji za posledicu imaju resorpciju kosti¹⁹.

2.4. Ortodontska terapija fiksnim aparatima

Terapija primenom fiksnih ortodontskih aparata započeta je još u XVIII veku od strane Fausharda i Huntera. Glavni ciljevi ovakve terapije su bili stvaranje prostora i pravilno postavljanje zuba u zubni niz. Najveći doprinos razvoju fiksnih aparata dao je Angle krajem XIX i početkom XX veka. Fiksni aparati koji se danas koriste bazirani su na Angleovom dizajnu i ideji.

Do danas je razvijen veliki broj tehnika lečenja fiksnim aparatima, ali tehnika koja je najrasprostranjenija je tehnika pravog luka - Straight wire appliance (SWA). Suština ove tehnike leži u specijalnom dizajnu bravica (potpuno programirane bravice), koje su originalno potekle od Andrews. Ovakve bravice imaju individualne karakteristike slota za svaki zub u odnosu na njegov meziodistalni nagib (angulacija), u odnosu na njegov bukooralni nagib (tork ili inklinacija) i u odnosu na prominenciju krunice (in-out ili ofset za molare).

Bravice se sastoje od baze sa retencijom, gde se nanosi kompozitni materijal, koji služi za lepljenje bravice na zub, tela sa kracima za postavljanje ligaturnih gumica i slota bravice u koji se postavlja luk. Bravice se lepe na sekutiće, očnjake i premolare, dok se na molare lepe tube ili se cementiraju prstenovi. Na tržištu postoji velik broj bravica metalnih i estetskih, klasičnih i samoligirajućih, pa čak i lingvalnih koje se pozicioniraju na lingvalnu površinu zuba.

Tehnika pravog luka podrazumeva primenu pravih žičanih lukova u svim fazama terapije. Ne koristi se savijanje žice u vidu bilo kakvih omči ili krivina.

Fiksni aparati se sastoje iz pasivnih i aktivnih elemenata. Pasivni elementi se fiksiraju za zube i tako primenjenu silu prenose na zube. Aktivni elementi su izvor sile neophodan za pomeranje zuba.

Pasivni elementi su: bravice, bukalne tube, ortodontski prstenovi, palatinalne i lingvalne tube na molarima, pinovi na bravicama, lingvalni atačmenti, omče, stoperi, ligaturne žice. Aktivni elementi su: žičani lukovi, elastične gumice, elastični lanci, spiralne opruge, žica kao izvor sile i magneti.

Terapija fiksnim aparatima odvija se u tri stadijuma: početni, intermedijatni i završni.

U početnom stadijumu se odvija nivelacija zubnih nizova. Koriste se fleksibilni nitinol lukovi različite debljine, počev od 0,12, 0,14, 0,16. Blage sile koje se postižu primenom ovih lukova su imperativ u početnoj fazi lečenja, koja u proseku traje 4-5 meseci. Na kraju ovog perioda su korigovane rotacije, vertikalna i labiobukalna odstupanja u položaju zuba.

U drugom ili radnom stadijumu terapije koriguju se anteroposteriorni dentoalveolarni poremećaji, koriguje se odnos molara i incizalni stepenik.

U trećem, završnom stadijumu lečenja odvija završno doterivanje položaja zuba, interkuspidacije, završna korekcija vertikalnih nepravilnosti. U SWA tehnici, u ovoj fazi se primenjuju završni četvrtasti termo ili čelični lukovi koji obezbeđuju maksimalno doterivanje torka i angulacije zuba²⁰.



Slika 8. Intraoralne fotografije pacijenta sa gornjim i donjim fiksnim aparatom

Ortodontska terapija fiksnim aparatima podrazumeva fiksiranje bravica na svaki zub pojedinačno, pri čemu su bravice povezane lukom (Slika 8). Uz primenu brojnih manje i više složenih mehaničkih postupaka rešavaju se nepravilnosti okluzije, grupa i pojedinačnih zuba. Ovaj sistem se pokazao izuzetno efikasnim i delotvornim zbog konstantnosti delovanja sila na zube koje su dovoljno jake da ostvare željeni efekat, ali i dovoljno slabe da imitiraju biološke sile nicanja zuba i ne dovedu do ozbiljnijih akutnih oštećenja parodontijuma²¹.

Terapija fiksnim aparatima traje u proseku godinu i po dana, dužina terapije zavisi kako od tipa nepravilnosti koji se koriguje, tako i od individualnog odgovora organizma na terapiju. Negativna strana fiksnih ortodontskih aparata je ta što su konstantno prisutni u ustima onemogućavajući adekvatnu oralnu higijenu i izazivajući mehaničke iritacije oralne sluzokože. Veliki je broj polemika o uticaju ove terapije na zdravlje parodontijuma pacijenata koji su uglavnom deca ili mladi odrasli ljudi. Kod većine pacijenata u terapiji fiksnim aparatima prisutne su promene na gingivi (uvećanje, promena boje, konzistencije, oblika gingive ili krvarenje na mehaničku stimulaciju) (Slika 9). Danas je aktuelno pitanje koliko su ova stanja opasna po parodontijum najčešće mladih pacijenata i da li je period ortodontskog tretmana dovoljan da izazove ireverzibilne promene parodontijuma?



Slika 9. Intraoralne fotografije pacijenta pre i 8 meseci nakon postave fiksnih aparata sa vidljivim znacima pogoršanja zapaljenskog stanja gingive u toku ortodontske terapije

2.4.1. Ortodontska sila i pomeranje zuba

Ortodontsko pomeranje zuba je biomehanički proces pokrenut delovanjem mehaničke sile. One potiču od različitih tipova ortodontskih aparata. Ovo pomeranje zuba se razlikuje od fiziološkog pomeranja tokom nicanja, gde sila potiče iz samog parodontalnog ligamenta²². Za razliku od dešavanja u parodontcijumu tokom normalnih funkcija mastikatornog aparata, ortodontsko pomeranje se zasniva na remodeliranju parodontalnog tkiva²³.

Proces kretanja zuba kroz koštano tkivo u toku ortodontskog tretmana već duže vreme privlači pažnju istraživača. Sila proizvedena ortodontskom terapijom uzrokuje stvaranje mikroštećenja u parodontcijumu²². Pored ovih oštećenja javlja se i distorzija nervnih završetaka i parodontalnih ćelija. Sve ovo će dovesti do pojave zapaljenskog procesa. Zapaljenje u parodontcijumu je odgovorno za započinjanje procesa remodelacije kosti. Otkriveni su brojni citokini, biološki aktivni molekuli, kao i transkripcioni faktori koji posreduju u regulaciji ovog procesa²⁴.

Primarna uloga u pokretanju lanca biohemijskih procesa kojima se regulišu ćelijske aktivnosti tokom zapaljenskog procesa pokrenutog ortodontskom silom pripisuje se citokini-
ma²⁵. Citokine izlučuju mahom imune ćelije u odgovoru na razne stimulse. Oni mogu delovati autokrino (na ćelije koje ih sekretuju), parakrino (na obližnje ćelije) i endokrino (na udaljene ćelije). Vezuju se za receptore na ćelijskim membranama i prenose signale koji posledično dovode do promene genske ekspresije u njima.

Pored biohemijskih promena koje nastaju u parodontcijumu, postoje radovi koji ukazuju na mogućnost postojanja bioelektričnih signala kao mogućih medijatora transformacije mehaničke sile u ćelijske signale koji omogućavaju remodeliranje koštanog tkiva. Basset i saradnici (1962) su još pre pola veka dokazali da se pod dejstvom mehaničke sile u tkivu javljaju električni potencijali²⁶.

Da bi došlo do kretanja zuba kao odgovor na primenjenu silu u sklopu terapije mora doći do resorpcije na kompresionoj strani a do apozicije na strani tenzije. Postoje dva tipa pomeranja zuba: pomeranje kroz kost i sa koštanim tkivom.

Ako je ortodontska sila dovoljno jaka nastaje ishemija periodontalnog ligamenta (PDL) na strani kompresije, hijalinizacija PDL prostora uz smanjenje broja ćelija. Ovo je faza staze u kojoj nema pomeranja zuba, pošto se resorpcija ne razvija na periostalnoj površini alveolarne čašice. Uporedo nastaje endoostalna vaskularizacija uz povećanje broja ćelija i otpočinje endoostalna resorpcija zida alveolarne čašice ispod hijalinizovanog bezćelijskog predela periodontalne membrane (podminirajuća resorpcija). U ovom slučaju, zub se kreće kroz kost, a

resorpcija kosti se odvija van hijalinizirane zone PDL. Ako primenjena ortodonska sila nije dovoljna da izazove okluziju krvnih sudova PDL, na strani pritiska nastaje reaktivna hipere-mija krvnih sudova PDL. Nastaje diferencijacija osteoklasta na strani pritiska, a osteoblasta na strani vuče. Resorpcija kosti se odvija na unutrašnjoj površini alveolarne čašice izložene pritisku pod uticajem osteoklasta, a apozicija na unutrašnjoj strani izloženoj vuči pod utica-jem osteoblasta. Kombinovani procesi resorpcije i apozicije u alveolarnoj čašici udruženi su sa procesima remodelacije, što znači da se na endostalnoj strani u predelu pritiska odigrava apozicija, a na strani vuče resorpcija. U ovom slučaju kaže se da se zub pomera zajedno sa kosti. Ova vrsta pomeranja je poželjna u ortodonskoj terapiji. Optimalna ortodonska sila je ona koja najbrže pomera zube, a da pri tom ne dovodi do oštećenja tkiva. Međutim univerzal-no prihvaćen standard za prag i optimalne vrednosti sile ne postoji ²⁷.

Preterano jake ortodonske sile su svakako nepoželjne i mogu dovesti do ozbiljnih kom-plikacija u terapiji. Usled dejstva ovakve sile prekida se u potpunosti snabdevanje periodontal-ne membrane krvlju, nastaje njena nekroza i masivna podminirajuća resorpcija. Ovo je praćeno klaćenjem zuba i bolom, dok kao posledica može nastati patološka resorpcija korena ili anki-loza zuba.

Da bi ortodonska sila imala efekta, stimulus koji ona predstavlja mora se prevesti u intracelularni signal u mehanosenzitivnim ćelijama. Iz mehanosenzitivnih ćelija informacija se prosleđuje dalje ćelijama koje nisu mehanosenzitivne kako bi na kraju došlo do koordini-sanog odgovora.

Da bi se ostvario efekat dejstva ortodonske sile moraju biti zadovoljeni sledeći uslovi:

1. Ortodonska sila se mora prevesti u signal koji prepoznaju ćelije (transdukcioni me-hanizam)
2. Periodontalni ligamenti i alveolarna kost moraju posedovati mehanosenzitivne ćelije.
3. Mehanosenzitivne ćelije moraju posedovati receptore kako bi detektovale signal koji će dalje biti preveden u intracelularni signal.
4. Intracelularni signali vode ka produkciji ćelijskih medijatora za komunikaciju sa ostalim ćelijama.
5. Kao rezultat pomenutih događaja nastaje transkripcija i stvaranje prostanglandina E2 i azot monoksida (NO), za koje se veruje da imaju važnu ulogu u inicijaciji procesa resorpcije i formiranja nove kosti.

2.4.1.1. Mehanotransdukcija

Pretpostavlja se da postoje tri mehanizma transdukcije.

1. Mehaničko opterećenje periodontalnih ligamenata i kosti uzrokuje deformaciju ekstracelularnog matriksa. Mehanoosetljivost PDL ćelija, osteoblasta i osteocita je povezana sa veličinom deformacije.
2. Kost se opisuje kao vodom natopljeni sunder, tako da sila pritiska na jednoj strani pomera intersticijalni fluid ka drugoj strani. Brzina pokretanja fluida direktno je povezana sa veličinom aplikovane sile. Fluid struji u mreži koštanih kanala prenoseći pritisak na osteocite i druge koštane ćelije.
3. Tečnost u kosti sadrži različite jone. Pokretanje jona je uslovljeno mehaničkim opterećenjem. Dolazi do nastanka električnog potencijala. Dokazana je osetljivost ćelija na električno polje.

U PDL ćelijama usled dejstva ortodontske sile (usled kompresije ili istezanja) dolazi do povećane aktivnosti različitih gena. Pulziranje fluida koji prenosi pritisak reda veličine svega 0,6 mPa utiče na intenziviranje genske ekspresije odgovorne za produkciju IL-8, prostanglandina i NO.

In vitro eksperimenti na osteoblastima su ukazali da njihovo mehaničko istezanje nije uslovalo pojačanu produkciju faktora za koje se veruje da su važni medijatori u procesu koštano remodiranja. Sa druge strane, izlaganje osteoblasta protoku tečnosti uslovljava produkciju PG E2 i NO.

Osteociti ili terminalno diferentovani osteoblasti smešteni su u mineralizovanim koštanim lakunama i komuniciraju međusobno nastavcima koji se protežu kroz uske kanale. To je sistem koštane mreže koji će prvi odreagovati na dejstvo mehaničke sile. Nova istraživanja ukazuju da je dovoljan i mali pritisak koji se prenosi fluidom u kosti, pa da dođe do pojačane ekspresije ciljnih gena i produkcije PGE i ciklooksigenaze COX-2 u osteoblastima. Ispitivanja na pacovima ukazuju da su osteociti, kao i osteoblasti mehanosenzitivni.

2.5. Pljuvačka

Pljuvačka (saliva) predstavlja važnu komponentu oralne homeostaze. Pljuvačka je mešavina sekreta tri para velikih i mnogih malih pljuvačnih žlezdi, koje su smeštene u submukoznom sloju usne duplje i faringusa. Velike pljuvačne žlezde su: parotidna, submandibularna,

sublingvalna, dok se 700–1000 malih klasifikuju kao: labijalne, bukalne, palatinalne, tonzilarne, retro molarne, lingvalne, faringealne, kao i one u oblasti laringsa i traheje.

Normalna, sveža pljuvačka je beličasta penušava i viskozna tečnost otužnog mirisa i bez ukusa. Količina izlučene pljuvačke u toku 24 h varira. Dnevno se izluči 500–600 ml, pa čak i do 1200 ml. Sastav, kao i količina, zavise od tipa, intenziteta i trajanja stimulacije, načina i kvaliteta hrane, pola, doba dana, godina, opšteg zdravstvenog stanja i uzimanja lekova. Voda je glavni sastojak pljuvačke i to 99% dok 1% čine organski i neorganski sastojci: neorganski sastojci su: Ca Na, K, Cl, fosfati, rodanidi, S, Mg, J, Br, NH₄, Cu i Fe, a organski: proteini, ugljeni hidrati, masti, enzimi, vitamini i hormoni.

Pljuvačka ima brojne funkcije. Pored lubrikacije tkiva, pljuvačka održava neutralnu pH sredinu koja omogućava remineralizaciju zuba jonima minerala prisutnim u njenom rastvoru. Takođe, pljuvačka pomaže i antimikrobnu funkciju delovanjem imunoglobulina i proteina. Omogućava funkcije kao što su govor, žvakanje, gutanje hrane i štiti oralnu mukozu.

Lubrikantnu i antimikrobnu funkciju uglavnom ostvaruje bazična nestimulisana pljuvačka, dok se stimulacijom lučenja pljuvačke ostvaruju značajni efekti čišćenja i neutralizovanja oralnog debrisa.

Sa aspekta biohemijskog sastava, porekla i vremena kada se luči možemo razlikovati dva osnovna tipa pljuvačke: *nestimulisanu* i *stimulisanu*.

Nestimulisana pljuvačka predstavlja mešavinu sekreta parotidne, submandibularne, sublingvalne i manjih mukoznih žlezda. U kvantitativnom pogledu ona je u najvećoj meri produkt submandibularne žlezde -65%, parotidne 20–25% i sublingvalne 5–7%. Njena pH varira u širokom spektru vrednosti od 6,1 do 7,5.

Stimulisana pljuvačka je gotovo u potpunosti proizvod sekrecije parotidnih pljuvačnih žlezdi i predstavlja neposredan odgovor na nadražaj. Pljuvačka takođe održava i integritet oralne mukoze i pelikule koja štiti zube nakon erupcije.

Pljuvačne žlezde se sastoje od dva funkcionalno i anatomski različita dela - acinusa i duktusa. Acinus, sekretorni region obično se sastoji od jedne ili najviše dve vrste ćelija. To je mesto skoro kompletne produkcije salivarnog fluida i sekrecije oko 85% egzokrinih proteina. Fluidna, tečna komponenta pljuvačke je produkt lokalnog vaskularnog sistema u formi izotonične primarne sekrecije u lumen acinusa. Primarni fluid se zatim putem sistema kanala (4–5 različitih tipova ćelija) transportuje do usne duplje. Primarna pljuvačka je po sastavu elektrolita slična plazmi. Ona se menja u izvodnim kanalima i stvara se sekundarna pljuvačka. U

najvećoj meri dolazi do reapsorpcije jona Na^+ i Cl^- i u manjoj meri do sekrecije K^+ i HCO_3^- jona. Takođe dolazi do obogaćivanja pljuvačke brojnim proteinima¹⁴.

Pljuvačka odražava čitav spektar normalnih i patoloških stanja organizma, ukazujući na nivo fizioloških sastojaka u tkivima u organizmu, brojnih molekula značajnih sa aspekta terapije i oporavka od bolesti, ali i molekula parametara emocionalnog, hormonskog, imunološkog bolesti statusa. Gotovo sve što može biti mereno u krvi može biti mereno i u pljuvački. Pljuvačka se pouzdano može koristiti za detekciju HIV, virusa hepatitisa A,B,C, kao i u svrhu praćenja prisustva droga u organizmu: marihuana, kokain, alkohol.

Pljuvačka se lako uzorkuje neinvazivnim metodama, što je manje stresno za pacijenta, ne koaguliše, lako se čuva i transportuje. Procedure zasnovane na upotrebi pljuvačke u dijagnostičke svrhe su jeftinije i nose manji rizik za pacijenta, kao i za medicinsko osoblje koje vrši uzorkovanje.

Sa aspekta savremene stomatologije, pljuvačka danas nudi brojne mogućnosti ispitivanja i praćenja fizioloških i patoloških stanja tvrdih i mekih tkiva usne duplje. Smanjena sekrecija pljuvačke, nizak puferski potencijal pljuvačke i smanjena sposobnost za agregaciju bakterija su parametri koja ukazuju na povećan rizik za pojavu karijesa.

Pljuvačka se koristi i za praćenje uznapredovalosti i faze parodontalne bolesti. Gubitak epitelnog pripoja i produbljivanje parodontalnih džepova dovode do curenja fluida sličnog serumu, koji se naziva gingivalna sulkusna tečnost (GST) u usnu duplju. Pošto serum ima 50–70 puta veću koncentraciju proteina, prosečna koncentracija proteina u pljuvački se dramatično povećava, a koncentracija tipičnih komponenti seruma, kao što su albumini, se povećava i do 8 puta. Za vreme aktivnog perioda parodontalne bolesti povećanje koncentracije markera zapaljenja, markera koštane resorpcije, bakterijskih enzima i toksina, degradacionih produkata vezivnog tkiva i proteina ekstracelularnog matriksa može biti detektovano kako u GST tako i u pljuvački²⁸.

2.6. Gingivalna sulkusna tečnost

Gingivalna sulkusna tečnost je eksudat u gingivalnom sulkusu. Njena količina raste sa pojavom i pogoršanjem zapaljenskog procesa na nivou periodoncijuma usled povećanja kapilarne permeabilnosti u gingivi²⁹.

Čini je uglavnom serum, mada njen sastav može varirati u zavisnosti od stanja susjednog gingivalnog tkiva i prisustva bakterija tako da može sadržati ćelije, imunoglobuline, toksine, mikroorganizme i enzime³⁰.

Biohemijska analiza GST nudi mogućnost neinvazivne procene zapaljenskog stanja parodonticijuma preko kvantifikacije i merenja različitih molekula i bakterijskog prisustva^{31–33}. Bakterijski enzimi, degradacioni produkti bakterija i vezivnog tkiva, medijatori zapaljenja, proteini ekstracelularnog matriksa, zajedno ili pojedinačno, mogu biti detektovani za vreme aktivne faze parodontalne bolesti ili za vreme ortodontske terapije fiksnim aparatima u ovoj tečnosti^{34, 35}.

2.7. Mikrobiološka osnova parodontalnih oboljenja

U usnoj duplji postoji više od 400 bakterijskih vrsta, ali se samo neke od njih smatraju parodontalnim patogenima. Neki od ovih mikroorganizama se mogu naći u parodonticijumu zdravih osoba, gde žive u harmoničnom odnosu sa domaćinom.

Poseban značaj u nastajanju parodontalnih lezija imaju Gram negativne bakterije. *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*), *Prevotella intermedia* (*P. intermedia*), *Bacteroides saprofiticus*, *Campilobacter rectus*, *Selenomonas saprofiticus* izazivaju refraktorni periodontitis odraslih osoba³⁶. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (*A. Actinomycetemcomitans*), *Capnocytophaga saprofiticus*, *Prevotella intermedia*, *E. corrodens* su udružene sa parodontalnim oboljenjima mlađih osoba^{37, 38}.

Slots i saradnici (1990) su sprovedli studiju na 1624 pacijenata sa parodontalnom bolešću starosti od 15–89 godina³⁹. Ispitali su povezanost prisustva *A. actinomycetemcomitans* i *B. intermedius* u odnosu na starosno doba. *A. actinomycetemcomitans* je pokazao veću prevalencu (75%) kod pacijenata mlađih od 25 godina u odnosu na stare osobe (31%). *B. intermedius* nije pokazao predilekciju u odnosu na starosnu dob ispitanika. Dobijeni rezultati upućuju da ne postoji ni sinergistička ni antagonistička povezanost ova dva mikroorganizma pri njihovoj subgingivalnoj kolonizaciji.

P. gingivalis, *P. intermedia* i *Bacteroides saprofiticus* se ubrajaju u tamnopigmentisane anaerobne Gram negativne bakterije čiji su virulentni faktori prisutni u proteazi ćelijske membrane, lipopolisaharidima i citokinima koji predstavljaju krajnje metaboličke produkte. *P. gingivalis* se najčešće nalazi u dubokim parodontalnim džepovima, dok se *P. intermedia* i *P. nigrescens* mogu naći u plitkim džepovima, apikalnim lezijama, ali i u zdravom parodonticijumu^{40, 41}. U dubokim parodontalnim džepovima, parcijalni pritisak kiseonika je nizak, dok je pH neutralan. Ovi uslovi mogu da variraju u plićim džepovima u toku impakcije hrane, pranja zuba. *P. gingivalis* raste u anaerobnim uslovima i neutralnoj pH, dok *P. intermedia* i *Porphyromonas nigrescens* mogu preživeti i kiselu sredinu, pa se time i objašnjava njihova različita distribu-

cija u usnoj duplji. Na distribuciju bakterija deluju i šećeri, dok *P. gingivalis* ne koristi šećere, *Prevotella* spp ima saharolitičku sposobnost. Glukoza je jedan od glavnih šećera koji se unosi putem hrane, uzevši u obzir da su i skrob i saharoza izvori ovog šećera. Glukoza ima ulogu u regulaciji bakterijskih metaboličkih enzima. Glukoza modifikuje proteolitičku aktivnost *Capnocytophaga gingivalis*, ali utiče i na proteolitičku aktivnost *P. intermedia*, *P. nigrescens*, *P. gingivalis* u aerobnim uslovima⁴².

U svom istraživanju sprovedenom na 95 pacijenata starosti od 14–62 godina Nonnenmacher i saradnici (2001) su ispitivali subgingivalnu mikrofloru. Pacijenti su imali adultni parodontitis (AP), lokalizovani juvenilni parodontitis (LJP) i rapidno progredirajući parodontitis (RPP)⁴³. Rezultati su pokazali da su *P. intermedia* i *Capnocytophaga* spp. najčešće prisutni mikroorganizmi u svim ispitivanim grupama. *P. gingivalis* i *Peptostreptococcus micros* je bio najčešće prisutan u AP i RPP grupi, dok su *A. actinomycetemcomitans* i *E. corrodens* bili prisutni kod AP, LJP, RPP pacijenata. Druge bakterijske vrste uključujući *Actinomyces* spp., *Streptococcus* spp, i *Eubacterium* spp, su detektovane u različitom nivou kod sve tri grupe ispitanika. Na osnovu svojih rezultata, autori zaključuju da je kompleksnost subgingivalne mikroflore udružena sa različitim grupama parodontalnih bolesti, što ukazuje na potrebu njihovog detektovanja kako bi se na vreme terapijski delovalo.

Virulentnost bakterija *Prevotellae intermediae*, *P. nigrescens* i *P. gingivalis*, može biti modifikovana uslovima sredine, kao na primer sastavom namirnica koje se konzumiraju. Glukoza je glavni hranljivi supstrat oralnih mikroorganizama iako je njihovo snabdevanje glukozom diskontinuirano i zavisi od različitih faktora kakav je dubina džepa. Saito i saradnici (2001) su ispitivali uticaj prisustva glukoze na formiranje krajnjih citotoksičnih produkata i proteolitičku aktivnost pomenutih mikroorganizama⁴⁴. Rezultati istraživanja pokazuju da, iako se rast bakterija *P. intermedia* i *P. nigrescens* u prisustvu glukoze povećava, dolazi do značajnog smanjivanja produkcije krajnjih citotoksičnih faktora, uključujući: sukcinat, izobutirat, izovalerat i amonijak. Proteolitičke aktivnosti bakterija, kao što su razlaganje imunoglobulina, albumina i kazeina, se smanjuju. Efekat glukoze na metaboličku aktivnost *P. gingivalis* nije uočen. Autori su izveli zaključak da se patogenost *P. intermedia* i *P. nigrescens* može smanjiti prisustvom glukoze.

Türkkahraman i saradnici (2005) su sproveli ispitivanje na 21 pacijentu tretiranom fiksnim ortodontskim aparatima⁴⁵. Utvrđivali su da li postoji razlika u mikrobiološkoj flori pacijenata sa primenjenim elastičnim ligaturnim gunicama i pacijenata kod kojih je primenjena žičana ligatura. Rezultati pokazuju da ne postoji signifikantno značajna razlika u gingivalnom indeksu, plak indeksu i dubini džepova između ispitivanih grupa. Broj mikroorganizama je ipak bio veći kod pacijenata sa elastičnim ligaturama.

2.8. Azot monoksid

Azot monoksid (NO) je slobodni radikal sa mnogobrojnim biološkim funkcijama. On je intra i intercelularni signalni molekul i deluje kao modulator niza fizioloških funkcija u organizmu: regulacije vaskularnog tonusa, motiliteta creva, agregacije i adhezije trombocita, formiranja i razgradnje kosti, brojnih imunoloških funkcija, apoptoze, neurotransmisije. To je visoko reaktivni molekul koji brzo difunduje kroz ćelijske membrane, stvara disocijabilne komplekse sa različitim molekulima i ostvaruje svoje efekte u skoro svim sistemima organa. Sve ovo mu omogućuje da kontroliše široki spektar funkcija u organizmu⁴⁶.

Endotelijalne i neuralne ćelije proizvode NO, ali ga mogu proizvoditi i makrofagi kao i druge ćelije zapaljenja. Najvažniji stimulus za sintezu NO su bakterijski produkti. Kada se sintetiše u velikim količinama, kao što se dešava u slučaju sepse, može ozbilno naštetiti kardiovaskularnoj funkciji⁴⁷ ali, ima antibakterijsko dejstvo i smatra se važnim molekulom u odbrani od određenih bakterijskih infekcija⁴⁸. Zapaljenjske ćelije usne duplje takođe proizvode NO⁴⁹. Postoje međutim i istraživanja koja upućuju na to da polimorfonuklearni leukociti (PMNL) pacijenata sa parodontalnom bolešću i gingivitisom suprimiraju produkciju i bioaktivnost NO. Za PMNL izolovane iz parodontalnih džepova je utvrđeno da imaju jak supresorni efekat u poređenju sa PMNL iz venske krvi. Ima autora koji nalaze da pljuvačka pacijenata sa parodontalnom bolešću ne pogađa niti suprimira produkciju NO u PMNL, dok pljuvačka zdravih osoba stimuliše produkciju NO⁵⁰.

In vivo, NO brzo reaguje sa O₂ i gradi stabilan oblik nitrit (NO₂⁻) koji je normalno prisutan u ljudskoj pljuvački⁵¹. Zbog reaktivnosti i kratkog poluveka, direktna merenja NO iz fluida ljudi su teško izvodljiva. Nasuprot tome, merenje NO₂⁻ je znatno lakše i jednostavnije. Nitriti se takođe stvaraju i mikrobiološkom redukcijom nitrata (NO₃⁻) iz hrane. Postoje protivurečni stavovi o važnosti spomenutih izvora nitrita u ljudskoj pljuvački. Kod ljudi nivo salivarnog NO₂⁻ prvenstveno zavisi od oslobađanja NO iz pljuvačnih žlezda⁵².

Značaj NO u živim organizmima je determinisan njegovim reakcijama sa target molekulima, a ove reakcije su uslovljene njegovim hemijskim okruženjem. Biološka reaktivnost ovog važnog medijatora može se sumirati u četiri osnovna metabolička puta:

- destrukcija NO u reakciji sa hemoglobinom
- aktivacija guanil ciklaze
- transformacija u peroksinitrit
- interakcija sa tiol grupama

Reakcija NO sa hemom hemoglobina smatra se jednim od osnovnih metaboličkih puteva endogenog NO. Nakon sinteze, NO slobodno difunduje u vaskularni kompartment gde ga hemoglobin vezuje pre nego što stigne da reaguje sa ćelijskim komponentama. U arterijskoj krvi, u aerobnim uslovima NO reaguje sa oksihemoglobinom, pri čemu nastaju nitrati i methemoglobin. U anaerobnim uslovima reaguje sa deoksihemoglobinom, formirajući nitrozilisani hemoglobin. Hemoglobin takođe može da deluje kao depo azot monoksida u organizmu⁵³.

Aktivacija guanil ciklaze se takođe zasniva na činjenici da je guanil ciklaza enzim koji sadrži hem, pa vezivanje NO dovodi do konformacionih promena molekula ovog enzima, koje dovode do direktne stimulacije katalitičke aktivnosti enzima i produkcije cGMP⁵⁴. Posledična aktivacija cGMP-zavisnih protein kinaza, medijatora lokalne i globalne ćelijske signalizacije, i fosforilacija različitih ćelijskih proteina predstavlja sponu koja se nalazi u osnovi jednog od mogućih mehanizama delovanja NO u ćeliji.

Transformacija u peroksinitrit. U reakciji sa molekulskim kiseonikom (O_2), NO se konvertuje u azot dioksid (NO_2). Ova reakcija se brzo odvija u gasnoj fazi, dok je u rastvoru, pri fiziološkim koncentracijama reaktanata, poluvreme reakcije nekoliko sati. Stoga, u biološkim sistemima molekulski kiseonik nije primarna meta NO⁵⁵. Azot monoksid radije reaguje sa superoksid anjon radikalom (O_2^-), stvarajući snažni oksidant, peroksinitrit ($ONOO^-$)⁵⁶. Budući da poseduje nespareni elektron, NO može brzo da reaguje sa superoksid anjon radikalom (O_2^-), koji se stvara u intracelularnom i u ekstracelularnom kompartmentu, kada dolazi do produkcije peroksinitrita⁵⁷. Stvoreni peroksinitrit reaguje sa brojnim biomolekulima, delujući kao selektivni oksidant i nitrišući agens. On vrši nitrovanje tirozina i tirozinskih ostataka, stvarajući nitrotirozin, koji se može detektovati *in vivo*. Korišćenjem antitela na nitrotirozin otkriveno je da su reakcije nitrovanja uključene u molekulske mehanizme patogeneze arteroskleroze, ishemije miokarda, sepse, distres sindroma pluća, zapaljenjskih bolesti creva, amiotrofične lateralne skleroze i dr.

Interakcija sa tiol grupama. Obično se tvrdi da su tioli glavne mete NO. On može da nitroziliše tiol grupe i pri tom se konvertuje u nitrozonijum jon (NO^+). Ovaj jon zatim reaguje sa tiol grupama, stvarajući nitrozotiole koji mogu da prenose NO^+ grupu na druge sulfhidrilne grupe target proteina, formirajući stabilnije kovalentne veze⁵⁸. Stvoreni nitrozotioli se smatraju prirodnim depoom i transportnim oblikom NO-a, koji učestvuje u kontroli fluksa NO kroz ćeliju, a time i u dostupnosti NO za druge metaboličke puteve. Smatra se da mehanizmi nitrovanja i nitrozilacije imaju važnu ulogu u mehanizmima delovanja NO *in vivo*, kao što su inhibicija adenil ciklaze, aktivacija protein kinaze C, inhibicija NMDA receptora u CNS i nitrozilacija receptornih proteina. Nitrovanje ostataka tirozina i cisteina u nukleoproteidima i sledstvena

aktivacija ili inhibicija ovih molekula nalaze se u osnovi biološkog odgovora na NO u mnogim tkivima⁵⁹.

Neusaglašenost stavova o učešću azot monoksida u fiziološkim, ali i brojnim patofiziološkim stanjima (artritis, ateroskleroza, parodontalna bolest, infarkt miokarda kancerogeneza, dijabetes, brojne neurodegenerativne bolesti i dr., dodatno se komplikuje činjenicom da ovaj molekul ispoljava multiple i često paradoksalne efekte u organizmu.

2.8.1. Azot monoksid i gingivo-parodontalna bolest

Pozitivni efekti NO, bar kada je reč o zapaljenskim procesima parodontcijuma, se odnose na uništavanje bakterija, a negativni na oštećenje sopstvenog tkiva preko mehanizama oksidacije, nitritne reakcije, inhibicije enzima, oštećenja DNK i aktivacije metaloproteinaze. Kao i drugi slobodni radikali, NO učestvuje u aktivaciji prokolagenaza u neutrofilima i suprimira sintezu proteoglikana i kolagena. Ovo može biti još jedan od mehanizama preko koga NO sudeluje u napredovanju gingivalnih oštećenja preko gubitka kolagena.

Dosadašnji rezultati ispitivanja uticaja NO na resorpciju kosti kod hroničnih oboljenja parodontcijuma nisu najjasniji. Literaturni podaci ukazuju na preventivne, ali i destruktivne efekte NO na kost, verovatno u zavisnosti od njegove koncentracije. Budući da NO ima značajnu ulogu u reakcijama na infektivne agense u oralnim tkivima, smatra se da ovaj molekul u pljuvački u parodontalnim bolestima može biti deo nespecifičnog prirodnog mehanizma odbrane protiv patogenih bakterija. Pritom je dokazano da lipopolisaharidi G(-) bakterija zajedno sa TNF α , IL1 i TNF γ predstavljaju značajne stimulatore sinteze NO u humanim i životinjskim ćelijama.

Azot monoksid se u organizmu stvara pomoću dva mehanizma, nezavisnog i zavisnog. Nezavisni mehanizam podrazumeva nastanak nitrita i nitrata iz hrane u procesu njenog razlaganja i fermentacije pod uticajem bakterija i enzima usne duplje kao i želudačne kiseline. U direktnom mehanizmu sinteze učestvuju enzimi NO sintaze.

Sintetiše se konverzijom L-arginina u L-citrulin pod dejstvom enzima azot monoksid sintaze (NOS). Azot monoksid sintaza se javlja u tri izoforme: neuronalna (nNOS), endothelijalna (eNOS), koja je prvi put otkrivena u ćelijama vaskularnog endotela i inducibilna (iNOS). Dok nNOS i eNOS proizvode male količine NO tokom kratkog vremenskog perioda, koji prati stimulaciju receptora, iNOS se aktivira kao odgovor na proinflamatorne stimulse i proizvode velike količine NO⁶⁰. Prve dve forme enzima, nNOS i eNOS, su zavisne od intracelularnog kalcijuma i količina NO koji proizvode je mala, na pikomolarnom nivou, i nestaje za

manje od 4 s. Nasuprot tome, iNOS produkuje NO u makrofagima koji su prethodno stimulirani od strane inflamatornih citokina, kao što je IL-1, količina produkovanog NO je veća, na nano molarnom nivou, a sintetisani NO je stabilan nekoliko sati⁶¹.

Indukcija ekspresije iNOS može inhibirati fibroblastnu proliferaciju i uzrokovati apoptozu, pa i na taj način može dovesti do disbalansa destrukcije i reparacije tkiva parodontijuma⁶².

2.9. Nuklearni faktor kappa B, RANKL i OPG

Nuklearni faktor kappa B (nuclear factor kappa-light-chain enhancer of activated B cells - NF- κ B) je proteinski kompleks koji kontroliše transkripciju DNK. Pronađen je kod gotovo svih tipova životinjskih ćelija i igra ulogu u ćelijskom odgovoru na stimulse kakvi su: stres, citokini, slobodni radikali, ultravioletno zračenje, bakterijski ili virusni antigeni⁶³. On ima ključnu ulogu u regulaciji imunog odgovora na infekciju. Nepravilna regulacija NF- κ B se povezuje sa nastankom kancera, zapaljenskih i autoimunih bolesti, septičkim šokom, virusnim infekcijama i nepravilnim razvojem imuniteta.

Svi proteini iz porodice NF- κ B dele Rel Homology domen na svom N kraju. Subporodica proteina koja uključuje RelA, RelB i c-Rel ima transaktivacioni domen na svojim C krajevima. Proteini NF- κ B1 i NF- κ B2 se sintetišu kao veliki prekursori p105 i p100 koji dalje podležu obradi kako bi nastale zrele NF- κ B subjedinice^{64, 65}.

Pomenuti NF- κ B je bitan u smislu regulacije ćelijskog odgovora zato što pripada kategoriji brzodelujućih transkripcionih faktora, to je faktor koji je takođe prisutan u ćeliji, čak i u inaktivnom stanju, i ne zahteva novu ćelijsku sintezu kako bi se aktivirao. Ove činjenice objašnjavaju zašto je NF- κ B prvi faktor odgovora na oštećujuća dejstva koja deluju na ćeliju. Brojni faktori kao što su: faktor tumorske nekroze α (TNF- α), IL-1 β , bakterijski lipopolisaharidi (LPS), kokain i jonizujuće zračenje dovode do njegove aktivacije⁶⁶.

Osteoprotekterin (OPG), receptor aktivator NF- κ B ligand (RANKL) i membranski receptor (RANK) su proteini-ligandi koji pripadaju superfamiliji receptora za faktor tumorske nekroze i funkcionišu kao parakrini regulatori osteoklastogeneze i koštanog metabolizma^{67, 68}.

Osteoprotekterin predstavlja protein sastavljen od 380 aminokiselina. On se sekretuje kao solubilni protein. Poznato je da je mitohondrijalna RNK za OPG eksprimirana u brojnim tkivima⁶⁹ ali je OPG protein uglavnom sekretovan od strane osteoblastne ćelijske linije i aktivisanih T limfocita. Njegova glavna uloga je u inhibiciji diferencijacije osteoklasta i u stimulaciji njihove apoptoze. Membranski receptor RANK je sastavljen iz 616 aminokiselina. Nalazi se na

površini ćelijske membrane prekursora osteoklasta. Protein RANKL je sastavljen iz 317 aminokiselina, proizvode ga ćelije osteoblastne linije i aktivisani T limfociti. Kada je RANKL ekspresiran od strane ćelija osteoblastne loze vezan je za ćelije, a kada je ekspresiran od strane T limfocita, on je solubiln i nalazi se kao slobodan (s-RANKL).

Činjenica da su koštani rast i remodeliranje koštanog tkiva poremećeni kod autoimunih bolesti, kakva je reumatoidni artritis, pokrenula je istraživanja sa svrhom da se pronadje mehanizam kojim imuni sistem deluje na kosti. Sedamdesetih godina prošlog veka postalo je jasno da ćelije imunog sistema luče solubilne faktore koji utiču na osteoklastima posredovanu resorpciju kosti. Od tada počinje potraga za faktorom nazvanim faktor osteoklastne diferencijacije, odnosno molekulom koga luče imunociti, a koji reguliše diferencijaciju osteoklasta⁷⁰. Godine 1998. otkriven je RANKL, molekul koga luče osteoblasti, a stimuliše diferencijaciju osteoklasta. Mitohondrijalna RNK za RANKL je ekspresirana u velikoj meri u koštanom tkivu i koštanjoj srži, kao i u limfoidnom tkivu. Uloga RANKL je da stimuliše formiranje, fuziju, diferencijaciju, aktivaciju i preživljavanje osteoklasta, pa samim tim i utiče na pojačavanje koštane resorpcije⁷¹⁻⁷³.

Biološki efekat RANKL-a se ostvaruje u onom trenutku kada se veže za receptor RANK. Efekti OPG su drugačiji od onih koji su posredovani RANKL, zato što je OPG solubilni antagonist receptora, jer vezuje i neutralizuje RANKL i sprečava nastanak RANKL-RANK interakcije⁷⁴. Ovo objašnjava zašto resorptivna aktivnost osteoklasta, indukovana solubilnim RANKL ili RANKL vezanim za ćelijsku površinu može u potpunosti biti kompromitovana prisustvom OPG. Može se izvesti zaključak da je sistem RANK, RANKL i OPG onaj koji reguliše koštani metabolizam i biologiju osteoklasta.

Osteoprotekcin uglavnom funkcioniše kao lažna meta receptor za RANKL. Proizvode se u brojnim tkivima među kojima su: koštano tkivo, intestinum, kardiovaskularni sistem, bubrezi, pluća, hematopoezne ćelije, ćelije imunog sistema, jetra, mozak, kičmena moždina i tireoidna žlezda⁷⁵. Njegova ekspresija je modulirana od strane raznih citokina, proteina, hormona, lekova⁷⁶. Citokini koji su uključeni u regulaciju ekspresije OPG su: TNF- α , IL-1 α , IL-18, transformišući faktor rasta β (TGF β) i steroidni hormoni kao na primer 17 β estradiol⁷⁷⁻⁸¹.

Prisustvo OPG u serumu je od velikog značaja za održavanje koštanje mase, pošto vezuje cirkulišući RANKL koji je u višku. Mitohondrijalna RNK za RANKL je visoko ekspresirana u koštanom tkivu, koštanjoj srži, limfoidnom tkivu, jetri, slezini i timusu⁸². Solubilna forma RANKL-a je sposobna da indukuje formiranje osteoklasta u odsustvu ćelijske forme. Moguće objašnjenje je diferencijacija perifernih mononuklearnih ćelija i makrofagima sličnih ćelija krvi⁸³.

Kao solubilni protein, RANKL je produkovan od strane aktivisanih T limfocita, pa je koštana resorpcija regulisana od strane imunog sistema, gde T ćelijska ekspresija RANKL može voditi i u patološka stanja, kao što su parodontitis i autoimuni artritis⁶⁸. Smatra se da OPG zato što inhibiše aktivnost RANKL može imati terapeutsko dejstvo za razne bolesti.

Sistem OPG-RANKL-RANK je instrument za interakciju između koštanog, vaskularnog i imunog tkiva. U krvotoku postoji značajno prisustvo OPG i solubilne forme RANKL, a merenja njihovih koncentracija pružaju uvid u regulatorni mehanizam ovog sistema. Tako je na primer nivo OPG visok u serumu žena u postmenopauznom periodu života kod kojih postoji osteoporoza. Ovo se objašnjava kao homeostatski mehanizam za limitiranje brzog gubitka koštanog tkiva⁸⁴.

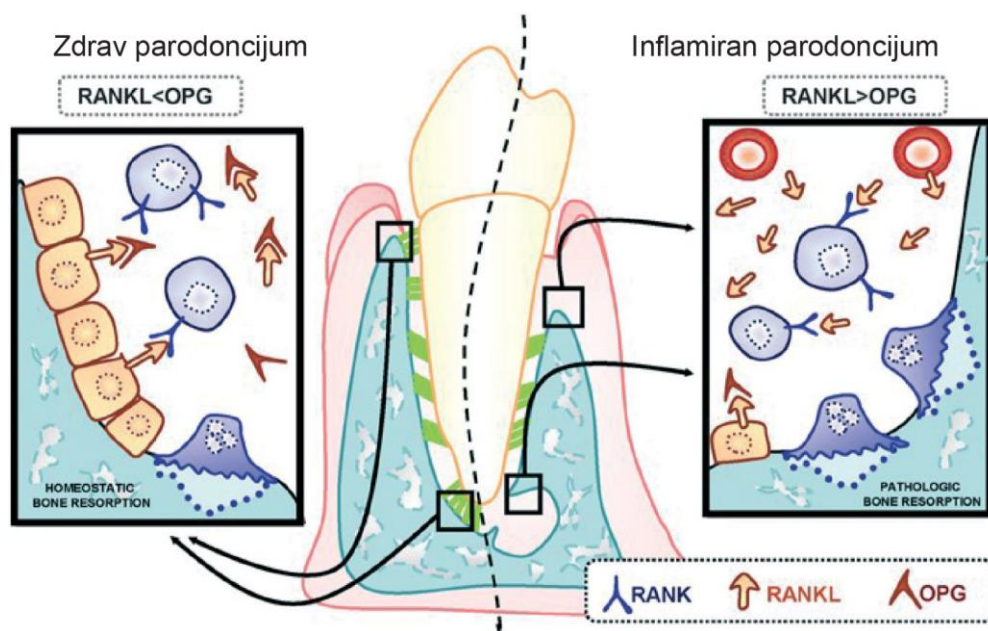
Pomenuti ligandi takođe vrše značajnu funkciju u regulaciji remodeliranja kosti za vreme ortodontskog pomeranja zuba⁸⁵. Malo se zna o nivou RANKL i OPG u humanoju GST za vreme ortodontske terapije. Većina studija je bila usmerena na nivo pomenutih liganada u GST pacijenata sa parodontalnom bolešću. Bolje razumevanje sistema RANKL-OPG moglo bi voditi ka razvijanju novih kliničkih tehnika i definisanju najoptimalnijih sila koje se mogu upotrebiti u cilju pomeranja zuba.

2.9.1. RANKL i gingivo- parodontalna bolest

Gingivalna sulkusna tečnost je pogodna za neinvazivnu analizu parodontalnog stanja, uključujući ispitivanja markera vezivnog tkiva i koštane resorpcije⁸⁶. Ekspresija RANKL i OPG je regulisana sistemskim i lokalnim stimulusima, uključujući hormone, medijatore zapaljenja, bakterijske produkte i imunosupresivne lekove⁸⁷. Ključna uloga ekspresije RANKL i OPG u regulaciji destrukcije kosti je dokazana u nekoliko *in vivo* modela bolesti, uključujući reumatoidni artritis i parodontitis^{88,89}. Postoje studije koje potvrđuju da RANKL i OPG mogu biti detektovani u humanoju GST, kao i da je nivo RANKL povišen, a nivo OPG snižen kod parodontitisa ili za vreme ortodontskih tretmana⁹⁰⁻⁹². Odnos RANKL/OPG je jako važan faktor u regulaciji resorpcije kosti u periodontalnom, kao i periapikalnom okruženju. U homeostatskim uslovima, odnos RANKL i OPG je uravnotežen, pa je osteoklastogeneza limitirana. Sa zapaljenjskim stimulusima odnos RANKL/OPG se remeti u korist RANKL, što vodi u patogenu resorpciju alveolarnih kosti.

Interesantno je i to da TNF- α , interleukin-1 β (IL 1 β), IL-6 i prostanglandin E2 utiču na porast nivoa iRNK za RANKL i samog proteina, dok citokini i prostanglandini pospešuju inhibiciju transkripcije iRNK za OPG i smanjuju nivo proteina u osteoblastima⁷⁷. Baltacioğlu i

saradnici (2014) su u sprovedenoj studiji ispitivali međuzavisnost između totalnog oksidantnog statusa (TOS), nivoa RANKL i OPG kao i RANKL/OPG odnosa u serumu i GST kod pacijenata sa hroničnom i generalizovanom akutnom parodontalnom bolešću⁹³.



Slika 10. Uticaj RANKL/OPG odnosa na koštanu resorpciju u zdravom i bolesnom parodoncijumu⁹⁴.

U studiju su uključili 30 pacijenata sa hroničnom, 30 sa akutnom parodontalnom bolešću i 28 sa zdravim parodoncijumom. Vrednosti TOS, RANKL i RANKL/OPG odnosa u GST i serumu su očekivano bile statistički značajno više kod pacijenata sa parodontalnom bolešću u odnosu na kontrolu, pri čemu je ovo povećanje evidentnije kod akutne u odnosu na hroničnu bolest. Ovo ukazuje da je oksidativni stres blisko povezan sa izraženošću parodontalne bolesti i sa biomarkerima koštane resorpcije.

2.9.2. B i T limfociti kao primarni izvori RANKL u koštanim lezijama kod parodontalne bolesti

U istraživanjima ćelijskih izvora RANKL u lezijama parodontalne bolesti najčešće se koristi *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) test i dvobojna konfokalna mikroskopska analiza. Rezultati dobijeni ELISA testom nedvosmisleno pokazuju veću produkciju solubilnog RANKL u gingivalnom tkivu pacijenata sa parodontalnom bolešću u poređenju sa zdravim tkivom. Konfokalna mikroskopska analiza pokazuje da su upravo T i B limfociti, a ne monociti

ili fibroblasti osnovni izvor RANKL u koštanim lezijama kod parodontalne bolesti. Zato se i smatra da T i B limfociti igraju najvažniju ulogu u progresiji i patogenezi bolesti⁹⁵.

Kawai i saradnici su dokazali uticaj regulacije funkcije i aktivacije T limfocita u progresiji parodontalne bolesti^{96,97}. U daljim studijama je dokazan uticaj T limfocita specifičnih za *A. actinomycetem comitans* u progresiji parodontalne bolesti na pacovima inficiranim sa *A. actinomycetem comitans*⁹⁸. T limfociti izolovani iz gingivalnog tkiva miševa imunizovanih na *A. actinomycetem comitans* i *P. pneumotropica* su uzgajani *in vitro*, a produkovali su sRANKL kao odgovor na prisustvo antigena obe bakterije. T limfociti iz gingive neimunizovanih miševa nisu reagovali produkcijom sRANKL na prisustvo bakterijskih antigena. Ovakvi rezultati pokazuju da pomenuti mikroorganizmi preko T limfocita indirektno utiču na ekspresiju RANKL kod osoba sa parodontalnom bolešću⁹⁹.

Pošto su bakterije uključene u nastanak parodontalne bolesti ekstracelularni patogeni, CD4+ T limfociti imaju najvažniju ulogu u prepoznavanju antigena ovih bakterija. Baker i saradnici (1999) ističu da je gubitak kosti manji kod CD4+ deficijentnih miševa nakon infekcije bakterijskim patogenima, dok ova pojava nije uočena kod CD8+ deficijentnih miševa¹⁰⁰. Ima i drugih studija koje ukazuju da su CD4+ T limfociti predominantni u gingivalnom tkivu kod osoba sa parodontalnom bolešću i da oni ekspimiraju RANKL mnogo više od dendritičnih ćelija ili monocita. Neopredeljene, prirodne CD4+ helper ćelije mogu biti podstaknute na diferencijaciju u T helper ćelije (Th1, Th2, Th17 ili regulatorni T limfocit (Treg) zavisno od prisutnih citokina. Citokini kao što su IL-27, IL-6, IL-12 mogu u velikoj meri vršiti inhibiciju ekspresije mRANKL i sekrecije sRANKL u CD4+ T limfocitima¹⁰¹. Kod Th 17 ćelija, IL-27 mnogo manje efikasno inhibiše RANKL ekspresiju nakon restimulacije, pa zaključujemo da različiti tipovi T ćelija igraju različite uloge u regulaciji ekspresije RANKL.

Više od 90% B limfocita iz ljudskog obolelog parodontalnog tkiva ekspimirira RANKL, nasuprot T limfocita od kojih samo 54% ekspimirira RANKL. Izgleda da B limfociti ne zahtevaju prisustvo T limfocita da bi izazvali resorpciju kosti (Slika 11). Kod pacova sa kongenitalnim nedostatkom timusa i eksperimentalno izazvanom parodontalnom bolešću kada se injekcijom ubrizgaju B limfociti donora, produkcija RANKL i posledična diferencijacija osteoklasta se značajno uvećava kod pacova koji su primili limfocite imunizovane na *A. actinomycetem comitans* u odnosu na grupu pacova koja je primila ne imunizovane limfocite¹⁰². Han i saradnici (2009) su u svojoj studiji zaključili da je ekspresija RANKL u B-limfocitima pre posledica aktivisanja ovih ćelija u okviru adaptivnog imunog odgovora nego njihove prirodne urođenje imune reakcije na *A. Actinomycetem comitans*¹⁰³. Preimunizacija životinja sa *A.*

Actinomyces comitans vodi u pojačanu B ćelijsku reakciju koja podrazumeva pojačanu ekspresiju RANKL.

2.9.3. Osteoblasti, osteoklasti i ekspresija RANKL u parodontalnom tkivu

Kod miševa sa deficijencijom RANKL u osteoblastnoj liniji postoje manje mogućnosti za gubitak kosti prouzrokovan ovarijektomijom, kao i manja mogućnost za gubitak kosti vilica kod postojanja artritisa. Kod miševa koji imaju deficijenciju za RANKL u T limfocitima ne postoji ovakav zaštitni potencijal u odnosu na koštano tkivo. Nameće se zaključak da osteoblastna linija ima značajniju ulogu u koštanoj resorpciji¹⁰⁴. Atkins i saradnici (2003) su došli do rezultata koji ukazuju da je ekspresija RANKL povezana sa stadijumom diferencijacije humanih osteoblasta, a da je RANKL više ekspimiran od strane nezrelih osteoblasta, dok ekspresija opada sa njihovim sazrevanjem¹⁰⁵.

Postoje studije koje tvrde da su osteociti, a ne osteoblasti ili njihovi progenitori glavni izvor RANKL koji će uticati na formiranje osteoklasta u trabekularnoj kosti. Nakashima i saradnici (2011) ističu da *in vitro* prečišćeni osteociti produkuju statistički značajno više RANKL u poređenju sa osteoblastima i marginalnim stromalnim ćelijama kosti, pa samim tim imaju veći potencijal za podržavanje osteoklastogeneze¹⁰⁶. Xiong i O'Brien (2012) su ispitujući miševе sa osteocitima sa nedostatkom sposobnosti za produkciju RANKL došli do zaključka da je modelovanje metafizealnog korteksa dugih kostiju (femura) kontrolisano od strane drugih ćelija u većoj meri nego od strane osteocita¹⁰⁷. Autori zaključuju da RANKL sintetisan od strane osteocita igra verovatno veću ulogu u remodelaciji kosti.

2.9.4. Makrofagi i ekspresija RANKL u parodontalnom tkivu

Makrofagi nisu glavni izvor RANKL u parodontalnom tkivu u toku parodontalne bolesti ali mogu da utiču na njegovu ekspresiju preko svojih pattern recognition receptora (PRRs) i preko citokina¹⁰⁸. Makrofagi vrše fagocitozu, prepoznaju parodontalni patogen, a zatim pokreću seriju intracelularnih događaja koji vode ka aktivaciji NF-κB i kulminiraju ekspresijom zapaljenskih medijatora¹⁰⁸. Interesantno je da se broj ćelija koje ekspimiraju Toll-like receptor 2 (TLR2), ali ne i onih koje ekspimiraju TLR4 receptore, povećava linearno kod pacijenata sa zapaljenskim procesom na gingivi. Ovo ima veze sa činjenicom da većina suspektnih parodontalnih patogena prvenstveno aktivira TLR2 receptore. Regulacija ekspresije ovih receptora, kao i njihova aktivacija od strane parodontalnih patogenih bakterija upućuje da oni imaju potencijalno značaj-

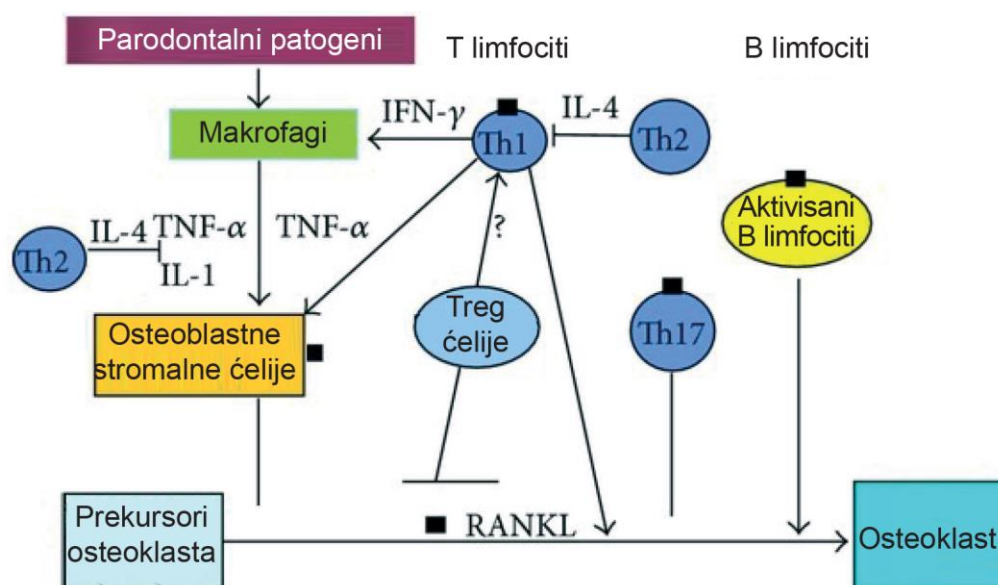
nu ulogu u patogenezi parodontalne bolesti. To da li ovi receptori igraju ulogu u balansiranju zaštitnog imuniteta ili destruktivnog zapaljenja još uvek nije potpuno razjašnjeno¹⁰⁹.

Kliničke i eksperimentalne studije su pokazale da je prepoznavanje *P. gingivalis* od strane PRR receptora prvi korak u reakciji domaćina na njega, a da se TLR grupa receptora pojavljuje kao glavna grupa PRR receptora u procesu prepoznavanja *P. gingivalis* eksponiranja i daljeg signaliziranja. Eksperimentalna studija na miševima je pokazala da signalizacija preko TLR2 vodi ka gubitku oralne kosti¹¹⁰.

Rezultati dobijeni u kliničkim studijama koje koriste pristup genskog polimorfizma se ne podudaraju sa tim da je glavna uloga u patogenezi parodontalne bolesti u TLR receptorima¹¹¹. Nisu uspeli da dokažu vezu između TLR2 receptora i periodontalne bolesti. Verovatno je da pored TLR i drugi PRR receptori mogu doprinostiti razvoju parodontalne bolesti. Baer i saradnici (2009) smatraju da Scavenger receptor A, koji se eksprimira od strane makrofaga kao deo odgovora na prisustvo *P. gingivalis*, igra ulogu takođe i u ekspresiji TNF- α što dalje dovodi do ekspresije RANKL¹¹².

Proliferacija i diferencijacija osteoklasta može biti pospešena od strane TNF- α ali u prisustvu RANKL. Resorptivna aktivnost osteoklasta diferentovanih pod uticajem TNF- α , a u odsustvu RANKL zavisna je pre svega od IL-1 koji je eksprimiran u interakciji limfocita i monocita¹¹³. Važna uloga TNF- α i IL-1 u procesu parodontalne bolesti u regulaciji osteoklastogeneze je već dokazana u *in vitro* i *in vivo* studijama^{114, 115}. Dokazana je i pozitivna korelacija između TNF- α i IL-1 i RANKL kod eksperimentalno prouzrokovane parodontalne bolesti¹¹⁶. Fujihara i saradnici (2014) su pokazali da TNF- α pospešuje ekspresiju RANKL od strane gingivalnih epitelijalnih ćelija¹¹⁷. Humani fibroblasti iz periodontalnog ligamenta su sposobni da pod uticajem IL-1 β i TNF- α inhibiraju osteoklastogenezu na taj način što proizvode više OPG nego RANKL¹¹⁸. deVries i saradnici (2006) su detektovali visok nivo OPG u kulturi fibroblasta dok RANKL nije detektovan¹¹⁹.

Mononuklearne ćelije u prisustvu fibroblasta ne prouzrokuju koštanu resorpciju, što je još jedna vrsta dokaza da fibroblasti sekretuju inhibitorne faktore za gubitak kosti. Ovo vodi ka disfunkciji ćelija sličnih osteoklastima. Nespopsobnost mononuklearnih ćelija da u prisustvu fibroblasta resorbuju kost se može promeniti dodavanjem macrophage colony-stimulating factor-a (M-CSF) i RANKL u medijum kulture. Ovakvi rezultati upućuju da fibroblasti u okolini zuba ipak mogu biti sposobni da otpočnu formiranje ćelija sličnih osteoklastima, ali njihova primarna i još važnija uloga je u sprečavanju koštane resorpcije.



Slika 11. Diferencijacija osteoklasta pod uticajem parodontalnih patogena ¹²⁰.

2.10. Citokini

Citokini su mali sekretorni proteini koji posreduju i regulišu imune reakcije, zapaljenja i hematopoeze. Ovi proteini se stvaraju *de novo* kao reakcija na imuni stimulus. Oni obično, mada ne uvek, deluju sa kratkog rastojanja, šire se u kratkom vremenskom intervalu i u niskoj koncentraciji. Deluju vezujući se za membranske receptore, koji zatim putem sekundarnih glasnika najčešće tirozin-kinaze utiču na gensku ekspresiju.

Reakcija na citokine uključuje: povećanje ili smanjenje ekspresije membranskih proteina uključujući tu i citokinske receptore, ćelijsku proliferaciju i sekreciju efektornih molekula. Citokini su generalno prihvaćeno ime, druga imena koja se upotrebljavaju su i *limfokini* (citokini sekretovani od strane limfocita), *monokini* (citokini sekretovani od strane monocita), *hemokini* (citokini sa hemotaksičnom aktivnošću) i *interleukini* (citokini produkovani od strane jednog leukocita da bi delovali na druge leukocite).

Citokini mogu delovati na ćelije koje su ih sekretovale (autokrini aktivnost), na susedne ćelije (parakrini aktivnost) ili iz nekog razloga ulaze u cirkulaciju i deluju na udaljene ćelije (endokrini aktivnost). Uobičajena je pojava da različiti tipovi ćelija sekretuju određeni citokin ili da jedan citokin deluje na više različitih tipova ćelija. Najčešće se proizvode u kaskadama, pošto jedan citokin stimuliše njegove ciljane ćelije na produkciju novih citokina. Mogu takođe da deluju sinergički (dva ili više citokina pojačavaju međusobno svoja dejstva) ili antagonistički (dva ili više citokina umanjuju ili isključuju međusobno svoja dejstva) ¹²¹.

Pro-inflamatorni citokini stimulišu zapaljenje. Glavni pro-inflamatorni citokini koji su odgovorni za fazu ranog odgovora su: IL-1 α , IL-1 β , IL-6 i TNF- α . Drugi pro-inflamatorni medijatori uključuju interferon- γ (IFN- γ), Transformišući faktor rasta – beta transforming growth factor-beta (TGF- β), IL-8, IL-11, IL-12, IL-17, IL-18 i mnoštvo drugih hemokina. Pro-inflamatorni citokini mogu delovati poput endogenih pirogena (IL-1, IL-6, TNF- α) koji regulišu sintezu sekundarnih medijatora i ostalih proinflamatornih citokina preko makrofaga i mezenhimalnih ćelija (fibroblasti, epitelijalne i endotelijalne ćelije), stimulišući produkciju proteina akutne faze ili privlačeći ćelije zapaljenja^{122–124}.

Antiinflamatorni citokini deluju protiv različitih oblika zapaljenja, što doprinosi kontroli zapaljenskog odgovora *in vivo*. Ovi medijatori deluju uglavnom preko inhibicije produkcije proinflamatornih citokina ili preko blokiranja njihovih bioloških efekata. Glavni anti-inflamatorni citokini su IL-4, IL-10 i IL-13. Ostali anti-inflamatorni medijatori su: IL-16, IFN- α , TGF- β , IL-1 antagonist receptora (IL-1ra), faktor stimulacije granulocitne kolonije, granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF), kao i rastvorljivi receptori za TNF ili IL-6. Čisti efekt zapaljenskog odgovora je određen balansom između pro- i anti-inflamatornih citokina. Tip, trajanje i obim ćelijske aktivnosti uzrokovane tačno jednim citokinom u velikoj meri zavise od prirode target ćelije i mikro okruženja same ćelije. Tako na primer, na reakciju ćelije utiču stadijum rasta i aktivnosti ćelije, kao i tip ćelija u okolini, koncentracija citokina i prisustvo drugih citokina¹²¹.

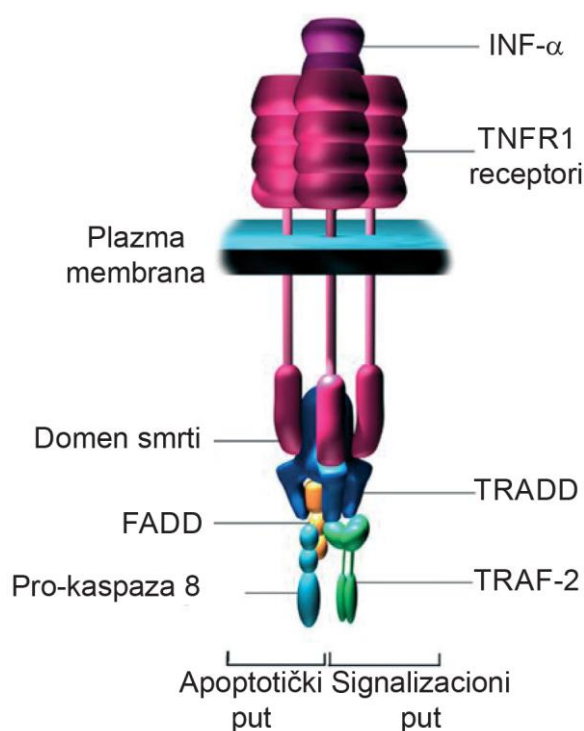
2.11. Faktor tumorske nekroze- α

Faktor tumorske nekroze alfa je protein iz familije citokina koji ima značajnu ulogu u sistemskom zapaljenju. Pripada grupi citokina koja stimuliše sintezu proteina akutne faze zapaljenja. Reč je o trimernu sastavljenom iz tri identične osnovne jedinice (homotrimer) i ima molekulsku masu od 51 kDa¹²⁵.

Primarno se stvara kao stabilan transmembranski protein tip II sastavljen od 212 aminokiselina. Iz ove forme, integrisane u membranu, solubilni citokin se oslobađa zahvaljujući proteolitičkoj aktivnosti metaloproteinaze - TNF- α konvertujućeg enzima (TACE). Za protoimer TNF- α je karakteristična „jelly roll“ beta struktura koju formiraju talasasto uređeni i neuređeni delovi peptidnog lanca. Ova struktura je karakteristična za TNF- α familiju citokina, a nalazi se i u proteinima virusnih kapsula. Kod ljudi, TNF- α je kodiran genom lokalizovanim na hromozomu 6 (6p23-6q12), unutar lokusa za glavni histokompatibilni kompleks. Ima brojne nazive i skraćenice: kahektin, citotoksični faktor (CF), endogeni pirogen (EP), hemoragični faktor i dr.

On indukuje više tipova bioloških odgovora putem TNF receptora tip 1 (TNFR1) i tip 2 (TNFR2). Receptor TNFR1 ima molekulsku masu od 55-60 kDa, eksprimiran je od strane svih somatskih ćelija, a aktiviraju ga solubilni i membranski TNF- α . On je glavni signalni receptor za TNF- α i započinje većinu bioloških funkcija ovog interleukina. Receptor TNFR2 ima molekulsku masu od 75-80 kDa, eksprimiraju ga uglavnom ćelije imunog sistema (stimulisani T i B limfociti). Aktivira ga jedino membranski TNF- α . Ovaj receptor posreduje samo u malom broju bioloških odgovora koje pokreće TNF- α . Pri vezivanju TNF- α za receptor pokreću se signalni putevi sa raznim fiziološkim posledicama ¹²⁶.

Signalizacija preko TNFR1 receptora može voditi ka zapaljenskom ili citotoksičnom odgovoru. Vezivanjem liganda za receptor TNFR1 dolazi do konformacionih promena u receptoru, što vodi disocijaciji inhibitornog proteina SODD (silencer of death domain) iz intracelularnog domena smrti. Ova disocijacija omogućava intracelularnom adaptor proteinu (tumor necrosis factor receptor type 1-associated DEATH domain protein-TRADD) da se veže za domen smrti, što služi kao osnova za vezivanje bar tri medijatora. Dakle, adapter protein je taj koji omogućava transformisanje signala od aktiviranog TNFR1 receptora u intracelularne kaskadne mehanizme koje vode u apoptozu, aktivaciju NF- κ B ili diferencijaciju i proliferaciju ćelije preko JNK kaskade (Slika 12).



Slika 12. Aktivacija TNFR1 receptora od strane TNF- α ¹²⁷

Aktivacija NF- κ B:

Receptor TRADD ima sposobnost da privuče i veže različite proteine među kojima je i TNF receptor-associated factor 2 (TRAF2). On zatim može voditi u aktivaciju NF- κ B ili c-jun N terminal kinaze (JNK). Kada TRAF2 veže multi komponentnu protein kinazu IKK, onemogućava serin treonin kinazu RIP da je aktivira. Inhibitorni protein, (nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha) I κ B α , koji se normalno veže za NF- κ B i inhibira njegovu translokaciju, biva fosforilisan od strane IKK i degradiran kasnije. NF- κ B je transkripcioni faktor koji se translocira u jedro i posreduje u transkripciji

proteina uključenih u ćelijski opstanak, proliferaciju, inflamatorni odgovor i antiapoptotičku aktivnost¹²⁸.

Aktivacija mitogen aktivisanih protein kinaza (MARK) puteva:

Faktor tumorske nekroze α uslovljava jaku aktivaciju JNK, povezane sa stresom što dovodi do provociranja umerenog odgovora p-38- MAPK, i slabe aktivnosti klasične ekstracelularne signal aktivisane kinaze (ERKs). TRAF-2 aktivira JNK, koji se zatim translocira u jedro i aktivira transkripcione faktore. Put aktiviranja JNK je uključen u diferencijaciju i proliferaciju ćelija.

Indukcija signaliziranja smrti:

Pošto svi domeni smrti sadrže članove TNFR superporodice, TNFR1 je uključen u signalizaciju smrti¹²⁹. Ćelijska smrt indukovana TNF- α igra samo malu ulogu kada se uporedi sa njegovim nadmoćnim funkcijama u zapaljenskim procesima. Njegova sposobnost da prouzrokuje smrt je slaba kada ga uporedimo sa ostalim članovima pomenute familije kao što je fas, na primer.

Kao što smo videli, primarna uloga TNF- α je u regulaciji imunih ćelija, ali on može da učestvuje i u indukciji ćelijske apoptoze, zapaljenja, inhibiciji tumorogeneze i viralne replikacije. Poremećaj regulacije produkcije TNF- α je prisutan kod brojnih bolesti čoveka, čak i kod kancera¹³⁰. Većina ćelija u organizmu reaguje nekim odgovorom na stimulaciju ovim citokinom. U patofiziološkim uslovima ovaj citokin deluje dvojako pošto aktivno učestvuje u regeneraciji i destrukciji tkiva. Pozitivan efekat je taj što u malim količinama deluje na balansiranje cirkadijalnog ritma, utiče na uspostavljanje i održavanje homeostaze, uklanjanje ostarelog i oštećenog tkiva i stimulisanje rasta fibroblasta.

Uglavnom se stvara u makrofagima, ali ga proizvode i brojne druge ćelije: limfoidne ćelije, mastociti, endotelne ćelije, kardiomiociti, masne ćelije, fibroblasti, osteoblasti i ćelije nervnog tkiva. Od tipa ćelije u kojoj se sintetiše, zavisi i biološki efekat TNF- α . Velika količina TNF- α se oslobađa kao odgovor na lipopolisaharide, druge bakterijske produkte i interleukin-1 (IL-1). Zajedno sa IL-1 β i IL-16, TNF- α deluje na brojne organske sisteme. U hipotalamusu indukuje oslobađanje corticotropin releasing hormona - CRH, utiče na povećavanje telesne temperature i supresiju apetita, na nivou jetre stimuliše produkciju C-reaktivnog proteina – CRP i drugih medijatora akutne faze zapaljenja. Utiče na povećavanje insulinske rezistencije preko indukovanja fosforilacije na insulinskim receptorima i na taj način remeti insulinsku signalizaciju. Uslovljava insulinsku rezistenciju u brojnim tkivima, a ne samo na nivou jetre. Ovaj citokin igra značajnu

ulogu i u bolestima kakva je reumatoidni artritis ili parodontalna bolest. Nishimura i saradnici (2003) su utvrdili da je TNF- α produkovan u masnom tkivu gojaznih pacijenata faktor rizika za pojavu parodontalnog zapaljenja¹³¹.

Na nivou koštanog tkiva TNF- α je snažan stimulator resorpcije. Ovaj efekat se ostvaruje direktno, aktivacijom zrelih osteoklasta ili indirektno stimulisanjem proliferacije i diferencijacije prekursora osteoklasta¹³². On privlači neutrofile, povećava njihovo adheriranje za endotel i stimuliše fagocitozu, izaziva citolizu većine tumorskih linija in vitro.

Lokalni porast koncentracije TNF- α izaziva pojavu glavnih znakova zapaljenja: crvenilo, otok bol, smanjena funkcija, dok visoka koncentracija TNF- α u cirkulaciji izaziva simptome slične šoku. Produženo prisustvo niskih koncentracija TNF- α može uticati na pojavu kaheksije kod pacijenata obolelih od uznapredovalih oblika kancera.

2.11.1. TNF- α i parodontalna bolest

Jedan od ključnih citokina ranog stadijuma parodontalne bolesti je upravo TNF- α . Rossomando i saradnici (1990) ističu da se porast TNF- α u GST može uočiti i pre pojave kliničkih znakova bolesti¹³³. Na mogućnost korišćenja TNF- α iz GST kao indikatora parodontalne bolesti ukazali su i drugi autori^{134, 135}.

Uloga bakterijskih faktora, pogotovu *A. actinomycetemcomitans* i *P. gingivalis-a* kao glavnih parodontopatogena u razvoju parodontalne bolesti više je nego očigledna. One stimulišu produkciju TNF- α u okviru nespecifičnog sistema odbrane organizma. Kao reakcija na prisustvo pomenutih mikroorganizama nastaje stimulacija monocita i makrofaga. Oni zatim produkuju TNF- α ¹³⁶⁻¹³⁸. Povišen nivo TNF- α utiče na pojavu parodontalne bolesti preko nekoliko mehanizama. Doprinosi destrukciji alveolarne kosti stimulacijom formiranja osteoklasta¹³⁹. Učestvuje u regulaciji matriks metaloproteinaza (MMP) koje izazivaju destrukciju vezivnog tkiva. Doprinosi pojačavanju imunog odgovora organizma na bakterijske patogene¹⁴⁰.

Najsnažniji impuls za proliferaciju, diferencijaciju i aktivaciju osteoklasta je ipak IL-1, TNF- α ima isti efekat ali je njegovo dejstvo slabije. Zajednička karakteristika oba citokina je produkcija MMP iz mezenhimalnih ćelija.

Nivo TNF- α se može meriti ne samo u GST i serumu, već i u pljuvački. Povećana koncentracija ovog citokina u pljuvački takođe predstavlja faktor rizika za razvijanje parodontalne bolesti, ali i parametar koji ukazuje na već razvijenu bolest¹⁴¹.

Yousefimanesh i saradnici (2013) su sprovedli studiju na 60 osoba, 30 sa srednje izraženim hroničnim parodontitisom i 30 sa zdravim parodoncijumom i nisu dobili statistički značajnu razliku koncentracija TNF- α u pljuvački između dve ispitivane grupe¹⁴², a slične rezultate su dobili i Gursoy i sar., 2009 u studiji sprovedenoj u Finskoj¹⁴³. Gümüs i saradnici (2014) su ispitivali koncentraciju TNF- α u pljuvački i serumu pacijenata sa zdravim parodoncijumom, hroničnom i akutnom parodontalnom bolešću¹⁴⁴. Došli su do zaključka da ne postoji statistički značajna razlika u koncentracijama TNF- α u pljuvački i serumu kod pacijenata sa akutnom i hroničnom parodontalnom bolešću, ali da je koncentracija TNF- α kod ovih pacijenata statički značajno viša u odnosu na zdrave pacijente. Povećanu koncentraciju ovog citokina autori povezuju sa dominantnim prisustvom B ćelija u periodontalnim lezijama.

Genco i saradnici (2005) su utvrdili da ne postoji korelacija između nivoa TNF- α u serumu i izraženosti destruktivne parodontalne bolesti što su protumačili činjenicom da ovaj citokin učestvuje samo u početnim stadijumima bolesti¹⁴⁵.

Prihvaćeno je mišljenje da gojaznost takođe može biti povezana sa rizicima za nastanak mnogih patoloških stanja kao što su: hipertenzija, hiperlipidemija, dijabetes melitus tip 2, kao i parodontalna bolest. Adipociti u masnom tkivu proizvode velike količine biološki aktivnih molekula (adipocitokini). Adipociti proizvode i TNF- α tako da se njegova koncentracija u krvi povećava kod gojaznih osoba i predstavlja značajan faktor rizika za pojavu mnogih, pa i parodontalne bolesti. Khosravi i saradnici (2013) su utvrdili da je kod gojaznih dečaka, ali ne i kod devojčica nivo ovog citokina u GST veći čak za 37 % u odnosu na decu koja nisu gojazna, pa kao manje rizičnu grupu za pojavu parodontalne bolesti navode gojazne devojčice u odnosu na gojazne dečake¹⁴⁶.

Dag i saradnici (2010) su ispitivali pacijente sa bubrežnom insuficijencijom na dijalizi i ustanovili znatno povećan nivo TNF- α u GST¹⁴⁷. Takođe su konstatovali snažnu statistički značajnu korelaciju između nivoa ovog citokina i kliničkih parametara parodontalne bolesti kod pomenutih pacijenata. To je još jedan u nizu dokaza o njegovom učešću u nastanku parodontalne bolesti.

Za parodontalno oboljenje ne možemo reći da je striktno lokalizovano zato što često vodi u sistemsku reorganizaciju imunih funkcija. Lokalna zapaljenska reakcija na bakterije i bakterijske produkte je uvek praćena infiltracijom periodontalnog tkiva imunim ćelijama i oslobađanjem medijatora, kao što su CRP (C-reaktivni protein), TNF- α i IL-6 u okolinu. Poznato je da su CRP i TNF- α uobičajeno prisutni u malim koncentracijama u plazmi ali njihova koncentracija može znatno da poraste u slučajevima povreda tkiva, bakterijskih, virusnih infekcija, kao i u slučajevima parodontalne bolesti.

Koppolu i saradnici (2013) su pokušali da dokažu da parodontalna bolest i primenjena terapija mogu uticati na koncentraciju CRP i TNF- α u serumu koji su dodatni faktori rizika pacijenata sa hroničnom kardiovaskularnom bolešću¹⁴⁸.

2.12. Biokompatibilnost ortodontskih materijala za lepljenje bravica

Biokompatibilnost je sposobnost materijala da izazove određeni biološki odgovor u okviru specifične primene. Za biomaterijale se ne može reći da su biološki inertni. Lekari koji ih aplikuju moraju biti svesni da ne postoji potpuna inertnost materijala. Nakon aplikacije u tkivo javlja se interakcija sa složenim biološkim sistemima u okolini, što rezultuje biološkim odgovorom. Interakcija će zavisi od samog materijala, domaćina, kao i sile koja deluje na materijal, odnosno od funkcije koju aplikovan materijal ima. Većina istraživača se slaže da ne postoji zaista inertan materijal u telu. Biokompatibilnost je dakle dinamičan proces.

Da bi se krenulo sa rutinskom upotrebom određenog materijala u medicini ili stomatologiji neophodno je da prođe niz *in vitro* i *in vivo* ispitivanja kako bi se dokazalo da je bezbedan za primenu. Upotreba životinja u istraživanju biomaterijala omogućava mnogo složenih interakcija između materijala i kompletnog biološkog sistema životinje. Aktiviranje imunog sistema životinje i njegov odgovor na primenjeni materijal je teško imitirati u *in vitro* uslovima. Upravo zato se *in vivo* testovi na životinjama smatraju pouzdanijim. Glavni nedostatak *in vivo* testova je što su često jako teški za interpretaciju, ponavljanje i teško ih je precizno kontrolisati, skupi su i zahtevaju složene pripremne procedure i dobijanja odobrenja etičkih komiteta. Takođe postavlja se i pitanje o mogućnosti određene životinjske vrste da reprezentuje ljudski organizam. Sve navedeno je doprinelo razvoju *in vitro* testova citotoksičnosti i njihovoj standardizaciji. Svaki test i metod se primenjuju samo za ispitivanje jednog tipa neželjene reakcije. Za pomenuta istraživanja danas se jako često koriste ćelije mišjih fibroblasta (L929). Ove ćelije se inkubiraju sa ispitivanim materijalima ili njihovim ekstraktima, a na kraju se mere različiti parametri, kao što su: broj preživelih ćelija, sposobnost sintetisanja proteina, enzimska aktivnost i sekrecija medijatora zapaljenja.

Za mišje L929 i humane fibroblaste je dokazano da imaju približan citotoksični nivo, a zbog bolje reproduktivnosti i lakšeg uzgajanja primat se daje L929 ćelijama¹⁴⁹.

Jedan od često primenjivanih *in vitro* testova citotoksičnosti je MTT test. Njime se meri aktivnost ćelijske dehidrogenaze koja konvertuje hemikaliju nazvanu MTT, preko nekoliko ćelijskih redukcionih mehanizama u plavu nerastvorljivu formazan komponentu. Ukoliko dehidrogenaze nisu aktivne usled prisutnog citotoksičnog efekta neće doći do nastanka formazana.

Stvaranje formazana može biti kvantifikovano preko merenja optičke gustine rastvora koji je nastao. Mnoge ćelijske aktivnosti mogu biti praćene kvalitativno ili kvantitativno. Nedavno su razvijeni *in vitro* testovi za merenje aktivnosti gena, genske ekspresije, ćelijskog oksidativnog stresa i drugih specifičnih ćelijskih funkcija. Ipak pomenuti testovi se još uvek ne koriste rutinski za merenje citotoksičnosti materijala.

Nedostatak većine *in vitro* testova citotoksičnosti je taj što je materijal u direktnom kontaktu sa ćelijskim kulturama. U organizmu direktan kontakt ispitivanog materijala i ćelija često ne postoji. Razdvajanje materijala i ćelija nastaje usled prisustva keratinizovanog epitela ili prisustva ekstracelularnog matriksa. Zbog toga je konstruisano nekoliko *in vitro* testova sa barijerama kako bi se što približnije imitirali *in vivo* uslovi. Jedan od takvih testova je test gde se dodaje agar kao barijera između sloja ćelija i ispitivanog materijala.

Evalvacija biokompatibilnosti stomatoloških materijala je svakako kompleksna zato što se neželjeni odgovori tkiva mogu javiti na različite načine¹⁵⁰. O biokompatibilnosti materijala koji se koriste svakodnevno stomatolozi najčešće ne razmišljaju mnogo. Većina upotrebljava materijale koji su lako dostupni na tržištu bez velike brige o njihovom potencijalnom toksičnom dejstvu. Najveći broj studija se odnosi na fizička svojstva ovih materijala, dok je znatno manji broj studija posvećen njihovoj biološkoj kompatibilnosti.

Određivanje biokompatibilnosti ortodontskih materijala za lepljenje bravica je veoma važno obzirom da se oni nalaze jako blizu periodontalnog tkiva i alveolarne kosti. Supstance oslobođene iz njih bi mogle izazvati upalne ili čak nekrotične promene na pomenutom tkivu. Ortodontski materijali za lepljenje mogu prouzrokovati promene na gingivi ili usled direktnog kontakta ili usled oslobađanja rastvorljivih komponenti u GST i pljuvačku¹⁵¹.

Dugotrajna i konstantna izloženost stomatoloških radnika određenim stomatološkim materijalima i monomerima koji se iz njih oslobađaju mogu dovesti do raznih zdravstvenih tegoba. Neke od tih tegoba su: alergijski dermatitis^{3,4}, glavobolja, anoreksija¹⁵², bihevioralni poremećaji¹⁵³. Najveći broj zdravstvenih tegoba na koje se stomatolozi žale su kožne reakcije na rukama nastale kao rezultat iritacije usled dejstva brojnih materijala sa kojima se svakodnevno radi u ordinacijama¹⁵⁴.

Drugi problem se odnosi na subtoksično dejstvo materijala za lepljenje u stomatologiji. Bisfenol (Bisphenol-A) je nusprodukt koji nastaje degradacijom ovih materijala i može se ponašati kao steroidni hormon koji prouzrokuje razne biološke efekte kao što su: prevremeni pubertet kod devojčica, ovarijalni kancer, poremećaj sazrevanja muških polnih organa¹⁵⁵. Ipak, ima i autora koji smatraju da količina oslobođenog bisfenola-A iz ovih materijala je niske koncentracije koja nije dovoljna da izazove biološku reakciju¹⁵⁶.

Mali je broj studija koje se bave citotoksičnošću ortodontskih materijala za lepljenje. U literaturi je naznačeno da poprilične količine monomera i kratkih lanaca polimera ostaju nevezani u okviru strukture mase za lepljenje i da je njihovo oslobađanje glavni izvor citotoksičnosti u kratkom vremenskom intervalu nakon lepljenja^{157, 158}. Pored biodegradacije, dentalni kompoziti imaju sposobnost da upiju i određenu količinu vode, što dovodi do dodatnog istiskivanja zaostalog monomera i pojačavanja toksičnog dejstva¹⁵⁹.

In vivo istraživanja su pokazala da postoji zapaljenjska reakcija posebno na tečnu komponentu materijala za lepljenje na svim ispitanim životinjama¹⁶⁰. Fredericks (1981) je pokazao da postoji mutageni potencijal materijala, kao i Lee Unique prajmera u lepku koji su kasnije zamenjeni novijim i manje toksičnim komponentama¹⁶¹. Studija Athas i saradnici (1979) su dokazali kancerogeni potencijal ortodontskih materijala za lepljenje¹⁶². Najveći broj studija citotoksičnosti u ortodonciji je sproveden na jednoslojnim ćelijskim kulturama¹⁶³.

Drugačiji pristup su imali Vande Vannet i Hanssens (2007) koji su koristili rekonstruisan trodimenzionalni oralni epitel u cilju utvrđivanja toksičnosti ortodontskih lepkova¹⁶⁴. Utvrdili su da postoje ultrastrukturne promene epitela usled penetracije prajmera iz materijala. Dokazano je i da aktivatorska komponenta autopolimerizujućih materijala ima veću toksičnost u odnosu na ostale materijale¹⁶⁵. Postoje ispitivanja sprovedena na fibroblastima koja su pokazala da veću toksičnost imaju autopolimerizujući (AP) u poređenju sa svetlosno polimerizujućim (SP)¹²⁵.

U poslednje vreme nanotehnologija se sve više primenjuje u stomatologiji prvenstveno zbog poboljšavanja mehaničkih svojstava materijala, ali i zbog antibakterijskog efekta. Već neko vreme se ispituje primena različitih nanokomponenti u ortodontskim materijalima za lepljenje. Srebrne nanokomponente omogućavaju izražen antibakterijski efekat bez narušavanja već postojećih mehaničkih karakteristika materijala za lepljenje. Ipak, primena srebra na ovaj način može dovesti do lakog prebojavanja kompozita, a ima i autora koji upućuju na nedovoljnu biokompatibilnost ovakvih materijala^{166, 167}. Nanokomponente bazirane na bakru i cinku dovode do čestih i izraženih citotoksičnih efekata, pa se od njihove upotrebe brzo odustalo¹⁶⁸.

Trenutno se dosta ispituje moguća upotreba titanijum dioksida (TiO₂) i njegove fotokatalitičke aktivnosti u medicini i u stomatologiji. Postoje studije koje ukazuju na značajan antimikrobiološki efekat materijala koji sadrže čestice na bazi TiO₂^{169, 170}. Ovo bi u slučaju primene ortodontskih materijala za lepljenje bravica značilo manju mogućnost za pojavu gingivalnog zapaljenja, karijesa i posledično manju mogućnost za demineralizaciona oštećenja gleđi. Dodatak mikrokomponenti TiO₂ pomenutim materijalima popravlja i njihove meha-

ničke karakteristike, kao što su modul elastičnosti, mikročvrstoću i otpornost na savijanje, a pri tom nema slabljenja sposobnosti materijala za lepljenje bravica¹⁷¹.

Nema mnogo istraživanja koja su se bavila ispitivanjem biokompatibilnosti materijala na bazi TiO₂ za lepljenje bravica. Teoretski gledano, primena nanokomponenti dovodi do strukturnih promena, pa mnogi autori smatraju da bi moglo doći do smanjenja citotoksičnosti i manjeg otpuštanja nepolimerizovanih, rezidualnih komponenti. Heravi i saradnici (2013) su ispitivali citotoksičnost ovih materijala na kulturama humanih fibroblasta, kao i fibroblasta miševa L929¹⁷². Došli su do zaključka da su kompoziti obogaćeni nano česticama TiO₂ manje toksični u odnosu na klasične kompozite.

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Uzevši u obzir činjenice moguće citotoksičnosti materijala za bondiranje i njihovog uticaja na pojavu zapaljenja gingive kod pacijenata u terapiji fiksnim ortodontskim aparatima, kao i da u toku terapije fiksnim ortodontskim aparatima kod određenog broja pacijenata dolazi do zapaljenskih promena na gingivi, a da preciznije praćenje trenutne aktivnosti zapaljenskog procesa, kao i stadijuma njegove progresije, ne omogućavaju trenutno dostupni kliničkih parametri, postavljeni su sledeći ciljevi istraživanja:

1. Praćenje zapaljenjskog stanja gingive kod pacijenata sa fiksnim ortodontskim aparatima pre početka, 3 i 6 meseci nakon početka terapije na osnovu kliničkih parametara – PI, SBI i CPITN.
2. Praćenje koncentracija NO_2+NO_3 , $\text{TNF-}\alpha$ i RANKL u GST pacijenata sa fiksnim ortodontskim aparatima, pre početka, 3 i 6 meseci nakon početka terapije.
3. Praćenje koncentracija NO_2+NO_3 u pljuvački pacijenata sa fiksnim ortodontskim aparatima pre početka, 3 i 6 meseci nakon početka terapije.
4. Utvrditi da li postoji korelacija između praćenih kliničkih parametara stanja gingive i vrednosti koncentracija NO_2+NO_3 , $\text{TNF-}\alpha$ i RANKL u GST pre početka, 3 i 6 meseci nakon početka terapije.
5. Utvrditi da li postoji korelacije između praćenih kliničkih parametara stanja gingive i vrednosti koncentracije NO_2+NO_3 u pljuvački pre početka, 3 i 6 meseci nakon početka terapije.
6. Utvrditi da li postoji korelacija vrednosti koncentracija NO_2+NO_3 u GST i pljuvački pre početka, 3 i 6 meseci nakon početka ortodontske terapije.
7. Ispitivanje potencijalne citotoksičnosti AP i SP materijala za lepljenje bravica na ćelijskim linijama fibroblasta i makrofaga.

4. MATERIJAL I METODE

4.1. Određivanje kliničkih parametara za procenu stanja gingive i biohemijskih parametara u GST i pljuvački pacijenata u terapiji fiksnim ortodontskim aparatima

4.1.1. Pacijenti

Sprovedena prospektivna studija je obuhvatila 30 ortodontskih pacijenata Klinike za stomatologiju u Nišu, oba pola, uzrasta 15–22 godina. Pacijenti su birani uz poštovanje sledećih kriterijuma: 1) postojanje umerene potrebe za ortodontskim tretmanom u odnosu na dentalnu komponentu indeksa potrebe za ortodontskim tretmanom, 2) potreba za neekstrakcionim ortodontskim tretmanom fiksnim aparatima, 3) odsustvo aproksimalnog karijesa ili aproksimalnih ispuna na stalnim molarima i drugim premolarima, 4) dobro sistemsko zdravlje pacijenta (odsustvo istorije hroničnih bolesti), 5) nekorisćenje antibiotika i antizapaljenjskih lekova tri meseca pre početka ortodontske terapije.

Kriterijumi za isključivanje pacijenata iz studije su bili: 1) izražena teskoba zubnih nizova, 2) postojanje dentofacijalnog deformiteta, 3) disanje na usta, 4) navika pušenja, 5) parodontološka terapija u toku prvih 6 meseci ortodontske terapije, 6) korišćenje antibiotika i antizapaljenjskih lekova u toku prvih šest meseci ortodontske terapije.

Informativni dokument i pristanak za učešće u studiji su potpisivali pacijenti ili njihovi roditelji ukoliko je pacijent mlađi od 18 godina. Studijski protokol je odobren od strane Etičkog komiteta broj rešenja (01-890-6)

4.1.2. Klinička procedura

U okviru sprovedene studije određivni su klinički parametri PI, SBI i CPITN i prikupljeni uzorci GST i pljuvačke.

Na početku terapije pacijentima su data detaljna uputstva o proceduri održavanja oralne higijene u toku trajanja ortodontske terapije. Pacijentima nije bilo dozvoljeno korišćenje antiplak rastvora u prvih 6 meseci terapije. Supra i subgingivalno čišćenje ultrazvukom je sprovedeno kod svih pacijenata 2 nedelje pre početka terapije.

Svi pacijenti su tretirani fiksnim ortodontski aparatima poštujući osnovne principe tehnike pravog luka. Kontrolni pregledi su sprovedeni precizno u intervalima od mesec dana.

U prvih 6 meseci ortodontske terapije samo je sprovedena nivelacija zubnih nizova uz pomoć okruglih NiTi lukova 0,12, 0,14 i 0,16.

4.1.3. Određivanje kliničkih parametara

Klinički parametri zapaljenja gingive Silness Loe Plaque Index (PI) i Muhlemann-Son Sulcus Bleeding Index (SBI), The Community Periodontal Index of Treatment Needs (CPITN)¹⁷³ su određivani, korišćenjem parodontalne sonde uz poštovanje kriterijuma Svetske Zdravstvene Organizacije, pre početka, tri i šest meseci nakon početka ortodontske terapije na redovnim kontrolama. Izabrali smo baš ove vremenske periode jer smo smatrali da su to minimalni periodi potrebni za jasnu ekspresiju zapaljenja gingive kod ortodontskih pacijenata

4.1.4. Uzorkovanje GST

Gingivalna sulkusna tečnost je uzorkovana pomoću sterilnih papirnatih apoeni pre početka, tri i šest meseci nakon početka terapije fiksnim aparatima. Pre uzorkovanja uklonjen je supragingivalni dentalni plak, a zubi su izolovani papirnim vaterolnama u cilju izbegavanja kontaminacije pljuvačkom. Papirnati apoeni su unošeni u gingivalni sulkus sa vestibularne strane prvih stalnih molara, drugih premolara, očnjaka i centralnih sekutića do momenta srednjeg otpora i ostavljani su da upiju GST 30s. Papirnati apoeni kontaminirani krvlju usled iritacije gingive su isključivani iz dalje obrade. Prikupljeni apoeni za svakog pacijenta su odlagani u sterline ependorfe na ledu i zamrzavani na temperaturi od -80 C° do sledećeg koraka u biohemijskoj obradi na Institutu za biohemiju Medicinskog fakulteta u Nišu.

4.1.5. Uzorkovanje pljuvačke

Nakon laganog ispiranja usta vodom, uzorci pljuvačke su sakupljeni u sterilne epruvete, pri čemu je pacijentima objašnjeno da sačekaju da se pljuvačka prirodno skupi u ustima, a zatim ispljune u epruvetu. Sakupljeni uzorci svakog pacijenta su čuvani na temperaturi od -80 C° do sledećeg koraka u biohemijskoj obradi na Institutu za biohemiju Medicinskog fakulteta u Nišu.

4.1.6. Biohemijske analize

Nakon deproteinizacije, produkcija NO je određivana merenjem koncentracije nitrita i nitrata ($\text{NO}_2 + \text{NO}_3$). Nitrati su redukcijom pomoću kadmijuma prevedeni u nitrite koji su zatim

određivani direktno spektrofotometrijski na 543 nm metodom po Griess-u.¹⁷⁴ Vrednosti koncentracija NO_2+NO_3 u pljuvački i GST su izražavane kao nmol/mg proteina.

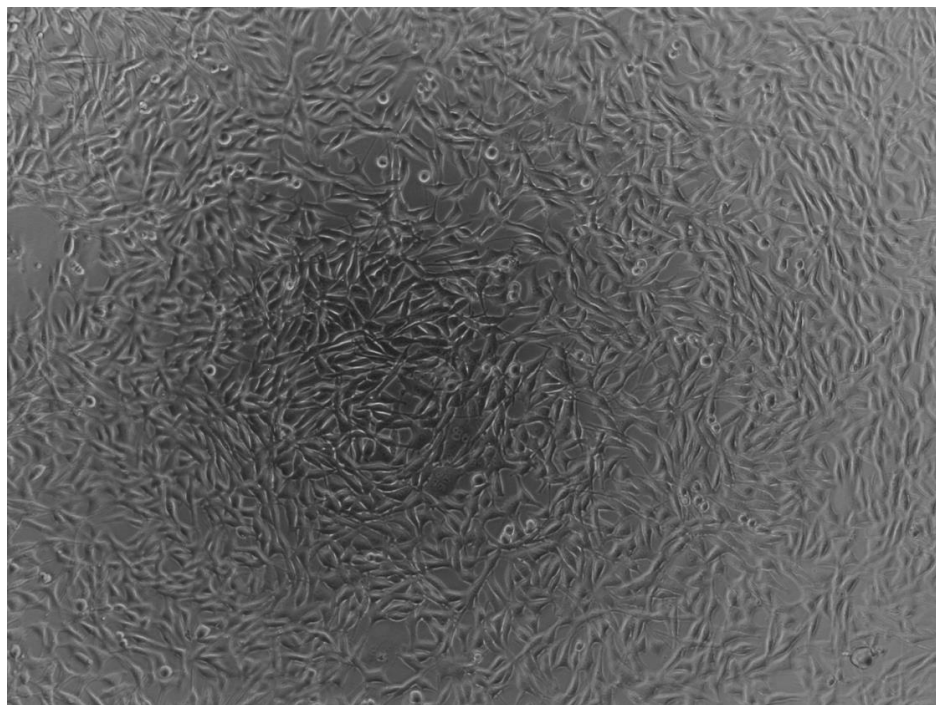
Za merenje koncentracija TNF- α i RANKL u GST korišćen je ELISA test (Invitrogen, human TNF- α , ultra sensitive. BioVendor Human sRANKL). Koncentracija TNF- α i RANKL detektovana u svakom uzorku GST je određivana u odnosu na standardnu krivu za TNF- α i RANKL koja pokazuje direktan odnos optičke gustine i koncentracije citokina. Ukupna količina TNF- α je izražavana u pikogramima, a RANKL u pikomolima.

Koncentracije TNF- α i RANKL u GST određivane su komercijalnim ELISA testovima (Human TNF- α , ultra sensitive, Invitrogen, Mineapolis, USA i Human sRANKL (TOTAL) BioVendor, Brno, Czech Republic). Koncentracija TNF- α i RANKL detektovana u svakom uzorku GST je određivana u odnosu na standardnu krivu za TNF- α i RANKL koja pokazuje direktan odnos optičke gustine i koncentracije citokina. Senzitivnost ELISA testa za TNF- α podrazumeva minimalnu detektabilnu dozu od 1,6 pg/ml, u rasponu od 0,5-5,5 pg/ml. Ukupna količina TNF- α je izražavana u pikogramima/ml. Senzitivnost testa za sRANKL bila je 0,4 pmol/L, a specifičnost 2ng/ml. Koncentracija sRANKL je izražavana u pikomolima/L.

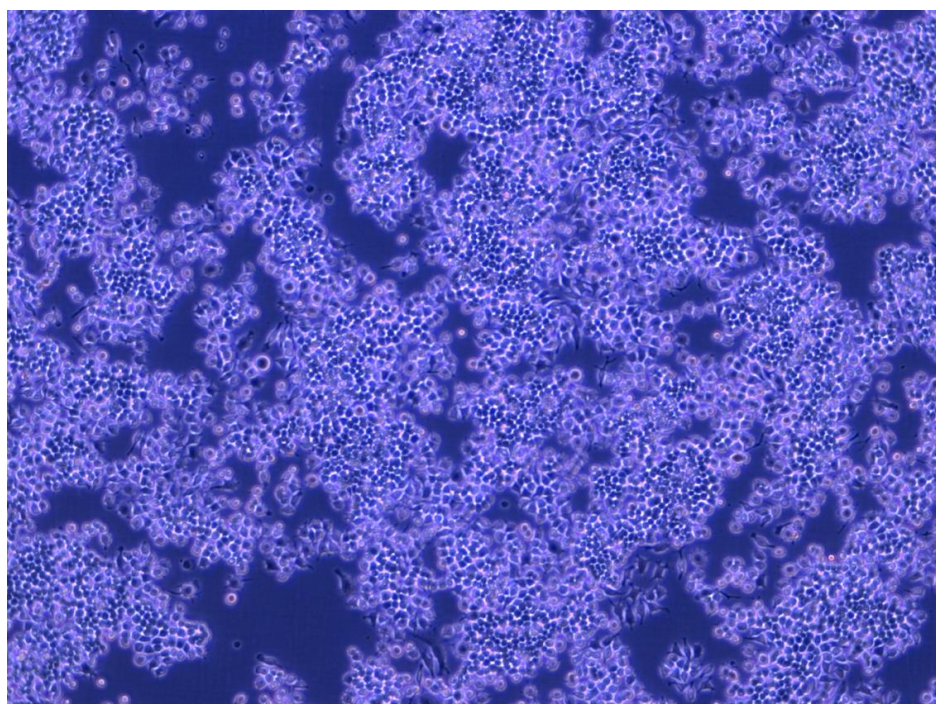
4.2. *In vitro* metode ispitivanja AP i SP materijala na ćelijskim kulturama fibroblasta i makrofaga

4.2.1. Ćelijske linije

In vitro efekat ekstrakata AP i SP materijala ispitivan je na dve ćelijske linije, L929 (Slika 13 i Slika 14) i RAW 264.7 ćelijskoj liniji. Ćelijska linija L929 je uzeta za ispitivanje ekstrakata materijala, jer je to najčešće korišćeni model za ispitivanja stomatoloških materijala na fibroblastima. Ćelijska linija RAW 264.7 je linija makrofaga koja je uzeta za test fagocitoze ispitivanih materijala.



Slika 13. Kultura L929 ćelija, uv. x 100, fazni kontrast.
Odeljenje za ćelijsko i tkivno inženjerstvo. Med. fakultet Niš



Slika 14. Kultura RAW 264.7 ćelija, uv. x 100, fazni kontrast.
Odeljenje za ćelijsko i tkivno inženjerstvo. Med. fakultet Niš

4.2.2. Priprema materijala AP i SP za ispitivanje na ćelijama u kulturi

Priprema Dentaurum non mix AP i 3M Unitek Transbond XT SP materijala pre ispitivanja na ćelijama je urađena na isti način kao što se to u kliničkoj praksi radi. Pravljeni su standardizovani kalupi 8x5 mm za izradu pločica debljine 1 mm od ispitivanih materijala poštujući procedure propisane za njihovu upotrebu. Kod svetlosno polimerizujućeg materijala bond je nanošen na kalup i preko materijala nakon njegove aplikacije, a zatim je svetlosno polimerizovan. Kod autopolimerizujućih materijala bond je lagano mešan sa smolom i nakon brzog aplikovanja u kalupe ostavljan da se polimerizuje. Nakon završene auto ili svetlosne polimerizacije, u zavisnosti od tipa ispitivanog materijala, pločice uzoraka su dalje korišćene u analizi. Pre ispitivanja na L929 ćelijama napravljeni su ekstrakti gotovih materijala (AP i SP). Ekstrakcija je rađena u medijumu za kultivaciju ćelija DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, 1 g/L glucose, Biological Industries), kome je dodat antibiotik-antimikotik rastvor. Odnos materijal/medijum je bio 0,2 g / 5 ml. Napravljeni su jednodnevni, trodnevni i sedmodnevni ekstrakti oba materijala. Nakon završenog perioda ekstrakcije, ekstraktima je dodat goveđi serum (finalna koncentracija 10%) i L-glutamin (2 mM). Ekstrakti su razblaživani do određenih finalnih koncentracija kompletnim medijumom. Za test fagocitoze na RAW 264.7 makrofagima, pločice polimerizovanog AP i SP su smrvljene pomoću avana i tučka do konzistencije grubog praška.

4.2.3. Kultivisanje ćelija

Ćelije obe ćelijske linije (L929 i RAW 264.7) su gajene u hranljivom medijumu za kultivaciju ćelija DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, 1 g/L glucose, Biological Industries), kome su dodati L-glutamin (2 mM), 10% fetalnog goveđeg seruma (FBS) i antibiotik-antimikotik rastvor. Zamena medijuma rađena je na svaka 3 – 4 dana, u aseptičnim uslovima, u laminarnoj komori. Pri zameni medijuma stavljano je 5 ml svežeg medijuma po flasku. Ćelijske kulture su gajene u inkubatoru u atmosferi zasićenoj vodenom parom, u prisustvu 5% CO₂, na temperaturi od 37⁰C.

4.2.4. Pasaža ćelija

Presadivanje (pasaža) ćelija je rađena pri konfluentnosti ćelija od oko 70-80%. Pasaža je rađena tako što je ćelijama prvo uklonjen medijum, zatim im je dodato 3 ml Tripsin-EDTA rastvora (Biological Industries) u kojem su inkubirane oko 5 minuta u inkubatoru na 37⁰C.

Nakon toga, proces tripsinizacije je prekinut dodavanjem 5 ml hranljivog medijuma. Čelije su resuspendovane i ćelijska suspenzija je u sterilnoj epruveti centrifugirana 10 minuta na $+4^{\circ}\text{C}$ i 1000 rpm. Potrebna gustina ćelija podešena je posle bojenja ćelija tripan plavim (Trypan Blue Dye, Gibco) metodom isključivanja obojenih ćelija (Trypan Blue Dye Exclusion Test). Odnos boje i ćelijske suspenzije bio je 1 : 1. Tripan plavo selektivno boji mrtve ili vitalno oštećene ćelije u plavo, jer je njihova membrana propustljivija. Žive ćelije ostaju neobojene zahvaljujući očuvanom integritetu membrane. Brojanje živih ćelija je vršeno na mrežici Malasezove hemocitometarske komore na svetlosnom mikroskopu. Ukupan broj ćelija izračunat je po formuli:

$$\text{br. ćelija u 1 mkl} = \text{br. ćelija u 100 polja} \times 2$$

ako se broji u 10 polja množi se sa 10, jer je ukupan broj polja u komori 100, x 2, jer je to razblaženje ćelija, zato što je odnos boja : ćelijska suspenzija = 1 : 1.

Ćelije podešene na određenu gustinu, sađene su u nove flaskove površine 25 cm^2 , (Greiner Bio-One) sa 5 ml svežeg hranljivog medijuma po flasku

4.2.5. Priprema ćelija za ispitivanje

Za potrebe ispitivanja efekata ekstrakata AP i SP materijala, ćelije su pripremljene po proceduri za pasažu, ali su posađene u sterilne ploče sa 96 bunarčića (96 well Tissue Culture Plates, Greiner Bio-One, Germany) za esej proliferacije i esej vijabilnosti, a za ispitivanje fagocitoze ćelije su posađene u sterilne ploče sa 12 bunara (12 well Tissue Culture Plates, Greiner Bio-One, Germany).

4.2.6. Esej vijabilnosti/citotoksičnosti

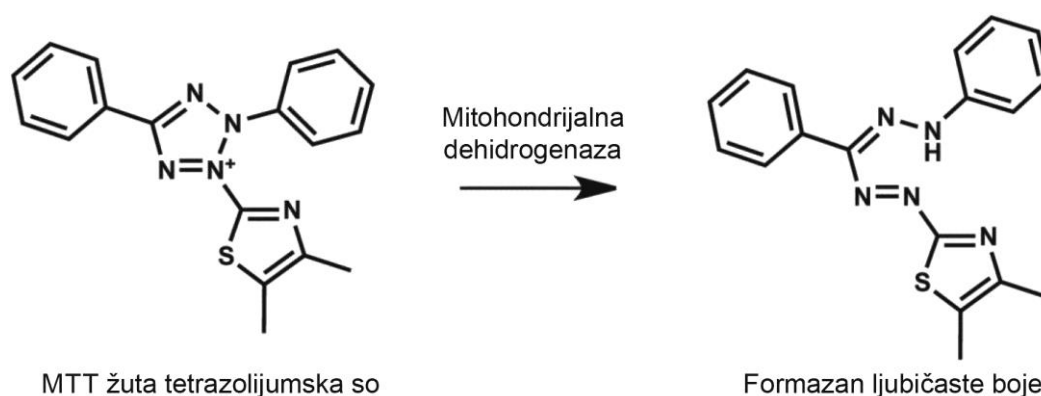
U testu vijabilnosti/citotoksičnosti u svaki bunarčić sterilne ploče sa 96 bunarčića (96 well Microplates, Greiner Bio-One) stavljan je po 2×10^4 ćelija/100 μl medijuma. Nakon 24 h kultivacije ćelija u inkubatoru, u atmosferi zasićenoj vlažnošću, sa 5% CO_2 , na 37°C medijumi iz bunarčića su izvađeni i u svaki bunarčić su dodate odgovarajuće koncentracije ispitivanih ekstrakata materijala. Svaka koncentracija je ispitivana u tetraplikatu. Negativnu kontrolu činile su ćelije koje su inkubirane u hranljivom medijumu bez dodatka ekstrakata. Čelije su inkubirane sa ispitivanim ekstraktima materijala, kao i sa kontrolnim medijumom, narednih 24 h u atmosferi zasićenoj vlažnošću i 5% CO_2 , na 37°C u inkubatoru, a nakon toga urađen je MTT test.

4.2.7. Esej proliferacije/citostatičnosti

U testu proliferacije/citostatičnosti u svaki bunarčić sterilne ploče sa 96 bunarčića (96 well Microplates, Greiner Bio-One) stavljano je po 5×10^3 ćelija/100 μ l medijuma. Nakon 24 h kultivacije ćelija u inkubatoru, u atmosferi zasićenoj vlažnošću, sa 5% CO₂, na 37⁰C medijumi iz bunarčića su izvađeni i u svaki bunarčić dodata je odgovarajuća koncentracija ispitivanih ekstrakata materijala. Svaka koncentracija je ispitivana u tetraplikatu. Negativnu kontrolu činile su ćelije koje su inkubirane u hranljivom medijumu bez prisustva ekstrakata materijala. Ćelije su inkubirane sa ispitivanim ekstraktima, kao i sa kontrolnim medijumom, narednih 72 h u atmosferi zasićenoj vlažnošću i 5% CO₂, na 37⁰C u inkubatoru, a nakon toga urađen je MTT test.

4.2.8. MTT test

MTT test je široko prihvaćena metoda *in vitro* spitivanja vijabilnosti i proliferacije ćelija, baziran na redukciji tetrazolijumske soli MTT (3-(4,5-dimetiltiazolil-2)-2,5-difenil-tetrazolijum bromid) (Carl Roth GmbH, Nemačka). Vijabilne i metabolički aktivne ćelije pomoću mitohondrijalnih dehidrogenaza redukuju rastvorljivi žuti MTT, do ljubičastih kristala formazana koji su nerastvorljivi u vodi (Slika 15).



Slika 15. Mehanizam reakcije MTT-a

(preuzeto sa sajta http://modernsteroid.blogspot.rs/2012_03_01_archive.html)¹⁷⁵

U oba tipa eseja (vijabilnosti i proliferacije), po završetku inkubacije sa različitim koncentracijama ispitivanih ekstrakata materijala i kontrolnim medijumom, medijum u kojem su ćelije inkubirane je uklonjen iz svih bunarčića i ćelije su isprane sa 100 μ l fosfatnog pufera (PBS). U svaki bunarčić je zatim dodato po 100 μ l rastvora MTT (koncentracije 1 mg/ml). Nakon 2 sata inkubacije ćelija sa MTT na 37°C, rastvor MTT je uklonjen iz bunarčića, a nastali ljubičasti kristali formazana rastvoreni su dodavanjem 100 μ l 2-propanola. Rastvaranjem kristala formazana su dobijeni rastvori ljubičaste boje, čiji je intenzitet meren spektrofotometrijski na talasnoj dužini od 540 nm na višekanalnom spektrofotometru (Multiscan Ascent, Thermo LabSystems) (Slika 16).



Slika 16. Višekanalni spektrofotometar (Multiscan Ascent, Thermo LabSystems) (preuzeto sa sajta <http://www.scientific-equipment.com/equipment-for-sale/microplate/multiskan-ascent-354-microplate-reader?ln=1698>)¹⁷⁶

Intenzitet ljubičaste boje je u direktnoj korelaciji sa brojem ćelija, pa porast broja ćelija rezultuje porastom količine stvorenog formazana i porastom apsorbance.

4.2.9. Test fagocitoze

U testu fagocitoze, RAW 264.7 ćelije su zasađene u gustini 2×10^5 ćelija po bunaru (u 2 ml medijuma) u sterilnoj ploči za kultivaciju sa 12 bunara u DMEM medijumu obogaćenom sa 10% FBS-om, 2 mM L-glutaminom i antibiotik-antimikotik rastvorom. Nakon 24 h inkubacije pod standardnim uslovima, medijum je uklonjen i ćelijama je dodata suspenzija materijala AP ili SP koja je napravljena suspendovanjem materijala u hranljivom medijumu DMEM sa dodatim standardnim komponentama. Ispitivane su 2 koncentracije suspenzije materijala, 200 i 40 μ g/ml, svaka u duplikatu. Kao pozitivna kontrola u testu fagocitoze korišćen je lipopolisaharid (LPS, 0111:B4 *Escherichia coli*).

4.2.10. Svetlosna mikroskopija

Ćelije su tokom eksperimenta posmatrane na invertnom svetlosnom mikroskopu (Carl Zeiss, Nemačka), na faznom kontrastu (Slika 17). Mikroskopski je praćen rast ćelija, njihova gustina, praćene su i promene u njihovoj morfologiji, kao prisustvo partikula materijala u

ćelijama u testu fagocitoze. Ćelije su fotografisane u nekoliko faza eksperimenata: za vreme kultivacije, pre dodavanja ispitivanih materijala, nakon završenog perioda inkubacije (24 h u eseju vijabilnosti/citotoksičnosti, 72 h u eseju proliferacije/citostatičnosti) i u testu fagocitoze nakon inkubacije ćelija sa česticama materijala i LPS-om, na različitim uvećanjima objektivna (10x, 20x i 40x).



Slika 17. Invertni svetlosni mikroskop (Carl Zeiss)

4.3. Statistička obrada rezultata

Rezultati sprovedene studije su prikazani tabelama i grafikonima. Vrednosti ispitivanih parametara su predstavljene srednjim vrednostima (\bar{X}), standardnim devijacijama (SD), intervalima poverenja od 95% (95% CI), medijanama (Me) i interkvartilnih opsega (IQR).

Normalnost distribucije kontinuiranih varijabli utvrđivana je Shapiro-Wilk testom.

T-test uparenih uzoraka je korišćen u slučaju poređenja dva povezana ispitivanja sa normalnom distribucijom, a Wilcoxon Signed-Ranks test ukoliko distribucija podataka odstupa od normalne.

Poređenje vrednosti kontinualnih varijabli između grupa, u zavisnosti od normalnosti raspodele, vršeno je Studentovim t testom nezavisnih uzoraka, u slučaju normalne raspodele, ili Mann-Whitney testom, u slučaju da raspodela odstupa od normalne.

U zavisnosti od distribucije normalnosti, Pearson (r) ili Spearman (ρ) koeficijent korelacije je korišćen za analizu povezanosti kontinuiranih varijabli.

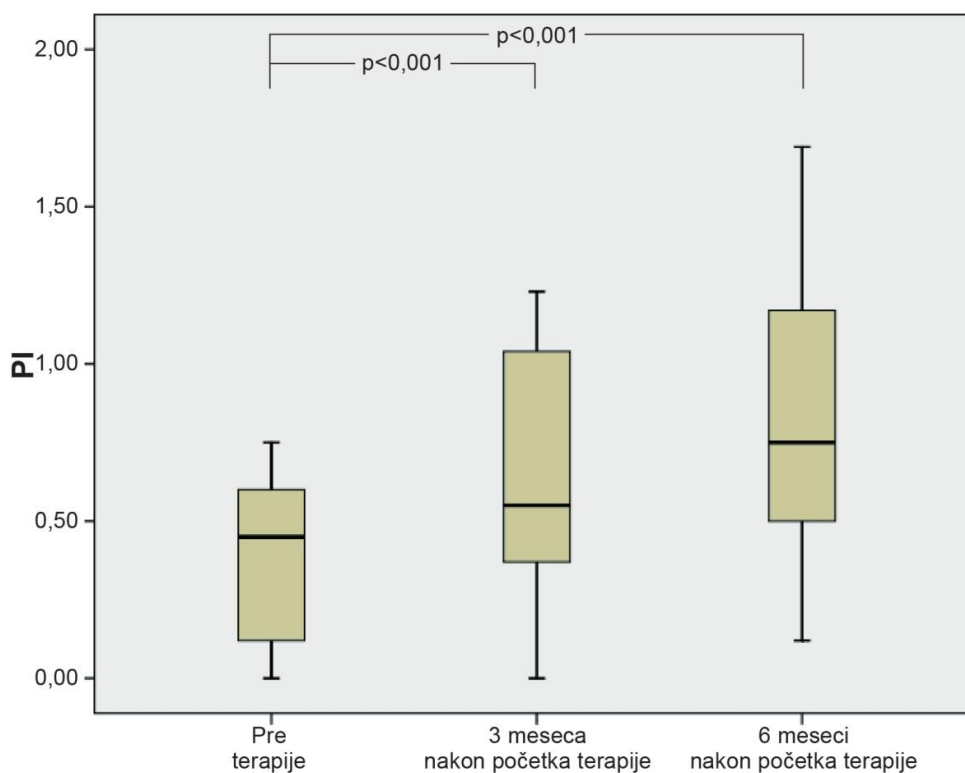
Statistička analiza podataka odrađena je u programu SPSS v. 15.0 programu, pri čemu je nivo značajnosti bio $p < 0,05$. Kao prag statističke značajnosti u zaključivanju korišćen je nivo greške procene manji od 5% ($p < 0,05$).

5. REZULTATI

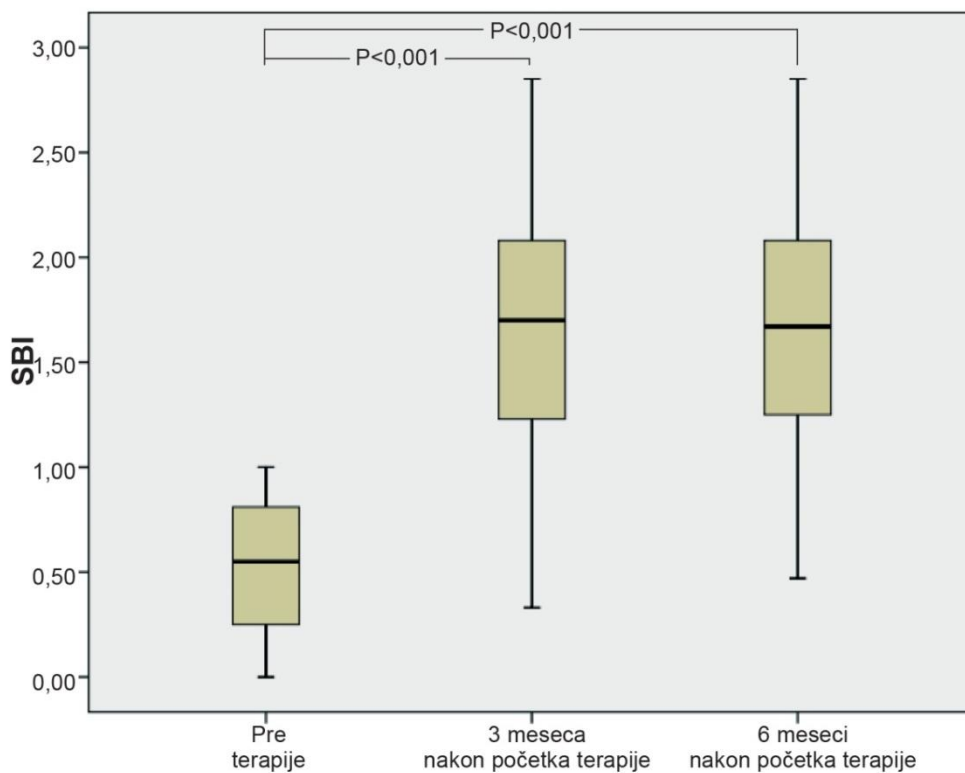
5.1. Klinički i biohemijski parametri u praćenju parodontalnog stanja kod pacijenata u treapiji fiksnim ortodontskim aparatima

5.1.1. Klinički parametri u praćenju parodontalnog stanja kod pacijenata u treapiji fiksnim ortodontskim aparatima

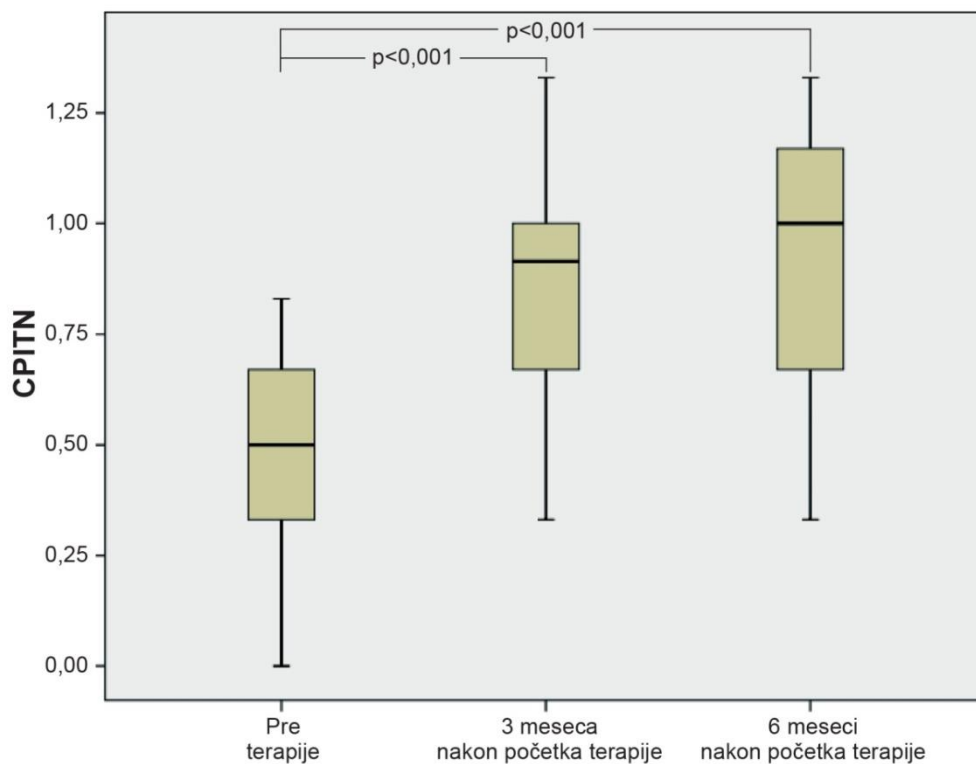
Evidentno je da nakon 3 meseca, kao i 6 meseci nakon početka ortodontske terapije postoji statistički značajan porast vrednosti svih praćenih kliničkih parametara stanja gingive u odnosu na vrednosti pre početka terapije, na maksimalnom nivou statističke značajnosti ($p < 0,001$, Wilcoxon Signed-Ranks test, Studentov t-test uparenih uzoraka) (Grafikon 1,2,3).



Grafikon 1. Vrednosti medijane i interkvartalnog ranga PI, pre početka, 3 i 6 meseci nakon početka terapije.



Grafikon 2. Vrednosti medijane i interkvartilnog ranga SBI, pre početka, 3 i 6 meseci nakon početka terapije.



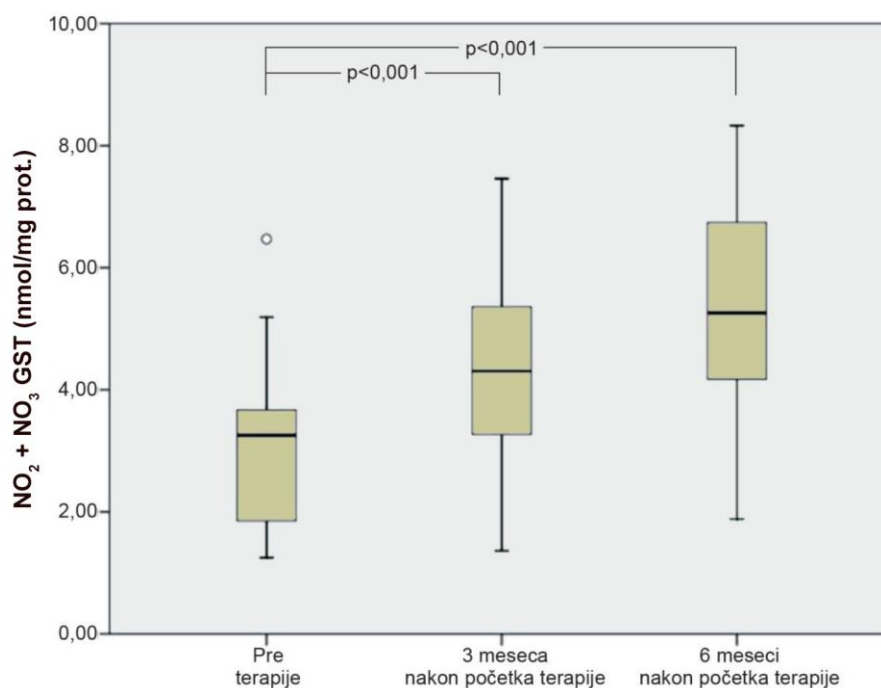
Grafikon 3. Vrednosti medijane i interkvartilnog ranga CPITN pre početka, 3 i 6 meseci nakon početka terapije.

5.1.2. Biohemijski parametri u praćenju parodontalnog stanja kod pacijenata u treapiji fiksnim ortodontskim aparatima

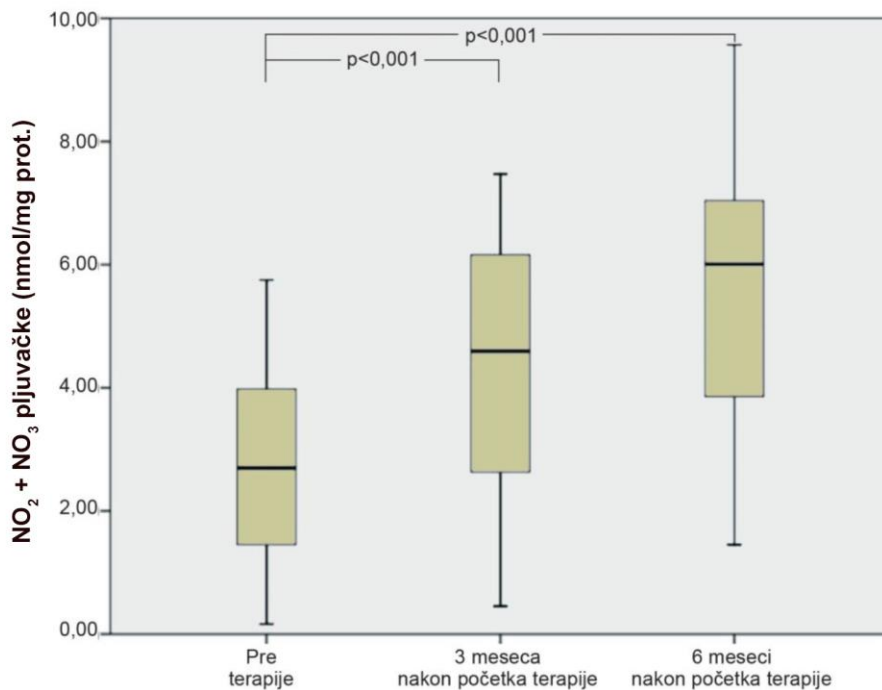
Postoji statistički značajan porast vrednosti koncentracija NO_2+NO_3 u GST i pljuvački 3 i 6 meseci nakon početka ortodontske terapije u poređenju sa vrednostima pre početka terapije na najvišem nivou statističke značajnosti ($p<0,001$, Studentov t-test uparenih uzoraka) (Grafikon 4 i 5).

Postoji statistički značajan porast vrednosti koncentracija RANKL u GST 3 i 6 meseci nakon početka ortodontske terapije u poređenju sa vrednostima pre početka terapije na najvišem nivou statističke značajnosti ($p<0,001$, Wilcoxon Signed-Ranks test, Studentov t-test uparenih uzoraka) (Grafikon 7 i 8).

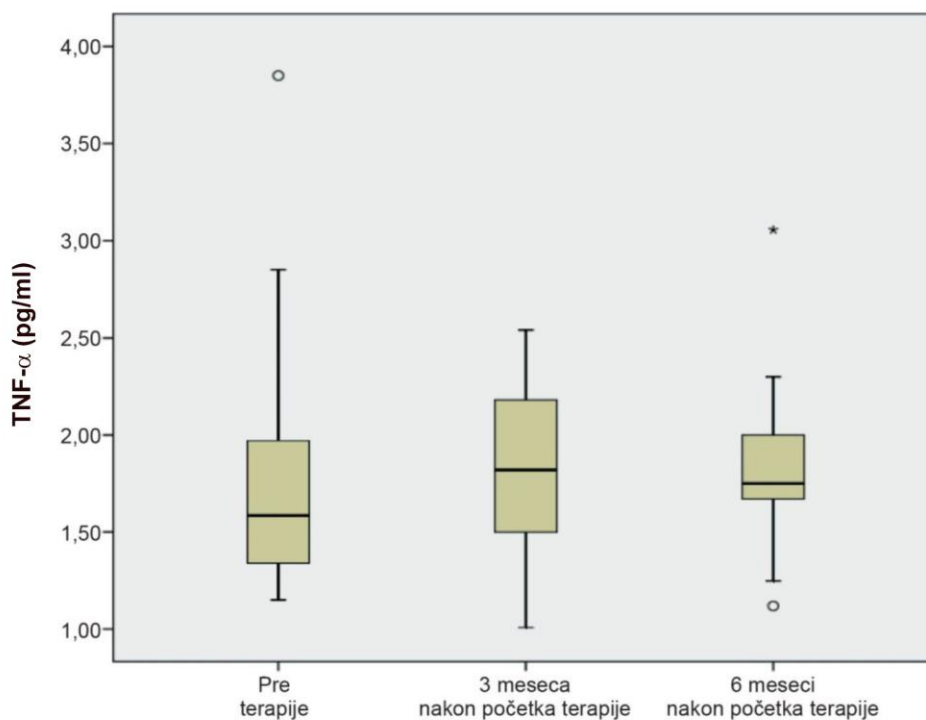
Ne postoji statistički značajan porast vrednosti koncentracija $\text{TNF-}\alpha$ 3 i 6 meseci nakon početka ortodontske terapije (Wilcoxon Signed-Ranks test), a vrednosti koncentracija nakon 6-tog meseca su niže u odnosu na vrednosti dobijene 3 meseca nakon početka terapije (Grafikon 6).



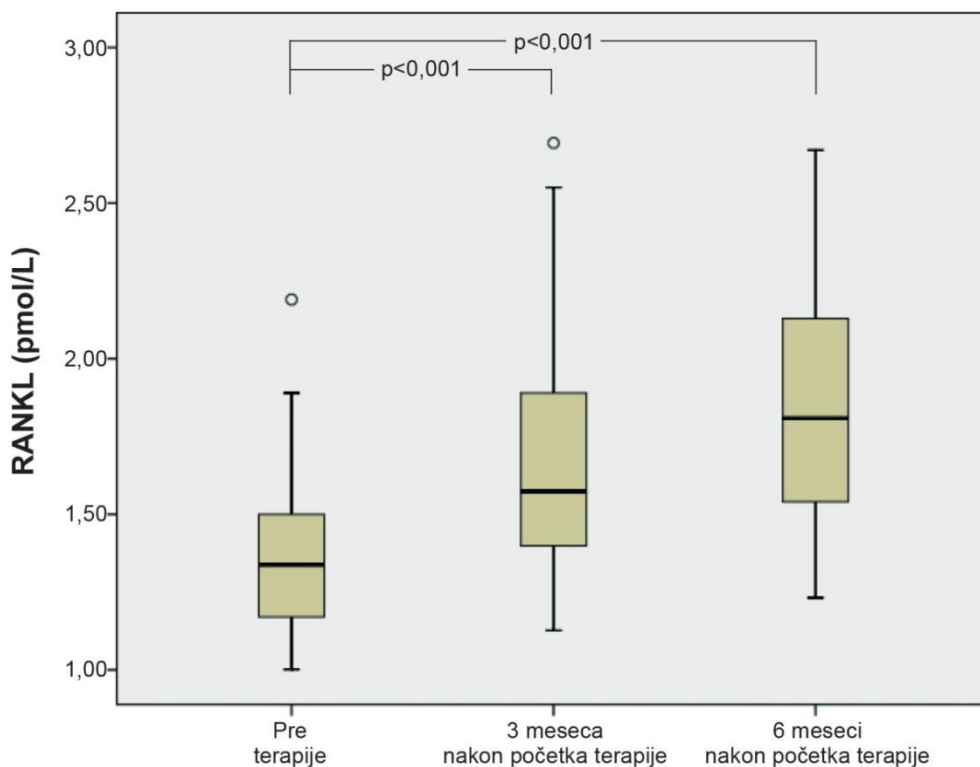
Grafikon 4. Vrednosti medijane i interkvartalnog ranga koncentracije NO_2+NO_3 u GST, pre početka, 3 i 6 meseci nakon početka terapije.



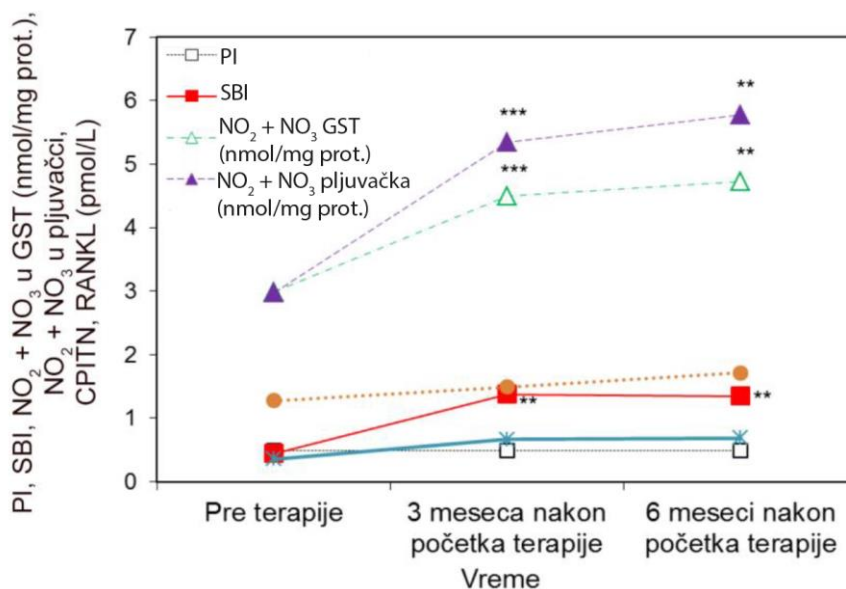
Grafikon 5. Vrednosti medijane i interkvartilnog ranga koncentracije NO₂+NO₃ u pljuvački, pre početka, 3 i 6 meseci nakon početka terapije.



Grafikon 6. Vrednosti medijane i interkvartilnog ranga koncentracije TNF- α u GST pre početka, 3 i 6 meseci nakon početka terapije.



Grafikon 7. Vrednosti medijane i interkvartilnog ranga koncentracije RANKL u GST, pre početka, 3 i 6 meseci nakon početka terapije.



Grafikon 8. Vrednosti medijane i interkvartilnog ranga ispitivanih varijabli pre početka, 3 i 6 meseci nakon početka terapije kod pacijenata sa konstantnim vrednostima PI.

5.1.3. Korelacije i promene ispitivanih kliničkih i biohemijskih parametara

Tabela 1. Korelacije ispitivanih varijabli tokom 6 meseci ortodontske terapije

Korelacije parametara	Pre terapije	3 meseca od početka terapije	6 meseci od početka terapije
PI i SBI	0,46*	0,41*	0,46**
PI i CPITN	0,42*	0,56**	0,64***
PI i NO ₂ +NO ₃ GST	-0,20	-0,17	-0,10
PI i NO ₂ +NO ₃ u pljuvački	-0,19	-0,27	-0,41*
PI i TNF- α	0,32	0,01	-0,03
PI i RANKL	-0,11	-0,05	0,00
SBI i CPITN	0,81***	0,75***	0,80***
SBI i NO ₂ +NO ₃ GST	-0,08	0,15	0,05
SBI i NO ₂ +NO ₃ u pljuvački	-0,42*	-0,30	-0,24
SBI i TNF- α	0,32	0,15	0,19
SBI i RANKL	0,03	-0,02	0,10
NO ₂ +NO ₃ GST i NO ₂ +NO ₃ u pljuvački	0,53**	0,43*	0,71***
NO ₂ +NO ₃ GST i TNF- α	0,28	0,32	-0,02
NO ₂ +NO ₃ GST i RANKL	-0,05	-0,11	0,19
NO ₂ +NO ₃ u pljuvački i TNF- α	-0,13	0,23	-0,17
NO ₂ +NO ₃ u pljuvački i RANKL	-0,22	-0,20	0,15
CPITN i TNF- α	0,34	0,14	0,29
CPITN i RANKL	0,15	0,06	0,01
TNF- α i RANKL	-0,10	0,05	-0,03

* – p<0,05, ** – p<0,01, *** – p<0,001

U svim ispitivanim periodima postoji statistički značajna pozitivna korelacija vrednosti kliničkih parametara gingive (PI i SBI), koja je pre početka i 3 meseca nakon početka terapije na nivou statističke značajnosti od p<0,05, a 6 meseci nakon početka terapije još veće statističke značajnosti (p<0,01).

Postoje pozitivne statistički značajne korelacije PI i CPITN srednjeg intenziteta pre početka terapije (p<0,05), velikog intenziteta 3 meseca (p<0,01), kao i 6 meseci nakon početka terapije (p<0,001). Postoje visoke, pozitivne statistički značajne korelacije SBI i CPITN pre početka, 3 i 6 meseci nakon početka terapije (p<0,001)

Statistički značajne, pozitivne i veoma izražene korelacije utvrđene su i između koncentracije NO_2+NO_3 u GST i u pljuvački, na nivou statističke značajnosti $p<0,05$, 3 meseca nakon početka terapije, $p<0,01$ pre početka terapije, a čak $p<0,001$, 6 meseci nakon početka terapije sa Pirsonovim koeficijentom korelacije od $r=0,71$.

Koncentracije NO_2+NO_3 statistički značajno i negativno korelišu sa PI i SBI, ($p<0,05$).

Korelacije RANKL sa svim parametrima su minimalne. Najizraženija korelacija, ali bez statističke značajnosti, postoji između CPITN i $\text{TNF-}\alpha$ pre početka terapije, sa vrednošću Spearmanovog koeficijenta od 0,34 (Tabela 1).

Tabela 2. Vrednosti promena ispitivanih varijabli tokom prvih 6 meseci ortodontske terapije (promene u odnosu na vrednosti pre terapije)

Promene parametra	$X\pm\text{SD}$ (95% CI); Md (IKR)	
	3 meseca od početka terapije	6 meseci od početka terapije
PI	0,27±0,26 (0,17 – 0,36) 0,28 (0,00 – 0,49)	0,42±0,35 (0,29 – 0,55) ^{***} 0,39 (0,00 – 0,62)
SBI	1,04±0,52 (0,85 – 1,24) 1,07 (0,54 – 1,50)	1,17±0,53 (0,97 – 1,36) [*] 1,21 (0,74 – 1,46)
NO_2+NO_3 GST (nmol/mg prot.)	1,34±0,99 (0,97 – 1,71) 1,06 (0,31 – 1,94)	2,20±1,22 (1,74 – 2,65) ^{**} 1,81 (1,51 – 3,41)
NO_2+NO_3 pljuvačka (nmol/mg prot.)	1,60±1,08 (1,20 – 2,00) 1,16 (0,75 – 2,53)	2,89±1,50 (2,33 – 3,45) ^{***} 2,60 (1,83 – 3,98)
CPITN	0,36±0,16 (0,30 – 0,41) 0,33 (0,29 – 0,50)	0,46±0,17 (0,39 – 0,52) ^{***} 0,42 (0,33 – 0,54)
$\text{TNF-}\alpha$ (pg/mL)	0,04±0,62 (-0,20 – 0,27) 0,09 (-0,17 – 0,38)	0,03±0,56 (-0,18 – 0,23) 0,15 (-0,20 – 0,37)
RANKL (pmol/L)	0,29±0,30 (0,17 – 0,40) 0,21 (0,12 – 0,38)	0,45±0,27 (0,35 – 0,55) 0,50 (0,23 – 0,67) [*]

* – $p<0,05$, ** – $p<0,01$, *** – $p<0,001$

Utvrđeno je da su ostvarene promene u odnosu na vrednosti pre početka terapije kod većine ispitivanih parametara statistički značajno veće nakon 6 meseci u odnosu na period nakon 3 meseca od početka ortodontske terapije, sa nivoima značajnosti od $p<0,05$ za SBI, $p<0,01$ za

NO₂+NO₃ GST, $p < 0,001$ za PI i NO₂+NO₃ u pljuvačci, $p < 0,001$ za CPITN, odnosno $p < 0,05$ za RANKL ($p < 0,001$, Wilcoxon Signed-Ranks test, Studentov t-test uparenih uzoraka). Jedino su promene za TNF- α na istom nivou 3 i 6 meseci nakon početka terapije, a one su i onako veoma male (Tabela 2).

Tabla 3. Korelacije promena ispitivanih varijabli tokom 6 meseci ortodontske terapije

Korelacije parametara	3 meseca	6 meseci
	od početka terapije	od početka terapije
PI i SBI	0,27	0,31
PI i CPITN	0,04	0,35
PI i NO ₂ +NO ₃ GST	0,02	0,11
PI i NO ₂ +NO ₃ u pljuvačci	-0,19	0,03
PI i TNF- α	-0,11	-0,00
PI i RANKL	-0,09	-0,07
SBI i CPITN	0,45*	0,52**
SBI i NO ₂ +NO ₃ GST	0,13	0,03
SBI i NO ₂ +NO ₃ u pljuvačci	-0,25	-0,04
SBI i TNF- α	-0,14	-0,08
SBI i RANKL	0,01	-0,13
NO ₂ +NO ₃ GST i NO ₂ +NO ₃ u pljuvačci	0,31	0,59***
NO ₂ +NO ₃ GST i CPITN	-0,18	-0,09
NO ₂ +NO ₃ GST i TNF- α	-0,09	0,00
NO ₂ +NO ₃ GST i RANKL	-0,18	0,22
NO ₂ +NO ₃ u pljuvačci i CPITN	-0,04	0,07
NO ₂ +NO ₃ u pljuvačci i TNF- α	0,06	0,03
NO ₂ +NO ₃ u pljuvačci i RANKL	-0,23	0,26
CPITN i TNF- α	0,13	0,09
CPITN i RANKL	0,47**	0,24
TNF- α i RANKL	0,07	0,24

*** – $p < 0,001$, ** – $p < 0,01$

Postoji pozitivna korelacija vrednosti promena kliničkih parametara gingive (PI i SBI) malog intenziteta 3 meseca, a srednjeg intenziteta 6 meseci nakon početka terapije, međutim,

bez statističke značajnosti. Kao statistički značajne izdvajaju se i pozitivne korelacije promena SBI i CPITN: srednjeg intenziteta nakon 3 meseca terapije ($p < 0,05$) i jaka korelacija 6 meseci nakon početka terapije ($p < 0,01$).

Korelacija promena koncentracija $\text{NO}_2 + \text{NO}_3$ u GST i $\text{NO}_2 + \text{NO}_3$ u pljuvački je pozitivna, srednjeg intenziteta, ali ne i statistički značajna 3 meseca nakon početka terapije, a velika i statistički značajna 6 meseci nakon početka terapije ($p < 0,001$). Postoji pozitivna korelacija vrednosti promena malog intenziteta između CPITN i $\text{TNF-}\alpha$ 3 meseca nakon početka terapije, kao i između RANKL, CPITN i $\text{TNF-}\alpha$ 6 meseci nakon početka terapije. Statistički značajna je i pozitivna korelacija CPITN i RANKL visokog intenziteta, utvrđena 3 meseca od početka terapije sa vrednošću Spearmanovog koeficijenta korelacije $\rho = 0,47$ ($p < 0,01$) (Tabela 3).

Iako je vrednost PI kod 8 ispitivanih pacijenata konstantna tokom 6 meseci ortodontske terapije (Grafikon 8), prisutan je statistički značajan porast vrednosti CPITN, SBI, RANKL, $\text{NO}_2 + \text{NO}_3$ u GST i u pljuvački 3 i 6 meseci nakon početka terapije. Vrednosti kliničkog parametra SBI, 3 meseca, kao i 6 meseci nakon početka terapije statistički su značajno veće nego pre početka terapije ($p < 0,01$).

U odnosu na vrednosti parametara pre početka terapije, koncentracije $\text{NO}_2 + \text{NO}_3$ u GST, kao i u pljuvački, statistički su značajno veće 3 meseca ($p < 0,001$), kao i 6 meseci nakon početka terapije ($p < 0,01$).

Treba uočiti da su vrednosti SBI i koncentracije $\text{NO}_2 + \text{NO}_3$ u GST nešto niže 6 meseci nakon početka terapije nego 3 meseca od početka terapije, dok je vrednost koncentracije $\text{NO}_2 + \text{NO}_3$ u pljuvački veća 6 meseci nego 3 meseca nakon početka ortodontske terapije.

U odnosu na početak, 3 meseca, kao i 6 meseci nakon početka ortodontske terapije ostvaren je statistički značajan porast vrednosti CPITN i RANKL, na maksimalnom nivou statističke značajnosti ($p < 0,001$), dok je vrednost $\text{TNF-}\alpha$ samo minimalno veća 3 i 6 meseci nakon početka terapije u odnosu na vrednost parametra pre terapije (Grafikon 8).

5.2. Rezultati ispitivanja efekata različitih koncentracija ekstrakata materijala za lepljenje bravica na vijabilnost i proliferaciju L929 ćelija

5.2.1. Efekat različitih koncentracija jednodnevnog ekstrakta ispitivanih materijala na vijabilnost L929 ćelija

Vijabilnost ćelija tretiranih različitim koncentracijama jednodnevnog ekstrakta ispitivanih materijala je izražena preko srednje vrednosti apsorbance, koja je direktno proporcionalna broju živih ćelija.

Deskriptivni parametri vijabilnosti ćelija u zavisnosti od koncentracije jednodnevnog ekstrakata ispitivanih materijala, dati su u Tabelama 4 i 5. Vijabilnost ćelija izloženih kontrolnom medijumu je veća u poređenju sa ćelijama izloženim jednodnevnom ekstraktu *AP* materijala sa nivoima značajnosti datim u tabeli 4. Vijabilnost ćelija izloženih ekstraktu *AP* materijala opada sa povećanjem koncentracije ekstrakta. Vijabilnost ćelija izloženih jednodnevnom ekstraktu *SP* materijala malo varira u odnosu na koncentraciju ekstrakta, manja je u odnosu na vijabilnost u kontroli (Tabela 5), sa statistički značajnim razlikama koje su nižeg nivoa nego kod *AP* materijala.

Tabela 4. Efekat različitih koncentracija jednodnevnog ekstrakta *AP* materijala na vijabilnost ćelija

Koncentracija	N	X ± SD	SE	95% CI	Min	Max	Cv
Kontrola	4	0,76 ± 0,01	0,00	0,75 – 0,77	0,75	0,77	1,06
5%	4	0,50 ± 0,01 ***	0,01	0,48 – 0,52	0,49	0,52	2,39
10%	4	0,52 ± 0,02 ***	0,01	0,48 – 0,55	0,49	0,55	4,66
25%	4	0,50 ± 0,01 ***	0,01	0,47 – 0,52	0,49	0,51	2,82
50%	4	0,49 ± 0,07 **	0,04	0,37 – 0,60	0,40	0,56	15,01
100%	4	0,07 ± 0,00 ***	0,00	0,07 – 0,08	0,07	0,08	5,61

** – p<0,01, *** – p<0,001

Studentov t test nezavisnih uzoraka, Mann-Whitney test

Tabela 5. Efekat različitih koncentracija jednodnevnog ekstrakta SP materijala na vijabilnost ćelija

Koncentracija	N	X ± SD	SE	95% CI	Min	Max	Cv
Kontrola	4	0,66 ± 0,07	0,03	0,56 – 0,76	0,61	0,75	9,86
5%	4	0,56 ± 0,02 *	0,01	0,53 – 0,59	0,54	0,58	3,44
10%	4	0,63 ± 0,04	0,02	0,56 – 0,69	0,59	0,69	6,99
25%	4	0,57 ± 0,03 *	0,01	0,53 – 0,62	0,55	0,61	4,72
50%	4	0,57 ± 0,02 *	0,01	0,54 – 0,59	0,55	0,58	2,86
100%	4	0,48 ± 0,02 **	0,01	0,45 – 0,50	0,46	0,50	3,40

* – 0,05; ** – p<0,01
Studentov t test nezavisnih uzoraka

5.2.2. Efekat različitih koncentracija jednodnevnog ekstrakta ispitivanih materijala na proliferaciju L929 ćelija

Proliferacija ćelija tretiranih različitim koncentracijama jednodnevnog ekstrakta ispitivanih materijala izražena je preko srednje vrednosti apsorbance, koja je direktno proporcionalna broju živih ćelija.

Deskriptivni parametri proliferacije ćelija u zavisnosti od koncentracije jednodnevnog ekstrakata ispitivanih materijala, dati su u Tabelama 6 i 7. Proliferacija ćelija izloženih kontrolnom rastvoru je manja u poređenju sa ćelijama izloženim peto i desetoprocentnom jednodnevnom ekstraktu oba materijala. Proliferacija ćelija tretiranih 25%-nim ekstraktom AP materijala, beleži brži pad i statistički je značajno niža u odnosu na kontrolu, a veoma značajan pad se beleži za 50 i 100%-ne ekstrakte AP materijala.

Proliferacija ćelija izloženih 25 i 50%-nim ekstraktima SP materijala je u nivou, čak i viša u odnosu na kontrolu. Statistički značajno smanjena proliferacija u odnosu na kontrolu se beleži samo za koncentraciju ekstrakta od 100%.

Tabela 6. Efekat različitih koncentracija jednodnevnog ekstrakta AP materijala na proliferaciju ćelija

Koncentracija	N	X ± SD	SE	95% CI	Min	Max	Cv
Kontrola	4	0,94 ± 0,05	0,02	0,86 – 1,02	0,88	0,99	5,18
5%	4	1,19 ± 0,11 **	0,05	1,02 – 1,36	1,03	1,25	8,97
10%	4	1,23 ± 0,13 *	0,07	1,02 – 1,43	1,10	1,36	10,61
25%	4	0,77 ± 0,09 *	0,04	0,63 – 0,91	0,68	0,86	11,65
50%	4	0,12 ± 0,01 ***	0,01	0,10 – 0,14	0,10	0,13	12,14
100%	4	0,04 ± 0,00 ***	0,00	0,04 – 0,04	0,04	0,04	2,21

* – p<0,05, ** – p<0,01, *** – p<0,001
Studentov t test nezavisnih uzoraka, Mann-Whitney test

Tabela 7. Efekat različitih koncentracija jednodnevnog ekstrakta SP materijala na proliferaciju ćelija

Koncentracija	N	X ± SD	SE	95% CI	Min	Max	Cv
Kontrola	4	0,95 ± 0,03	0,02	0,90 – 1,01	0,92	1,00	3,49
5%	4	1,10 ± 0,14 **	0,07	0,87 – 1,33	1,00	1,32	13,00
10%	4	1,21 ± 0,10	0,05	1,05 – 1,38	1,07	1,29	8,53
25%	4	0,98 ± 0,09	0,05	0,84 – 1,13	0,89	1,10	9,53
50%	4	0,98 ± 0,05	0,03	0,89 – 1,06	0,92	1,03	5,52
100%	4	0,81 ± 0,06 **	0,03	0,71 – 0,90	0,76	0,88	7,24

** – p<0,01
Studentov t test nezavisnih uzoraka

5.2.3. Efekat različitih koncentracija trodnevnog ekstrakta ispitivanih materijala na vijabilnost L929 ćelija

Vijabilnost ćelija tretiranih različitim koncentracijama trodnevnog ekstrakta ispitivanih materijala izražena je preko srednje vrednosti apsorbance, koja je direktno proporcionalna broju živih ćelija.

Deskriptivni parametri vijabilnosti ćelija u zavisnosti od koncentracije trodnevnog ekstrakta ispitivanih materijala, dati su u Tabelama 8 i 9. Vijabilnost ćelija izloženih kontrolnom rastvoru je statistički značajno veća u odnosu na ćelije izložene svim prikazanim koncentracijama trodnevnog ekstrakta AP materijala na maksimalnom nivou značajnosti (p<0,001) (Tabela 8).

Vijabilnost ćelija izloženih ekstraktu *SP* materijala značajno blaže opada sa povećanjem koncentracije ekstrakta u odnosu na ekstrakt *AP* materijala i veoma je bliska vijabilnosti ćelija u kontroli. Statistički je značajno manja vijabilnost ćelija izloženih 10%-nom ekstraktu *AP* materijala ($p < 0,05$), a statistički značajno manja u odnosu na kontrolu kod ćelija izloženih 100%-nom ekstraktu oba materijala ($p < 0,001$) (Tabela 9).

Tabela 8. Efekat različitih koncentracija trodnevnog ekstrakta *AP* materijala na vijabilnost ćelija

Koncentracija	N	X ± SD	SE	95% CI	Min	Max	Cv
Kontrola	4	0,76 ± 0,01	0,00	0,75 – 0,77	0,75	0,77	1,06
5%	4	0,46 ± 0,01 ***	0,00	0,45 – 0,47	0,46	0,47	1,26
10%	4	0,47 ± 0,03 ***	0,01	0,42 – 0,52	0,43	0,49	6,26
25%	4	0,49 ± 0,04 ***	0,02	0,43 – 0,55	0,44	0,53	7,74
50%	4	0,37 ± 0,03 ***	0,02	0,31 – 0,42	0,33	0,40	8,72
100%	4	0,07 ± 0,01 ***	0,00	0,06 – 0,08	0,07	0,08	9,00

*** – $p < 0,001$

Studentov t test nezavisnih uzoraka, Mann-Whitney test

Tabela 9. Efekat različitih koncentracija trodnevnog ekstrakta *SP* materijala na vijabilnost ćelija

Koncentracija	N	X ± SD	SE	95% CI	Min	Max	Cv
Kontrola	4	0,66 ± 0,07	0,03	0,56 – 0,76	0,61	0,75	9,86
5%	4	0,64 ± 0,10	0,05	0,49 – 0,79	0,50	0,69	14,86
10%	4	0,56 ± 0,03 *	0,02	0,51 – 0,61	0,51	0,58	5,54
25%	4	0,63 ± 0,07	0,04	0,52 – 0,75	0,54	0,71	11,16
50%	4	0,62 ± 0,08	0,04	0,49 – 0,75	0,50	0,68	13,20
100%	4	0,32 ± 0,01 ***	0,01	0,30 – 0,35	0,31	0,34	4,54

* – 0,05; ** – $p < 0,01$

Studentov t test nezavisnih uzoraka

5.2.4. Efekat različitih koncentracija trodnevnog ekstrakta ispitivanih materijala na proliferaciju L 929 ćelija

Proliferacija ćelija tretiranih različitim koncentracijama trodnevnog ekstrakta ispitivanih materijala izražena je preko srednje vrednosti apsorbance, koja je direktno proporcionalna broju živih ćelija.

Deskriptivni parametri proliferacije ćelija u zavisnosti od koncentracije trodnevnog ekstrakta ispitivanih materijala, dati su u Tabelama 10 i 11

Tabela 10. Efekat različitih koncentracija trodnevnog ekstrakta AP materijala na proliferaciju ćelija

Koncentracija	N	X ± SD	SE	95% CI	Min	Max	Cv
Kontrola	4	0,94 ± 0,05	0,02	0,86 – 1,02	0,88	0,99	5,18
5%	4	0,93 ± 0,05	0,03	0,85 – 1,01	0,89	0,99	5,54
10%	4	0,84 ± 0,03 **	0,01	0,80 – 0,88	0,81	0,87	3,18
25%	4	0,35 ± 0,01 ***	0,01	0,33 – 0,37	0,33	0,36	3,66
50%	4	0,06 ± 0,02 ***	0,01	0,03 – 0,09	0,04	0,08	31,85
100%	4	0,04 ± 0,00 ***	0,00	0,04 – 0,05	0,04	0,05	3,82

** – p<0,01, *** – p<0,001
Studentov t test nezavisnih uzoraka

Tabela 11. Efekat različitih koncentracija trodnevnog ekstrakta SP materijala na proliferaciju ćelija

Koncentracija	N	X ± SD	SE	95% CI	Min	Max	Cv
Kontrola	4	0,95 ± 0,03	0,02	0,90 – 1,01	0,92	1,00	3,49
5%	4	0,96 ± 0,03	0,01	0,91 – 1,01	0,93	1,00	3,06
10%	4	0,97 ± 0,04	0,02	0,91 – 1,04	0,94	1,03	4,18
25%	4	1,00 ± 0,06	0,03	0,91 – 1,09	0,95	1,08	5,66
50%	4	1,00 ± 0,08	0,04	0,87 – 1,14	0,91	1,11	8,34
100%	4	0,33 ± 0,03 ***	0,01	0,29 – 0,37	0,31	0,36	7,56

*** – p<0,01
Studentov t test nezavisnih uzoraka

Proliferacija ćelija izloženih kontrolnom rastvoru je statistički značajno veća u odnosu na ćelije izložene ekstraktu *AP* materijala, već počev od koncentracije od 10% ($p < 0,01$), a na najvišem nivou značajnosti za sve ostale više koncentracije ekstrakta ($p < 0,001$). Proliferacija ćelija izloženih ekstraktu *SP* materijala je veoma sličnog nivoa u odnosu na kontrolu (čak je i minimalno viša i u porastu) za ispitivane koncentracije od 5, 10, 25 i 50%, a statistički je značajno niža u odnosu na kontrolu tek pri najvećoj koncentraciji ekstrakta od 100% ($p < 0,001$).

5.2.5. Efekat različitih koncentracija sedmodnevnog ekstrakta ispitivanih materijala na vijabilnost L929 ćelija

Vijabilnost ćelija tretiranih različitim koncentracijama sedmodnevnog ekstrakta ispitivanih materijala izražena je preko srednje vrednosti apsorbance, koja je direktno proporcionalna broju živih ćelija.

Deskriptivni parametri vijabilnosti ćelija u zavisnosti od koncentracije sedmodnevnog ekstrakta ispitivanih materijala, dati su u tabelama 12 i 13. Kod ćelija izloženih kontrolnom rastvoru vijabilnost je statistički značajno veća u odnosu na ćelije izložene svim prikazanim koncentracijama ekstrakata *AP* materijala sa datim nivoima značajnosti (Tabela 12). Vijabilnost ćelija izloženih ekstraktu *SP* materijala se menja manjim intenzitetom, čak je približno sličnog nivoa na koncentracijama od 25 i 50% onoj u kontroli. Statistički je značajno niža u odnosu na kontrolu pri koncentracijama od 5 i 10% ($p < 0,05$), a najniža i statistički značajno manja u odnosu na kontrolu je pri koncentraciji od 100% ($p < 0,001$) (Tabela 13).

Tabela 12. Efekat različitih koncentracija sedmodnevnog ekstrakta *AP* materijala na vijabilnost ćelija

Koncentracija	N	$X \pm SD$	SE	95% CI	Min	Max	Cv
Kontrola	4	0,76 ± 0,01	0,00	0,75 – 0,77	0,75	0,77	1,06
5%	4	0,51 ± 0,03 ***	0,02	0,45 – 0,56	0,48	0,56	6,75
10%	4	0,48 ± 0,01 **	0,01	0,47 – 0,50	0,47	0,49	2,11
25%	4	0,50 ± 0,01 ***	0,01	0,48 – 0,52	0,49	0,52	2,44
50%	4	0,39 ± 0,02 *	0,01	0,35 – 0,43	0,38	0,43	6,30
100%	4	0,07 ± 0,01 ***	0,00	0,06 – 0,09	0,07	0,08	10,03

* – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$ *** – $p < 0,001$
Studentov t test nezavisnih uzoraka, Mann-Whitney test

Tabela 13. Efekat različitih koncentracija sedmodnevnog ekstrakta SP materijala na vijabilnost ćelija

Koncentracija	N	X ± SD	SE	95% CI	Min	Max	Cv
Kontrola	4	0,66 ± 0,07	0,03	0,56 – 0,76	0,61	0,75	9,86
5%	4	0,51 ± 0,01 **	0,00	0,49 – 0,52	0,50	0,51	1,68
10%	4	0,53 ± 0,02 **	0,01	0,50 – 0,55	0,52	0,55	2,91
25%	4	0,63 ± 0,08	0,04	0,50 – 0,77	0,51	0,68	13,35
50%	4	0,61 ± 0,08	0,04	0,47 – 0,74	0,49	0,69	14,01
100%	4	0,30 ± 0,01 ***	0,01	0,28 – 0,31	0,28	0,31	3,87

** – 0,01; *** – p<0,001
Studentov t test nezavisnih uzoraka

5.2.6. Efekat različitih koncentracija sedmodnevnog ekstrakta ispitivanih materijala na proliferaciju L929 ćelija

Proliferacija ćelija tretiranih različitim koncentracijama sedmodnevnog ekstrakta ispitivanih materijala izražena je preko srednje vrednosti apsorbance, koja je direktno proporcionalna broju živih ćelija.

Deskriptivni parametri proliferacije ćelija u zavisnosti od koncentracije sedmodnevnog ekstrakta ispitivanih materijala, dati su u Tabelama 14 i 15. Proliferacija ćelija izloženih dejstvu ekstrakata AP materijala statistički je niža pri svim koncentracijama ekstrakta u odnosu na kontrolu, sa nivoima značajnosti datim u Tabeli 14. Proliferacija ćelija je najviše smanjena pri koncentracijama ekstrakta od 50 i 100%. Proliferacija ćelija izloženih ekstraktu SP materijala je slična onoj u kontroli sve do koncentracije ekstrakta od 50% pri kojoj je statistički manja u odnosu na kontrolu (p<0,01), a pri koncentraciji od 100% proliferacija ćelija je izrazito smanjena u odnosu na kontrolu sa najvišim nivoom statističke značajnosti (p<0,001) (Tabela 15).

Tabela 14. Efekat različitih koncentracija sedmodnevnog ekstrakta AP materijala na proliferaciju ćelija

Koncentracija	N	X ± SD	SE	95% CI	Min	Max	Cv
Kontrola	4	0,94 ± 0,05	0,02	0,86 – 1,02	0,88	0,99	5,18
5%	4	0,80 ± 0,03 **	0,02	0,75 – 0,85	0,76	0,84	4,25
10%	4	0,74 ± 0,05 **	0,02	0,66 – 0,81	0,70	0,81	6,43
25%	4	0,39 ± 0,03 ***	0,02	0,34 – 0,44	0,37	0,44	7,84
50%	4	0,04 ± 0,00 ***	0,00	0,04 – 0,05	0,04	0,05	4,30
100%	4	0,04 ± 0,00 ***	0,00	0,04 – 0,05	0,04	0,05	3,99

** – p<0,01, *** – p<0,001
Studentov t test nezavisnih uzoraka

Tabela 15. Efekat različitih koncentracija sedmodnevnog ekstrakta SP materijala na proliferaciju ćelija

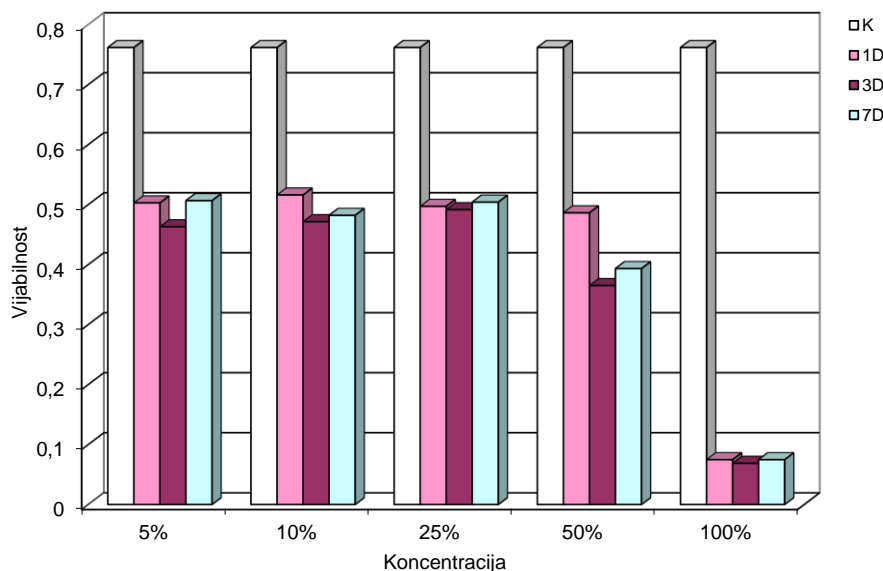
Koncentracija	N	X ± SD	SE	95% CI	Min	Max	Cv
Kontrola	4	0,95 ± 0,03	0,02	0,90 – 1,01	0,92	1,00	3,49
5%	4	0,90 ± 0,03	0,02	0,85 – 0,95	0,87	0,94	3,43
10%	4	0,95 ± 0,04	0,02	0,89 – 1,01	0,92	1,00	4,04
25%	4	0,95 ± 0,04	0,02	0,88 – 1,02	0,91	0,99	4,41
50%	4	0,81 ± 0,06 **	0,03	0,71 – 0,91	0,74	0,89	7,58
100%	4	0,14 ± 0,03 ***	0,02	0,09 – 0,20	0,12	0,19	24,07

** – p<0,01, *** – p<0,001
Studentov t test nezavisnih uzoraka

5.3. Rezultati ispitivanja vijabilnosti i proliferacije ćelija u istim koncentracijama ekstrakata za zadati tip materijala u zavisnosti od perioda ekstrakcije

5.3.1. Uticaj ispitivanih koncentracija ekstrakta AP materijala na vijabilnost ćelija u zavisnosti od perioda ekstrakcije

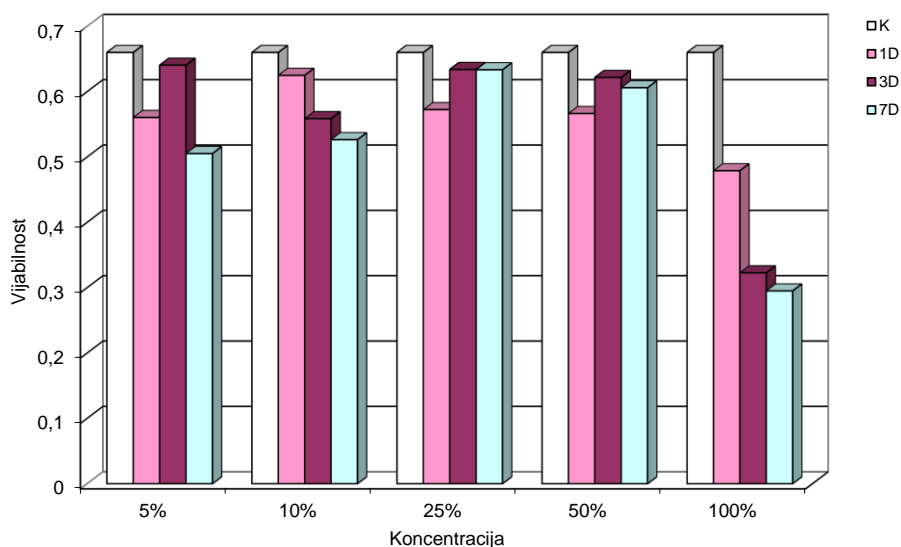
Na osnovu deskriptivnih parametara vijabilnosti ćelija datih u grafikonu 9 može se utvrditi da svi ekstrakti AP materijala deluju citotoksično, odnosno dovode do smanjenja vijabilnosti L929 ćelija, bez obzira na period ekstrakcije i ispitivane koncentracije. Najizraženiji citotoksični efekat zapaža se pri koncentraciji ekstrakta AP materijala od 100%. Jedino na koncentraciji ekstrakta od 50% se uočava značajna razlika u vijabilnosti ćelija zavisna od trajanja ekstrakcije. Date su statistički značajne razlike vijabilnosti u odnosu na negativnu kontrolu.



Grafikon 9. Efekat ispitivanih koncentracija ekstrakta AP materijala na vijabilnost ćelija u zavisnosti od trajanja ekstrakcije

5.3.2. Uticaj zadatih koncentracija ekstrakta SP materijala na vijabilnost ćelija u zavisnosti od perioda ekstrakcije

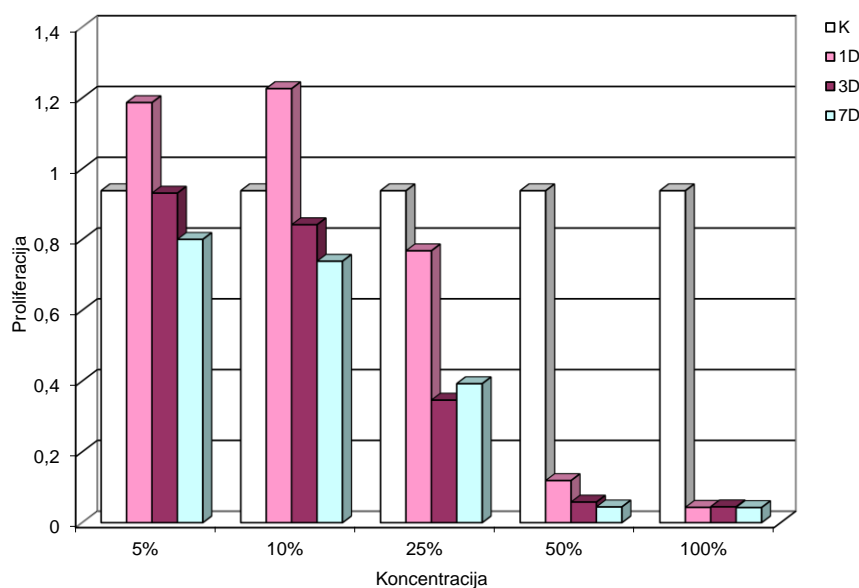
Deskriptivni parametri vijabilnosti ćelija prikazani na Grafikonu 10 ukazuju da period ekstrakcije, pri zadatoj koncentraciji, ne utiče značajnije na promenu vijabilnosti ćelija kada su u pitanju SP materijali. Najizraženija promena vijabilnosti zapaža se pri najvećoj koncentraciji od 100% pri čemu vijabilnost opada sa povećanjem perioda ekstrakcije. Prikazane su statistički značajne razlike vijabilnosti u odnosu na kontrolu.



Grafikon 10. Efekat različitih koncentracija ekstrakta SP materijala na vijabilnost ćelija u zavisnosti od trajanja ekstrakcije

5.3.3. Uticaj ispitivanih koncentracija ekstrakta AP materijala na proliferaciju ćelija u zavisnosti od perioda ekstrakcije

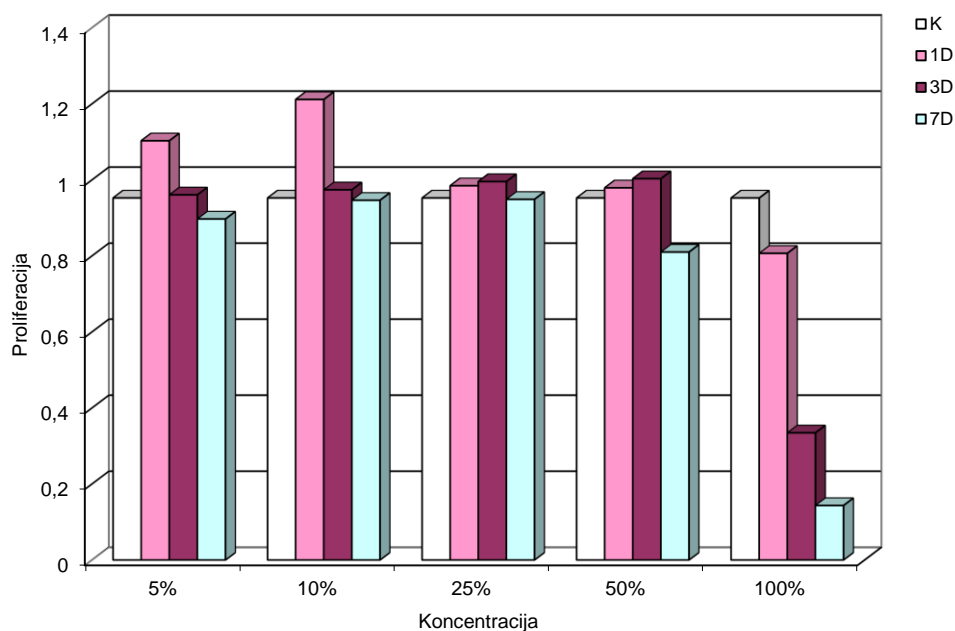
Na osnovu deskriptivnih parametara proliferacije prikazanih na Grafikonu 11 za materijal AP može se utvrditi da se sa produženjem perioda ekstrakcije, pri ispitivanoj koncentraciji, smanjuje proliferacija ćelija za koncentracije ekstrakta od 5, 10, 25 i 50%, dok je pri koncentraciji od 100% vrednost proliferacije veoma niska i ista za sve periode ekstrakcije. Dati su nivoi statističke značajnosti razlika proliferacija u odnosu na negativnu kontrolu.



Grafikon 11. Efekat različitih koncentracija ekstrakta AP materijala na proliferaciju ćelija u zavisnosti od trajanja ekstrakcije

5.3.4. Uticaj ispitivanih koncentracija ekstrakta SP materijala na proliferaciju ćelija u zavisnosti od perioda ekstrakcije

Deskriptivni parametri proliferacije prikazani na Grafikonu 12 za materijal *SP* ukazuju da generalno postoji blagi pad proliferacije sa porastom perioda ekstrakcije, uz zapažanje da je najveće smanjenje utvrđeno pri koncentraciji ekstrakta od 100%. Prikazani su nivoi statističke značajnosti razlika proliferacija u odnosu na kontrolu.



Grafikon 12. Efekat različitih koncentracija ekstrakta SP materijala na proliferaciju ćelija u zavisnosti od trajanja ekstrakcije

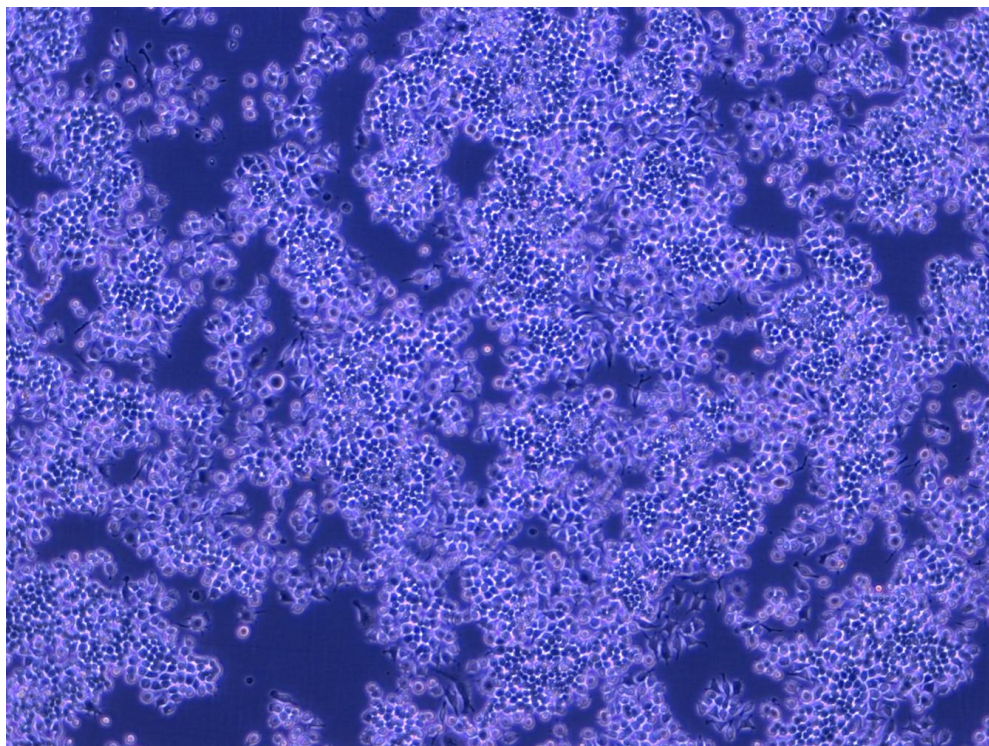
5.4. Rezultati mikroskopske analize fagocitoze čestica AP i SP materijala od strane makrofaga linije RAW 264.7

Na slici 20 prikazan je izgled ćelija u kontrolnoj kulturi makrofaga posmatrano na svetlosnom mikroskopu na faznom kontrastu. Makrofagi tretirani LPS-om su služili kao pozitivna kontrolna grupa za fagocitozu, jer LPS stimuliše fagocitnu aktivnost makrofaga. Na slikama 20 i 21. vide se znaci aktivacije makrofaga. Postoji veliki broj ćelija sa uočljivim vezikulama.

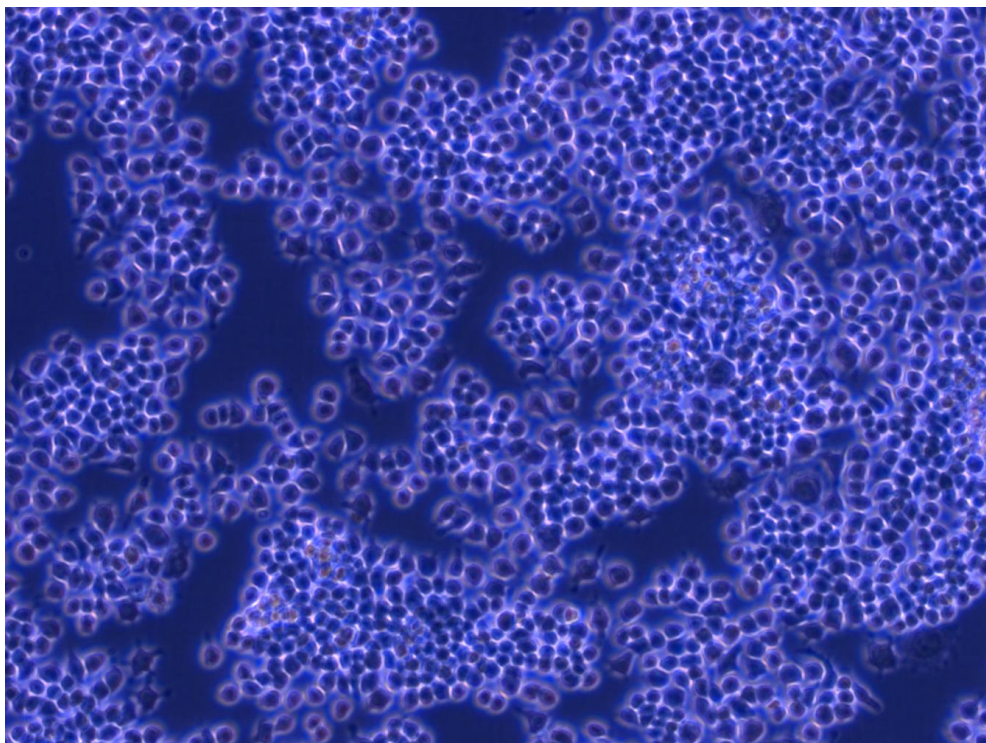
U kulturi makrofaga izloženih suspenziji AP materijala koncentracije 200 μ g/ml ne postoje znaci fagocitoze. Prisutna je značana redukcija broja ćelija u odnosu na kontrolu, a prisutni su znaci masovne apoptoze ćelija. (Slika 22 i 23).

U kulturi makrofaga izloženih suspenziji AP materijala u koncentraciji 40 mcg/ml postoji blaga redukcija broja ćelija, ali i znaci fagocitoze čestica ponuđenog materijala (Slika 24 i 25).

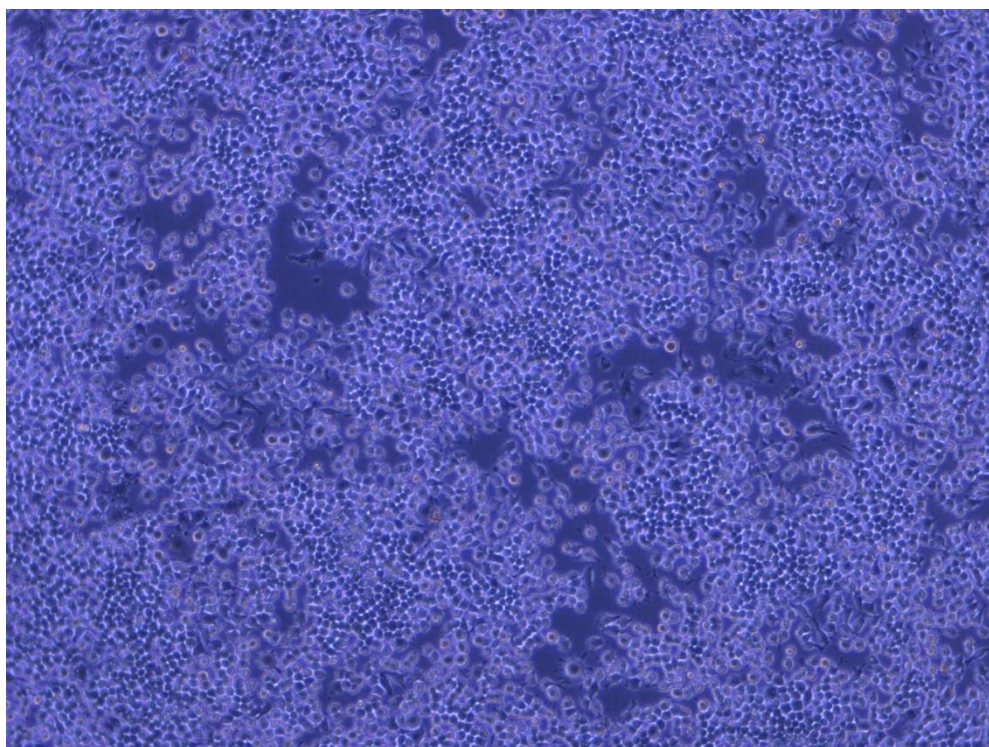
U kulturi makrofaga izloženih suspenzijama SP materijala u koncentracijama 200 i 40 mcg/ml može se uočiti izražena fagocitoza čestica, dok znakova apoptoze nema. Takođe mogu se uočiti ćelije ispunjene vezikulama (Slika 26, 27, 28, 29).



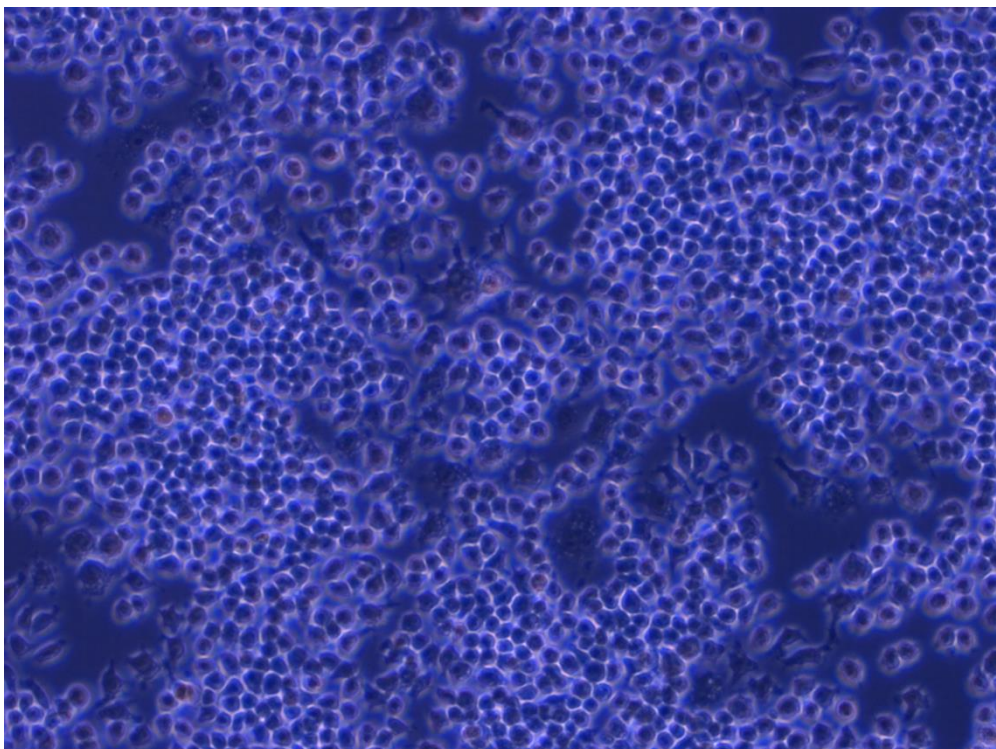
Slika 18. Negativna kontrola: kultura RAW 264.7 ćelija, uv. x 100, fazni kontrast.



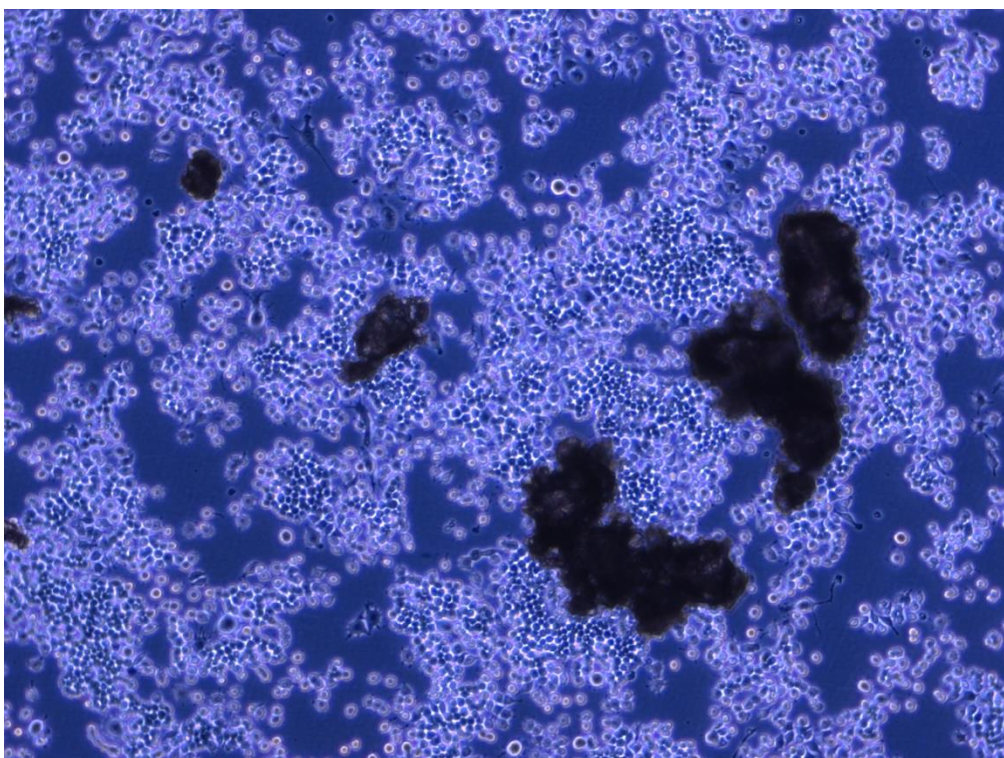
Slika 19. Negativna kontrola: kultura RAW 264.7 ćelija, uv. x 200, fazni kontrast.



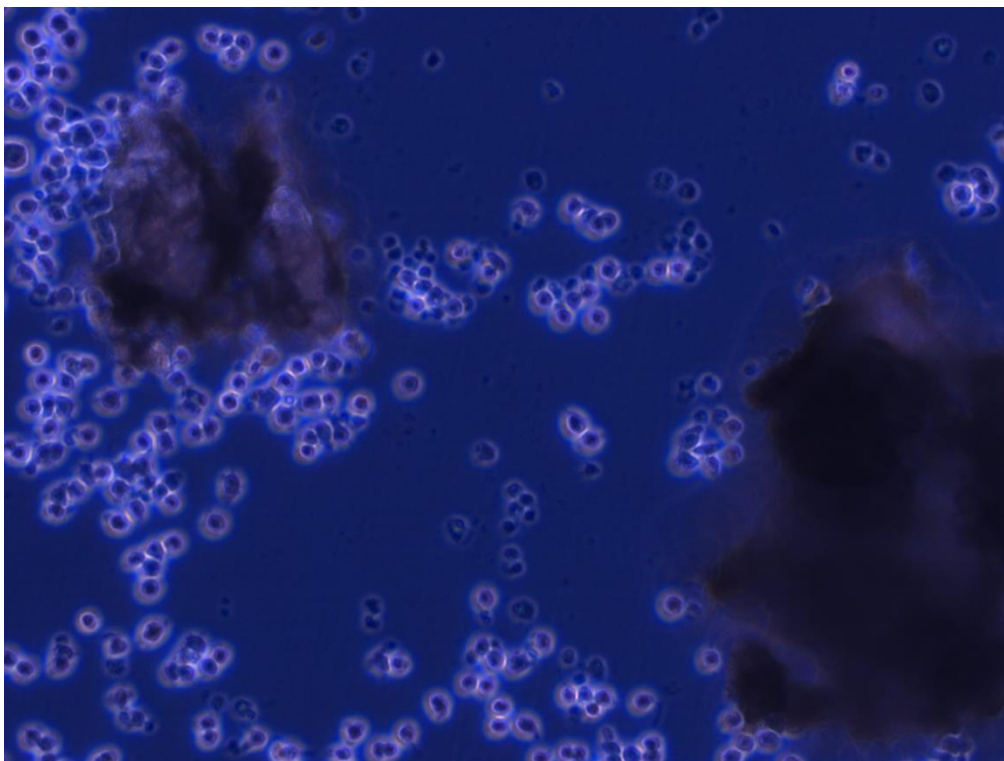
Slika 20. Pozitivna kontrola: kultura RAW 264.7 ćelija izloženih LPS-u, uv. x 100, fazni kontrast.



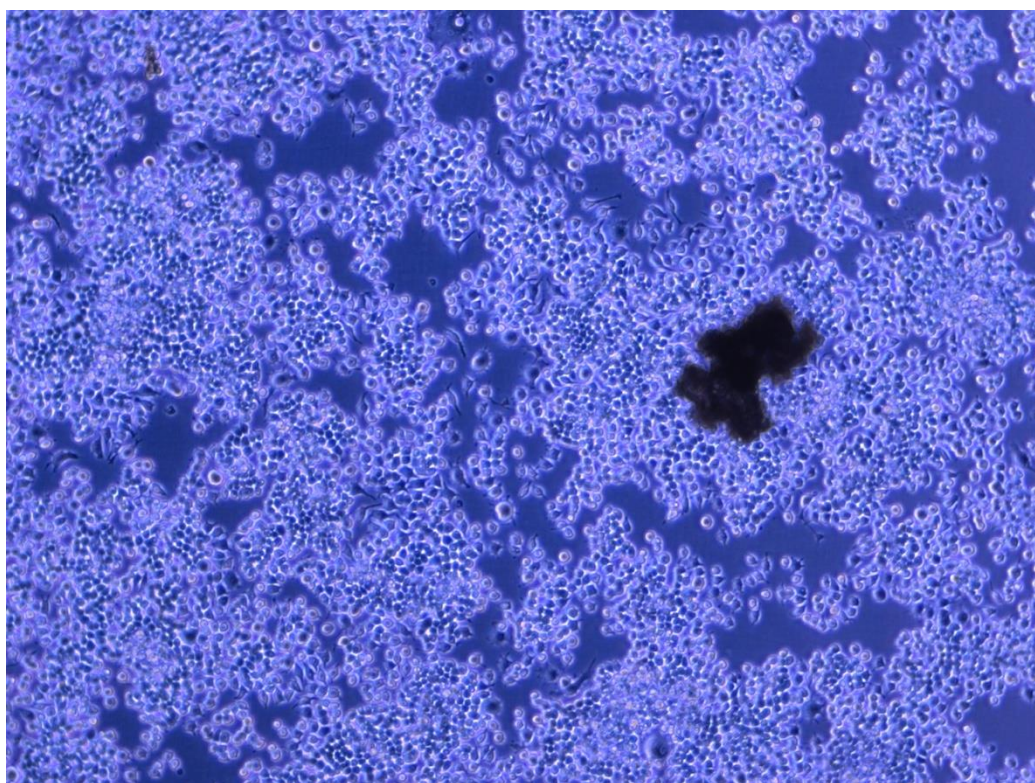
Slika 21. Pozitivna kontrola: kultura RAW 264.7 ćelija izloženih LPS-u, uv. x 200, fazni kontrast.



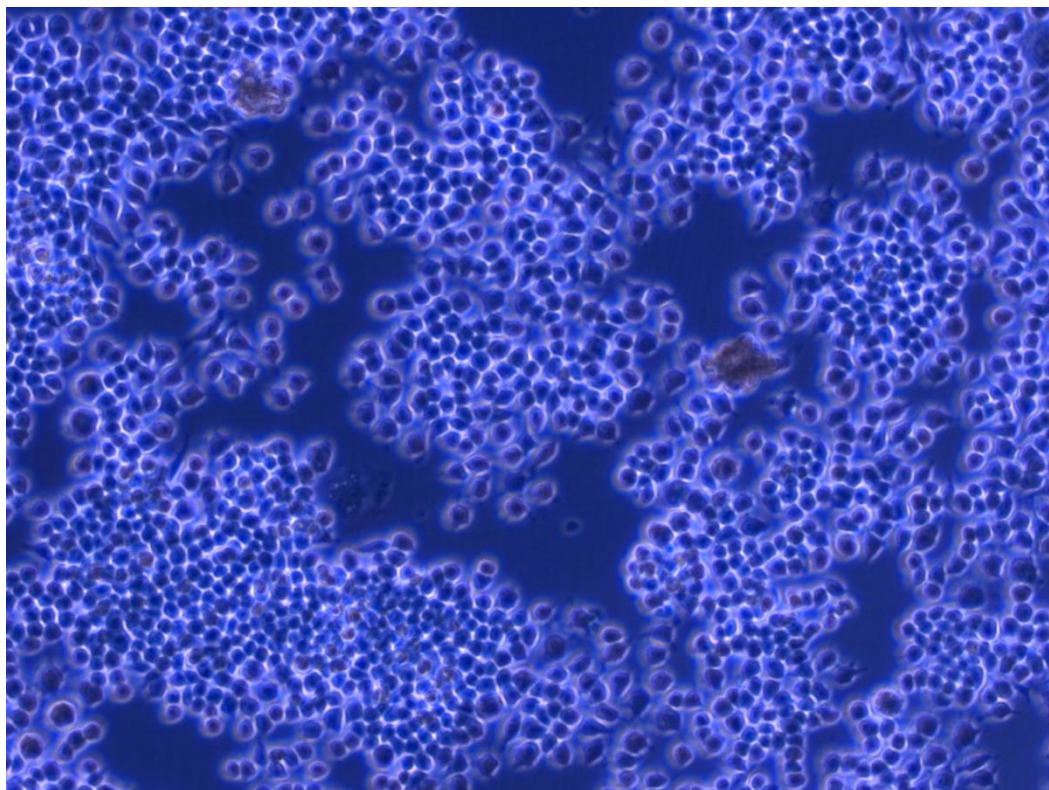
Slika 22. Kultura RAW 264.7 ćelija izloženih suspenziji AP1, uv. x 100, fazni kontrast.



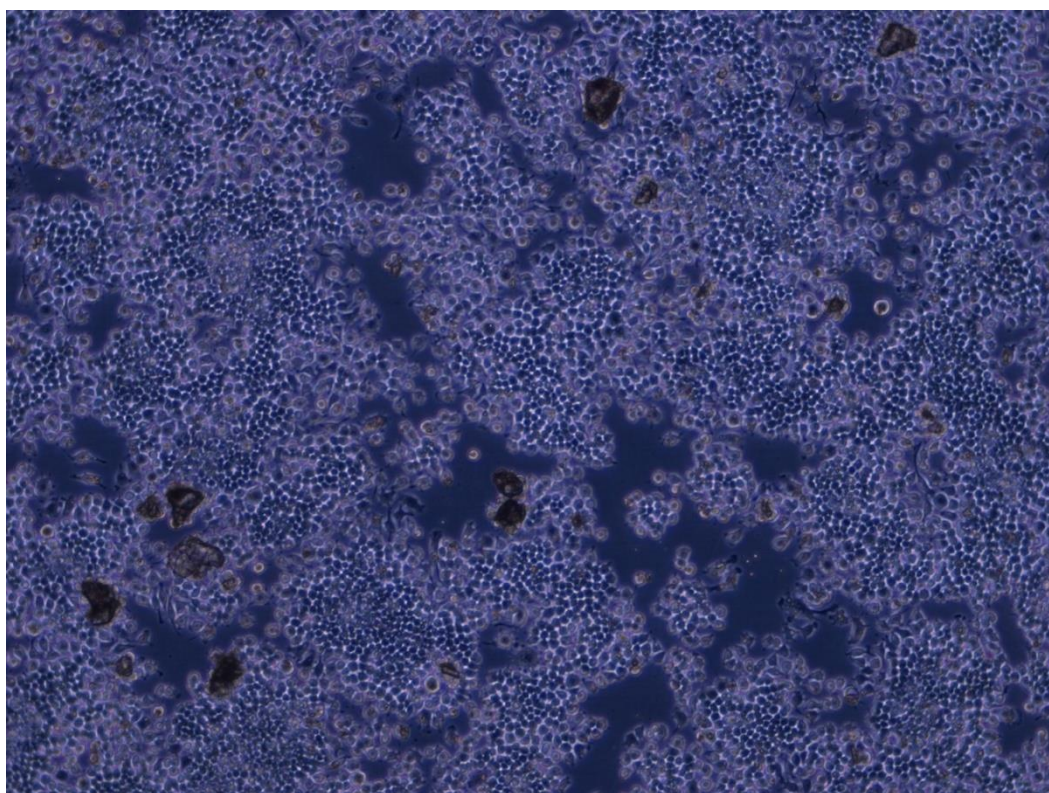
Slika 23. Kultura RAW 264.7 ćelija izloženih suspenziji AP1,
uv. x 200, fazni kontrast.



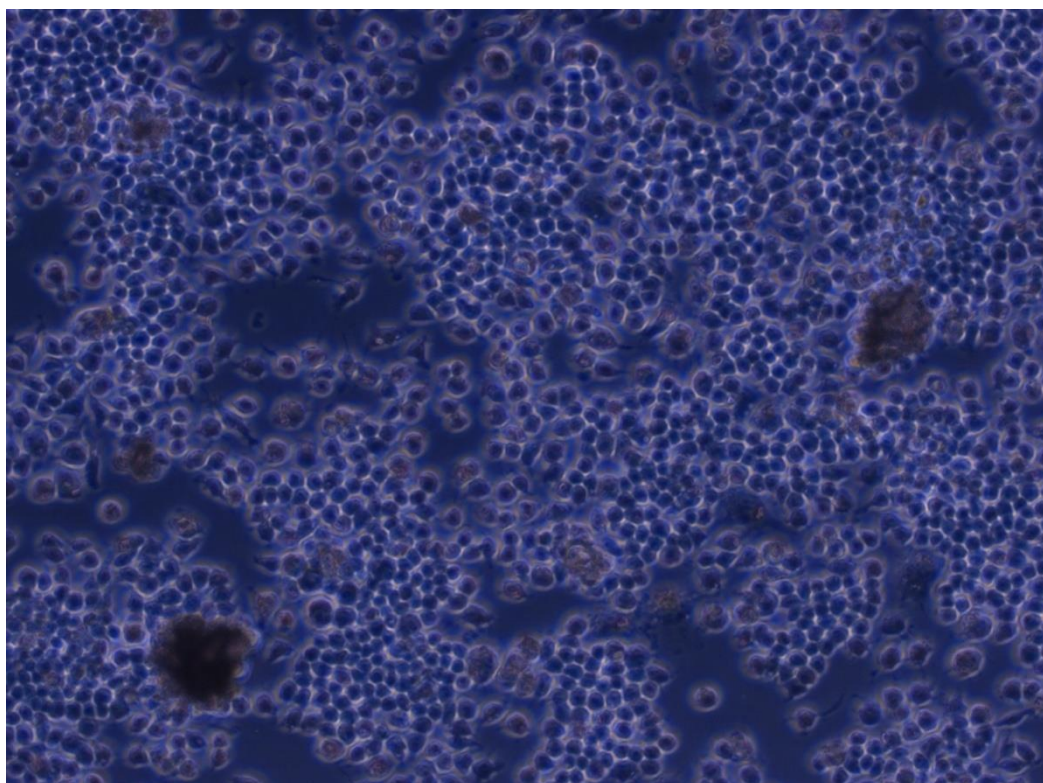
Slika 24. Kultura RAW 264.7 ćelija izloženih suspenziji AP2,
uv. x 100, fazni kontrast.



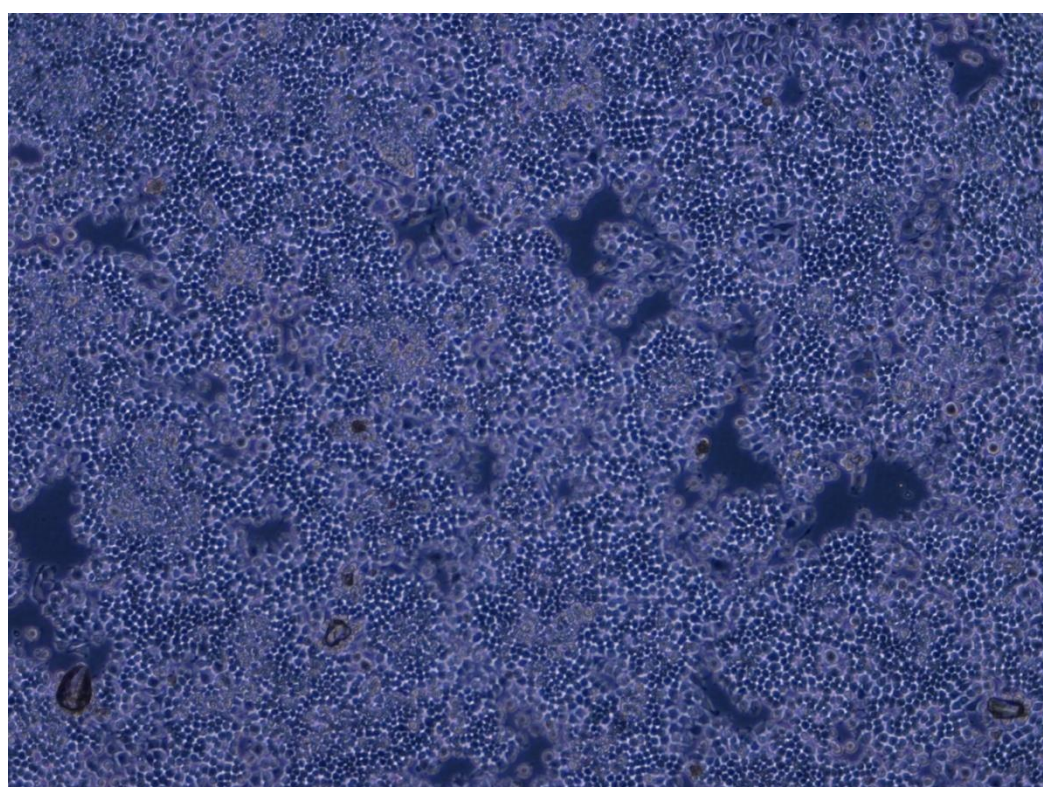
Slika 25. Kultura RAW 264.7 ćelija izloženih suspenziji AP2, uv. x 200, fazni kontrast.



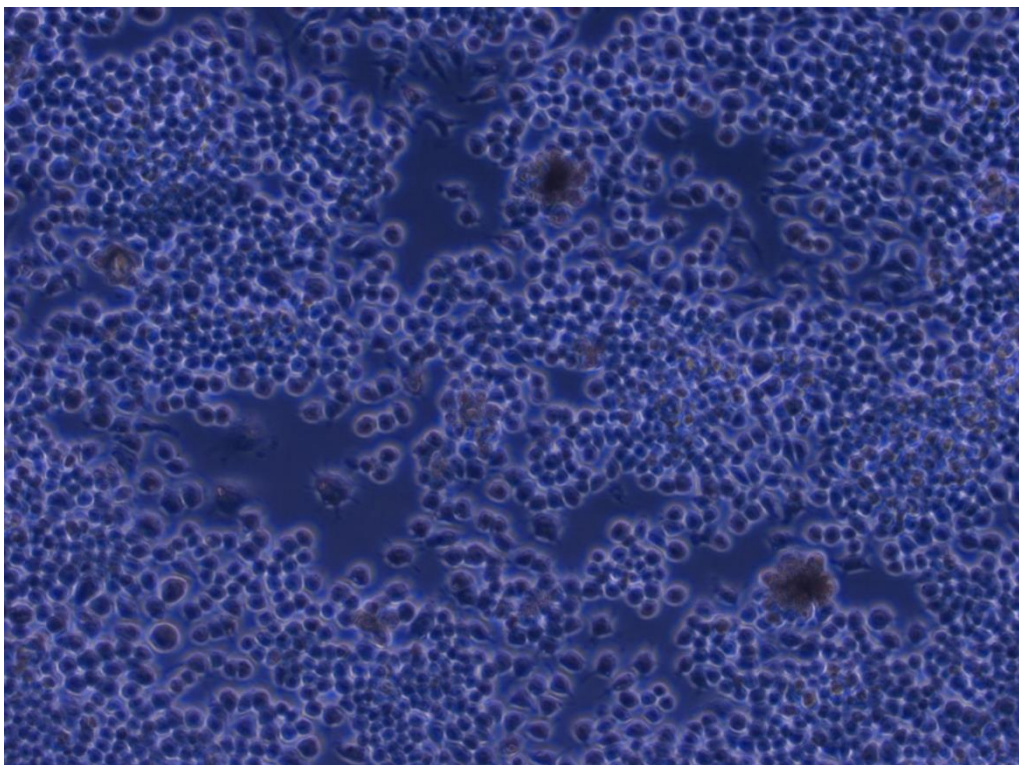
Slika 26. Kultura RAW 264.7 ćelija izloženih suspenziji SP1, uv. x 100, fazni kontrast.



Slika 27. Kultura RAW 264.7 ćelija izloženih suspenziji SP1, uv. x 200, fazni kontrast.



Slika 28. Kultura RAW 264.7 ćelija izloženih suspenziji SP2, uv. x 100, fazni kontrast.



Slika 29. Kultura RAW 264.7 ćelija izloženih suspenziji SP2, uv. x200, fazni kontrast.

6. DISKUSIJA

6.1. Klinički i biohemijski parametri u praćenju parodontalnog stanja kod pacijenata u terapiji fiksnim ortodontskim aparatima

6.1.1. Praćenje parodontalnog stanja preko kliničkih parametara kod pacijenata u terapiji fiksnim ortodontskim aparatima.

Parodontalna bolest je relativno česta u savremenom društvu. Poznato je da najčešće napreduje sporo i prolazi kroz više stadijuma pre nego što dođe do gubitka zuba kao glavne komplikacije bolesti. Ovo nameće potrebu za periodičnim praćenjem parodontalnog stanja i preduzimanjem potrebnih terapijskih i preventivnih mera kako bi se odložio nastanak ili usporila progresija bolesti.

Terapija fiksnim ortodontskim aparatima je široko rasprostranjena zbog svojih pozitivnih efekata u terapiji malokluzija, ali se od početka njene primene vodi polemika o njenom uticaju na parodont. Savremeni fiksni aparati su dizajnirani tako da proizvode blage i kontinuirane sile, ali ipak konstantno prisustvo bravica, otežana higijena i mehanička iritacija i dalje mogu štetno uticati na parodont. Većina studija ističe čestu pojavu zapaljenja gingive kod pacijenata u ortodontskoj terapiji, otuda i potreba da se tokom terapije periodično mere klinički parametri stanja gingive i na taj način na vreme preventivno deluje ukoliko za to postoji potreba.

U sprovedenom istraživanju postoji statistički značajno povećanje vrednosti kliničkih parametara PI, SBI i CPITN 3 i 6 meseci nakon početka ortodontske terapije u poređenju sa vrednostima pre terapije. Dobijeni rezultati ukazuju na postojanje i pogoršavanje zapaljenskog procesa na gingivi u toku prvih 6 meseci terapije, što je u skladu sa rezultatima drugih studija^{2, 6, 7, 177, 178}.

Interesantan je podatak da od 30 pacijenata koje smo obuhvatili studijom kod 8 nije zabeležen bilo kakav porast vrednosti PI u toku prvih 6 meseci terapije u odnosu na vrednosti pre početka terapije. To ukazuje na dobru oralnu higijenu i motivisanost pacijenata, bez obzira na novonastale okolnosti koje podrazumevaju prisustvo ortodontskih bravica na zubima. Ipak, kod većine pacijenata postoji trend pogoršavanja zapaljenja gingive na šta ukazuje porast vrednosti SBI, CPITN, kao i produkcije NO i RANKL u GST i NO u pljuvački u prvih 6 meseci ortodontske terapije.

Može se zaključiti da na zapaljensko stanje gingive pored prisustva dentalnog plaka utiču i drugi faktori kao što su: lepak za bravice, bond ili mehanička iritacija gingive. U sprovedenoj studiji Corbacho de Melo i saradnici (2012) ukazuju da pozicija bravice ispod ivice gingive može usloviti mehaničku iritaciju, retenciju plaka i uticati na pojavu i pogoršavanje gingivalnog zapaljenje².

6.1.2. Azot monoksid - medijator zapaljenja u toku ortodontske terapije

U okviru složenih procesa koštane remodelacije za vreme ortodontskog pomeranja zuba, postoje biomolekuli koji igraju glavnu ulogu u ovom procesu. Utvrđeno je da se sinteza NO i PGE2 može koristiti kao parametar mehanosenzitivnosti koštanih ćelija u okviru procesa remodelacije¹⁷⁹. Kada se inhibira iNOS, odgovor kosti na mehaničko opterećenje se smanjuje, što takođe upućuje na značaj uloge NO u početnoj fazi koštane remodelacije¹⁸⁰. Produkcija NO od strane primarnih koštanih ćelija direktno zavisi od veličine mehaničkog stresa, nastalog usled opterećenja. Koštane ćelije mogu da detektuju mehaničke signale preko strujanja i protoka fluida, a mehanička sila koja deluje na kost prouzrokuje kretanje intersticijalnog fluida kroz sisteme koštanih kanalića¹⁸¹.

Kako bi bolje razumeli ortodontsko pomeranje zuba i kako bi odredili optimalnu silu u terapiji sa biološkog aspekta, Nakago-Matsuo i saradnici (2009) su pratili produkciju NO u kulturi fibroblasta humanih periodontalnih ligamenata izloženih različitim nivoima hidrauličnog pritiska¹⁸². Došli su do rezultata koji ukazuju da je produkcija NO znatno veća u fibroblastima pod većim pritiskom, zbog čega bi NO mogao biti jedan od ključnih molekula u regulaciji pomeranja zuba.

Činjenica je da nema puno studija koje se bave ulogom NO u procesima koštane remodelacije za vreme ortodontskog pomeranja zuba. Shirazi i saradnici (2002) smatraju da je osnovna uloga NO u procesu regulacije formiranja sistema sekundarnih glasnika, u regulisanju funkcija osteoblasta i osteoklasta, kao i u regulaciji protoka krvi u zubnoj pulpi¹⁸³. Potvrđeno je da NO povećava mikrovaskularnu propustljivost kapilara, a samim tim igra ulogu u početnoj fazi koštane remodelacije. Kasnije, monociti iz krvnih sudova postaju baza za remodelaciju kosti¹⁸⁴. Visoka produkcija NO može i da inhibira resorpciju kosti preko inhibicije formiranja osteoklasta iz njihovih prekursora^{185, 186}.

Akin i saradnici (2004) su ispitivali uticaj NO na pomeranje zuba kod pacova u eksperimentu u kome su koristili N-omega-nitro-L-arginine metil ester (L-NAME) kao inhibitor NOS, a nitro-L-arginine (NLA) kao prekursor NOS¹⁸⁷. Došlo se do zaključka da je broj

multinuklearnih osteoklasta, howship-ovih lakuna, vaskularizacija i stepen pomeranja zuba bio statistički značajno veći u NLA u odnosu na L-NAME i kontrolnu grupu. Ovo je još jedan od dokaza značaja NO u ortodontskom pomeranju zuba.

Tan i saradnici (2009) tvrde da su upravo osteociti ćelije od najvećeg značaja za remodelaciju kosti¹⁸⁸. Oni sintetišu NO preko aktiviranja i ekspresije eNOS i iNOS. Njihova studija je posvećena ispitivanju ekspresije eNOS i iNOS u osteocitima za vreme ortodontskog pomeranja zuba. U ovoj studiji ispitivani su prvi gornji molari koji su pomoću federa pomerali mezijalno. Imunohistohemijsko bojenje je pokazalo da na strani vuče postoji statistički značajan porast broja eNOS pozitivnih osteocita, 24h nakon početka dejstva sile, dok je broj iNOS pozitivnih ćelija ostao približno isti. Na strani pritiska broj iNOS pozitivnih osteocita raste već nakon 6 sati, dok broj eNOS pozitivnih osteocita raste nakon 24h. Ovi rezultati ukazuju da eNOS igra ulogu u formiranju kosti na strani vuče, dok je aktivnost iNOS značajnija na strani pritiska.

Naši rezultati pokazuju statistički značajan porast produkcije NO u GST i pljuvački 3 i 6 meseci nakon početka ortodontske terapije. Pomenuti porast može ukazati na trend pogoršanja zapaljenskog stanja gingive kod ispitivanih pacijenata.

Ipak, prisutna je slaba je statistička korelacija između kliničkih parametara (PI, SBI i CPITN) i produkcije NO u pljuvački i GST u toku prvih 6 meseci ortodontske terapije. Ova činjenica možda može ukazati da na sintezu NO u pljuvački i GST kod ortodontskih pacijenata pored gingivalnog zapaljenja mogu uticati i drugi faktori vezani za prirodu ortodontske terapije i koštanu remodelaciju koja je prati.

Poznavanje uloge NO u procesima koštane remodelacije u toku ortodontske terapije je od velike važnosti za tumačenje dobijenih rezultata. Uzorci GST i pljuvačke su uvek uzimani mesec dana nakon prethodne kontrole i uvek pre sledećeg aplikovanja ortodontske sile. Na ovaj način smo pokušavali da smanjimo uticaj ortodontske sile i remodelacije kosti na produkciju NO i da se ista učini što više merom gingivalnog zapaljenja prouzrokovanog prisustvom bračvica u ustima.

Na osnovu dobijenih rezultata, očigledno je da postoje velike individualne varijacije u produkciji NO u GST i pljuvački kod ispitivanih pacijenata, čak i onih sa istim vrednostima kliničkih parametara stanja gingive. Zato se može izvesti zaključak da sinteza NO u pljuvački ili GST ne ukazuje direktno na zapaljenski status gingive.

Ima studija koje ukazuju da produkcija NO dostiže pik u GST već 1 sat nakon aplikovanja ortodontske sile, a zatim ima tendenciju opadanja. Yoo i saradnici (2004) su ispitivali značaj NO kao markera prenošenja signala za otpočinjanje koštane remodelacije, odnosno

inicijalno aktiviranje NO sintaze nakon remećenja periodontalnog ekvilibrijuma u smislu aplikovanja kontinuirane ortodontske sile¹⁸⁹. U ovom istraživanju, prvi molari pacova su pomerani mezijalno pomoću niktitanijumskih federa. Da bi ispitali aktivnost NOS, brojene su NADPH-dijaforaza pozitivne ćelije. Došli su do podataka da se aktivnost NOS značajno povećava na strani pritiska već 1 sat nakon početka dejstva sile, dok opada na strani vuče 3 i 6 sati od početka dejstva sile. Ovi rezultati ukazuju da je 1 do 3 sata sasvim dovoljno za početak pomeranja zuba usled dejstva lagane kontinuirane ortodontske sile na zub.

Ford i saradnici (2014) su sprovedeli istraživanje ortodontskih pacijenata uzrasta 11-18 godina kod kojih je planirana neekstrakciona terapija¹⁹⁰. Uzorci GST su skupljani iz gingivalnog sulkusa centralnih sekutića, prvih i drugih stalnih molara odmah, 1 sat i 3-4 dana nakon početka ortodontske terapije i aplikovanja početnih lukova koji proizvode laganu ortodontsku silu. Maksimalni drugi stalni molari nisu uključivani u aparat i služili su kao kontrolna grupa. Rezultati su ukazali da je nivo NO znatno veći u GST sa bukalne strane prvih stalnih molara, ali samo u početnoj fazi pomeranja zuba odnosno 1 sat nakon postavljanja ortodontskog luka.

U endotelnim ćelijama krvnih sudova dokazana je visoka aktivnost eNOS¹⁸⁶. Za vreme pomeranja zuba, NO je važan faktor odgovoran za relaksaciju glatkih mišića zidova krvnih sudova u komprimovanoj zoni periodoncijuma. Parodontalna hiperemija je u stvari inicijalna faza koja vodi u brojne kompleksne procese koštane remodelacije u okviru ortodontske terapije.

D'Attilio i saradnici (2004) su ispitali nivo eNOS i iNOS u gingivi pacijenata kod kojih je sprovedena terapija fiksnim ortodontskim aparatima¹⁹¹. U ovoj studiji su praćeni očnjaci, pri čemu je jedan usmeravan distalno nakon ekstrakcije premolara, dok je drugi očnjak služio kao kontrolni zub. Nakon 2 nedelje od primene ortodontske sile nivoi eNOS i iNOS su bili statistički značajno viši u gingivi distalno usmeravanog očnjaka u poređenju sa kontrolnim zubom. Autori ovu pojavu objašnjavaju time da gingiva i ako ne podleže resorpciji za vreme pomeranja zuba biva komprimovana na strani pritiska, a istegnuta na strani vuče, usled čeka dolazi do produkcije NO koji svakako utiče na ukupnu produkciju NO u GST.

Nilforoushan i Manolson (2009) su u ispitivanju sprovedenom na pacovima došli do rezultata da je ekspresija svih izoformi NOS povećana na strani vuče, dok je na strani pritiska kod postojanja bezćelijske zone smanjena¹⁹². U slučaju dejstva slabijih ortodontskih sila i nepostojanja bezćelijske zone, ekspresija NOS se povećava i na strani pritiska. Broj eNOS pozitivnih ćelija se nije menjao, ali je intenzitet bojenja bio značajno veći na strani vuče. Autori zaključuju da se za vreme ortodontskog pomeranja zuba pre svega menja obrazac ekspresije nNOS, kao i da su ćelije periodontalnog ligamenta, pre nego osteociti mehanosenzitivne ćelije koje putem sinteze NO kao signalnog molekula učestvuju u ranim fazama ortodontskog

pomeranja zuba. Uloga gingivalne eNOS, iNOS, kao i NO, u ranim fazama pomeranja zuba kod ljudi je očigledna.

Dva glavna tipa ćelija uključenih u remodelaciju kosti su osteoklasti, koji vrše resorpciju, i osteoblasti koji stvaraju novu kost. Osteoklasti su ćelije hematopoetskog porekla sa više jedara, a diferenciraju se iz prekursora linije monociti/makrofagi. Njihova diferencijacija se odvija pod uticajem specifičnih regulatora, uključujući c-fos, M-CSF, RANK, RANKL i OPG. Postoje studije koje ukazuju na ulogu NO u stimulaciji diferencijacije osteoklasta i koštane resorpcije^{193, 194}.

U toku ortodontske terapije, jača sila primenjena na zub koji se pomera može prouzrokovati nekrotične promene periodoncijuma na strani pritiska usled potpune opstrukcije krvnih sudova periodontalnog spacijuma. Tada dolazi do lokalnog porasta broja makrofaga i njima sličnih ćelija. Oni uklanjaju nekrotično tkivo i pri tom oslobađaju NO. Gaspirc i saradnici (2002) su dokazali povišenu aktivnost iNOS i u makrofagima gingive kod pacijenata tokom ortodontske terapije¹⁹⁵.

Chae i saradnici (1997) su sproveli studiju na mišjim osteoblastima-sličnim ćelijama i na ćelijama osteosarkoma i zaključili da je NO jako bitan regulator u procesu formiranja i resorpcije kosti, kao i da može biti uključen u patogenezu gubitka kosti kod bolesti povezanih sa aktivacijom citokina, kao što su reumatoidni artritis i parodontalna bolest¹⁹⁶.

Ima dosta studija koje su se bavile utvrđivanjem koncentracije NO u pljuvački kod osoba sa parodontalnom bolešću, ali dobijeni rezultati su protivurečni^{197, 198}. Ima autora koji tvrde da u slučaju parodontitisa postoje supstance koje suprimiraju produkciju NO, ali i da se ovaj molekul troši u borbi sa infektivnim agensima kao antibakterijski faktor¹⁹⁹.

Ukratko, produkcija NO u GST za vreme ortodontske terapije zavisi od aktivnosti više ćelijskih tipova u kosti, periodoncijumu i gingivi. Pored njegove glavne funkcije u početnoj fazi remodelacije, postoje i drugi komplikovani procesi koji bi mogli da utiču na koncentraciju NO u GST i pljuvački, možda čak i mesec dana nakon početka delovanja ortodontske sile. To bi moglo objasniti nedostatak statistički značajne korelacije između produkcije NO u GST i pljuvački i kliničkih parametara zapaljenskog stanja gingive u našoj studiji.

Sa druge strane, klinički parametri su korisni kao pokazatelji prisustva i posledica parodontalne bolesti, ali ne i njene aktivnosti. Zbog toga i ne postoji korelacija kliničkih parametara i produkcije NO u pljuvački i GST.

Zbog celokupne kompleksnosti koštane remodelacije u toku ortodontske terapije fiksnim aparatima potrebna su dalja istraživanja u cilju potvrđivanja uloge NO kao biomarkera gingivalnog zapaljenja kod ortodontskih pacijenata.

Postavlja se pitanje da li GST i pljuvačka mogu podjednako pouzdano služiti za praćenje parodontalnog stanja. Budući da je uzorkovanje pljuvačke mnogo jednostavnije u odnosu na GST i možemo je uzorkovati u znatno većim količinama. Određeni broj autora smatra da je GST, pouzdaniji izvor za identifikovanje i paćenje parodontalne bolesti. Sadržaj gingivalne krevikularne tečnosti je samo pod uticajem okolnog parodontalnog tkiva, dok je pljuvačka sačinjena prvenstveno od sekreta salivarnih žlezdi koje su takođe u stanju da produkuju NO. Dodatni razlog za manju pouzdanost pljuvačke i njenog dijagnostičkog potencijala u praćenju parodontalne bolesti je i to što pljuvačka može lako odražavati i sistemsko zapaljenjsko i infektivno stanje^{30, 197}.

Poorsattar Bejeh Mir i saradnici (2014) tvrde da je pljuvačka pouzdaniji medijum za procenu i praćenje zapaljenjskog stanja parodontcijuma na osnovu ukupnog NO, nitrita i nitrata u poređenju sa GST¹⁴. Oni takođe ističu da koncentracije ispitivanih parametara u pljuvački omogućavaju diferenciranje zdravih od pacijenata sa gingivitisom i parodontitisom.

Khorsavi Samani i saradnici (2012) su upoređivali pacijente sa zdravim parodontcijumom, umerenom i izraženom parodontalnom bolešću u odnosu na vrednosti NO u pljuvački¹⁹⁷. Ovi autori su došli do zaključka da nivo NO u pljuvački može biti značajno dijagnostičko sredstvo u proceni zapaljenjskog stanja parodontcijuma i da mogu poslužiti čak i za dijagnozu subkliničkih formi parodontalnog zapaljenja.

Naši rezultati ukazuju na statistički značajan porast produkcije NO u pljuvački i GST nakon 3 i 6 meseci terapije fiksnim ortodontskim aparatima. Dokazali smo takođe postojanje statistički značajne korelacije između ovih vrednosti pre, 3 i 6 meseci nakon početka ortodontske terapije.

Postoji pozitivna ali ne i statistički značajna korelacija promena vrednosti produkcije NO u pljuvački i GST 3 meseca, a jaka statistički značajna korelacija promena vrednosti koncentracija 6 meseci nakon početka terapije fiksnim ortodontskim aparatima. Sve ovo vodi ka zaključku da GST i pljuvačka mogu poslužiti kao pouzdani medijumi za praćenje parodontalnog zapaljenjskog stanja, što je u skladu sa stavovima²⁰⁰.

Ovi autori su ispitivali produkciju NO metodom po Griess-u u uzorcima GST i pljuvačke pacijenata sa gingivitisom i hroničnim parodontitisom i upoređivali sa vrednostima NO kod ispitanika sa zdravim parodontcijumom. Nije bilo značajnih razlika u rezultatima dobijenim u pljuvački u odnosu na GST.

Poorsattar Bejeh Mir i saradnici (2014) su dobili da je vrednost NO u GST najviša u grupi pacijenata sa gingivitisom, dok je najniži nivo primećen kod pacijenata sa uznapredovanim parodontitisom¹⁸. Ovo znači da NO ima najveći dijagnostički značaj u praćenju početnih

stadijuma bolesti, odnosno zapaljenja gingive. Kako bolest napreduje njegoa koncentracija u GST pada i više ne može biti pouzdan parametar za praćenje stadijuma upale i kompleksnosti bolesti parodonta.

Zaključci ove studije mogu biti od značaja u tumačenju naših rezultata obzirom da su praćene zapaljenske promene pre svega na gingivi.

6.1.3. Značaj TNF- α i RANKL u proceni stanja gingive u toku ortodontske terapije

Brojni citokini učestvuju u remodelaciji kosti tokom ortodontskog pomeranja zuba. Neki od njih olakšavaju proces koštane remodelacije u toku ortodontskog pomeranja stimulacijom ćelijske proliferacije i diferencijacije. Nekoliko studija je pokazalo da ortodontske sile indukuju ekspresiju TNF- α čime su skrenule pažnju na to da TNF- α ima važnu ulogu u ortodontskom pomeranju zuba^{23, 201}.

Ortodontski tretman dovodi do deformisanja ekstracelularnog matriksa parodonticijuma, što rezultuje promenama konfiguracije citoskeleta. Ren i saradnici (2007) su merili nivo proinflammatoryh citokina u GST za vreme ortodontskog pomeranja zuba i došli do zaključka da čim se aktivira mikrookolina periodontalnog tkiva, nekoliko ključnih proinflammatoryh citokina, među kojima je i TNF- α , se proizvode i pokreću kaskadu ćelijskih događaja²⁵. Faktor tumorske nekroze- α je tipičan medijator zapaljenja. On pokreće zapaljenski proces u periodoncijumu zuba na koji deluje sila, što će rezultovati dalje pokretanjem remodelacije kosti. U remodelaciji parodontalnog tkiva učestvuju i IL-1 β i IL-6. Sudeći po njihovoj koncentraciji u GST, produkcija sva tri interleukina se povećava već u početnoj fazi ovog procesa, 12 sati nakon početka dejstva ortodontskih sila. Tada ih leukociti i fibroblasti gingive, periodontalnog ligamenta i alveolarne kosti stvaraju kao medijatore zapaljenja²⁰².

Utvrđeno je da su TNF- α , IL-1 β i IL-6 osteotropni citokini. Oslobođeni na mestu zapaljenja, oni direktno ili indirektno reaguju sa ćelijama kosti, pokrećući procese njene resorpcije²⁰³. Smatra se da zapaljenjem-indukovanu resorpciju kosti uzrokuje lokalna stimulacija osteoklasta pokrenuta delovanjem citokina, oslobođenih iz zapaljenskih ćelija¹³². Proces se odvija složenim signalnim putem preko TNFR1 na osteoblastima. Ovaj receptor aktivira nuklearni transkripcioni faktor NF-Kappa B, pa je nazvan RANKL receptor aktivator NF- κ B liganda. Protein RANKL se vezuje za RANK receptore na zrelim osteoklastima. Vezujući se za ove receptore, RANKL aktivira zrele osteoklaste i njihove prekursore u pravcu osteoklastogeneze.

Uloga TNF- α kod ortodontskog pomeranja zuba je ispitivana na TNFR1- i TNFR2-deficitnim miševima. Pokazalo se da je veličina pomeranja zuba u grupi TNFR deficitnih mi-

ševa bila manja u odnosu na divlje tipove miševa. Ovo dokazuje da TNF- α igra značajnu ulogu u osteoklastogenezi indukovanoj mehaničkom silom i remodeliranju kosti za vreme ortodontskog pomeranja zuba²⁰⁴. *In vivo* istraživanja ukazuju da TNF- α takođe indukuje diferencijaciju osteoklasta iz makrofaga koštane srži^{132, 205}.

Dokazano je da ćelije periodontalnog ligamenta mogu da sintetišu i RANKL i OPG. Na kompresionoj strani PDL u fibroblastima i osteoblastima eksprimira se RANKL. Diferencijacija osteoklasta je u najvećoj meri regulisana baš od strane RANKL koji se produkuje kao rezultat reakcije na mehanički stres. Za vreme resorpcije alveolarne kosti brojni autori su detektovali RANKL u ćelijama PDL^{206–208}. Novija istraživanja su pokazala da ortodonska sila utiče na promenu nivoa OPG i RANKL, kao i da mehaničko istezanje deluje u smislu regulacije sinteze OPG i ekspresije RANKL.

U biološkim uzorcima ispitivanih pacijenata nije pronađen statistički značajan porast vrednosti koncentracije TNF- α u GST 3 i 6 meseci nakon početka terapije u odnosu na vrednosti pre početka terapije, dok postoji statistički značajan porast vrednosti koncentracije RANKL u GST 3 i 6 meseci nakon početka ortodontske terapije. Nije dokazana statistički značajna korelacija između vrednosti koncentracije TNF- α i RANKL u GST i praćenih kliničkih parametara, pre, 3 i 6 meseci nakon početka terapije.

Ovakvi rezultati se ne slažu sa rezultatima jednog broja autora u literaturi koji ukazuju na statistički značajnu korelaciju između koncentracije TNF- α i kliničkih parametara stanja gingive i parodontijuma^{143, 144, 148}. Sa druge strane, Yousefimanesh i saradnici¹⁴² i Gursoy i saradnici¹⁴³ nisu našli statistički značajnu razliku u koncentracijama TNF- α kod osoba sa zdravim parodontijumom i umereno izraženom periodontalnom bolešću.

U studiji koju su sproveli Gümüs i saradnici (2014) utvrđeno je da ne postoji statistički značajna razlika u koncentracijama TNF- α u pljuvački i serumu kod pacijenata sa akutnom i hroničnom parodontalnom bolešću, ali da je koncentracija TNF- α kod ovih pacijenata statički značajno veća u odnosu na zdrave pacijente¹⁴⁴. Postoje i dokazi da nehirurška parodontalna terapija statistički značajno umanjuje vrednosti proinflamatornih citokina, i TNF- α , u serumu pacijenata¹⁴⁸.

U tumačenju dobijenih rezultata mora se imati u vidu i uloga TNF- α u procesima koštane remodelacije za vreme pomeranja zuba. Direktnom aktivacijom zrelih osteoklasta ili stimulisanjem proliferacije i diferencijacije prekursora osteoklasta TNF- α snažno stimuliše resorpciju kosti¹³². On se vezuje za TNFR1 receptor na osteoblastima i aktivira nuklearni transkripcioni faktor NF-Kappa B. To izaziva produkciju RANKL od strane osteoblasta i nje-

govo vezivanje za RANK receptore na zrelim osteoklastima. RANKL aktivira zrele osteoklaste i njihove prekursore u pravcu osteoklastogeneze. Čim se ortodontskom silom aktivira mikrokolina periodontalnog tkiva, pokreće se čitava kaskada ćelijskih događaja. Produkcija TNF- α se povećava, a njegova koncentracija u GST raste već 12 sati nakon početka dejstva ortodontskih sila²⁵.

Mi smo uzorkoval GST pre početka terapije, kao i na redovnim kontrolama mesec dana nakon prethodne, a neposredno pre sledeće aplikacije ortodontske sile na zube i na taj način smo želeli da izbegnemo uticaj ortodontske sile na koncentracije TNF- α u GST. Rezultati studije Tian i saradnika (2006) su pokazali da u GST očnjaka koji su tretirani elastičnim „chain“-om (lancem), u toku njihove distalizacije, nivo TNF- α raste već 24 sata nakon postavljanja lanca i postiže najvišu vrednost 72 sata nakon početka dejstva sile²⁰⁹. Vrednosti su se vratile na normalu nakon 168 sati. Zaključak je da TNF- α igra važnu ulogu u započinjanju procesa alveolarne remodelacije i pomeranja zuba.

Nedostatak statistički značajnog povećanja vrednosti koncentracije TNF- α u GST u prvih 3 i 6 meseci terapije, pri čemu postoji statistički značajan porast vrednosti praćenih kliničkih parametara, ukazuje da ovaj citokin ne može služiti kao dovoljno pouzdan parametar za praćenje zapaljenskog stanja gingive kod ortodontskih pacijenata u terapiji fiksnim aparatima. Moguće je da kod pomenutih pacijenata postoje mehanizmi koji utiču na njegovu koncentraciju u GST i duže od 168 h. Nakon početka dejstva ortodontske sile, parodontalni sistem se brzo stabilizuje na novom nivou fiziološke homeostaze usled povratne regulacije rane faze proinflamatornih citokina. Završetak resorpcije kosti i otpočinjanje njenog ponovnog formiranja u sklopu ortodontske terapije i pomeranja zuba podrazumeva inhibiciju funkcije osteoklasta i stimulaciju aktivnosti osteoblasta. Ova faza remodeliranja kosti praćena je snižavanjem nivoa zapaljenskih citokina u GST. Broj ćelija koje produkuju TNF, IL-1 β i IL-6 kao i nivo pomenutih citokina u GST opadaju 7-10 dana od početka delovanja mehaničke sile²¹⁰, što se poklapa sa fazom reparacije parodontalnog tkiva. U tom periodu, uočen je porast nivoa TGF- β , IGF-I i II, faktora rasta fibroblasta (FGF), interleukina -10 (IL-10) i dr.^{211, 212} koji moduliraju reaktivnost osteoblasta i blokiraju resorpciju kosti.

Mikroorganizmi dentalnog plaka svakako stimulišu produkciju TNF- α u gingivalnom tkivu u okviru nespecifičnog sistema odbrane organizma. Nastaje stimulacija monocita i makrofaga, a oni zatim produkuju TNF- α ¹³⁶⁻¹³⁸. Njegov povišen nivo utiče na pojavu parodontalne bolesti preko stimulacije formiranja osteoklasta, regulacije matriks metaloproteina-

za i posledične destrukcije vezivnog tkiva, kao i preko pojačavanja imunog odgovora organizma na bakterijske patogene^{134, 135, 140}.

Postavlja se pitanje za buduća istraživanja, da li regenerativni procesi koji preovladavaju u parodontijumu 168 h nakon početka dejstva ortodontske sile mogu uticati na redukciju čak i TNF- α oslobođenog od strane makrofaga u vidu reakcije na prisustvo bakterija dentalnog plaka. Ova pojava bi u sprovedenom istraživanju razjasnila nepostojanje statistički značajnog porasta vrednosti TNF- α 3 i 6 meseci nakon početka dejstva ortodontske terapije.

Već već je pomenuto da u našoj studiji postoji statistički značajan porast koncentracije RANKL u GST tokom 6 meseci ortodontske terapije. U isto vreme, ne postoji statistički značajna korelacija vrednosti RANKL i praćenih kliničkih parametara pre, 3 i 6 meseci nakon početka terapije. Ovakvi rezultati ukazuju da vrednost koncentracije RANKL u GST možda može poslužiti kao parametar za praćenje zapaljenjskog stanja gingive i parodontijuma kod pacijenata u terapiji fiksnim ortodontskim aparatima. Ipak, zbunjuje nedostatak korelacije sa kliničkim parametrima, što ukazuje na potrebu za dodatnim istraživanjima koja bi potvrdila validnost ovog parametra u praćenju zapaljenjskog procesa na gingivi kod ovakvih pacijenata. Brojni autori su pokazali da postoji veza između RANKL i parodontalne bolesti u smislu regulaciji destrukcije kosti^{88, 89, 93, 95, 99}.

Konfokalna mikroskopska analiza pokazuje da su upravo T i B limfociti, a ne monociti ili fibroblasti osnovni izvor RANKL u koštanim lezijama kod parodontalne bolesti. Ipak više od 90% B limfocita iz ljudskog obolelog parodontalnog tkiva eksprimira RANKL, nasuprot T limfocitima od kojih samo 54% pokazuje ekspresiju ovog proteina⁹⁵. Postoje studije koje ukazuju na isti trend kod gingivalnog zapaljenja. T limfociti izolovani iz gingivalnog tkiva miševa imunizovanih na *A. aktinomicetem comitans* i *P. pneumotropica* uzgajani *in vitro* produkuju RANKL kao odgovor na prisustvo antigena obe bakterije. T limfociti iz gingive neimunizovanih miševa ne reaguju na prisustvo bakterijskih antigena. Možemo zaključiti da mikroorganizmi preko T limfocita indirektno utiču na ekspresiju RANKL, kako kod gingivalnog zapaljenja, tako i kod uznapredovalijih oblika parodontalnog oboljenja⁹⁹. Makrofagi nisu glavni izvor RANKL u parodontalnom tkivu u toku parodontalne bolesti, ali mogu da utiču na njegovu ekspresiju preko svojih (PRRs) receptora i preko citokina¹⁰⁸. Broj ćelija koje ekspimiraju ove receptore se povećava linearno u gingivalnom tkivu usled zapaljenja¹⁰². Makrofagi vrše fagocitozu i prepoznaju parodontalni patogen, a zatim pokreću seriju intracelularnih događaja koji vode ka aktivaciji NF- κ B i kulminiraju ekspresijom zapaljenjskih medijatora¹⁰⁸. Dokazano je da *A. aktinomicetem comitans* i *P. pneumotropica* preko T limfocita indirektno mogu uticati na ekspresiju RANKL kod osoba sa parodontalnom bolešću⁹⁹.

Postoji veliki broj studija koje potvrđuju da RANKL i OPG mogu biti detektovani u GST kao i da je nivo RANKL povišen, a nivo OPG snižen kod parodontalne bolesti ili za vreme ortodontskih tretmana⁹⁰⁻⁹². Rezultati ovih studija se poklapaju sa dobijenim rezultatima, mada u literaturi ne postoje istraživanja koja su se bavila utvrđivanjem mogućnosti praćenja zapaljenjskog stanja parodontalnog tkiva preko koncentracije RANKL kod pacijenata tretiranih fiksnim ortodontskim aparatima.

Pošto je u sprovedenoj studiji praćeno zapaljensko stanje gingive i parodontcinuma kod pacijenata sa fiksnim ortodontskim aparatima mora se uzeti u obzir i uloga RANKL u procesima koštane remodelacije. Kanzaki i saradnici (2004) su dokazali da ortodontsko pomeranje zuba kod pacova može biti usporeno ili ubrzano ubrizgavanjem OPG ili RANKL u parodontalno tkivo životinja²¹³.

Sharath i saradnici (2011) ističu da postoji veliki porast koncentracije različitih citokina u GST već 24 h nakon aplikovanja ortodontske sile⁸³. U studiji Nishijima i saradnika je utvrđeno da se koncentracija RANKL u GST drastično povećava na strani kompresije 24 h nakon aplikovanja sile, dok se koncentracija normalizuje u potpunosti već 168 h nakon primene sile⁹².

Ovi rezultati bi mogli poslužiti za tumačenje dobijenih rezultata, jer upućuju da RANKL pokreće resorpciju kosti pri ortodontskom pomeranju zuba, ali njegova koncentracija u GST u smislu ove funkcije opada veoma brzo. Budući da je u našoj studiji GST uzorkovana na redovnim kontrolama, mesec dana nakon prethodnog aplikovanja ortodontske sile na zube, koncentracija RANKL bi trebalo pre biti odraz zapaljenjskog stanja gingive, nego kompleksnih procesa remodelacije kosti.

Izgleda da funkcionalna koordinacija OPG-RANKL-RANK sistema igra ulogu ne samo u remodeliranju alveolarne kosti, već i u patološkoj resorpciji korena za vreme tretmana fiksnim ortodontskim aparatima usled dejstva preterano jakih sila. U tom slučaju, ćelije slične osteoklastima na površini korena zuba pri uklanjanju hijaline zone koja nastaje u PDL mogu greškom krenuti u resorpciju korena zuba^{85, 214-216}. Ćelije PDL u slučaju patoloških resorpcija korenova produkuju velike količine RANKL. U okviru prvih 6 meseci naše studije korišćene su isključivo blage ortodontske sile u cilju nivelacije zubnih lukova, tako da nije postojala mogućnost uticaja pomenutog mehanizma na koncentraciju RANKL u GST.

Možemo zaključiti da koncentracija RANKL u GST kod ortodontskih pacijenata može zavisiti od više ćelijskih tipova u kosti, periodoncijumu i gingivi. Iako je njegova glavna uloga u inicijalnoj fazi koštane remodelacije, moguće je da postoje procesi koji bi u većoj ili

manjoj meri mogli da utiču na njegovu koncentraciju u GST, čak i mesec dana nakon početka dejstva sile na zub.

Na ovaj način bi se moglo objasniti nepostojanje statistički značajne korelacije između koncentracije RANKL u GST i vrednosti kliničkih parametara stanja parodontijuma u sprovedenoj studiji. Sa druge strane, kao i pri tumačenju produkcije NO u GST i pljuvački možemo se pozvati na činjenicu da su klinički parametri odraz prisustva i posledica parodontalne bolesti za razliku od biohemijskih parametara koji reflektuju aktivnost bolesti, tako da se nepostojanje korelacije između koncentracije RANKL i praćenih kliničkih parametara može donekle očekivati.

Dobijeni rezultati ne pokazuju statistički značajnu korelaciju koncentracija TNF- α i RANKL pre početka, 3 i 6 meseci nakon početka ortodontske terapije. Za razliku od koncentracije RANKL koja statistički raste kako odmiče ortodontska terapija, ne postoji trend porasta koncentracije TNF- α u uzorcima GST 3 i 6 meseci nakon početka terapije. Ovo ukazuje da TNF- α izlučen u parodontijumu od strane makrofaga kao odgovor na bakterijske antigene nije glavni faktor koji utiče na produkciju, a samim tim i na koncentraciju RANKL u GST ortodontskih pacijenata.

Na osnovu svega pomenutog ne može se predložiti koncentracija TNF- α u GST kao marker koji bi mogao poslužiti za praćenje zapaljenskog stanja gingive i parodontijuma kod ortodontskih pacijenata tretiranih fiksnim aparatima. Statistički značajan porast koncentracije RANKL u GST, u prvih 6 meseci ortodontske terapije mereno uvek mesec dana nakon aplikacije ortodontske sile na zube može ukazati na rizik za komplikovanje i dalju progresiju postojećeg gingivalnog zapaljenja. Ovakvi rezultati ukazuju da iako je kod ispitivanih pacijenata najčešće prisutno samo gingivalno zapaljenje, a nisu prisutne komplikovanije forme parodontalnog zapaljenja, postoji rizik od RANKL posredovane osteoklastogeneze i posledične resorpcije kosti.

Treba imati u vidu i to da biološki procesi posredovani solubilnim RANKL ili RANKL vezanim za ćelijsku površinu mogu u potpunosti biti kompromitovani prisustvom OPG. Sistem RANK, RANKL i OPG je taj koji reguliše koštani metabolizam i biologiju osteoklasta. Humani fibroblasti iz periodontalnog ligamenta su sposobni da pod uticajem IL-1 β i TNF- α inhibiraju osteoklastogenezu na taj način što proizvode više OPG nego RANKL¹¹⁸. Treba imati u vidu da je ekspresija RANKL i OPG regulisana sistemskim i lokalnim stimulusima, uključujući hormone, medijatore zapaljenja, bakterijske produkte i imunosupresivne lekove⁸⁷. Neko od budućih istraživanja na ovu temu bi svakako trebalo pratiti odnos OPG/RANKL kod pacijenata sa fiksnim ortodontskim aparatima. Ovakvi rezultati bi upotpunili naše zaključke i dodatno rasve-

tilili ulogu RANKL kao mogućeg markera gingivalnog zapaljenja kod pacijenata u terapiji fiksnim ortodontskim aparatima .

Naši rezultati ukazuju na malu mogućnost da koncentracija TNF- α može služiti kao parametar za praćenju zapaljenskog stanja gingive i parodontcijuma kod pacijenata tretiranih fiksnim ortodontskim aparatima. Neophodna su dalja istraživanja kako bi se RANKL sa sigurnošću mogao predložiti kao biološki marker za praćenje parodontalnog stanja kod pacijenata u terapiji fiksnim aparatima.

6.2. Citotoksičnost materijala za lepljenje bravica

Citotoksičnost različitih vrsta dentalnih kompozita i njihovih komponenata je dokazana u brojnim studijama^{164, 217-219}. Naši rezultati pokazuju da postoji statistički značajan uticaj ekstrakata pogotovu AP materijala za lepljenje ortodontskih bravica na vijabilnost i proliferaciju ćelija u ispitivanim kulturama fibroblasta.

Smatra se da je glavni uzrok citotoksičnog efekta ortodontskih materijala za lepljenje otpuštanje rezidualnog, nepolimerizovanog monomera. Približno 5 do 10 % rezidualnog monomera se najčešće izliva u rastvor¹⁵⁷. Dokazano je da bisfenol A diglicidil dimetakrilat (Bis GMA) može biti glavni monomer koji se ispušta iz dentalnih kompozita i da je upravo on potencijalno najtoksičnija komponenta među derivatima dimetakrilata^{220, 221}.

Emmler i saradnici (2008) su pokazali da i degradacioni derivati dentalnih kompozita mogu prouzrokovati sličan toksičan efekat kao i monomer¹⁵⁹. Utvrđeno je da je period inkubacije materijala od 7 dana na temperaturi od 37 C° u ćelijskoj kulturi dovoljan da ukaže na maksimalni citotoksični potencijal pomenutih materijala.

Bond kompozitnih ortodontskih materijala za lepljenje se najčešće sastoji od dve glavne komponente, dva monomera: (bis-GAMA) i tritilen glikol metakrilata (TEGDMA). Ostali sastojci lepka su komonomeri, dietilen glikol dimetakrilat (DEGDMA), etilen glikol dimetakrilat (EGDMA), različiti fotoinicijatori, ko-inicijatori, ultravioletni absorberi, fotostabilizatori i pigmenti. Trilenglikol metakrilat smanjuje viskoznost samog materijala i omogućava na taj način njegovu lakšu aplikaciju na bravice²²².

Studije sprovedene na životinjama su ukazale da postoji zabrinjavajuća biodegradacija 2-hidroksi etil metakrilat HEMA/TEGDMA. Trilen glikol dimetakrilat se koristi kao sastavni deo bonda, a HEMA/TEGDMA kao sastavni deo osnovne mase kompozita. Oba molekula se lako oslobađaju iz materijala nakon aplikacije²²³. Istraživanja na životinjama su takođe pokazala da HEMA/TEGDMA koji su životinje progutale biva gotovo u potpunosti apsorbovan u

digestivnom traktu. Pomenuti molekuli lako difunduju kroz oralna tkiva i ostvaruju toksični efekat.

Hansel i saradnici (1998) su ispitivali uticaj ko-monomera TEGDMA i EGDMA na proliferaciju bakterija odgovornih za pojavu karijesa *in vitro* i došli su do zaključka da oba ko-monomera pospešuju bakterijsku proliferaciju²²⁴. Na životinjama je ispitivan i uticaj bondova na bazi bis-GMA/TEGDMA. Dokazano je da pomenuti materijali izazivaju u 50% slučajeva izražene alergijske reakcije²²⁵.

Trilen glikol metakrilat, bisfenol A diglicidil dimetakrilat i uretan dimetakrilat (UDMA) su hidrofobni monomeri, ali se često u kompozitima nalaze vezani za HEMA. Na taj način je olakšana difuzija pomenutih monomera, pošto HEMA povećava hidrofilne karakteristike materijala. U takvim uslovima, hidrofobni monomeri mogu dospeti do ćelija i oštetiti ih²²⁶. Sa druge strane, HEMA udružen sa etanolom izgleda da prouzrokuje još jača ćelijska oštećenja. Etanol povećava permeabilnost oralne sluzokože²²⁷, a samim tim i penetraciju molekula pomenutih monomera, kroz sluzokožnu barijeru. Lokalno primenjen etanol menja strukturu oralne sluzokože²²⁸.

Söhoel i saradnici (1994) su ispitivali ortodontske materijale za lepljenje na svinjama i došli do zaključka da oni mogu dovesti do ozbiljnih alergijskih reakcija, kako kod pacijenata, tako i kod ljudi koji rade sa ovim materijalima²²⁵. Oni navode da ovakav citotoksičan efekat može trajati i do dve godine nakon polimerizacije. Sa druge strane, smatra se da molekuli kao što je HEMA kada prodru u vezivno tkivo mogu iz njega biti uklonjeni lokalnom limfnom drenažom, što bi podrazumevalo smanjivanje upalnog procesa i regeneraciju vezivnog tkiva²²⁹. U slučaju ortodontskih pacijenata ovo je malo verovatno obzirom da se materijali za lepljenje veoma često dugo nalaze u blizini ili u samom gingivalnom sulkusu, ostvarujući direktan i dugotrajni kontakt sa epitelom koji ne keratinizuje, pa je i slabija barijera za prodor pomenutih molekula.

Naši rezultati pokazuju da period ekstrakcije, ne utiče bitnije na vijabilnost i proliferaciju ispitivanih fibroblasta za većinu zadatih koncentracija ekstrakata AP i SP materijala. Očigledno, smanjenje vijabilnosti i proliferacije ćelija u odnosu na dužinu ekstrakcije se kod SP materijala zapaža samo pri koncentraciji ekstrakta od 100%. Kada je reč o AP materijalima, smanjenje vijabilnosti i proliferacije ćelija u odnosu na dužinu ekstrakcije je primetno tek pri izloženosti 50%-nom rastvoru ekstrakata, dok su vrednosti vijabilnosti i proliferacije podjednako niske za sve periode ekstrakcije pri izloženosti 100% ekstraktu.

Ovi rezultati se delimično poklapaju sa rezultatima Ahrari i saradnika (2010) koji takođe navode blag citotoksični efekat SP ortodontskih materijala tek u sedmom danu eksperimen-

menta, što su objasnili mogućnošću da su materijali tada dodatno apsorbovali vodu, što je uslovalo otpuštanje monomera¹⁵⁸. Lassila i Vallittu (2001)²³⁰ i Jonke i saradnici (2008)¹⁴⁹ su došli do zaključka da citotoksičnost svih ispitivanih materijala opada od sedmog dana pre-inkubacije. Varijabilne trendove citotoksičnosti kroz ceo period trajanja eksperimenta primetili su i drugi autori^{218, 231}.

Malkoc i saradnici (2010) su ispitivali citotoksični efekat jednodnevnih ekstrakata pet različitih svetlosno polimerizujućih kompozita na L 929 fibroblastima²³². Došli su do zaključka da je 4 od 5 ispitivanih kompozita bezbedno za upotrebu, odnosno da nisu pokazali nikakvo citotoksično dejstvo. Ovi rezultati odstupaju od naših koji ukazuju da, iako nije drastično, kao kod dejstva ekstrakta AP materijala, postoji statistički značajno smanjenje vijabilnosti i proliferacije ćelija pri izloženosti 100%-nom, jednodnevnom ekstraktu SP materijala. Rezultati pomenute studije se ipak lako mogu dovesti u pitanje obzirom da neke studije, kao i naša, ukazuju na značajan citotoksični efekat 100% ekstrakta SP materijala tek nakon 7 dana ekstrakcije. Rezlike u dobijenim rezultatima svakako mogu biti posledica istraživanja pod različitim eksperimentalnim uslovima i na različitim eksperimentalnim modelima.

Dobijeni rezultati ukazuju da kod AP materijala postoji statistički značajno smanjenje vijabilnosti ispitivanih ćelija u odnosu na negativnu kontrolu pri izlaganju ćelija svim ispitivanim koncentracijama 1, 3- i 7-dnevnog ekstrakta. Postoji i statistički značajno smanjenje proliferacije ćelija u odnosu na kontrolu za sve periode ekstrakcije kod 25, 50 i 100%-nog ekstrakta. Sa druge strane, pri delovanju SP materijala postoji statistički značajno smanjenje vijabilnosti i proliferacije ćelija samo pri izlaganju ćelija 100%-nom ekstraktu bez obzira na dužinu ekstrakcije. Kod oba ispitivana materijala najveći pad vijabilnosti u odnosu na kontrolu je prisutan pri dejstvu 100% ekstrakta za sve periode ekstrakcije. Ovo nedvosmisleno upućuje da postoji toksični potencijal oba materijala, ali je on znatno veći kod upotrebe AP materijala, obzirom da se značajan pad vijabilnosti u odnosu na kontrolu javlja čak i pri razblaženju ekstrakta od 5%. Razlog za ovakve rezultate može donekle biti i sama tehnika izrade uzoraka AP materijala za dalju ekstrakciju. Polimerizacija AP materijala zahteva mešanje bonda i osnovne komponente kompozita usled čega se pri izradi pločica materijala za eksperiment utroši nešto veća količina bonda nego kod izrade pločica SP materijala. Brojne studije upravo ukazuju na toksični potencijal sastavnih komponenti bonda između ostalog i Bis GMA koji se nalazi i u našem ispitivanom bondu. Sa druge strane, višak primenjenog bonda lako curi iz polimerizovanog materijala i rastvara se u pljuvački i GST. Dobijeni rezultati se podudaraju sa rezultatima Ahrari i saradnika (2010)¹⁵⁸.

Nizak nivo citotoksičnosti SP materijala su dokazali i Tang i saradnici (1999)¹²⁵, a ovaj rezultat su objasnili smanjenim površinskim curenjem materijala. Quinlan i saradnici (2002) su dokazali negativnu vezu između nivoa svetlosne polimerizacije i citotoksičnosti kompozitnih materijala²³³. Heravi i saradnici (2013) su ispitivali citotoksičnost ortodontskih materijala za lepljenje bravica koji sadrže nano partikule titanijum dioksida (TiO₂)¹⁷². Lepkovi obogaćeni nano partikulama su dizajnirani kako bi smanjili demineralizaciju gleđi oko brave, po 10 pločica standardizovane dimenzije od konvencijalnog i nano kompozita je čuvano u specijalnom medijumu 1, 3, 5, 7 i 14 dana. Posle svake vremenske tačke ekstrakti su uzorkovani i svež medijum je dodavan za novu ekstrakciju. Ovako dobijenim ekstraktima su izlagane kulture humanih fibroblasta, kao i fibroblasta miševa L929. Viabilnost ćelija je merena MTT testom. Obe grupe kompozita su pokazale citotoksičnost na fibroblaste u kulturi, najveću nakon prvog dana ekspozicije, dok se toksičnost smanjivala sa vremenom ekstrakcija, što je razumljivo, jer u kasnijim terminima ekstrakcije ostaje manje materijal za eluciju. Kompoziti obogaćeni nano česticama su pokazali manju toksičnost u odnosu na klasične kompozite. Na L929 ćelijama su uočeni slični trendovi toksičnosti kao na humanim fibroblastima.

U sprovedenom ispitivanju dobijen je i podatak da usled izloženosti ćelija 5 i 10% jednodnevnom ekstraktu oba ispitivana materijala dolazi do rasta proliferacije u odnosu na kontrolnu grupu. To se može protumačiti time da jako niska koncentracija pomenutih monomera može da utiče stimulatивно na deobe fibroblasta u kulturi.

U sprovedenoj studiji smo pravili 5, 10, 25, 50%-na razblaženja ekstrakta AP i SP materijala pošto u usnoj duplji neminovno dolazi do eluiranja i razblaživanja ovih materijala pljuvačkom. Ipak, pljuvačka se ne zadržava dugo u usnoj duplji, već se gutanjem usmerava u dalje partije alimentarnog trakta. Uticaj razblaženih rastvora ekstrakta na vijabilnost i proliferaciju ćelija bi se zato mogao pre tumačiti u svetlu toksičnog sistemskog delovanja pomenutih materijala. Obzirom na blizinu materijala za lepljenje gingivalnom sulkusu i GST čija je količina jako mala, možda je podesnije obratiti pažnju samo na 50% i 100% koncentracije ekstrakta ispitivanih materijala pri diskutovanju njihovog toksičnog uticaja na tkivo gingive.

Budući da naši rezultati ukazuju na značajan pad vijabilnosti i proliferacije fibroblasta izloženih ovim koncentracijama ekstrakata, možemo zaključiti da AP i SP materijali predstavljaju faktor rizika za pojavu zapaljenja gingive.

Manja citotoksičnost pri razblaženjima od 25, 10 i 5% ispitivanih ekstrakata ukazuje da usled razblaženja pljuvačkom postoji manji rizik oštećenja i izazivanja zapaljenjskog procesa na ostalim delovima oralne mukoze. Oralna mukoza uz to i keratinizuje, pa je otpornija na štetne agense.

Treba imati u vidu da *in vitro* testovi citotoksičnosti ne reprezentuju u potpunosti citotoksične osobine materijala u usnoj duplji. Poznato je da je sluzokoža usne duplje generalno otpornija na toksične supstance u odnosu na ćelije iz kulture zbog slojeva keratina koji imaju zaštitno dejstvo²³⁴. Pri tumačenju naših rezultata moramo imati u vidu da usled anatomije zuba, kratke kliničke krune i tehnike lepljenja bravica višak materijala za lepljenje često može završiti u gingivalnom sulkusu. Epitel gingivalnog sulkusa ne keratinizuje, pa je samim tim i manje otporan, a materijal direktnim kontaktom i otpuštanjem rastvorljivih molekula monomera u GST svakako može dovesti do pojave zapaljenja gingive.

U literaturi nema istraživanja koja su se bavila uticajem ortodontskih materijala za lepljenje bravica na kulture makrofaga. Takođe nema ni istraživanja sposobnosti makrofaga da fagocituju sitne partikule ovih materijala.

Naši rezultati ukazuju da postoji veoma izraženo toksično dejstvo suspenzije AP materijala koncentracije 200 µg/ml (AP1) na kulturu makrofaga koji ulaze u apoptozu pre nego što uopšte fagocituju materijal. Posmatrano svetlosnim mikroskopom, uočljiva je masovna ćelijska apoptoza. Toksičan efekat je manje izražen, ali prisutan pri dejstvu suspenzije koncentracije 40 µg/ml (AP2). Sa druge strane, ne postoji toksično dejstvo suspenzije SP materijala na kulture makrofaga. Makrofagi fagocituju sitne partikule usitnjenog SP materijala. Posmatrano svetlosnim mikroskopom uočljive su i ćelije sa vezikulama koje verovatno produkuju zapaljenske medijatore kao reakciju na fagocitozu pomenutih materijala.

Ovakvi rezultati su u skladu sa rezultatima dobijenim na fibroblastima koje upućuju na izraženiji toksični efekat AP u odnosu na SP materijale.

U daljem toku istraživanja je potrebno ispitati koji zapaljenski medijatori se luče pri degranulaciji makrofaga kao odgovor na fagocitozu usitnjenih partikula SP materijala. Ovo bi mogla dodatno razjasniti dobijene rezultate vezane za produkciju NO, TNF-α i RANKL u GST za vreme trajanja ortodontske terapije fiksnim aparatima.

7. ZAKLJUČCI

1. U toku prvih 6 meseci ortodontske terapije fiksnim aparatima evidentno je pogoršanje gingivalnog zapaljenja, jer postoji statistički značajan porast vrednosti svih ispitivanih kliničkih parametara stanja parodonticijuma - PI, SBI, CPITN.
2. Nakon 3 i 6 meseci od početka ortodontske terapije postoji statistički značajan porast vrednosti NO_2+NO_3 i RANKL u GST, dok ne postoji porast vrednosti $\text{TNF-}\alpha$.
3. Nakon 3 i 6 meseci od početka ortodontske terapije postoji statistički značajan porast vrednosti NO_2+NO_3 u pljuvački.
4. Ne postoji ili postoji slaba korelacija između praćenih kliničkih parametara i biohemijskih parametara zapaljenja u GST pre početka, 3 i 6 meseci nakon početka ortodontske terapije.
5. Ne postoji ili postoji slaba korelacija između praćenih kliničkih parametara i produkcije NO u pljuvački pre početka, 3 i 6 meseci nakon početka ortodontske terapije.
6. Postoje statistički značajne, pozitivne i veoma izražene korelacije između koncentracije NO_2+NO_3 u GST i pljuvački, pre početka terapije, 3 i 6 meseci nakon početka terapije.
7. Koncentracije RANKL u GST i koncentracije NO_2+NO_3 u GST i pljuvački se mogu koristiti za praćenje zapaljenskog stanja gingive kod ortodontskih pacijenata u terapiji fiksnim aparatima.
8. Pljuvačka i GST mogu poslužiti kao pouzdani medijumi za praćenje zapaljenja gingive kod ortodontskih pacijenata.
9. Dentalni plak nije jedini faktor koji utiče na pojavu zapaljenja gingive i parodonticijuma kod ortodontskih pacijenata u terapiji fiksnim aparatima.
10. Ekstrakti AP materijala za lepljenje bravica imaju negativan uticaj na vijabilnost i proliferaciju L929 fibroblasta, čak i pri većem razblaženju, dok ekstrakti SP materijala imaju negativan uticaj na vijabilnost i proliferaciju ćelija samo pri dejstvu 100%-tnih ekstrakata.
11. Uticaj dužine inkubacije ekstrakta SP materijal na smanjenje vijabilnosti i proliferacije fibroblasta je očigledan samo pri dejstvu 100%-tnog ekstrakta.

12. Uticaj dužine inkubacije ekstrakta AP materijala na smanjivanje vijabilnosti ćelija je očigledan samo pri dejstvu 50%-nog ekstrakta.
13. U slučaju dejstva 100%-nog ekstrakta AP materijala ne postoji trend smanjenja vijabilnosti i proliferacije ćelija u odnosu na dužinu ekstrakcije. Vijabilnost i proliferacija ćelija su podjednako niski bez obzira na dužinu inkubacije.
14. Dokazano je veće citotoksično dejstvo AP u odnosu na SP materijale. Pri delovanju suspenzije AP materijala na kulturu makrofaga postoji izraženo toksično dejstvo i indukcija masovne apoptoze ćelija. Ne postoji toksično dejstvo suspenzije SP materijala na kulturu makrofaga. Prisutni su znaci fagocitoze usitnjenih partikula materijala od strane makrofaga, ali i puno intraćelularnih vezikula.
15. Usled blizine gingivalnom sulkusu i GST, materijali za lepljenje bravica predstavljaju faktor rizika za pojavu zapaljenja gingive.

8. LITERATURA

1. Ireland AJ, McDonald F. The orthodontic patient: treatment and biomechanics. Oxford; New York : Oxford University Press; 2003.
2. Corbacho de Melo MM, Cardoso MG, Faber J, Sobral A. Risk factors for periodontal changes in adult patients with banded second molars during orthodontic treatment. *Angle Orthod.* 2012; 82(2): 224–228.
3. Munksgaard EC, Hansen EK, Engen T, Holm U. Self-reported occupational dermatological reactions among Danish dentists. *Eur J Oral Sci.* 1996; 104: 396–402.
4. Geukens S, Goossens A. Occupational contact allergy to (meth)acrylates. *Contact Dermatitis* 2001; 44(3): 153–159.
5. Thornberg MJ, Riolo CS, Bayirli B, Riolo ML, Van Tubergen EA, Kulbersh R. Periodontal pathogen levels in adolescents before, during, and after fixed orthodontic appliance therapy. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2009; 135(1):95–08.
6. Alexander SA. Effects of orthodontic attachments in the gingival health of permanent second molars. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 1991; 100(4): 337–340.
7. Matic S, Ivanovic M, Nikolic P. Evaluation of preventive programme efficiency for patients with fixed orthodontic appliances. *Vojnosanit Pregl.* 2011; 68(3): 214–219.
8. Zia A, Khan S, Bey A Gupta ND, Mukhtar-Un-Nisar S. Oral biomarkers in the diagnosis and progression of periodontal diseases. *Biol Med.* 2011; 3(2):45–52.
9. Lindhe J, Lang NP, Karring T. *Clinical periodontology and implant dentistry.* 5th ed. Oxford: Blackwell Publishing Ltd; 2008. 2-12.
10. Karring T. Mitotic activity in the oral epithelium. *J Periodontal Res Suppl.* 1973; 13: 1–47.
11. Beertsen W, McCulloch CA, Sodek J. The periodontal ligament: a unique, multifunctional connective tissue. *Periodontol 2000.* 1997; 13: 20–40.
12. Bosshardt D.D, Selving KA. Dental cementum: the dynamic tissue covering of the rooth. *Periodontol 2000.* 1997; 13: 41–75.
13. Theilade E, Theilade J. Bacteriological and ultrastructural studies of developing dental plaque. In: McHugh WD, editor. *Dental plaque.* Edinburgh: Livingstone; 1970. p. 27–40.

14. Orlov S, Kojović D, Mirković B, Kesić LJ, Petrović D, Pešić Z. Oralna medicina, drugo dopunjeno izdanje. Niš: Sitomehanika. 2007. p. 67–76.
15. Page RC. The role of inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontal diseases. *J Periodont Res* 1991; 26: 230–242.
16. Kinane DF, Attström R; European Workshop in Periodontology group B. Advances in pathogenesis of periodontitis. Group B consensus report of the fifth European Workshop in Periodontology. *J Clin Periodontol*. 2005; 32 Suppl 6: 130–131.
17. Schätzle M, Loe H, Bürgin W, Anerud A, Boysen H, Lang NP. Clinical course of chronic periodontitis I. Role of gingivitis. *J Clin Periodontol*. 2003; 30: 887–901.
18. Poorsattar Bejeh-Mir A, Parsian H, Akbari Khoram M, Ghasemi N, Bijani A, Khosravi-Samani M. Diagnostic role of salivary and gcf nitrite, nitrate and nitric oxide to distinguish healthy periodontium from gingivitis and periodontitis. *Int J Mol Cell Med*. 2014; 3(3): 138–145.
19. Đajić D, Đukanović D, Stanić S, Kovačević K. Atlas parodontopatija. Beograd: Dečje novine; 1988.
20. Janošević M, Filipović G, Perović T, Radojčić J, Sošić M. Ortopedija vilica za strukovne zubne protetičare. Niš: Galaksija; 2014.
21. Demirović D. Osnovi fiksne tehnike u ortodontiji, prvo izdanje. Sarajevo: Stomatološki fakultet i Arka press; 2005. 43-46.
22. Krishnan V, Davidovitch Z. Cellular, molecular and tissue-level reaction to orthodontic force. *AM J Orthod Dentofacial Orthop*. 2006; 129: 469.e1-32.
23. Thilander B, Rygh P, Reitan K. Tissue reaction in orthodontics. In: Graber TM, Varnarsdall RL, eds. *Orthodontics. Current Principles and Techniques*, 3rd ed. St Louis: Mosby; 2000. p. 117–192.
24. Massela R, Meister M. Current concepts in the biology of orthodontic tooth movement. *Am J Orthod Dentofac Orthop*. 2006; 129: 458–468.
25. Ren Y, Hazemeijer H, de Haan B, Qu N, de Vos P. Cytokines profiles in crevicular fluid during orthodontic tooth movement of short and long durations. *J Periodontol* 2007; 78(3): 453–458.
26. Basset C, Becker O. Generation of electric potentials by bone in response to mechanical stress. *Science*. 1962; 137: 1063–1065.
27. Melsen B, Cattaneo PM, Dalstra M, Kraft DC. The importance of force levels in relation to tooth movement. *Semin Orthod*. 2007; 13: 220–233.

28. Wong DT. Salivary diagnostics powered by nano technologies, proteomics and genomics. *J Am Dent Assoc.* 2006; 137(3): 313–321.
29. Yamaguchi M. RANK/RANKL/OPG during orthodontic tooth movement. *Orthod Craniofac Res.* 2009; 12(2): 113–119.
30. Cimasoni G. Crevicular fluid updated. *Monogr Oral Sci.* 1983;12:III-VII,1–152.
31. Armitage GC. Analysis of gingival crevice fluid and risk of progression of periodontitis. *Periodontol 2000.* 2004; 34: 109–119.
32. Grenier G, Gagnon G, Grenier D. Detection of herpetic viruses in gingival crevicular fluid of patients suffering from periodontal diseases: prevalence and effect of treatment. *Oral Microbiol Immunol.* 2009; 24(6): 506–509.
33. Khosravi R, Tran SD, Lambert M, O'Loughlin J, Kâ K, Feine JS, Caron C, Tremblay A, Nicolau B. Adiposity and gingival crevicular fluid tumour necrosis factor-alpha levels in children. *J Clin Periodontol.* 2009; 36(4): 301–307.
34. Ren Y, Maltha JC, Van't Hof MA, Von Den Hoff JW, Kuijpers-Jagtman AM, Zhang D. Cytokine levels in crevicular fluid are less responsive to orthodontic force in adults than in juveniles. *J Clin Periodontol.* 2002; 29(8):757–762.
35. Ren Y, Maltha JC, Kuijpers-Jagtman AM. Tooth movement characteristics in relation to root resorption in young and adult rats. *Eur J Oral Sci.* 2007; 115(6): 449–453.
36. Dzink JL, Socransky SS, Haffajee AD. The predominant cultivable microbiota of active and inactive lesions of destructive periodontal diseases. *J Clin Periodontol.* 1988; 15(5): 316–323.
37. Slots J. The predominant cultivable organisms in juvenile periodontitis. *Scand J Dent Res.* 1976; 84(1): 1–10.
38. Dalaney JE, Ratzan SK, Kornman KS. Subgingival microbiota associated with puberty: studies of precircum- and postpubertal human females. *Pediatr Dent.* 1986; 8(4): 268–275.
39. Slots J, Feik D, Rams TE. *Actinobacillus actinomycetem comitans* and *bacteroides intermedius* in human periodontitis: age relationship and mutual association. *J Clin Periodontol.* 1990; 17(9): 659–662.
40. Brauner AW, Conrads G. Studies into the microbial spectrum of apical periodontitis. *Int Endod J.* 1995; 28(5): 244–248.
41. Petsios A, Nakou M, Manti F. Microflora in adult periodontitis. *J Periodont Res.* 1995; 30(5): 325–331.

42. Spratt DA, Greenman J, Schaffer AG. Capnocytophaga gingivalis: effects of glucose concentration on growth and hydrolytic enzyme production. *Microbiol.* 1996; 142(Pt 8): 2161–2164.
43. Nonnenmacher C, Mutters R, de Jacoby LF. Microbiological characteristics of subgingival microbiota in adult periodontitis, localized juvenile periodontitis and rapidly progressive periodontitis subjects. *Clin Microbiol Infect.* 2001; 7(4): 213–217.
44. Saito K, Takahashi N, Horiuchi H, Yamada T. Effects of glucose on formation of cytotoxic end-products and proteolytic activity of *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens* and *Porphyromonas gingivalis*. *J Periodontal Res.* 2001; 36(6): 355–360.
45. Türkkahraman H, Sayın M, Bozkurt Zuhul Yetkin Y, Kaya S, Önal S. Archwire ligation techniques, microbial colonization, and periodontal status in orthodontically treated patients. *Angle Orthod.* 2005; 75(2): 231–236.
46. Matejka M, Partyka L, Ulm C, Solar P, Sinzinger H. Nitric oxide synthesis is increased in periodontal disease. *J Periodont Res.* 1998; 33(8): 517–518.
47. Calver A, Collier J, Vallance P. Nitric oxide and cardiovascular control. *Exp Physiol.* 1993; 78(3): 303–326.
48. Liew FY. Nitric oxide in infectious and autoimmune diseases. *Ciba Found Symp.* 1995; 195: 234–239.
49. Ohashi M, Iwase M, Nagumo M. Elevated production of salivary nitric oxide in oral mucosal diseases. *J Oral Patol Med.* 1999; 28(8): 355–359.
50. Aakopov S, Kankanian A. Nitric oxide inactivation by polymorphonuclear leukocytes as a mechanism for the development of periodontal lesions. *Stomatologija (Mosk).* 1996; 75(2): 12–24. [in Russian]
51. Nathan C, Xie QW. Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. *Cell.* 1994, 78(6): 915–918.
52. Bodis S, Heregovoin A. Evidence for the release and possible neural regulation of nitric oxide in human saliva. *Biochem Biophys Res Commun.* 1993; 194(1): 347–350.
53. Gow AJ, Luchsinger BP, Pawloski JP, Singel DJ, Stamler JS. The oxyhemoglobin reaction of nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999; 96(16): 9027–9032.
54. Murad F. Regulation of cytosolic guanyl cyclase by nitric oxide: the NO – cyclic GMP signal transduction system. *Adv Pharmacol.* 1994; 26: 19–33.

55. Butler AR, Flitney FW, Williams DLH. NO, nitrosonium ions, nitroxide ions, nitrosothiols, and iron-nitrosyls in biology: a chemist's perspective. *Trends Pharmacol Sci.* 1995; 16(1): 18–22.
56. Murphy S. Production of nitric oxide by glial cells: regulation and potential roles in the CNS. *Glia.* 2000; 29(1):1–13.
57. White CS, Brock TA, Chang LY, Crapo J, Briscoe P, Ku D, Bradley WA, Gianturco SH, Gore J, Freeman BA, et al. Superoxide and peroxynitrite in atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994; 91(3): 1044–1048.
58. Stamler JS. Redox signalling: nitrosylation and related target interactions of nitric oxide. *Cell* 1994; 78(6): 931–936.
59. Van der Vliet A, Eiserich JP, O'Neill CA, Halliwell B, Cross CE. Tyrosine modification by reactive nitrogen species: a closer look. *Arch Biochem Biophys.* 1995; 319(2): 341–349.
60. Batista A, Silva T, Chun JH, Lara VS. Nitric oxide synthesis and severity of human periodontal disease. *Oral Dis.* 2002; 8(5): 254–260.
61. Poorsattar Nejeht Mir A. Focusing on Periodontitis as a vasculopathy: the therapeutic possibilities from the perspective of a dentistry student. *J Pharm Biomed Sci.* 2011; 13(2): 1–5.
62. Skaleric U, Gaspirc B, McCartney-Francis N, Masera A, Wahl SM. Proinflammatory and antimicrobial nitric oxide in gingival fluid of diabetic patients with periodontal disease. *Infect Immun.* 2006; 74(12): 7010–7013.
63. Gilmore TD. Introduction to NF- κ B: players, pathways, perspectives. *Oncogene.* 2006; 25(51): 6680–6684.
64. Karin M, Ben-Neriah Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- κ B activity. *Annu Rev Immunol.* 2000; 18: 621–663.
65. Senftleben U, Cao Y, Xiao G, Greten FR, Krähn G, Bonizzi G, Chen Y, Hu Y, Fong A, Sun SC, Karin M. Activation by IKK α of a second, evolutionary conserved, NF- κ B signaling pathway. *Science* 2001; 293(5534): 1495–1499.
66. Chandel NS, Trzyna WC, McClintock DS, Schumacker PT 2000. Role of oxidants in NF- κ B activation and TNF- α gene transcription induced by hypoxia and endotoxin. *J Immunol* 2000 165 (2): 1013–1021.
67. Schoppet M, Preissner KT, Hofbauer LC. RANK ligand and osteoprotegerin: paracrine regulators of bone metabolism and vascular function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002; 22(4): 549–553.

68. Katagiri T, Takahashi N. Regulatory mechanisms of osteoblast and osteoclast differentiation. *Oral Dis* 2002; 8: 147-159.
69. Tyrovola JB, Spyropoulos MN, Makou M, Perrea D. Root resorption and the OPG/RANKL/RANK system: a mini review. *J. Oral Sci.* 2008; 50(4): 367–376.
70. Takayanagi H. Inflammatory bone destruction and osteoimmunology. *J Periodontal Res.* 2005; 40(4): 287–293.
71. Lacey DL, Timms E, Tan HL, Kelly MJ, Dunstan CR, Burgess T, Elliott R, Colombero A, Elliott G, Scully S, Hsu H, Sullivan J, Hawkins N, Davy E, Capparelli C, Eli A, Qian YX, Kaufman S, Sarosi I, Shalhoub V, Senaldi G, Guo J, Delaney J, Boyle WJ. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell.* 1998; 93(2): 165–176.
72. Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Yamaguchi K, Kinosaki M, Mochizuki S, Tomoyasu A, Yano K, Goto M, Murakami A, Tsuda E, Morinaga T, Higashio K, Udagawa N, Takahashi N, Suda T. Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin /osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998; 95(7): 3597–3602.
73. Malyanker UM, Scatena M, Suchland KL, Yun TJ, Clark EA, Giachelli CM. Osteoprotegerin is an $\alpha\beta3$ -induced, NF- κ B-dependent survival factor for endothelial cells. *J Biol Chem.* 2000(28); 275: 20959–20962.
74. Kwon Bs, Wang S, Udagawa N, Haridas V, Lee ZH, Kim KK, Ok K, Greene J, Li Y, Su J, Gentz R, Aggarwal BB, Ni J. TR1 a new member of the tumor necrosis factor receptor family, induces fibroblast proliferation and inhibits osteoclastogenesis and bone resorption *FASEB J* 1998; 12: 845-854.
75. Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Luthy R, Nguyen HQ, Wooden S, Bennett L, Boone T, Shimamoto G, DeRose M, Elliott R, Colombero A, Tan HL, Trail G, Sullivan J, Davey E, Bucay N, Renshaw-Gregg L, Hughes ZM, Hill D, Pattison W, Campbell P, Boyle WJ. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell.* 1997; 89(2): 309–319.
76. Mizuno A, Murakami A, Nakagawa N, Yasuda H, Tsuda E, Morinaga T, Higashio K. Structure of the mouse osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) gene and its expression in embryogenesis. *Gene.* 1998; 215(2): 339–343.

77. Hofbauer LC, Khosla S, Dunstan CR, Lacey DL, Boyle WJ, Riggs BL. The roles of osteoprotegerin ligand in paracrine regulation of bone resorption. *J Bone Miner Res.* 2000; 15(1): 2-12.
78. Hofbauer LC, Khosla S, Dunstan CR, Lacey DL, Spelsberg TC, Riggs BL. Estrogen stimulates gene expression and protein production of osteoprotegerin in human osteoblastic cells. *Endocrinology.* 1999; 140(9): 4367–4370.
79. Lee SK, Lorenzo JA. Parathyroid hormone stimulates TRANCE and inhibits osteoprotegerin messenger ribonucleic acid expression in murine bone marrow cultures: correlation with osteoclast-like cell formation. *Endocrinology.* 1999; 140(8): 3552–3561.
80. Wan M, Shi X, Feng X, Cao X. Transcriptional mechanisms of bone morphogenetic protein-induced osteoprotegerin gene expression. *J Biol Chem.* 2001; 276(13): 10119–10125.
81. Colin-Osbody P, Rothe L, Anderson F, Nelson M, Maloney W, Osbody P. Receptor activator of NF- κ B, and osteoprotegerin expression by human microvascular cells, regulation by inflammatory cytokines, and role in human osteoclastogenesis. *J Biol Chem.* 2001; 276(23): 20659-20672.
82. Horowitz MC, Xi Y, Wilson K, Kacena MA. Control of osteoclastogenesis and bone resorption by members of TNF family of receptors and ligands. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2001; 1(1): 9–18.
83. Sharath KS, Mahesh K, Smitha PL. Cytokines and Orthodontic tooth movement. *J Dent Sci Res* 2011; 2(1): 132–141.
84. Yano K, Tsuda N, Kobayashi F, Goto M, Harada A, Ikeda K, Higashio K, Yamada Y. Immunological characterization of circulating osteoprotegerin/osteoclastogenesis inhibitory factor: increased serum concentrations in postmenopausal women with osteoporosis. *J Bone Miner Res.* 1999; 14(4): 518–527.
85. Oshiro T, Shibasaki Y, Martin J, Sasaki T. Immunolocalization of vacuolar type H-ATPase, Cathepsin K, matrix metalloproteinase-9, and receptor activator of Nfkappa B ligand in odontoclasts during physiological root resorption of human deciduous teeth. *Anat Rec.* 2001; 264: 305–311.
86. Uitto VJ. Gingival crevice fluid-an introduction. *Periodontol* 2000. 2003; 31: 9–11.
87. Lerner UH. New molecules in the tumor necrosis factor ligand and receptor superfamilies with importance for physiological and pathological bone resorption. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2004; 15(2): 64–81.

88. Lerner UH. Inflammation-induced bone remodeling in periodontal disease and the influence of postmenopausal osteoporosis. *J Dent Res.* 2006; 85(7): 596–607.
89. Firestein GS. Evolving concepts of reumatoid arthritis. *Nature.* 2003; 42(6837): 356–361.
90. Taubman MA, Valverde P, Han X, Kawai T. Immune response: the key to bone resorption in periodontal disease. *J Periodontol.* 2005; 76(11 Suppl): 2033–2041.
91. Mogi M, Ootogoto J, Ota N, Togari A. Differential expression of RANKL and osteoprotegerin in gingival crevicular fluid of patients with periodontitis. *J Dent Res* 2004; 83(2): 166–169.
92. Nishijima Y, Yamaguchi M, Kojima T, Aihara N, Nakajima R, Kasai K. Levels of RANKL and OPG in gingival crevicular fluid during orthodontic tooth movement and effect of compression force on releases from periodontal ligament cells in vitro. *Orthod Craniofac Res.* 2006; 9(2): 63–70.
93. Baltacıoğlu E, Kehribar MA, Yuva P, Alver A, Atagün OS, Karabulut E, Akalın FA. Total oxidant status and bone resorption biomarkers in serum and gingival crevicular fluid of patients with periodontitis. *J Periodontol.* 2014; 85(2): 317–326.
94. Graves DT, Oates T, Garlet GP. Review of osteoimmunology and the host response in endodontic and periodontal lesions. *J Oral Microbiol.* 2011; 17: 3.
95. Kawai T, Matsuyama T, Hosokawa Y, Makihira S, Seki M, Karimbux NY, Goncalves RB, Valverde P, Dibart S, Li YP, Miranda LA, Ernst CW, Izumi Y, Taubman MA. B and T lymphocytes are the primary sources of RANKL in the bone resorptive lesion of periodontal disease. *Am J Pathol.* 2006; 169(3): 987–998.
96. Kawai T, Shimauchi H, Eastcott JW, Smith DJ, Taubman MA. Antigen direction of specific T-cell clones into gingival tissues. *Immunology.* 1998; 93(1): 11–19.
97. Kawai T, Eisen-Lev R, Seki M, Eastcott JW, Wilson ME, Taubman MA. Requirement of B7 costimulation for Th1-mediated inflammatory bone resorption in experimental periodontal disease. *J Immunol.* 2000; 164(4): 2102–2109.
98. Taubman MA, Kawai T. Involvement of T-lymphocytes in periodontal disease and in direct and indirect induction of bone resorption. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2001; 12(2): 125–135.

99. Kawai T, Paster BJ, Komatsuzawa H, Ernst CW, Goncalves RB, Sasaki H, Ouhara K, Stashenko PP, Sugai M, Taubman MA. Cross-reactive adaptive immune response to oral commensal bacteria results in an induction of receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL)-dependent periodontal bone resorption in a mouse model. *Oral Microbiol Immunol*. 2007; 22(3): 208–215.
100. Baker PJ, Dixon M, Evans RT, Dufour L, Johnson E, Roopenian DC. CD4(+) T cells and the proinflammatory cytokines gamma interferon and interleukin-6 contribute to alveolar bone loss in mice. *Infect Immun*. 1999; 67(6): 2804–2809.
101. Kamiya S, Okumura M, Chiba Y, Fukawa T, Nakamura C, Nimura N, Mizuguchi J, Wada S, Yoshimoto T. IL-27 suppresses RANKL expression in CD4(+) T cells in part through STAT3. *Immunol Lett*. 2011; 138(1): 47–53.
102. Han X, Kawai T, Eastcott JW, Taubman MA. Bacterial-responsive B lymphocytes induce periodontal bone resorption. *J Immunol*. 2006; 176(1): 625–631.
103. Han X, Lin X, Seliger A. R, Eastcott J, Kawai T, Taubman M A. Expression of receptor activator of nuclear factor- κ B ligand by B cells in response to oral bacteria. *Oral Microbiol Immunol*. 2009; 24(3): 190–196.
104. Fumoto T, Takeshita S, Ito M, Ikeda K. Physiological functions of osteoblast lineage and T cell-derived RANKL in bone homeostasis. *J Bone Miner Res* 2014; 29(4): 830–842.
105. Atkins GJ, Kostakis P, Pan B, Farrugia A, Gronthos S, Evdokiou A, Harrison K, Findlay DM, Zannettino AC. RANKL expression is related to the differentiation state of human osteoblasts. *J Bone Miner Res*. 2003; 18(6): 1088–1098.
106. Nakashima T, Hayashi M, Fukunaga T, Kurata K, Oh-Hora M, Feng JQ, Bonewald LF, Kodama T, Wutz A, Wagner EF, Penninger JM, Takayanagi H. Evidence for osteocyte regulation of bone homeostasis through RANKL expression. *Nat Med*. 2011; 17(10): 1231–1234.
107. Xiong J, O'Brien CA. Osteocyte RANKL: new insights into the control of bone remodeling. *J Bone Min Res*. 2012; 27(3): 499–505.
108. Gordon S. Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response. *Cell*. 2002; 111(7): 927–930.
109. Hajishengallis G. Toll gates to periodontal host modulation and vaccine therapy. *Periodontology 2000*. 2009; 51: 181–207.

110. Burns E, Bachrach G, Shapira L, Nussbaum G. Cutting edge: TLR2 is required for the innate response to *Porphyromonas gingivalis*: activation leads to bacterial persistence and TLR2 deficiency attenuates induced alveolar bone resorption. *J Immunol.* 2006; 177(12): 8296–8300.
111. Folwaczny M, Glas J, Török HP, Limbersky O, Folwaczny C. Toll-like receptor (TLR) 2 and 4 mutations in periodontal disease. *Clin Exp Immunol.* 2004; 135(2):330–335.
112. Baer MT, Huang NF, Gibson FC 3rd. Scavenger receptor A is expressed by macrophages in response to *Porphyromonas gingivalis*, and participates in TNF- α expression. *Oral Microbiol Immunol.* 2009; 24(6): 456–463.
113. O' Gradaigh D, Ireland D, Bord S, Compston JE. Joint erosion in rheumatoid arthritis: interactions between tumour necrosis factor α , interleukin 1, and receptor activator of nuclear factor κ B ligand (RANKL) regulate osteoclasts. *Ann Rheum Dis.* 2004; 63(4): 354–359.
114. Graves DT, Oskoui M, Volejnikova S, Naguib G, Cai S, Desta T, Kakouras A, Jiang Y. Tumor necrosis factor modulates fibroblast apoptosis, PMN recruitment, and osteoclast formation in response to *P. gingivalis* infection. *J Dent Res.* 2001; 80(10):1875–1879.
115. Assuma R, Oates T, Cochran D, Amar S, Graves DT. IL-1 and TNF antagonists inhibit the inflammatory response and bone loss in experimental periodontitis. *J Immunol.* 1998; 160(1): 403–409.
116. Kwan Tat S, Padrines M, Théoleyre S, Heymann D, Fortun Y. IL-6, RANKL, TNF- α /IL-1: interrelations in bone resorption pathophysiology. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2004; 15(1): 49–60.
117. Fujihara R, Usui M, Yamamoto G, Nishii K, Tsukamoto Y, Okamatsu Y, Sato T, Asou Y, Nakashima K, Yamamoto M. Tumor necrosis factor- α enhances RANKL expression in gingival epithelial cells via protein kinase A signaling. *J Periodontal Res.* 2014; 49(4): 508–517.
118. Wada N, Maeda H, Yoshimine Y, Akamine A. Lipopolysaccharide stimulates expression of osteoprotegerin and receptor activator of NF- κ B ligand in periodontal ligament fibroblasts through the induction of interleukin-1 beta and tumor necrosis factor- α . *Bone.* 2004; 35(3):629–635.

119. de Vries TJ, Schoenmaker T, Wattanaroonwong N, van den Hoonaard M, Nieuwenhuijse A, Beertsen W, Everts V. Gingival fibroblasts are better at inhibiting osteoclast formation than periodontal ligament fibroblasts. *J Cell Biochem.* 2006; 98(2):370–382.
120. Chen B, Wu W, Sun W, Zhang Q, Yan F and Xiao Y. RANKL expression in periodontal disease: where does RANKL come from? *Biomed Res Int.* 2014; 2014: 731039.
121. Balkwill F. Cytokines and cytokine receptors. In: Roitt I, Brostoff J, Male D, editors. *Immunology.* (6th ed). London: C.V. Mosby; 2001.
122. Billiau A, Vandekerckhove F. Cytokines and their interactions with other inflammatory mediators in the pathogenesis of sepsis and septic shock. *Eur J Clin Invest.* 1991; 21(6): 559–573.
123. Cerami A. Inflammatory cytokines. *Clin Immunol Immunopathol.* 1992; 62 (1 Pt 2): S3–10.
124. Baumann H, Gauldie J. The acute phase response. *Immunol Today.* 1994; 15(2): 74–80.
125. Tang AT, Liu Y, Bjorkman L, Ekstrand J. In vitro cytotoxicity of orthodontic bonding resins on human oral fibroblasts. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 1999; 116(2): 132–138.
126. Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P. Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ.* 2003; 10(1): 45–65.
127. <http://www.reading.ac.uk/cellmigration/apoptosis.htm>
128. Pobezinskaya YL, Choksi S, Morgan MJ, Liu ZG. The adaptor protein TRADD is essential for TNF-like ligand 1A/death receptor 3 signaling. *J Immunol.* 2011; 186(9): 5212–5216.
129. Gaur U, Aggarwal BB. Regulation of proliferation, survival and apoptosis by members of the TNF superfamily. *Biochem Pharmacol.* 2003; 66(8): 1403–1408.
130. Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell.* 2001; 104(4): 487–501.
131. Nishimura F, Iwamoto Y, Mineshiba J, Shimizu A, Soga Y, Murayama Y. Periodontal disease and diabetes mellitus: the role of tumor necrosis factor-alpha in a 2 way relationship. *J Periodontol.* 2003; 74(1): 97–102.

132. Azuma Y, Kaji K, Katogi R, Takeshita S, Kudo A. Tumor necrosis factor- α induces differentiation of and bone resorption by osteoclasts. *J Biol Chem.* 2000; 275(7): 4858–4864.
133. Rossomando EF, Kennedy JE, Hadjimichael J. Tumour necrosis factor α in gingival crevicular fluid as a possible indicator of periodontal disease in humans. *Arch Oral Biol* 1990; 35(6): 431–434
134. Gokul K, Faizuddin M, Pradeep AR. Estimation of the level of tumor necrosis factor- α in gingival crevicular fluid and serum in periodontal health & disease: A biochemical study. *Indian J Dent Res.* 2012; 23(3): 348–352.
135. Graves DT, Cochran D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction. *J Periodontol.* 2003; 74(3): 391–401.
136. Kjeldsen M, Holmstrup P, Lindemann RA, Bendtzen K. Bacterial-stimulated cytokine production of peripheral mononuclear cells from patients of various periodontitis categories. *J Periodontol.* 1995; 66(2): 139–44.
137. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol.* 1998; 25(2): 134–144.
138. Zambon JJ. Periodontal diseases: Microbial factors. *Ann Periodontol.* 1996; 1(1): 879–925.
139. Kobayashi K, Takahashi N, Jimi E, Udagawa N, Takami M, Kotake S, Nakagawa N, Kinoshita M, Yamaguchi K, Shima N, Yasuda H, Morinaga T, Higashio K, Martin TJ, Suda T. Tumor necrosis factor α stimulates osteoclast differentiation by a mechanism independent of the ODF/RANKL-RANK interaction. *J Exp Med.* 2000; 191(2): 275–285.
140. Graves DT, Liu R, Alikhani M, Al-Mashat H, Trackman PC. Diabetes-enhanced inflammation and apoptosis—impact on periodontal pathology. *J Dental Res.* 2006; 85(1): 15–21.
141. Nagler RM, Hershkovich O, Lischinsky S, Diamond E, Reznick AZ. Saliva analysis in the clinical setting: revisiting an under used diagnostic tool. *J. Investig Med.* 2002; 50(3): 214–225.
142. Yousefimanesh H, Maryam R, Mahmoud J, Boroujerdnia Mehr GB, Mohsen T. Evaluation of salivary tumor necrosis factor- α in patients with the chronic periodontitis: A case-control study. *J Indian Soc Periodontol.* 2013; 17(6): 737–740.

143. Gursoy UK, Könönen E, Uitto VJ, Pussinen PJ, Hyvärinen K, Suominen-Taipale L, Knuuttila M. Salivary interleukin-1beta concentration and the presence of multiple pathogens in periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2009; 36(11): 922–927.
144. Gümüş P, Nizam N, Lappin DF, Buduneli N. Saliva and serum levels of B-cell activating factors and tumor necrosis factor- α in patients with periodontitis. *J Periodontol.* 2014; 85(2): 270–280.
145. Genco RJ, Grossi SG, Ho A, Nishimura F, Murayama Y. A proposed model linking inflammation to obesity, diabetes, and periodontal infections. *J Periodontol.* 2005; 76(11 Suppl): 2075–2084.
146. Khosravi R, Ka K, Huang T, Khalili S, Nguyen BH, Nicolau B, Tran SD. Tumor necrosis factor- α and interleukin-6: potential interorgan inflammatory mediators contributing to destructive periodontal disease in obesity or metabolic syndrome. *Mediators Inflamm.* 2013; 2013: 728987.
147. Dağ A, Firat ET, Kadiroğlu AK, Kale E, Yılmaz ME. Significance of elevated gingival crevicular fluid tumor necrosis factor-alpha and interleukin-8 levels in chronic hemodialysis patients with periodontal disease. *J Periodontal Res.* 2010; 45(4): 445–450.
148. Koppolu P, Durvasula S, Palaparthi R, Rao M, Sagar V, Reddy SK, Lingam S. Estimate of CRP and TNF-alpha level before and after periodontal therapy in cardiovascular disease patients. *Pan Afr Med J.* 2013; 15: 92. doi: 10.11604/pamj.2013.15.92.2326
149. Jonke E, Franz A, Freudenthaler J, König F, Bantleon HP, Schedle A. Cytotoxicity and shear bond strength of four orthodontic adhesive systems. *Eur J Orthod.* 2008; 30(5): 495–502.
150. Schmalz G. Resin-based composites. In: Schmalz G, Arenholt-Bindlev D, eds. *Biocompatibility of dental materials.* Berlin, Heidelberg, Germany: Springer-Verlag; 2009. p. 99–138.
151. Huang TH, Tsai CY, Chen SL, Kao CT. An evaluation of the cytotoxic effects of orthodontic bonding adhesives upon a primary human oral gingival fibroblast culture and a permanent, human oral cancer-cell line. *J Biomed Mater Res.* 2002; 63(6): 814–821.
152. Anderson RL, Stasior OG. Self-curing methyl methacrylate: is it safe? *Ophthalmic Surg* 1976; 7(4): 28–30.

153. Husain R, Srivastava SP, Seth PK. Methyl methacrylate induced behavioural and neurochemical changes in rats. *Arch Toxicol* 1985; 58(1): 33–36.
154. Jacobsen N, Hensten-Pettersen A. Occupational health problems and adverse patient reactions in orthodontics. *Eur J Orthod.* 1989; 11(3): 254–264.
155. Eliades T. Orthodontic materials research and applications: part 2. Current status and projected future developments in materials and biocompatibility. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2007; 131(2): 253–262.
156. Gioka C, Bourauel C, Hiskia A, Kletsas D, Eliades T, Eliades G. Light-cured or chemically cured orthodontic adhesive resins? A selection based on the degree of cure, monomer leaching, and cytotoxicity. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2005; 127(4): 413–419.
157. Ferracane JL. Elution of leachable components from composites. *J Oral Rehabil.* 1994; 21(4): 441–452.
158. Ahrari F, Tavakkol Afshari J, Poosti M, Brook A. Cytotoxicity of orthodontic bonding adhesive resins on human oral fibroblasts. *Eur J Orthod.* 2010; 32(6): 688–692.
159. Emmler J, Seiss M, Kreppel H, Reichl FX, Hickel R, Kehe K. Cytotoxicity of the dental composite component TEGDMA and selected metabolic by-products in human pulmonary cells. *Dent Mater.* 2008; 24(12): 1670–1675.
160. Davidson WM, Sheinis EM, Shepherd SR. Tissue reaction to orthodontic adhesives. *Am J Orthod.* 1982; 82(6): 502–507.
161. Fredericks HE. Mutagenic potential of orthodontic bonding materials. *Am J Orthod.* 1981; 80(3): 316–324.
162. Athas WF, Gutzke GE, Kubinski ZO, Kubinski H. In vitro studies on the carcinogenic potential of orthodontic bonding materials. *Ecotoxicol Environ Saf.* 1979; 3(4): 401–410.
163. Vande Vannet B, Mohebbian N, Wehrbein H. Toxicity of used orthodontic archwires assessed by three-dimensional cell culture. *Eur J Orthod.* 2006; 28(5): 426–432.
164. Vande Vannet BM, Hanssens JL. Cytotoxicity of two bonding adhesives assessed by three-dimensional cell culture. *Angle Orthod* 2007; 77(4): 716–722.
165. Terhune WF, Sydiskis RJ, Davidson WM. In vitro cytotoxicity of orthodontic bonding materials. *Am J Orthod.* 1983; 83(6): 501–506.
166. Ahn SJ, Lee SJ, Kook JK, Lim BS. Experimental antimicrobial orthodontic adhesives using nanofillers and silver nanoparticles. *Dent Mater.* 2009; 25(2): 206–213.

167. Wijnhoven SWP, Peijnenburg WJGM, Herberts CA, Hagens WI, Oomen AG, Heugens EHW. et al. Nano-silver-a review of available data and knowledge gaps in human and environmental risk assessment. *Nanotoxicology*. 2009; 3(2): 109–138.
168. Lanone S, Rogerieux F, Geys J, Dupont A, Maillot-Marechal E, Boczkowski J, Lacroix G, Hoet P. Comparative toxicity of 24 manufactured nanoparticles in human alveolar epithelial and macrophage cell lines. *Part Fibre Toxicol*. 2009; 6: 14. doi: 10.1186/1743-8977-6-14
169. Arai T, Ueda T, Sugiyama T, Sakurai K. Inhibiting microbial adhesion to denture base acrylic resin by titanium dioxide coating. *J Oral Rehabil*. 2009; 36(12): 902–908.
170. Poosti M, Ramazanzadeh B, Zebarjad M, Javadzadeh P, Naderinasab M, Shakeri MT. Shear bond strength and antibacterial effects of orthodontic composite containing TiO₂ nanoparticles. *Eur J Orthod*. 2013; 35(5): 676–679.
171. Sun J, Forster AM, Johnson PM, Eidelman N, Quinn G, Schumacher G, Zhang X, Wu WL. Improving performance of dental resins by adding titanium dioxide nanoparticles. *Dent Mater*. 2011; 27(10): 972–982.
172. Heravi F, Ramezani M, Poosti M, Hosseini M, Shajiei A, Ahrari F. In vitro cytotoxicity assessment of an orthodontic composite containing titanium-dioxide nano-particles. *J Dent Res Dent Clin Dent Prospects*. 2013; 7(4): 192–198.
173. Wolf HE, Hassell TM. Indices in: *Color atlas of dental hygiene*. Periodontology. Stuttgart-New York: Thieme, 2006. p. 67–73.
174. Navaro Gonzalez JA, Garcia Benayas C, Arenas J. Semi automated measurement in nitrate in biological fluids. *Clin Chem*. 1998; 44(3): 679–681.
175. http://modernsteroid.blogspot.rs/2012_03_01_archive.html
176. <http://www.scientific-equipment.com/equipment-for-sale/microplate/multiskan-ascent-354-microplate-reader?ln=1698>
177. Gong X, Chen W, Gong Y, Zhou L. Clinical analysis of PLI, GI and SBI in patients with fixed orthodontic appliances. *Shanghai Kou Qiang Yi Xue* 2006; 15(4): 367–369. [In Chinese]
178. Rego RO, Oliveira CA, dos Santos-Pinto A, Jordam SF, Zambon JJ, Cirelli JA, Haraszthy VI. Clinical and microbiological studies of children and adolescents receiving orthodontic treatment. *Am J Dent* 2010; 23(6): 317–323.
179. Turner CH, Owan I, Jacob DS, McClintock R, Peacock M. Effects of nitric oxide synthase inhibitors on bone formation in rats. *Bone*. 1997; 21(6): 487–490.

180. Fox SW, Chambers TJ, Chow, JW. Nitric oxide as an early mediator of the increase in bone formation by mechanical stimulation. *Am J Physiol.* 1996; 270(6 Pt 1): E955–E960.
181. Smalt R, Mitchell FT, Howard RL, Chambers TJ. Mechanotransduction in bone cells: induction of nitric oxide and prostaglandin synthesis by fluid shear stress, but not by mechanical strain. *Adv Exp Med Biol.* 1997; 433: 311–314.
182. Nakago-Matsuo C, Matsuo T, Nakago T. Basal nitric oxide production is enhanced by hydraulic pressure in cultured human periodontal ligament fibroblasts. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2009; 117(4): 474–478.
183. Shirazi M, Nilforoushan D, Alghasi H, Dehpour AR. The role of nitric oxide in orthodontic tooth movement in rats. *Angle Orthod* 2002; 72(3): 211–215.
184. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular biology of the cell.* 4th ed. Garland Science: New York, 2002. p. 838–39, 1304–1307
185. Holliday LS, Dean AD, Lin RH, Greenwald JE, Gluck SL. Low NO concentrations inhibit osteoclast formation in mouse marrow cultures by cGMP-dependent mechanism. *Am J Physiol.* 1997; 272(3 Pt 2): F283–F291.
186. Collin-Osdoby P, Nickols GA, Osdoby P. Bone cell function, regulation, and communication: a role for nitric oxide. *J Cell Biochem.* 1995; 57(3): 399–408.
187. Akin E, Gurton AU, Olmez H. Effects of nitric oxide in orthodontic tooth movement in rats. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2004; 126(5): 608–614.
188. Tan SD, Xie R, Klein-Nulend J, van Rheden RE, Bronckers AL, Kuijpers-Jagtman AM, Von den Hoff JW, Maltha JC. Orthodontic force stimulates eNOS and iNOS in rat osteocytes. *J Dent Res.* 2009; 88(3): 255–260.
189. Yoo SK, Warita H, Soma K. Duration of orthodontic force affecting initial response of nitric oxide synthase in rat periodontal ligaments. *J Med Dent Sci.* 2004; 51(1): 83–88.
190. Ford H, Suri S, Nilforoushan D, Manolson M, Gong SG. Nitric oxide in human gingival crevicular fluid after orthodontic force application. *Arch Oral Biol.* 2014; 59(11): 1211–1216.
191. D'Attilio M, Di Maio F, D'Arcangela C, Filippi MR, Felaco M, Lohinai Z, Festa F, Perinetti G. Gingival endothelial and inducible nitric oxide synthase levels during orthodontic treatment: a cross-sectional study. *Angle Orthod.* 2004; 74(6):851–858.
192. Nilforoushan D, Manolson MF. Expression of nitric oxide synthases in orthodontic tooth movement. *Angle Orthod.* 2009; 9(3):502–508.

193. Mancini L, Becherini Alberts B, Johnson A, Lewis J L, Benvenuti S, Brandi ML. Bioeffects of a nitric oxide donor in a human preosteoclastic cell line. *Int J Clin Pharmacol Res.* 1997; 17(2–3): 93–96
194. Mentaverri R, Kamel S, Wattel A, Prouillet C, Sevenet N, Petit JP, Tordjmann T, Brazier M. Regulation of bone resorption and osteoclast survival by nitric oxide: possible involvement of NMDA-receptor. *J Cell Biochem.* 2003; 15; 88(6): 1145–1156.
195. Gaspirc B, Masera A, Skaleric U. Immunolocalization of inducible nitric oxide synthase in localized juvenile periodontitis patients. *Connect Tissue Res.* 2002; 43(2–3): 413–418.
196. Chae HJ, Park RK, Chung HT, Kang JS, Kim MS, Choi DY, Bang BG, Kim HR. Nitric oxide is a regulator of bone remodelling. *J Pharm Pharmacol.* 1997; 49(9): 897–902.
197. Khorsavi Samani M, Poorsattar Bejeh Mir A, Kashiri M, Gujeq D. Introducing cut-points for salivary nitric oxide to distinguish periodontitis from the normal periodontium. *Minerva Stomatol.* 2012; 61(10): 443–448.
198. Bayindir YZ, Polat MF, Seven N. Nitric oxide concentrations in saliva and dental plaque in relation to caries experience and oral hygiene. *Caries Res.* 2005; 39(2): 130–133.
199. Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev.* 2007; 87(1): 315–424.
200. Topcu Ali O, Akalin FA, Sahbazoglu KB, Yamalik N, Kilinc K, Karabulut E, Tözüm TF. Nitrite and nitrate levels of gingival crevicular fluid and saliva in subjects with gingivitis and chronic periodontitis. *J Oral Maxillofac Res.* 2014; 5(2): e5.
201. Uematsu S, Mogi M, Deguchi T. Interleukin (IL)-1 beta, IL-6, tumor necrosis factor-alpha, epidermal growth factor, and beta 2-microglobulin levels are elevated in gingival crevicular fluid during human orthodontic tooth movement. *J Dent Res.* 1996; 75(1): 562–567.
202. Ren Y, Vissink A. Cytokines in crevicular fluid and orthodontic tooth movement. *Eur J Oral Sci.* 2008; 116(2): 89–97.
203. Yamaguchi M, Kasai K. Inflammation in periodontal tissue in response to mechanical force. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2005; 53(5): 388–389.

204. Yoshimatsu M, Shibata Y, Kitaura H, Chang X, Moriishi T, Hashimoto F, Yoshida N, Yamaguchi A. Experimental model of tooth movement by orthodontic force in mice and its application to tumor necrosis factor receptor-deficient mice. *J Bone Miner Metab.* 2006; 24(1): 20–27.
205. Kim N, Kadono Y, Takami M, Lee J, Lee SH, Okada F, Kim JH, Kobayashi T, Odgren PR, Nakano H, Yeh WC, Lee SK, Lorenzo JA, Choi Y. Osteoclast differentiation independent of the TRANCE-RANK-TRAF6 axis. *J Exp Med.* 2005; 202(5): 589–595.
206. Shiotani A, Shibasaki Y, Sasaki T. Localization of receptor activator of NF kappa B ligand, RANK in periodontal tissue during experimental movement of rat molars. *J Electron Microsc (Tokyo).* 2001; 50(4): 365–369.
207. Ogasawara T, Yoshimine Y, Kiyoshima T, Kobayashi I, Matsuo K, Akamine A, Sakai H. In situ expression of RANKL, RANK, osteoprotegerin and cytokines in osteoklasts of rat periodontal tissue. *J Periodont Res.* 2004; 39(1): 42–49.
208. Hesegawa T, Yoshimura Y, Kikuri T, Yawaka Y, Tekeyama S, Matsumoto A, Ogushi H, Shirakawa T. Expression of receptor activator of NF-kappa B ligand and osteoprotegerin in culture of human periodontal ligament cells. *J Periodontal Res.* 2002; 37(6): 405–411.
209. Tian YL, Xie JC, Zhao ZJ, Zhang Y. Changes of interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha levels in gingival crevicular fluid during orthodontic tooth movement. *Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi.* 2006; 24(3): 243–245. [in Chinese]
210. Alhashimi N, Frithiof L, Brudvik P, Bakhiet M. Orthodontic tooth movement and de novo synthesis of proinflammatory cytokines. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2001; 119(3): 307–312.
211. Martin TJ, Ng KW. Mechanisms by which cells of the osteoblast lineage control osteoclast formation and activity. *J Cell Biol.* 1994; 56(3): 357–366.
212. Mundy GR. Peptides and growth regulatory factors in bone. *Rheum Dis Clin North Am.* 1994; 20(3): 577–588
213. Kanzaki H, Chiba M, Takahashi I, Haruyama N, Nishimura M, Mitani H. Local OPG gene transfer to periodontal tissue inhibits orthodontic tooth movement. *J Dent Res.* 2004; 83(12): 920–925.
214. Casa MA, Faltin RM, Faltin K, Arana-Chavez VE. Root resorption on torqued human premolars shown by tartrate-resistant acid phosphatase histochemistry and transmission electron microscopy. *Angle Orthod.* 2006; 76(6): 1015–1021.

215. Sasaki T. Differentiation and functions of osteoclasts and odontoclasts in mineralized tissue resorption. *Microsc Res Tech.* 2003; 61(6): 483–459.
216. Brudvik P, Rygh P. Non-clast cells start orthodontic root resorption in the periphery of hyalinized zones. *Eur J Orthod.* 1993; 15(6): 467–480.
217. Caughman WF, Caughman GB, Shiflett RA, Rueggeberg F, Schuster GS. Correlation of cytotoxicity, filler loading and curing time of dental composites. *Biomaterials.* 1991; 12(8): 737–740.
218. Bouillaguet S, Shaw L, Gonzalez L, Wataha JC, Krejci I. Long-term cytotoxicity of resin-based dental restorative materials. *J Oral Rehabil.* 2002; 29(1): 7–13.
219. Annunziata M, Aversa R, Apicella A, Annunziata A, Apicella D, Buonaiuto C, Guida L. In vitro biological response to a light-cured composite when used for cementation of composite inlays. *Dent Mater.* 2006; 22(12): 1081–1085.
220. Thonemann B, Schmalz G, Hiller KA, Schweikl H. Responses of L929 mouse fibroblasts, primary and immortalized bovine dental papilla-derived cell lines to dental resin components. *Dent Mater.* 2002; 18(4): 318–323.
221. Issa Y, Watts DC, Brunton PA, Waters CM, Duxbury AJ. Resin composite monomers alter MTT and LDH activity of human gingival fibroblasts in vitro. *Dent Mater.* 2004; 20(1): 12–20.
222. Stanislawski L, Lefeuvre M, Bourd K, Soheili-Majd E, Goldberg M, Perianin A. TEGDMA-induced toxicity in human fibroblasts is associated with early and drastic glutathione depletion with subsequent production of oxygen reactive species. *J Biomed Mater Res. A.* 2003; 66(3): 476–482.
223. Reichl FX, Durner J, Hickel R, Spahl W, Kehe K, Walther U, Gempel K, Liebl B, Kunzelmann KH, Hume W. Uptake, clearance and metabolism of TEGDMA in guinea pigs. *Dent Mater.* 2002; 18(8): 581–589.
224. Hansel C, Leyhausen G, Mai UE, Geurtsen W. Effects of various resin composite (co)monomers and extracts on two caries-associated micro-organisms in vitro. *J Dent Res.* 1998; 77(1): 60–67.
225. Söhoel H, Gjerdet NR, Hensten-Pettersen A, Ruyter IE. Allergenic potential of two orthodontic bonding materials. *Scand J Dent Res.* 1994; 102(2): 126–129.
226. Souza PP, Aranha AM, Hebling J, Giro EM, Costa CA. In vitro cytotoxicity and in vivo biocompatibility of contemporary resin-modified glass-ionomer cements. *Dent Mater.* 2006; 22(9): 838–844.

227. Howie NM, Trigkas TK, Cruchley AT, Wertz PW, Squier CA, Williams DM. Short-term exposure to alcohol increases the permeability of human oral mucosa. *Oral Dis.* 2001; 7(6): 349–354.
228. Maier H, Tisch M. Epidemiology of laryngeal cancer: results of the Heidelberg case-control study. *Acta Otolaryngol Suppl.* 1997; 527: 160–164.
229. Kakaboura A, Eliades G, Palaghias G. An FTIR study on the setting mechanism of resin-modified glass ionomer restoratives. *Dent Mater.* 1996; 12(3): 173–178.
230. Lassila LV, Vallittu PK. Denture base polymer Allident Sinomer: mechanical properties, water sorption and release of residual compounds. *J Oral Rehabil.* 2001; 28(7): 607–613.
231. Sigusch BW, Volpel A, Braun I, Uhl A, Jandt KD. Influence of different light curing units on the cytotoxicity of various dental composites. *Dent Mater.* 2007; 23(11): 1342–1348.
232. Malkoc S, Corekci B, Esra Ulker H, Yalçın M, Şengün A. Cytotoxic effects of orthodontic composites. *Angle Orthod.* 2010; 80(4): 759–764.
233. Quinlan CA, Zisterer DM, Tipton KF, O’Sullivan MI. In vitro cytotoxicity of a composite resin and compomer. *Int Endod J.* 2002; 35(1): 47–55.
234. Sjogren G, Sletten G, Dahl JE. Cytotoxicity of dental alloys, metals, and ceramics assessed by millipore filter, agar overlay, and MTT tests. *J Prosth Dent.* 2000; 84(2): 229–236.

BIOGRAFIJA AUTORA

Predrag Janošević rođen je 1982. godine u Prokuplju. Osnovno školovanje je završio u Nišu kao đak generacije. Završio je gimnaziju Stevan Sremac u Nišu sa odličnim uspehom. Medicinski fakultet u Nišu, odsek stomatologija upisao je školske 2001/02 godine, a diplomirao školske 2007/08. godine sa prosečnom ocenom studiranja 10.00. Dobitnik je nagrade Univerziteta za najboljeg diplomiranog studenta Medicinskog fakulteta U toku studija bavio se naučno-istraživačkim radom. Učestvovao je na brojnim kongresima, u organizacija studentskih kongresa, a volontirao je i kao demonstrator na predmetu Bolesti zuba. Tokom pete i šeste godine studija obavljao je funkciju predsednika centra za naučno istraživački rad (CNIRS) na odseku stomatologija.

Primalac je stipendije Ministarstva nauke Republike Srbije. Od 2009. godine volontira na Medicinskom fakultetu u Nišu, kao saradnik u nastavi. Od 2011 radi kao saradnik u nastavi na odeljenju Ortopedija vilica Medicinskog fakulteta, odsek stomatologija u Nišu. Od 2014. godine radi na Klinici za stomatologiju u Nišu kao klinički lekar.

Položio je specijalizaciju iz oblasti Ortopedija vilica. Učesnik je brojnih domaćih i međunarodnih Kongresa i simpozijuma. Autor je i koautor više stručnih radova. Do sada je bio angažovan kao istraživač na dva projekta finansirana od strane Ministarstva za nauku Republike Srbije.

Član je Antropološkog društva Srbije, Ortodontskog udruženja Srbije i Evropskog udruženja ortodonata.

Doktorske akademske studije upisao je školske 2007/08. godine, odslušao nastavu i položio programom predviđene ispite. Na osnovu odluke Nastavno naučnog veća Medicinskog fakulteta u Nišu od 06.05.2014. godine (br.04-KS-9/10) odobrena mu je tema za izradu doktorske disertacije pod naslovom „Uticaj terapije fiksnim ortodontskim aparatima na parodontcijum i dijagnostički potencijal biohemijjskih parametara zapaljenja“ pod mentorstvom prof. dr Ivane Stojanović.

Služi se engleskim jezikom.

Oženjen je i otac jednog deteta.

ИЗЈАВА О АУТОРСТВУ

Изјављујем да је докторска дисертација, под насловом

**УТИЦАЈ ТЕРАПИЈЕ ФИКСНИМ ОРТОДОНТСКИМ АПАРАТИМА
НА ПАРОДОНЦИЈУМ И ДИЈАГНОСТИЧКИ ПОТЕНЦИЈАЛ
БИОХЕМИЈСКИХ ПАРАМЕТАРА ЗАПАЉЕЊА**

која је одбрањена на Медицинском факултету Универзитета у Нишу:

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

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

У Нишу, 10. јуна 2016.

Потпис аутора дисертације:



(Предраг Н. Јаношевић)

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

Наслов дисертације

**УТИЦАЈ ТЕРАПИЈЕ ФИКСНИМ ОРТОДОНТСКИМ АПАРАТИМА
НА ПАРОДОНЦИЈУМ И ДИЈАГНОСТИЧКИ ПОТЕНЦИЈАЛ
БИОХЕМИЈСКИХ ПАРАМЕТАРА ЗАПАЉЕЊА**

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

У Нишу, 10. јуна 2016.

Потпис аутора дисертације:



(Предраг Н. Јаношевић)

ИЗЈАВА О КОРИШЋЕЊУ

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

УТИЦАЈ ТЕРАПИЈЕ ФИКСНИМ ОРТОДОНТСКИМ АПАРАТИМА НА ПАРОДОНЦИЈУМ И ДИЈАГНОСТИЧКИ ПОТЕНЦИЈАЛ БИОХЕМИЈСКИХ ПАРАМЕТАРА ЗАПАЉЕЊА

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

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

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прераде (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

У Нишу, 10. јуна 2016.

Потпис аутора дисертације:



(Предраг Н. Јаношевић)