

UNIVERZITET U BEOGRADU

STOMATOLOŠKI FAKULTET

Sanja D. Matić

UTICAJ POLIMORFIZAMA GENA ZA
INFLAMATORNE CITOKINE I NJIHOVE
RECEPTORE NA NIVO CIRKULIŠUĆIH
CITOKINA I KLINIČKE PARAMETRE KOD
PACIJENATA SA HRONIČNOM
PARODONTOPATIJOM I DIAJBETES
MELITUSOM TIPA 2

doktorska disertacija

Beograd, 2016

UNIVERSITY OF BELGRADE
SCHOOL OF DENTAL MEDICINE

Sanja D. Matić

INFLUENCE OF POLYMORPHISM OF
PROINFLAMMATORY CYTOKINES AND
RECEPTORS ON SERUM CYTOKINE
LEVEL AND CLINICAL PARAMETERS OF
CHRONIC PERIODONTITIS AND
DIABETES MELLITUS TYPE 2

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2016

Mentori:

Prof dr Ana Pucar

vanredni profesor,
Univerzitet u Beogradu, Stomatološki fakultet
Klinika za parodontologiju i oralnu medicinu

Prof dr Jelena Milašin

redovni profesor
Univerzitet u Beogradu, Stomatološki fakultet
Institut za humanu genetiku

Članovi komisije:

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

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

Prof. dr Branka Popović, vanredni profesor
Univerzitet u Beogradu, Stomatološki fakultet
Institut za humanu genetiku

Prof Dr Nebojša Lalić, redovni profesor,
Klinika za endokrinologiju i bolesti metabolizma,
Kliničkog centra Srbije,
Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Datum odbrane: _____

Uticaj polimorfizama gena za inflamatorne citokine i njihove receptore na nivo cirkulišućih citokina i kliničke parametre kod pacijenata sa hroničnom parodontopatijom i dijabetes melitusom tipa 2

Uvod: Hronična parodontopatija (PD) i tip 2 dijabetesa melitusa (T2D) su hronična, inflamatorna poligena oboljenja, koja dele zajedničke patogenetske mehanizme. Već 30 godina parodontopatija se smatra šestom komplikacijom T2D, ali je sve više dokaza o uticaju inflamacije iz parodontocijuma na pojavu i kliničku sliku dijabetesa. S obzirom da je genska podložnost bitna u nastanku i progresiji oba oboljenja, sve je veće interesovanje da se ispita da li su neke varijacije genoma odgovorne za zajedničku podložnost i dvosmernu povezanost ovih oboljenja. Faktor nekroze tumora (TNF α) igra ključnu ulogu u patogenezi oba oboljenja i objašnjava pomenutu dvosmernu povezanost. Blisko strukturalno, funkcionalno odnosno genski povezani sa TNF α su limfotoksin alfa (LT α), kao i njihovi receptori -TNFR $_1$ i TNFR $_2$.

Ciljevi studije: S obzirom da polimorfizmi gena ovih molekula utiču na ekspresiju, funkciju ili oslobađanje solubilnih formi ovih citokina/receptora, zanimljivo je bilo ispitati da li polimorfizam na ovim molekulima mogu uticati na rizik za oboljevanje od PD i/ili T2D. Takođe, ciljevi ove studije bili su ispitivanje uticaja kliničkih parodontoloških parametara (inflamacije iz parodontocijuma) ili polimorfizama (-308G/A TNF α , +252A/G LT α , +36A/G TNFR $_1$ i +676T/G TNFR $_2$) na sistemski nivo pomenutih molekula.

Ispitanici, materijal i metode: Ispitanici (N=180) su raspoređeni u tri grupe: sistemski zdravi ispitanici bez kliničkih znakova PD (ZK grupa), sistemski zdravi ispitanici sa dijagnostikovanom PD (PD grupa) i ispitanici sa dijagnostikovanim T2D i PD (T2D grupa). Kliničkim pregledom parodontocijuma praćeni su plak indeks Silness-Loe (PI), krvarenja na provokaciju (KNP), dubina sondiranja (DS) i nivo pripojnog epitela (NPE). Uticaj inflamiranog parodontocijuma na sistemski nivo citokina kvantifikovan je PESA i PISA parametrima. Detekcija polimorfizama vršena RFLP-PCR metodom iz DNK izolovanih iz briseva bukalne sluzokože. Koncentracija ispitivanih molekula određivana je ELISA metodom. Pratili smo i uticaj bihevioralnih faktora na kliničke parametre oboljenja i na sistemski nivo citokina putem regresionih modela.

Rezultati: Polimorfizam -308G/A TNF α nije se izdvojio kao faktor rizika za oboljevanje od PD ili T2D. AA genotip (OR=0,173, CI=0,036-0,837, p=0,022) i alel A

(OR=0,563, CI=0,334-0,936, p=0,029) ovog polimorfizma pokazao je protektivan efekat za oboljevanje od PD i T2D u odnosu na PD. AG genotip (OR=2,75, CI=1,184-6,380, p=0,019) i alel G (OR=1,824, CI=1,047-3,176, p=0,032) +252A/G LT α polimorfizma izdvojili su se kao nosioci povećanog rizika za oboljevanje od PD. Nasuprot, AA (OR=0,261, CI=0,105-0,647, p=0,003) i GG genotip (OR=0,215, CI=0,084-0,547, p=0,000) ovog polimorfizma pokazali su protektivan efekat pri poređenju PD sa T2D grupom. Kod sistemski zdravih ispitanika, AA genotip +36A/G TNFR₁ jedinstveno je predviđao varijanse promenljivih DS (8,9%) i NPE (5,9%). Ovaj genotip izdvojio se kao protektivan pri poređenju PD sa T2D grupom (OR=0,616, CI=0,384-0,991, p=0,046). TT genotip +676T/G TNFR₂ polimorfizma pokazao je povećan rizik za oboljevanje od PD (OR=2,302, CI=1,075-4,926, p=0,031). Serumna koncentracija ispitivanih citokina/receptora nije bila pod uticajem pomenutih polimorfizama na našem uzorku. Koncentracija TNFR₁ bila je značajno veća kod ispitanika T2D grupe u odnosu na druge dve grupe. Korelacije TNF α , LT α sa određenim kliničkim parodontološkim parametarima bile su pozitivne, dok je korelacija TNFR₂ i parametara u PD grupi bila negativna, a u T2D grupi pozitivna.

Zaključci: Nosioci G alela +252A/G LT α polimorfizma, kao i TT genotipa +676T/G TNFR₂ pokazuju veći rizik za oboljevanje od PD. Na ovom uzorku nismo pokazali zajedničku gensku podložnost za pojavu oba oboljenja. U našoj studiji, kod sistemski zdravih ispitanika, parametric destrukcije parodontijuma mogu biti pod malim uticajem genske osnove (AA genotip TNFR₁), dok su ove promene kod obolelih od dijabetesa povezane sa parametrima higijene. Ovo navodi na razmišljanje da parodontopatija, odnosno stepen destrukcije parodontijuma kod sistemski zdravih ispitanika može biti pod uticajem genski determinisan, dok je ova destrukcija kod ispitanika sa dijabetesom posledica patoloških promena tkiva kao posledica prisustva samog dijabetesa, bez obzira na gensku osnovu. Sintaza sTNFR₂ i korelacija sa kliničkim parodontološkim parametrima u dijabetesu su izmenjeni u odnosu na sistemski zdrave ispitanike.

Ključne reči: Hronična parodontopatija, Tip 2 dijabetesa, polimorfizmi, TNF α , LT α , TNFR₁, TNFR₂, PCR-RFLP, ELISA, genska podložnost

Naučna oblast: Stomatologija

Uža naučna oblast: Parodontalna medicina

Influence of polymorphism of proinflammatory cytokines and receptors on serum cytokine level and clinical parameters of chronic periodontitis and diabetes mellitus type 2

Introduction: Chronic periodontitis (CP) and Type 2 Diabetes (T2D) are two common chronic inflammatory diseases. Although of different origin, they share some pathogenetic mechanisms. CP has been considered as the sixth complication of T2D for 30 years now, but also there is increasing evidence about the influence of inflammation from periodontium on T2D onset and progression. According that both diseases are polygenic and genetic susceptibility for CP or T2D is widely studied, it would be useful to explore if some genetic variations are responsible for cross-susceptibility or bidirectional relationship of mentioned diseases. Tumor Necrosis Factor (TNF α) plays key role in pathogenesis of both diseases and could explain their bidirectional relationship. TNF α is structurally, functionally or genetically related with Lymphotoxin alpha (LT α) and their receptors TNFR $_1$ and TNFR $_2$.

Aims: According that Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) on genes for mentioned molecules regulates their expression, function or cleavage, it would be interesting to explore if SNPs of TNF α and its related molecules may be responsible for susceptibility for CP and/or T2D. Further, the aims of this study were to study if serum levels of TNF α , LT α , TNFR $_1$ and TNFR $_2$ are influenced by clinical periodontal parameters (inflammation from periodontium) or SNPs (-308G/A TNF α , +252A/G LT α , +36A/G TNFR $_1$ and +676T/G TNFR $_2$).

Subjects, Materials and Methods: This study of association included 180 subjects divided into three groups: systematically health subjects without CP (HC group), systematically health subjects with CP (PD group) and patients with diagnosed CP and T2D (T2D group). Plaque Index (PI), Bleeding on Probing (BOP), Probing Pocket Depth (PPD) and Clinical Attachment Level (CAL) were measured at six points of each tooth except third molars. Impact of inflammation from periodontium on circulating levels were measured by Periodontal Epithelial, Surface Area (PESA) and Periodontal Inflamed Surface Area (PISA) parameters. SNPs were detected using Polymerase Chain Reaction- Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) from DNA isolated from buccal epithelial cells. Serum concentrations of TNF α , LT α , TNFR $_1$ and TNFR $_2$

were measured by ELISA method. Impact of behavioral characteristic on clinical parameters and serum concentrations of cytokines were measured.

Results: -308G/A TNF α SNP did not show risk effect for PD or T2D. AA genotype (OR=0.173, CI=0.036-0.837, p=0.022) and allele A (OR=0.563, CI=0.334-0.936, p=0.029) of this SNP showed protective effect for PD and T2D together in comparison with PD only. AG genotype (OR=2.75, CI=1.184-6.380, p=0.019) and allele G (OR=1.824, CI=1.047-3.176, p=0.032) of +252A/G LT α SNP showed risk effect for PD. On contrary, AG (OR=0.261, CI=0.105-0.647, p=0.003) and GG genotypes (OR=0.215, CI=0.084-0.547, p=0.000) were protective for having both PD and T2D in comparison to PD. AA genotype of +36A/G TNFR₁ SNP predicted variances of PPD (8.9%) and CAL (5.9%) at systematically health subjects. This genotype was protective when comparing PD vs. T2D groups (OR=0.616, CI=0.384-0.991, p=0.046). TT genotype of +676T/G TNFR₂ SNP showed risk effect for PD (OR=2.302, CI=1.075-4.926, p=0.031). Serum concentrations of examined molecules were not influenced by SNPs. TNFR₁ concentration was higher at T2D group. TNF α and LT α correlated positively with some of the clinical periodontal parameters. At systematically healthy periodontitis patients, correlations of TNFR₂ and clinical periodontal parameters were negative, while at diabetics they were positive.

Conclusions: Carriers of allele G +252A/G LT α SNP and TT genotype of +676T/G TNFR₂ SNP are at higher risk for PD. In this study, similar genetic susceptibility for PD and PD and T2D both were not presented. At systematically healthy periodontitis patients, clinical periodontal parameters were influenced by genetic variations (presence of AA genotype of +36A/G TNFR₁), while at diabetics they were influenced by oral hygiene parameters. This may lead to assumption that periodontal destruction at systematically healthy subject are genetically determined, while this destruction at diabetics are consequence of pathological changes in periodontium as result of diabetes, regardless of the genetic variations. Correlations and synthesis of TNFR₂ at diabetic are changed compared to systematically healthy subjects with PD.

Key words: Chronic Periodontitis, Type 2 Diabetes, SNP, TNF α , LT α , TNFR₁, TNFR₂, PCR-RFLP, ELISA, genetic susceptibility

Scientific field: Dentistry

Specific Scientific Field: Periodontal medicine

1. UVOD	1
1.1.DEFINICIJA I EPIDEMIOLOGIJA PARODONTOPATIJE	1
1.1.1.Karakteristike parodontopatije	1
1.2.ETIOLOGIJA PARODONTOPATIJE.....	2
1.2.1.Dentalni biofilm i teorije etiologije parodontopatije	2
1.2.2.Aksesorni faktori, modifikujući faktori i faktori rizika parodontopatija	5
1.3.PATOGENEZA PARODONTOPATIJE	6
1.3.1.Mehanizmi koštane resorpcije u patogenezi parodontopatije- M-CSF i RANK/RANKL/OPG sistem	8
1.3.1.1.Makrofagni kolonostimulišući faktor (M-CSF)	8
1.3.1.2.RANK/RANKL/OPG sistem.....	9
1.3.2.MMP/TIMP sistem.....	9
1.4.DIJABETES MELITUS.....	10
1.5.TIP 2 DIJABETESA.....	11
1.5.1.Etiologija T2D	11
1.5.2.Patogeneza T2D	12
1.5.3.Komplikacije T2D.....	13
1.6.DVOSMERNNA VEZA PARODONTOPATIJE I DIJABETESA	13
1.6.1. Uticaj dijabetesa na stanje usne duplje i parodontalnih tkiva	13
1.6.1.Gingivitis i parodontopatije.....	14
1.6.2.Uticaj inflamacije iz parodonticijuma na glikoregulaciju- parodontalna medicina	15
1.6.2.1.Longitudinalne (kohortne) studije	17
1.6.2.2.Intervencione studije	18
1.7.PATOGENETSKE SLIČNOSTI DM I PDP.....	19
1.7.1.Genski mehanizmi.....	19
1.7.2.Imunološki mehanizmi	19
1.7.3.TNF α kao potencijalni citokin koji objašnjava dvosmernu vezu parodontopatije i dijabetesa.....	21
1.8.INTERLEUKINI (CITOKINI).....	21
1.8.1.TNF alfa/TNF receptor (TNF/TNFR) familija citokina	22
1.8.1.1.Faktor nekroze tumora- TNF α	22

1.8.1.2.Limfotoksin α (LT α).....	25
1.8.1.3.Receptori TNFR ₁ i TNFR ₂	25
1.8.1.4.Uloga TNF α , LT α , TNFR ₁ i TNFR ₂ u patogenezi dijabetesa	29
1.8.1.5.Uloga TNF/TNFR u patogenezi parodontopatije	31
1.9.POLIMORFIZMI.....	33
1.9.1.Polimorfizam u genu za TNF α (-308G/A, rs1800629).....	35
1.9.2.Polimorfizam LT α +252A/G (rs909253).....	37
1.9.3.Polimorfizam na genu za TNFR ₁ (+36A/G, rs767455).....	38
1.9.4.Polimorfizam TNFR ₂ (rs1061622)	39
2. POLAZNA HIPOTEZA I CILJEVI STUDIJE.....	40
3. ISPITANICI, MATERIJAL I METODE.....	42
3.1. PODACI O STUDIJU.....	42
3.2.ISPITANICI.....	42
3.2.1. Kriterijumi isključivanja iz studije	43
3.3. ANAMNEZA, ISTRAŽIVAČKI KARTON.....	43
3.4.BIOHEMIJSKI I PARAMETRI KRVNE SLIKE	44
3.5.KLINIČKI PREGLED I DIJAGNOZA HRONIČNE PARODONTOPATIJE	45
3.6.POSTAVLJANJE DIJAGNOZE DIJABETESA MELITUSA TIP 2	47
3.7.UZORKOVANJE	48
3.8.ANALIZA POLIMORFIZAMA	48
3.8.1.Izolacija DNK iz brisa bukalne sluzokože	48
3.8.2. Lančana reakcija polimeraze-PCR	49
3.8.3. Provera PCR produkata elektroforezom na 8% poliakrilamidnom gelu (PAGE)	50
3.8.4. Restrikciona digestija PCR produkata i analiza dužine restrikcioni fragmenata (RFLP) (Restriction Fragment Length Polymorphism).....	52
3.8.5. PCR reakcija u analizi polimorfizma gena za TNF- α , LT alfa, TNFR ₁ i TNFR ₂	52
3.8.6. RFLP u analizi polimorfizama za TNF alfa, LT alfa, TNFR ₁ i TNFR ₂	55
3.9. ELISA-ENZYM-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY	57
3.9.1. Korišćeni komercijalni ELISA setovi za analizu koncentracije citokina.....	58

3.10. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA	58
4.0 REZULTATI.....	60
4.1.DEMOGRAFSKI PODACI ISPITANIKA.....	60
4.2.KLINIČKI PARODONTOLOŠKI PARAMETRI.....	62
4.3.PODACI O TIPU 2 DIJABETESA.....	68
4.4.KRVNA SLIKA I BIOHEMIJSKE ANALIZE	68
4.5.ANALIZA BIOHEMIJSKIH REZULTATA U ODNOSU NA KLINIČKE PARAMETRE PARODONTOPATIJE	70
4.6.ANALIZA GENETIČKIH REZULTATA	70
4.6.1.Odstupanje od Hardy-Weinberg-ovog ekvilibrijuma	70
4.6.2.Analiza polimorfizama u genu za $TNF\alpha$ (-308G/A $TNF\alpha$, rs1800629).....	71
4.6.3.Analiza polimorfizma u genu za $LT\alpha$ (+252G/A $LT\alpha$, rs909253)	74
4.6.4.Analiza polimorfizma u genu za $TNFR_1$ (+36G/A $TNFR1$, rs767455)	76
4.6.5.Analiza polimorfizma u genu za $TNFR_2$ (+676 T/G $TNFR2$, rs1061622).....	78
4.6.6.Analiza genetičkih rezultata i kliničkih parametara parodontopatije.....	80
4.6.7.Povezanost polimorfizama sa karakteristikama tipa 2 dijabetesa	80
4.7.ANALIZA BIOHEMIJSKIH REZULTATA	81
4.7.1.Serumske koncentracije $TNF\alpha$, $LT\alpha$, $TNFR_1$ i $TNFR_2$	81
4.7.2.Koncentracije citokina u odnosu na ispitivane parametre i karakteristike oboljenja.....	83
4.8.ANALIZA BIOHEMIJSKIH I GENETIČKIH REZULTATA- POVEZANOSTI POLIMORFIZAMA I SERUMSKIH KONCENTRACIJA CITOKINA/RECEPTORA	87
4.9.ODREĐIVANJE UTICAJA ISPITIVANIH PARAMETARA NA KLINIČKE PARAMETRE PARODONTOPATIJE (DS I NPE) KOD ISPITANIKA PD I T2D GRUPE- VIŠESTRUKA LINEARNA REGRESIJA.....	90
4.9.1.Rezultati višestruke linearne regresije za dubinu sondiranja u grupi obolelih od parodontopatije	90
4.9.2.Rezultati višestruke linearne regresije za nivo pripojnog epitela u grupi obolelih od parodontopatije	91
4.9.3.Rezultati višestruke linearne regresije za dubinu sondiranja u grupi obolelih od dijabetesa i parodontopatije.....	91

4.9.4. Rezultati višestruke linearne regresije za nivo pripojnog epitela u grupi obolelih od dijabetesa i parodontopatije.....	92
4.10. ODREĐIVANJE UTICAJA ISPITIVANIH PARAMETARA NA SERUMSKE KONCENTRACIJE ISPITIVANIH CITOKINA I RECEPTORA-VIŠESTRUKA LINEARNA REGRESIONA ANALIZA ..	92
4.10.1 Rezultati višestruke regresione analize na serumski nivo TNF α	93
4.10.2 Rezultati višestruke regresione analize za serumski nivo LT α	93
4.10.3 Rezultati višestruke regresione analize za serumski nivo TNFR $_1$	93
4.10.4 Rezultati višestruke regresione analize na serumski nivo TNFR $_2$	94
4.11. UNIVARIJANTNA I MULTIVARIJANTNA REGRESIONA ANALIZA U PREDIKCIJI NASTANKA PARODONTOPATIJE I PARODONTOPATIJE I DIJABETESA	95
4.11.1. Rezultati regresionih analiza u predikciji nastanka parodontopatije	95
4.11.2. Rezultati regresionih analiza u predikciji nastanka parodontopatije i dijabetesa.....	96
4.11.3. Rezultati regresionih analiza u predikciji nastanka parodontopatije i dijabetesa u odnosu na ispitanike sa dijabetesom.....	97
4.12. ANALIZA NERAVNOTEŽE POVEZANOSTI (LD)	98
5.0. DISKUSIJA.....	101
6.0. Zaključci.....	125
7.0. literatura.....	127

1. UVOD

1.1. Definicija i epidemiologija parodontopatije

Oboljenja parodontocijuma predstavljaju heterogenu grupu oboljenja, a najčešće podrazumevaju zajednički termin za gingivitise i parodontopatije, zapaljenska stanja potpornog aparata zuba koja nastaju kao odgovor domaćina na prisutvo bakterija na površini zuba i desni [1].

Gingivitis predstavlja najblažu formu inflamatornih oboljenja parodontocijuma u kojem je proces inflamacije, reverzibilne prirode, ograničen na desni. Parodontopatija predstavlja ireverzibilno oboljenje kod kojeg se inflamacija širi u dublja parodontalna tkiva [2]. Epidemiološki podaci u literaturi se veoma razlikuju, s obzirom na nekonzistentne kriterijume definisanja i dijagnostikovanja samog oboljenja. Na našem području se rasprostranjenost parodontopatije bavila „Beogradska studija“ u kojoj je pokazano da 84,6% ispitanika starijih od 18 godina pokazuje znake destrukcije potpornih tkiva zuba. Pri tome, čak 44,8% njih pokazuje oštećenja dubljih tkiva parodontocijuma [3].

Klasifikacija oboljenja parodontocijuma revidirana je 1999. godine. Najčešća forma parodontopatije je hronična parodontopatija o kojoj će i biti reči u ovoj disertaciji, i koja će, jednostavnosti radi, biti označena samo kao „parodontopatija“.

1.1.1. Karakteristike parodontopatije

Kao što je rečeno, parodontopatije su heterogena grupa oboljenja. Klinička slika varira i u okviru jednog istog oboljenja a takođe i kod istog pacijenta zavisno od faze same bolesti. Parodontopatija ima cikličan tok, periodi remisije i relapsa se smenjuju. Simptomi koje najčešće srećemo su inflamacija, apikalna migracija desni i stvaranje parodontalnih džepova (patognomoničan znak parodontopatije). U samom džepu nailazimo na konkremete, a može biti prisutna i supuracija iz džepa. U uznapredovalim fazama parodontopatije, klinički registrujemo labavljenje i patološku migraciju zuba. Prisustvo inflamacije i supuracije nam govori u prilog trenutnog stanja, aktivnosti oboljenja, dok su destrukcija kosti, dubina sondiranja i apikalna migracija desni kumulativne mere oboljenja iz prošlosti [4].

1.2. Etiologija parodontopatije

Usnu duplju naseljava oko 1000 različitih mikroorganizama [5] uključujući bakterije, gljivice, viruse, protozoe i arhea. Kao većina mikroorganizama u prirodi, ne nalaze se u planktonskom obliku nego organizovani u biofilme. Veliki deo mikroorganizama usne duplje još uvek nije kultivisan. Prihvaćena teorija je da su glavni etiološki faktor parodontopatije bakterije dentalnog plaka, mada se u poslednje vreme sve više govori o prisustvu i potencijalnim ulogama virusa [6], gljivica [7] i arhea.

1.2.1. Dentalni biofilm i teorije etiologije parodontopatije

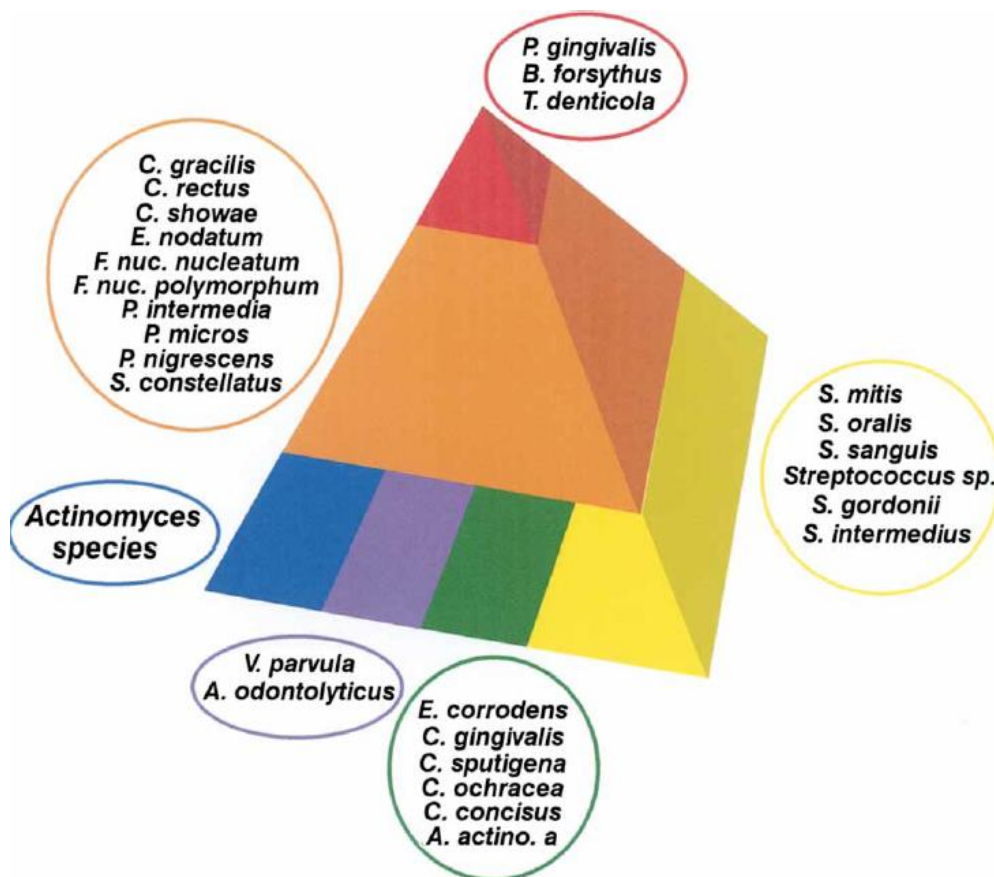
Dentalni plak odnosno biofilm definiše se kao zajednica različitih mikroorganizama (mikrokolonija) koja su po tačno određenom sistemu ugrađena u matriks polimera salivarnog i sopstvenog porekla [8]. Biofilm predstavlja veoma dinamičnu strukturu složene građe. Stvara se prirodno na zubima i čini deo odbrambenog sistema organizma [9]. U odnosu na lokaciju na ivicu gingive, razlikujemo supragingivalni i subgingivalni dentalni biofilm. Mikrobiološki sastav ova dva biofilma se veoma razlikuje, a kada se govori o etiologiji parodontopatija, misli se na subgingivalni dentalni plak.

Proces formiranja dentalnog plaka dešava se po tačno utvrđenom redosledu. Nakon formiranja pelikule sastavljene od organskih supstanci iz pljuvačke dolazi do kolonizacije primarnim (*Streptococci spp*, *Actinomyces spp*, *Capnocytophaga spp*, *Eikenella spp*, *Haemophilus spp*, *Veillonella spp*.), a zatim i sekundarnim (*Fusobacterium nucleatum*, *Treponema spp*, *P. Gingivalis spp*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*) mikroorganizmima [10]. Ono što povećava patogenost dentalnog biofilma nije samo raznovrsnost mikroorganizama već i njihova međusobna komunikacija. Veoma važnu ulogu u formiranju dentalnog biofilma igra i *Fusobacterium nucleatum* koji komunicirajući sa primarnim i sekundarnim mikroorganizmima predstavlja svojevrsan most između ove dve grupe bakterija.

Iako je dentalni biofilm oduvek smatran glavnim etiološkim faktorom patogeneze parodontopatije, same teorije delovanja mikroorganizama dentalnog plaka su se vremenom menjale. Kasnih 50ih godina prošlog veka bila je zastupljena **nespecifična teorija** dejstva dentalnog plaka, koja je tvrdila da bilo koje bakterije u dovoljnom broju produkcijom metabolita mogu dovesti do destrukcije parodontocijuma [11]. Ovu teoriju je kasnih 70ih godina prošlog veka zamenila **specifična teorija** po kojoj je parodontopatija

UVOD

rezultat umnožavanja i delovanja određenih specifičnih patogenih vrsta. *Socranski* i saradnici su izučavali mikroorganizme subgingivalnog plaka i svrstali ih u asocijacije prema osobinama, dinamici kolonizacije i faktorima virulencije [12]. Pomenute asocijacije mikroorganizama su obeležene bojama (Slika 1.1) a pripadnicima crvenog i narandžastog kompleksa pripisuje se najveća patogenost (gram negativni i anaerobni mikroorganizmi, tradicionalno označeni kao periopatogeni (*Bacteroides forsythus*, *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *Peptostreptococcus micros*)).



Slika 1.1: Šematski prikaz odnosa mikroorganizama unutar kompleksa i međusobni odnos samih asocijacija [8, 12]. Bazu piramide čine primarni kolonizatori, narandžasti kompleks čine bakterije čiji se broj povećava vremenom i predstavljaju most između pionira i patogenih bakterija crvenog kompleksa odgovornih za maturaciju biofilma.

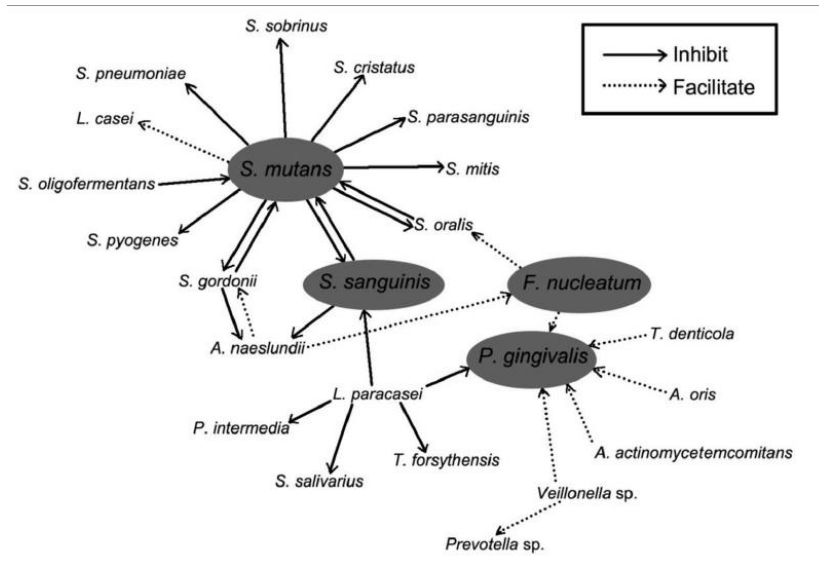
Iako je ova podela bakterija biofilma je u mnogim naučnim krugovima aktuelna i danas, savremene metode kultivisanja mikroorganizama su dovele do nekih saznanja koja su oprečna sa prethodno iznetim. Tako npr, bakterije crvenog kompleksa- tradicionalni periopatogeni su identifikovani i kod pacijenata sa klinički zdravim parodontijumom.

UVOD

Takođe, mikrobiološki sastav usne duplje je mnogo raznovrsniji nego što se mislilo i neke nove vrste mikroorganizama su pokazale iste ili čak bolje korelacije sa oboljenjem parodontcijuma od pomenutih mikroorganizama. Shodno iznetim saznanjima, dogma o gram negativnim mikroorganizmima kao etiološkim faktorima parodontopatije se menja, i isto tako bitno mesto u etiologiji počinju da zauzimaju i gram pozitivni anaerobni organizmi (*Prevotella*, *Megasphaera*, *Seimonas*, *Desulfobulbus*, *Dialister* i *Synergistetes* [13]).

Najnovija teorija etiologije parodontopatije mogla bi se definisati kao ***polimikrobna sinergija i disbioza flore usne duplje*** [13]. Po ovoj teoriji, uzrok parodontopatije je sinergizam i komunikacija među bakterijama dentalnog biofilma. Mnogobrojne studije su pokazale sofisticiranu komunikaciju među bakterijama biofilma, definisanu kao fizičku, metaboličku, komunikaciju malim signalnim molekulima i razmenu genetičkog materijala [10]. Međubakterijska komunikacija u biofilmu za posledicu ima povećanje šansi za njihovo preživljavanje u okviru zajednice. Klinički, kao posledica dolazi do povećanja otpornosti mikroorganizama biofilma na antimikrobne lekove. Osim sinergizma, u okviru biofilma prisutna je i kompeticija među mikroorganizmima, npr putem sinteze baktericina (Slika 1.2)

Kao što je rečeno, poslednja teorija (sinergizma i disbioze) ne priznaje isključivo tradicionalne periopatoгене kao jedine etiološke faktore parodontopatije. Po ovoj teoriji, raznovrsne kombinacije mikroorganizama stvaraju floru koja dovodi do oboljenja. S druge strane, ova teorija daje posebnu ulogu tzv “ključnim periopatoženima“. „Ključni patogeni“ će svojim prisustvom modifikovati komensalnu floru, odnosno „dirigovati“ florom i povećati patogenost celog biofilma, tačnije omogućiti drugim bakterijama da ispolje svoje štetne efekte. Na ovaj način dolazi do narušavanja homeostaze između mikroorganizama biofilma i tkiva i svoje štetno dejstvo ispoljavaju disbionti- normalno nepatogene bakterije koje u uslovima narušene homeostaze postaju patogene.



Slika 1.2: šematski prikaz interakcija među bakterijama biofilma. Isprekidane linije označavaju sinergizam, dok neisprekidane linije označavaju inhibiciju među mikroorganizmima.

1.2.2. Akcesorni faktori, modifikujući faktori i faktori rizika parodontopatija

Osim dentalnog plaka koji se smatra glavnim etiološkim faktorom parodontopatije, na nastanak, progresiju oboljenja i odgovor na terapiju znatno utiču akcesorni faktori, odnosno faktori rizika parodontopatije. Ovi faktori pomažu akumulaciju plaka/otežavaju njegovo uklanjanje ili olakšavaju dejstvo mikroorganizama. Definisani su kao lokalni i opšti.

Lokalnim akcesornim faktorima smatraju se druge naslage na zubima, impakcije hrane, loši ispuni i protetski radovi, traumatska okluzija, anatomska odstupanja mekih i tvrdih tkiva parodoncijuma.

Opšti akcesorni faktori- faktori rizika odnose se na neka oboljenja, ali i na bihevioralne i faktore okoline. Dva faktora kojima se najviše pridaje značaj su dijabetes melitus i pušenje cigareta. Dokazan je uticaj duvanskog dima na sastav flore, dozna zavisna korelacija konzumacije duvana i gubitka parodontalne kosti (4x veći gubitak kosti nego kod nepušača), lošiji odgovor domaćina na terapeutkse procedure (zarastanje, regeneracija kosti, lošiji pripoj fibroblasta za koren zuba). Takođe dokazan je direktan efekat duvanskog dima na smanjenu funkciju neutrofila i smanjenje funkcije T i B limfocita [14]. U poslednje vreme sve je više istraživanja povezanih sa gojaznošću [15], fizičkim [16], a naročito mentalnim stresom i parodontopatijom. Stres putem

neuroendokrinog sistema deluje na imuni sistem i danas se zna da imunološki disbalans izazvan na ovaj način može biti u vidu umanjenog, ali i preterano povećanog imunološkog odgovora [17]. Unos raznih mikronutrijenata (vitamin C, E, folna kiselina, melatonin) [18, 19], kafe [20], vitamina D [21], zatim pol (muškarci) [22] i godine su takođe neki od faktora koji se pozitivno ili negativno povezuju sa hroničnom parodontopatijom.

Zanimljivo je međutim da pacijenti sličnog zdravstvenog stanja, higijene i lokalnih akcesornih faktora mogu da imaju različite kliničke slike i različit odgovor na terapiju parodontopatije. Kod ovih pacijenta se govori o naslednoj podložnosti kao faktoru rizika, koja je za sada objašnjena kroz postojanje polimorfizama u genima za određene citokine i njihove receptore.

1.3. Patogeneza parodontopatije

Mnogi aspekti parodontopatije nisu još uvek objašnjeni ni najnovijim teorijama etiologije ovog oboljenja. Osim etiološkog faktora- mikroorganizama sigurno da je neophodan i podložan domaćin. I dalje ostaje pitanje zašto neki pacijenti kod kojih su detektovani tzv. ključni patogeni mogu da kontrolišu inflamaciju, dok kod drugih dolazi do narušavanja balansa biofilm-domaćin. Dobro je poznata činjenica da destruktivni procesi u parodontocijumu nisu posledica isključivo štetnih noksi koje produkuju same bakterije dentalnog biofilma nego su većim delom posledica dejstva supstanci koje sekretuje sam imuni sistem domaćina kao odgovor na prisustvo bakterija. Sam parodontocijum predstavlja strukturu jedinstvene anatomije- na tvrdo zubno tkivo koje je uvek prekriveno dentalnim plakom pripajaju se epitelne ćelije. Zahvaljujući stalnom prisustvu mikroorganizama, u parodontocijumu je prisutna stalna tzv. „fiziološka, kontrolisana inflamacija“ odnosno konstantna migracija leukocita (uglavnom fagocita) iz krvnih sudova u blizini. Urođeni imunitet (neutrofili i makrofagi) prepoznaje i reaguje na sve mikroorganizme u usnoj duplji (komensale i patogene). U slučaju parodontocijuma, komensali stimulišu konstantnu proizvodnju malih nivoa citokina neophodnih za održavanje primarnog imuniteta i održavanje integriteta tkiva [23].

U odbrani organizma od patogena učestvuju urođeni (primarni) i stečeni (sekundarni) imunitet koji komuniciraju putem veoma kompleksne i još uvek *in vivo* neistražene mreže citokina.

UVOD

Rana faza odgovora urođenog imuniteta karakteriše se pojačanom sekrecijom citokina ($\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, IL-17), koja će sa jedne strane voditi tkivnim promenama- vaskularnim, daljoj aktivaciji i migraciji neutrofila, i na kraju aktivaciji osteoklasta, a sa druge će dovesti do aktivacije antigen prezentujućih ćelija (APĆ) i aktiviranja specifičnog imuniteta [24]. Najvažniju ulogu u primarnom imunitetu u patogenezi parodontopatije imaju neutrofili. Pomalo je neuobičajeno da u jednom hroničnom oboljenju glavnu ulogu imaju ćelije koje su karakteristika akutnih infekcija, ali ova činjenica ide u prilog teoriji da parodontopatija predstavlja konstantan patološki proces smenjivanja relapsa (akutnih insulta) i remisija. Neutrofili uzrokuju destrukciju parodonticijuma oslobađanjem enzima (matriksne metaloproteinaze -MMP-), citotoksičnih supstanci (slobodni radikali, reaktivne kiseoničke i azotne vrste) i ekspresijom membranskih RANKL (Receptor aktivatora nuklearnog faktora β). Takođe, neutrofili indirektno učestvuju u destrukciji parodonticijuma i putem regrutacije Th17 ćelija. Tkivni makrofagi i dendritične ćelije predstavljaju glavne antigen prezentujuće ćelije. Epitelne ćelije, osim što predstavljaju fizičku barijeru, kao odgovor na prisustvo bakterija proizvode povećanu količinu citokina i ekspiriraju atehzione molekule. Tkivni fibroblasti takođe proizvode povećanu količinu citokina i pojačavaju inflamatorni odgovor u parodonticijumu [23].

Pojačana sinteza citokina nije rezultat samo odgovora na prisustvo bakterija već i raspadnih produkata samog tkiva, što govori u prilog da je etiološki parodontopatija mikrobno i autoimuno oboljenje. Na ovaj način ulazi se u krug pozitivne povratne sprege stimulacije citokina.

Ulogu u specifičnom imunitetu imaju T i manje B ćelije. Do skoro, ceo koncept patogeneze parodontopatije sa aspekta specifičnog imuniteta bio je objašnjen odnosom Th1 i Th2 ćelija. Smatrano je da u fazama remisije dominiraju Th1, dok su sa fazama progresije oboljenja povezivane Th2 ćelije. Kasnija istraživanja su pokazala sposobnost Th1 ćelija da ekspirira RANKL [25], kao i Th2 ćelija da putem sekrecije IL-4 i IL-13 inhibiraju osteoklastogenezu [26]. Otkriće Th17 i T regulatornih (T reg) ćelija, dodatno je objasnilo ulogu specifičnog imuniteta u patogenezi parodontopatije. Th17 ćelije čvrsto su povezane sa osteoklasnom aktivnošću. Citokin koji proizvode ove ćelije, IL-17 , indukuje ekspresiju MMP-a u fibroblastima, endotelnim i epitelnim ćelijama kao i ekspresiju RANKL-a na osteoblastima. Na ovaj način učestvuju u degradaciji mekih i

koštanih parodontalnih tkiva. Takođe, dokazana je uloga Th17 ćelija u aktivaciji B ćelija.

Za razliku od Th1 i Th2 ćelije, koje su relativno fenotipski stabilne, ostale T ćelije pod određenim uticajem kombinacije citokina ispoljavaju funkcionalnu plastičnost. Tako npr. Th17 ćelije se mogu funkcionalno transformisati u Th1 ćelije ili u Th2 ćelije. Isto tako, T reg ćelije u inflamiranom parodonticijumu mogu postati IL-17 sekretujuće ćelije. Glavnu ulogu u diferencijaciji, funkciji i održavanju T ćelija imaju citokini organizovani u kompleksnu mrežu. Do sada je dokazana najbitnije uloga IL-1 β , TNF α , IL-6 i RANKL-a u patogenezi parodontopatije (Tabela 1.1). Uloga imunološkog sistema prepoznata je i u koštanom metabolizmu. S toga se danas razvila čitava grana koja proučava vezu imunološkog sistema i koštanog metabolizma, tzv. osteoimunologija [27]. Sa aspekta destrukcije nekalcifikovanog vezivnog tkiva parodonticijuma ključan je MMP/TIMP sistem, dok se RANK/RANKL/OPG sistem smatra glavnim za destrukciju koštanog tkiva. U poslednje vreme dokazan je i mehanizam koštane resorpcije nezavisan od RANK/RANKL/OPG sistema, i ovde glavnu ulogu igra TNF α .

1.3.1. Mehanizmi koštane resorpcije u patogenezi parodontopatije- M-CSF i RANK/RANKL/OPG sistem

Metabolizam kosti je dinamičan proces, koji i u fiziološkim uslovima prolazi kroz stalan proces remodelacije- sinteze i degradacije koštanog tkiva za koje su zaduženi osteoblasti i osteoklasti. Osteoblasti se diferenciraju od mezenhimalnih stem ćelija, dok se osteoklasti diferenciraju od monocita i makrofaga. Osteoblasti i mezenhimalne ćelije koštane srži stimulišu diferencijaciju osteoklasta pod uticajem različitih stimulusa kao što su paratireoidni hormon, vitamin D, glukokortikoidi, i različiti inflamatorni citokini kao što su IL-1, IL-6 i TNF α .

1.3.1.1. Makrofagni kolonostimulišući faktor (M-CSF)

Makrofagni kolonostimulišući faktor jedan je od najranijih medijatora koštane resorpcije. Produkuju ga uglavnom osteoblasti i stromalne mezenhimalne ćelije. Uloga mu je u inicijaciji osteoklastogeneze, kao i u preživljavanju zrelih osteoklasta [28].

1.3.1.2.RANK/RANKL/OPG sistem

Ovaj sistem deo je TNF/TNFR superfamilije citokina i receptora. Sa ovim sistemom stupaju u interakciju mnogi citokini i na taj način indukuju koštanu resorpciju. RANKL (ligand receptora aktivatora nuklearnog faktora κ B) u uslovima normalnog koštanog metabolizma eksprimiraju osteoblasti, dok ga u inflamaciji eksprimiraju i ostale ćelije npr. aktivirani T i B limfociti, fibroblasti i mononuklearne ćelije [29] i pod uticajem je proinflamatornih citokina kao što su IL-1 i TNF α . RANK (receptor aktivator nuklearnog faktora κ B) je površinski ćelijski transmembranski receptor, eksprimiran na monocitno/makrofagnoj liniji ćelija, B i T ćelijama, dendritičnim ćelijama, fibroblastima, kao i prekursorima i zrelim osteoklastima. Po vezivanju RANKL za RANK na površini osteoblasta, nakon direktnog ćelijskog kontakta, dolazi do transformacije preosteoklasta u osteoklaste kao i aktivacije zrelih osteoklasta. Treći član ovog sistema je osteoprotežerin (OPG) koji predstavlja prirodni inhibitor- mamac receptor za RANKL. Sposoban je da se veže za RANKL i na taj način spreči vezivanje RANKL-a za RANK [29]. OPG proizvode gingivalni fibroblasti, epitelne i ćelije periodoncijuma. I ova sekrecija je pod kontrolom proinflamatornih citokina. Za homeostazu koštanog tkiva u stvari je bitan odnos RANKL/OPG. Dokazano je da OPG deluje na osteoklaste i direktno. Ovi, još nedovoljno istraženi mehanizmi dovode do inhibicije terminalne maturacije osteoklasta, supresije aktivacije već zrelih osteoklasta, kao i apoptoze samih osteoklasta [30].

1.3.2.MMP/TIMP sistem

Matriksne metaloproteinaze predstavljaju grupu endopeptidaza koje modeluju komponente vezivnog tkiva-kolagen, elastin, želatin, matriksne glikoproteine i proteoglikane. Većina MMP se ne proizvodi ili se pak proizvodi u minimalnim količinama u fiziološkim stanjima u tkivu odraslih osoba. Do sada je otkriveno 25 različitih tipova MMP svrstanih u 6 grupa. Sa aspekta patogeneze parodontopatije, najbitnije su MMP-2, MMP-8, MMP-9 i u manjoj meri MMP-13 i MMP-14.

MMP-8 i MMP-13 pripadaju grupi kolagenaza koje degradiraju kolagen tipa I, II i III. MMP-8 se može smatrati biohemijskim parametrom aktivnosti parodontopatije, dok se MMP-13 više smatra markerom reparacije parodontoncijuma u toku parodontopatije [31]. MMP-2 i MMP-9 pripadaju grupi želatinaza i degradiraju uglavnom kolagen tipa IV.

UVOD

MMP-14 pripada grupi membranskih MMP. Ispoljava kolagenaznu aktivnost na kolagen I, II i III. Dokazi o ulozi ovog enzima u destukciji parodonticijuma su još uvek oprečni, ali za sada se smatra da ima ulogu u ranim fazama destrukcije parodonticijuma, naročito zbog svoje sposobnosti da aktivira druge MMP.

Održavanje homeostaze tkiva postiže se kontrolom ovih degradirajućih enzima endogenim inhibitorima. Glavni endogeni inhibitori su tkivni inhibitori MMP- TIMP, zatim $\alpha 2$ makroglobulin, koji je najbitniji inhibitor u telesnim tečnostima.

Za održavanje homeostaze tkiva bitan je odnos MMP/TIMP i u mnogim studijama je dokazan povećan odnos kod pacijenata sa parodontopatijom [32].

Tabela 1.1: Karakteristike najvažnijih citokina u patogenezi parodontopatije

Citokin	Poreklo	Uloge
IL-1 α , IL-1 β , IL-1Ra	Monociti, makrofagi, neutrofili, keratinociti, epitelne ćć, fibroblasti	Proinflamatorni citokin (stimulacija koštane resorpcije)
TNF α	Makrofagi, T ly, neutrofili, B ćć, fibroblasti, osteoklasti, endotelne ćć	Proinflamatorni citokin, vazodilatacija, \uparrow permeabilnost ks, stimulacija koštane resorpcije
IL-6	T ćć, B ćć, makrofagi, osteoblasti, dendritične ćć, keratinociti, endotelne ćć, fibroblasti, adipociti	Proinflamatorni citokin, akutna inflamacija, koštana resorpcija
IL-17A, B, C, D, E (IL-25), F	T ćć, makrofagi, neutrofili, dendritične, mast ćć, NK ćć	Proinflamatorni efekti, koštana resorpcija (indukcija ekspresija RANKL na osteoblastima), indukcija ekspresije MMP. Antiinflamatorna uloga (može stimulisati zaštitni primarni imunitet)
IL-10	T reg Manje: Th1, Th2, Th17, CD8 ⁺ , monociti, makrofagi, dendritične ćć, B ćć	Antiinflamatorna uloga (inhibira aktivnost Th1, Th2, NK ćć, makrofaga, i druge APC) Proinflamatorna uloga (aktivacija B ćelijske proliferacije i sekrecija Ig)

1.4. Dijabetes melitus

Dijabetes melitus predstavlja grupu oboljenja koje karakteriše povećan nivo glukoze u krvi nastao kao posledica poremećaja sekrecije i/ili dejstva insulina. Danas se dijabetes klasifikuje (etiološki) u 4 grupe [33]:

1. Dijabetes tip 1 posledica je autoimune destrukcije β ćelija pankreasa i obično dovodi do apsolutnog nedostatka insulina. Iako se javlja uglavnom kod osoba do 30 godina, sporadično se može javiti kod odraslih kada se definiše kao latentni autoimuni dijabetes odraslih- LADA (*Latent Autoimmune Diabetes in Adults*).
2. Dijabetes tip 2
3. Drugi oblici dijabetesa (genetski defekti u funkciji β ćelija pankreasa ili insulinskom dejstvu), oboljenja egzokrinog pankreasa (npr: cistična fibroza), dijabetes u okviru drugih endokrinih oboljenja (npr: akromegalija) dijabetes indukovano lekovima, infekcijama, i dr.
4. Gestacioni dijabetes (dijabetes dijagnostikovano u toku trudnoće)

Dijabetes melitus je jedno od najčešćih oboljenja u skoro svim zemljama sveta; incidenca dijabetesa je u porastu zbog produženja životnog veka, promene životnog stila (sedentarni stil) i povećanja gojaznosti. Smatra se da će 2030. godine otprilike 439 miliona odraslih (7,7% svetske odrasle populacije između 20 i 79 godina) imati dijabetes [34]. Očekivani porast za period od 2010-2030. godine je 54%, gde se očekuje značajna razlika između razvijenih zemalja (porast od 20%) i zemalja u razvoju (porast od 69%) [34].

1.5. Tip 2 dijabetesa

Tip 2 dijabetesa (T2D) je hronični metabolički poremećaj koji karakteriše progresivna hiperglikemija kao posledica smanjene osetljivosti ćelija na insulin koju kasnije prati poremećaj sekrecije insulina. Smatra se da 90-95% pacijenta obolelih od dijabetesa čine oboleli od T2D.

1.5.1. Etiologija T2D

Etiološki, T2D smatra se oboljenjem životnog stila udruženo sa genetskim predisponirajućim faktorima [35]. Dijabetes je poligeno oboljenje koje je za genetičare i dalje misterija i već dugo se s pravom naziva „noćnom morom“ genetičara [36]. Studije na blizancima pokazale su da je udeo nasledne komponente čak 30-70% [37]. Studije genomskih asocijacija (*Genome Wide Association Studies- GWAS*) su identifikovale preko 70 lokusa potencijalno odgovornih za T2D [38]. Naravno, svaki pojedinačan lokus ima veoma malu ulogu u etiologiji dijabetesa, a čak i svi identifikovani lokusi zajedno objašnjavaju neznatan deo uloge nasleđa u dijabetesu. S druge strane postoji i

evolutivna teorija o tzv. „štedljivom genu“. Po ovoj teoriji, ljudski organizam je prilagođen na uslove gladovanja (6 hormona koji dovode do povećanja nivoa glukoze u krvi, a samo jedan hormon koji je snižava) i nosioci ovih gena mnogo bolje iskorišćavaju hranu i lakše akumuliraju masno tkivo [39]. Sa aspekta životnog stila, najveći faktori rizika za razvoj dijabetesa su visok kalorijski unos, nizak stepen fizičke aktivnosti [40, 41] i gojaznost (5-10 puta češća pojava dijabetesa kod gojaznih u odnosu na normalno uhranjene osobe). Osim ovih, i pušenje cigareta se smatra nezavisnom faktorom koji može da poveća rizik za nastanak T2D [42].

1.5.2. Patogeneza T2D

Insulinska rezistencija (IR) je ključni i primarni poremećaj koji se javlja u toku T2D. Prisustvo konstantne inflamacije niskog intenziteta dovodi do IR. Smanjenje sekrecije insulina je posledica povećane apoptoze β ćelija izazvane oksidativnim stresom i stresom endoplazmatskog retikuluma samih β ćelija. Do pojave oksidativnog i stresa endoplazmatskog retikuluma dolazi zbog visokog nivoa glukoze (glukotoksičan) i zasićenih masnih kiselina (lipotoksičan efekat) u krvi, povećanja amiloidnih depozita u pankreasu i inflamatornih citokina poreklom iz masnog tkiva.

Glavni citokini i adipokini uključeni u patogenezu IR i povećanog odumiranja β ćelija su IL-1, IL-6, IL-18, TNF α , leptin, rezistin i adiponektin. I citokini i adipokini imaju svoje uloge u tesno povezanom imunološko-metaboličkom odgovoru, neophodnom za održavanje homeostaze organizma. Dokazano je na više nivoa da TNF α izaziva, odnosno pogoršava insulinsku rezistenciju u masnom i mišićnom tkivu [43] kao i da povećava lipolizu što opet može dovesti do IR. IL-6 dovodi do poremećaja metabolizma glukoze na više nivoa- smanjenjem signalnih molekula neophodnih za preuzimanje glukoze od strane ciljnih tkiva, ali i poremećajem samog signalnog sistema na nivou ovih tkiva [44]. S druge strane postoje dokazi da na nivou adipocita on podstiče preuzimanje glukoze i dovodi do smanjenja nivoa glukoze u plazmi [45]. IL-1 posreduje u smanjenju osetljivosti ćelija na insulin, ali isto tako pokazuje i citotoksičnost na β ćelije pankreasa. On je jedan od najbitnijih proapoptotskih i proinflamatornih citokina zaduženih za odumiranje β ćelija pankreasa, a smanjuje i sintezu samog insulina u β ćelijama [46]. Povećani nivo IL-18 povezani su sa IR i T2D [47], a ovaj citokin smatra se i prediktorom makrovaskularnih dijabetičnih komplikacija. Glavni izvori

proinflatornih citokina u dijabetesu su masno tkivo i kasnije u toku bolesti zapaljenske ćelije koje se nagomilavaju u samim Langerhansovim ostrvcima.

Kao što je napomenuto, u patogenezi dijabetesa vremenom dolazi do smanjenja ili čak izostanska sekrecije insulina. U poslednje vreme je više dokaza da insulin ima mnoge druge uloge sem snižavanja glukoze u krvi. Tako, on deluje antiinflamatorno, indirektno putem smanjenja nivoa glukoze, ali i direktno, modualcijom ključnih inflamatornih molekula. Takođe, dokazano je da insulin inhibira aktivaciju oksidativnog stresa ali i da neutrališe prooksidativne efekte hiperglikemije [48, 49]. Iz ovih činjenica može se zaključiti da u slučaju nedostatka insulina, nedostaje još jedan mehanizam kontrole inflamacije i oksidativnog stresa. Rezultati odnosa inflamacije i T2D su oprečni. Postoje stavovi da se inflamacija u dijabetesu javlja sekundarno, odnosno kao posledica hiperglikemije [50]. S druge strane, istraživanja koja opovrgavaju teoriju o sekundarom povećanju citokina u dijabetesu, su ona koja pokazuju da kod pacijenata sa dijabetesom tip 1, nivo inflamatornih citokina nije povišen čak i kada imaju iste glikemija kao ispitanici sa T2D [51].

1.5.3. Komplikacije T2D

Najveći klinički i socijalno-ekonomski problem pacijenata sa dijabetesom su njegove komplikacije, akutne i hronične. Akutne komplikacije su dijabetička ketoacidoza, laktatna acidoza, dijabetesno neketogeno hiperosmolalno stanje i hipoglikemija u dijabetesu.

Glavne hronične komplikacije dijabetesa su: dijabetesna retinopatija, nefropatija, neuropatija i one se definišu kao mikrovaskularne komplikacije. Postoje i makrovaskularne hronične komplikacije (arterijska hipertenzija, ishemijska bolest srca, cerebrovaskularna bolest, periferna vaskularna bolest-dijabetesno stopalo). Kod dijabetičara nisu retke urinarne infekcije, infekcije respiratonog trakta, gastrointestinalog trakta, infekcije mekih tkiva i kostiju; kožna oboljenja i dr.

1.6. Dvosmerna veza parodontopatije i dijabetesa

1.6.1. Uticaj dijabetesa na stanje usne duplje i parodontalnih tkiva

Klinička slika T2D je često zamaskirana i praćena blagim simptomima (za razliku od tipa 1 dijabetesa), pa se dešava da je dobro obučan stomatolog taj koji uputi pacijenta na

eventualno postojanje oboljenja. Kod obolelih od dijabetesa, patologija oralnih tkiva je raznovrsna i zahvata i meka i čvrsta zubna tkiva.

Dentalni karijes

Veza između karijesa i dijabetesa je dosta dugo i ekstenzivno proučavana, ali su rezultati kontradiktorni. Dijabetes tip 1 se dijagnostikuje uglavnom u ranim godinama i kod ovih pacijenata je unos ugljenih hidrata limitiran od najranije mladosti [52]. Generalan je stav da je kod obolelih od dijabetesa tipa 2, koji se dijagnostikuje kasnije i povezan je sa povećanim kalorijskim unosom, povećana incidenca karijesa, što se objašnjava smanjenjem salivacijom, glikosijalijom i promenom flore i pH usne duplje, kao i neadekvatnom oralnom higijenom.

Kserostomija

Osećaj suvoće usta je čest oralni simptom pacijenta sa dijabetesom. Pretpostavlja se da može biti posledica poliurije, polidipsije, ili promena u bazalnom membrani samih pljuvačnih žlezda [53], kao i posledica drugih medikamenata koje pacijenti koriste ili starosti samog pacijenta.

Oralni mukozni poremećaji

Neke studije su dokazale povećanu incidencu lihen planusa i rekurentnog aftoznog stomatitisa [54] kod obolelih od dijabetesa. Pretpostavlja se da su ova oboljenja posledica imunološkog disbalansa koji se javlja u obolelih od dijabetesa.

Oralna kandidioza

Infekcije oportunističkim patogenima svrstavaju se u hronične komplikacije dijabetesa. Imunološki disbalans, hiposalivacija, glikosijalija i promene pH mogu biti neka od objašnjenja za pojavu ovih infekcija.

Poremećaj ukusa

Poremećaj ukusa kod pacijenata sa dijabetesom mogu biti posledica neuropatije, hiposalivacije ili promene načina ishrane.

1.6.1. Gingivitis i parodontopatije

Za razliku od prethodnih oboljenja usne duplje, dokazi o parodontopatiji kao oralnoj manifestaciji dijabetesa su konzistentni. Već preko 20 godina, ona se smatra šestom komplikacijom dijabetesa [55]. Pacijenti sa dobro kontrolisanim dijabetesom imaju 1,56 puta veće šanse da obole od parodontopatije u odnosu na zdrave ispitanike, dok je ovaj odnos kod pacijenata sa lošom glikoregulacijom čak 2,9 puta [56]. Neke studije su

pokazale da je parodontopatija prva klinička komplikacija dijabetesa kod dece i omladine i dokazale su povezanost između parodontalne destrukcije i loše glikoregulacije u dužem vremenskom periodu [57]. Postoji mnogo potencijalnih mehanizama koji objašnjavaju destrukciju parodontalnih tkiva kod pacijenata sa dijabetesom.

Ranije se smatralo da se flora parodontalnih džepova sistemski zdravih i pacijenata sa dijabetesom razlikuje. Iako je veoma teško porediti sve studije koje su se bavile ovom tematikom, prihvaćen je stav da se mikrobiološka flora ove dve grupe pacijenata ne razlikuje [58]. Kod pacijenata sa dijabetesom, imunoinflamatorni odgovor na mikroorganizme je prenaplašen. Vezivanje AGE-RAGE (*Advanced Glycation End Products*, *Receptor for Advanced Glycation End Products*) sistema na više načina doprinosi destrukciji parodontalnih tkiva: na površini endotelnih ćelija indukuje ekspresiju VCAM-1 (vaskularni adhezivni molekul tip 1) koji dodatno privlači monocite i pojačava imuni odgovor [52], putem aktiviranja RANKL sistema pojačava osteoklastogenezu [59], i dovodi do pojačanog/produženog imunog odgovora, transformišući makrofage u ćelije destruktivnog fenotipa (povećava koncentracije IL-6 i TNF α). Sa druge strane, sva tri pomenuta patološka procesa (AGE, ROS i TNF α) su proapoptotski signali. Pojačana apoptoza je mehanizam koji objašnjava mnoge komplikacije dijabetesa pa i destrukciju, tačnije poremećenu reparaciju parodontalnih tkiva. Dokazano je da su ćelije parodontalnih tkiva osetljive na fluktuacije nivoa glukoze [60]. Kod pacijenata sa dijabetesom povećana je koncentracija proinflamatornih citokina i TNF α , koji mogu dovesti do pogoršanja već postojeće parodontopatije različitim mehanizmima, kao što su stimulacija sekrecije MMP iz gingivalnih fibroblasta [61] ili stimulacija osteoklastogeneze [62].

1.6.2. Uticaj inflamacije iz parodontalnih džepova na glikoregulaciju- parodontalna medicina

Termin parodontalna medicina pojavljuje se u literaturi još 1996. godine i podrazumeva novu oblast parodontologije koja proučava dvosmernu vezu između oboljenja parodontalnih tkiva i sistemskih oboljenja. Postoje mnogi načini koji pokušavaju da objasne povezanost parodontopatije i sistemskih oboljenja [63].

1. Zajednički faktori rizika- faktori rizika za progresiju parodontopatije su često i najbitniji faktori rizika za nastanak mnogih sistemskih oboljenja, npr. pušenje

cigareta, stres, godine, rasa, pol, fizička aktivnost, a u poslednje vreme se pominju i zajednički genetski faktori (polimorfizmi).

2. Subgingivalni biofilm, rezervoar bakterija- dejstvo biofilma još 1984. godine je definisano na tri načina [64]:
 - a. *Metastatska infekcija*- bazira se na tranzitnoj bakterijemiji. U normalnim uslovima, bakterije koje prodru u sistemsku cirkulaciju bivaju eliminisane retikuloendotelnim sistemom.
 - b. *Metastatska povreda*- parodontcijum predstavlja konstantan izvor egzo- i endotoksina (lipopolisaharida-LPS) bakterija dentalnog biofilma. Sistemsko prisustvo LPS dovodi do vaskularnog odgovora [65, 66].
 - c. *Metastatska inflamacija*- bazira se na taloženju imunih kompleksa nastalih vezivanjem antigena bakterija dentalnog biofilma sa odgovorajućim antitelima u cirkulaciji i njihovim taloženjem u udaljena tkiva/organe.
3. Parodontcijum kao konstantan izvor proinflamatornih citokina- mnogi proinflamatorni citokini (posebno IL-1 β , TNF α , PGE $_2$) se sintetišu pojačano u inflamiranom parodontcijumu.

Zahvaljujući dobroj prokrvljenosti inflamiranog parodontcijuma i ulcerisanim parodontalnim džepovima, parodontcijum obolelih od parodontopatije može biti konstantan izvor svih pomenutih supstanci (bakterijskih toksina, antigena i citokina) i na taj način može doći do modifikovanja mnogih stanja i oboljenja. Procenjuje se da je površina ulcerisanog epitela kod pacijenata sa srednje teškim i uznapredovalim formama parodontopatije veličine površine šake [63]. Ova površina je individualna, i zavisi od broja zuba, morfologije korenova, dubine parodontalnih džepova, same inflamacije...Površina ulcerisanog epitela, tačnije površina inflamiranog ulcerisanog epitela bi bile dobra mera uticaja inflamiranog parodontcijuma na sistemske zdravlje. Sistem koji za sada najbolje opisuje površinu inflamiranog parodontcijuma je PISA (*Periodontal Inflamed Surface Area*) [67], detaljnije opisan u poglavlju Materijal i metode. Ukratko, ovaj sistem koristi mere dubina sondiranja, nivoa pripojnog epitela i krvarenja na provokaciju na 6 tačaka po zubu u cilju izračunavanja konačne površine parodontcijuma koja utiče na sistemske zdravlje. Mane ovih algoritama su što koristi prosečne dužine i površine korenova za izračunavanje i što računa količinu zapaljenog tkiva u dve dimenzije (mm 2), a sama inflamacija je trodimenzionalni proces, odnosno

zahvata tkivo u dubinu. Takođe, PISA nikako ne može da uzme u obzir i vrstu bakterija u samom biofilmu. Bez obzira na sve mane, ovo je za sada najprecizniji mehanizam merenja uticaja inflamacije iz parodontijuma na sistemsko zdravlje.

Sve je veći broj studija koje govore u prilog uticaja inflamacije iz parodontijuma na glikoregulaciju kako obolelih od dijabetesa, tako i sistemski zdravih ispitanika, kao i o uticaju pomenute inflamacije na pojavu komplikacija dijabetesa. Različite studije su se bavile ovom problematikom. Opisani su brojni mehanizmi međusobnog recipročnog uticaja ova dva oboljenja.

Epidemiološki podaci takođe govore u prilog uticaja parodontopatije na pojavu dijabetesa. Istraživanje *Soskolne* i sar. pokazalo je da pacijenti sa parodontopatijom imaju dva puta veću šansu da obole od dijabetesa u odnosu na pacijente bez kliničkih znakova parodontopatije (korišćeni podaci 13471 pacijenta u retrogradnoj studiji) [68].

1.6.2.1. Longitudinalne (kohortne) studije

Studije ovog tipa su retrospektivne i propektivne. Retrospektivne koriste informacije uglavnom iz velikih baza podataka. Problem predstavljaju sami klinički parametri koji se prate- različiti parametri od studije do studije, definisanje ovih parametara, kao i različite metode definisanja dijabetesa (anamenstički ili laboratorijski) i praćenja glikoregulacije.

Retrospektivna studija [69] pratila je nivo HbA1c kod pacijenata sa dijabetesom sa/bez uznapredovale parodontopatije u periodu od 2-3 godine. Pogoršanje glikoregulacije uočava se kod pacijenata sa parodontopatijom u odnosu na ispitanike sa klinički zdravim parodontijumom. Longitudinalna 10-ogodišnja studija koja je pratila normoglikemijske pacijente, pacijente sa IR i pacijente sa dijabetesom zaključila je da je povećanje dubine sondiranja bilo povezano sa prelaskom iz normoglikemijskog u IR stanje [70]. *Taylor* i sar. su praćenjem Pima Indijanaca u periodu od dve godine pokazali da T2D pacijenti sa uznapredovalom parodontopatijom imaju šest puta veće šanse da imaju lošu glikoregulaciju od pacijenata bez ovog stanja u usnoj duplji [71]. Veći rizik nastanka komplikacija (nefrološke i kardiovaskularne) [72] kao i veća smrtnost od ovih komplikacija [73] pokazana je kod obolelih od dijabetesa sa uznapredovalom parodontopatijom u odnosu na pacijente sa dijabetesom i gingivitisom odnosno blagom formom parodontopatije (Tabela 1.2)

UVOD

Tabela 1.2: Longitudinalne (retrospektivne i prospektivne) studije uticaja inflamacije iz parodontcijuma na glikoregulaciju

Referenca	Zemlja, grupe, period	Stanje oralnih tkiva	Glikoregulacija	Zaključak
<i>Collin i sar</i> [69]	Finska, KG (n=40) sistemski zdravi EG (n=26) T2D pacijenti t=15 godina	PI, KNP, Rec, Indeks kamenca, DS, NPE, RA snimci, PCR	HbA1c	Uznappedovala PD povezana sa pogoršanjem glikoregulacije (HbA1c)
<i>Saito i sar</i> [70]	Japan 591 ispitanik, t=10 godina	PI, DS, NPE,	HbA1c, OGTT	Povezanost ↑DS sa prelaskom normoglikemijskog stanja u IR
<i>Taylor i sar</i> [71]	SAD t=6 godina	NPE, radiološki gubitak kosti	HbA1c	Pogoršanje glikoregulacije kod pacijenata sa uznappedovalom PD u odnosu na one bez
<i>Thorslensson i sar</i> [72]	Slučaj-kontrola. Kontrola: T1D i blagaPD Slučaj: T1D i uznappedovala PD, t=6 godina	PI, DS, NPE, radiološki gubitak kosti	HbA1c	Pacijenti sa uznappedovalom PD imaju veći rizik za bubrežne i kardiovaskularne komplikacije
<i>Saremi i sar</i> [73]	SAD 628 ispitanika, t=11 godina	Pregled oralne sluzokože, NPE, radiološki gubitak kosti	HbA1c, glukoza našte	PD se može smatrati prediktorom smrtnosti od kardiorrenalnih komplikacija kod T2D

KG=kontrolna grupa; EG=eksperimentalna grupa; t=period praćenja; OHi=instrukcije o održavanju oralne higijene, PD=parodontopatije, RA= retroalveolarni radiogram

1.6.2.2. Intervencione studije

Mnogobrojne intervencione studije govore u prilog poboljšanja HbA1c nakon kauzalne terapije parodontopatije sa/bez upotrebe antibiotika nakon tri meseca [74, 75, 76, 77, 78]. Nakon šest meseci ovaj efekat uglavnom ne postoji. Nepromenjene vrednosti HbA1c nakon šest meseci objašnjene su činjenicom da kad je parodontalna inflamacija pod kontrolom, tada dalja terapija parodontopatije nema uticaj na glikoregulaciju [79]. S druge strane, ukoliko se kauzalna faza sprovodila samo u nultom periodu posete,

p/ogoršanje glikoregulacije nakon šest meseci objašnjeno je naknadnom repopularizacijom džepova i posledičnom inflamacijom. (Tabela 1.3).

1.7.Patogenetske sličnosti dm i pdp

1.7.1.Genski mehanizmi

Osim uticaja inflamacije iz parodontijuma na glikoregulaciju, govori se i o zajedničkim patološkim defektima koji čine domaćina više podložnim jednom ili oba oboljenja. U prilog ovome govori činjenica da su i dijabetes melitus i parodontopatija oboljenja koja se viđaju u okviru porodica. S obzirom da nijednom oboljenju nije otkriven određeni gen odgovoran za pojavu oboljenja, smatraju se poligeniskim bolestima [68]. Pretpostavlja se da je nemogućnost kontrole citokinske mreže, koja je inače pod genetskim uticajem, potencijalno objašnjenje ovih, u osnovi, inflamatornih oboljenja. U okviru ove hipoteze izučavaju se genske varijacije prisutne kod ispitanika sa oba oboljenja.

1.7.2.Imunološki mehanizmi

I T2D i parodontopatija se smatraju prenaplašenim imunim odgovorom na stresore. U slučaju parodontopatije, ovi stresori su dentalni biofilm, cigarete i mentalni stres. U T2D, to su hiperkalorijski unos hrane, mentalni stres i nedostatak fizičkog vežbanja [68]. Stresori ispoljavaju svoj efekat putem različitih ćelija uključenih u imunološki odgovor: makrofaga/monocita, limfocita, fibroblasta i endotelnih ćelija. Studije pokazuju da PgE₂, TNFα i IL-1 pokazuju sličnu, povećanu produkciju kod obolelih od dijabetesa, parodontopatije ili oba oboljenja (Tabela 1.4).

Tabela 1.3: Intervencione studije-uticaj inflamacije iz parodontijuma na glikoregulaciju

Referenca	Zemlja; (kg, eg)	Klin preg.	HbA _{1c}	Terapijski protkol	HbA _{1c} :0→3 mes→6 mes	Zaključak
<i>Kiran M i sar</i> (2006)[74]	Turska, N=44 (KG=22, EG=22)	DS, NPE, PI, GI, KNP, GR	6-8%	Početak: svi: OHi, endo th, kauz th EG: kauz th-1. i 3. mes	KG: 7,0±0,7→7,3±2,1 EG: 7,3±0,7→6,5±0,8	Kauz th PD poboljšava HbA _{1c} i glukozu našte
<i>Singh S i sar</i> (2008) [75]	Indija, N=44 (KG,EG, EG ₂ =15)	DS, NPE, PI, GI	<7,5%	KG: bez th EG ₁ : OHi, kauz th EG ₂ : EG ₁ doksiciklin	KG:8,1±0,7→8,2 EG ₁ :7.9±0.7→7,3 EG ₂ :8,3±0,7→7,5	Poboljšanje klin. parametara→ poboljšanje glikoreg.

UVOD

<i>Katagiri</i> S i sar. (2009) [76]	Japan, N=49 (KG=17, EG=32)	DS, KNP	6,5-10%	KG: OHi EG: kauz th i lokalna aplikacija monociklina	KG: 6,9±0,9→7,06 EG: 7,2±0,9→7,06	Kauz th PD+ lokalni ab poboljšavaju glikoreg. i smanjenje CRP-a
<i>Koromantzos</i> PA i sar. (2011)[77]	Grčka, N=60 (KG=30, EG=30)	DS, NPE, KNP, GI	7-9,9%	KG: OHi i supragingival no uklanjenje naslaga EG: OHi i kauz th PD	KG: 7,6±0,7→ 7,4±0,5 →7,5±0,6 EG: 7,9±0,7→7,1±0,5 →7,1±0,9	Kauz th PD dovodi do poboljšanja glikoreg. kod T2D pacijenata posle 1,3 i 6 meseci
<i>Moeintaghavi</i> A i sar. 2012 [78]	Iran, N=40 (KG=18, EH=22)	PI, DS, NPE, GI	>7%	KG: OHi EG: OHi i kauz th	KG: 8,72±2,22→ 8,97±1,82 EG: 8,15±1,18→ 7,41±1,18	Kauz th PD dovodi do poboljšanja glu i HbA1c kod pacijenata sa umerenom/lošom glikoreg
<i>Engbreton</i> SP i sar. 2013[80]	Amerika N=275 (KG=23 5, EG=240)	DS, NPE, PI, KNP	7-9%	Kg: OHi Eg: OHi, kauz th i hlorheksidin	KG: 7,77±0,60→ 7,85→7,88 EG: 7,84±0,65→ 7,97→7,99	Kauz th PD nije poboljšala glikoreg kod T2D pacijenata
<i>Chen i sar</i> 2012 [81]	Kina, N=134 (KG=65 EG=69)	DS, NPE, PI, KNP	Dobra glikoreg	KG:bez th EG ₁ : kauz th (0 i 3 mes) EG ₂ : kauz th (0mes)i supragingival ne naslage (3 mes)	KG: 7,25→7,30 EG ₁ : 7,31→7,30 EG ₂ : 7,29→7,43	Poboljšanje kliničkih parametara PD u EG1 i EG2 nije bilo praćeno poboljšanjem glikoreg.
<i>Rodrigues i</i> sar. 2003 [82]	Brazil N=30 (EG ₁ =15, EG ₂ =15)	PI, KNP, DS, NPE, sunuraciia	Nije definisano	EG ₁ : OHi, kauz th +ab. EG ₂ : OHi, kauz th	EG ₁ : 9,5±2,4→9,2±1,6 EG ₂ : 8,8±1,8→7,6±1,4	Statistički značajno poboljšanje glikoregu. EG2 grupi

OHi- instrukcije o održavanju oralne higijene; kauz th- kauzalna faza terapije; N- broj ispitanika; PD-parodontopatija; KG=kontrolna grupa; EG= eksperimentalna grupa, ab=antibiotik, glikoreg=glikoregulacija

Tabela 1.4: Studije koje povezuju parodontopatiju i/ili dijabetes melitus sa povećanom produkcijom PgE₂, TNF α i IL-1.

Citokin	Dijabetes	Parodontopatija	Dijabetes i parodontopatija
PgE ₂	Inhibicija sinteze PgE ₂ inhibira streptozotocin indukovani DM kod miševa [83]	Povećana sekrecija PgE ₂ u perifernim monocitima kod pacijenata sa PD [84]	Povećana sekrecija PgE ₂ kod pacijenata sa PD i DM u odnosu na sistemski zdrave pacijente sa PD [85]
IL-1	Selektivno citotoksičan za β -ćelije [86]	Povećana sekrecija u perifernim monocitima u agresivnoj PD [84, 87] Polimorfizam na genu za IL-1 povezan sa PD [88]	Povećana koncentracija IL-1 u sulkusnoj tečnosti i u perifernim monocitima kod pacijenata sa DM i PD u odnosu na sistemske zdrave ispitanike sa PD [85]
TNF- α	TNF- α u sistemskoj IR putem inhibicije insulinskog receptora tirozin kinaze u mišićnom i masnom tkivu [89, 90]	Serumski nivo TNF α znatno povišen kod pacijenata sa PD u odnosu na sistemski zdrave ispitanike [91]	Pacijenti sa DM kod kojih je rađena kauzalna terapija PD pokazali su značajno smanjenje cirkulišućeg TNF α u odnosu na parodontološki netretirane pacijente sa DM [92]

PD=parodontopatije, DM=dijabetes melitus

1.7.3. TNF α kao potencijalni citokin koji objašnjava dvosmernu vezu parodontopatije i dijabetesa

Kao što je već pomenuto, povećane koncentracije cirkulišućeg TNF- α mogu dovesti do pogoršanja već postojeće parodontopatije putem stimulacije destrukcije mekih i tvrdih parodontalnih tkiva. Povećanje inflamacije u parodontacijumu zatim može povećati ekspresiju TNF- α u monocitima i tako dovesti do dodatne smanjene osetljivosti na insulin, delujući na jetru, mišiće i masno tkivo direktnim mehanizmima, ali indirektnim, stimulacijom drugih molekula koji dovode do insulinske rezistencije [93].

1.8. Interleukini (Citokini)

Interleukini (IL) su polipeptidni/glikoproteinski regulatorni molekuli koje može da produkuje praktično svaka ćelija sa jedrom. Odgovorni su za ćelijsku komunikaciju u fiziološkim i patološkim uslovima.

Strukturalne analize omogućile su grupisanje IL u takozvane familije, npr. IL-2/IL-4, IL-6/IL-12, IL1, TNF α .

1.8.1. TNF alfa/TNF receptor (TNF/TNFR) familija citokina

Faktor nekroze tumora α (TNF α) i limfotoksin alfa (LT α) su dva prva izolovana interleukina ove familije. Njihova prvootkrivena uloga bila je nekroza tumorskih ćelija, a zatim kaheksija životinja inficiranih parazitima [94]. Ubrzo zatim, otkriveno je da ovi citokini pripadaju familiji citokina koji moduliraju mnogobrojne imunološke funkcije.

Iako među članovima ove superfamilije postoji mala homologija ekstracelularne komponente, njihova jedinstvena karakteristika je trostruko savijena struktura- trimerna forma. Ligandi su tip 2 proteini i mogu biti u „pro“- transmembranskoj formi ili u solubilnoj- zreloj formi. Obe forme su aktivne kao samostalni nekovalentni trimeri. Spoljašnje površine trimera pokazuju minimalnu sličnost, dok unutrašnje površine pokazuju analogiju u 25-30% amino kiselina.

Receptori su tip 1 proteini. Putem disulfidnih veza formiraju domene bogate cisteinom u ekstracelularnom domenu, što je jedna od karakteristika TNFR familije. Ove receptore neki svrstavaju u tri grupe: receptore koji poseduju domen smrti (*Death Domain*- DD), receptore koji ne poseduju DD i one koji deluju kao „mamac“ (*decoy*) receptori. Poslednje karakteriše nedostatak transmembranskog i citoplazmatskog dela, pa samim tim vezuju ligand bez dalje indukcije ćelijskih signala [95].

Određeni ligandi odnosno receptori iz TNF superfamilije mogu se vezivati za više kompatibilnih receptora/liganada sa istom specifičnošću, što doprinosi regulatornoj fleksibilnosti i kompleksnosti. Glavne uloge ćelijske smrti indukovane putem DD su ćelijska citotoksičnost kao odgovor na prisustvo infektivnih agenasa i imuna homeostaza koja se ogleda u održavanju balansa ponavljane limfocitne ekspanzije kao odgovor na antigene u prostorno ograničenom tkivu limfnih organa. Među mnogobrojnim funkcijama ove familije, jedinstvena im je uloga sposobnosti destrukcije, izgradnje i remodelacije tkiva [96]. Danas je poznata i vitalna uloga ove familije u balansu ćelijskog umiranja i preživljavanja.

1.8.1.1. Faktor nekroze tumora- TNF α

TNF α je potentni proinflamatorni citokin koji sekretuju mnogobrojne ćelije kao odgovor na inflamaciju, infekciju, povredu ili bilo koje druge nadražaje [97]. Prvenstveno ga produkuju aktivirani makrofagi, monociti, NK ćelije, a manje keratinociti, mast ćelije, fibroblasti, glatkomišićne i neke tumorske ćelije. U koštanom

UVOD

tkivu ga proizvode osteoblasti i osteoklasti. TNF α se sintetizira kao propeptid u transmembranskoj formi (26kDa, 212 AA). Solubilna forma (17kDa, 185 AA) se oslobađa pomoću TNF α konvertujućeg enzima (TNF α Converting Enzyme-TACE/ADAM17) [98]. TACE također može da uklanja TNF receptore sa površine ćelije. Solubilna i transmembranska forma imaju različite funkcije, a njihovu bioaktivnost reguliraju solubilni receptori.

Funkcije TNF α karakterizira kompleksnost i slojevitost, koje potiču od prisustva dve forme (s i tm) kako samog liganda tako i dva receptora, njihovog međusobnog odnosa kao i složene mreže intraćelijskog prenosa signala. Iako je uloga TNF α je od vitalnog značaja za odbrambene mehanizme domaćina, u višku TNF α ispoljava štetne efekte [99]. Putem svojih receptora on može aktivirati signale odgovorne za programiranu ćelijsku smrt ili signale za modulaciju apoptoze, ćelijsko preživljavanje i proliferaciju [100]. Primarna uloga TNF α je regulacija i razvoj imunološkog sistema. Uloga TNF α bila bi sinergističko izazivanje lokalnog imunološkog odgovora sa IL-1 i IL-6, i pokretanje urođenog i stečenog imuniteta sa ciljem borbe protiv infekcije [95]. TNF α ima bitne uloge u metabolizmu lipida, indukuje lipolizu i stimuliše lipogenezu u jetri [101]. Solubilna i transmembranska forma TNF α vrše različite uloge-sforma zadužena je uglavnom za sistemske i štetne efekte, dok je tm forma zadužena za korisne efekte [102].

Biosinteza TNF α je strogo kontrolisan proces na transkripcionom, translacionom i posttranslacionom nivou, sa ciljem da organizam osigura produkciju malih količina ovog citokina u fiziološkim uslovima, a omogućiti brzu i značajnu ushodnu regulaciju u stimulisanim ćelijama i da ograniči dejstvo ovog citokina kada više nema potrebe za njegovim dejstvom. Na sintezu TNF α utiče mnogo faktora. Iako se starenje smatra stanjem udruženim sa povećanom produkcijom citokina, teško je razdvojiti uticaj samog starenja od uticaja komorbiditeta vrlo često prisutnih kod starijih osoba. Neke studije nalaze povećan nivo TNF α [103], neke nepromenjen [104] u odnosu na mlađe ispitanike. Iako je i starenje bez dijagnostikovanih komorbiditeta praćeno pojačanom ekspresijom TNF α , ovo povećanje je 2-4 puta, što je daleko manje od povećanja u akutnim zapaljenjima. Uticaj polna, tj polnih hormona na sintezu TNF α je predmet istraživanja od samog prepoznavanja ovog citokina. Iako je generalni stav da premenopausalne žene pokazuju veću količinu sekretovanog TNF α , postoje dokazi da

uticaj estrogena na sintezu TNF α zavisi od koncentracije ovog hormona [105]. Bez obzira što su adipociti izvor samog TNF α , veze indeksa telesne mase (IMT) i koncentracije citokina su oprečne [106, 107]. Psihički stres modulira imuni odgovor u oba smera, zavisno od tipa stresa, ali i elemenata imunološkog sistema koje posmatramo kao ishodišne varijable. Neka istraživanja su pokazala povećan nivo TNF α u stresu [108], dok su druga pokazala njegov nepromenjen nivo [109]. Jedan od stavova je da je stimulacija imunog sistema u stresu samo prolazna faza, koja prethodi realnoj depresiji imuniteta [110]. Vežbanje je još jedan od faktora koji na različite načine utiče na nivo TNF α . I ovde je prisutna nekoznistentnost rezultata zbog različitih načina vežbanja i utreniranosti ispitanika, kao i kitova za određivanje koncentracija. Bez obzira na ove razlike, mogao bi se izdvojiti stav da jednokratno vežbanje slabog do umerenog intenziteta osoba nenaviknutih na aktivnosti prvo dovodi do povećanja, a zatim smanjenja nivoa TNF α u serumu [111], dok umereno kontinuirano vežbanje dovodi do smanjenja koncentracije TNF α [112]. Produkcija TNF α po uticajem je i duvanskog dima. Mnogobrojne studije izučavale su akutne i hronične uticaje cigara, cigareta i esktrakata različitih duvana na raznovrsnim modelima (humani, animalni, *in vitro*), tako da rezultati ovih studija nisu jednostavni za poređenje. Uticaji akutnog izlaganja duvanu zavise od doza i vremena ekspozicije kao i merenja samog citokina. U nekim studijama TNF α je opisan kao glavni medijator inflamacije izazvane akutnim dejstvom duvana [113]. U drugim je ovaj efekat definisan kao suprimirajući [114], što je objašnjeno antiinflamatornim dejstvom ugljenmonoksida. Dugoročan uticaj duvana na nivo TNF α u serumu uglavnom je definisan kao stimulativni.

Dugo se smatralo da su jedini stimulus za sintezu TNF α bakterijski endotoksini (LPS-lipopolisaharid). Sada se zna da ushodnu regulaciju sinteze ovo citokina mogu podstaći i enterotoksin, granulocitni kolonostimulišući faktor, hipoksija, IL-1, leukotrijeni, melitin, azot oksid, C5a anafilotoksin, slobodni radikali, parazitarni i mikotični antigeni, radijacija, UV svetlo u epitelnim ćelijama. Supresori ekspresije TNF α u makrofagima su PgE₂, transformišući faktor rasta β , IFN α , IFN γ , IL-4, IL-6, IL-10, kolonostimulišući faktor, određeni virusni produkti, deksametazon, glukokortikoidi, ciklosporin A, holinergički agonisti uključujući nikotin i acetyl-holin [115]. Takođe, putem stimulacije određenih antiinflamatornih supstanci kao što su IL-10, kortikosteroidi i prostaglandini, sam TNF α negativnom povratnom spregom suprimira svoju ekspresiju.

1.8.1.2.Limfotoksin α (LT α)

Limfotoksin α (prvobitno definisan kao TNF β) otkriven je gotovo istovremeno kad i TNF α . Za razliku od TNF α , LT α sekretuju isključivo limfociti (CD4+ i CD8+), NK ćelije, makrofagi i B ćelije [116]. LT α je najbliži strukturni homolog TNF α i homologija ova dva citokina je 30% u primarnom aminokiselinskom sastavu, ali je još većeg značaja međusobna visoka podudarnost tercijarne i kvaternerne strukture [117]. Kao i TNF α , LT α je trimer sastavljen iz tri monomera veličine 17kDa. Iako je sličnost velika, određene razlike postoje, pa se tako, sekretuje isključivo u solubilno formi, a vezan za ćelijsku membranu se može naći kao heterotrimer sa LT β . Sa aspekta receptora, sličnost sa TNF α je reagovanje sa TNFR1 i TNFR2, a razliku predstavlja vezivanje ovog solubilnog citokina istim afinitetom za oba receptora [118]. LT α sa LT β formira dve vrste heterotrimerera, LT $\alpha_2\beta_1$ (čini samo 2%) i dominantni LT $\alpha_1\beta_2$ heterotrimer [119]. Geni za LT α i LT β nalaze se sa obe strane gena za TNF α , na hromozomu 6. LT $\alpha_1\beta_2$ kompleks poseduje sopstvene receptore i signalne puteve, a vezuje se za posebni receptor-LT $\alpha\beta$ R, tip 1 transmembranski receptor [120]. LT $\alpha_1\beta_2$ kompleks eksprimiran je na B, T, NK i limfnim ćelijama koje učestvuju u formiranju limfoidnih organa. Ranije se smatralo da je uloga LT α u indukovanju nekroze određenih ćelija skoro identična sa ulogom TNF α , dok je njegova uloga u inflamaciji i citotoksičnosti tumorskih ćelija daleko manja- uloga parcijalnog agonista [121]. Danas se smatra da ova dva citokina dele neke zajedničke funkcije, ali poseduju i sopstvene uloge. LT α ima ulogu u velikom broju inflamatornih, imunostimulatornih i antivirusnih odgovora. Njegova uloga u formiranju sekundarnih limfnih organa je od vitalnog značaja, tako LT α nokaut miševi ne poseduju Pajerove ploče, dok su limfni nodusi poremećene arhitekture [122]. Osim uloge u formiranju sekundarnih limfnih organa, LT α ima ulogu i u obezbeđivanju adekvatnog mikrokruženja limfnim organima. LT α ima ulogu limfoangiogenezi u inflamaciji, i njegovo prisustvo neophodno je za diferencijaciju, regrutaciju i antitumorsku aktivnost NK ćelija [123]. Na animalnim modelima utvrđena je uloga ovog limfokina u odbrani od određenih patogena.

1.8.1.3.Receptori TNFR $_1$ i TNFR $_2$

TNF α i LT α dele dva zajednička receptora- TNFR $_1$ (CD 120a, p55-R, p60) i TNFR $_2$ (CD120b, p75-R, p80).

UVOD

Gen za TNFR₁ nalazi se na lokusu 12p13.31, poseduje 10 egzona i kodira 55/60kDa transmembranski receptor [124], dok se gen za TNFR₂, takođe od 10 egzona, nalazi na lokusu 1p.36.22, i kodira transmembranski receptor 75/80kDa [125].

Oba receptora postoje u transmembranskoj (tm) i solubilnoj (s) formi. Za razliku od TNF α , sTNFR₁ formira se i egzocitozom [126]. Solubilne forme receptora (poznate i kao BP-TNF od „Binding proteins“-vezujući proteini za TNF) mogu da se kompeticijski vezuju za tm i sTNF α , i na taj način blokiraju dalje dejstvo TNF α (u visokim koncentracijama), ali takođe funkcionišu i kao depo samog TNF α (u niskim koncentracijama prezerviraju TNF α). Takođe, solubilni receptori stabilizuju TNF α , sprečavajući inaktivaciju aktivnog trimera u neaktivni monomer [127], produžavajući mu polужivot. Osim ova dva mehanizma, i internalizacija receptora- mehanizam koji je ranije smatran isključivo odgovornim za degradaciju ili reciklažu receptora učestvuje kako u prenosu signala tako i u regulaciji funkcije liganada. Ovo znači da uloga receptora nije samo prosta ćelijska transdukcija, nego i regulacija biodostupnosti samog TNF α . Solubilni receptori su u niskoj koncentraciji prisutni u serumu i kod zdravih osoba. Iako i u ovim niskim koncentracijama deluju kao regulatori biodostupnosti TNF α , ova uloga posebno dolazi do izražaja u patološkim stanjima [128].

Ekspresija receptora je takođe pod uticajem mnogobrojnih faktora. Stimulišuće na njihovu ekspresiju deluju LPS, retionična kiselina, glukokortikoidi, TNF α , IL-2, IL-4, IL-6, INF α , INF β , INF γ , GM-CSF i tireostimulišući hormon (TSH) [115]. Na stimulaciju oslobađanja solubilnih formi utiču TNF, IL-1, endotoksin.

TNFR₁ je konstitutivno prisutan na skoro svim ćelijama, sem eritrocita. Vezivanje solubilnog TNF α za TNFR₁ je brzo i sa velikim afinitetom, dok je disocijacija sa receptora spora. TNFR₁ aktivira se podjednako i solubilnom i transmembranskom formom TNF α [129].

TNFR₂ je inducibilan i prisutan je u fiziološkim uslovima u malom broju samo na imunološkim, endotelnim i nekim ćelijama centralnog nervnog sistema, kao i kardiomiocitima. Funkcije TNFR₂ kasnije su upoznate i potcenjene su baš zbog činjenice da je glavni ligand ovog receptora transmembranska forma. Podaci o afinitetu TNF α za receptor 2 su oprečni, ali se zna da je disocijacija liganda i TNFR₂ 20-30 puta brža u odnosu na disocijaciju od TNFR₁ [129].

UVOD

Ukratko, TNFR₁ se definiše kao induktor apoptoze i manjim delom ćelijskog preživljavanja dok je TNFR₂ zadužen prevashodno za ćelijsko preživljavanje. TNF receptori nemaju metaboličke sposobnosti pa signale prenose putem vezivanja intracelularnih proteina. Oni su jednostavni glikoproteini sa 28% homologije u ekstracelularnom domenu i skoro bez homologih motiva u intraćelijskom delu. Receptori poseduju sekvence sposobne za vezivanje intraćelijskih adaptorskih proteina (TNF receptor-associating Factors-TRAFs). Ovi intraćelijski adaptorski proteini prenose signal sa stimulanog receptora i vrše aktivaciju mnogobrojnih signalnih procesa. TNFR₁ receptor poseduje domen smrti (DD), koji ima ulogu u indukciji apoptoze i ukoliko dođe do delecije ovog domena, dobija se nefunkcionalni R₁, što govori o neophodnosti DD u fiziološkim procesima [130]. Signali za izazivanje ćelijske smrti poreklom sa TNFR₁ za posledicu imaju dve pojave- apoptozu, odnosno programiranu ćelijsku smrt i nekrotozu. Ukratko, kada postoji signal za apoptozu, a ne postoje ćelijski uslovi za njeno izvršenje, dolazi do programiranog umiranja ćelije ali sa karakteristikama nekroze [131].

Ovaj receptor nije citotoksičan za sve ćelije, pa osim ovih signala usmerenih ka apoptozi, aktivira i NFκβ-transkripcioni faktor, koji dalje aktivira transkripciju mnogih gena uključujući proinflamatorne citokine, hemokine i antiapoptotkse faktore. Uloga TNFR₁ mogla biti opisana na tri nivoa: na ćelijskom nivou on izaziva apoptozu inficiranih i oštećenih ćelija, na nivou tkiva izaziva i kontroliše inflamatorni odgovor, dok na sistemskom nivou kontroliše funkcije kao što su spavanje i povišena telesna temperatura [102] (Slika 1.3).

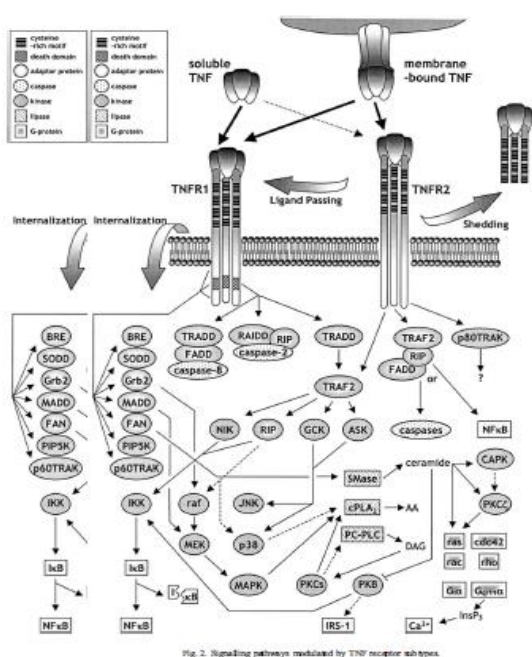
TNFR₂ ne poseduje domen smrti i dugo se smatralo da on ne učestvuje u apoptotskim signalima. Međutim, proučavanjem mehanizama intraćelijskog prenosa signala i otkrićem adaptorskih proteina, konkretno TRAF-2, uočene su i ove funkcije R₂. TRAF-1 i TRAF-2 se uglavnom direktno vezuju za citoplazmatksi deo TNFR₂. Preko TRAF-1/TRAF-2 kompleksa se apoptotski adaptorski proteini vezuju za receptore. Putem TRAF-2, TNFR₂ se indirektno vezuje i sa drugim molekulima koji iniciraju apoptotske signale. Osim ovih proapoptotskih funkcija, ranije otkrivene uloge TNFR₂ su antiapoptotske. Ostavruju se putem mnoštva signala, ali najvažniji je putem TRAF2 koji se vezuje za NFκβ-indukujuću kinazu. Ova kinaza za ciljni molekul ima NFκβ-transkripcioni faktor čija je uloga transkripcija kao odgovor na stres i antiapoptotske

UVOD

signale [132]. Aktivacija NF κ B sistema je osnovni način zaštite ćelije od ćelijske smrti. Mišljenja su da su ćelijski uslovi ti koji određuju da li će biti uključeni anti- ili proapoptotski signali receptora 2 [133]. Antiapoptotksim signalima TNFR₂ je odgovoran za preživljavanje CD4⁺ i CD8⁺ ćelija tokom klonalne ekspanzije pri imunološkom odgovoru na IĆ bakterijske patogene, tj za formiranje većeg broja efektorskih ćelija. Indirektna uloga TNFR₂ u apoptozi je tzv „prelazak liganda“ (*ligand passing*) odnosno pojačavanje dejstva receptora 1. Po ovoj teoriji, TNFR₂ velikim afinitetom vezuje ligand, ali s obzirom na brzu disocijaciju TNFR₂-TNF kompleksa, on povećava koncentraciju liganda u blizini TNFR₁, koji dalje deluje svojim putevima za ćelijsku smrt.

Što se tiče uloge ovih receptora u nekim procesima u usnoj duplji, dokazana je uloga TNFR₁ i TNFR₂ u patogenezi perikoronitisa [134], kao i uloga TNFR₁ u ortodontskom pomeranju zuba [135].

Kao što je pomenuto, solubilni receptori prisutni su u niskoj koncentraciji i u serumu zdravih ispitanika [136]. Dokazano je takođe da koncentracije receptora variraju kod istih individua tokom vremena, ali da međusobni odnosi koncentracija R₁ i R₂ tokom vremena ostaju konstanti [128]. Kod osoba sa niskom koncentracijom solubilnih receptora, može doći do preterane ekspresije TNF α u oboljenjima, zbog nedostatka inhibitorne funkcije receptora.



Slika 1.3: Interakcija TNF α sa TNFR₁ i TNFR₂ receptorima. Preuzeto iz [137]

1.8.1.4. Uloga TNF α , LT α , TNFR $_1$ i TNFR $_2$ u patogenezi dijabetesa

Dugo je poznato da TNF α ima bitan uticaj na metabolizam lipida i glukoze u organizmu. Masno tkivo je važan endogeni izvor TNF α , i kod gojaznih produkcija ovog citokina povećana je na nivou i masnog i mišićnog tkiva. Uloga TNF α u patogenezi insulinske rezistencije kod gojaznih ostvaruje se putem inhibicije insulinskog receptora tirozin kinaze [89] i poremećene funkcije mitohondrija [138] u glatkim mišićnim i masnim ćelijama. TNF α utiče na IR i putem inhibicije supstrata insulinskog receptora (*Insulin Receptor Substrate*- IRS), tj. direktno fosforilacijom IRS i indirektno stimulacijom ekspresije supresora citokinske signalizacije [139]. TNF α putem svojih receptora u poprečno-prugastim mišićima smanjuje aktivnost 5'AMP-aktivisane protein kinaze koja daljim mehanizmima dovodi do smanjenja fosforilacije Acetil-koenzim A karboksilaze što zatim dovodi do smanjenja oksidacije masnih kiselina, povećane akumulacije diacilglicerola u skeletnim mišićima i povećanja IR [140]. Takođe, sinergistički sa IFN γ , deluje na Ca⁺⁺ kanale, što dovodi do disfunkcije mitohondrija i aktivacije kaspaza [141]. Na nivou masnog tkiva, TNF α vrši nishodnu regulaciju gena za GLUT4, glukoznog transportera koji reaguje na insulin [142]. Na nivou adipocita TNF α inhibira PPAR (*Peroxisome Proliferator –activator receptor*), neophodan u adipogenezi, regulaciji funkcije adipocita, ali i osetljivosti masnih ćelija na glukozu. Postoje dokazi da je posledica hronične ekspozicije ovom citokinu, nishodna regulacija ekspresije gena za kodiranje insulinskog receptora i supstrata insulinskog receptora-IRS [143]. Osim ove direktne uloge, TNF α deluje i indirektno na IR, putem stimulacije hormona stresa. Među mnogobrojnim proinflamatornim citokinima, TNF α je prvi koji je povezao gojaznost, insulinsku rezistenciju i inflamaciju [138]. S obzirom na ulogu TNF α u smanjenju telesne mase, smatra se čak da je insulinska rezistencija cena koju organizam plaća zbog pokušaja smanjenja telesne mase posredovanog TNF α [144]. Neki animalni modeli pokazuju povećane koncentracije TNF α u Langerhansovim ostrvcima negojaznih miševa [145], kao i ubrzavanje razvoja dijabetesa kod negojaznih miševa [146], na ove načine pripisujući ulogu TNF α u patogenezi dijabetesa nezavisnoj od gojaznosti. Nalazi koncentracije sistemskog TNF α kod pacijenata sa poremećenom tolerancijom glukoze, IR i T2D su oprečni. Koncentracije TNF α u serumu obolelih od dijabetesa su povećane [61] ili nepromenjene [147]. Pacijenti sa poremećenom tolerancijom glukoze takođe pokazuju nepromenjen [148], ili povećan nivo TNF α

[149]. Povećanje koncentracije $LT\alpha$ nađeno je kod velikog broja pacijenata sa dijabetesom [150]. Poređenje koncentracija proinflammatoryh citokina na ljudima je otežano zbog uticaja stila života (stres, vežbanje, pušenje cigareta...) i eventualno još neprepoznatih komorbiditeta na ekspresiju $TNF\alpha$.

S obzirom da $TNF\alpha$ deluje putem svojih receptora, za nastanak i progresiju oboljenja potrebna je i disfunkcija receptora. Studije na genetski gojaznim miševima pokazuju da je $TNFR_1$ glavni medijator $TNF\alpha$ posredovane IR, ali da $TNFR_2$ može da pojača ovaj efekat [151]. Smanjeno oslobađanje $TNFR_1$ i povećanje $TNFR_2/TNFR_1$ odnosa povezano je sa IR [152]. Dokazana je inverzna korelacija nivoa sistemskih citokina sa insulinskom osetljivošću [153].

$TNF\alpha$ je jedan od glavnih medijatora patogeneze dijabetesne nefropatije (DN) [154]. $TNF\alpha$ sistem deluje putem ekspresije athezionih molekula i hemokina, apoptoze/nekroptoze oštećenih ćelija [155], alteracijama intraglomerularnog protoka krvi, povećane permeabilnosti endotela i indukcije oksidativnog stresa. Pokazana je snažna korelacija između cirkulišućih $TNFR_1$ i $TNFR_2$ i krajnjeg stadijuma dijabetesne nefropatije [156]. Proliferativna dijabetesna retinopatija (PDR), mikrovaskularna hronična komplikacija dijabetesa, karakteriše se aktivnom neovaskularizacijom retine, i formiranjem fibrovaskularnog tkiva u vitroretinalnom okruženju. $TNF\alpha$ dokazan je u ekstracelularnom matriksu, endotelu i krvnim sudovima novostvorenog fibrovaskularnog tkiva, kao i u staklastom telu pacijenata sa ovom komplikacijom [157]. Dijabetesna neuropatija (DN) je najčešća hronična komplikacija dijabetesa, i posebno je klinički značajna jer je u velikom broju slučajeva nezavisna od glikoregulacije. Zbog ovoga se smatra da do ove komplikacije dolazi zbog prisustva ranih biohemijskih medijatora koji kada jednom pokrenu proces, nezavisni su od inicijalnog stimulusa. Sve veći broj dokaza govori u prilog uticaja inflamatornih medijatora u nastanku i razvoju DN. Dokazi o ulozi $TNF\alpha$ u razvoju ove komplikacije su oprečni [158, 159]. Dokazana je uloga TNF sistema i u patogenezi makrovaskularnih komplikacija dijabetesa. $TNF\alpha$ povećava ekspresiju endotelina 1 i angiotenzina [160], medijatora odgovornih za ubrzavanje ateroskleroze. Oslobađanje receptora, koje predstavlja indikator aktivacije TNF sistema, je u pozitivnoj korelaciji sa hipertenzijom i kod zdravih i kod osoba sa dijabetesom [152].

1.8.1.5. Uloga TNF/TNFR u patogenezi parodontopatije

Već je dokazano da destrukcija u parodonticijumu nastaje većim delom kao posledica proinflamatornih citokina, eikosanoida, slobodnih radikala i ostalih efektorskih molekula koje sekretuje sam domaćin. Ključnu ulogu u inicijaciji i prolongaciji ovih mehanizama ima TNF α .

Uloga TNF α u destrukciji mekih tkiva

U parodontalnim tkivima, TNF α i TNFR₁ pokazuju gotovo istu distribuciju i ekspimiraju se na endotelnim ćelijama i fibroblastima u zdravim tkivima, dok se u hroničnoj parodontopatiji ekspimiraju dodatno i na sulkusnim epitelnim i monocitno-makrofagnim infiltrišućim ćelijama. [161]. TNFR₂ se u gingivi bez kliničkih znakova parodontopatije gotovo ni ne ekspimiraju, dok se kod hronične parodontopatije detektuje u manjoj meri na infiltrišućim monocitno-makrofagnim ćelijama [161], ali i gingivalnim fibroblastima *in vitro* [162]. LT α pokazana je na infiltrirajućim limfocitima u gingivi obolelih od parodontopatije [163]. Lokalizacija TNF α , LT α i njihovih receptora u ovim tkivima omogućava autokrino i parakrino delovanje liganada. Na nivou sulkusnih epitelih ćelija i gingivalnih fibroblasta, a putem R₁ receptora, TNF α povećava ekspresiju matriksnih metaloproteinaza MMP1, MMP8, MMP13 [164]. U endotelnim ćelijama, ovim putem se stimuliše atezija polimorfonukleara, limfocita i makrofaga [161]. TNF α i LT α indukuju ekspresiju drugih medijatora koji pojačavaju i održavaju inflamatorni odgovor (npr. prostaglandini), stimulišu produkciju lizirajućih enzima i pojačavaju fagocitnu aktivnost [165].

Za razliku od štetnih efekata koje ispoljavaju TNF α i TNFR₁, TNFR₂ ublažava gubitak kosti u parodontopatiji na animalnom modelu [166] i modulira zapaljenje posredovano TNF α [162]. Na animalnom modelu pokazano je da Etanercept, solubilni agonist TNFR₂ dovodi do smanjenja aktivacije TNF α , smanjenja infiltracije neutrofila, umanjenja apoptoze i stvaranja iNOS, kao i povrede gingivomukoznih tkiva pacova [165]. Oslobođanje TNFR₂ iz fibroblasta u parodontopatiji može se tumačiti kao pokušaj neutralizacije samog TNF α [162]. Nedovoljne količine ovog receptora dovode do progresije parodontopatije.

TNF α detektovan je u sulkusnoj tečnosti pacijenata obolelih od parodontopatije, ali je nađen i u obolelim mestima pre klinički dijagnostikovanog oboljenja [167]. Druga

istraživanja pokazuju niske koncentracije TNF α u sulkusnoj tečnosti obolelih od parodontopatije [168], ili čak manje vrednosti kod pacijenata sa T2D i PD u odnosu na sistemski zdrave ispitanike sa PD [169]. Neke studije pokazuju pozitivnu korelaciju TNF α sa TNFR $_1$ i TNF α sa TNFR $_2$ u sulkusnoj tečnosti [170]. Dokazana je i pozitivna korelacija između koncentracije TNFR $_1$ i TNFR $_2$ sa dubinom sondiranja, pri čemu sa porastom dubine sondiranja dolazi do disbalansa receptora, odnosno porast TNFR $_2$ ne može da prati TNFR $_1$ [170]. Odnos TNFR $_2$ /TNFR $_1$ sa DS negativno korelira, što takođe govori u prilog zaštitne uloge TNFR $_2$ na destrukciju parodontijuma, odnosno veće destrukcije na mestima na kojima TNFR $_2$ ne može da se proizvede u odgovarajućoj količini [170, 171]. Koncentracije receptora u gingivalnoj tečnosti smanjuju se nakon kauzalne faze terapije parodontopatije [171]. U svakom slučaju, istraživanja su pokazala da odnos stanja parodontalnog džepa i sekrecije citokina nije jednostavan, već da na njega utiče individualni imuni odgovor domaćina, proteolitički enzimi u ćelijama i drugi inflamatorni medijatori [170].

Uticaj TNF α na metabolizam kosti

Tradicionalno opisivana uloga TNF α u patogenezi parodontopatije je osteoklasno indukovana resorpcija kosti kao i inhibicija osteogeneze [62]. TNF α je jedan od najpotentnijih induktora osteoklastogeneze u inflamaciji.

TNF α stimuliše osteoklasnu resorpciju kosti *in vivo* [172] i *in vitro* [173]. Dokazano je da je TNF α glavni medijator lipopolisaharidima indukovane osteoklastogeneze i da se ova funkcija vrši putem TNFR $_1$ receptora [174]. TNF α , zajedno sa IL-1 stimuliše stvaranje višejedarnih gigantskih ćelija sa karakteristikama osteoklasta u humanoj kosnoj srži [175]. U procesu geneze osteoklasta, uloga TNF α je u procesima determinisanja makrofagne linije ka osteoklastima, ali i kasnije u procesima fuzije monojedarnih u višejedarne gigantske ćelije.

Ispitivanja molekularnih mehanizama putem kojih TNF α deluje na resorpciju su oprečna i pokazuju da ovaj citokin deluje putem RANKL mehanizma, a po nekim studijama i samostalno. Dodavanje TNF α *in vitro* sistemu pospešuje osteoklastogenezu pod uticajem RANKL; antiTNF α i antiTNFR $_1$ antitela inhibiraju ovaj proces, dok dodavanje antiTNFR $_2$ antitela ne remeti diferencijaciju osteoklasta [176]. Studije sa antiTNFR $_1$ antitelima nisu konzistentne, tako neke pokazuju poremećaje osteoklastogeneze [177], dok druge nisu pokazale signifikantan uticaj ovih antitela [62].

Rezultati uticaja antiTNFR₂ antitela su konzistentiji i pokazuju pojačanu osteoklastogenezu kod TNFR₂ nokaut miševa, što govori u prilog zaštitne uloge ovog receptora u koštanom metabolizmu [177]. Takođe, eksperimentalna parodontopatija tretirana Etanerceptom, agonistom TNFR₂ pokazala je smanjen gubitak koštanog tkiva [165]. TNF α koji deluje na RANKL indukovanu osteoklastogenezu deluje autokrinim i parakrinim [178] mehanizmima, ali postoje dokazi i o uticaju sistemski sintetisanog TNF α na pojačanu osteoklastogenezu. S druge strane, postoje dokazi o pozitivnom ali slabom uticaju TNF α na osteoklastogenezu bez RANKL-a [176], i dokazi o formiranju malog broja osteoklasta kod RANKL^{-/-} životinja [179]. RANKL dovodi do povećanje ekspresije i sekrecija TNF α , dok sam TNF α ne utiče na ekspresiju RANKL-a [176]. OPG inhibira RANKL indukovanu osteoklastogenezu i ekspresiju TNF α , ali ne utiče na aktivnost već sekretovanog TNF α [176]. Osim dobro poznate uloge TNF α u diferenciranju osteoklasta, kao što je već pomenuto, poznata je i uloga ovog citokina i u inhibiciji osteoblastogeneze. *In vitro* studije pokazale su da je potentni inhibitor osteoblastogeneze iz prekursornih ćelija, da deluje distalno od koštanog morfogenog proteina (BMP) i da suprimira transkripciju izazvanu vitaminom D. Sve ove funkcije ostvaruju se putem TNFR1 receptora [180]. S druge strane, najnoviji dokazi govore u prilog stimulatornog delovanja niskih koncentracija TNF α na osteoblastogenezu [181]. Dokazano je stimulatorno dejstvo na ovaj proces putem povećavanja oslobađanja koštanog morfogenog proteina 2 (BMP-2) [182], kao i autokrinom stimulacijom osteoblasta [183].

1.9. Polimorfizmi

Polimorfizmi označavaju razlike u sekvenci molekula DNK koje postoje između zdravih individua jedne vrste. Tipični humani genom razlikuje se od referentnog genoma u 4,1-5 miliona mesta/pozicija. Preko 99% ovih razlika čine tačkasti polimorfizmi odnosno polimorfizmi pojedinačnih nukleotida (*Single Nucleotide Polymorphisms*, SNPs) i mali insercioni/delecioni polimorfizmi [184], dok sami SNP čine preko 85% genetičke varijabilnosti čoveka. Broj varijantih mesta razlikuje se među populacijama, pri čemu najveću stopu polimorfizama pokazuje afrička, a najmanju evropska populacija. Ukoliko posmatramo samo varijacije genoma koji utiču na funkciju gena- funkcionalne varijacije, tipični genom sadrži 149-182 mesta koja direktno skraćuju proteine, 10 000-12 000 mesta koja dovode do menjanja sekvenci

UVOD

proteina i 459 000-565 000 mesta koja utiču na regulatorne genske sekvence (promotori, vodeće sekvence- UTR, pojačivači, sajlenersi i dr.) [184].

SNP, predstavljaju varijacije jednog baznog para DNK pri čemu su alternativne sekvence (aleli) prisutni u najmanje 1% normalnih individua određene populacije [185]. SNP koji se nalazi na promotorskom regionu ispred naziva ima negativan predznak („-“), dok onaj lociran u intronima ili egzonima nosi pozitivan predznak („+“) a broj označava mesto nukleotida u odnosu na početno transkripciono mesto. Drugi način, i danas zastupljeniji, nomenklature SNP je na osnovu jedinstvenog registarskog broja rs broj (*Reference SNP Number*).

Učestalost alela se razlikuje od populacije do populacije, odnosno veoma učestao alel u jednoj populaciji u drugoj može biti veoma redak. Takođe, varijacije alela mogu biti „privatni polimorfizmi“ u slučajevima reproduktivno izolovanih populacija [186]. Populaciono zavisno je i definisanje mogućih genotipova na divlje (*wild type*) i mutirane (*mutant*) homozigote, odnosno divlji tip u jednoj populaciji se u drugoj definiše kao mutirani. Pri analiziranju polimorfizama kao modifikatora oboljenja, posebna pažnja obraća se i na gametksu neravnotežu povezanosti (*Linkage disequilibrium* (LD)), odnosno pojavu da dva polimorfizma nisu međusobno nezavisna, već se javljaju (nasleđuju) zajedno. I polimorfizmi koji pokazuju LD su u osnovi nastali nezavisno, ali se kroz generacije prenose i češće javljaju zajedno. Ova pojava je korisna jer omogućava predikciju polimorfizama lokusa koje nismo ispitivali na osnovu ispitivanih varijacija, odnosno omogućava postojanje surogata markera polimorfizama. Mana ovih analiza je nestabilnost LD, odnosno što se stepen nezavisnosti smanjuje kroz generacije [185], zahvaljujući rekombinacijama tokom mejoze. Što su dva lokusa prostorno bliža, veća je stabilnost LD-a. Najvažniji parametri za merenje LD su r^2 i D' . Oba parametra se kreću u opsegu od 0 (odsustvo vezanosti neravnoteže) do 1 (potpuna vezanost-neravnoteža).

Iako polimorfizmi po definiciji predstavljaju normalne varijacije, povezani su sa individualnom osetljivošću na različite stimulse [187]. S obzirom na to da je sinteza citokina strogo programiran proces kontrolisan na mnoštvu nivoa, SNP-ovi mogu imati uticaj na transkripciju, stabilnost RNK, na stepen ekspresije ovih citokina [188], na oslobađanje njihovih solubilnih formi i dr. [189]. Ove varijacije utiču na individualni inflamatorni odgovor, urođeni i/ili stečeni imunitet, ili pak menjaju uslove za

kolonizaciju određenih mikroorganizama [190], što nekada dobija klinički značaj tek kada osoba postane podložnija oboljenjima npr. zbog starenja ili pridruženih stanja i oboljenja. Razumevanje i povezivanje polimorfizama sa određenim bolestima predstavlja veliki korak u objašnjavanju mnogobrojnih poligenih oboljenja. Problem poligenih oboljenja je potencijalno sinergističko delovanje stotina/hiljada polimorfizama i njihova interakcija sa faktorima sredine, životnim navikama koji se često razlikuju i u okviru homogenih grupa. Tako da pri analizi ovih varijacija treba voditi računa o potencijalnim specifičnim kombinacijama funkcionalnih polimorfizama, evaluaciji funkcionalnih posledica SNP-ova, postojanju neravnoteže povezanosti (LD), kao i mogućeg uplitanja epigenetskih varijacija [190]. Značaj ovih istraživanja nije samo u etiološkom povezivanju oboljenja sa određenim varijacijama, nego i razvoju preventivnih mera, ranih profilaktičkih i terapijskih mera, kao i prognoza samog ishoda bolesti.

Bez obzira što su neke studije asocijacije nedovosmisleno povezale određene tačkaste polimorfizme sa nekim oboljenjima, rezultati su i dalje prilično šaroliki. Nemogućnost poređenja rezultata i kreiranja jedinstvenog stava po ovom pitanju u nauci proističe iz različitosti populacija koje su ispitivane, studija koje uglavnom koriste mali uzorak i mali broj ispitivanih polimorfizama i različitih metodoloških pristupa.

1.9.1. Polimorfizam u genu za TNF α (-308G/A, rs1800629)

Gen koji kodira TNF α , zajedno sa genom za LT α , deo je glavnog gena histokompatibilnosti (*eng. Major Histocompatibility Complex, MHC*). Dužine 3kb, lociran je na kratkom kraku hromozoma 6 (6p21.32). MHC karakteriše najveća gustina lokusa koji su odgovorni za određivanje individualnog imunog odgovora i ujedno je region sa najvećim brojem polimorfizama u genomu [191]. Gen za TNF α sastoji se od 4 egzona, a više od 80% ovog citokina kodirano je četvrtim egzonom [192]. Do sada je identifikovan veći broj polimorfizama na ovom lokusu (na pozicijama -1031, -863 -857 -574 -376, -308, -244, -238, +70, +489 itd.).

Polimorfizam na poziciji -308G/A (naziv u bazi tačkastih polimorfizama: rs1800629) lociran je u promotorskom regionu na 5' kraju lanca (Tabela 1.5). Ovde dolazi do zamene guanina adeninom, sa tri potencijalna genotipa: GG, homozigot 1 ili divlji tip kako ga definišemo u evropskoj populaciji, GA ili heterozigot i AA, homozigot 2, odnosno mutantni homozigot za evropsku populaciju. Približno 60-70% bele populacije

UVOD

su GG homozigoti (TNFR1 alel), 30-40% su heterozigoti, dok su samo 1,5-3% ove populacije AA homozigoti (TNFR2 alel) [193]. Ovaj polimorfizam je većina studija povezala sa povećanom produkcijom TNF α [191, 194]

Povezanost ovog promotorskog polimorfizma sa različitim oboljenjima i stanjima bila je predmet brojnih studija. Sa ovim polimorfizmom povezivani su odbacivanje kalema, hronična opstruktivna bolest pluća, glaukom, Gravesova bolest, migrene, psorijaza i mnoge druge. Uticaj ovog polimorfizma na patogenezu ateroskleroze nije dokazan, ali u sadejstvu sa pušenjem cigareta može biti bitan faktor [195]. A alel povezan je sa povećanim rizikom od astme [196], i Kronove bolesti [197]. Što se tiče uticaja na multiplu sklerozu, rezultati su vrlo oprečni, a neki čak govore u prilog protektivnoj ulozi A alela u ovom oboljenju [198]. Takođe, tok i ishod sepse povezani su sa ovim SNP-om [199].

Nije nađena veza ovog polimorfizma sa T2D ili gojaznošću u populaciji pacijenata iz Tunisa [200], niti je povezan sa dijabetesnom nefropatijom ispitanika kineske populacije [201]. I u evropskoj populaciji nalazimo rezultate nepostojanja asocijacije -308G/A TNF sa dijabetesom, dijabetesnom nefropatijom [202], retinopatijom i hipertenzijom kod ispitanika sa T2D [203]. Na britanskoj populaciji velika studija asocijacije nije uspela da dokaže povezanost nijednog od 11 najčešće ispitivanih polimorfnihih mesta TNF/LT lokusa [204] sa T2D. S druge strane, postoje i dokazi o povezanosti dijabetesa/komplikacija sa 308G/A TNF. Tako je u populaciji Severnih Indijanaca pokazana veza, ali zavisna od indeksa telesne mase [205]. U Hrvatskoj je takođe nađena veza ovog polimorfizma sa tipom 1 dijabetesa u porodicama [206]. U populaciji Kurda GA i AA genotip pokazali su 2,24 i 3,18 puta veći rizik za oboljevanje od T2D u odnosu na GG genotip [207], dok je na ispitanicima iz Indije polimorfizam povezan sa T2D, sa dijabetesnim stopalom i povećanom proizvodnjom citokina u dijabetesu [208]. Na beloj populaciji u Brazilu dokazana je veza dijabetične proliferativne retinopatije i -308G/A TNF [209], dok je na ispitanicima iz Skandinavije SNP povezan sa makrovaskularnim komplikacijama dijabetesa [210].

Iako je veza polimorfizama sa parodontopatijom počela kasnije da se ispituje, i na ovu temu postoji značajan broj radova, sa vrlo oprečnim rezultatima. Sam -308G/A polimorfizam nije povezan sa hroničnom parodontopatijom u evropskoj [211], turskoj [212], tajvanskoj [213] i kineskoj populaciji [214]. U evropskoj populaciji ovaj

UVOD

polimorfizam ima uticaj na rizik od oboljevanja od parodontopatije kada je udružen sa +252A/G LT polimorfizmom [211]. S druge strane, AA genotip povezan je sa hroničnom parodontopatijom u kineskoj, kao i sa stepenom napredovanja parodontopatije u evropskoj populaciji [215, 216]. U beloju rasi dokazana je povezanost podložnosti hroničnoj parodontopatiji sa A alelom [217], kao i povezanost prisustva bakterije *Prevotella intermedia* kod nosilaca GA+AA genotipa i A alela [218].

Vrlo je ograničen broj radova koji ispituju ove polimorfizme kod obolelih od dijabetesa i parodontopatije. U kineskoj populaciji nađena je razlika u distribuciji genotipova kod sistemski zdravih i obolelih od dijabetesa sa parodontopatijom, i u obe grupe A alel povezan je sa većim vrednostima DS i NPE [219]. Na ispitanicima iz Indije pri ispitivanju zdravih kontrola, pacijenata sa parodontopatijom i obolelih od dijabetesa tipa 2 i parodontopatije, G alel bio je protektivan za oboljevanje od parodontopatije i zajedno parodontopatije i dijabetesa [220].

Tabela 1.5: Karakteristike polimorfizama TNF α , LT α , TNFR $_1$ i TNFR $_2$

Citokin	Rs broj	Alternativni naziv	Hromozom	Lokacija na genu
TNF α	rs1800629	-308 G/A TNF	Hromozom 6 31651010	Promotor
LT α	rs909253	+252 A/G LT	Hromozom 6 31648292	Intron 1
TNFR $_1$	rs767455	+36 A/G	Hromozom 12 6341779	Egzon 1
TNFR $_2$	Rs1061622	+676T/G	Hromozom 1 12192898	Egzon 6

1.9.2. Polimorfizam LT α +252A/G (rs909253)

Gen koji kodira LT α smešten je zajedno sa genom za TNF α na hromozomu 6p21.3-21.1. Otkriveno je nekoliko polimorfizama na ovom lokusu (+10G/A, +80A/C, +204G/C, +252A/G, +804 itd.) [221].

Polimorfizam +252A/G lociran je u prvom intronu (Tabela 1.5). Zamena adenina guaninom u procesu transkripcije rezultira zamenom aminokiseline asparagin treoninom [222]. Tri su potencijalna genotipa kao posledica ove zamene: AA, homozigot 1 ili divlji tip, heterozigot AG i GG genotip, homozigot 2, mutirani tip. U beloju populaciji 40% je nosilaca AA genotipa, 45% heterozigotnog genotipa, a samo 15% pokazuje GG genotip [193].

GG genotip povezan je sa povećanom produkcijom LT α *in vitro* [222] i *in vivo* [163, 223, 224] kao i sa povećanom produkcijom TNF α [225]. Rezultati povezanosti ovog polimorfizma i ankilozirajućeg spondilitisa su oprečni [226, 227], kao što su i za većinu oboljenja poput autoimunih oboljenja štitne žlezde [228], hronične limfocitarne leukemije [229], reumatoidnog artritisa i sistemskog lupusa eritematodusa [230], Behčetove bolesti [231] i mnogih drugih.

Na evropskoj (Britanija) populaciji velika studija asocijacije nije uspela da dokaže povezanost nijednog od 11 najčešće ispitivanih polimorfizama TNF/LT lokusa sa hroničnom parodontopatijom [204]. Na tajvanskoj populaciji nije nađena razlika asocijacija između ovih polimorfizama i hronične parodontopatije [213]. U evropskoj populaciji su tri studije iz Češke našle ređi- GG genotip i/ili G alel kao protektivan za hroničnu parodontopatiju [163, 211, 232]. S druge strane, na Brazilskoj populaciji GG genotip, odnosno G alel povezan je sa 2,67 puta većim rizikom za nastanak parodontopatije, odnosno suprotno prethodnim studijama alel A je protektivan [233].

Takođe, +252A/G LT i -308G/A TNF nisu povezani sa gestacionim dijabetesom [234]. SNP u intronu 1 gena za LT α povezan je sa dijabetesnom nefropatijom, ali ne i sa neuropatijom, retinopatijom i makrovaskularnim komplikacijama [210]. Pojedine studije povezuju alel A sa povećanim rizikom za nastanak dijabetesa [235, 236], dok druge G alel povezuju sa komplikacijama dijabetesa i povećanom produkcijom LT α [223]. Pretragom literature nisu nađeni podaci o rezultatima istraživanja +252A/G LT polimorfizma i ispitanika sa dijabetesom i parodontopatijom.

1.9.3. Polimorfizam na genu za TNFR₁ (+36A/G, rs767455)

Gen koji kodira TNFR₁ nalazi se na hromozomu 12 (pozicija 12p.13) i sastoji se od 10 egzona. U ovom genu otkriveno je više polimorfizama u promotorskom regionu, egzonu 1, kao i u intronima 1, 2, 4, 6, 7 i 8 (-609 G/T, -580A/G, -383A/C, -329T/G, -300A/G, -102A/C +36 A/G,+49C/T) [237].

Zamena adenina sa guaninom u egzonu 1 na poziciji +36 dovodi do zamene poslednjeg nukleotida u kodonu 12 (CCA→CCG) i predstavlja sinonimni polimorfizam, odnosno ne utiče na proteinsku strukturu receptora (Prolin→Prolin) [238]. Tri su potencijalna genotipa kao posledica ove zamene: AA (homozigot 1), AG (heterozigot) i GG (homozigot 2), odnosno dva alela A alel i G alel.

Ispitivan je uticaj ovog polimorfizma na mnoga oboljenja kao što su Gravesova bolest [238], plućna aspergiloza, reumatoidni artritis [239], Kronova bolest [240] kao i uticaj na individualni odgovor na antiTNF terapiju kod pacijenata sa autoimunim oboljenjima gde je dokazan slabiji biološko odgovor kod ispitanika sa ovim polimorfizmom [241]. Pretragom pristupačnih baza podataka nađena je studija na japanskim ispitanicima koja nije dovela u vezu SNP-ove u genima za TNF receptore i agresivnu formu parodontopatije [242].

1.9.4. Polimorfizam TNFR₂ (rs1061622)

Gen koji kodira TNFR₂ nalazi se na hromozomu 1 (pozicija 1p36.2) i takođe se sastoji od 10 egzona. U ovom genu otkriveno je više tačkastih polimorfizama (+593G/A, +598T/G, +620T/C, +676 T/G +1663 G/A, +1668 T/G itd.) [243].

Egzon 6 kodira mali deo transmembranskog regiona koji učestvuje u oslobađanju solubilnih formi receptora. Najizučavaniji SNP ovog gena, pri kojem dolazi do zamene timidina guaninom na poziciji +676 (kodon 196), nalazi se u ovom egzonu. Javlja se tri genotipa, TT (homozigot 1), TG (heterozigot) i GG (homozigot 2), odnosno dva alela T i G alel. Kao posledica zamene ovih baza dolazi do promene u primarnoj proteinskoj strukturi, odnosno dolazi do zamene aminokiseline metionin argininom (196Met→Arg) u cisteinom bogatom ekstracelularnom delu receptora. Ova zamena aminokiselina utiče na oslobađanje solubilnih formi receptora [238], vezivanje receptora za ligand i/ili TNF-om indukovanu apoptozu putem poremećene signalizacije NF-κB [244]. Istraživanja su pokazala i povezanost ovog SNP-a sa povećanim koncentracijama sTNFR₂ [189, 245], mada su rezultati oprečni [246].

Ovaj široko izučavani SNP povezan je sa mnogim oboljenjima, kao što su Gravesova bolest [238], reumatoidni artritis [239], Kronova bolest [240] i dr.

Iako je dokazana protektivna uloga TNFR₂ na parodontalna tkiva, kao i uticaj +676T/G SNP-a na oslobađanje solubilnih formi ovog receptora, pretragom literature nismo našli istraživanje koje je povezivalo ovaj SNP sa hroničnom parodontopatijom. SNP u ovom //genu, ali na poziciji +587 u japanskoj populaciji povezan je sa hroničnom parodontopatijom [247].

Postoji puno dokaza o upletenosti TNFR₂ u patogenezu dijabetesa i/ili njegovih hroničnih komplikacija, ali bez obzira na to, mali je broj istraživanja povezivalo +676T/G TNFR₂ polimorfizam sa ovim oboljenjem.

2. POLAZNA HIPOTEZA I CILJEVI STUDIJE

Već je pomenuto da su polimorfizmi populaciono i etnički definisane varijacije genoma. Ne postoji studija na ispitanicima populacije u Srbiji koja ispituje prisustvo ovih polimorfizama kod pacijenata sa tipom 2 dijabetesa i hroničnom parodontopatijom.

2.1. Polazna hipoteza

Polazne hipoteze ovog istraživanja bile su:

1. Hronična parodontopatija i tip 2 dijabetesa dele zajedničke patogenetske mehanizme
2. Polimorfizmi pojedinačnih nukleotida (SNP) TNF- α -308 G/A, LT-A +252A/G, TNFR₂ +676 T/G mogu imati uticaj na nivo cirkulišućih citokina
3. Produkcija citokina u inflamiranom parodoncijumu može imati uticaj na nivo sistemskih citokina
4. Polimorfizmi TNF- α -308 G/A, LT-A +252A/G, +36 A/G TNFR₁, TNFR₂ +676 T/G mogu biti modulatori rizika za nastanak hronične parodontopatije i tipa 2 dijabetesa, kao i imati uticaja na kliničke slike ova dva oboljenja

2.2. Ciljevi istraživanja

1. Određivanje distribucije genotipova i alela za polimorfizme u genima za proinflamatorne citokine (TNF- α i LT-A) i njihove receptore (TNFR₁ i TNFR₂) kod tri grupe ispitanika (pacijenata sa hroničnom parodontopatijom, hroničnom parodontopatijom i dijabetes melitusom tip 2, i sistemski zdravih osoba bez kliničkih znakova parodontopatije).
2. Poređenje učestalosti genotipova i alela u tri grupe ispitanika i polimorfizama kao faktora koji povećavaju rizik za oboljevanje od hronične parodontopatije i tipa 2 dijabetesa
3. Određivanje nivoa cirkulišućih citokina/receptora kod tri grupe ispitanika
4. Određivanje odnosa sistemskih nivoa citokina/receptora u odnosu na stanje tkiva parodoncijuma kod dve grupe ispitanika sa dijagnostikovanom hroničnom parodontopatijom
5. Određivanje odnosa polimorfizama proinflamatornih citokina/receptora u odnosu na stanje tkiva parodoncijuma kod tri grupe ispitanika

CILJEVI

6. Ispitivanje odnosa kliničkog stanja tkiva parodontijuma sa stepenom glikoregulacije pacijenata sa dijabetes melitusom tip 2 i hroničnom parodontopatijom.

3. ISPITANICI, MATERIJAL I METODE

3.1. Podaci o studiji

Ova studija preseka sprovedena je u periodu od septembra 2012. godine do februara 2014. godine. Istraživanja su sprovedena na Klinici za oralnu medicinu i parodontologiju Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu, Klinici za dijabetes i bolesti metabolizma Kliničkog centra Srbije, Laboratoriji za humanu genetiku Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu, Biohemijskoj laboratoriji Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu, Odeljenju za molekularnu biologiju Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“.

Doktorska disertacija predstavlja deo istraživanja koje se obavlja u okviru projekta Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Vlade RS, Ev. br. 41008 pod nazivom “Interakcija etiopatogenetskih mehanizama parodontopatije i periimplantitisa sa sistemskim bolestima današnjice”

Istraživanje je odobreno od strane Etičkog komiteta Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu (36/9 od 20. februara 2013.) .

Pacijenti su dobijali obrazac „Informacije za pacijenta“ i usmeno dodatno objašnjenje o studiji u kojoj učestvuju i potpisivali su obrazac „ Informisane saglasnosti“. Validnost obrazaca je kontrolisana na Etičkom komitetu od kojeg je dobijena saglasnost za istraživanje.

3.2. Ispitanici

U studiji je učestvovalo 180 međusobno nesrodnih ispitanika bele rase srpske nacionalnosti podeljenih u tri grupe. Prvu grupu (zdrave kontrole-ZK, N=56) činili su sistemski zdravi pacijenti bez kliničkih znakova parodontopatije. Drugu grupu (parodontopatija grupa-PG, N=59) sačinjavali su takođe sistemski zdravi pacijenti, ali sa dijagnostikovanom hroničnom parodontopatijom. Prve dve grupe pacijenata činili su volonteri i pacijenti Klinike za oralnu medicinu i parodontologiju Stomatološkog fakulteta u Beogradu. Treća grupa pacijenata (Tip 2 dijabetesa grupa-T2D, N=65) formirana je od hospitalizovanih pacijenata sa dijagnostikovanim tipom 2 dijabetesa i hroničnom parodontopatijom Klinike za dijabetes i bolesti metabolizma Kliničkog

centra Srbije, kao i ispitanika Klinike za oralnu medicinu i parodontologiju Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

3.2.1. Kriterijumi isključivanja iz studije

Da bi bili uključeni u istraživanje pacijenti su morali biti stariji od 18 godina.

Kriterijumima isključenja iz studije smo pokušali da eliminišemo faktore koji utiču na kliničku sliku hronične parodontopatije, tipa 2 dijabetesa i nivo sistemskih citokina. Kriterijumi za isključivanje iz studije bili su: prisustvo sistemskih oboljenja sem T2D i njegovih komplikacija i pratećih promena u krvnoj slici i biohemiji, istorija bilo kog maligniteta, prisustvo bilo kog oralnog oboljenja sem karijesa i hronične parodontopatije, prisustvo manje od 14 zuba ne računajući treće molare, indeks telesne mase (ITM) $18,5\text{kg/m}^2 > \text{ITM} > 30\text{kg/m}^2$, menstruacija, trudnoća, period dojenja, povrede u prethodne 2 godine. Takođe, ispitanici koji su u poslednjih 6 meseci koristili antibiotsku, kortikosteroidnu ili antiinflamatornu terapiju, oni koji svakodnevno koriste oralne antiseptike ili im je sprovedena kauzalna faza terapije parodontopatije u poslednjih godinu i po dana, isključeni su iz studije.

3.3. Anamneza, istraživački karton

U okviru istraživačkog kartona pacijenti su popunjavali anamnestičke podatke od značaja za naše istraživanje prikupljanje u naše istraživačke kartone (Prilog 1). Davali su podatke o starosti, polu, obrazovanju (osnovno, srednje, visoko i više, student, magistri i doktori nauka), porodičnoj anamnezi (bez oboljenja, parodontopatije, dijabetes melitus, druga oboljenja od značaja za hereditet). Davali su podatke o svojoj visini i težini da bismo računali indeks telesne mase (ITM) (količnik telesne mase merene u kg sa kvadratom telesne visine u metrima).

Prikupljali smo podatke o pušačkim navikama. Podelili pacijente na pušače i nepušače. Pušače smo dalje podelili na osnovu broja popušanih cigareta na dan, na podgrupe sa više odnosno manje od 10 cigareta na dan. Za trenutne pušače smo takođe računali i prosečan indeks paklo-godine. Indeks paklo-godina izračunava se kada se umnožak prosečnog broja popušanih cigareta na dan i broja godina pušačkog staža podeli sa brojem 20, odnosno brojem cigareta u kutiji [248]. Bivše pušače smo podelili u dve podgrupe, one koji su ostavili pušenje cigareta pre manje, odnosno više od 5 godina.

MATERIJAL I METODE

Beležili smo i podatke o disanju na usta, grickanju stranih predmeta, bruksizmu i stiskanju zuba. Podatke o mentalnom stresu beležili smo na sledeći način: ispitanici su davali informacije o učestalosti stresa definisanom kao nikad/retko (dodeljena vrednost 0), na mesečnom nivou (vrednost 1), na nedeljnom (vrednost 2) i dnevnom nivou (vrednost 3). Davali su informacije i o intenzitetu stresa definisanom na sledeći način: bez stresa (dodeljena vrednost 0), nizak nivo stresa (vrednost 1), umeren (vrednost 2) i visok intenzitet stresa (vrednost 3). Konačan nivo stresa dobijen je kao zbir učestalosti i intenziteta i definisan je kao: 0-1=nizak nivo stresa, 2-4= umeren nivo stresa, 5-6=visok nivo stresa [249].

Ispitanici su davali i podatke o fizičkom vežbanju u smislu redovnosti (nikad, redovno odnosno > 2 puta nedeljno i neredovno odnosno <2 puta nedeljno), vrsti vežbi (aerobne, anaerobne, kombinovane) i intenzitetu (slab, umeren, jak).

3.4. Biohemijski i parametri krvne slike

Pratili smo i parametre krvne slike i biohemijske analize. Od parametara krvne slike pratili smo broj eritrocita (Er), vrednosti hemoglobina (Hgb), MCV (*Mean Corpuscular Volumen*), MCH (*Mean Corpuscular Hemoglobin*), MCHC (*Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration*), HCT (hematokrit), leukocita i leukocitarne formule. Takođe, pratili smo vrednosti sedimenatacije i biohemijske parametre: vrednosti glukoze našte, glikozilovanog hemoglobina (HbA1c), ukupnog holesterola, HDL, LDL i vrednosti triglicerida. Vrednosti fibrinogena definisane su dihotomno, kao veće odnosno manje od 3,7 g/l.

Tabela 2.1: Referentne vrednosti biohemijskih parametara u odnosu na pol, grupe i podgrupe pacijenata (sve vrednosti su predstavljene kao mmol/l)

Grupa Param.	KG+PG	T2D	
		Bez makrovaskul. kompl.	Sa makrovaskual. kompl.
Fibrinogen	3,7	3,7	3,7
HDL	M	>1,42	>1,15
	F	>1,68	>1,29
LDL	<3,3	<2,6	<1,8
HOL	<5,2	<3,3	<2,6
TGC	<1,7	<1,7	<1,7

U odnosu na biohemijske parametre, pacijenti su podeljeni na dve grupe, pacijente čiji su nalazi u referentnim granicama i one čiji nalazi to nisu. S obzirom na razlike u opštem zdravstvenom stanju ispitivanih pacijenata, same referentne vrednosti su različite po grupama [250] (Tabela 2.1).

3.5. Klinički pregled i dijagnoza hronične parodontopatije

Klinički pregled parodonticijuma i stanja mekih tkiva obavljao je kandidat uz pomoć osobe koja je beležila parametre u istraživački karton. Pregled je obavljen parodontalnom graduisanom sondom (UNC 15, Hu Friedy, Chicago, IL, USA), na šest tačaka po zubi (mezijalno, medijalno i distalno sa vestibularne i oralne strane) na svim prisutnim zubima sem trećim molarima. Radi evaluiranja stanja oralne higijene i kliničkog stanja potpornih tkiva zuba, praćeni su sledeći parametri: Plak Indeks-PI (Silness-Löe) [251], Dihotomni indeks krvarenja na provokaciju (KNP) [252], dubina sondiranja (DS) i nivo pripojnog epitela (NPE).

Plak indeks (Silness-Löe) predstavlja indeks oralne higijene. Prati se prisustvo dentalnog plaka na ivici gingive, gingivalnoj trećini zuba i u gingivalnom sulkusu/parodontalnom džepu. Koristi se vizuelizacija i sondiranje. Merenja se vrše na svih 6 tačaka na zubi. Pre početka merenja, pacijent vodom dobro ispere usta u cilju uklanjanja svih mekih naslaga izuzev dentalnog plaka. Nakon sušenja zuba vazduhom, pristupa se pregledu. Vrednosti su definisane u rasponu 0-3 na sledeći način:

- 0: odusustvo plaka pri pregledu i na sondi nakon sondiranja
- 1: mala količina plaka koja se ne vidi, ali ostaje na sondi nakon sondiranja
- 2: pri pregledu se uočava umerena količina plaka u gingivalnoj trećini zuba, na ivici gingive i u gingivalnom sulkusu/parodontalnom džepu
- 3: obilje plaka koji pokriva površinu zuba i ispunjava gingivalni sulkus/parodontalni džep i površinu zuba

Prosečna vrednost dobija se kao aritmetička sredina svih izmerenih vrednosti i kreće se u rasponu od 0,00-3,00. Pri daljim analizama, konačni skor delimo u podgrupe (rangove)

- Rang 1: 0,00-1,00
- Rang 2: 1,01-2,00
- Rang 3: 2,01-3,00

Krvarenje na provokaciju (KNP) predstavlja meru zapaljenja potpornih tkiva zuba. Beleži se pojava krvarenja 15 sekundi nakon sondiranja. Vrednosti se definišu kao nula (0) kad je krvarenje nakon sondiranja odsutno ili jedan (1) kada je krvarenje prisutno. Ukupan rezultat se izražava kao procenat (%) mesta koja krvare i može biti u rasponu od 0-100%. Pri daljim analizama, vrednosti smo klasifikovali u četiri podrupe (ranga):

- 1: 0-25,00%
- 2: 25,01-50,00%
- 3: 50,01-75,00%
- 4: 75, 01-100%.

Dubina sondiranja (DS) predstavlja rastojanje između ivice gingive i mesta gde je vrh parodontalne sonde pri blagom pritisku zaustavljen u predelu dna gingivalnog sulkusa/parodontalnog džepa. Izražava se u milimetrima (mm) u celim brojevima. Prosečna dubina sondiranja predstavlja aritmetičku sredinu svih merenih vrednosti. Za dalje istraživanja smo dubine sondiranja podelili u potkategorije (rangove)

1. : < 3mm
2. 3,1-4,0mm (blaga parodontopatija)
3. 4,1-6,0mm (umerena parodontopatija)
4. >6,1 mm (uznapredovala parodontopatija)

Nivo pripojnog epitela (NPE) predstavlja rastojanje od gleđno-cementne granice do koronarnog kraja degenerisanog pripojnog epitela, odnosno mesta gde se vrh parodontalne sonde zaustavi na dnu parodontalnog džepa. Izražava se u milimetrima (mm). Prosečna vrednost nivoa pripojnog epitela predstavlja aritmetičku sredinu svih merenih vrednosti.

Na osnovu dubine sondiranja, nivoa pripojnog epitela i dihotomnog indeksa krvarenja gingive, računali smo još dva parametra koji mere impakt inflamacije iz parodonticijuma na sistemsku inflamaciju: “Parodontalna epitelna površina” (**PESA-Periodontal Epithelial Surface Area**) i “Parodontalna inflamirana površina” (**PISA-Periodontal Inflamed Surface Area**) [253, 254]. Ove parametre osmislila je grupa naučnika iz Holandije (Univerzitet u Groningenu) u cilju objektiviziranja inflamatornog opterećenja poreklom iz parodonticijuma na celokupan organizam. Vrednosti dubina sondiranja, nivoa pripojnog epitela i dihotomnog indeksa krvarenja gingive unose se u logaritamske tabele koje su široko dostupne na sajtu <http://parsprototo.info>. PESA predstavlja

površinu sulkusnog epitela obolelog od parodontopatije (računa se pomoću DS i NPE), dok PISA predstavlja inflamirani deo celokupne površine sulkusnog epitela pacijenta sa destrukcijom parodontocijuma (računa se pomoću DS, NPE i IKG). Obe vrednosti se izražavaju u kvadratnim milimetrima (mm²).

S obzirom da se kroz literaturu javlja razmimoilaženje stavova po pitanju kliničkog definisanja dijagnoze hronične parodontoptije, mi smo se odlučili na zaključke velike pregledne studije iz 2009. godine [255] i američke Akademije za parodontologiju [256]. Za definisanje smo koristili kliničke parametre DS i NPE. Pacijentima je dijagnostikovana parodontopatija ukoliko imaju vrednosti $NPE \geq 1\text{mm}$ i $DS \geq 3\text{mm}$ na najmanje 3 mesta u dva različita kvadranta. U odnosu na broj zuba zahvaćenih ovakvim promenama, parodontopatija je definisana kao lokalizovana (<30%) i generalizovana (>30% mesta zahvaćeno parodontopatijom). Na osnovu prosečne vrednosti NPE, parodontopatija je definisana kao blaga (NPE=1-2mm), umerena (NPE=3-4mm) i uznapredovala (NPE \geq 5mm).

3.6. Postavljanje dijagnoze dijabetesa melitusa tipa 2

Dijagnoza dijabetesa postavljena je prema savetima Svetske zdravstvene organizacije (SZO) i Američke dijabetološke asocijacije (ADA) iz 2013 [33]. Prema SZO, određivanje glikemije iz venskog uzorka plazme je osnova testiranja glukozne tolerancije. Kod ispitanika kod kojih su vrednosti jutarnje glikemije između 6,1-6,9 mmol/l, radi se i test opterećenja glukozom (OGTT-*Oral Glucose Tolerance Test*).

S druge strane, ADA smatra glikozilovani hemoglobin za pouzdanu meru izloženosti pacijenta hiperglikemiji u prethodna 2-3 meseca i pouzdanu meru za postavljanje dijagnoze dijabetesa. Zajednički kriterijumi tj preporuke za dijagnozu dijabetesa su, shodno prethodno iznesenom, sledeći [250]:

1. HbA1c \geq 6.5% ili,
2. Glikemija našte \geq 7,0 mmol/L (126 mg/dL) ili,
3. Glikemija u toku OGTT-a sa 75 g glukoze u 120. minutu \geq 11,1 mmol/L (126 mg/dL) ili,
4. Glikemija u bilo kom slučajnom uzorku krvi (bez obzira na obrok) \geq 11,1 mmol/L (126 mg/dL) uz prisustvo tipičnih dijabetesnih simptoma (poliurija, polidipsija, gubitak u telesnoj težini).

3.7. Uzorkovanje

Za analize uzimane su dve vrste uzoraka: bris bukalne sluzokože i uzorak periferne venske krvi.

Uzimanjem brisa bukalne sluzokože u cilju prikupljanja deskvamiranih epitelnih ćelija dobijen je material za izolaciju DNK. Brisevi su stavljeni u sterilne plastične tubice i odmah transportovani u zamrzivač na -70°C do daljih analiza.

Uzorak periferne venske krvi uziman je ujutru između 7:30-9h pre doručka nakon noćnog gladovanja iz vene u kubitalnom predelu. Uzimano je 5 ml krvi u plastične epruvete sa aktivatorom koagulacije (D-VAC, clot activator, 9ml, DEMOPHORIUS). Iz ove krvi određivani su pomenuti biohemijski i hematološki parametri i izolovan serum za ispitivanje nivoa citokina. Serum je izolovan centrifugiranjem na 3000 obrtaja u trajanju od 5 minuta. U što kraćem periodu, zbog izuzetno kratkog poluživota $\text{TNF}\alpha$, serum je prebacivan u sterilne plastične tubice i čuvan na -70°C do daljih analiza.

3.8. Analiza polimorfizama

Analiza polimorfizama rađena je metodom lančane reakcije polimeraze i dužine restrikcionih fragmenata PCR/RFLP (*Polymerase Chain Reaction/-Restriction Fragment Length Polymorphism*).

Procedura podrazumeva izolaciju DNK iz briseva bukalne sluzokože, zatim klasičnu PCR reakciju (umnožavanje sekvenci DNK), proveru produkata PCR na poliakrilamidnom gelu elektroforezom, zatim digestiju nastalih produkata restrikcionim enzimima i na kraju analizu restrikcionih produkata takođe na poliakrilamidnom gelu.

3.8.1. Izolacija DNK iz brisa bukalne sluzokože

Izolacija DNK vršena je pomoću izolacionog kompleta KAPA Express Extract Kit® (Kapa Biosystems, Inc. Wilmington, MA). Sterilnom pincetom se odvoji vata sa brisa, stavi u sterilnu plastičnu tubicu i zatim se doda reakciona smeša koju sačinjavaju:

- 2 μl enzima (KAPA Express Extract Enzyme (1 U/ μL))
- 15 μl pufera (10X KAPA Express Extract Buffer)
- 283 μl dejonizovane vode

Smesa se vorteksuje u trajanju od 5 sekundi, zatim centrifugira na 13400 obrtaja u trajanju od 1 minut. Sledi inkubacija u PCR aparatu po sledećem režimu: 10 minuta na

75 °C (aktivacija enzima), a zatim još 5 minuta na 95 °C (deaktivacija proteaze iz kita). Sterilnim plastičnim pipetorima se izdvaja supernatant u sterilne plastične tubice i ovaj izolat se čuva na -20 °C do daljih analiza.

3.8.2. Lančana reakcija polimeraze-PCR

Lančana reakcija polimeraze predstavlja *in vitro* amplifikaciju tačno definisanih sekvenci DNK. Ovu revolucionarnu metodu razvio je 1980tih godina Kari Mullis (Kary Mullis) [257]. PCR u stvari predstavlja imitaciju procesa replikacije DNK. Bazira se na mogućnosti DNK polimeraze da sintetiše novi komplementarni lanac DNK. S obzirom na to da DNK polimeraza dodaje nukleotide samo na slobodne 3-OH grupe, za izvođenje PCR neophodni su i prajmeri-kratki oligonukleotidi komplementarni sa delovima DNK koje želimo da umnožimo. Sama specifičnost amplifikacije se postiže korišćenjem prajmera. Na taj način krajevi amplifikata su određeni 5' krajevima prajmera, dok je veličina (dužina) amplifikata određena rastojanjem između sekvenci koje prajmeri prepoznaju.

Lančana reakcija polimeraze izvodi se u plastičnim tubicama u totalnoj zapremini od 25µl, a sadržaj svake tubice čine sledeće komponente

- Uzorak DNK
- *DNK polimeraza*- enzim koji je sposoban da sintetiše željene sekvence gena. Najčešće korišćena polimeraza je *Taq polimeraza*. Prednosti ove polimeraze su što može da generiše nove lance DNK uz pomoć prajmera i što je otporna na visoke temperature neophodne za izvođenje samog PCR-a.
- *Prajmeri*- oligonukleotidi komplementarni 3' kraju sekvence koju želimo da umnožimo.
- Deoksiribonukleotidi
- Mg⁺ joni- katalizatori *Taq polimeraze*
- Pufer- neophodan za optimalnu aktivnost *Taq polimeraze*
- Voda

Sama reakcija podrazumeva tri sukcesivno ponavljajuća procesa, denaturaciju, hibridizaciju i elongaciju koji se ponavljaju u 25-40 ciklusa.

- Denaturacija- proces “topljenja” dvolančane DNK odnosno zagrevanja na 95 °C pri čemu se raskidaju vodonične veze između baznih parova odnosno komplemetarnih lanaca. Rezultat ovog procesa su jednolančane DNK.
- Hibridizacija (eng. *annealing*) podrazumeva sparivanje prajmera sa matričnim DNK lancem. Temperatura neophodna za hibridizaciju je od 42°C do 65°C što zavisi od sekvence prajmera. Previsoka temperature može dovesti do ometanja sparivanja prajmera sa matričnim lancem, dok preniska temperature može dovesti do lošeg sparivanja baza. Obično se koristi temperatura koja je 2-3°C niža od tačke topljenja prajmera.
- Elongacija (ekstenzija) predstavlja ugradnju nukleotida pri čemu se 5'fosfatna grupa nukleotida vezuje za 3'hidroksilnu grupu prajmera odnosno lanca u formiranju. Ova faza je katalizovana DNK polimerazom pa se u slučaju korišćenja *Taq polimeraze* odvija na 72 °C.

Na kraju svih ciklusa sledi faza finalne elongacije na istoj temperaturi kao i elongacija, a sa ciljem da svi jednolančani matrični lanci budu umnoženi do kraja.

S obzirom na to da u svakom ciklusu od jednog dobijamo dva nova lanca, količina DNK eksponencijalno raste (u optimalnim uslovima, odnosno pri dovoljnoj količini svih reagenasa) tako da na kraju PCR dobijamo oko 10^7 - 10^9 kopija željenog fragmenata.

3.8.3. Provera PCR produkata elektroforezom na 8% poliakrilamidnom gelu (PAGE)

Elektroforeza nukleinskih kiselina je metoda kojom se određuje veličina fragmenata nukleinskih kiselina na agaroznom ili poliakrilamidnom gelu. S obzirom na mnogobrojne prednosti poliakrilamidnog gela (hemijska inertnost i stabilnost u širokom opsegu fizičko-hemijskih uslova) najčešće se koristi ova metoda [258].

Ona koristi razlike koje postoje između markomolekula u njihovoj pokretljivosti u gelu kada se nađu u kolu jednosmerne struje. Razlike u pokretljivosti zavise od molekularne mase (manji molekuli brže putuju), prostorne konformacije molekula (linearni molekuli putuju sporije od spiralnih) i najbitnije od naelektrisanja (nukleinske kiseline su negativno naelektrisane zbog prisustva fosfatnih grupa pa putuju od katode ka anodi).

U analizama smo koristili veritkalnu elektroforezu u kontinuiranom sistemu (isti pufer se koristi za pravljenje samog gela i kao provodnik). Poliakrilamidni gel nastaje

MATERIJAL I METODE

kopolimerizacijom akrilamida i bisakrilamida (Serva, Nemačka). Katalizatori polimerizacije su amonijumpersulfat (APS) (Serva, Nemačka) i N,N,N',N'-tetrametilendiamin (TEMED) (*BioChemica*, AppliChem) (Tabela 2.1). Gel se polimerizuje na sobnoj temperaturi u trajanju od 30 minuta (Tabela 2.2).

Pripremljeni gel se potapa u kadicu za elektroforezu u kojoj se nalazi odgovarajući pufer (provodnik), u našem slučaju 1X Tris-Borat EDTA (5xTBE). Uzorci koji se analiziraju prvo se pomešaju sa puferom za nalivanje uzoraka (engl. loading buffer) (u našem slučaju 6X DNA Loading Dye®, Thermo Scientific) koji povećava gustinu uzorka (čime je omogućeno da uzorak padne na dno bunarića), boji uzorak i samim tim omogućava praćenje elektroforeze. Nakon mešanja, uzorci se nalivaju u bunariće na gelu (1 bunarić = 1 uzorak) i uključuje se kolo jednosmerne struje (230 V).

Za proveru dužine fragmenta nalivaju se i markeri (lenjiri, ladder engl.) (u našem slučaju GeneRuler 100 bp DNA Ladder®, Thermo Scientific) koji predstavljaju isečene fragmente DNK poznatih dužina. Leder poseduje sekvence u rasponu od 100 do 1000 baznih parova sečene na svakih 100 bp. Leder u sebi poseduje inkorporiranu boju neophodnu za prepoznavanje na gelu.

Po završetku elektroforeze vrši se vizuelizacija razdvojenih fragmenata bojenjem gela 1% etidijum-bromidom (Ethidium Bromide Solution 1%®, *BioChemica BC*), supstancom koja se ugrađuje između lanaca DNK molekula i koja fluorescira kada se osvetli UV svetlom (266 nm) na transiluminatoru.

Poređenjem brzine kretanja molekula koji ispitujemo sa brzinom kretanja molekula poznatih dužina, elektroforezom procenjujemo veličinu ciljne sekvence koja je predmet identifikacije. Na osnovu toga se može reći da li je ciljna sekvenca prisutna ili ne u ispitivanom uzorku.

Tabela 2.2: Sastojci za pripremu 8% poliakrilamidnog gela

Supstanca	Količina
ddH ₂ O	3,9 ml
5xTBE	1,3 ml
Akrilamid / Bis-akrilamid 40 %	1,3 ml
APS 10%	46 µl
TEMED	8,4 µl

3.8.4. Restrikciona digestija PCR produkata i analiza dužine restrikcionihi fragmenata (RFLP) (Restriction Fragment Length Polymorphism)

Ova metoda zasniva se na sposobnosti restrikcionog enzima (endonukleaze) da izvrši digestiju odnosno iseče PCR produkt na karakterističnoj poziciji, specifičnoj za dati enzim i nagradi dva ili više fragmenata koji se potom vizualizuju na poliakrilamidnom gelu. Kod ovih polimorfizama dolazi do gubitka postojećeg ili stvaranja novog restrikcionog mesta, tako da u zavisnosti od polimorfizma dobijamo produkte različite veličine [259].

Restrikciona smeša (20 μ l) se sastoji od

- PCR amplifikata
- Restrikcionog enzima (endonukleaze)
- Pufera

Nakon inkubacije (na 37°C u trajanju od sat-dva), produkti restrikcije se podvrgavaju elektroforezi na istovetan način kao produkti PCR-a. Kao rezultate analize svakog SNP-a dobijamo tri mogućnosti: nesečeni fragment (sekvenca nema restrikciono mesto), heterozigot (jedan lanac je isečen a drugi nije) i isečeni fragmenti (postoji restrikciono mesto).

3.8.5. PCR reakcija u analizi polimorfizma gena za TNF-alpha, LT alfa, TNFR₁ i TNFR₂

Reakcionu smešu od 25 μ l u svakoj tubici činili su reagensi prikazani u Tabeli 2.3.

U našem slučaju korišćeni su sledeći reagensi:

- MgCl₂ (Kappa Biosystems)
- 10XPCR puffer (KAPA Taq Buffer A and B (10X, with 1.5 mM MgCl₂ at 1X, Kappa Biosystems)
- Nukleotidi: dNTP Mix, 10 mM each ®, Thermo Scientific
- DMSO-Dimetil Sulfoksid (Serva, Nemačka)
- Prajmeri (Metabion GmbH, Nemačka)
- dd H₂O (Galenika, Srbija)
- Taq polimeraza (KAPA Taq DNA Polymerase (5 U/ μ L)®, Kappa Biosystems)

MATERIJAL I METODE

Tabela 2.3: Reakciona smeša za PCR analizu produkata TNF α , LT α , TNFR $_1$ i TNFR $_2$.

Reagens	Količina (μ l)			
	TNF alfa	LT alfa	TNFR $_1$	TNFR $_2$
MgCl $_2$ (25mM)	0,5	2,5	0,5	0,5
10xPCR pufer	2,5	2,5	2,5	2,5
dNTP (10mM)	0,5	1,0	0,5	0,5
DMSO		2,5		
Fw prajmer	1,0	1,0	1,0	1,0
Rw prajmer	1,0	1,0	1,0	1,0
ddH $_2$ O	16,3	11,3	16,3	16,3
Taq polimeraza	0,2	0,2	0,2	0,2
Uzorak DNK	3,0	3,0	3,0	3,0

Svaka sekvenca zahteva po dva specifična oligonukleotidna prajmera (Tabela 2.4). PCR reakcija odvija se u 35 ciklusa denaturacije, hibridizacije i elongacije uz po jedan ciklus početne denaturacije i finalne elongacije (Tabela 2.5).

Dobijeni PCR produkti koji se vizuelizuju na transiluminatoru korišćenjem PAGE su sledećih veličina:

- TNF α - 117bp (Slika 2.1)
- LT α - 782bp (Slika 2.2)
- TNFR $_1$ - 183bp
- TNFR $_2$ - 242 bp (Slika 2.3)

Tabela 2.4: Specifični prajmeri neophodni za amplifikaciju produkata TNF α , LT α , TNFR $_1$ i TNFR $_2$.

	Fw prajmer	Rv prajmer
-308G/A TNF α	Fw: 5' AGG CAA TAG GTT TTG AGG GCC AT 3'	Rv: 5' ACA CTC CCC ATC CTC CCT GCT 3'
+252A/G LT α	Fw: 5'CCGTGCTTCGTGCTTTGGAC TA 3'	Rv: 5' AGAGGGGTGGATGCTTG GGTTC 3'
+36G/A TNFR $_1$	Fw: 5'GAC CCC AAA TGG GGG AGT GAG AGG 3'	Rv: 5' ACC AGG CCC GGG CAG GAG AG 3'
+676T/G TNFR $_2$	Fw: 5' TCC TGG AGT TGG CTG CGT GT 3'	Rv: 5'ACT CTC CTA TCC TGC CTG CT 3'

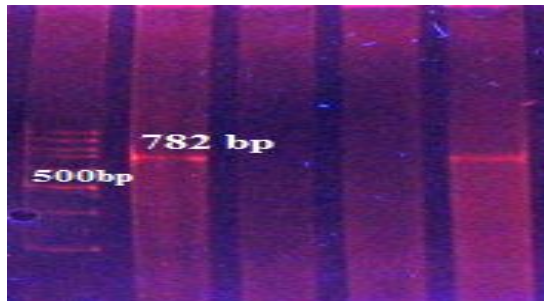
MATERIJAL I METODE

Tabela 2.5: Uslovi reakcije lančane polimeraze za amplifikaciju produkata TNF α , LT α , TNFR $_1$ i TNFR $_2$.

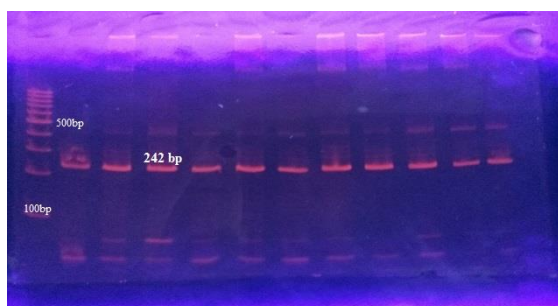
	Početna denaturacija	Denaturacija	Hibridizacija	Elongacija	Finalna elongacija
TNF α	3 min 95°C	45 sec 94 °C	45 sec 59 °C	45 sec 72 °C	7 min 72 °C
LT α	3 min 95°C	30 sec 95 °C	30 sec 56 °C	1 min 72 °C	5 min 72 °C
TNFR $_1$	3 min 94 °C	30 sec 94 °C	30 sec 65 °C	30 sec 72 °C	7 min 72 °C
TNFR $_2$	3 min 95°C	30 sec 95 °C	30 sec 60 °C	30 sec 72 °C	7min 72 °C



Slika 2.1: Prikaz PCR produkta na PAA gelu za TNF α



Slika 2.2: Prikaz PCR produkata na PAA gelu za LT α



Slika 2.3: Prikaz PCR produkata na PAA gelu za TNFR $_2$

3.8.6. RFLP u analizi polimorfizama za TNF alfa, LT alfa, TNFR₁ i TNFR₂

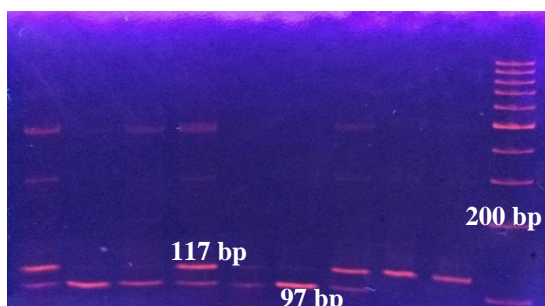
Kao što je već pomenuto, za svaki polimorfizam postoje individualni uslovi (Tabela 2.6). Zapremina restrikcione smeše se dodaje celokupnom preostalom amplifikatu nakon provere (maksimalno do 16 µl amplifiakta).

Tabela 2.6: Uslovi restrikcije ispitivanih polimorfizama

	TNF α	LT α	TNFR ₁	TNFR ₂
Pufer (µl)	Tango (2)	Tango (2)	MultiCore10x (2)	Tango (2)
Enzim (µl)	NcoI (0,5)	NcoI (0,3)	MSPA1I (0,3)	Hin1II (0,5)
Inkubacija, 37 °C	10 min	10 min	2,5h	1,5h
Proizvođač	Thermo Scientific		New England Biolabs	Thermo Scientific

U slučaju **TNF α -308 G/A** polimorfizma, pomenuti NcoI enzime prepoznaje specifičnu sekvencu 5'...C ↓ CATG G...3'. Ukoliko zamena baza ne postoji, enzim će prepoznati restrikciono mesto i produkt dužine 117 bp će digestovati na dva manja produkta (97 bp+20 bp). Kao rezultat ove analize na poliakrilamidnom gelu dobijamo sledeće mogućnosti (Slika 2.4)

- Homozigot bez SNP, homozigot 1, (divlji tip, *wild type-wt*, za Evropsku populaciju) čiji je genotip G/G . Na gelu ovaj genotip prepoznamo kao dve trake dužine 97 bp i 20 bp.
- Heterozigot -sa SNP (het) čiji je genotip G/A. Na gelu ovaj genotip prepoznamo kao tri trake dužine 117 bp, 97 bp i 20 bp.
- Homozigot za SNP, homozigot 1 (mutantni tip-mut za evropsku populaciju) čiji je genotip A/A. Ovaj genotip na gelu prepoznamo kao jednu traku dužine 117 bp.

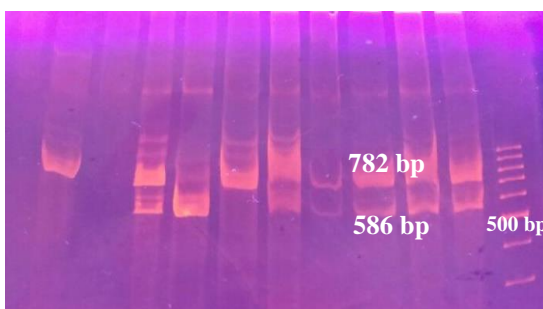


Slika 2.4: Prikaz produkata digestije na PAA gelu za TNF α (Da bi PCR fragmenti dužine 117 bp i 97 bp bili vizuelizovani (“razdvojeni”) na gelu, traku dužine 20 bp nije moguće prikazati na gelu)

MATERIJAL I METODE

U slučaju **LT +252A/G** polimorfizma, pomenuti *NcoI* enzim prepoznaje specifičnu sekvencu.... 5'...C ↓ CATG G...3'. Ukoliko ne postoji polimorfizam, enzim prepoznaje restrikciono mesto i fragment dužine 782 bp će digestovati na dva manja (586 bp+196 bp). Na poliakrialmidnom gelu vizuelizacijom dobijamo sledeće mogućnosti (Slika 2.5):

- Homozigot bez SNP, homozigot 1, nesečeni homozigot (divlji tip-wt za evropsku populaciju) čiji je genotip A/A. Ovaj genotip na gelu prepoznavamo kao jedan fragment dužine 782 bp.
- Heterozigot sa SNP-(het) čiji je genotip GA. Posmatranjem ovog genotipa na gelu uočavamo tri fragmenta dužine 782 bp, 586 bp i 196bp.
- Homozigot bez SNP, homozigot 2, sečeni homozigot (divlji tip-wt za evropsku populaciju) čiji je genotip GG. Na gelu ovaj genotip prepoznavamo kao dve trake dužine 586 bp i 196 bp.



Slika 2.5: Prikaz produkata digestije na PAA gelu za $LT\alpha$ (Da bi PCR fragmenti dužine 782 bp i 586 bp bili vizuelizovani ("razdvojeni") na gelu, traku dužine 196 bp nije moguće prikazati na gelu)

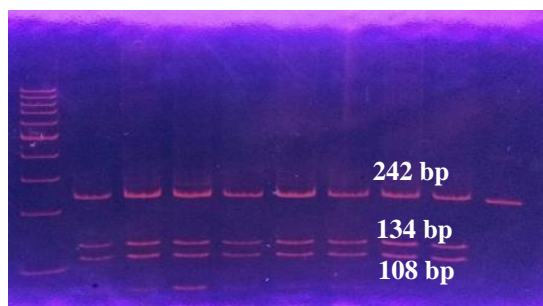
Kada se radi o **TNFR₁ +36A/G** polimorfizmu, enzim *MspAII* prepoznaje specifično restrikcionu sekvencu 5'...CMG↓CKG...3'. U ovom slučaju će enzim prepoznati sekvencu u slučaju prisustva zamene baze i produkt od 183 bp će digestovati produkte od 108 bp i 75 bp. kao rezultat na PAA gelu pratimo sledeće mogućnosti:

- Homozigot bez SNP, homozigot 1 (divlji tip-wt za evropsku populaciju) gde nije došlo do zamene baza i genotip je A/A. Na gelu ovaj genotip pokazuje jednu traku dužine samog PCR produkta odnosno 183 bp.
- Heterozigot sa SNP (het) čiji je genotip AG jer je došlo do zamene baze u jednom lancu. Na PAA gelu ovaj genotip pokazuje tri fragmenta dužine 183 bp, 108 bp i 75 bp.

- Homozigot za SNP, homozigot 2 (mutant-mut za evropsku populaciju) čiji je genotip GG (na oba lanca došlo do zamene baze. Pri vizuelizaciji na gelu ovaj genotip pokazuje dva fragmenta dužine 108 bp i 75 bp.

Digestija PCR produkta za analizu **TNFR₂ +676 T/G** polimorfizma vršena je pomenutim Hin III enzimom koji prepoznaje specifičnu 5'...CATG↓...3' sekvencu. Ukoliko zamena baza ne postoji, enzim će prepoznati restrikciono mesto i produkt dužine 242 bp će digestovati na dva manja (134 bp+108 bp). Pri analizi na PAA gelu možemo očekivati sledeće mogućnosti (Slika 2.6):

- Homozigot bez SNP-divlji tip (wild type-wt) gde nije došlo do zamene baze i genotip je TT. Pri analizi na gelu ovaj genotip pokazuje dva fragmenta dužine 134 bp i 108 bp.
- Heterozigot sa SNP (het) čiji je genotip TG jer je došlo do zamene baze na jednom lancu DNK. Na PAA gelu ovaj genotip daje tri fragmenta dužina 242 bp, 134bp i 108bp.
- Homozigot za SNP- mutant (mut) čiji je genotip GG jer je došlo do zamene baze na oba lanca DNK. Pri vizuelizaciji na PAA gelu ovaj genotip poseduje jedan fragment dužine 242 bp.



Slika 2.6: Prikaz produkata digestije na PAA gelu za TNFR2

3.9. ELISA-Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

ELISA reakcija predstavlja imunoesej (upotreba antitela (At) kao reagenasa) koji koriste enzim vezan za jedan od reagenasa u cilju kvantifikacije ispitivane supstance kroz formiranje boje nakon dodavanja supstrata/hromogena [260]. Tako da je osnovna karakteristika ELISE obeležavanje jednog od reagenasa enzimom.

ELISA je heterogeni sistem, odnosno podrazumeva postepeno dodavanje i reagovanje reagenasa na supstrat vezan za čvrstu podlogu, kroz korake inkubacije i ispiranja u cilju

razdvajanja vezanog i slobodnog supstrata. Enzimaska reakcija služi da nagradi boju i na taj način kvantifikuje reakciju, upotrebom reagensa obeleženog enzima.

3.9.1. Korišćeni komercijalni ELISA setovi za analizu koncentracije citokina

Sva četiri ELISA seta su proizvođača eBioscience i predstavljaju direktne sendvič ELIZE (Tabela 2.7). Absorbanca se za sva 4 seta očitava na 450 nm. Sastoje se od ploče sa 96 bunarića. Od 96 bunarića, jedan služi za tzv „blank“ čija je absorbanca jednaka nuli, a u 8 se pripremaju standardna razblaženja pomoću kojih se formira standardna kriva, tako da se po ploči dobija 88 rezultata.

Tabela 2.7: Korišćeni ELISA setovi za određivanje serumskih koncentracija TNF α , LT α , TNFR $_1$, TNFR $_2$

Citokin	Naziv seta	jedinice	senzitivnost
TNF α	Human TNF alpha ELISA Ready-SET-Go!® (88-7346)	pg/ml	4,000
LT α	Human TNF- β Instant ELISA® (BMS202INST)	pg/ml	4,600
TNFR $_1$	Human sTNF-R (60kDa) Instant ELISA® (BMS203INST)	ng/ml	0,053
TNFR $_2$	Human sTNF-R (80 kDa) Platinum ELISA® (BMS211)	ng/ml	0,100

Absorbanca se očitava na TECAN čitaču u kombinaciji sa Microsoft Excel programom. Nakon formiranja standardne krive u Microsoft EXCEL programu, na osnovu absorbanci dobijaju se željene koncentracije.

3.10. Statistička obrada podataka

Statističkom analizom podataka obuhvaćeni su svi ispitivani parametri. Baza podataka kao i obrada samih rezultata vršeni su u SPSS 18.0 statističkom paketu (SPSS inc., Chicago, IL, USA).

Od metoda deskriptivne statistike korišćene su mere centralne tendencije i mere disperzije, za numerička obeležja posmatranja, a apsolutni i relativni brojevi za atributivna obeležja posmatranja.

Hi-kvadrat (χ^2 , *Chi-square Test*), odnosno Fišerovim testom egzaktne verovatnoće (*Fisher's exact Test*) poredili smo učestalost pojavljivanja analiziranih atributivnih obeležja posmatranja, između analiziranih grupa.

MATERIJAL I METODE

Izbor testa za analizu numeričkih obeležja posmatranja zavisio je od prirode raspodele podataka. U cilju određivanja normalnosti raspodele korišćen je Kolmogorov-Smirnov test (*Kolmogorov-Smirnov Test*). U slučaju normalne raspodele koristili smo Studentov T test (*Student's t-Test*), jednofaktorsku analizu varijanse (ANOVA) i sa Bonferroni korekcijom (*Bonferroni correction*) za analizu razlika između grupa. Kod raspodele različite od normalne koristili smo Kraskal-Volisov test (*Kruskal-Wallis Test*), a za međugrupnu analizu Man Vitnjev U test (*Mann Whitney U Test*).

Korišćeni su i Spirmanovi (*Spearman's rank correlation coefficient*) i Pirsonovi (*Pearson's rank correlation coefficient*) koeficijenti korelacije, u zavisnosti od toga da li su obrađivani parametarske ili neparametarske vrednosti. Regresionim modelima (univarijantim pa multivarijantim) određivali smo zavisne odnosno nezavisne prediktore razlike rizika za nastanak oboljenja. Logističku regresionu analizu koristili smo za računanje odnosa verovatnoća (*eng. Odds Ratio-OR*) za utvrđivanje rizika oboljevanja od istraživanih oboljenja. Interval poverenja (*engl. Confidence Interval-CI*) bio je 95%. Višestrukom linearnom regresijom određivali smo kretanje vrednosti zavisnih promenljivih (dubine sondiranja, nivoa pripojnog epitela i serumske koncentracije citokina) u zavisnosti od menjanja nezavisnih promenljivih.

Odstupanje od Hardi-Vajnergovog ekvilibrijuma (*Hardy-Weinberg equilibrium-HWe*) računato Hi kvadrat testom pomoću online dostupnih kalkulatora.

Vrednosti ravnoteže nepovezanosti (LD) su računane i grafički predstavljene za polimorfizme na istom lokusu pomoću programa *Haploview 4.2*.

Pacijenti sa nedostajućim podacima nisu uključeni u studiju. Statistička signifikantnost definisana je za $p < 0,05$

REZULTATI

4.0 REZULTATI

4.1. Demografski podaci ispitanika

U studiju je bilo uključeno ukupno 180 ispitanika, 81 muškog (45,0%) i 99 ženskog (55,0%) pola. Prosečna starost ispitanika bila je 44,53±9,087, raspona od 26-72 godine. Demografske karakteristike ispitanike po grupama predstavljene su u tabeli 3.1. Grupe ispitanika bile su usklađene po polu (χ^2 , p=0,179) i starosti (ANOVA, p=0,242). Obrazovanje ispitanika definisano je kao osnovno, srednje, student i visoko. Grupe nisu bile usklađene po obrazovanju (χ^2 , p=0,000). Ispitanici srednjeg obrazovanjem preovladavali su u T2D grupi, dok su visoko obrazovani ispitanici preovladali u grupama sistemski zdravih ispitanika.

Tabela 3.1: Demografske karakteristike ispitanika po grupama

		Grupa			
		ZK (n=57)	PD (n=58)	T2D (n=65)	Ukupno
Pol (N(%))	Muški	23 (40,4)	24 (41,4)	34 (52,3)	81 (45,0)
	Ženski	34 (59,6)	34 (58,6)	31 (47,7)	99 (55,0)
Starost (SV±SD; raspon)		43,47±4,22 6 (26-57)	46,15±12,5 3 (28-72)	44,00±8,48 2 (27-61)	44,53±9,08 7 (26-72)
Stepen obrazovan ja (N (%))	Osnovno	0 (0)	2 (3,4)	6 (9,2)	8 (4,4)
	Srednje	2 (3,5)	15 (25,9)	44 (67,7)	61 (33,9)
	Student	25 (43,9)	7 (12,1)	0 (0)	32 (17,8)
	Visoko	30 (52,6)	34 (58,6)	15 (23,1)	78 (43,3)
ITM(kg/m ²)		22,6±2,932	24,3±3,589	27,0±2,789	24,7±3,620
Intenzitet stresa	Nizak	4 (7,0)	1 (32,8)	31 (47,7)	54 (30,0)
	Umeren	35 (61,4)	26 (44,8)	18 (27,7)	79 (43,9)
	Visok	18 (31,6)	13 (22,4)	16 (24,6)	47 (26,1)
	Prosek	2,25±0,576	1,9±0,742	1,77±0,825	1,96±0,750
Fizička aktivnost- frekvencija	Nema	26 (45,6)	25 (43,1)	38 (58,5)	89 (49,4)
	Redovna	24 (42,1)	26 (44,8)	19 (29,2)	69 (39,3)
	Neredovna	7 (12,3)	7 (12,1)	8 (12,3)	22 (12,2)
Fizička aktivnost- intenzitet	Slab	4 (12,9)	14 (42,4)	21 (77,8)	39 (42,9)
	Umeren	19 (63,1)	16 (48,5)	3 (11,1)	38 (41,8)
	Jak	8 (25,8)	3 (9,1)	3 (11,1)	14 (15,4)
Fizička aktivnost- vrsta	Aerobna	27 (87,1)	23 (69,7)	23 (82,1)	73 (79,3)
	Anaerobna	1 (3,2)	6 (18,2)	4 (14,8)	11 (12,1)
	Kombinovan	3 (9,7)	4 (12,1)	0	7 (7,6)

ITM-Indeks telesne mase

Iako je ulaznim kriterijumima studije indeks telesne mase definisan u rasponu od 18-30 kg/m², uočena je statistički značajna razlika u ovom parametru među grupama (ANOVA sa Bonferoni korekcijom, p<0,05 za ZK>PD>T2D). Nivo stresa značajno je

REZULTATI

veći (Man-Vitnijev test) u grupi zdravih kontrola u odnosu na PD grupu ($p=0,008$) i na T2D grupu ($p=0,000$). Ispitanici su davali podatke i o redovnosti, intenzitetu i vrsti fizičke aktivnosti. Grupe se međusobno razlikuju samo po podacima o intenzitetu vežbanja, sa tendencijom jačeg intenziteta u grupi zdravih kontrola (χ^2 , ZK/PD: $p=0,018$, ZK/T2D: $p=0,000$, PD/T2D: $p=0,007$).

Osnovna podela pacijenata na osnovu konzumiranja cigareta je na pušače i nepušače (Tabela 3.2). U odnosu na ovu podelu, grupe pacijenata su međusobno usklađene (χ^2 , $p=0,202$). Pušačima je dalje računat indeks paklo/godina, i u ovoj podeli pušača uočena je razlika između ispitanika ZK i T2D grupe (ANOVA sa Bonferoni korekcijom, $p=0,003$). Nepušači su definisani kao oni koji nikada nisu pušili, a bivši pušači podeljeni su na osnovu vremena kada su ostavili cigarete. U grupi zdravih kontrola dominiraju pacijenti koji nisu nikada pušili (χ^2 , ZK/PD: $p=0,001$, ZK/T2D: $p=0,000$). Beležili smo i podatke o disanju na usta (noću ili danju) i dobili smo statistički značajno veći broj ispitanika sa ovom navikom u T2D grupi (38,5%), nego u PD (17,2%) i ZK (15,3%) grupi (χ^2 , ZK/T2D: $p=0,045$, T2D/PD: $p=0,027$). Navika stiskanja zuba zabeležena je statistički češće kod ispitanika kontrolne grupe (33,3%) nego u PD (17,2%) i T2D grupi (13,8%) (χ^2 , ZK/PD: $p=0,047$, ZK/T2D: $p=0,011$).

Tabela 3.2: Pušački status ispitanika

	Grupa			
	ZK (n=57)	PD (n=58)	T2D (n=65)	Ukupno
Pušači	19 (33,3)	24 (41,4)	17 (26,2)	60 (33,3)
■N<10 cig/d	4 (21,1)	11 (45,8)	6 (35,3)	21 (35,0)
■N≥10 cig/d	15 (78,9)	13 (54,2)	11 (54,7)	39 (65,0)
■PPY ($\bar{x}\pm SD$)	7,6±7,151	16,6±10,604	29,0±26,743	17,9±18,157
(min-max)	(0,5-23,0)	(1,20-40,0)	(5,0-120,0)	(0,5-120,0)
Nepušači	38 (66,7)	34 (58,6)	48 (73,8)	120 (66,7)
■Nikad	35 (92,1)	22 (64,7)	22 (45,8)	79 (65,8)
■Ostavili<5god	3 (7,9)	4 (11,8)	11 (22,9)	18 (15,0)
■Ostavili≥5god	0(0)	8 (23,5)	15 (33,3)	23 (19,2)

Sve vrednosti, sem PPY indeksa su izražene kao N(%). PPY-indeks paklo-godina.

Sa aspekta porodične anamneze, beležili smo podatke o postojanju dijabetesa i/ili parodontopatije u porodicama (Tabela 3.3). Sa veoma nesigurnim podacima o prisustvu

REZULTATI

parodontopatije u porodicama ispitanika, podaci govore o većoj zastupljenosti parodontopatije u grupi zdravih kontrola i većoj zastupljenosti dijabetesa u porodicama obolelih od dijabetesa (χ^2 , $p=0,001$; $ZK>PDP=0,000$; $PDP<T2D=0,005$)

Tabela 3.3: Podaci o pozitivnoj porodičnoj anamnezi ispitanika

Porodična an.	Grupa	ZK (n=57)	PD(n=58)	T2D (n=65)	Ukupno (n=180)
Dijabetes		20 (35,1)	19 (32,76)	29 (44,61)	68 (37,7)
Parodontopatija		31 (54,4)	24 (41,37)	9 (13,84)	64 (35,6)
T2D+PDP		10(17,5)	10 (17,24)	3 (4,63)	23 (12,7)

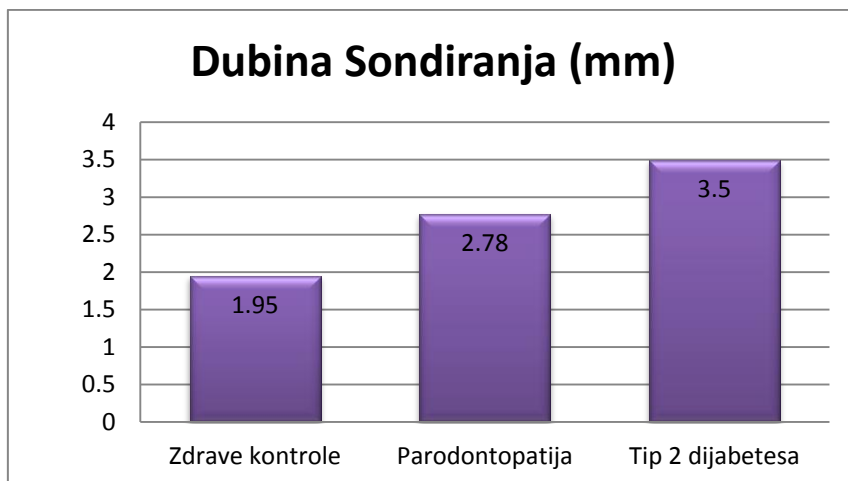
4.2.Klinički parodontološki parametri

Kriterijumima uključenja u studiju, minimalan broj zuba definisan je na 14. Prosečan broj zuba ispitanika iznosio je $21,82\pm 5,268$ (po grupama: $ZK=25,39\pm 1,398$, $PD=22,74\pm 4,170$, $T2D=19,91\pm 4,030$, Mann-Whitney $ZK-PD-T2D=0,000$). Iako pacijenti sa parodontopatijom pokazuju veći broj zuba od ispitanika T2D grupe, broj pacijenata sa prisutnim protetskim nadoknadama neznatno je veći kod pacijenata PD (30 (51,72%)) nego kod pacijenata T2D grupe (30 (46,15%)) (T test za nevezane uzorke, $p=0,800$).

Stepen higijene usne duplje i stanje parodontalnih tkiva pratili smo kroz merenja plak indeksa, krvarenja na provokaciju, dubine sondiranja i nivoa pripojnog epitela.

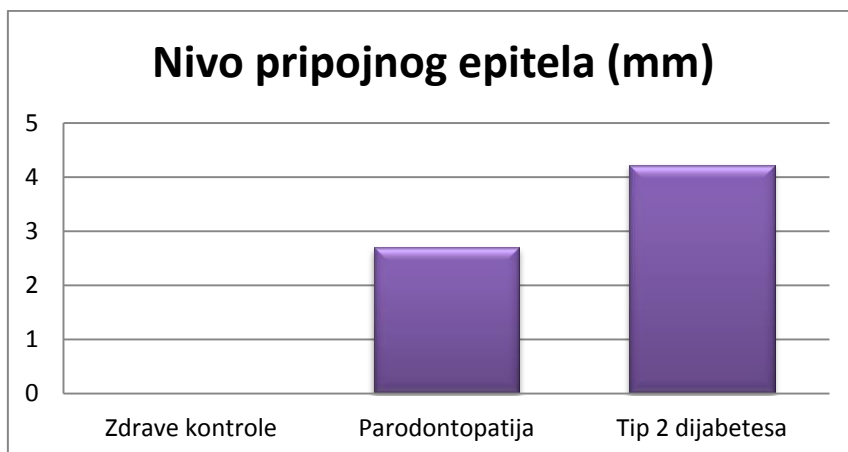
Srednje vrednosti dubine sondiranja (DS) iznosile su $1,95\pm 0,462$ mm u grupi ZK, $2,78\pm 0,591$ mm u PD grupi i $3,5\pm 0,920$ mm u T2D grupi. Statističkom obradom podataka (ANOVA sa Bonferoni korekcijom) potvrđene su značajno veće vrednosti DS kod pacijenata T2D i PD grupe u odnosu na grupu zdravih ispitanika ($p=0,000$) (Grafik 3.1, Tabela 3.4). Ni kada smo vrednosti dubine sondiranja predstavili kao rangovne vrednosti, nije nađena statistički značajna razlika između ispitanika iz PD i T2D grupe (χ^2 , $p=0,085$). U grupi ispitanika sa dijagnostikovanim dijabetesom poredili smo vrednosti DS u odnosu na parametre glikoregulacije i nismo našli statistički značajnu razliku u ovom parametru u odnosu na vrednosti HbA1c (dobro kontrolisan dijabetes: $DS=2,62\pm 0,717$ mm, loše kontrolisan dijabetes: $DS=2,76\pm 1,001$ mm, T test za nevezane uzorke: $p=0,572$).

REZULTATI



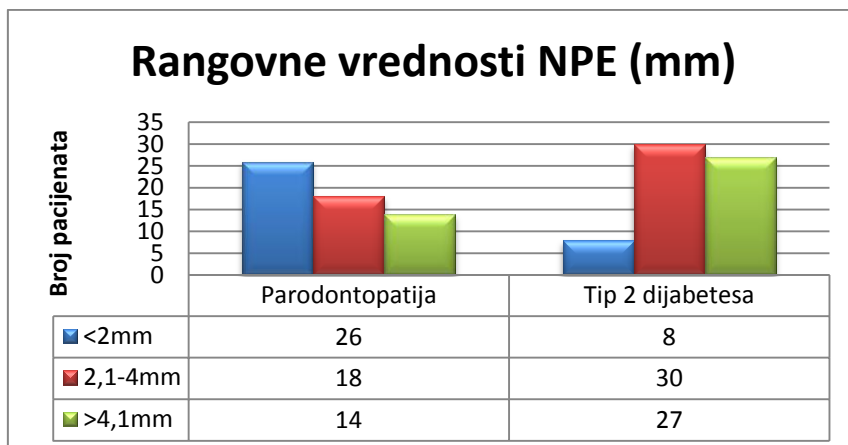
Grafikon 3.1. Srednje vrednosti dubine sondiranja (DS) izražene u mm kod pacijenata sve tri grupe

Srednje vrednosti nivoa pripojnog epitela (NPE) iznosile su 0.00 ± 0.00 mm u ZK grupi, $2,71 \pm 1,885$ mm u PD grupi i $4,23 \pm 2,214$ mm. Poređenjem srednjih vrednosti uočena je statistički značajna razlika ovog parametra među grupama sa dijagnostikovanom parodontopatijom (Mann-Whitney, $p=0,000$) (Grafikon 3.2, Tabela 3.4). Takođe, kada smo vrednosti NPE za grupe pacijenata sa dijagnostikovanom parodontopatijom podelili na rangovne vrednosti, dobili smo statistički značajnu razliku (χ^2 , $p=0,001$), što ukazuje na veći stepen destrukcije parodontocijuma kod ispitanika sa dijabetesom (Grafikon 3.3). U okviru T2D grupe, ispitanici sa dobrom glikoregulacijom pokazali su neznatno manje vrednosti NPE ($3,62 \pm 1,910$ mm) u odnosu na one sa lošom regulacijom nivoa šećera u krvi ($4,49 \pm 2,306$ mm; T test za nevezane uzorke: $p=0,145$),



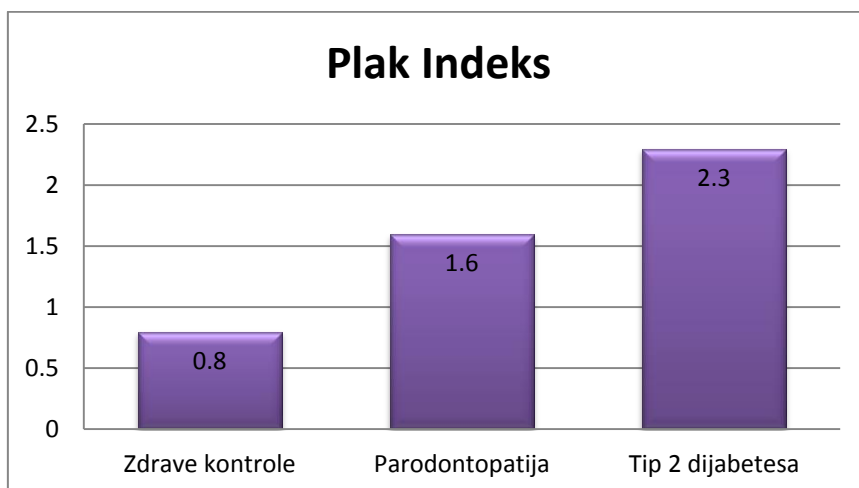
Grafikon 3.2: Srednje vrednosti nivoa pripojnog epitela (NPE) izražene u mm kod pacijenata sve tri grupe

REZULTATI



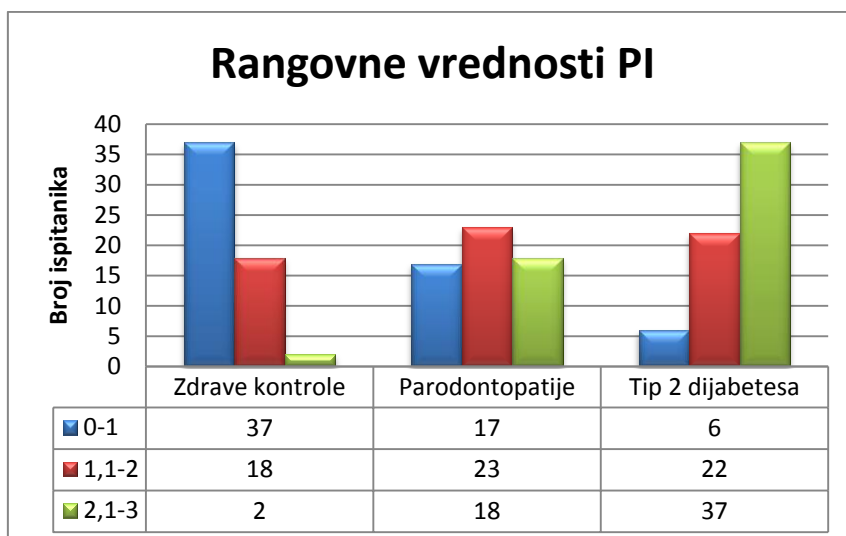
Grafikon 3.3. Raspored ispitanika prema rangovnim vrednostima NPE

Prosečne vrednosti plak indeksa (PI) po grupama bile su $0,80 \pm 0,552$ u ZK grupi, $1,60 \pm 0,763$ u PD grupi i $2,30 \pm 0,741$ u T2D grupi. Poređenjem vrednosti PI uočena je statistički značajna razlika u ovom parametru među sve tri grupe (ANOVA sa Bonferoni korekcijom, $p=0,000$) (Grafikon 3.4, Tabela 3.4). Značajnost ostaje ista i kada vrednosti plak indeksa rangiramo (χ^2 , $ZK < PD = ZK < T2D = 0,000$, $PD < T2D = 0,003$). U ZK grupi, najveći broj ispitanika (37(64,9%)) je u opsegu od 0-1, u grupi PD najviše pacijenata (23(39,7%)) je u opsegu 1,1-2, dok je u T2D grupi najviše pacijenata (37(56,9%)) pokazuje prosečan plak indeks 2,1-3 (Grafikon 3.5). Nije nađena razlika u vrednostima PI između ispitanika sa dobro ($2,32 \pm 0,649$) i loše kontrolisanim dijabetesom ($2,17 \pm 0,780$) (Man Vitni test, $p=0,497$).



Grafikon 3.4: Srednje vrednosti plak indeksa (PI) po grupama

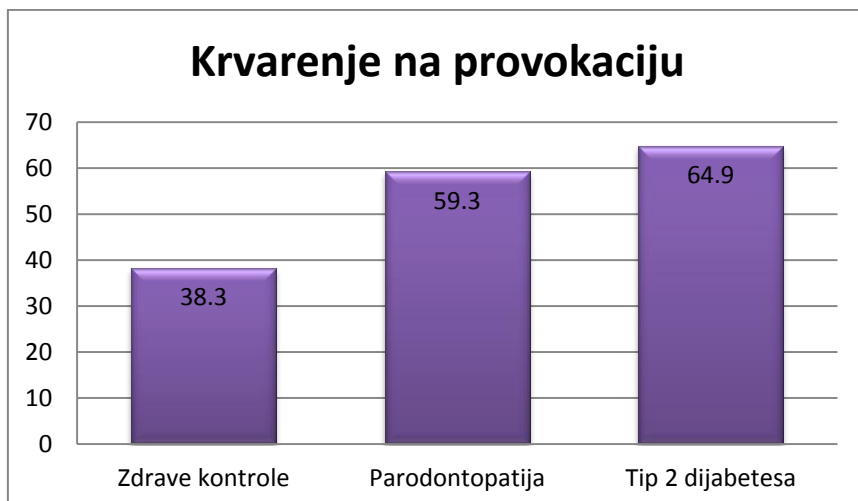
REZULTATI



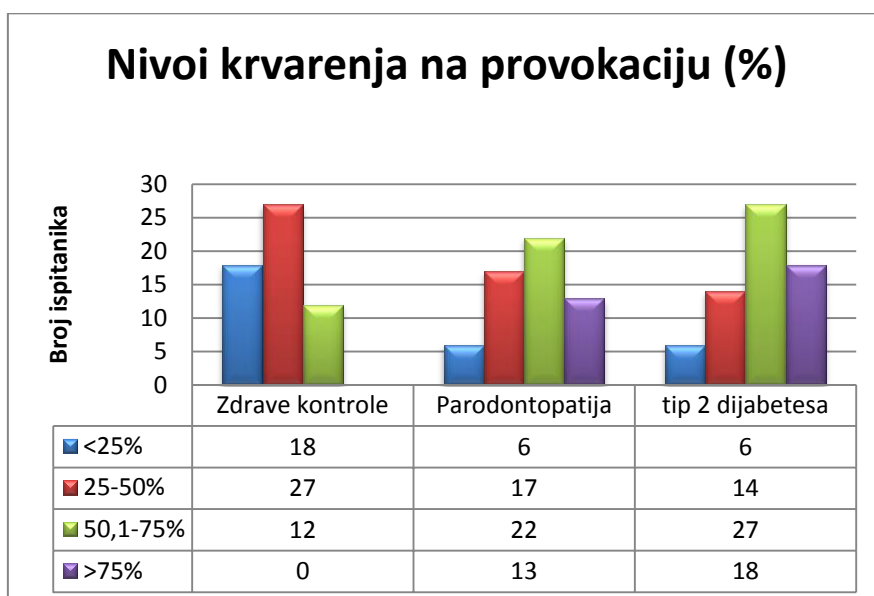
Grafikon 3.5: Stepenovane vrednosti plak indeksa (PI) po grupama

Krvarenje na provokaciju izražavano je kao broj mesta koji krvare 30 sekundi nakon sondiranja izraženo u procentima. Prosečan procenat mesta koja krvare nakon sondiranja iznosio je $38,3 \pm 18,418$ u ZK grupi, $59,3 \pm 25,905$ u PD grupi i $64,9 \pm 27,633$ u T2D grupi. Poredeći vrednosti KNP dobili smo statistički značajnu razliku u ovom parametru između zdravih kontrola u odnosu na grupe pacijenata sa dijagnostikovanom parodontopatijom (ANOVA sa Bonferoni korekcijom, $ZK < PD$, $ZK < T2D$, $p=0,000$) (Grafikon 3.6, Tabela 3.4). Kada su ispitanici podeljeni po stepenu krvarenja, takođe je uočena statistički značajna razlika među grupama (χ^2 , $p=0,000$) (Grafikon 3.7). Daljom međugrupnom analizom utvrđeno je da razlika postoji između zdravih kontrola i dve grupe u kojima je dijagnostikovana parodontopatija (χ^2 , ZK/PD i $ZK/T2D$, $p=0,000$), dok nema razlike između PD i T2D grupe (χ^2 , $p=0,705$). Ispitanici sa dobro regulisanim dijabetesom pokazali su neznatno manje vrednosti krvarenja na provokaciju ($62,23 \pm 0,649$) u odnosu na ispitanike sa lošom glikoregulacijom ($66,16 \pm 28,888$) (T test za nevezane uzorke, $p=0,599$).

REZULTATI



Grafikon 3.6: Srednje vrednosti krvarenja na provokaciju (KNP) izraženog u % kod pacijenata sve tri grupe



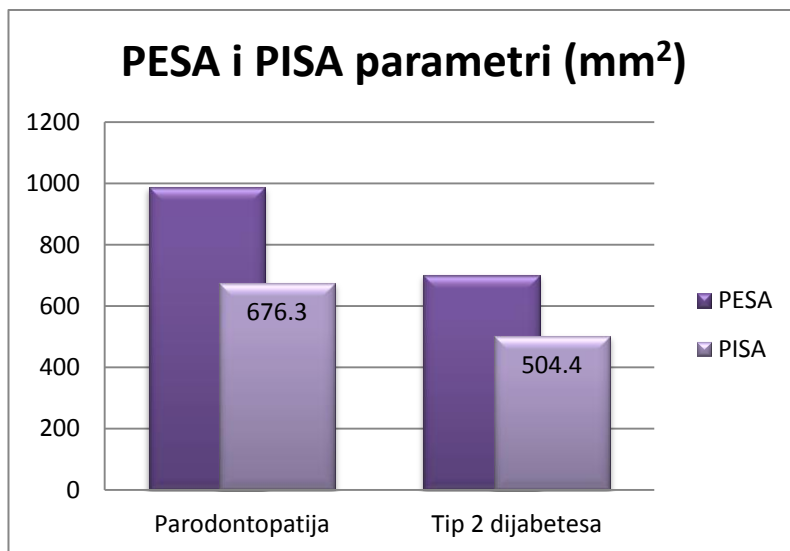
Grafikon 3.7: Nivoi krvarenja na provokaciju(%) po grupama.

Kao mera uticaja inflamacije iz parodontcijuma na sistemsko zdravlje određivani su PESA i PISA parametri. PESA predstavlja meru površine epitela parodontalnih džepova, ima je smisla upotrebiti samo kod pacijenata sa dijagnostikovanom parodontopatijom, i iznosila je $989,8 \pm 302,1 \text{ mm}^2$ u PD grupi i $702,9 \pm 289,9 \text{ mm}^2$ u T2D grupi ispitanika. Poređenjem ovih vrednosti dobijamo statistički značajnu razliku posmatranih parametara između pomenutih grupa pacijenata (T test, $p=0,000$). Ovaj parametar nije se razlikovao među ispitanicima sa dobrom ($780,87 \pm 359,785 \text{ mm}^2$) i lošom glikoregulacijom ($668,28 \pm 249,866 \text{ mm}^2$) (T test za nevezane uzorke, $p=0,150$).

PISA parametar oslikava inflamiranu površinu epitela parodontalnih džepova, i iznosio je $676,3 \pm 359,007 \text{ mm}^2$ u PD i $504,4 \pm 332,3 \text{ mm}^2$ u T2D grupi. Pokazano je postojanje

REZULTATI

statistički značajne razlike u vrednosti PISA parametra među grupama pacijenata sa dijagnostikovanom parodontopatijom (T test, $p=0,007$) (Grafikon 3.8, Tabela 3.4). PISA je pokazala neznatno veće vrednosti kod ispitanika sa dobro ($554,74\pm 348,758 \text{ mm}^2$) u odnosu na ispitanika sa loše kontrolisanim dijabetesom ($481,93\pm 316,231 \text{ mm}^2$) (T test za nevezane uzorke, $p=0,419$).



Grafikon 3.8: Srednje vrednosti PISA I PESA (mm²) kod pacijenata sve tri grupe.

Tabela 3.4 Klinički parodontološki parametri ispitanika

Parametar	Grupa	$x\pm SD$	Med (Min-Max)	P vrednost
DS (mm)	ZK	$1,95\pm 0,462$	1,85(1,17-3,1)	¶0,000 ZK<PD 0,000 ZK<T2D 1,000 PD/T2D
	PD	$3,18\pm 0,591$	2,73(0,59-4,12)	
	T2D	$3,15\pm 0,920$	2,58(1,92-6,42)	
NPE (mm)	PD	$2,91\pm 1,884$	2,28 (0,68-9,04)	‡0,000 PDP<T2D
	T2D	$4,23\pm 2,214$	3,73 (1,11-10,30)	
PI	ZK	$0,85\pm 0,552$	0,780 (0,06-2,20)	¶0,000 ZK<PD 0,000 ZK<T2D 0,000 PD<T2D
	PD	$1,60\pm 0,763$	1,475 (0,28-3,00)	
	T2D	$2,22\pm 0,741$	2,30 (0,50-3,00)	
KNP (%)	ZK	$38,28\pm 18,418$	35,710(8,80-84,52)	¶0,000 ZK<PD 0,000 ZK<T2D 0,618 PD/T2D
	PD	$59,35\pm 25,906$	57,59(14,28-100,0)	
	T2D	$64,96\pm 27,63$	67,85(5,88-100,0)	
PESA (mm ²)	PDP	$989,8\pm 302,06$	99,34 (314,5-2080,7)	¶0,000PDP>T2D
	T2D	$702,9\pm 289,990$	659,6 (213,6-1854,4)	
PISA (mm ²)	PDP	$676,6\pm 359,007$	648,8 (171,5-2080,7)	¶0,000PDP>T2D
	T2D	$504,4\pm 332,300$	431,8 (65,1-2126,1)	

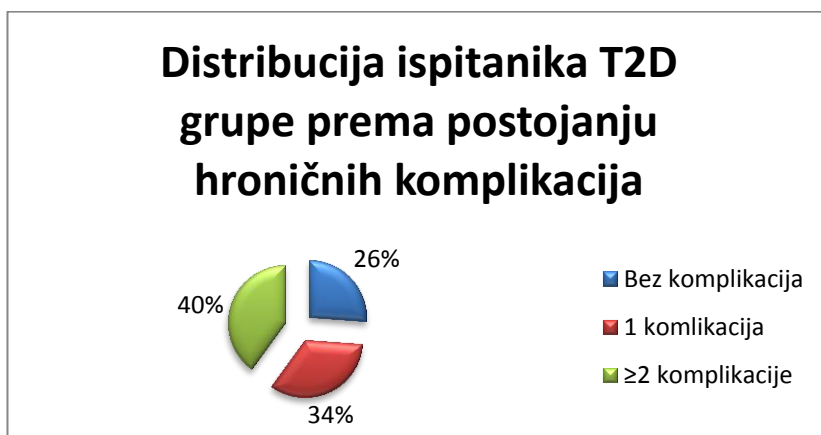
¶ANOVA (Bonferoni korekcija), ‡Mann-Whitney U Test, ¶T test (nezavisni uzorci)

REZULTATI

Merenja svih kliničkih parodontoloških parametara sumirana su u Tabeli 3.4 gde su prikazane srednje vrednosti, standardne devijacije, mediane, minimalne i maksimalne vrednosti pomenutih parametara.

4.3. Podaci o tipu 2 dijabetesa

Grupu pacijenata obolelih od tipa 2 dijabetesa činilo je ukupno 65 ispitanika. Prosežna dužina trajanja dijabetesa u godinama bila je $11,46 \pm 7,399$ godine (med(min-max)=10,00(1,00-35,00)). 31 pacijent (47,7%) bio je na terapiji oralnim hipoglikemicima, njih 22 (33,8%) bilo je na terapiji insulinom, dok je 12 (18,5) koristilo kombinovanu terapiju. Većina pacijenata (njih 45, odnosno 69,2%) imalo je lošu glikoregulaciju. Najmanji broj ispitanika T2D grupe (17 (26,2%)) nije imalo dijagnostikovanu nijednu hroničnu komplikaciju, njih 22 (33,8%) imalo je jednu, dok je čak 26 (40,0%) ispitanika imalo dijagnostikovano dve ili više hronične komplikacije (Grafikon 3.9). Makrovaskularne komplikacije imalo je 28 (43,1%) ispitanika, dok je prisustvo mikrovaskularnih hroničnih komplikacija detektovano kod 37 (56,9%) pacijenata. Daljom podelom hroničnih mikrovaskularnih promena zabeleženo je da 21 (32,3%) ispitanika ima očne, 9 (13,8%) nefrološke, dok 29 (44,6%) ima periferne neurološke komplikacije.



Grafikon 3.9: Distribucija pacijenata sa dijabetesom u odnosu na prisustvo hroničnih komplikacija

4.4. Krvna slika i biohemijske analize

Prosečne vrednosti broja eritrocita po grupama bile su u granicama normale (ZK= $4,53 \pm 0,559$, PD= $4,69 \pm 0,646$, T2D= $4,63 \pm 0,486$), iako su maksimalne vrednosti u grupama PD i T2D dostizale do $6,70 \times 10^{12}/l$. Srednje vrednosti hemoglobina takođe su

REZULTATI

bile u granicama normale (ZK=137,00±13,043, PD=138,93±13,447, T2D=138,43±14,97), iako su minimalne vrednosti bile čak 76,70 g/l. Srednje vrednosti hemoglobina (ANOVA, p=0,741) i eritrocita (Kruskal Volis, p=0,150) su usklađene među grupama. Parametri krvne slike- MCH (Kruskal Volis, p=0,095), MCHC (Kruskal Volis, p=0,590), HCT (ANOVA, p=0,608) su takođe usklađeni međugrupno. Srednje vrednosti svih ovih parametara su bile u granicama normale, iako su u svim grupama minimalne i maksimalne vrednosti bile van referentnih vrednosti. Jedini parametar krvne slike koji je bio smanjen u T2D grupi u odnosu na ostale dve grupe je MCV (Man Vitni test: ZK/T2D:p=0,026, PD/T2D:p=0,023). Pokazatelji inflamacije u analizama krvne slike, prosečne vrednosti leukocita i leukocitarne formule, takođe su u granicama referentnih vrednosti. Vrednosti leukocita (ZK=6,92±1,717, PD=7,57±2,207, T2D=7,39±1,807) međugrupno su usklađene, a maksimalne vrednosti su iznad gornjih granica referentnih vrednosti u svim grupama. Parametri leukocitarne formule (procentualni odnos monocita, neutrofila i limfocita) pokazuju veće vrednosti u PD grupi nego u ZK i T2D grupi. Iako su i kod ovih pokazatelja inflamacije srednje vrednosti u referentnim granicama, pojedine maksimalne i minimalne vrednosti izlaze iz propisanih okvira.

Povećanje brzine sedimentacije u prvom satu i vrednosti fibrinogena su dodatni parametri koji pokazuju stepen sistemske inflamacije. Vrednosti fibrinogena definisali smo kao dihotomne vrednosti- veće, odnosno manje od 3,7 g/l. Broj ispitanika sa vrednostima fibrinogena većim od 3,7 g/l u grupi ZK bio je 2 (3,5%), u grupi PD 5 (8,6%) a u grupi T2D bio je 34 (53,8%). Statističkom obradom ovih podataka dobijena je značajna razlika u učestalosti povećanih vrednosti fibrinogena kod pacijenata sa dijabetesom u odnosu na dve grupe sistemski zdravih ispitanika (χ^2 , ZK<T2D, PD<T2D=0,000). Sedimentacija u prvom satu veća je kod pacijenata sa dijabetesom (19,02±13,231) nego kod grupa sistemski zdravih ispitanika (ZK=9,51±5,470, PD=10,86±6,019). U grupama sistemski zdravih ispitanika prosečne vrednosti sedimentacije su u opsegu referentnih vrednosti, sa maksimumom van opsega za PD grupu. U T2D grupi, povećane su i srednje i maksimalne vrednosti. Parametri praćenja glikoregulacije, glukoza našte i glikozilovani hemoglobin, statistički su značajno veći kod pacijenata sa dijabetesom (glu=9,39±3,183, HbA1c=8,18±2,116), nego u grupama sistemski zdravih ispitanika (ZK:glu=4,60±0,519, HbA1c=4,71±0,603, PD:

REZULTATI

glu=5,07±1,018, HbA1c=4,82±0,528). Oba parametra u T2D grupi pokazuju povećane srednje i maksimalne vrednosti. Lipidni status pacijenata određivan je merenjem ukupnog holesterola, HDL, LDL i vrednosti triglicerida. Granične vrednosti za pomenute parametre (sem triglicerida) variraju u zavisnosti od pola i zdravstvenog stanja bolesnika (prisustvo dijabetesa i njegovih kardiovaskularnih komplikacija), kao što je opisano u poglavlju materijal i metode. Srednje vrednosti ukupnog holesterola van su referentnih granica u T2D grupi (5,46±1,358) i značajno su veće nego kod druge dve grupe (ZK=4,14±0,996, PD=5,13±1,097). Srednje vrednosti HDL, LDL i triglicerida značajno se razlikuju među sve tri grupe ispitanika, iako su njihove prosečne vrednosti u ZK i PD grupi u referentnom opsegu. Maksimalne vrednosti holesterola, LDL i triglicerida, su van opsega referentnih vrednosti u sve tri posmatrane grupe ispitanika.

4.5. Analiza biohemijskih rezultata u odnosu na kliničke parametre parodontopatije

Statističkom obradom podataka nismo dobili ni jednu značajnu korelaciju između parametara glikoregulacije (glukoza našte i HbA1c) i lipidnog statusa (ukupni holesterol, HDL; LDL, trigliceridi) sa kliničkim parodontološkim parametrima (DS, NPE, PESA, PISA).

4.6. Analiza genetičkih rezultata

4.6.1. Odstupanje od Hardy-Weinberg-ovog ekvilibrijuma

Ravnotežu sa Hardy-Weinberg-ovim ekvilibrijumom računali smo za svaki polimorfizam na nivou celog uzorka, kao i na nivou svake grupe ponaosob. U tabeli 3.5 prikazane su vrednosti χ^2 testa i p vrednosti. Raspodela genotipova polimorfizma je u Hwe ravnoteži ukoliko je p vrednost veća od 0,05. U našem slučaju, u ravnoteži su sledeći polimorfizmi: -308G/A TNF α na celokupnom uzorku, +36A/G TNFR $_1$ u PD i T2D grupi kao i +676T/G TNFR $_2$ na celokupnom uzorku i u svakoj ispitivanoj grupi ponaosob.

REZULTATI

Tabela 3.5: Vrednosti ravnoteže sa Hardy-Weinberg-ovim ekvilibrijumom

SNP	Uzorak	χ^2	P vrednost
-308G/ATNF	Svi ispitanici	0,402	0,249
	ZK grupa	0,249	0,001
	PD grupa	0,630	0,043
	T2D grupa	2,922	0,019
+252A/G LT α	Svi ispitanici	24,660	0,000
	ZK grupa	14,979	0,003
	PD grupa	1,823	0,000
	T2D grupa	11,587	0,003
+36A/G TNFR ₁	Svi ispitanici	3,692	0,000
	ZK grupa	0,569	0,003
	PD grupa	1,229	0,268
	T2D grupa	2,442	0,118
+676T/G TNFR ₂	Svi ispitanici	0,144	0,703
	ZK grupa	0,002	0,953
	PD grupa	0,948	0,329
	T2D grupa	0,216	0,641

4.6.2. Analiza polimorfizama u genu za TNF α (-308G/A TNF α , rs1800629)

U celom uzorku ispitanika, njih 85 (47,3%) imalo je GG genotip, 80 (44,4%) je pokazalo GA, a 15 (8,3%) AA genotip. Učestalost G alela u celokupnom uzorku bila je 0,694, a A alela 0,306.

U grupi zdravih kontrola, 28 (49,1%) ispitanika ima GG genotip, njih 25 (43,9%) GA i 4 ispitanika (7,0%) ima homozigotni AA genotip. Sistemski zdravi ispitanici sa parodontopatijom pokazali su sličnu distribuciju genotipova, sa neznatno manjim procentom homozigota GG (25 (43,1%)) i većom frekvencom homozigota AA (9(15,5%)). U T2D grupi, najmanja je učestalost AA homozigota u odnosu na ostale grupe (2(3,2%)) dok je učestalost GG i GA genotipa neznatno veća nego u grupama zdravih ispitanika. Sa aspekta uticaja na sintezu samog TNF α , genotipove definišemo

REZULTATI

kao niskoprodukujuće odnosno GG genotip i visokoprodukujući odnosno GA+AA. Ne postoji statistički značajna razlika u učestalosti genotipova definisanih na pomenuti način među grupama, ali je neobična pojava većeg broja nosilaca GA ili AA nego GG genotipa (Tabela 3.6). Univarijantnim regresionim modelom nijedan od genotipova nije se pokazano kao zavisni prediktor pojave parodontopatije (Tabela 3.7) niti zajedno parodontopatije i dijabetesa (Tabela 3.8). Nakon pokazanog protektivnog efekta AA genotipa za nastanak dijabetesa i parodontopatije u odnosu na parodontopatiju u univarijantnoj analizi (Tabela 3.9), isti efekat ovog genotipa potvrđen je i u multivarijantnoj regresionoj analizi (OR=0,180, CI=0,037-0,886, p=0,035). Logističkom regresionom analizom nijedan genotip niti alel nisu definisani kao nosioci povećanog rizika za oboljevanje od parodontopatije (Tabela 3.10), parodontopatije i dijabetesa zajedno (Tabela 3.11), niti kombinacije oboljenja u odnosu na PD ispitanike (Tabela 3.12). Ovi rezultati, su pokazali su da AA genotip nosi 2,5 puta, a A alel 1,4 puta veći rizik za nastanak parodontopatije, međutim bez statističke značajnosti (Tabele 3.7, 3.10). S druge strane AA genotip je kod obolelih od dijabetesa i parodontopatije pokazao obrnuti, odnosno protektivni efekat u odnosu na zdrave (Tabela 3.8). Logistička regresiona analiza pokazala je statistički značajano smanjen rizik od istovremenog oboljevanja od pomenutih oboljenja (dijabetes i parodontopatija) u odnosu na sistemski zdrave ispitanike sa parodontopatijom (Tabela 3.9, 3.12).

Tabela 3.6: Distribucija genotipova i frekvencija alela za polimorfizam TNF alfa rs1800629 po grupama

Gen	Genotip	ZK	PD	T2D	P vrednost
TNF alfa rs1800629	GG	28 (49,1)	25 (43,1)	32 (49,2)	T 0,168
	GA	25 (43,9)	24 (41,4)	31 (47,7)	
	AA	4 (7,0)	9 (15,5)	2 (3,1)	
	GG	28 (49,1)	25 (43,1)	32 (49,2)	T 0,747
	GA+AA	29 (50,9)	33 (56,9)	33 (50,8)	T 0,260
	G	81 (0,710)	74 (0,638)	95 (0,730)	
	A	33 (0,290)	42 (0,362)	35 (0,269)	

Sve vrednosti su prikazane kao N(%), T Pirsonov Hi kvadrat test

Tabela 3.7: Univarijantna logistička regresiona analiza različitih genotipova TNF α (ZK vs PD grupa)

Genotip	Exp B (95%CI)	P
TNF α GG	0,785 (0,376-1,630)	0,518
TNF α GA	0,904 (0,431-1,893)	0,788
TNF α AA	2,434 (0,704-8,411)	0,160

REZULTATI

Tabela 3.8. Univarijantna logistička regresiona analiza različitih genotipova TNF α (ZK vs T2D grupa)

Genotip	Exp B (95% CI)	P
TNF α GG	1,004 (0,493-2,046)	0,991
TNF α GA	1,167 (0,571-2,157)	0,672
TNF α AA	0,421 (0,074-2,338)	0,328

Tabela 3.9: Univarijantna logistička regresiona analiza različitih genotipova TNF α (PD vs T2D grupa)

Genotip	Exp B (95% CI)	P
TNF α GG	1,280 (0,628-6,208)	0,497
TNF α GA	1,292 (0,632-2,638)	0,482
TNF α AA	0,173 (0,036-0,837)	0,029

Tabela 3.10: Polimorfizam gena za TNF α i rizik za nastanak parodontopatije, logistička regresiona analiza

-308G/A	ZK (N(%))	PD (N(%))	OR	P	95% CI
GG	28 (49,1)	25 (43,1)	1,000		Reference
GA	25 (43,9)	24 (41,4)	1.0752	0,862	0.4941-2.3398
AA	4 (7,0)	9 (15,5)	2.52	0,131	0.6899-9.2044
GA+AA	29 (50,9)	33 (56,9)	1.2745	0,516	0.6113-2.657
G	81 (0,710)	74 (0,638)	1,000		Reference
A	33 (0,290)	42 (0,362)	1.3931	0,240	0.8003-2.425

Tabela 3.11: Polimorfizam gena za TNF α i rizik za nastanak parodontopatije i dijabetesa, logistička regresiona analiza

-308G/A	ZK	T2D	OR	P	95% CI
GG	28 (49,1)	32 (49,2)	1,000		Reference
GA	25 (43,9)	31 (47,7)	1.085	0,823	0.5222-2.2544
AA	4 (7,0)	2 (3,1)	0.4375	0,307	0.0744-2.5725
GA+AA	29 (50,9)	33 (50,8)	0.9957	0,567	0.4888-2.0281
G	81 (0,710)	95 (0,730)	1,000		Reference
A	33 (0,290)	35 (0,269)	0.9043	0,729	0.5163-1.5838

Tabela 3.12: Polimorfizam gena za TNF α i rizik za nastanak parodontopatije i dijabetesa u odnosu na parodontopatiju, logistička regresiona analiza

308G/A	PD	T2D	OR	P	95% CI
GG	25 (43,1)	32 (49,2)	1,000		Reference
GA	24 (41,4)	31 (47,7)	1.0091	0,892	0.4782-2.1295
AA	9 (15,5)	2 (3,1)	0.1736	0,022*	0.0344-0.8764
GA+AA	29 (50,9)	33 (50,8)	0.889	0,795	0.4315-1.8317
G	81 (0,710)	95 (0,730)	1,000		Reference
A	33 (0,290)	35 (0,269)	0.5631	0,029*	0.3348-0.9468

REZULTATI

4.6.3 Analiza polimorfizma u genu za LT α (+252G/A LT α , rs909253)

U ukupnom uzorku ispitanika, njih 36 (20%) imalo je GG genotip, 51 (28,2%) GA genotip, dok je 93 (51,7%) pokazivalo AA genotip. Učestalost A alela bila je 0,658, a G alela 0,347. U grupi zdravih kontrola 10 (17,5%) ispitanika imalo je GG genotip, 11 (19,3 %) GA, a 36 (63,2%) AA genotip. Pacijenti sa parodontopatijom pokazali su sličnu distribuciju genotipova, njih 12 (20,6%) imalo je GG genotip, dok je isti broj ispitanika, po 23 (39,7%) imalo GA i AA genotip. Pacijenti oboleli od dijabetesa imali su najmanje GG genotipova (14 (21,5%)), zatim GA genotipa-17 (26,2%) i najviše AA genotipa (34 (52,3%). Dihotomnom podelom genotipova nismo dobili statistički značajnu razliku u distribucij među grupama (Tabela 3.13). Univarijantnim regresionim modelom nosioci AA genotipa izdvojili su se sa manjom predispozicijom za parodontopatiju, dok su se nosioci AG genotipa izdvojili sa većom predispozicijom (Tabela 3.14). Ovaj odnos nije potvrđen u multivarijantnom modelu. Univarijantnim analizama između grupa ZK i T2D kao i PD i T2D, nijedan genotip nije izdvojen kao zavisni faktor koji utiče na rizik od pojave ova dva oboljenja u odnosu na zdrave ili ispitanike sa parodontopatijom (Tabele 3.15, 3.16). Logističkom regresionom analizom AG genotip i G alel izdvojili su se statistički značajno kao rizični za nastanak parodontopatije (Tabela 3.17). Sličan trend, ali ne i statistički značajan se vidi i u riziku za nastanak parodontopatije i dijabetesa zajedno (Tabela 3.18). Ovaj statistički model označio je i AG genotip, kao i ispitanike sa bar jednim G alelom kao one sa povećanim rizikom za oboljevanje od dijabetesa i parodontopatije u odnosu na one sa samo parodontopatijom (Tabela 3.19).

Tabela 3.13: Distribucija genotipova za polimorfizam LT α rs 909253 po grupama

Gen	Genotip	ZK	PD	T2D	P vrednost
LT alfa rs 909253	GG	10 (17,5)	12 (20,6)	14 (21,5)	T 0,102
	GA	11 (19,3)	23 (39,7)	17 (26,2)	
	AA	36 (63,2)	23 (39,7)	34 (52,3)	
	GG	10 (17,5)	12 (20,7)	14 (21,5)	T 0,849
	GA+AA	47 (82,5)	46 (79,3)	51 (78,5)	T 0,102
	A	83 (0,728)	69 (0,594)	85 (0,653)	
	G	31 (0,271)	47 (0,406)	45 (0,346)	

Sve vrednosti su prikazane kao N(%)

T Pirsonov Hi kvadrat test

REZULTATI

Tabela 3.14. Univarijantna logistička regresiona analiza genotipova LTα (ZK vs PD)

Genotip	Exp B (95%CI)	P
LTα AA	0,383 (0,181-0,814)	0,013*
LTα AG	2,748 (1,184-6,380)	0,019*
LTα GG	1,226 (0,4486-3,115)	0,668

Tabela 3.15. Univarijantna logistička regresiona analiza genotipova LTα (ZK vs T2D)

Genotip	Exp B (95%CI)	P
LTα AA	0,648 (0,310-1,322)	0,228
LTα AG	1,481(0,627-3,498)	0,370
LTα GG	1,290 (0,530-3,183)	0,580

Tabela 3.16. Univarijantna logistička regresiona analiza genotipova LTα (PD vs T2D)

Genotip	Exp B (95%CI)	P
LTα AA	1,052 (0,442-2,507)	0,908
LTα AG	0,539 (0,251-1,156)	0,113
LTα GG	1,669 (0,815-3,418)	0,161

Tabela 3.17: Polimorfizam gena za LTα i rizik za nastanak parodontopatije, logistička regresiona analiza

+252A/G	ZK	PD	OR	P	95% CI
AA	36 (63,2)	23 (39,7)	1,000		Reference
AG	11 (19,3)	23 (39,7)	3,2727	0,007*	1,3456- 7,9601
GG	10 (17,5)	12 (20,6)	1,8783	0,208	0,6986-5,0496
AG+GG	22 (38,6)	35 (61,4)	2,4901	0,015*	1,1797-5,2562
A	83 (0,728)	69 (0,594)	1,000		Reference
G	31 (0,271)	47 (0,406)	1,8237	0,032*	1,0473-3,1757

Tabela 3.18: Polimorfizam gena za LTα i rizik za nastanak parodontopatije i dijabetesa, logistička regresiona analiza

+252A/G	ZK	T2D	OR	P	95% CI
AA	36 (63,2)	34 (52,3)	1,000		Reference
AG	11 (19,3)	17 (26,2)	1,6364	0,277	0,6709-3,9911
GG	10 (17,5)	14 (21,5)	1,4824	0,409	0,5807-3,784
AG+GG	22 (38,6)	31 (47,7%)	1,492	0,275	0,7263-3,0648
A	83 (0,728)	85 (0,653)	1,000		Reference
G	31 (0,271)	45 (0,346)	1,4175	0,211	0,8191-2,4529

Tabela 3.19: Polimorfizam gena za LTα i rizik za nastanak dijabetesa u odnosu na obolele od parodontopatije, logistička regresiona analiza

+252A/G	PD	T2D	OR	P	95% CI
AA	12 (20,6)	34 (52,3)	1,000		Reference
AG	23 (39,7)	17 (26,2)	0.2609	0,003*	0.1051-0.6474
GG	23 (39,7)	14 (21,5)	0.2148	0,0009*	0.0843-0.5473
AG+GG	46 (79,3)	31 (47,7%)	0.2379	0,0003*	0.1068-0.5295
A	69 (0,594)	85 (0,653)	1,000		Reference
G	47 (0,406)	45 (0,346)	0.7772	0,340	0.4632-1.3043

REZULTATI

4.6.4. Analiza polimorfizma u genu za TNFR₁ (+36G/A TNFR₁, rs767455)

Od ukupno 180 ispitanika, 58 (32,2%) je imalo AA genotip, 99 (55%) AG, a 23 (12,8%) GG genotip. Učestalost A alela bila je 0,597, a G alela 0,403. U grupi zdravih kontrola najviše je bilo heterozigota, njih 31 (54,4%), manje AA genotipa- 16 (28,1), a najmanje GG genotipa, njih 10 (17,5). Distribucija je slična i u grupi obolelih od parodontopatije, gde je GA genotipa bilo je 31 (53,4), AA bilo je 21 (36,2) a GG genotipa bilo je 6 (10,3%). Pacijenti oboleli od dijabetesa takođe su imali najveći broj ispitanika sa AG genotipom- 37 (56,9%), zatim sa AA genotipom-21 (32,3%) i GG genotipom- 7 (10,8%). Dihotomnom podelom uočava se veća učestalost AG+GG genotipa (Tabela 3.20). Univarijantnim regresionim modelom nijedan genotip nije pokazan kao zavisni prediktor češće pojave parodontopatije (Tabela 3.21) ili parodontopatije i dijabetesa (Tabela 3.22). Ovim statističkim modelom AA genotip je definisan kao protektivan za nastanak dijabetesa i parodontopatije u odnosu na sistemski zdrave ispitanike sa parodontopatijom (Tabela 3.23). Logističkom regresionom analizom nijedan genotip se nije pokazao kao statistički značajan nosilac rizika za nastanak pomenutih oboljenja (Tabele 3.24, 3.25, 3.26).

Tabela 3.20: Distribucija genotipova i frekvencija alela za polimorfizam TNFR₁ rs767455 po grupama

Gen	Genotip	ZK	PD	T2D	P vrednost
TNFR ₁ rs767455	AA	16 (28,1)	21(36,2)	21 (32,3)	⊞ 0,708
	AG	31 (54,4)	31(53,4)	37 (56,9)	
	GG	10 (17,5)	6 (10,3)	7 (10,8)	
	AA	16 (28,1)	21(36,2)	21 (32,3)	⊞ 0,647
	AG+GG	41 (71,9)	37 (63,8)	44 (67,7)	
	A	63 (0,553)	73 (0,629)	79 (0,607)	⊞ 0,472
G	51 (0,447)	43 (0,370)	51 (0,393)		

Sve vrednosti su prikazane kao N(%)

⊞ Pirsonov Hi kvadrat test

Tabela 3.21. Univarijantna logistička regresiona analiza različitih genotipova TNFR₁ (ZK vs PD)

Genotip	Exp B (95%CI)	P
TNFR ₁ AA	1,290 (0,530-3,183)	0,475
TNFR ₁ AG	1,481(0,627-3,498)	0,920
TNFR ₁ GG	0,640(0,310-1,322)	0,270

REZULTATI

Tabela 3.22. Univarijantna logistička regresiona analiza različitih genotipova TNFR₁ (ZK vs T2D grupa)

Genotip	Exp B (95%CI)	P
TNFR ₁ AA	0,748 (0,470-1,191)	0,221
TNFR ₁ AG	1,108 (0,542-2,268)	0,778
TNFR ₁ GG	0,478 (0,162-1,422)	0,181

Tabela 3.23. Univarijantna logistička regresiona analiza različitih genotipova TNFR₁ (PD vs T2D grupa)

Genotip	Exp B (95%CI)	P
TNFR ₁ AA	0,616(0,384-0,991)	0,046*
TNFR ₁ AG	1,151(0,565-2,364)	0,699
TNFR ₁ GG	0,881(0,269-2,901)	0,835

Tabela 3.24: Polimorfizam gena za TNFR₁ i rizik za nastanak parodontopatije, logistička regresiona analiza

+36G/A	ZK	PD	OR	P	95% CI
GG	16 (28,1)	21(36,2)	1,000		Reference
GA	31 (54,4)	31(53,4)	0,7619	0,516	0,3359-1,7283
AA	10 (17,5)	6 (10,3)	0,4571	0,197	0,1373-1,5225
GA+AA	41 (71,9)	37 (63,8)	0,6876	0,350	0,3128-1,5116
G	63 (0,553)	73 (0,629)	1,000		Reference
A	51 (0,447)	43 (0,370)	0,7276	0,236	0,4294-1,2331

Tabela 3.25: Polimorfizam gena za TNFR₁ i rizik za nastanak parodontopatije i dijabetesa, logistička regresiona analiza

+36G/A	ZK	T2D	OR	P	95% CI
GG	16 (28,1)	21 (32,3)	1,000		Reference
GA	31 (54,4)	37 (56,9)	0,9094	0,823	0,4059-2,0375
AA	10 (17,5)	7 (10,8)	0,5333	0,287	0,1664-1,7089
GA+AA	41 (71,9)	44 (67,7)	0,8177	0,610	0,3759-1,7787
G	63 (0,553)	79 (0,607)	1,000		Reference
A	51 (0,447)	51 (0,393)	0,7975	0,383	0,4788-1,3282

Tabela 3.26: Polimorfizam gena za TNFR₁ i rizik za nastanak parodontopatije i dijabetesa, logistička regresiona analiza

+36G/A	PD	T2D	OR	P	95% CI
GG	21(36,2)	21 (32,3)	1,000		Reference
GA	31(53,4)	37 (56,9)	1.1935	0,654	0.5524-2,759
AA	6 (10,3)	7 (10,8)	2.0556	0,240	0.61-6,926
GA+AA	41 (71,9)	44 (67,7)	1.8908	0,066	0.9542-3,747
G	63 (0,553)	79 (0,607)	1,000		Reference
A	51 (0,447)	51 (0,393)	0.7975	0,383	0.4788-1,328

REZULTATI

4.6.5. Analiza polimorfizma u genu za TNFR₂ (+676 T/G ZNFR₂, rs1061622)

Ukupni broj TT genotipova je 109 (60,6%), TG genotipova je 61 (33,9%), a GG je 10 (5,6%). T alel bio je prisutan kod 0,775, a G alela kod 0,225 ispitanika. U grupi zdravih kontrola TT genotip je zastupljen kod 28 (49,1%) ispitanika, TG kod 24 (42,1%) a GG genotip kod 5 (8,8) ispitanika. Pacijenti sa parodontopatijom su pokazali sličnu distribuciju genotipova, 40 (69,0%), 15 (25,9) i 3 (5,2%) su bile zastupljenosti TT, TG i GG genotipova redom. U grupi pacijenata sa dijabetesom raspored genotipova bio je 41 (63,1%), 22 (33,8%) i 2 (3,1%) za TT, TG i GG genotip redom (Tabela 3.27). Rezultati univarijante regresione analize pokazuju da različite varijante TNFR₂ gena ne utiču na predispoziciju za nastanak parodontopatije (Tabela 3.28) niti parodontopatije i dijabetesa u odnosu na zdrave (Tabela 3.29) i sistemski zdrave obolele od parodontopatije (Tabela 3.30). Logistička regresiona analiza pokazuje da TG genotip i G alel imaju protektivnu ulogu za nastanak parodontopatije (Tabela 3.31). Ovakav odnos, ali koji nije statistički značajan se pokazuje i za ispitanike T2D grupe (Tabela 3.32). Suprotan odnos, OR>1, za iste genotipove i alele pokazuju ispitanici sa dijabetesom i parodontopatijom, u odnosu na ispitanike sa parodontopatijom (Tabela 3.33).

Tabela 3.27: Distribucija genotipova i frekvencija alela u sve tri grupe obolelih ispitanika

Gen	Genotip	ZK	PD	T2D	P vrednost
+676 T/G rs1061622	TT	28 (49,1)	40 (69,0)	41 (63,1)	U 0,070
	TG	24 (42,1)	15 (25,9)	22 (33,8)	
	GG	5 (8,8)	3 (5,2)	2 (3,1)	
	TT	28 (49,1)	40 (69,0)	41 (63,1)	U 0,082
	TG+GG	29 (50,9)	18 (31,0)	24 (36,9)	
	T	80 (0,702)	95 (0,819)	104 (0,800)	U 0,072
G	34 (0,298)	21 (0,181)	26 (0,200)		

Sve vrednosti su prikazane kao N(%)

U Pirsonov Hi kvadrat test

Tabela 3.28. Univarijantna logistička regresiona analiza različitih genotipova TNFR₂ (ZK vs PD grupa)

Genotip	Exp B (95%CI)	P
TNFR ₂ TT	2,302 (1,075-4,926)	0,031*
TNFR ₂ TG	0,480 (0,218-1,055)	0,068
TNFR ₂ GG	0,567 (0,129-2,454)	0,453

REZULTATI

Tabela 3.29. Univarijantna logistička regresiona analiza različitih genotipova TNFR₂ (ZK vs T2D grupa)

Genotip	Exp B (95%CI)	P
TNFR ₂ TT	1,769 (0,858-3,648)	0,122
TNFR ₂ TG	0,703 (0,337-1,467)	0,348
TNFR ₂ GG	0,330 (0,062-1,722)	0,196

Tabela 3.30. Univarijantna logistička regresiona analiza različitih genotipova TNFR₂ (PD vs T2D grupa)

Genotip	Exp B (95%CI)	P
TNFR ₂ TT	0,769 (0,363-1,628)	0,492
TNFR ₂ TG	1,467(0,672-3,202)	0,336
TNFR ₂ GG	0,582(0,094-3,611)	0,561

Tabela 3.31: Polimorfizam gena za TNFR₂ i rizik za nastanak parodontopatije, logistička regresiona analiza

+676T/G	ZK	PD	OR	P	95% CI
TT	28 (49,1)	40 (69,0)	1,000		Reference
TG	24 (42,1)	15 (25,9)	0,4375	0,042*	0,1954-0,9794
GG	5 (8,8)	3 (5,2)	0,42	0,218	0,0927-1,9025
TG+GG	29 (50,9)	18 (31,0)	0,4345	0,030*	0,203-0,93
T	80 (0,702)	95 (0,819)	1,000		Reference
G	34 (0,298)	21 (0,181)	0,5201	0,037*	0,2798-0,9669

Tabela 3.32: Polimorfizam gena za TNFR₂ i rizik za nastanak parodontopatije i dijabetesa, logistička regresiona analiza

+676T/G	ZK	T2D	OR	P	95% CI
TT	28 (49,1)	41 (63,1)	1,000		Reference
TG	24 (42,1)	22 (33,8)	0,626	0,220	0,2951-1,328
GG	5 (8,8)	2 (3,1)	0,2732	0,121	0,0495-1,5085
TG+GG	29 (50,9)	24 (36,9)	0,5652	0,120	0,2741-1,1652
T	80 (0,702)	104 (0,800)	1,000		Reference
G	34 (0,298)	26 (0,200)	0,5882	0,074	0,3267-1,059

Tabela 3.33: Polimorfizam gena za TNFR₂ i rizik za nastanak dijabetesa u odnosu na PD, logistička regresiona analiza

+676T/G	PD	T2D	OR	P	95% CI
TT	40 (69,0)	41 (63,1)	1,000		Reference
TG	15 (25,9)	22 (33,8)	1.4309	0,371	0.6509-3,145
GG	3 (5,2)	2 (3,1)	0.6504	0,5	0.1031-4,1014
TG+GG	18 (31,0)	24 (36,9)	1.3008	0,493	0.6142-2.7552
T	95 (0,819)	104 (0,800)	1,000		Reference
G	21 (0,181)	26 (0,200)	1.131	0,708	0.5971-2,142

4.6.6. Analiza genetičkih rezultata i kliničkih parametara parodontopatije

Pri analiziranju povezanosti polimorfizama i kliničkih parametara parodontopatije, polimorfizme smo posmatrali dihotomno. U svim grupama posmatrali smo odnose plak indeksa i krvarenja na provokaciju, dok smo u grupama sa pacijenata sa dijagnostikovanom parodontopatijom, pored pomenutih, posmatrali i dubinu sondiranja i nivo pripojnog epitela.

Nije postojala statistički značajna razlika ni u jednom parametru između pojedinih genotipa TNF α . Poređenjem kliničkih parametara spram genotipa LT α pokazano je da u grupama sa dijagnostikovanom parodontopatijom nije postojala pravilnost u povezanosti vrednosti kliničkih parametara u odnosu na genotip. Tako, u PD grupi dubina sondiranja je veća kod nosilaca GG genotipa, dok su dubine sondiranja u T2D grupi izjednačene. Parametar mere uticaja inflamiranog parodontocijuma na sistemsko zdravlje, PISA, statistički je značajno veći kod nosilaca AA genotipa TNFR₁ u grupi pacijenata sa parodontopatijom (T test za nevezane uzorke, $p=0,030$). Ostali klinički parametri posmatrani spram ovog polimorfizma se međusobno statistički značajno ne razlikuju. U T2D i PD grupi, nosioci genotipa AG+GG pokazali su neznatno veće vrednosti DS i NPE. Povezanost kliničkih parametara i genotipova za TNFR₂ nije nađena. U grupi pacijenata sa dijabetesom, nosioci TT genotipa pokazali su neznatno veće vrednosti DS i NPE, PESA i PISA, dok su u PD grupi ove vrednosti izjednačene (za DS) ili suprotnog odnosa, odnosno veće kod nosilaca TG+GG genotipa (za NPE, PESA i PISA).

4.6.7. Povezanost polimorfizama sa karakteristikama tipa 2 dijabetesa

U ovim analizama posmatrali smo vrednosti glikozilovanog hemoglobina i mikrovaskularnih komplikacija. Vrednosti HbA_{1c} bile su statistički značajno veće kod nosilaca GG genotipa TNF α nego kod GA+AA genotipa. Nije uočena značajna razlika u vrednosti glikozilovanog hemoglobina i genotipova za LT α , TNFR₁ i TNFR₂ (Tabela 3.34).

Analizirali smo prisustvo mikrovaskularnih komplikacija uopšte, a zatim ponaosob prisustvo očnih, nefroloških komplikacija i periferne neuropatije spram dihotomne

REZULTATI

podele genotipova za svaki ispitivani polimorfizam. Za -308G/A polimorfizam nije nađena statistički značajan razlika u prisustvu komplikacija, ali je neznatno veći broj svih komplikacija prisutan za GA+AA genotip. Identična pravilnost uočava se i za +25G/A LT α i +36A/G polimorfizam. Statistički značajno veći broj ispitanika nosilaca TG+GG genotipa za TNFR $_2$ polimorfizam ima pristune nefrološke komplikacije (Pirson Hi kvadrat test, p=0,046). Ostale komplikacije su neznatno više zastupljene kod nosilaca TT genotip.

Tabela 3.34: Povezanost polimorfizama i vrednosti glikozilovanog hemoglobina

Citokin	Genotip	HbA1c(%) x \pm SD	Med (min-max)	P vrednost
TNF α	GG	9,38 \pm 2,104	9,60 (5,60-12,70)	f 0,031*
	GA+AA	8,25 \pm 2,005	8,40 (3,90-14,20)	
LT α	GG	8,01 \pm 2,269	7,75 (3,90-12,70)	f 0,112
	GA+AA	9,03 \pm 20,41	8,80 (5,60-14,20)	
TNFR $_1$	GG	8,82 \pm 1,943	8,40 (6,40-12,00)	f 0,973
	GA+AA	8,80 \pm 2,214	8,60 (3,90-14,20)	
TNFR $_2$	TT	8,57 \pm 2,033	8,30 (5,60-14,20)	f 0,230
	TG+GG	9,22 \pm 2,231	8,90 (3,90-12,70)	

f T test za nezavisne uzorke

HbA1c= glikozilovani hemoglobin

4.7. Analiza biohemijskih rezultata

4.7.1. Serumske koncentracije TNF α , LT α , TNFR $_1$ i TNFR $_2$

Tabela 3.35 i grafikoni 3.10 i 3.11 prikazuju podatke o serumskim koncentracijama ispitivanih citokina. Koncentracija TNF α najveća je u grupi zdravih ispitanika- 16,43pg/ml, manja u PD grupi-11,78,43pg/ml i najmanja u T2D grupi-10,43pg/ml. Koncentracije LT α pokazuju isti odnos, vrednosti su 58,56 pg/ml, 52,89 pg/ml i 34,62 pg/ml u ZK, PD i T2D grupama redom. Razlika u koncentraciji TNFR $_1$ je statistički značajna između obolelih od dijabetesa i ispitanika sistemski zdravih grupa. U grupi T2D, koncentracija TNFR $_1$ iznosi 3,11ng/ml, dok je u grupi PD ona 1,82 ng/ml, a u ZK grupi 1,79 ng/ml. Najveća koncentracija TNFR $_2$ - 8,23 ng/ml je u ZK grupi, manja u T2D grupi- 5,33 ng/ml, a najmanja u PD grupi- 4,77 ng/ml.

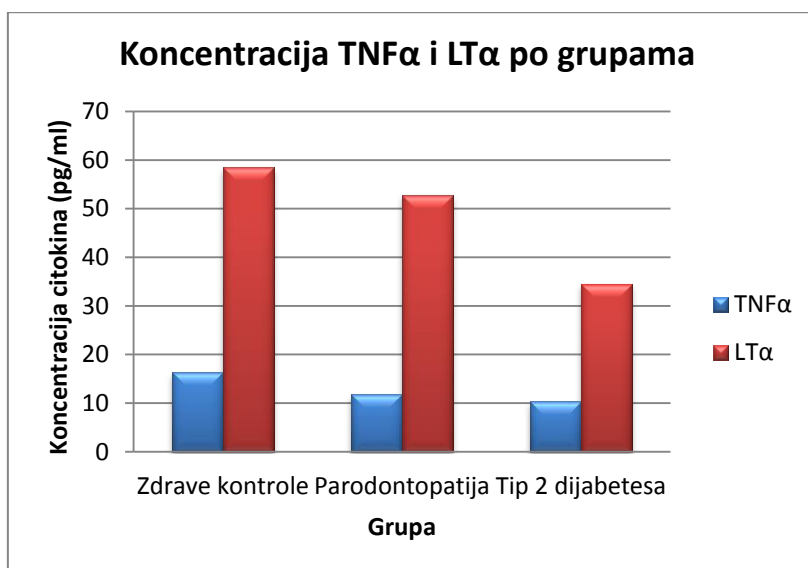
REZULTATI

Tabela 3.35: Serumske koncentracije TNF α , LT α , TNFR $_1$ i TNFR $_2$ po grupama

Parametar	Grupa	$\bar{x}\pm SD$	Med (Min-Max)	P vrednost
TNF α (pg/ml)	ZK	16,43 \pm 25,277	2,65(0,91-19,70)	§ 0,660
	PD	11,78 \pm 11,056	2,84(0,23-29,09)	
	T2D	10,43 \pm 12,898	20,90(0,46-25,46)	
LT α (pg/ml)	ZK	58,56 \pm 67,317	30,63(9,37-115,62)	§ 0,778
	PD	52,89 \pm 75,422	22,50(3,75-268,75)	
	T2D	34,62 \pm 37,001	43,13(5,63-139,38)	
TNFR $_1$ (ng/ml)	ZK	1,79 \pm 0,372	1,56(1,39-1,97)	‡ ZK/PD:0,962 ZK/T2D:0,000 PD/T2D:0,000
	PD	1,82 \pm 0,542	1,64(1,08-3,57)	
	T2D	3,11 \pm 1,681	3,07(1,96-3,82)	
TNFR $_2$ (ng/ml)	ZK	8,23 \pm 12,967	2,49(0,84-8,48)	§ 0,162
	PD	4,77 \pm 7,381	3,36(0,53-35,08)	
	T2D	5,33 \pm 9,831	2,82(2,52-55,01)	
TNFR $_2$ /TNFR $_1$ odnos	ZK	2,55 \pm 2,41		§ 0,101
	PD	3,28 \pm 2,55		
	T2D	1,71 \pm 0,91		

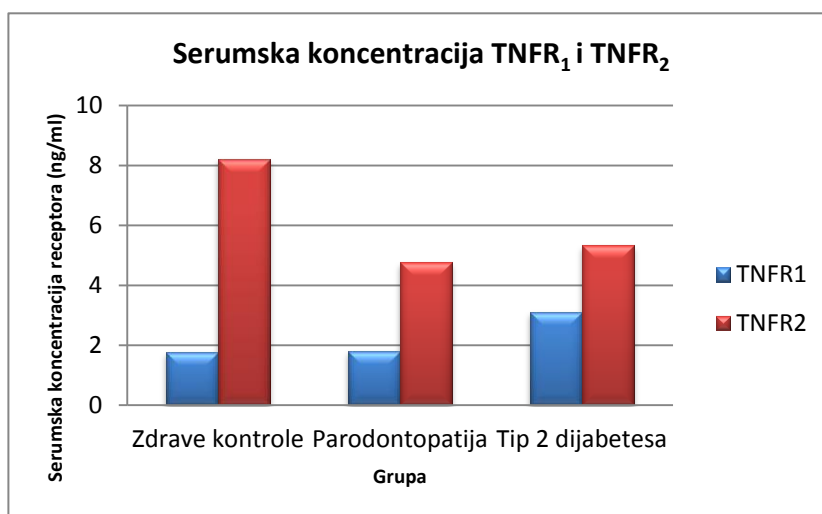
§ Kruskal-Wallis Test

‡ Mann-Whitney U Test



Grafikon 3.10: Serumske koncentracije TNF α i LT α po grupama

REZULTATI



Grafikon 3.11: Serumska koncentracija TNFR₁ i TNFR₂ po grupama

4.7.2. Koncentracije citokina u odnosu na ispitivane parametre i karakteristike oboljenja

U tabelama 3.36-3.38 prikazane su serumske koncentracije ispitivanih citokina po grupama u odnosu na pušački status, odnosno podelu pušača na trenutne pušače i nepušače. Ni u jednoj grupi nije nađena statistički signifikantna razlika koncentracija u odnosu na posmatrane kriterijume. U grupi zdravih kontrola, koncentracije TNF α , LT α , TNFR₁ su neznatno veće kod pušača, dok u T2D grupi veće koncentracije pokazuju nepušači za sva četiri posmatrana citokina.

Tabela 3.36: Koncentracije TNF α , LT α , TNFR₁ i TNFR₂ u ZK grupi

Citokin	Pušački status	$\bar{x} \pm SD$	Mediana (min-max)	P vrednost
TNF α	Pušač	19,59 \pm 38,752	6,59 (0,91-122,21)	‡ 0,837
	Nepušač	14,54 \pm 16,126	5,83 (1,14-56,36)	
LT α	Pušač	67,08 \pm 56,910	42,5 (8,75-158,75)	∫ 0,648
	Nepušač	54,05 \pm 73,475	18,75 (1,87-233,75)	
TNFR ₁	Pušač	1,88 \pm 0,430	1,97 (1,25-2,38)	∫ 0,429
	Nepušač	1,76 \pm 0,346	1,65 (1,29-2,48)	
TNFR ₂	Pušač	6,48 \pm 5,368	5,63 (1,19-15,33)	‡ 0,432
	Nepušač	8,75 \pm 14,572	2,54 (0,57-54,71)	

‡ Mann-Whitney U Test

∫ T test za nezavisne uzorke

REZULTATI

Tabela 3.37: Koncentracije TNF α , LT α , TNFR $_1$ i TNFR $_2$ u PD grupi

Citokin	Pušački status	$\bar{x}\pm SD$	Mediana (min-max)	P vrednost
TNF α	Pušač	13,69 \pm 14,088	10,30 (0,23-40,36)	∫ 0,394
	Nepušač	10,57 \pm 8,978	8,41 (1,14-29,09)	
LT α	Pušač	74,48 \pm 100,32	34,69 (6,85-268,75)	∫ 0,154
	Nepušač	39,37 \pm 58,261	15,93 (3,75-185,63)	
TNFR $_1$	Pušač	1,65 \pm 0,507	1,45 (0,98-2,51)	∫ 0,943
	Nepušač	1,94 \pm 0,547	1,72(1,08-2,82)	
TNFR $_2$	Pušač	4,63 \pm 3,946	3,62 (0,13-10,03)	‡ 0,208
	Nepušač	4,85 \pm 9,171	1,48 (0,36-35,09)	

‡ Mann-Whitney U Test

∫ T test za nezavisne uzorke

Tabela 3.38: Koncentracije TNF α , LT α , TNFR $_1$ i TNFR $_2$ u T2D grupi

Citokin	Pušački status	$\bar{x}\pm SD$	Mediana (min-max)	P vrednost
TNF α	Pušač	6,19 \pm 9,829	1,07 (0,46-20,91)	∫ 0,463
	Nepušač	11,97 \pm 13,932	5,45 (0,99-46,36)	
LT α	Pušač	28,87 \pm 20,708	42,50 (5,63-46,25)	∫ 0,678
	Nepušač	58,20 \pm 45,440	24,58 (0,625-139,28)	
TNFR $_1$	Pušač	2,59 \pm 0,685	2,42 (1,86-3,82)	‡ 0,211
	Nepušač	3,37 \pm 1,985	2,81 (1,92-9,89)	
TNFR $_2$	Pušač	3,63 \pm 3,637	2,52 (0,265-12,815)	‡ 0,785
	Nepušač	6,44 \pm 12,294	2,49 (0,972-55,015)	

Korelacije između indeksa paklo-godina i serumskih nivoa TNF α , LT α , TNFR $_1$ i TNFR $_2$ nije pokazala statističku značajnost.

S obzirom na potencijalni uticaj indeksa telesne mase na sintezu citokina, odredili smo korelacije koncentracije svakog citokina sa ITM za celolupan uzorak, kao i za svaku grupu ponaosob. Svuda se uočava pozitivna ali nesignifikantna korelacija ITM i citokina, sem za korelaciju ITM-TNFR $_1$ na celokupnom uzorku koja je statistički značajna (Spirmanov korelacioni koeficijent, $\rho=0,441$; $p=0,000$)

Pirsonovim korelacionim koeficijentom (Tabela 3.39) određivali smo korelacije između kliničkih (DS i NPE) i parametara uticaja inflamacije iz parodonticijuma na sistemsko zdravlje (PESA, PISA) sa serumskim koncentracijama TNF α , LT α , TNFR $_1$ i TNFR $_2$. U grupi sistemski zdravih ispitanika sa parodontopatijom, nađena je statistički značajna korelacija za sledeće parametre: negativna osrednja ($r=-0,450$) između nivoa TNFR $_2$ i DS i pozitivna osrednja ($r=0,351$) između NPE i nivoa TNFR $_1$. U ovoj grupi ispitanika, iako statistički nesignifikantna, korelacija TNF α i svih parametara bila je negativna.

REZULTATI

Tabela 3.39: Korelacija DS, NPE, PESA i PISA sa koncentracijama posmatranih citokina

Grupa	Kl.par.		R	P
Parodontopatija	DS	TNF α	0,188	§ 0,656
		LT α	0,174	§ 0,159
		TNFR $_1$	0,133	§ 0,484
		TNFR $_2$	-0,450	§ 0,019
		R $_2$ /R $_1$	-0,497	§ 0,043
	NPE	TNF α	-0,202	§ 0,354
		LT α	0,390	§ 0,135
		TNFR $_1$	0,351	§ 0,049
		TNFR $_2$	0,090	§ 0,356
		R $_2$ /R $_1$	-0,097	0,708
	PESA	TNF α	0,129	§ 0,558
		LT α	0,078	§ 0,773
		TNFR $_1$	0,083	§ 0,661
		TNFR $_2$	-0,349	§ 0,075
		R $_2$ /R $_1$	-0,416	§ 0,097
	PISA	TNF α	0,083	§ 0,706
		LT α	0,127	§ 0,639
		TNFR $_1$	0,031	§ 0,871
		TNFR $_2$	-0,141	§ 0,482
		R $_2$ /R $_1$	-0,157	§ 0,548
Tip 2 dijabetesa	DS	TNF α	0,310	§ 0,260
		LT α	0,224	§ 0,456
		TNFR $_1$	0,060	§ 0,756
		TNFR $_2$	0,377	§ 0,030
		R $_2$ /R $_1$	0,312	Y 0,121
	NPE	TNF α	0,435	§ 0,105
		LT α	0,414	§ 0,160
		TNFR $_1$	0,066	§ 0,732
		TNFR $_2$	0,301	§ 0,089
		R $_2$ /R $_1$	0,285	Y 0,158
	PESA	TNF α	0,819	§ 0,000
		LT α	0,682	§ 0,010
		TNFR $_1$	0,158	§ 0,414
		TNFR $_2$	0,330	§ 0,049
		R $_2$ /R $_1$	0,134	Y 0,514
	PISA	TNF α	0,559	§ 0,030
		LT α	0,788	§ 0,001
		TNFR $_1$	0,169	§ 0,381
		TNFR $_2$	0,603	§ 0,001
		R $_2$ /R $_1$	0,148	0,469

r-korelacioni koeficijent

Kl.par= klinički parametar

Y Sprimanov test korelacije

§ Pirsonov test korelacije

REZULTATI

Nivo TNFR₂, osim pomenute statistički značajne korelacije sa DS, bio je negativno korelisan i sa PESA i PISA parametrima. U grupi pacijenata sa dijabetesom, korelacije svih parametara sa svim koncentracijama citokina bile su pozitivne. Korelacija DS i TNFR₂ je pozitivna i osrednja ($r=0,377$). PESA je u pozitivnoj korelaciji sa tri citokina: jaka povezanost uočava se u odnosu sa TNF α ($r=0,819$) i LT α ($r=0,682$), dok je sa TNFR₂ povezanost osrednja ($r=0,330$). PISA pokazuje jaku povezanost sa tri citokina: TNF α ($r=0,559$), LT α ($r=0,778$) i TNFR₂ ($r=0,603$).

Određivali smo povezanosti dužine dijabetesa u godinama i nivoa glikozilovanog hemoglobina sa koncentracijama ispitivanih citokina. Nijedna ispitivana korelacija nije bila statistički značajna

U tabeli 3.40 prikazani su korelacioni koeficijenti međusobnih odnosa koncentracija citokina u svakoj grupi ponaosob i na nivou svih ispitanika. Na nivou svih ispitanika, svi citokini su međusobno u pozitivnoj korelaciji. Statistički signifikantna, pozitivna i jaka korelacija izdvojila se u odnosu LT α - TNFR₂ ($r=0,734$). I u grupi zdravih ispitanika odnosi koncentracija su zadržali identičnu pravilnost- značajna, pozitivna i jaka korelacija izdvojena je na nivou LT α - TNFR₂ ($r=0,781$). U PD grupi, takođe je na nivou LT α -TNFR₂ dobijena značajna pozitivna, ali osrednja korelacija ($r=0,687$). U ovoj grupi ispitanika neke korelacije koje nisu bile statistički značajne pokazale su negativnu povezanost. Kod pacijenata sa dijagnostikovanim dijabetesom takođe se ponovila značajna pozitivna i jaka povezanost na nivou LT α -TNFR₂ ($r=0,781$). U ovoj grupi ispitanika, osrednja i pozitivna značajnost je nađena i u odnosu TNFR₁-TNFR₂ ($r=0,494$).

Tabela 3.40: Međusobne korelacije ispitivanih citokina u svim grupama i na nivou svih ispitanika

Grupa	Parametri	R	P
Svi ispitanici	TNF α	0,03	Y 0,867
	LT α		
	TNF α	0,051	Y 0,746
	TNFR ₁		
	TNF α	0,300	Y 0,071
	TNFR ₂		
	LT α	0,077	Y 0,578
	TNFR ₁		
	LT α	0,734	Y 0,000
	TNFR ₂		
TNFR ₁	0,071	Y 0,585	

REZULTATI

Zdravi ispitanici	TNFR ₂		
	TNF α	0,093	Y 0,742
	LT α		
	TNF α	0,404	Y 0,136
	TNFR ₁		
	TNF α	0,396	Y 0,181
	TNFR ₂		
	LT α	0,205	§ 0,316
	TNFR ₁		
	LT α	0,781	Y 0,000
	TNFR ₂		
	TNFR ₁	0,251	Y 0,351
TNFR ₂			
Parodontopatija	TNF α	-0,028	§ 0,932
	LT α		
	TNF α	-0,199	§ 0,461
	TNFR ₁		
	TNF α	0,354	Y 0,179
	TNFR ₂		
	LT α	0,188	§ 0,487
	TNFR ₁		
	LT α	0,627	Y 0,029
	TNFR ₂		
	TNFR ₁	-0,223	Y 0,389
	TNFR ₂		
Tip 2 dijabetesa	TNF α	0,521	§ 0,231
	LT α		
	TNF α	-0,455	Y 0,160
	TNFR ₁		
	TNF α	0,500	Y 0,207
	TNFR ₂		
	LT α	0,042	Y 0,897
	TNFR ₁		
	LT α	0,750	Y 0,020
	TNFR ₂		
	TNFR ₁	0,494	Y 0,010
	TNFR ₂		

Y Sprimanov test korelacije

§ Pirsonov test korelacije

4.8. Analiza biohemijskih i genetičkih rezultata- povezanosti polimorfizama i serumskih koncentracija citokina/receptora

Zbog relativno malog broja uzoraka, pri ovim analizama, polimorfizme smo posmatrali dihotomno. Razliku smo tumačili na dva načina. Prvo smo posmatrali kroz razliku koncentracija u svakoj grupi ponaosob u odnosu na genotip, odnosno da li sam genotip ima uticaj na sintezu u okviru ispitanika istog opšteg zdravstvenog stanja. Zatim smo

REZULTATI

određivali međugrupnu razliku spram genotipova, odnosno da li stanje sistemskog zdravlja utiče na sintezu kada je genotip isti.

Razlike u koncentraciji TNF α nisu dostigle statistički značajnu razliku (Tabela 3.41). U grupama sistemski zdravih ispitanika, pacijenti sa GG genotipom su pokazali neznatno manju koncentraciju TNF α u odnosu na hiperprodukujući genotip. Ova pravilnost nije zadržana u grupi T2D ispitanika- GG genotip bio je povezan sa neznatno većom koncentracijom. Analizom odnosa koncentracija i genotipova LT α , nije dobijena statistička značajnost. U grupama sistemski zdravih ispitanika, AA genotip bio je povezan sa neznatno povećanom koncentracijom citokina, dok je kod ispitanika sa dijabetesom ovaj odnos bio obrnut (Tabela 3.42). Analizom rezultata za TNFR $_1$, dobijena je statistički značajna razlika u grupi pacijenata obolelih od parodontopatije. Pacijenti sa AG+GG genotipom su povezani sa većom koncentracijom receptora. Analizom dobijenih rezultata u okviru istih genotipova, uočena je značajna razlika u koncentracijama receptora između pacijenata T2D grupe i ostale dve grupe kada smo posmatrali ove parametre u okviru istih genotipova (Tabela 3.43). Obradom rezultata povezanosti genotipova i koncentracija za TNFR $_2$ nije nađena statistički signifikantna razlika. Postoji trend neznatno povećane koncentracije kod nosilaca TG+GG genotipa u sve tri grupe. Razlika je najveća u ZK, a najmanja u T2D grupi. U okviru istih genotipova, postoji blaga tendencija većih koncentracija u grupama sistemski zdravih ispitanika nego kod pacijenata sa dijabetesom (Tabela 3.44).

Tabela 3.41: Koncentracije TNF α u zavisnosti od genotipova po grupama

TNF α	Genotip		P vrednost
	GG	GA+AA	
ZK	10,66 \pm 9,404; 6,67(2,27-34,04)	20,25 \pm 35,757; 5,00(0,91-122,21)	‡ 0,730
PD	10,36 \pm 12,890; 5,00(0,23-46,36)	13,32 \pm 9,001; 14,24(1,14-29,09)	‡ 0,230
T2D	11,92 \pm 11,528; 11,21(1,14-25,40)	9,44 \pm 14,328; 4,84(0,46-46,36)	‡ 0,724
P vredn.	¶ 0,962	§ 0,362	

Sve vrednosti su prikazane kao x \pm SD;med(min-max)

‡ Mann-Whitney U Test

§ Kruskal-Wallis Test

¶ ANOVA

REZULTATI

Tabela 3.42: Koncentracije LT α u zavisnosti od genotipova po grupama

LT α	Genotip		P vrednost
	AA	AG+GG	
ZK	62,74 \pm 67,541; 29,37 (1,87-189,37)	54,37 \pm 69,578; 21,87 (2,50-233,75)	∫ 0,758
PD	59,89 \pm 71,600; 30,94 (3,75-185,63)	48,68 \pm 81,118; 19,68 (6,85-268,75)	∫ 0,784
T2D	17,85 \pm 17,674; 17,67 (0,625-46,250)	54,17 \pm 45,395; 45,39 (6,87-139,38)	∫ 0,076
P vrednost	¶ 0,270	§ 0,433	

Sve vrednosti su prikazane kao x \pm SD;med(min-max)

∫ T test za nevazane uzorke

§ Kruskall-Wallis Test

¶ ANOVA

Tabela 3.43: Koncentracije TNFR₁ u zavisnosti od genotipova po grupama

TNFR ₁	Genotip		P vrednost
	AA	AG+GG	
ZK	1,96 \pm 0,434; 1,79(1,34-2,38)	1,76 \pm 0,351; 1,75(1,25-2,48)	‡ 0,307
PD	1,48 \pm 0,269; 1,52(0,98-2,82)	1,99 \pm 0,565; 2,01(1,68-2,71)	‡ 0,019
T2D	2,68 \pm 0,729; 2,57(1,87-7,44)	3,26 \pm 1,916; 2,73(1,86-9,89)	‡ 0,582
P vrednost	¶ HC/PD=0,230 ¶ HC/T2D= 0,044 ¶ PD/T2D= 0,000	‡ HC/PD=0,124 ‡ HC/T2D= 0,000 ‡ PD/T2D= 0,001	

Sve vrednosti su prikazane kao x \pm SD;med(min-max)

‡ Mann-Whitney U Test

¶ ANOVA sa Bonferoni korekcijom

Tabela 3.44: Koncentracije TNFR₂ u zavisnosti od genotipova po grupama

TNFR ₂	Genotip		P vrednost
	TT	TG+GG	
ZK	3,65 \pm 3,681; 2,25(0,84-8,57)	9,92 \pm 14,782; 4,37(0,58-54,71)	‡ 0,231
PD	4,01 \pm 4,648; 1,62(0,44-17,45)	6,05 \pm 10,708; 1,46(0,13-35,08)	‡ 0,467
T2D	5,05 \pm 11,274; 2,49(0,265-55,01)	5,9 \pm 6,470; 2,61(0,75-21,17)	‡ 0,620
P vrednost	§ 0,906	§ 0,200	

Sve vrednosti su prikazane kao x \pm SD;med(min-max)

‡ Mann-Whitney U Test

§ Kruskall-Wallis Test

4.9. Određivanje uticaja ispitivanih parametara na kliničke parametre parodontopatije (DS i NPE) kod ispitanika PD i T2D grupe- višestruka linearna regresija

U daljnim analizama smo detaljnije hteli da odredimo koji to ispitivani faktori utiču na dva najbitnija klinička parametra parodontopatije, dubinu sondiranja i nivo proipojnog epitela, što smo postigli višestrukim linearnim regresionim analizama. Ovim analizama prvo određujemo koliko dobro skup svih nezavisnih promenljivih može da predvidi vrednosti DS i NPE (vrednost modela), ali i utvrđujemo koja od promenljivih je najbolji prediktor tih vrednosti. Kao prediktore razlike posmatrali smo pol, starost, zamimanje, ITM, stres, fizičku aktivnost, parodontopatiju i dijabetes u porodičnoj anamnezi, disanje na usta, stiskanje zuba, pušačke navike, PI, KNP i polimorfizme za sva četiri citokina. U grupi obolelih od dijabetesa posmatrali smo još i dužinu dijabetesa i vrednosti HbA1c.

4.9.1. Rezultati višestruke linearne regresije za dubinu sondiranja u grupi obolelih od parodontopatije

Koeficijent determinacije (R^2) ovog modela je 0,433, što znači da ovaj model objašnjava 43,3% procenta varijanse faktora DS, što je dobar rezultat. Sam R^2 predstavlja previše optimističnu meru procene stvarne mere predviđanja, odnosno predviđanja koje bi moglo biti primenjeno na celu populaciju, kada se merenje vrši na malom uzorku. Stoga, kao parametar bolje procene stvarne vrednosti koeficijenta determinacije u celoj populaciji koristi se *Adjusted R²*, koji je u našem slučaju -0,042. Ovo znači da među promenljivama postoji negativna linearna zavisnot, i da naši rezultati nisu dobri za predviđanje u populaciji.

Signifikantnost celog modela je 0,597, što znači da model sam po sebi nije pogodan za procenu vrednosti DS, odnosno da svi posmatrani parametri zajedno ne mogu odrediti dubinu sondiranja. Kada smo posmatrali svaki parametar odvojeno, dobili smo da je samo prisustvo AA genotipa TNFR₁ faktor koji determiniše dubinu sondiranja na našem uzorku (standardizovani koeficijent $\beta=0,470$, t statistika=2,212, p=0,035, semiparcijalni koeficijent korelacije=0,299). Obradom podataka dobija se da AA genotip TNFR₁ objašnjava 8,9% varijanse parametra dubine sondiranja u grupi obolelih od parodontopatije.

4.9.2. Rezultati višestruke linearne regresije za nivo pripojnog epitela u grupi obolelih od parodontopatije

Primenom linearnog regresionog modela kod zavisne promenljive NPE, rezultati vrednovanja modela pokazuju da koeficijent determinacije iznosi $r^2=0.705$ što znači da ovaj model objašnjava 70.5 procenta varijanse faktora NPE, što predstavlja odličan rezultat. Pokazatelj Adjusted R Square daje korigovanu i bolju procenu stvarne vrednosti što u ovom slučaju iznosi 0.458 (45.8%) što se dosta razlikuje od prvobitno dobijenog r^2 , ali takođe predstavlja dobar rezultat, odnosno promenljive su linearno zavisne i korišćenje regresione jednačine je pogodno za predviđanje vrednosti faktora NPE. Ceo model pokazuje statističku značajnost $p=0,003$, što znači da je ceo model dobar a regresija značajna. Ovo praktično znači da svi posmatrani parametri zajedno mogu da određuju, odnosno utiču na NPE u okviru ispitanika sa parodontopatijom. Ipak, prilikom vrednovanja svake promenljive ponaosob, kao nezavisne promenljive koje utiču na NPE izdvojili su se faktori starost, PI kao i AA genotip TNFR₁. Izračunato je da godine ispitanika predviđaju ovaj parametar sa 12,5%, PI sa 5,86% a AA genotip TNFR₁ sa 5,95% udela (Tabela 3.45).

Tabela 3.45: Rezultati višestruke linearne regresione analize predikcije parametra NPE u grupi PD samo za faktore koji su se izdvojili kao nezavisni signifikantni faktori predikcije

Nezavisno promenljiva	Standardizovani koeficijent β	T statistika	P vrednost	Semiparcijalni koeficijent korelacije
Konstanta		-0,664	-0,512	
Starost	,525	3,587	,001	,350
PI	,347	2,481	,019	,242
TNFR ₁ AA	,384	2,505	,018	,244

4.9.3. Rezultati višestruke linearne regresije za dubinu sondiranja u grupi obolelih od dijabetesa i parodontopatije

Primenom linearnog regresionog modela kod zavisne promenljive DS, rezultati vrednovanja modela pokazuju da koeficijent determinacije iznosi $R^2=0.527$ što znači da ovaj model objašnjava 52.7% varijanse faktora DS, što predstavlja dobar rezultat. Međutim, pokazatelj Adjusted R Square kao korigovana i bolja procena stvarne vrednosti iznosi dosta manje, odnosno 0.135 (13.5%) što pokazuje da među promenljivim postoji slaba linearna zavisnost, odnosno da naši rezultati dobro

REZULTATI

objašnjavaju uticaj na DS na našem uzorku, ali da sa uzrokom na opštoj populaciji postoji slaba pozitivna linearna regresija. Stepenn značajnosti celog modela je 0,201, što znači da model nije dobar i signifikantan. Ovo praktično znači da svi parametri zajedno ne mogu predviđati vrednosti dubine sondiranja na ovom poduzorku.

Daljim ispitivanjem koja promenljiva najviše doprinosi predikciji DS, pokazano je da samo promenljiva krvarenje na provokaciju (KNP) nezavisno može predvideti dubinu sondiranja (standardizovani koeficijent $\beta = 0,381$, t statistika=2,232, $p=0,032$, semiparcijalni koeficijent korelacije=0,259). Učešće ove promenljive u predikciji dubine sondiranja iznosi 6,7%.

4.9.4. Rezultati višestruke linearne regresije za nivo pripojnog epitela u grupi obolelih od dijabetesa i parodontopatije

Rezultati vrednovanja ovog modela pokazuju da koeficijent determinacije iznosi $R^2=0.527$ što znači da skup promenljivih, odnosno ovaj model objašnjava 57.8% varijanse faktora NPE, što predstavlja dobar rezultat. Međutim, i ovde pokazatelj *Adjusted R Square* daje dosta manju korigovanu procenu stvarne vrednosti i iznosi 0.228 (22.8%) što pokazuje da među promenljivim postoji slabija linearna zavisnost. Na osnovu dobijenog stepena značajnosti Sig.=0.078, zaključeno je kao i u slučaju predikcije faktora DS, da ovaj model nije dobar i da regresija nije značajna, odnosno da svi parametri zajedno ne mogu doprineti predikciji NPE u ovom poduzorku.

Daljim ispitivanjem koja promenljiva može najviše doprineti predikciji NPE, pokazano je da samo promenljiva plak indeks (PI) nezavisno može predvideti nivo pripojnog epitela (standardizovani koeficijent $\beta = 0,545$ t statistika=3,061, $p=0,004$, semiparcijalni koeficijent korelacije=0,336) i to sa 11,29% udela.

4.10. Određivanje uticaja ispitivanih parametara na serumske koncentracije ispitivanih citokina i receptora-višestruka linearna regresiona analiza

Višestrukom linearnom regresijom pokušali smo da odredimo kretanje vrednosti zavisno promenljivih- serumskih koncentracija citokina i receptora u zavisnosti od menjanja nezavisnih promenljivih na nivou celokupnog uzorka kojem su određivane koncentracije- njih 85.

4.10.1 Rezultati višestruke regresione analize na serumski nivo TNF α

Nezavisne promenljive koje smo posmatrali u ovoj analizi bile su starost, pol, ITM, mentalni stres, PESA, PISA, polimorfizmi -308 G/A TNF α , +252A/G LT α , prisustvo dijabetesa i prisustvo parodontopatije.

Pri vrednovanju celog modela, zapaža se da je vrednost R^2 0,283, što znači da naš model objašnjava samo 28,3% varijanse naše zavisne promenljive. Korigovana vrednost ovog parametra, *Adjusted R²*, koji objašnjava stvarnu vrednost našeg modela primenjenog na celoj populaciji pokazuje vrednost od 0,025, što znači da primenjen na populaciju, naš model objašnjava samo 2,5% varijanse koncentracije TNF α . Statistička značajnost modela je 0,541, što znači da nije statistički značajan, odnosno da svi posmatrani parametri zajedno ne objašnjavaju varijanse promenljive serumske koncentracije TNF α . Ni kada smo vrednovali svaki pomenuti parametar ponaosob, nismo dobili statističku značajnost, odnosno nijedan parametar iz našeg modela samostalno ne objašnjava posmatranu promenljivu.

4.10.2 Rezultati višestruke regresione analize za serumski nivo LT α

Nezavisne promenljive koje smo posmatrali u ovoj analizi bile su identične kao pri analizama za koncentraciju TNF α .

Pri vrednovanju celog modela, vrednost R^2 je 0,151, što znači da u našem istraživanju ove promenljive objašnjavaju 15,1% varijanse posmatranog parametra. Pri korigovanju ove vrednosti za celokupnu populaciju, dobijamo da ovaj model objašnjava 41,5% varijanse koncentracije LT α (*Adjusted R²*=0,415). Statistička značajnost celog modela veća je od 0,05 ($p=0,788$). Pri vrednovanju svake nezavisne promenljive ponaosob, dobili smo da nijedan parametar samostalno ne objašnjava vrednosti promenljive koncentracija LT α .

4.10.3 Rezultati višestruke regresione analize za serumski nivo

TNFR₁

U ovoj analizi posmatrali smo sledeće nezavisne promenljive: starost, pol, ITM, mentalni stres, PESA, PISA, polimorfizmi +36A/G TNFR₁, +676T/G TNFR₂, prisustvo dijabetesa, prisustvo parodontopatije.

REZULTATI

U slučaju predviđanja vrednosti zavisne promenljive serumska koncentracija TNFR₁, koeficijent determinacije iznosi $R^2=0.380$ što znači da ovaj model objašnjava 38% varijanse posmatranog faktora, dok pokazatelj *Adjusted R Square* iznosi 0.208 (20.8%) što govori da su promenljive linearno zavisne iako nije u pitanju jaka veza među njima i moguće je korišćenje regresione jednačine za predviđanje vrednosti navedenog faktora. Na osnovu rezultata statističke značajnosti $\text{Sig.}=0.024 \leq 0.05$, pri vrednosti F testa 2.214, donet je zaključak da je model dobar i da je regresija značajna, odnosno da svi naši posmatrani parametri zajedno doprinose predviđanju zavisne promenljive. Prilikom ispitivanja koja promenljiva u modelu doprinosi predikciji faktora, apsolutne vrednosti koeficijenta Beta pokazuju da znatno veću vrednost u odnosu na druge promenljive ovaj koeficijent ima za promenljivu prisustvo dijabetesa (0.463), što znači da ona pojedinačno najviše doprinose predikciji, a na osnovu t testa i signifikantnosti $\text{Sig.}=0.007 \leq 0.05$ može se zaključiti i da daje statistički značajan jedinstven doprinos jednačini, dok je u slučaju svih ostalih promenljivih signifikantnost veća od 0.05. Kada se vrednost semiparcijalnog koeficijenta podigne an kvadrat, dobija se da nezavisno promenljiva prisustvo dijabetesa jedinstveno predviđa 10,37% vrednosti koncentracije TNFR₁ (Standardizovani koeficijent $\beta= 0,463$; $t=2,802$; $p=0,007$; semiparcijalni koeficijent korelacije= 0,322).

4.10.4 Rezultati višestruke regresione analize na serumski nivo

TNFR₂

U ovoj analizi posmatrali smo identične nezavisne promenljive kao pri analizi koncentracije TNFR₁ U slučaju predviđanja vrednosti zavisne promenljive serumska koncentracija TNFR₁, koeficijent determinacije iznosi $R^2=0,340$ što znači da ovaj model objašnjava 34% varijanse posmatranog faktora, dok pokazatelj *Adjusted R Square* iznosi 0.157 (15.7%) što govori da su promenljive linearno zavisne iako nije u pitanju jaka veza među njima i moguće je korišćenje regresione jednačine za predviđanje vrednosti navedenog faktora. Na osnovu rezultata statističke značajnosti $\text{Sig.}=0.061 \geq 0.05$, pri vrednosti F testa 1.860, donet je zaključak da regresija nije značajna, odnosno da svi naši posmatrani parametri zajedno ne doprinose predviđanju zavisne promenljive. U ovom slučaju apsolutne vrednosti koeficijenta Beta pokazuju da ovaj koeficijent znatno veću vrednost u odnosu na druge promenljive ima za promenljivu PESA (0.547) i promenljivu PISA (0.775), te one pojedinačno najviše doprinose predikciji, a na osnovu

REZULTATI

t testa u oba slučaja i signifikantnosti $\text{Sig} \leq 0.05$ zaključuje se da daju statistički značajan jedinstven doprinos jednačini. Vrednost semiparcijalnog koeficijenta korelacije kada se podigne na kvadrat pokazuje da promenljiva PESA jedinstveno predviđa 8.88%, a promenljiva PISA 22.66% vrednosti faktora serumska koncentracija TNFR₂ (Tabela 3.46).

Tabela 3.46: Rezultati višestruke linearne regresione analize predikcije parametra serumska koncentracija TNFR2 samo za faktore koji su se izdvojili kao nezavisni signifikantni faktori predikcije

Nezavisno promenljiva	Standardizovani koeficijent β	T test	P vrednost	Semiparcijalni koeficijent korelacije
PESA	-,547	-2,512	,015	-,298
PISA	,775	4,014	,000	,476

4.11. Univarijantna i multivarijantna regresiona analiza u predikciji nastanka parodontopatije i parodontopatije i dijabetesa

Ovim analizama izdvajaju se prediktori pojave PD ili PD i T2D. Prediktori pojave podrazumevaju parametre razlika između posmatranih grupa ispitanika. Prvi deo logističke regresione analize je univarijanti model u kojem ispituje svaki željeni parametar ponasob. Faktori koji se u ovoj analizi pokazu značajnim, smatraju se zavisnim faktorima predikcije oboljenja, odnosno faktorima koji u sadejstvu sa ostalim značajnim činiocima dobijenim u ovoj analizi mogu uticati na pojavu oboljenja. Ovi faktori se dalje statistički obrađuju kroz multivarijanti model, gde kao rezultat dobijamo nezavisne prediktore, odnosno faktore koji su sami po sebi dovoljni za nastanak oboljenja. Mera uticaja faktora na oboljenja meri se relativnim rizikom izraženim eksponentom B, odnosno OR (*Odds Ratio*- relativni rizik). Ovaj eksponent nam pokazuje koliko su ispitanici sa pristunim faktorom u većem ($\text{Exp } B > 1$) odnosno manjem ($\text{Exp } B < 1$) riziku da obole od određenog oboljenja.

4.11.1. Rezultati regresionih analiza u predikciji nastanka parodontopatije

Kao prediktori razlike za pojavu parodontopatije posmatrani su pol, starost, socioeknomski status (zanimanje), ITM, stres, parametri fizičke aktivnosti, parodontopatija i dijabetes u porodičnoj anamnezi, disanje na usta, stiskanje zuba,

REZULTATI

podaci o pušenju cigareta, plak indeks, krvarenje na provokaciju, -308G/A TNF α , +252A/G LT α , +36A/G TNFR $_1$ i +676T/G TNFR $_2$ polimorfizmi. U ovom modelu kao zavisni faktori predikcije nastanka parodontopatije izdvojili su se sledeći parametri: stres, intenzitet fizičkog vežbanja, stiskanje zuba, indeks paklo-godina, PI, KNP, GA genotipo za LT α , GG genotip za LT α , TT genotip za TNFR $_2$ (Tabela 3.47).

U multivarijantom modelu kao nezavisni prediktori razlike u kliničkim parametrima izdvojili su se indeks telesne mase (OR=0,516, CI=0,273-0,979, p=0,043), i krvarenja na provokaciju (OR=2.667, CI=.976-7.293, p=0,050). Pomenuti polimorfizmi koji su predstavljali zavisne faktore rizika za parodontopatiju, nisu se izvojili u multivarijantom modelu.

Tabela 3.47: Univarijantni regresioni model- faktori koji su se izvojili kao značajni u predikcije nastanka parodontopatije

Faktor	P	OR	95% CI
ITM	0,009	1,175	1,041-1,327
Stres	0,007	0,454	0,255-0,810
Fiz. aktivnost	0,008	0,313	0,132-0,743
Stiskanje zuba	0,050	2,400	0,999-5,763
PPY	0,017	1,125	1,021-1,239
PI	0,000	5,378	2,654-10,899
KNP	0,000	1,041	1,022-1,061
LT α - GA	0,019	2,748	1,184-6,380
LT α - GG	0,013	0,383	0,181-0,814
TNFR $_2$ - TT	0,032	2,302	1,075-4,926

4.11.2. Rezultati regresionih analiza u predikciji nastanka parodontopatije i dijabetesa

U univarijantom regresionom modelu kao prediktori razlike za pojavu PD i T2D posmatrani su sledeći parametri: pol, starost, socioeknomski status (zanimanje), ITM, stres, parametri fizičke aktivnosti, parodontopatija i dijabetes u porodičnoj anamnezi, podaci o pušenju cigareta, broj zuba, plak indeks, krvarenje na provokaciju, -308G/A TNF α , +252A/G LT α , +36A/G TNFR $_1$ i +676T/G TNFR $_2$ polimorfizmi, kao i serumske koncentracije TNF α , LT α , TNFR $_1$ i TNFR $_2$.

U univarijantom modelu kao zavisni prediktori za PD izdvojili su se zanimanje, indeks telesne mase, stres, indeks paklo-godina, broj zuba, plak indeks, krvarenja na

REZULTATI

provokaciju i koncentracija TNFR₁ (Tabela 3.48). U multivarijantnom modelu od kliničkih parodontoloških parametara izdvojili su se dubina sondiranja (OR=8,478, CI=3,47-18,57, p=0,006). Od biohemijskih parametara izvojila se serumska koncentracija TNFR₁ (OR=8,047, CI=7,67-84,74, p=0,000).

Tabela 3.48: Univarijantni regresioni model-faktori koji su se izdvojili kao značajni prediktori nastanka parodontopatije

Faktor	p	OR	95% CI
Zanimanje	0,000	0,221	0,132-0,370
ITM	0,000	1,601	1,365-1,878
Stres	0,001	0,407	0,242-0,686
Fiz. aktivnost	0,000	0,164	0,061-0,439
PPY	0,001	1,203	1,062-1,362
Broj zuba	0,004	0,357	0,223-0,572
PI	0,000	13,691	5,778-32,441
KNP	0,000	1,046	1,027-1,065
DS	0,000	6,025	2,813-12,904
sTNFR ₁	0,000	8,0385	7,623-84,7642

4.11.3. Rezultati regresionih analiza u predikciji nastanka parodontopatije i dijabetesa u odnosu na ispitanike sa dijabetesom

U univarijantnom regresionom modelu kao prediktori razlike za pojavu PD i T2D posmatrani su sledeći parametri: pol, starost, socioekonomski status (zanimanje), ITM, stres, parametri fizičke aktivnosti, parodontopatija i dijabetes u porodičnoj anamnezi, podaci o pušenju cigareta, broj zuba, plak indeks, krvarenje na provokaciju, DS, NPE, PESA, PISA, -308G/A TNF α , +252A/G LT α , +36A/G TNFR₁ i +676T/G TNFR₂ polimorfizmi.

U univarijantnom modelu kao zavisni prediktori za PD i T2D u odnosu na PD izdvojili su se zanimanje, ITM, PI, NPE, PESA, PISA, AA genotip -308G/A TNF α , AA genotip +36A/G TNFR₁ (Tabela 3.49). U multivarijantnom modelu zanimanje se izdvojilo kao nezavisni parametar predikcije (OR=1,71, CI=0,370-3,992, p=0,021), a od genskih faktora izdvojili su se AA genotip -308G/A TNF α (OR=0,180, CI=0,037-0,886, p=0,035) sa protektivnim efektom.

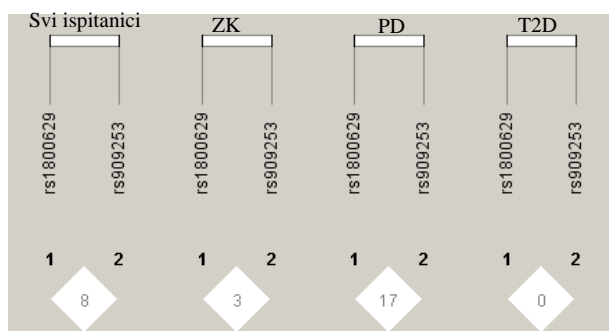
REZULTATI

Tabela 3.49: Univarijantni regresioni model- faktori koji su se izdvojili kao značajni u predikciji T2D i PD u odnosu na PD grupu

Faktor	p	OR	95% CI
Zanimanje	0,000	1,724	0,387-0,690
ITM	0,000	1,309	1,154-1,458
PI	0,000	2,816	1,697-4,673
NPE	0,000	1,468	1,190-1,813
AA -308G/A TNF α	0,029	0,173	0,036-0,837
AA +36A/G TNFR $_1$	0,046	0,616	0,384-0,991

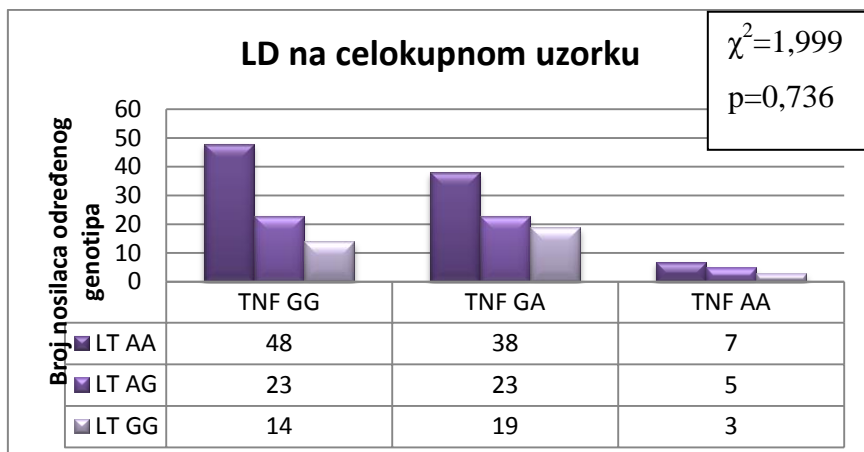
4.12. Analiza neravnoteže povezanosti (LD)

Koeficijent neravnoteže povezanosti računat je između polimorfizama na istom lokusu, odnosno -308G/A TNF α (rs1800629) i +252A/G LT α (909253). Nivo LD-a između ovog para polimorfizama izražen je putem parametra D' predstavljenog u kvadratićima. LD je računat za celu studijsku grupu (Grafikon 3.16), kao i u okviru svake ispitivane grupe ponaosob (Grafikoni 3.17, 3.18, 3.19). Na našem uzorku ispitivani polimorfizmi nisu pokazali statistički značajnu ravnotežu nepovezanosti. Koeficijentima povezanosti bili su veoma mali (ceo uzorak, D'=0,08; ZK grupa, D'=0,17, PD grupa=0,03, T2D grupa, D'=0,000).

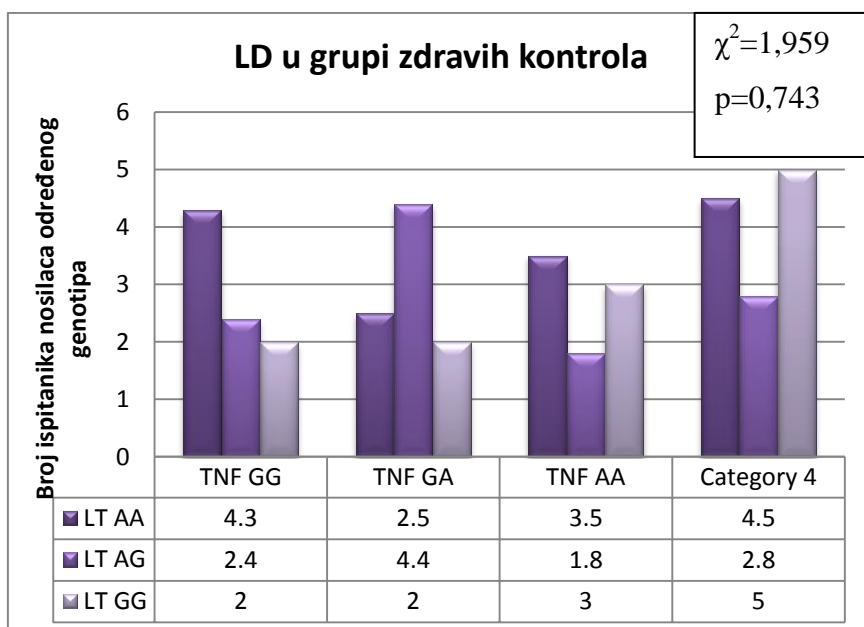


Grafikon 3.12: Neravnoteža povezanosti u celoj studijskoj grupi, ZK, PD i T2D grupi redom

REZULTATI

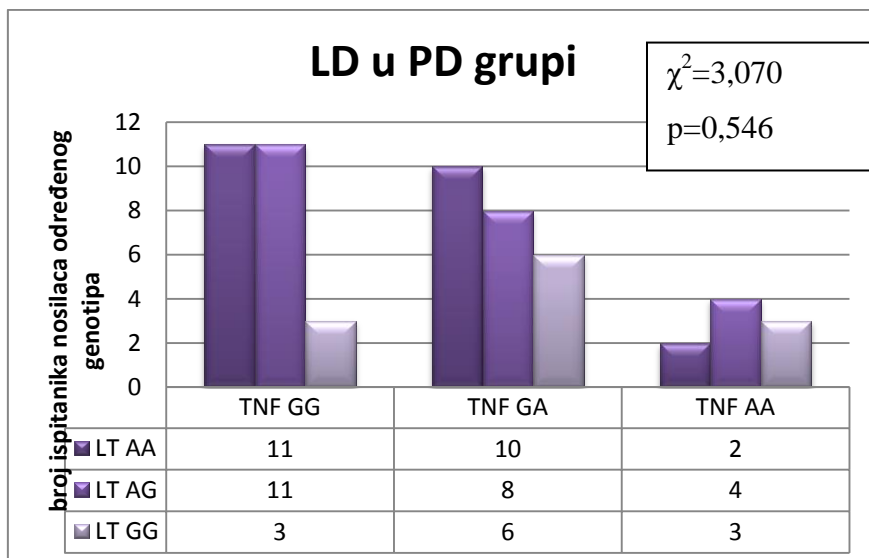


Grafik 3.13: Neravnoteža povezanosti na celokupnom uzorku računata Pirsonovim Hi kvadrat testom

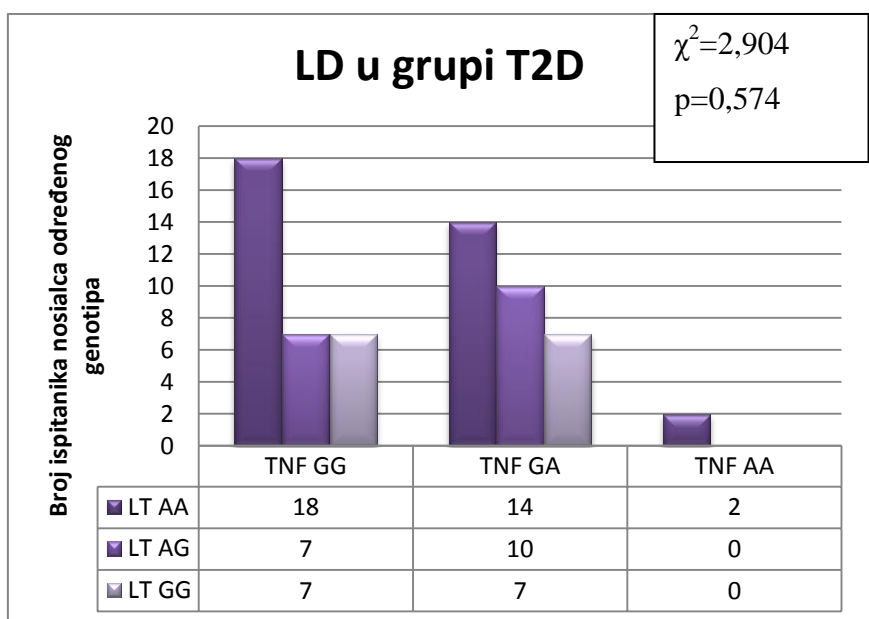


Grafik 3.14: Neravnoteža povezanosti u grupi zdravih kontrola računata Pirsonovim Hi kvadrat testom

REZULTATI



Grafikon 3.15: Neravnoteža povezanosti u grupi obolelih od parodontopatije računata Pirsonovim Hi kvadrat testom



Grafikon 3.16: Neravnoteža povezanosti u grupi obolelih od dijabetesa računata Pirsonovim Hi kvadrat testom

5.0. DISKUSIJA

Hronična parodontopatija i tip 2 dijabetesa predstavljaju dva hronična, inflamatorna poligena oboljenja. Oba oboljenja se nalaze u samom vrhu po rasprostranjenosti u svetu. Iako se smatra da su etiološki vrlo različita, ova dva oboljenja dele neke zajedničke patogenetske mehanizme, a u poslednje vreme sve je više dokaza i o zajedničkim genetskim mehanizmima.

Etiološki se parodontopatija i dalje smatra oboljenjem izazvanim primarno gram negativnim mikroorganizmima. Osim ovih klasičnih periopatogena, sve je više dokaza o prisustvu/ulozi virusa [6], gljivica [7], araha, kao i gram pozitivnih i nekih novootkrivenih bakterija [13]. Dobro je poznata činjenica da je destrukcija parodontijuma većim delom posledica imunološkog odgovora organizma na prisutne mikroorganizme, odnosno sekrecije citokina, prostaglandina, eikosanoida, slobodnih radikala i ostalih citotoksičnih supstanci. Pojačana sinteza ovih supstanci je na početku odgovor na prisustvo mikroorganizama, da bi kasnije bila odgovor i na prisustvo raspadnih produkata samog tkiva. Ovo govori u prilog da je etiološki parodontopatija mikrobnog i autoimunog oboljenja, što parodontopatiju etiološki približava nekim oblicima dijabetesa.

Tip 2 dijabetesa je poligeno inflamatorno oboljenje čija je osnovna karakteristika periferna rezistencija ciljnih tkiva na insulin uz naknadno poremećenu sekreciju insulina [261]. T2D je rezultat interakcije genske predispozicije sa bihevioralnim i faktorima sredine. Hronična inflamacija niskog intenziteta igra veoma bitnu ulogu u patogenezi T2D, s tim da su stavovi o primarnoj odnosno sekundarnoj pojavi inflamacije u odnosu na dijabetes oprečni [49, 61].

Oba oboljenja su povezana sa određenim modifikatorima oboljenja. Jedan od najvažnijih modifikatora parodontopatije je sam dijabetes melitus, gde se po nekima parodontopatija smatra šestom komplikacijom dijabetesa [55], ili čak prvim kliničkim znakom ovog oboljenja [57]. Dokazano je da pacijenti sa dobro odnosno loše kontrolisanim dijabetesom imaju 1,6 odnosno 2,9 puta veće šanse da obole od parodontopatije [56]. Prvobitni dizajn ove studije imao je definisanu i četvrtu grupu, odnosno grupu pacijenata sa T2D i klinički zdravim parodontijumom, koja bi upotpunila rezultate i olakšala donošenje zaključaka. S obzirom na iznete činjenice o uticaju dijabetesa na parodontalna tkiva, činjenici da se T2D javlja u uglavnom kod

DISKUSIJA

starijih i zbog oskudne simptomatologije se kasno dijagnostikuje, kao i relativno niskoj svesti ispitanika o održavanju oralne higijene, ovu grupu bilo je nemoguće oformiti među našim ispitanicima. Pri regrutovanju ispitanika sa dijagnostikovanim dijabetesom čak je mali broj pacijenata (manje od 50% pregledanih) ispunjavao osnovne kriterijume isključenja- prisutno više od 14 zuba bez trećih molara i odusustvo akutnih dijabetičnih komplikacija, među kojima i klinički vidljive infekcije oralne sluzokože. Među našim ispitanicima sa dijagnostikovanim dijabetesom čak 69,20% njih imalo je lošu glikoregulaciju, odnosno $HbA1c > 7,5\%$. Iznenadujuće, nije bilo razlike ni u jednom kliničkom parodontološkom parametru između ispitanika sa dobro i loše regulisanim dijabetesom. Ispitanici T2D grupe pokazali su slične vrednosti dubine sondiranja, ali veći stepen destrukcije, odnosno veće vrednosti NPE u odnosu na PD grupu. Vrednosti plak indeksa povećavale su se statistički značajno od kontrolne, preko PD do T2D grupe. Indeks krvarenja na provokaciju, neočekivano nije pratio ovaj trend plak indeksa, pa je razlika uočena samo između zdravih kontrola i druge dve grupe, odnosno KNP je bio sličan između PD i T2D grupe. Iako su ispitanici PD i T2D grupe usklađeni po pušačkom statusu (pušač-nepušač odnos), u grupi ispitanika sa dijabetesom indeks paklo-godina (PPY) i broj ispitanika koji puše više od 10 cigareta na dan, su neznatno veći, pa ovo može biti jedno od objašnjenja nepostojanja razlike u indeksu krvarenja na provokaciju između ove dve grupe, s obzirom da je krvarenje na provokaciju umanjeno kod pušača. Takođe, višestrukim linearnim regresionim statističkim modelom u kojem smo pokušali da pronađemo nezavisne faktore koji objašnjavaju DS i NPE, u okviru T2D grupe, dobili smo da na kliničke parametre u ovoj grupi ispitanika nezavisno deluju samo PI i KNP, bez uticaja glikoregulacije i drugih karakteristika dijabetesa ili genskih varijacija.

Pušenje cigareta je drugi veoma bitan modifikator koji utiče na oba oboljenja. Sa aspekta parodontopatije, dokazana je uloga duvanskog dima na sastav subgingivalne flore, veći gubitak kosti kod pušača u odnosu na nepušače, na lošiji odgovor domaćina na terapijske procedure u smislu osteogeneze i mekotkivnog zarastanja, kao i na imunološke funkcije, odnosno funkcije T i B limfocita [14]. Iako nije jedan od tri glavna modifikatora dijabetesa, pušenje cigareteta se smatra nezavisnim faktorom koji može da poveća rizik za nastanak T2D [42]. U našoj studiji uzimali smo detaljne anamnestičke podatke o pušenju cigareta. Prvobitno smo ispitanike podelili na pušače i

nepušače. S obzirom da ova najčešća podela ispitanika spram pušačkog statusa svrstava u iste grupe ispitanike sa veoma različitim navikama, pušače smo dalje podelili na one koji puše više odnosno manje od 10 cigareta na dan, ali smo računali precizniji kvantitativni indeks- indeks paklo-godina (PPY). Ovaj indeks uzima u obzir vreme pušenja cigareta u godinama i njihov prosečan broj na dan. Nepušači su takođe heterogena grupa, pa smo ih podelili na prave nepušače (nikad nisu pušili cigarete) i bivše pušače koji su ostavili cigarete pre manje ili više od 5 godina. Ovakav detaljan opis pušenja cigareta u ovom istraživanju je neophodan jer smo pratili razne parametre, koji mogu biti pod uticajem kako pušačkih navika, tako i kumulativnog dejstva cigareta. Tako na primer, kao što je pomenuto, krvarenje na provokaciju može biti umanjeno kod trenutnih pušača (za ovaj indeks bitan je PPY), dok sa druge strane na nivo pripojnog epitela, parametar koji odražava destrukciju parodonticijuma, kao i na glikoregulaciju, veći uticaj ima kumulativno dejstvo duvanskog dima. Univarijantnim regresionim analizama sasvim očekivano dobili smo da je indeks paklo-godina zavisni prediktor pojave parodontopatije ili parodontopatije i dijabetesa, ali neočekivano, sa malim rizikom (OR= 1,203 odnosno 1,125). Višestrukim linearnim regresionim analizama nijedan parametar koji opisuje pušačke navike nije se istakao kao nezavisni faktor koji opisuje kliničke parametre parodontopatije- DS i NPE u obe grupe ispitanika. Ipak, ovi faktori zajedno sa svim ostalima koje smo istraživali mogu predvideti NPE kod ispitanika PD grupe (statistički značajan i dobar model). Osim na kliničke parametre oboljenja, dokazan je uticaj duvanskog dima i na nivo proinflamatornih citokina. Rezultati studija akutnog uticaja duvanskog dima na nivo TNF α su oprečani, [113, 114, 262], dok je dugoročni uticaj duvanskog dima na produkciju TNF α stimulativan [263]. Višestrukim linearnim regresionim modelom, nijedan faktor koji se odnosi na pušačke navike nije opisivao varijansu koncentracije opisivanih citokina/receptora. Bitno je istaći da smo iz studije eliminisali ispitanike koji su ostavili cigarete u periodu od 6 meseci, kao i one ispitanike koji su pušili cigare, lule ili su zamotavali duvan. Bez obzira što smo definisali prilično iscrpnu podelu ispitanika spram pušačkog statusa, koliko nam je poznato, ne postoji jedinstvena formula koja bi uključila sve parametre vezane za ovu naviku (dužinu, broj ili vrste cigareta...) i omogućila lakše poređenje, odnosno uticaj ovih vrednosti sa karakteristikama oboljenja. U našoj studiji bilo je više nepušača nego pušača, ali je ovaj odnos bio ravnomerno raspoređen među grupama.

DISKUSIJA

Značajnost se uočava jedino u broju pravih nepušača i PPY indeksu ispitanika kontrolne grupe u odnosu na druge dve grupe. Ono što je zanimljivo je da iako je pušača neznatno više u PD grupi, prosečan indeks paklo-godina je neznatno veći u T2D grupi. U toku prikupljanja podataka, stekao se utisak da su ispitanici iz T2D grupe (mahom ležeći pacijenti) svesno umanjivali podatke o pušenju cigareta s obzirom da im je ta navika praktično zabranjena od strane endokrinologa. S toga bi ova razlika u PPY indeksu verovatno i dosegla statističku značajnost.

Gojaznost se smatra jednim od tri glavna modifikatora dijabetesa, ali je povezan i sa povećanom učestalošću parodontopatije [264]. U dijabetesu, masno tkivo smatra se glavnim izvorom proinflamatornih citokina, između ostalih i TNF α , koji učestvuju u patogenezi ovog oboljenja [265]. Pojačana inflamacija kod gojaznih osoba može uticati na stanje parodontijuma. Takođe, kod ovih ispitanika je higijena nekad otežana ili zanemarena, a kod žena je gojaznost često praćena i promenom hormonskog statusa. Rezultati povezanosti gojaznosti izražene kroz indeks telesne mase (ITM) i povećane ekspresije TNF α su oprečni [106, 107]. Iako je ulazni kriterijum za ITM bio 18-30kg/m², statističkom obradom podataka dobijena je razlika među sve tri grupe ispitanika. S obzirom na potencijalnu povezanost ITM sa sintezom TNF α , statistički smo korelirali nivo svih citokina sa ITM na svim ispitanicima na kojima je meren nivo citokina, kao i u svakoj grupi ponaosob. Spirmanov korelacioni koeficijent pokazuje pozitivnu ali nesigificantnu korelaciju ITM sa svim citokinima. Jedina statistički značajna korelacija je ITM-TNFR₁ na nivou svih ispitanika, mada pri određivanju nezavisnih faktora koji jedinsveno objašnjavaju vrednosti serumskih koncentracija, ITM se nije izdvojio kao sigificantan faktor. U multivarijantom regresionom modelu se ITM izdvojio kao nezavisni prediktor za nastanak parodontopatije (protektivan efekat), što se isprva čini kao neobičan rezultat. Međutim, kada se posmatra „dobro poznat“ odnos ITM i parodontopatije, uočava se da studije češće porede stepen napredovanja parodontopatije između normalno uhranjenih i gojaznih (ITM>30kg/m²), a gojaznih nije bilo u našoj studiji. S druge strane, studije koje ispituju pojavu i stepen parodontopatije kod normalno, prekomerno uhranjenih i gojaznih, pokazale su povećano prisustvo oboljenja parodontijuma kod ispitanika sa ITM<18kg/m², u odnosu na ona sa ITM>18 ili 25kg/m² [15], što se slaže sa našim rezultatima. U univarijantom regresionom modelu ovaj parametar izdvojio se kao zavisni faktor predikcije za nastanak dijabetesa i

DISKUSIJA

parodontopatije u odnosu na ZK (rizik) i ispitanike sa parodontopatijom (rizik), što se slaže sa opšte poznatim stavom gojaznosti kao jednog od tri glavna modifikatora dijabetesa. U linearnim regresionim modelima gde smo tragali za faktorima koji određuju DS i NPE kod ispitanika PD i T2D grupe, ITM se nije izdvojio kao faktor koji statistički značajno određuje ove kliničke parametre, što je donekle u suprotnosti sa većinom studija koje su našle ovu zavisnost [15]. Nivo ITM od 18-25 kg/m² predstavlja normalnu telesnu masu, 25-30 kg/m² definiše prekomernu telesnu težinu, dok ITM>30 kg/m² označava gojaznost. Definisanje šireg ulaznog kriterijuma iz razloga omogućavanja prikupljanja uzorka uz istovremeno izbegavanje gojaznih osoba, može biti razlog ove razlike među grupama.

Pol, starost i socioekonomski status takođe se povezuju sa ovim oboljenjima. Pol je modifikator prisutan celog života, za razliku od prethodno pomenutih faktora koji utiču na oboljenja i/ili sintezu citokina. Smatra se da je muški pol rizičan za parodontopatiju [22], dok se uticaj pola na prevalencu i rizik za nastanak dijabetesa menja godinama kako se menja i životni stil i prevalenca gojaznosti- dva od tri najvažnija modifikatora ovog oboljenja. Ranije se smatralo da se T2D javlja češće kod žena iznad 25 godina života, ali su se danas zbog povećanja gojaznosti u muškoj populaciji ovi odnosi promenili. Može se samo reći da je u populaciji starijih normalno uhranjenih, veća učestalost T2D kod žena, dok se u populaciji gojaznih ova prevalenca izjednačava [266]. Uticaj pola na sintezu TNF α posmatra se kroz uticaj estrogena, i rezultati ovih studija su oprečni [105, 147, 267]. U našoj studiji bilo je 45% ispitanika muškog pola. Grupe su bile usklađene po distribuciji muškaraca i žena. U grupi zdravih kontrola i ispitanika sa parodontopatijom bilo je neznatno više žena, dok je u grupi ispitanika sa dijabetesom bilo neznatno više muškaraca, što je donekle u suprotnosti sa prethodno iznetim činjenicama o uticaju pola na oboljenja. U univarijantnim i višestrukim linearnim regresionim analizama, pol se nije izdvojio kao faktor koji bi predvideo rizik za oboljevanje od ispitivanih bolesti, ili ispitivane kliničke parodontološke parametre, kao ni nezavisni prediktor varijanse koncentracije citokina/receptora. Prosečna starost ispitanika bila je 43,47 godina, a grupe su međusobno bile usklađene po godinama. Usklađivanje grupe ZK po godinama bio je težak zadatak u našoj populaciji, s obzirom da je veoma teško naći starije ispitanike sa intaktnim parodoncijumom. S druge strane, zbog načina života, T2D se u današnje vreme dijagnostikuje kod relativno mladih

DISKUSIJA

osoba, pa je prosek godina ove grupe bio relativno manji u odnosu na druge studije. Godine se smatraju faktorom rizika za hroničnu parodontopatiju i T2D. Sa aspekta uticaja na sintezu citokina, čini se da se povećanje javlja više kao posledica komorbiditeta, a zaključak je da je uticaj starenja bez komorbiditeta na sintezu citokina zanemarljiv, odnosno mnogo manji nego uticaj akutnih patoloških stanja. Suprotno već pomenutim uticajima pola na nastanak parodontopatije, ali u skladu sa nepostojanjem polne razlike u oboljevanju od dijabetesa, u univarijantnim regresionim modelima ovaj parametar nije se izdvojio kao zavisni faktor koji utiče na rizik za nastanak oboljenja. S druge strane, faktor starost objašnjava 12,25% varijanse NPE u grupi sistemski zdravih ispitanika sa parodontopatijom. Kod ispitanika sa dijabetesom, ova zavisnost uticaja na kliničke parodontološke parametre nije detektovana, pa se malo slobodnije može protumačiti da je kod obolelih od dijabetesa, uticaj godina na stanje parodonticijuma manje bitno u odnosu na opšte stanje i imunološki odgovor. Socioekonomski status kao modifikator oboljenja se ispituje na različite načine u studijama, od samo obrazovanja, samo prihoda ili kombinacije prihoda i obrazovanja. U našoj studiji pratili smo ovaj parametar samo kroz stepen obrazovanja ispitanika u anamnestičkim podacima, s obzirom da većina ispitanika nije želela da podeli podatke o primanjima. U našoj studiji ispitanici nisu bili usklađeni po stepenu obrazovanja, koje smo podelili na osnovno, srednje, visoko (fakultet, master, magistri i doktori nauka) kao i grupu studenata koja nije bila zanemarljiva. Na celokupnom uzorku je bilo najviše ispitanika sa visokim obrazovanjem, koji su bili raspoređeni slično u ZK i PD grupi dok ih je u T2D grupi upola manje. U T2D grupi dominirali su ispitanici sa završenom srednjom školom. Ispitanika sa samo osnovnim obrazovanjem bilo je najviše u T2D grupi a zatim u PD grupi, dok ih u grupi zdravih kontrola nije bilo. Ovaj podatak se uklapa u generalan stav da su ispitanici lošijeg socioekonomskog statusa skloni zanemarivanju sopstvenog zdravlja, i neredovnim posetama stomatologu. Čak se u multivarijantnom modelu ovaj faktor izdvojio kao zavisni faktor rizika pri poređenju ZK i T2D grupe, a kao nezavisni pri poređenju PD i T2D grupe.

Mentalni stres i fizičko vežbanje su takođe faktori koji mogu uticati na razvoj parodontopatije, dijabetesa kao i sintezu samog TNF α . Psihološki stres, koji deluje putem neuroendokrinog sistema, prvobitno je označen kao proinflammatorni mehanizam, mada su iscrpnija istraživanja zaključila da ishod stresa zavisi od vrste stresa, relaks

DISKUSIJA

perioda, kao i imunoloških parametara koje posmatramo. Mentalni stres povezan je sa parodontopatijom [17], glikoregulacijom [268], i različitim uticajima na sintezu $TNF\alpha$ [108, 269]. S obzirom na pomenute uticaje mentalnog stresa na oboljenja i ekspresiju citokina, logičan korak u dizajnu naše studije bio je praćene ovih parametara. Podatke o stresu dobijali smo tokom anamneze, uzimali smo podatke o intenzitetu i učestalosti stresa koje smo pretočili u definitivni zbir umerenog, srednjeg i jakog stresa [249]. Ono što umanjuje vrednost ove metode prikupljanja podataka o stresu je činjenica da nismo i opisno definisali stres kao anksioznost, nestrpljenje, napetost, nesanicu i eventualnu depresiju. Nismo pratili ni eventualno postojanje relaks perioda nakon stresa, koji takođe može imati uticaj na inflamaciju, ali s razlogom što se ovakav period obično prati u ciljanim eksperimentima gde se meri uticaj stresa odnosno relaks perioda na određene parametre/stanja. Takođe, u toku razgovora sa ispitanicima činilo da se da su neki ispitanici (npr. studenti) skloni da realno umeren stres (npr. polaganja ispita) definišu kao najjači, dok su drugi ispitanici sa egzistencijalnim i zdravstvenim problemima bili stidljiviji u ocenjivanju sopstvenog stresa i davali manje ocene. Drugim rečima, ovaj parametar je u sebi nosio veliku dozu subjektivnosti. Rezultati studije su i pokazali da se stres razlikovao među grupama i da je bio najveći u grupi zdravih kontrola (u rangu visokog) dok je u druge dve grupe bio u rangu umerenog, sa nešto nižim vrednostima u T2D grupi. S obzirom da najveći broj studenata i pripada grupi zdravih kontrola, jasno je zašto je u ovoj grupi stres najveći. Iako je ovo jedna od retkih (trenutnom pretragom jedina) studija koja je uzela u obzir parametre stresa pri ispitivanju citokina kod pacijenata sa dijabetesom i parodontopatijom, s obzirom na iznete činjenice o davanju podataka, uticaj ovog parametra treba posmatrati sa oprezom. Dodatna činjenica da ove podatke treba uzeti sa oprezom je da ta je univarijanta regresiona analiza pokazala protektivan efekat za nastanak PD i T2D u odnosu na zdrave ispitanke, što je u suprotnosti sa generalnim stavom nauke o uticaju stresa na PD i T2D. Što se tiče fizičkog vežbanja, opšte je poznatao i dokazano da da umerena fizička aktivnost ima pozitivne efekte na celokupno zdravlje. Pokazano je da ova vrsta fizičke aktivnosti smanjuje rizik za oboljevanje od parodontopatije [16], dijabetesa [41], i deluje antiinflamatorno, odnosno smanjuje koncentracije $TNF\alpha$ [112]. Antiinflamatorno dejstvo, kao i povećana svest o sopstvenom zdravlju kod osoba koje vežbaju su neki od parametara koji objašnjavaju pozitivan uticaj na ova dva oboljenja. S druge strane,

DISKUSIJA

jednokratno vežbanje osoba nenaviknutih na aktivnost deluje proinflamatorno [111], a ekstremni naponi su povezani sa pojačanim stiskanjem zuba koje se smatra faktorom koji loše utiče na parodontalna tkiva. S obzirom da ne postoje univerzalni parametri za anamnestičko praćenje vežbanja, u ovoj studiji smo efekte vežbanja pratili kroz redovnost (bez fizičke aktivnosti, redovna, neredovna), intenzitet (slab, umeren, jak) i učestalost (redovna i neredovna) fizičke aktivnosti. Treba naglasiti da su ovo subjektivno ocenjeni podaci, naročito sa aspekta intenziteta vežbanje i verodostojnost ovih podataka je nemoguće proveriti. Ipak, pretragom podataka uvideli smo da smo jedina studija koja je uzimala u obzir ove parametre, a da se nije bavila isključivo proučavanjem efekata vežbanja. Naši rezultati pokazuju prilično obeshrabrujući podatak da gotovo polovina (49,4%) naših ispitanika ne praktikuje nikakvu fizičku aktivnost; u T2D grupi ovaj procenat je najveći i iznosi čak 58,5%. U saglasnosti sa opštim stavom o vežbanju i uticaju na parodontopatiju i dijabetes, uloga ovog parametra je u univarijantnim analizama pokazala protektivan efekat pri poređenju ZK grupe sa PD i T2D grupama. Stiskanje zuba je pomenuto kao faktor koji se može javiti pri velikim naporima, ali se takođe povezuje i sa stresom. Pri ispitivanju ove navike definisali smo zajedno bruksiste i osobe koje danju stiskaju zube. Samo 21,1% naših ispitanika je prijavilo ovu lošu naviku, s tim da je najviše njih u ZK grupi a najmanje u T2D grupi, što se poklapa sa distribucijom stresa kao i fizičkog vežbanja. U višestrukim linearnim regresionim analizama u kojima smo ispitivali uticaj ovog parametra na DS i NPE, nismo dobili da ova navika statistički signifikantno objašnjava određeni deo varijanse ovih parametara, odnosno da samostalno utiče na ove kliničke parametre.

Već je pomenuto i opšte prihvaćeno da je dijabetes jedan od glavnih faktora rizika za nastanak i progresiju parodontopatije, ali u poslednje vreme ističe se i uticaj inflamacije poreklom iz parodontocijuma na glikoregulaciju i sistemska inflamaciju, kako kod zdravih tako i kod ispitanika sa dijabetesom. Grana parodontologije koja proučava ovaj uticaj naziva se parodontalna medicina. Oboleli parodontocijum smatra se rezervoarom mikroorganizama i citokina koji se otpuštaju u cirkulaciju. Mikroorganizmi deluju direktnim prodorom u cirkulaciju (metastatska infekcija), zatim prodorom egzo i endotokisna koji izazivaju povrede na udaljenim mestima (metastatska povreda), kao i taloženjem imunih kompleksa bakterijskih antigena sa antitelima (metastatska inflamacija) [68]. Sa aspekta uticaja inflamiranog parodontocijuma na dijabetes, najviše

DISKUSIJA

se pridaje značaja parodontcijumu kao direktnom izvoru inflamatornih citokina. Već dugo se smatra da osoba koja ima razvijenu formu parodontopatije i prisutne sve zube, poseduje inflamiranu površinu veličine dlana odrasle osobe. Preciznija mera kvantifikacije površine inflamiranog epitela su indeksi za određivanje površine epitela parodontalnih džepova- PESA (*Periodontal Epithelial Surface Area*) i inflamirane epitelne površine parodontalnih džepova- PISA (*Periodontal Inflamed Surface Area*) parametri. Iako u upotrebi još od 2008. godine [67] ovi parametri su slabo iskorišćeni u istraživanjima koja se bave parodontalnom medicinom. Računanje ovih vrednosti dobija se upotrebom vrednosti DS, NPE i KNP na šest tačaka po zubu. S obzirom da je PI u korelaciji sa KNP, ovi parametri uzimaju u obzir sve najčešće indekse oralne higijene i stanja parodontalnih tkiva. Kao što je pomenuto u uvodu, ovi logaritmi imaju određene mane jer koriste prosečne dužine korenova zuba, zapaljenje tretiraju kao dvodimenzionalnu pojavu, i ne govore ništa o vrstama bakterija u bioflmu, kao ni o samoj reaktivnosti domaćina. Bez obzira na ove nedostatke, ovo je za sada najpreciznija metoda kvantifikovanja uticaja zapaljenja iz parodontcijuma na sistemsko zdravlje. U našoj studiji vrednosti PISA i PESA parametara su se razlikovale između grupa sa dijagnostikovanom parodontopatijom, ali iznenađujuće ove vrednosti bile su veće kod ispitanika PD grupe. Iako su vrednosti NPE i PI bile veće kod ispitanika sa dijabetesom, neznatno veći broj zuba je bio presudan da PISA i PESA budu veći u grupi sistemski zdravih ispitanika. Krvarenje na provokaciju je neznatno veće kod T2D što je, kako je objašnjeno verovatno posledica većih vrednosti PPY u T2D grupi. Mnogobrojne studije su se bavile izučavanjem uticaja inflamacije iz parodontcijuma na glikoregulaciju. Dobijeni rezultati su vrlo nekonzistentni. Neke longitudinalne studije povezale su uznapredovalu parodontopatiju sa povećanim rizikom (6x) za lošiju glikoregulaciju [71], kao i sa smrtnim ishodom kardioresnalnih komplikacija kod pacijenata sa T2D [73]. Rezultati intervencionih studija, odnosno uticaja konzervativne terapije na poboljšanje glikoregulacije su takođe nekonzistentni [74, 75, 80]. Istraživanja na animalnim modelima koja su najbolje kontrolisana sa aspekta uticaja faktora spoljašnje sredine (ishrana, stres, vežbanje, pušenje cigareta, postojanje još nedijagnostikovanih oboljenja...) takođe pokazuju rezultate koji govore u prilog, ali i opovrgavaju uticaj inflamacije iz parodontcijuma na kontrolu glikemije [270, 271]. Naša studija je pokušala da poveže uticaj inflamacije iz parodontcijuma sa glikoregulacijom

DISKUSIJA

putem korelacija kliničkih parodontoloških parametara i parametara glikoregulacije-glukoze na tašte i HbA1c. Korelacioni koeficijenti (Pirsonov i Spirmanov) nisu dali nijednu statistički značajnu korelaciju ovih parametara. Čak iznenađujuće, u T2D grupi smo dobili negativne korelacione koeficijente između PESA i PISA parametara i HbA1c i glukoze. U našoj studiji na ovaj način nismo uspjeli da potvrdimo uticaj inflamacije iz parodontcijuma na glikoregulaciju što je u saglasnosti sa nekim ranijim studijama [80].

Većina pomenutih modifikatora, osim pola, nisu pristuni ceo život. Opšte je poznato da nekada ispitanici sa istim faktorima rizika razvijaju prilično različite kliničke slike, ili čak ne obole od određenog oboljenja. U poligenim oboljenjima, kakva su parodontopatije i T2D, ove razlike se objašnjavaju predispozicijom, odnosno naslednom osnovom, modifikatorima koji su prisutni ceo život. Kao što je već pomenuto, tip 2 dijabetesa neki nazivaju „noćnom morom“ genetičara [36], jer je dokazan udeo nasledne komponente od čak 30-70% [37]. Otkriveno je preko 70 lokusa potencijalno odgovornih za T2D [38], a svi oni zajedno objašnjavaju samo mali deo nasledne osnove T2D. Takođe, nekada ispitanici sa obiljem plaka, lokalnih i opštih faktora rizika ne razvijaju parodontopatiju ili razvijaju blage forme parodontopatije. Studijama na jednojajčanim blizancima dokazano je da nasleđe ima 50% uloge u patogenezi parodontopatije [272]. S obzirom da ni za jedno od ispitivanih oboljenja nije otkriven gen neposredno odgovoran za njegovu pojavu, oba se smatraju poligenim bolestima [68]. Oba oboljenja karakteriše prenaplašeni odgovor na stresore, koji može biti pod kontrolom gena. Stoga se smatra da, osim što su oboljenja dvosmerno povezana, odnosno jedno drugom predstavljaju modifikatore, dijabetes i parodontopatija dele i određene patogenetske sličnosti. Ove sličnosti ogledaju se u genetičkim i imunološkim mehanizmima. Po nekim autorima, ključni citokin koji objašnjava tj. posreduje u dvosmernoj vezi parodontopatije i dijabetesa je TNF α , citokin koji stimuliše destrukciju mekih i tvrdih parodontalnih tkiva i posreduje u insulinskoj rezistenciji [93]. U našoj studiji ispitivali smo varijacije ovog ključnog citokina- TNF α , njemu funkcionalo i genski vrlo bliskog LT α , kao i njihovih receptora. Ispitivani SNP na genu za TNF α nalazi se na promotorskom regionu (-308G/A), dok se za preostala tri citokina/receptora nalazi u egzonomima (+36 A/G TNFR $_1$, +676 T/G TNFR $_2$), odnosno intronu (+252 A/G LT α).

DISKUSIJA

Obradom podataka za SNP -308G/A TNF α dobili smo da je u celokupnom uzorku bilo 47,2% nosilaca GG genotipa, 44,4% GA, a 8,3% AA genotipa. Ova distribucija se razlikuje od podatka da je u beloj populaciji 60-70% nosilaca GG, 30-40% nosilaca GA i samo 1,5-3% AA genotipa [193], u smislu manje učestalosti homozigota 1 i povećane homozigota 2 u našoj populaciji. G alel bio je prisutan u 69,4% ispitanika, što je manje nego u opštoj beloj populaciji. Analizom ovog SNP-a u Srbiji bavilo se malo istraživanja i to uglavnom u vezi sa hematološkim i dermatološkim problemima. U ovim istraživanjima u kontrolnoj grupi AA genotip bio je prisutan od 0-10% [273, 274, 275, 276]. S obzirom da su kontrolne grupe u ovim istraživanjima bili dobrovoljni davaoci krvi, kojima se ne radi stomatološki pregled, sa ovim rezultatima bismo mogli porediti rezultate naše dve grupe sistemski zdravih ispitanika. Zastupljenost GG genotipa zbirno u ZK i PD grupi zajedno je 46,1%, GA genotipa 42,6%, dok je AA genotip na našem uzorku bio prisutan kod čak 11,3% ispitanika, što predstavlja veću učestalost ređeg, AA genotipa. Distribucija ispitivanih genotipova na našem uzorku nije se razlikovala među grupama, što je u saglasnosti sa studijama iz okolnih zemalja [211, 215, 277]. Međutim, ove studije su pokazale povećanu, iako ne statistički značajnu, učestalost GG genotipa u grupama obolelih od parodontopatije, sa iznenađujućim podatkom gde je OR=10,20 za GG kao rizični genotip za parodontopatiju. Na našem uzorku, ispitanici sa parodontopatijom pokazali su manje GG a više AA genotipa u odnosu na kontrolnu grupu. Zanimljiv podatak našeg istraživanja predstavlja to da je AA genotipa najviše bilo u ZK (čak 7%) a najmanje u T2D grupi (3,1%). Učestalost GG genotipa bila je podjednaka u ZK i T2D. Takođe, kada smo genotipove posmatrali dihotomno, odnosno kada smo hiperprodukujuće genotipove GA+AA spojili, dobili smo više hiperprodukujućeg genotipa na celom uzorku (62,2%) i u svakoj grupi ponaosob. Kada poredimo naše rezultate sa studijama na evropskoj populaciji koje su se bavile parodontopatijom i/ili dijabetesom, dobijamo da u kontrolnoj grupi ima više AA, a manje GG genotipova, dok u T2D grupi ima više GA [210]. Poredeći sa rezultatima istraživanja ovog SNP kod čeških ispitanika sa parodontopatijom [211], vidimo da naš uzorak pokazuje znatno više hiperprodukujućih (GA i AA) genotipova u ZK i PD grupi, a mnogo manje GG protektivnog genotipa. Ne postoje studije koje su se bavile proučavanjem ovog polimorfizma kod ispitanika sa T2D i parodontopatijom na evropskoj populaciji. Na ispitanicima u Kini, nije uočena razlika u distribuciji

DISKUSIJA

genotipova među grupama, ali je uočena razlika u učestalosti alela između sve tri grupe (učestalost A alela: T2D grupa=0,32, PD grupa=0,15, ZK grupa=0,05) [219], što je suprotno od frekvence ovog alela u našem uzorku. Na ispitanicima iz Indije, razlika u prisustvu genotipova uočena je između kontrola i druge dve grupe pacijenata [220]. Primenom univarijantnog regresionog modela nismo našli asocijaciju između ovog polimorfizma i nastanka parodontopatije ili parodontopatije i dijabetesa zajedno. Pri poređenju PD i T2D grupe, kao statistički značajan zavisni prediktor razlike pojave ova dva oboljenja sa protektivnim efektom izdvojio se pomenuti AA genotip (OR=0,173). Čak i pri daljim analizama u multivarijantnom regresionom modelu, AA genotip se izdvojio kao nezavisni prediktor razlike za nastanak T2D i PD u odnosu na sistemski zdrave ispitanike sa parodontopatijom. Logističkim regresionom modelom nijedan genotip niti alel nisu se pokazali statistički značajni nosioci rizika za parodontopatiju niti oba oboljenja zajedno. Takođe, slično univarijantnom modelu, pri poređenju PD i T2D grupe, visoko protektivan efekat pokazao je AA genotip (približno 5x manji rizik) i manje A alel (približno 2x manji rizik) za oboljevanje od tipa 2 dijabetesa i parodontopatije u odnosu na ispitanike sa parodontopatijom. Još jedan rezultat koji govori o „neobičnom“ odnosu genotipova TNF α sa dijabetesom, je taj da je glikoregulacija kod nosilaca GG genotipa bila lošija nego kod nosilaca GA+AA genotipa u okviru T2D grupe, što je identično studiji Al-Azzam i sar [278]. Takođe, naši „neobični“ rezultati uticaja -308G/A TNF α na T2D mogli bi donekle biti u saglasnosti sa ovom studijom. U saglasnosti sa ovim rezultatima je i rezultati neznatno povećanih koncentracija TNF α kod nosilaca GG genotipa u T2D grupi. Ovakvi rezultati bi se slobodnije mogli tumačiti kao razlika u genskoj osnovi parodontopatije i dijabetesa, sa aspekta -308G/A TNF α polimorfizma. Takođe, mogli bismo tumačiti da kod ispitanika sa dijabetesom, promene na parodoncijumu su pre posledica patoloških promena osnovnog oboljenja (pojačana inflamacija, AGE-RAGE sistem, hiperglikemija...) nego same genske osnove. S obzirom da je ovaj genotip/alel povezan sa povećanom produkcijom samog TNF α , sudeći po našim ispitanicima moglo bi se reći da hiperprodukcija ovog citokina nije ključna u patogenezi ova dva oboljenja zajedno. Najzastupljeniji genotip za polimorfizam +252A/G LT α bio je AA sa 51,7%, zatim AG sa 28,3% i GG sa 20% u celokupnom uzorku. U odnosu na druga istraživanja koja su određivala učestalost ovih genotipova u zdravim kontrolama (dobrovoljni davaoci krvi)

DISKUSIJA

u Srbiji pokazali smo veću zastupljenost GG genotipa (19,1% naših spram 0% u drugim studijama), a manju AG genotipa (29,6% u našoj studiji naspram 47,05% u drugim studijama) na našim sistemski zdravim ispitanicima [274]. Nismo našli razliku u distribuciji genotipova između posmatranih grupa. Studija u Japanu nije našla povezanost ovog polimorfizma sa stepenom parodontopatije kod ispitanika sa T2D [187]. Dve studije koje su ispitivale ovaj polimorfizam na evropskoj populaciji kod ispitanika sa parodontopatijom, našle su razliku u distribuciji ovih varijacija [163, 211, 232]. U našoj studiji G alela bilo je više u grupama obolelih, kao i u već pomenutoj studiji na ispitanicima iz Srbije za maligna hematološka oboljenja [274]. Univarijantnim regresionim modelom AA genotip pokazao se kao zavisni prediktor smanjenog rizika (OR=0,383) za nastanak parodontopatije u našoj studiji, dok se u ovom modelu AG genotip (OR=2,74) pokazao kao zavisni prediktor povećanog rizika. Ovaj trend odnosa genotipova i rizika za oboljevanje zadržan je i pri ispitivanju ZK-T2D grupa, s tim da odnosi nisu bili statistički značajni. Logističkom regresijom su AG genotip (OR=3,28) i G alel (OR=1,82) pokazani kao nosioci većeg rizika za nastanak parodontopatije, što je u suprotnosti sa pomenutom češkom studijom (protektivan efekat G alela) [211], ali u saglasnosti sa istraživanjem sprovedenim na belcima u Brazilu [233], kod kojih je G alel definisan kao rizičan (OR=2,67). Takođe, ovi rezultati su u saglasnosti sa dokazima da je +252 G alel povezan sa povećanom produkcijom kako $LT\alpha$ [222] tako i $TNF\alpha$ [225]. Kao i u univarijantnom modelu, odnosi ostaju isti ali bez statističke značajnosti pri poređenju ZK-T2D grupa, dok pri poređenju PD-T2D grupa dobijamo statistički značajne ali obrnute odnose (protektivan efekat AG i GG genotipa, i G alela za nastanak parodontopatije i dijabetesa u odnosu na ispitanike sa parodontopatijom). Slobodnijom interpretacijom rezultata sa aspekta +252A/G $LT\alpha$ polimorfizma, moglo bi se reći da je genska podložnost slična za nastanak parodontopatije i parodontopatije i dijabetesa zajedno. Međutim, kada posmatramo dve grupe obolelih, uočavamo da su polimorfizmi rizični za parodontopatiju, protektivni za oba oboljenja. S obzirom da su relativni rizici veći pri poređenju ZK-PD nego ZK-T2D grupe, te da statistička značajnost postoji pri poređenju ZK-PD i PD-T2D grupa, ovo bi se eventualno moglo tumačiti kao veći uticaj rizika ovog polimorfizma na nastanak parodontopatije, nego na nastanak dijabetesa.

Na celokupnom uzorku AA genotip +36A/G $TNFR_1$ polimorfizma bio je prisutan kod 32,2% ispitanika, AG kod 55,0%, a GG kod 12,8% ispitanika. Frekvenca A alela bila je

DISKUSIJA

0,597, a G alela 0,403. Jedna studija izučavala je ovaj polimorfizam na ispitanicima iz Srbije, ispitujući rizik za oboljevanje od karcinoma glave i vrata. Takođe, ni ova studija nije uzela u obzir parodontološki status ispitanika, pa sa ovim rezultatima poredimo učestalost genotipova naše dve grupe sistemski zdravih ispitanika (PD+ZK grupa naših ispitanika: AA genotip- 32,2%, AG-53,9% i GG genotip- 13,9%). U pomenutoj studiji AA genotip bio je prisutan kod 35,0%, AG kod 52,0% a GG genotip kod 13,03% ispitanika [276], što je gotovo identična raspodela kao u našoj studiji. Još dva istraživanja na evropskoj populaciji dala su slične distribucije našim na sistemski zdravim ispitanicima bez uzimanja u obzir stanja usne duplje (AA genotip- 37,8% odnosno 34,35%, AG- 42,9% odnosno 51,90% i GG genotip 19,3% odnosno 13,74%) [279, 280]. U univarijantom regresionom modelu, nijedan genotip se nije pokazao kao statistički značajan zavisni prediktor nastanka parodontopatije ili parodontopatije i dijabetesa zajedno, pri poređenju sa grupom zdravih kontrola. Ipak, vredni pomenuti da je odnos rizika AA genotipa bio različit- protektivan za T2D, a za PD grupu rizičan. Ovo se dopunjuje sa našim rezultatima višestruke linearne regresione analize u kojima smo određivali varijable koje mogu nezavisno opisati deo varijanse za parametre DS i NPE u okviru obe grupe ispitanika sa parodontopatijom. Pokazali smo da samo kod sistemski zdravih ispitanika sa PD, AA genotip učestvuje kao nezavisni faktor predikcije dubine sondiranja (8,9%) i nivoa pripojnog epitela (5,9%). U grupi PD, PISA parametar takođe je značajno bio veći kod nosilaca AA genotipa. Ovaj genotip nije se izdvojio kao faktor koji određuje pomenute kliničke parametre u grupi ispitanika sa dijabetesom. Protektivan i statistički značajan efekat pokazuje AA genotip pri poređenju PD i T2D grupe. Pri logističkim regresionim analizama, nijedan genotip se nije izdvojio kao statistički značajan nosilac rizika. Drugim rečima, klinički parodontološki parametri u dijabetesu pre su posledica poremećenog i pojačanog imunološkog odgovora (PI opisuje sa 11,28% nivo pripojnog epitela, a BOP sa 6,7% dubinu sondiranja u ovoj grupi) na etiološke faktore parodontopatije, nego genske predispozicije. Ovaj polimorfizam je sinonimni, pa njegov uticaj na oboljenja leži u eventualnoj neravnoteži povezanosti sa drugim polimorfizmima ovog lokusa koji mogu imati direktan funkcionalni uticaj na receptor.

Učestalost TT genotipa +676T/G TNFR₂ polimorfizma bila je 60,6%, TG genotipa 33,9% a GG genotipa 5,6% na celokupnom uzorku ispitanika. U grupama sistemski

DISKUSIJA

zdravih ispitanika (PD+T2D) TT genotip bi je prisutan kod 59,1%, TG kod 33,9%, a GG genotip kod 7,0% ispitanika. Učestalost ovog SNP-a na populaciji u Srbiji rađena je na sistemski zdravim ispitanicima bez uvida u zdravlje oralnih tkiva i iznosila 53% za TT genotip, 42% za TG i 5,0% za GG genotip [276], što je slična distribucija našim rezultatima. Naša distribucija genotipova i nepostojanje razlike u frekvenci genotipova i alela između sistemski zdravih i ispitanika sa dijabetesom je u saglasnosti sa istraživanjem na španskoj populaciji [281]. Univarijantnim regresionim modelom TT genotip pokazao je statistički signifikantan rizičan efekat (OR=2,30) za nastanak parodontopatije. Kao što je pomenuto u uvodnom poglavlju, ne postoje studije koje su proučavale ovaj polimorfizam kod ispitanika sa parodontopatijom. Ovim statističkim modelom iako statistički neznatna, odnos ovog genotipa ostaje isti za oboljevanje od PD i T2D zajedno, dok TG i GG genotipovi pokazuju protektivni efekat za obe grupe ispitanika. Suprotan odnos rizika za TT i TG genotip uočava se pri poređenju ispitanika sa parodontopatijom u odnosu na ispitanike sa dijabetesom i parodontopatijom. Logističkom regresijom nosioci TG genotipa, ili bar jednog G alela (TG+GG genotip i G alel) pokazali su se kao statistički značajni protektivni faktori za nastanak parodontopatije. Nesignifikantan, ali identičan odnos rizika i genotipova zapaža se i za obolele od oba oboljenja. Pri analizi PD spram T2D grupe, samo se TG genotip izdvojio kao rizik za oboljevanje od parodontopatije i dijabetesa u odnosu na parodontološke ispitanike. Ovi rezultati bi se mogli tumačiti da sa aspekta +676 T/G TNFR₂ polimorfizma, parodontopatija i parodontopatija i dijabetes imaju sličnu gensku osnovu.

Iako je prisustvo subgingivalnog biofilma neophodno za inicijaciju i progresiju parodontopatije, količina i sastav biofilma ne koreliraju uvek sa stepenom i aktivnošću oboljenja. Ova diskrepanca između etioloških faktora i postojanja odnosno progresije oboljenja objašnjena je različitom podložnošću organizma za oboljevanje. Različita podložnost oboljevanju od parodontopatije još uvek je vrlo nerazjašnjena tema, i smatra se da bi određeni polimorfizmi, odnosno njihove kombinacije mogle objasniti ovu pojavu. Pri analizi i interpretaciji rezultata polimorfizama, treba biti vrlo oprezan. Jedna od stvari na koju treba obratiti pažnju je tzv. „populaciona privatnost“ određenih polimorfizama, odnosno činjenica da se zastupljenost i uloga polimorfizama razlikuje od populacije do populacije. S druge strane, ne smemo genske varijacije posmatrati kao

DISKUSIJA

jedini faktor u patogenezi oboljenja, mora se obratiti pažnja i na bihevioralne i faktore sredine, što još više pojačava mogućnost uticaja etničke pripadnosti na patogenezu oboljenja (različite populacije često podrazumveaju različite faktore sredine ali i različite životne navike). Ispitanici u našoj studiji bili su poreklom iz Srbije, i ovo je prva studija koja je na ovoj populaciji ispitivala pomenuta četiri polimorfizma u genima funkcionalno povezanih proteinskih produkata, a još smo u obzir uzeli i stanje usne duplje ispitanike. Većina studija koja se ne bavi striktno proučavanjem patoloških stanja u usnoj duplji, pri selektovanju ispitanika kontrolne grupe, kao kriterijum isključenja ne navodi hronične/akutne infekcije usne duplje, ili prisustvo nekih autoimunih oboljenja koja se ponekad manifestuju samo u usnoj dupolji (lichen planus npr.). Detaljnim pregledom usne duplje, isključili smo i mogućnost postojanja ovih dodatnih komorbiditeta koji mogu biti povezani sa polimorfizmima.

Takođe, tumačenje polimorfizama i uopšte problemi poligenih oboljenja je potencijalno sinergističko delovanje stotina/hiljada polimorfizama i interakcije ovih polimorfizama sa pomenutim faktorima sredine, životnim navikama koji se često razlikuju i u okviru homogenih grupa. Tako da pri analizi ovih varijacija treba voditi računa o potencijalnim specifičnim kombinacijama funkcionalnih polimorfizama, evaluaciji funkcionalnih posledica SNP-ova, postojanju neravnoteže povezanosti (LD), kao i mogućeg uplitanja epigenetskih varijacija (metilacije, acetilacije histona) [190]. Naša grupa ispitanika iako iste nacionalnosti, usklađena po polu, godinama, osnovnoj podeli pušačkog statusa pokazala je (kao što je već prodiskutovano) razlike u drugim bitnim faktorima (stepen obrazivanja, stres, fizička aktivnost) koji mogu biti od uticaja na oba ispitivana oboljenja. U svakom slučaju, bez obzira na šarolikost rezultata povezanosti polimorfizama sa oboljenjima, pa i parodontopatijom i tipom 2 dijabetesa, nepobitna je činjenica da polimorfizmi imaju bitnu ulogu u orkestraciji imunog sistema, dovodeći do različitih ishoda i tokova oboljenja. Citokini su ti koji održavaju balans između unutrašnjih i spoljašnjih faktora domaćina.

Iako su rezultati asocijacije polimorfizama $TNF\alpha$ inkonzistenti [211, 215, 216], činjenica je da je visoka lokalna produkcija TNF prisutna u parodontopatiji i dijabetesu. S obzirom da je dokazan uticaj +252LT $TNF\alpha$ na nivo sinteze $TNF\alpha$, i da regulaciju biodostupnosti ovog citokina regulišu i solubilne forme njegovih receptora, bilo je zanimljivo ispitati polimorfizme za sve ove molekule. Takođe, dokazana je i uloga

DISKUSIJA

svakog ovog molekula ili polimorfizma (+252 LT α) u patogenezi i parodontopatije i dijabetesa [151, 154, 155, 164, 165, 166]. Jedno od potencijalnih objašnjenja šarolikosti rezultata za polimorfizme na genima za TNF α i LT α je i njihova lokacija na regionu sa najgušćim rasporedom gena koji su inače povezani sa kontrolom imunološkog sistema a često su i u neravnoteži povezanosti (LD) sa mnogobrojnim polimorfizmima ovog regiona. U našoj studiji -308G/A TNF α i +252A/G LT α polimorfizmi nisu pokazali značajnu neravnotežu povezanosti. Jedina studija koja je u našoj populaciji ispitivala ovu povezanost radila je to na dve subpopulacije hematoloških pacijenta. Na jednoj subpopulaciji dobijena je stastitički značajna vrednost LD-a [274]. U većini radova, LD između ova dva polimorfizma postoji [282], ali treba naglasiti da naše rezultate treba uzeti sa rezervom, s obzirom da polimorfizam +252A/G LT α nije u Hardi-Vajnbergovom ekvilibrijumu.

Bez obzira na visoku prevalencu parodontopatije kod ispitanika sa dijabetesom, veoma limitiran broj studija se bavio uopšte povezivanjem polimorfizama odnosno genetskim markerima kod ispitanika sa oba oboljenja [187, 219, 283, 284, 285]. Ovakva istraživanja su bitna da utvrde podložnost jednom ili oba oboljenja, kao i da eventualno pronađu zajedničku gensku osnovu za oba oboljenja ili objasne dvosmernu vezu parodontopatije i dijabetesa. Definisanje određenih genotipova/alela kao rizičnih doprinelo bi personalizovanoj medicini, koja bi mogla odrediti preventivne, profilaktičke i rane terapijske mere ispitanicima nosiocima određenih rizičnih (kombinacija) genotipova. Genska osnova je jednog ili više oboljenja je bitna i sa aspekta načina i doziranja nekih vidova terapije ovih oboljenja. Naime, antiTNF medikamenti se već primenjuju u terapiji nekih oboljenja. Ono što je sigurno je da ovi lekovi nose sa sobom određene neželjene efekte, ali i da ne reaguju svi oboleli podjednako na terapiju. Faktori koji se ispituju kao potencijalni modifikatori odgovora na ovu terapiju su baš polimorfizmi citokina/receptora TNF sistema. U nedostatku mogućnosti primene personalizovane medicine, određivanje genetskih profila za određeno oboljenje/više istovremeno pristunih oboljenja i primena terapije prilagođene genskoj osnovi karakterističnoj za dato oboljenje/kombinaciju oboljenja mogla bi biti od pomoći. Zato je bitno ispitati da li pacijenti sa jednim oboljenjem nose iste polimorfizme kao i pacijenti sa kombinacijom više oboljenja, da bi se eventualno usmerila primena terapije sa relativno predividom reakcijom i ishodom lečenja.

DISKUSIJA

Poznato je da ispitanici sa dijabetesom imaju poremećen koštani metabolizam i zarastanje i da je TNF α jedan od ključnih medijatora zadužen za ove patološke procese. Takođe, TNF α je kao što je već pomenuto i medijator koji objašnjava dvosmernu vezu parodontopatije i dijabetesa. Zbog svega navedenog, u izučavanju genskih markera ova dva oboljenja, dobro je krenuti od TNF α i molekula koji takođe utiču na njega.

Takođe, s obzirom da je poremećen nivo izučavanih citokina/receptora povezan sa parodontopatijom i/ili dijabetesom [152, 170, 171, 281] osim uticaja genskih varijacija, izučavali smo i sistemske nivoe citokina. Na ovaj način pokušali smo da povežemo uticaj datih oboljenja na nivo pomenutih molekula ali uzevši u obzir i ideo genske osnove na njihovu sekreciju/funkciju. Pokušali smo da definišemo uticaj svih anamnestički podataka, genskih varijacija kao i uticaja inflamacije iz parodontijuma na serumski nivo citokina/receptora. Idealno za donošenje zaključaka o povezanosti koncentracije citokina iz inflamiranog parodontijuma na sistemski nivo ovih supstanci, bilo bi i određivanje koncentracija lokalno sintetisanih parodontalnih citokina. Iz tehničkih razloga, ove lokalne koncentracije nisu određivane, a serumske koncentracije su merene na poduzorku od 85 ispitanika.

Međugrupno poređenje pokazalo je da nije nađena statistički značajna razlika u serumskim koncentracijama TNF α , LT α i TNFR $_2$. Iako statistički neznačajan, odnos koncentracija TNF α i LT α među grupama je naizgled neuobičajen. Naime, najveću koncentraciju ovih citokina pokazuju ispitanici ZK, zatim PD i na kraju T2D grupe. Ove razlike bi se delom mogle tumačiti bihejvioralnim i genskim karakteristikama grupa. Iako smo naglasili da podatke o stresu kao faktoru koji utiče na kliničke i biohemijske parametre koje pratimo treba uzeti sa velikom rezervom, rezultati su pokazali najveći stres u grupi ZK, zatim PD i na kraju T2D grupi. Grupe se razlikuju i po intenzitetu fizičkog vežbanja, u korist ZK grupe. Učestalost genotipova za -308G/A TNF α polimorfizam nije se statistički značajno razlikovala među grupama, ali se zapaža da je AA genotipa najviše u PD grupi (15,5%) a najmanje u T2D grupi (3,1%). Takođe, i pri podeli genotipova ovog polimorfizma na hipersekretore (GA+AA), dobili smo da najviše ovog genotipa ima u PD, a zatim podjednako u ostale dve grupe. Ovaj odnos postaje još zanimljiviji kada se dodaju podaci da, iako statistički nesignifikantno, u okviru T2D grupe, hipersekretori (GA+AA) pokazuju manju koncentraciju ovog citokina u odnosu na GG genotip, odnosno da u grupi T2D na sekreciju TNF α više utiču

DISKUSIJA

neki drugi nego genski faktori. Najveću frekvencu G alela pokazala je PD, zatim T2D i na kraju ZK grupa. Takođe, merili smo i uticaj inflamacije iz parodontijuma na sistemsku inflamaciju, korišćenjem standardnih kliničkih parametara DS i NPE, ali i parametara koji realnije kvantifikuju ovaj uticaj- PESA i PISA. U okviru T2D grupe, korelacija serumske koncentracije TNF α i LT α i pomenutih kliničkih parametara je signifikantna i jaka/osrednja (TNF α -PESA, $r=0,819$; LT α -PESA, $r=0,682$; TNF α -PISA, $r=0,554$; LT α -PISA, $r=0,778$). Ove korelacije u okviru PD grupe su takođe pozitivne, ali slabije i statistički nesignifikantne. Ipak, treba naglasiti da postoji značajna razlika PESA i PISA parametara u korist PD u odnosu na T2D grupu, što može biti još jedan faktor koji obajšnjava zanemarljivo manju koncentraciju ovih inflamatornih citokina u T2D grupi. Rezultati višestruke linearne regresije nisu odredili nijedan posmatrani faktor kao nezavisni prediktor koji jedinstveno opisuje neki deo varijanse serumskih koncentracija TNF α i LT α . Rezultati nepostojanja povezanosti +252A/G LT α polimorfizma sa koncentracijom LT α u saglasnosti su sa drugim studijama. Ipak, ove studije su našle povezanost kombinacije ovog i rs 1041981 polimorfizma sa koncentracijom LT α [163, 222], tako da se kao slabost naše studije može smatrati relativno mali broj ispitivanih polimorfizama.

Serumski citokini uglavnom se nalaze u vezanom stanju za proteine nosače, autoantitela ili solubilne forme receptora. Slobodne forme se nalaze u niskim koncentracijama i ako na ovo dodamo veoma kratak poluživot TNF α , jasno je da određivanje koncentracije ovih citokina nije preterano informativno. Određivanje solubilnih formi receptora, čije su koncentracije stabilnije i pod genskom kontrolom, pouzdanija je metoda i korisna za kvantifikaciju imunološkog odgovora [99, 286].

Serumska koncentracija sTNFR $_1$ statistički se značajno razlikovala među grupama, odnosno bila je povećana u T2D grupi u odnosu na ostale dve grupe. U grupama ZK i PD bila je gotovo izjednačena. Razlike u serumskim koncentracijama TNFR $_2$ nisu dozele statističku značajnost, ali je najveću koncentraciju pokazala ZK, dok je koncentracija gotovo izjednačena u grupama obolelih. Još bolji pokazatelj biološke aktivnosti receptora je odnos TNFR $_2$ /TNFR $_1$ (R_2/R_1), odnos koji je stabilan u toku vremena i kada koncentracije samih citokina variraju [128]. Ovaj odnos može biti dobar prediktor podložnosti i napredovanja inflamatornog procesa [171]. Razlike u ovom

DISKUSIJA

odnosu među grupama nisu bile statistički značajne, ali najveću vrednost R_2/R_1 odnosa pokazala je PD, zatim ZK i na kraju T2D grupa.

Danas je dobro poznato da podela funkcija ova dva receptora nije tako jednostavna i da im se uloge delom preklapaju. Studije na genetski gojaznim miševima pokazuju da je TNFR₁ glavni medijator TNF α posredovane IR, ali da TNFR₂ može da pojača ovaj efekat [151]. Takođe, dokazana je inverzna korelacija nivoa sistemskih citokina sa insulinskom osetljivošću [153]. S druge strane, neke studije su pokazale da insulinemija kao odgovor na akutnu hiperglikemiju korelira i određena je solubilnom formom TNFR₁. Zaključci ovih studija govore da je uloga sTNFR₁ kompeticija sa tm receptorom i da je porast TNFR₁ pokušaj prevencije destruktivnog efekta samog TNF α na β -ćelije pankreasa [286]. U našoj studiji, povećana koncentracija ovog solubilnog receptora u skladu je sa njegovim prethodno opisanim ulogama u dijabetesu. Kada posmatramo druge parametre koji mogu uticati na sintezu molekula TNF sistema, zapaža se značajna korelacija ($\rho=0,441$) ITM sa sTNFR₁ na nivou celog uzorka. Iako je posmatrani polimorfizam +36A/G TNFR1 sinonimni, odnosno zvanično nema biološki efekat na sintezu proteina, neke studije su pokušale da povežu ovaj SNP sa sTNFR₁ [287]. U našoj studiji kada smo dihotomno podelili ovaj SNP (AA vs AA+AG), u okviru svakog genotipa ponaosob, koncentracija u T2D grupi je bila veća nego u druge dve grupe, identično odnosu na celokupnom uzorku. U višestrukoj linearnoj regresionoj analizi, gde smo posmatrali više nezavisnih parametara u predikciji varijanse koncentracije TNFR₁, samo se varijabla prisustvo dijabetesa izdvojila kao statistički značajan nezavisni faktor koji jedinstveno predviđa 10,37% ove koncentracije. U patogenezi parodontopatije, TNFR₁ ima ulogu u povećanju ekspresije matriksnih metaloproteinaza [164], stimulaciji athezije polimorfonukleara, limfocita i makrofaga u endotelnim ćelijama [161], kao i osteoklastogenezi i inhibiciji osteoblastogeneze [174]. U našoj studiji je koncentracija TNFR₁ u PD i ZK grupi gotovo izjednačena. Mali broj studija se bavio proučavanjem povezanosti parodontalnog statusa i sTNFR₁ i nisu našli razliku u sTNFR₁ između ispitanika sa PD i kontrola, kao ni razliku u koncentracijama sTNFR₁ nakon kauzalne faze terapije parodontopatije [170, 171]. Ipak, ove studije su povezale povećanje lokalne produkcije TNFR₁ sa DS, kao i njegovo smanjenje nakon kauzalne faze terapije. Naši rezultati, kao i rezultati ovih studija mogli bi dovesti do zaključka da lokalna produkcija TNFR₁ u parodontopatiji nije dovoljna da izazove

DISKUSIJA

značajno povećanje sistemskog nivoa ovog receptora. Naravno, za ovakav zaključak morali bismo uraditi i lokalno merenje količine citokina. Treba pomenuti da je u grupi ispitanika sa parodontopatijom, uočena osrednja ($r=0,337$) korelacija parametra destrukcije parodontijuma sa sTNFR₁. S obzirom da je korelacija sa relevantnijim parametrima uticaja parodontalnog zapaljenja (PISA i PESA) na sistemsku inflamaciju nesigifikantna i veoma slaba u obe grupe ispitanika ($r=0,031-0,169$), uticaj lokalne inflamacije ne možemo potvrditi samo jednom sigifikantom korelacijom. S obzirom da kod pacijenata sa dijabetesom povećana koncentracija proinflamatornih citokina može dovesti do pogoršanja već postojeće parodontopatije različitim mehanizmima, kao što su stimulacija gingivalnih fibroblasta da sekretuje MMP [61] ili stimulacijom osteoklastogeneze [62], u našoj grupi ne treba zanemariti uticaj povećane koncentracije sTNFR₁ na parodontalna tkiva. Kao što je pomenuto, uloga TNFR₂ u patogenezi parodontopatije je definisana kao protektivna, sa efektima modulacije zapaljenja posredovanog TNF α i ublažavanjem gubitka kosti [162]. Pokazano je da Etanercept, solubilni agonist TNFR₂ ima pozitivne efekte na parodontopatiju kako na animalnom modelu [165], tako i na ljudima pri terapiji drugih oboljenja [288]. Kao što je već pomenuto, nije nađen uticaj povećane produkcije TNFR₂ u inflamiranom parodontijumu na povećan sistemski nivo ovog citokina [170, 171]. U našoj studiji, iako nismo našli razliku koncentracija između pomenutih grupa, nađene su statistički značajne korelacije kliničkih parodontoloških parametara i koncentracije ovog receptora u grupama sa dijagnostikovanom parodontopatijom. U PD grupi, statistički sigifikantna, negativna i osrednja korelacija ($r=0,450$) nađena je između parametara sTNFR₂ i DS. S druge strane, pomenute korelacije u okviru T2D grupe su pozitivne, ali je jedina značajna između faktora DS ($r=0,377$). Isti odnos korelacija zapaža se i između R₂/R₁ odnosa i kliničkih parametara u obe grupe. Ovaj negativan odnos u PD grupi može se smatrati da je u saglasnosti sa opštim stavom da je uloga ovog receptora protektivna za tkiva, odnosno da je smanjenje ovog receptora sa povećanjem kliničkih parodontoloških parametara neuspeh organizma da se zaštiti od destrukcije parodontijuma. Takođe, u višestrukim linearnim regresionim analizama, PISA i PESA faktori su se izdvojili kao jedini koji nezavisno opisuju varijabilitet sTNFR₂, ali sa negativnim koeficijentom β , odnosno vrednosti parametara su u negativnoj linearnoj korelaciji sa koncentracijom sTNFR₂. S druge strane, svi ovi odnosi su u T2D grupi

DISKUSIJA

pozitivni, odnosno moglo bi se zaključiti da u ovoj grupi dominira uticaj poremećene sinteze citokina (pojačana sinteza) u dijabetesu nad uticajima povezanosti inflamiranog parodontijuma i sTNFR. Uloga TNFR₂ u dijabetesu je oprečna. Dokazane su inverzne korelacije koncentracije oba citokina sa insulinskom osetljivošću [153], kao i povezanost bubrežnih komplikacija ispitanika sa dijabetesom i sTNFR₂ [281]. S druge strane, terapija Etanerceptom, agonistom TNFR₂, pokazuje šarolike efekte na glikoregulaciju i insulinsku osetljivost T2D ispitanika [289, 290], a neki prikazi slučajeva opisuju čak razvoj tipa 1 dijabetesa pri terapiji ovim lekom ispitanika sa već postojećim reumatoidnim artritismom. U našoj studiji, odnos R₂/R₁ bio je najmanji u grupi ispitanika sa dijabetesom, kao posledica velikih koncentracija sTNFR₁ u ovoj grupi. U našoj studiji, iako je korelacija ova dva receptora pozitivna, porast sTNFR₁ nije praćen porastom sTNFR₂ u okviru T2D grupe. Iako ne značajno, koncentracija TNFR₂ bila je najveća u grupi zdravih kontrola, što bi moglo biti objašnjeno stimulativnim efektom TNF α odnosno LT α na oslobađanje sTNFR₂. S obzirom da je poznato da sTNFR₂ neutrališe višak TNF α , ovaj porast predstavlja zaštitini mehanizam. Višestrukim regresionim modelima nismo dobili da je nivo serumske koncentracije posmatranih molekula parametra pod uticajem genskih varijacija.

Bitno je naglasiti da koncentracije ovih citokina, a naročito receptora ne možemo posmatrati isključivo kroz prenos „dobrih“ ili „loših“ signala. Kada se diskutuje o ulogama TNF α obično se pominju samo njegove uloge u patogenezi oboljenja. Ne treba zaboraviti da je ovaj citokin ključan za regulisanje imunološkog odgovora- pokretanje urođenog i stečenog imuniteta sa ciljem borbe protiv infekcije [137], kao i za formiranje limfnih organa. Najnovija istraživanja pokazuju i korisne uloge niskih koncentracija ovog citokina na procese osteoblastogeneze [181, 182, 183]. Isto tako, već je pomenuto da uloga receptora nije samo prosta transdukcija signala, već i regulacija biodostupnosti TNF α . Tako, TNF α indukuje značajnu ushodnu regulaciju iRNK TNFR₂ [291], što dovodi do pojačanog oslobađanja solubilne iz transmembranske forme receptora. Ovaj sTNFR₂ dalje u visokim koncentracijama negativnom povratnom spregom neutrališe sam TNF α , dok ga u niskim koncentracijama prezervira (nosač je za TNF α) i pojačava dugotrajne efekte ovog citokina [292]. Tako da se koncentracija sTNFR₂ često posmatra kao surogat marker za merenje aktivnosti samog TNF α . S druge strane, ako se govori o samom prenosu signala, odnosno efektu receptora treba napomenuti da se tu ne

DISKUSIJA

posmatraju samo transmembranske forme receptora, s obzirom da je dokazano da se određeni signali prenose i u procesu internalizacije receptora, procesa koji je ranije smatran pasivnim procesom „reciklaže“ ili uništavanja receptora. Pri internalizaciji TNFR₁ dolazi do aktivacije apoptotskih signala, dok se ovi signali samo delom aktiviraju pri „reciklaži“ TNFR₂. Još jedna činjenica sa aspekta prenosa signala ovog sistema koja doprinosi njegovoj kompleksnosti je to da tmTNF α , osim uloge liganda, ima ulogu i receptora, s tim da na različitim ćelijama pokazuje stimulatorne odnosno inhibitorne funkcije. Takođe, serumske koncentracije TNFR₁ ne mogu se posmatrati samo kao posledica oslobađanja solubilnih od transmembranskih formi receptora, s obzirom da je dokazano oslobađanje već gotovih formi sTNFR₁ egzocitozom [126]. Smatra se i da regulacija sinteze citokina u različitim ćelijama može biti različita pod dejstvom istih stimulusa.

U studiji smo pratili i međusobni odnos koncentracija citokina odnosno receptora. Na nivou svih posmatranih ispitanika, međusobne korelacije su pozitivne, ali je jedina značajna LT α -TNFR₁ ($r=0,734$). Pozitivan odnos između svih posmatranih molekula zapaža se i u grupi ZK, ali je jedini značajan odnos LT α -TNFR₂ ($r=0,781$). I u PD grupi je jedini signifikantan odnos LT α -TNFR₂ ($r=0,627$). U T2D grupi, LT α -TNFR₂ je takođe značajan ($r=0,750$), ali je ovde značajna i R₁/R₂ korelacija ($r=0,494$). Iako je poznato da TNF α dovodi do povećanja iTNFR₂ [291], u našoj studiji postoji jaka korelacija ovog receptora sa LT α u svim grupama. Ovaj naizgled neuobičajen odnos postaje jasniji ukoliko se posmatraju sledeće činjenice: LT α vezuje se istim afinitetom za oba receptora [118], dok se za TNFR₂ vezuje skoro samo tmTNF α forma. S obzirom da smo mi u našem eksperimentu određivali koncentraciju sTNF α , razlog ove korelacije postaje jasan. Takođe, faktori sredine kao i polimorfizmi utiču na sintezu TNF α i LT α . Moglo bi se reći da je u ovom istraživanju LT α informativniji marker porasta i aktivnosti TNFR₂ od TNF α . Pri izučavanju uloge TNF porodice u patogenezi svih oboljenja uloga LT α zanemarena s obzirom da je do relativno skoro smatran suvišnim, a ne citokinom sa sopstvenim ulogama i signalnim putevima. Treba naglasiti da ovaj citokin ima određene uloge u patogenezi posmatranih oboljenja. Tako, porast serumskog LT α detektovan je kod velikog broja ispitanika sa dijabetesom [150], a dokazano je i da ovaj citokin u parodontalnim tkivima indukuje ekspresiju drugih proinflamatornih medijatora i stimuliše fagocitnu aktivnost [165].

DISKUSIJA

Ciljevi studija asocijacije su otkrivanje eventualnog uticaja polimorfizama na rizik od oboljevanja (od jednog ili više oboljenja). Ovakvi podaci olakšali bi preventivni, profilaktički ali i terapijski pristup u personalizovanoj medicini. Svi pomenuti nivoi kompleksnosti funkcije i prenosa signala TNF sistema, mnogobrojni faktori sredine, bihevioralni i genski faktori, od kojih smo pratili samo neke u našoj studiji, navode na činjenicu da je za donošenje zaključaka o uticaju polimorfizama i citokinske mreže u patogenezi posmatranih oboljenja, neophodno sprovesti još studija. Neophodne su animalne studije, studije na većim kohortama obolelih, kao i longitudinalne studije sa strogo kontrolisanim efektima bihevioralnih faktora (pušenje, stres, fizičko vežbanje). Takođe, pri ispitivanju uticaja polimorfizama na rizik od oboljevanja kao i sekreciju citokina, trebalo bi ispitivati veći broj polimorfizama i pratiti efekte kombinacije haplotipova. Pri ispitivanju uticaja inflamacije iz parodonticijuma na sistemski nivo citokina, dobro bi bilo odrediti koncentracije i lokalno i sistemski produkovanih citokina.

S obzirom da su istraživanja pokazala da odnos stanja parodontalnog džepa i sekrecije citokina nije jednostavan, već da na njega utiče individualni imuni odgovor domaćina, proteolitički enzimi u ćelijama, drugi inflamatorni medijatori [170], mi smo u našoj studiji pokušali odrediti ovaj uticaj uzevši u obzir veliki broj bihevioralnih faktora (pušenje, stres, fizička aktivnost, bruksizam,) u kombinaciji sa određenim genskim predispozicijama.

6.0.ZAKLJUČCI

- Genotip AA polimorfizma -308G/A TNF α ima 2,5 puta veći rizik da oboli od parodontopatije iako se ne dostiže statistička značajnost. Zanimljivo je da nosioci GG genotipa i alela G imaju veći rizik da istovremeno obole od PD i T2D u odnosu na sistemski zdrave ispitanike sa PD.
- Analiza polimorfizma +252A/G LT α pokazala je da nosioci G alela u heterozigotnom stanju (GA) imaju 3,3 puta veći rizik da obole od parodontopatije.
- Analiza asocijacije između +36A/G TNFR₁ polimorfizma i parodontopatije u kombinaciji sa dijabetesom pokazala je da genotip AA ima protektivan efekat, odnosno da približno 2 puta smanjuje rizik od parodontopatije i dijabetesa.
- +36A/G TNFR₁ polimorfizam povezan je sa kliničkim parametrima parodontopatije kod sistemski zdravih ispitanika: AA genotip nezavisni je prediktor koji jedinstveno predviđa varijansu dubine sondiranja kod sistemski zdravih ispitanika (9%) i nivoa pripojnog epitela (6%). PISA parameter značajno je veći kod ispitanika sa AA u odnosu na AG+GG genotip sistemski zdravih ispitanika.
- TT genotip +676T/G polimorfizma pokazao se kao genotip sa povećanim rizikom za nastanak parodontopatije, dok su se TG genotip i G alel pokazali kao protektivni (2,3 puta snižavaju rizik).
- Koncentracija TNF α , LT α i TNFR₂ nije se značajno razlikovala među grupama
- Koncentracija TNFR₁ statistički je značajno bila veća u T2D grupi.
- Koncentracija TNFR₂ i R₂/R₁ odnosi negativno koreliraju sa DS kod sistemski zdravih ispitanika sa parodontopatijom. Koncentracija TNFR₂ i R₂/R₁ odnos pozitivno koreliraju sa DS, PESA i PISA parametrima u T2D grupi. U višestrukom linearnom regresionom modelu, PESA i PISA parametri jedinstveno opisuju varijansu koncentracije sTNFR₂ sa negativnom korelacijom.
- Sinteza sTNFR₂ i korelacija sa kliničkim parodontološkim parametrima u dijabetesu su izmenjeni u odnosu na sistemski zdrave ispitanike.
- Koncentracije serumskih TNF α , LT α , TNFR₁, TNFR₂ nisu pod uticajem ispitivanih genskih varijacija

ZAKLJUČCI

- U parodontopatiji, klinički parodontološki parametri određeni su AA genotipom +36A/G TNFR₁, dok su kod ispitanika sa dijabetesom određeni parametrima higijene (PI, KNP). Ovo govori da se na našem uzorku parametri koji utiču na kliničku sliku parodontopatije razlikuju kod obolelih od dijabetesa (uloga higijene) u odnosu na sistemske zdrave ispitanike (genska i uloga higijene).
- Na razvoj parodontopatije kod obolelih od T2D genska predispozicija ima manji uticaj u odnosu na promene u parodontocijumu nastalih kao posledica osnovnog oboljenja.
- Statistički značajne korelacije su nađene između citokina i parodontoloških parametara, bez obzira što nije nađena razlika u koncentracijama citokina među grupama.
- Na našem uzorku ITM i KNP su nezavisni prediktori razlike oboljevanja od parodontopatije
- Dubina sondiranja jedini je nezavisni prediktor razlike oboljevanja od T2D i PD
- ITM, PI, NPE, AA genotip TNF α i AA genotip TNFR₁ polimorfizma su nezavisni prediktori nastanka parodontopatije i dijabetesa u odnosu na ispitanike sa parodontopatijom

7.0.LITERATURA

- [1] Pihlstrom, BL, Michalowicz, BS, Johnson, NW. Periodontal diseases. *The Lancet* 2005;366:1809-20.
- [2] Armitage, GC. Clinical evaluation of periodontal diseases. *Periodontology* 2000 1995;7:39-53.
- [3] Popović, V, Lukić, V, Perović, J, Đukanović, D, Gvezdenović Simović, V, Beloica, D, et al. Bolesti usta i zuba stanovništva. In: Univerzitet u Beogradu Sf, editor. 1987.
- [4] Pihlstrom, BL. Periodontal risk assessment, diagnosis and treatment planning. *Periodontology* 2000 2001;25:37-58.
- [5] Dewhirst, FE, Chen, T, Izard, J, Paster, BJ, Tanner, ACR, Yu, W-H, et al. The Human Oral Microbiome. *Journal of Bacteriology* 2010;192:5002-17.
- [6] 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 Microbiology and Immunology* 2009;24:506-9.
- [7] Järvensivu, A, Hietanen, J, Rautemaa, R, Sorsa, T, Richardson, M. Candida yeasts in chronic periodontitis tissues and subgingival microbial biofilms in vivo. *Oral Diseases* 2004;10:106-12.
- [8] Socransky, SS, Haffajee, AD. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontology* 2000 2002;28:12-55.
- [9] Marsh, P, Bradshaw, D. Dental plaque as a biofilm. *Journal of industrial microbiology* 1995;15:169-75.
- [10] Mahajan, A, Singh, B, Kashyap, D, Kumar, A, Mahajan, P. Interspecies communication and periodontal disease. *The Scientific World Journal* 2013;2013:
- [11] Schultz-Hautdt, S, Bruce, M, Bibby, B. Bacterial factors in nonspecific gingivitis. *Journal of dental research* 1954;33:454-8.
- [12] Socransky, S, Haffajee, A, Cugini, M, Smith, C, Kent, R. Microbial complexes in subgingival plaque. *Journal of clinical periodontology* 1998;25:134-44.

LITERATURA

- [13] Hajishengallis, G, Lamont, RJ. Beyond the red complex and into more complexity: the polymicrobial synergy and dysbiosis (PSD) model of periodontal disease etiology. *Molecular oral microbiology* 2012;27:409-19.
- [14] Johnson, GK, Slach, NA. Impact of tobacco use on periodontal status. *Journal of Dental Education* 2001;65:313-21.
- [15] Habashneh, RA, Azar, W, Shaweesh, A, Khader, Y. The relationship between body mass index and periodontitis among postmenopausal women. *Obesity Research & Clinical Practice*
- [16] Al-Zahrani, MS, Borawski, EA, Bissada, NF. Increased physical activity reduces prevalence of periodontitis. *Journal of Dentistry* 2005;33:703-10.
- [17] LeResche, L, Dworkin, SF. The role of stress in inflammatory disease, including periodontal disease: review of concepts and current findings. *Periodontology* 2000 2002;30:91-103.
- [18] Anand, V, Gulati, M. *Current Trends in Periodontics and Implant Dentistry*: Nova Science Publishers, Incorporated; 2013.
- [19] Timmerman, M, Abbas, F, Loos, B, Van der Weijden, G, Van Winkelhoff, A, Winkel, E, et al. Java project on periodontal diseases: the relationship between vitamin C and the severity of periodontitis. *Journal of clinical periodontology* 2007;34:299-304.
- [20] Machida, T, Tomofuji, T, Ekuni, D, Azuma, T, Takeuchi, N, Maruyama, T, et al. Severe Periodontitis Is Inversely Associated with Coffee Consumption in the Maintenance Phase of Periodontal Treatment. *Nutrients* 2014;6:4476-90.
- [21] Jimenez, M, Giovannucci, E, Krall Kaye, E, Joshipura, KJ, Dietrich, T. Predicted vitamin D status and incidence of tooth loss and periodontitis. *Public Health Nutrition* 2014;17:844-52.
- [22] Genco, RJ. Current View of Risk Factors for Periodontal Diseases. *Journal of Periodontology* 1996;67:1041-9.
- [23] Preshaw, PM, Taylor, JJ. How has research into cytokine interactions and their role in driving immune responses impacted our understanding of periodontitis? *Journal of clinical periodontology* 2011;38:60-84.
- [24] Kinane, DF, Preshaw, PM, Loos, BG, on Behalf of Working Group 2 of the Seventh European Workshop on, P. Host-response: understanding the cellular and molecular mechanisms of host-microbial interactions – Consensus of the Seventh

LITERATURA

- European Workshop on Periodontology. *Journal of Clinical Periodontology* 2011;38:44-8.
- [25] Garlet, G. Destructive and protective roles of cytokines in periodontitis: a reappraisal from host defense and tissue destruction viewpoints. *Journal of dental research* 2010;89:1349-63.
- [26] McInnes, IB, Schett, G. Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Nature Reviews Immunology* 2007;7:429-42.
- [27] Arron, JR, Choi, Y. Osteoimmunology: bone versus immune system. *Nature* 2000;408:535-6.
- [28] Chambers, TJ. Regulation of the differentiation and function of osteoclasts. *The Journal of Pathology* 2000;192:4-13.
- [29] Bartold, PM, Cantley, MD, Haynes, DR. Mechanisms and control of pathologic bone loss in periodontitis. *Periodontology 2000* 2010;53:55-69.
- [30] Hakeda, Y, Kobayashi, Y, Yamaguchi, K, Yasuda, H, Tsuda, E, Higashio, K, et al. Osteoclastogenesis Inhibitory Factor (OCIF) Directly Inhibits Bone-Resorbing Activity of Isolated Mature Osteoclasts. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1998;251:796-801.
- [31] Romanelli, R, Mancini, S, Laschinger, C, Overall, CM, Sodek, J, McCulloch, CA. Activation of neutrophil collagenase in periodontitis. *Infection and immunity* 1999;67:2319-26.
- [32] Leppilahti, J, Ahonen, MM, Hernández, M, Munjal, S, Netuschil, L, Uitto, VJ, et al. Oral rinse MMP-8 point-of-care immuno test identifies patients with strong periodontal inflammatory burden. *Oral diseases* 2011;17:115-22.
- [33] Association, AD. Standards of Medical Care in Diabetes—2013. *Diabetes Care* 2013;36:S11-S66.
- [34] Shaw, JE, Sicree, RA, Zimmet, PZ. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes Research and Clinical Practice* 2010;87:4-14.
- [35] Diamond, J. The double puzzle of diabetes. *Nature* 2003;423:599-602.
- [36] Keen, H. The genetics of diabetes: from nightmare to headache. *British medical journal (Clinical research ed)* 1987;294:917.

LITERATURA

- [37] Newman, B, Selby, J, King, M-C, Slemenda, C, Fabsitz, R, Friedman, G. Concordance for type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus in male twins. *Diabetologia* 1987;30:763-8.
- [38] Hara, K, Shojima, N, Hosoe, J, Kadowaki, T. Genetic architecture of type 2 diabetes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2014;452:213-20.
- [39] Zimmet, PZ. Kelly West Lecture 1991 Challenges in Diabetes Epidemiology—From West to the Rest. *Diabetes Care* 1992;15:232-52.
- [40] Knudsen, S, Pedersen, B. Targeting Inflammation Through a Physical Active Lifestyle and Pharmaceuticals for the Treatment of Type 2 Diabetes. *Current Diabetes Reports* 2015;15:1-9.
- [41] Zaccardi, F, O'Donovan, G, Webb, DR, Yates, T, Kurl, S, Khunti, K, et al. Cardiorespiratory fitness and risk of type 2 diabetes mellitus: A 23-year cohort study and a meta-analysis of prospective studies. *Atherosclerosis* 2015;243:131-7.
- [42] Wannamethee, SG, Shaper, AG, Perry, IJ. Smoking as a Modifiable Risk Factor for Type 2 Diabetes in Middle-Aged Men. *Diabetes Care* 2001;24:1590-5.
- [43] Maegawa, H, Ugi, S, Adachi, M, Hinoda, Y, Kikkawa, R, Yachi, A, et al. Insulin Receptor Kinase Phosphorylates Protein Tyrosine Phosphatase Containing Src Homology 2 Regions and Modulates Its PTPase Activity in Vitro. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1994;199:780-5.
- [44] Cai, D, Yuan, M, Frantz, DF, Melendez, PA, Hansen, L, Lee, J, et al. Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK- β and NF- κ B. *Nature medicine* 2005;11:183-90.
- [45] Jazet, I, Pijl, H, Meinders, A. Adipose tissue as an endocrine organ: impact on insulin resistance. *Neth J Med* 2003;61:194-212.
- [46] Litwack, G. *Interleukins*: Academic Press; 2006.
- [47] Fischer, CP, Perstrup, LB, Berntsen, A, Eskildsen, P, Pedersen, BK. Elevated plasma interleukin-18 is a marker of insulin-resistance in type 2 diabetic and non-diabetic humans. *Clinical Immunology* 2005;117:152-60.
- [48] Monnier, L, Hanefeld, M, Schnell, O, Colette, C, Owens, D. Insulin and atherosclerosis: How are they related? *Diabetes & Metabolism* 2013;39:111-7.
- [49] Hyun, E, Ramachandran, R, Hollenberg, MD, Vergnolle, N. Mechanisms Behind the Anti-inflammatory Actions of Insulin. 2011;31:307-40.

LITERATURA

- [50] Arnalich, F, Hernanz, A, Lopez-Maderuelo, D, Pena, J, Camacho, J, Madero, R, et al. Enhanced acute-phase response and oxidative stress in older adults with type II diabetes. *Hormone and metabolic research= Hormon-und Stoffwechselforschung= Hormones et metabolisme* 2000;32:407-12.
- [51] Crook, MA, Tutt, P, Simpson, H, Pickup, JC. Serum sialic acid and acute phase proteins in type 1 and type 2 diabetes mellitus. *Clinica chimica acta* 1993;219:131-8.
- [52] Lamster, IB, Lalla, E, Borgnakke, WS, Taylor, GW. The relationship between oral health and diabetes mellitus. *The Journal of the American Dental Association* 2008;139:19S-24S.
- [53] Murrach, V, Crosson, J, Sauk, J. Parotid gland basement membrane variation in diabetes mellitus. *Journal of Oral Pathology & Medicine* 1985;14:236-46.
- [54] Ship, JA. Diabetes and oral health: an overview. *The Journal of the American Dental Association* 2003;134:4S-10S.
- [55] Loe, H. Periodontal disease: the sixth complication of diabetes mellitus. *Diabetes care* 1993;16:329-34.
- [56] Tsai, C, Hayes, C, Taylor, GW. Glycemic control of type 2 diabetes and severe periodontal disease in the US adult population. *Community dentistry and oral epidemiology* 2002;30:182-92.
- [57] Lalla, E, Cheng, B, Lal, S, Kaplan, S, Softness, B, Greenberg, E, et al. Diabetes mellitus promotes periodontal destruction in children. *Journal of clinical periodontology* 2007;34:294-8.
- [58] Taylor, JJ, Preshaw, PM, Lalla, E. A review of the evidence for pathogenic mechanisms that may link periodontitis and diabetes. *Journal of Clinical Periodontology* 2013;40:S113-S34.
- [59] Yoshida, T, Flegler, A, Kozlov, A, Stern, PH. Direct inhibitory and indirect stimulatory effects of RAGE ligand S100 on sRANKL-induced osteoclastogenesis. *Journal of cellular biochemistry* 2009;107:917-25.
- [60] Nishimura, F, Takahashi, K, Kurihara, M, Takashiba, S, Murayama, Y. Periodontal Disease as a Complication of Diabetes Mellitus*. *Annals of periodontology* 1998;3:20-9.

LITERATURA

- [61] Esposito, K, Nappo, F, Marfella, R, Giugliano, G, Giugliano, F, Ciotola, M, et al. Inflammatory cytokine concentrations are acutely increased by hyperglycemia in humans role of oxidative stress. *Circulation* 2002;106:2067-72.
- [62] Kobayashi, K, Takahashi, N, Jimi, E, Udagawa, N, Takami, M, Kotake, S, et al. Tumor necrosis factor α stimulates osteoclast differentiation by a mechanism independent of the ODF/RANKL–RANK interaction. *The Journal of experimental medicine* 2000;191:275-86.
- [63] Page, RC. The pathobiology of periodontal diseases may affect systemic diseases: inversion of a paradigm. *Annals of periodontology* 1998;3:108-20.
- [64] Thoden van Velzen, S, Abraham-Inpijn, L, Moorer, W. Plaque and systemic disease: a reappraisal of the focal infection concept. *Journal of clinical periodontology* 1984;11:209-20.
- [65] Mattila, K. Viral and bacterial infections in patients with acute myocardial infarction. *Journal of internal medicine* 1989;225:293-6.
- [66] Li, X, Kolltveit, KM, Tronstad, L, Olsen, I. Systemic diseases caused by oral infection. *Clinical microbiology reviews* 2000;13:547-58.
- [67] Nesse, W, Abbas, F, Van Der Ploeg, I, Spijkervet, FKL, Dijkstra, PU, Vissink, A. Periodontal inflamed surface area: quantifying inflammatory burden. *Journal of clinical periodontology* 2008;35:668-73.
- [68] Soskolne, WA, Klinger, A. The relationship between periodontal diseases and diabetes: an overview. *Annals of Periodontology* 2001;6:91-8.
- [69] Collin, H-L, Uusitupa, M, Niskanen, L, Kontturi-Närhi, V, Markkanen, H, Koivisto, A-M, et al. Periodontal Findings in Elderly Patients With Non-Insulin Dependent Diabetes Mellitus. *Journal of Periodontology* 1998;69:962-6.
- [70] Saito, T, Shimazaki, Y, Kiyohara, Y, Kato, I, Kubo, M, Iida, M, et al. The Severity of Periodontal Disease is Associated with the Development of Glucose Intolerance in Non-diabetics: The Hisayama Study. *Journal of Dental Research* 2004;83:485-90.
- [71] Taylor, GW, Burt, BA, Becker, MP, Genco, RJ, Shlossman, M, Knowler, WC, et al. Severe Periodontitis and Risk for Poor Glycemic Control in Patients with Non-Insulin-Dependent Diabetes Mellitus. *Journal of Periodontology* 1996;67:1085-93.

LITERATURA

- [72] Thorstensson, H, Kuylenstiema, J, Hugoson, A. Medical Status and complications in relation to periodontal disease experience in insulin-dependent diabetics. *Journal of Clinical Periodontology* 1996;23:194-202.
- [73] Saremi, A, Nelson, RG, Tulloch-Reid, M, Hanson, RL, Sievers, ML, Taylor, GW, et al. Periodontal Disease and Mortality in Type 2 Diabetes. *Diabetes Care* 2005;28:27-32.
- [74] Kıran, M, Arpak, N, Ünsal, E, Erdoğan, MF. The effect of improved periodontal health on metabolic control in type 2 diabetes mellitus. *Journal of Clinical Periodontology* 2005;32:266-72.
- [75] Singh, S, Kumar, V, Kumar, S, Subbappa, A. The effect of periodontal therapy on the improvement of glycemic control in patients with type 2 diabetes mellitus: A randomized controlled clinical trial. *International Journal of Diabetes in Developing Countries* 2008;28:38-44.
- [76] Katagiri, S, Nitta, H, Nagasawa, T, Uchimura, I, Izumiyama, H, Inagaki, K, et al. Multi-center intervention study on glycohemoglobin (HbA1c) and serum, high-sensitivity CRP (hs-CRP) after local anti-infectious periodontal treatment in type 2 diabetic patients with periodontal disease. *Diabetes Research and Clinical Practice* 2009;83:308-15.
- [77] Koromantzou, PA, Makrilakis, K, Dereka, X, Katsilambros, N, Vrotsos, IA, Madianos, PN. A randomized, controlled trial on the effect of non-surgical periodontal therapy in patients with type 2 diabetes. Part I: effect on periodontal status and glycaemic control. *Journal of Clinical Periodontology* 2011;38:142-7.
- [78] Moeintaghavi, A, Arab, HR, Bozorgnia, Y, Kianoush, K, Alizadeh, M. Non-surgical periodontal therapy affects metabolic control in diabetics: a randomized controlled clinical trial. *Australian Dental Journal* 2012;57:31-7.
- [79] Wang, X, Han, X, Guo, X, Luo, X, Wang, D. The Effect of Periodontal Treatment on Hemoglobin A1c Levels of Diabetic Patients: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS ONE* 2014;9:e108412.
- [80] Engebretson, SP, Hyman, LG, Michalowicz, BS, et al. The effect of nonsurgical periodontal therapy on hemoglobin a1c levels in persons with type 2 diabetes and chronic periodontitis: A randomized clinical trial. *JAMA* 2013;310:2523-32.

LITERATURA

- [81] Chen, L, Luo, G, Xuan, D, Wei, B, Liu, F, Li, J, et al. Effects of non-surgical periodontal treatment on clinical response, serum inflammatory parameters, and metabolic control in patients with type 2 diabetes: a randomized study. *Journal of periodontology* 2012;83:435-43.
- [82] Rodrigues, DC, Taba, M, Novaes, AB, Souza, SLS, Grisi, MFM. Effect of Non-Surgical Periodontal Therapy on Glycemic Control in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus. *Journal of Periodontology* 2003;74:1361-7.
- [83] Tabatabaie, T, Waldon, AM, Jacob, JM, Floyd, RA, Kotake, Y. COX-2 Inhibition Prevents Insulin-Dependent Diabetes in Low-Dose Streptozotocin-Treated Mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2000;273:699-704.
- [84] Shapira, L, Soskolne, WA, Sela, MN, Offenbacher, S, Barak, V. The Secretion of PGE₂, IL-1 β , IL-6, and TNF α by Adherent Mononuclear Cells From Early Onset Periodontitis Patients. *Journal of Periodontology* 1994;65:139-46.
- [85] Salvi, GE, Yalda, B, Collins, JG, Jones, BH, Smith, FW, Arnold, RR, et al. Inflammatory Mediator Response as a Potential Risk Marker for Periodontal Diseases in Insulin-Dependent Diabetes Mellitus Patients. *Journal of Periodontology* 1997;68:127-35.
- [86] Christensen, UB, Larsen, PM, Fey, S, Andersen, HU, Nawrocki, A, Sparre, T, et al. Islet protein expression changes during diabetes development in islet syngrafts in BB-DP rats and during rejection of BB-DP islet allografts. *Autoimmunity* 2000;32:1-15.
- [87] McGee, JM, Tucci, MA, Edmundson, TP, Serio, CL, Johnson, RB. The Relationship Between Concentrations of Proinflammatory Cytokines Within Gingiva and the Adjacent Sulcular Depth. *Journal of Periodontology* 1998;69:865-71.
- [88] Kornman, KS, Crane, A, Wang, H-Y, Giolne, FSd, Newman, MG, Pirk, FW, et al. The interleukin-1 genotype as a severity factor in adult periodontal disease. *Journal of Clinical Periodontology* 1997;24:72-7.
- [89] Hotamisligil, GS, Budavari, A, Murray, D, Spiegelman, BM. Reduced tyrosine kinase activity of the insulin receptor in obesity-diabetes. Central role of tumor necrosis factor-alpha. *Journal of Clinical Investigation* 1994;94:1543.
- [90] Peraldi, P, Hotamisligil, GS, Buurman, WA, White, MF, Spiegelman, BM. Tumor necrosis factor (TNF)- α inhibits insulin signaling through stimulation of the p55

LITERATURA

- TNF receptor and activation of sphingomyelinase. *Journal of Biological Chemistry* 1996;271:13018-22.
- [91] Andrukhov, O, Ulm, C, Reischl, H, Nguyen, PQ, Matejka, M, Rausch-Fan, X. Serum cytokine levels in periodontitis patients in relation to the bacterial load. *Journal of periodontology* 2011;82:885-92.
- [92] Sun, W-L, Chen, L-L, Zhang, S-Z, Wu, Y-M, Ren, Y-Z, Qin, G-M. Inflammatory cytokines, adiponectin, insulin resistance and metabolic control after periodontal intervention in patients with type 2 diabetes and chronic periodontitis. *Internal medicine* 2011;50:1569-74.
- [93] Nishimura, F, Iwamoto, Y, Mineshiba, J, Shimizu, A, Soga, Y, Murayama, Y. Periodontal Disease and Diabetes Mellitus: The Role of Tumor Necrosis Factor- α in a 2-Way Relationship. *Journal of Periodontology* 2003;74:97-102.
- [94] Beutler, B, Greenwald, D, Hulmes, J, Chang, M, Pan, Y-C, Mathison, J, et al. Identity of tumour necrosis factor and the macrophage-secreted factor cachectin. 1985;
- [95] MacEwan, DJ. Interactions between TNF and GnRH. *Neurochemical research* 2008;33:678-82.
- [96] Wallach, D, Kovalenko, A. 12th international TNF conference: The good, the bad and the scientists. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 2009;20:259-69.
- [97] Baud, V, Karin, M. Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *Trends in cell biology* 2001;11:372-7.
- [98] Van Hauwermeiren, F, Vandenbroucke, RE, Libert, C. Treatment of TNF mediated diseases by selective inhibition of soluble TNF or TNFR1. *Cytokine & growth factor reviews* 2011;22:311-9.
- [99] Aderka, D. The potential biological and clinical significance of the soluble tumor necrosis factor receptors. *Cytokine & growth factor reviews* 1996;7:231-40.
- [100] Kant, S, Swat, W, Zhang, S, Zhang, Z-Y, Neel, BG, Flavell, RA, et al. TNF-stimulated MAP kinase activation mediated by a Rho family GTPase signaling pathway. *Genes & development* 2011;25:2069-78.
- [101] BEUTLER, B, CERAMI, A. Cachectin (tumor necrosis factor): a macrophage hormone governing cellular metabolism and inflammatory response. *Endocrine Reviews* 1988;9:57-66.

LITERATURA

- [102] Probert, L. TNF and its receptors in the CNS: The essential, the desirable and the deleterious effects. *Neuroscience* 2015;302:2-22.
- [103] Pedersen, M, Bruunsgaard, H, Weis, N, Hendel, HW, Andreassen, BU, Eldrup, E, et al. Circulating levels of TNF-alpha and IL-6-relation to truncal fat mass and muscle mass in healthy elderly individuals and in patients with type-2 diabetes. *Mechanisms of Ageing and Development* 2003;124:495-502.
- [104] Peterson, PK, Chao, CC, Carson, P, Hu, S, Nichol, K, Janoff, EN. Levels of Tumor Necrosis Factor α , Interleukin 6, Interleukin 10, and Transforming Growth Factor β Are Normal in the Serum of the Healthy Elderly. *Clinical Infectious Diseases* 1994;19:1158-9.
- [105] Gilmore, W, Weiner, LP, Correale, J. Effect of estradiol on cytokine secretion by proteolipid protein-specific T cell clones isolated from multiple sclerosis patients and normal control subjects. *The Journal of Immunology* 1997;158:446-51.
- [106] Good, M, Newell, FM, Haupt, LM, Whitehead, JP, Hutley, LJ, Prins, JB. TNF and TNF receptor expression and insulin sensitivity in human omental and subcutaneous adipose tissue — influence of BMI and adipose distribution. *Diabetes and Vascular Disease Research* 2006;3:26-33.
- [107] Walsh, JM, McGowan, CA, Byrne, JA, Rath, A, McAuliffe, FM. The association between TNF- α and insulin resistance in euglycemic women. *Cytokine* 2013;64:208-12.
- [108] Goebel, MU, Mills, PJ, Irwin, MR, Ziegler, MG. Interleukin-6 and Tumor Necrosis Factor- α Production After Acute Psychological Stress, Exercise, and Infused Isoproterenol: Differential Effects and Pathways. *Psychosomatic Medicine* 2000;62:591-8.
- [109] Koh, KB, Lee, Y-J, Beyn, KM, Chu, SH, Kim, DM, Seo, WY. Effects of high and low stress on proinflammatory and antiinflammatory cytokines. *Psychophysiology* 2012;49:1290-7.
- [110] Koh, KB. Emotion and immunity. *Journal of Psychosomatic Research* 1998;45:107-15.
- [111] Gokhale, R, Chandrashekara, S, Vasanthakumar, K. Cytokine response to strenuous exercise in athletes and non-athletes—an adaptive response. *Cytokine* 2007;40:123-7.

LITERATURA

- [112] Walther, C, Möbius-Winkler, S, Linke, A, Bruegel, M, Thiery, J, Schuler, G, et al. Regular exercise training compared with percutaneous intervention leads to a reduction of inflammatory markers and cardiovascular events in patients with coronary artery disease. *European Journal of Cardiovascular Prevention & Rehabilitation* 2008;15:107-12.
- [113] Churg, A, Dai, J, Tai, H, Xie, C, Wright, JL. Tumor Necrosis Factor- α Is Central to Acute Cigarette Smoke-induced Inflammation and Connective Tissue Breakdown. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2002;166:849-54.
- [114] Churg, A, Wang, RD, Tai, H, Wang, X, Xie, C, Dai, J, et al. Macrophage metalloelastase mediates acute cigarette smoke-induced inflammation via tumor necrosis factor- α release. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2003;167:1083-9.
- [115] Thomson, AW, Lotze, MT. *The Cytokine Handbook, Two-Volume Set*. Thomson AW, editor: Gulf Professional Publishing; 2003.
- [116] Flier, JS, Underhill, LH, Bazzoni, F, Beutler, B. The tumor necrosis factor ligand and receptor families. *New England Journal of Medicine* 1996;334:1717-25.
- [117] Pennica, D, Nedwin, GE, Hayflick, JS, Seeburg, PH, Derynck, R, Palladino, MA, et al. Human tumour necrosis factor: precursor structure, expression and homology to lymphotoxin. *Nature* 1984;312:724-9.
- [118] Locksley, RM, Killeen, N, Lenardo, MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies-integrating mammalian biology. *Cell* 2001;104:487-501.
- [119] Androlewicz, MJ, Browning, JL, Ware, CF. Lymphotoxin is expressed as a heteromeric complex with a distinct 33-kDa glycoprotein on the surface of an activated human T cell hybridoma. *Journal of Biological Chemistry* 1992;267:2542-7.
- [120] Ware, C, VanArsdale, T, Crowe, P, Browning, J. *The ligands and receptors of the lymphotoxin system*. *Pathways for Cytolysis*: Springer; 1995. p. 175-218.
- [121] Andrews, J, Berger, A, Ware, C. Characterization of the receptor for tumor necrosis factor (TNF) and lymphotoxin (LT) on human T lymphocytes: TNF and LT differ in their receptor binding properties and the induction of MHC class I proteins on a human CD4⁺ hybridoma. *The Journal of Immunology* 1990;144:4906.

LITERATURA

- [122] De Togni, P, Goellner, J, Ruddle, N, Streeter, P, Fick, A, Mariathasan, S, et al. Abnormal development of peripheral lymphoid organs in mice deficient in lymphotoxin. *Science* 1994;264:703-7.
- [123] Wu, Q, Sun, Y, Wang, J, Lin, X, Wang, Y, Pegg, LE, et al. Signal Via Lymphotoxin- β R on Bone Marrow Stromal Cells Is Required for an Early Checkpoint of NK Cell Development. *The Journal of Immunology* 2001;166:1684-9.
- [124] Fuchs, P, Strehl, S, Dworzak, M, Himmler, A, Ambros, PF. Structure of the human TNF receptor 1 (p60) gene (TNRF1) and localization to chromosome 12p13. *Genomics* 1992;13:219-24.
- [125] Santee, SM, Owen-Schaub, LB. Human Tumor Necrosis Factor Receptor p75/80 (CD120b) Gene Structure and Promoter Characterization. *Journal of Biological Chemistry* 1996;271:21151-9.
- [126] Hawari, FI, Rouhani, FN, Cui, X, Yu, Z-X, Buckley, C, Kaler, M, et al. Release of full-length 55-kDa TNF receptor 1 in exosome-like vesicles: A mechanism for generation of soluble cytokine receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004;101:1297-302.
- [127] Smith, RA, Baglioni, C. The active form of tumor necrosis factor is a trimer. *Journal of Biological Chemistry* 1987;262:6951-4.
- [128] Aderka, D, Engelmann, H, Shemer-Avni, Y, Hornik, V, Galil, A, Sarov, B, et al. Variation in serum levels of the soluble TNF receptors among healthy individuals. *Lymphokine and Cytokine Research* 1992;11:157-9.
- [129] Grell, M, Wajant, H, Zimmermann, G, Scheurich, P. The type 1 receptor (CD120a) is the high-affinity receptor for soluble tumor necrosis factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1998;95:570-5.
- [130] Plitz, T, Huffstadt, U, Endres, R, Schaller, E, Mak, TW, Wagner, H, et al. The resistance against *Listeria monocytogenes* and the formation of germinal centers depend on a functional death domain of the 55 kDa tumor necrosis factor receptor. *European journal of immunology* 1999;29:581-91.
- [131] Degtarev, A, Huang, Z, Boyce, M, Li, Y, Jagtap, P, Mizushima, N, et al. Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. *Nature chemical biology* 2005;1:112-9.

LITERATURA

- [132] Ling, L, Cao, Z, Goeddel, DV. NF- κ B-inducing kinase activates IKK- α by phosphorylation of Ser-176. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1998;95:3792-7.
- [133] Pimentel-Muñoz, FX, Seed, B. Regulated Commitment of TNF Receptor Signaling: A Molecular Switch for Death or Activation. *Immunity* 1999;11:783-93.
- [134] Beklen, A, Laine, M, Ventä, I, Hyrkäs, T, Kontinen, YT. Role of TNF- α and Its Receptors in Pericoronitis. *Journal of dental research* 2005;84:1178-82.
- [135] Andrade, I, Silva, T, Silva, G, Teixeira, A, Teixeira, M. The role of tumor necrosis factor receptor type 1 in orthodontic tooth movement. *Journal of Dental Research* 2007;86:1089-94.
- [136] Aderka, D, Engelmann, H, Hornik, V, Skornick, Y, Levo, Y, Wallach, D, et al. Increased serum levels of soluble receptors for tumor necrosis factor in cancer patients. *Cancer research* 1991;51:5602-7.
- [137] MacEwan, DJ. TNF receptor subtype signalling: differences and cellular consequences. *Cellular signalling* 2002;14:477-92.
- [138] Chen, X-H, Zhao, Y-P, Xue, M, Ji, C-B, Gao, C-L, Zhu, J-G, et al. TNF- α induces mitochondrial dysfunction in 3T3-L1 adipocytes. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2010;328:63-9.
- [139] White, MF. The insulin signalling system and the IRS proteins. *Diabetologia* 1997;40:S2-S17.
- [140] Steinberg, GR, Michell, BJ, van Denderen, BJ, Watt, MJ, Carey, AL, Fam, BC, et al. Tumor necrosis factor α -induced skeletal muscle insulin resistance involves suppression of AMP-kinase signaling. *Cell Metabolism* 2006;4:465-74.
- [141] Cieślak, M, Wojtczak, A, Cieślak, M. Role of pro-inflammatory cytokines of pancreatic islets and prospects of elaboration of new methods for the diabetes treatment. *Acta Biochimica Polonica* 2015;62:15-21.
- [142] Zhang, B, Berger, J, Hu, E, Szalkowski, D, White-Carrington, S, Spiegelman, BM, et al. Negative regulation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma gene expression contributes to the antiadipogenic effects of tumor necrosis factor-alpha. *Molecular Endocrinology* 1996;10:1457-66.
- [143] Paz, K, Hemi, R, LeRoith, D, Karasik, A, Elhanany, E, Kanety, H, et al. A Molecular Basis for Insulin Resistance: Elevated Serine/Threonine Phosphorylation Of

LITERATURA

IRS-1 and IRS-2 Inhibits their Binding to the juxtamembrane region of the Insulin Receptor and impairs their ability to undergo Insulin-induced Tyrosine Phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry* 1997;272:29911-8.

[144] Hube, F, Hauner, H. The role of TNF- α in human adipose tissue: prevention of weight gain at the expense of insulin resistance? *Hormone and Metabolic Research* 1999;31:626-31.

[145] Mueller, C, Held, W, Imboden, MA, Carnaud, C. Accelerated β -cell destruction in adoptively transferred autoimmune diabetes correlates with an increased expression of the genes coding for TNF- α and granzyme A in the intra-islet infiltrates. *Diabetes* 1995;44:112-7.

[146] Yang, XD, Tisch, R, Singer, SM, Cao, ZA, Liblau, RS, Schreiber, RD, et al. Effect of tumor necrosis factor α on insulin-dependent diabetes mellitus in NOD mice. I. The early development of autoimmunity and the diabetogenic process. *Journal of Experimental Medicine* 1994;180:995-1004.

[147] Pfeiffer, A, Janott, J, Möhlig, M, Ristow, M, Rochlitz, H, Busch, K, et al. Circulating tumor necrosis factor alpha is elevated in male but not in female patients with type II diabetes mellitus. *Horm Metab Res* 1997;29:111-4.

[148] Choi, KM, Lee, J, Lee, KW, Seo, JA, Oh, JH, Kim, SG, et al. Comparison of serum concentrations of C-reactive protein, TNF- α , and interleukin 6 between elderly Korean women with normal and impaired glucose tolerance. *Diabetes Research and Clinical Practice* 2004;64:99-106.

[149] Xiao, Q, Wang, LP, Ran, ZS, Zhang, XH. Changes of plasma tumor necrosis factor α and C-reactive protein levels in patients with hypertension accompanied by impaired glucose tolerance and their clinical significance. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 2015;16:3389-93.

[150] Mooradian, A, Reed, R, Duerr, M, Valdez, C, Scuderi, P. The effect of age and diabetes mellitus on serum levels of lymphotoxin. *AGE* 1992;15:95-9.

[151] Uysal, KT, Wiesbrock, SM, Hotamisligil, GkS. Functional Analysis of Tumor Necrosis Factor (TNF) Receptors in TNF- α -Mediated Insulin Resistance in Genetic Obesity 1. *Endocrinology* 1998;139:4832-8.

[152] Fernandez-Real, J-M, Lainez, B, Vendrell, J, Rigla, M, Castro, A, Peñarroja, G, et al. Shedding of TNF- α receptors, blood pressure, and insulin sensitivity in type 2

LITERATURA

diabetes mellitus. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 2002;282:E952-E9.

[153] Dzienis-Straczkowska, S, Straczkowski, M, Szelachowska, M, Stepien, A, Kowalska, I, Kinalska, I. Soluble Tumor Necrosis Factor- α Receptors in Young Obese Subjects With Normal and Impaired Glucose Tolerance. *Diabetes Care* 2003;26:875-80.

[154] Navarro, JF, Mora, C. Role of inflammation in diabetic complications. *Nephrology dialysis transplantation* 2005;20:2601-4.

[155] Laster, SM, Wood, J, Gooding, L. Tumor necrosis factor can induce both apoptotic and necrotic forms of cell lysis. *The Journal of Immunology* 1988;141:2629-34.

[156] Niewczas, MA, Gohda, T, Skupien, J, Smiles, AM, Walker, WH, Rosetti, F, et al. Circulating TNF receptors 1 and 2 predict ESRD in type 2 diabetes. *Journal of the American Society of Nephrology* 2012;23:507-15.

[157] Limb, GA, Chignell, AH, Green, W, LeRoy, F, Dumonde, DC. Distribution of TNF alpha and its reactive vascular adhesion molecules in fibrovascular membranes of proliferative diabetic retinopathy. *British Journal of Ophthalmology* 1996;80:168-73.

[158] Magrinelli, F, Briani, C, Romano, M, Ruggero, S, Toffanin, E, Triolo, G, et al. The Association between Serum Cytokines and Damage to Large and Small Nerve Fibers in Diabetic Peripheral Neuropathy. *Journal of Diabetes Research* 2015;2015:7.

[159] Empl, M, Renaud, S, Erne, B, Fuhr, P, Straube, A, Schaeren-Wiemers, N, et al. TNF-alpha expression in painful and nonpainful neuropathies. *Neurology* 2001;56:1371-7.

[160] Wang, B, Jenkins, JR, Trayhurn, P. Expression and secretion of inflammation-related adipokines by human adipocytes differentiated in culture: integrated response to TNF- α . *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 2005;288:E731-E40.

[161] Tervahartiala, T, Koski, H, Xu, J-W, Häyrynen-Immonen, R, Hietanen, J, Sorsa, T, et al. Tumor Necrosis Factor- α and its Receptors, p55 and p75, in Gingiva of Adult Periodontitis. *Journal of Dental Research* 2001;80:1535-9.

[162] Ohe, H, Takashiba, S, Naruishi, K, Chou, H-H, Yamada, H, Nishimura, F, et al. Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α)-Induced and Interleukin-1 β (IL-1 β)-Induced Shedding of TNF Receptors from Gingival Fibroblasts. *Journal of Interferon & Cytokine Research* 2000;20:1077-82.

LITERATURA

- [163] Kallio, KAE, Marchesani, M, Vlachopoulou, E, Mäntylä, P, Paju, S, Buhlin, K, et al. Genetic Variation on the BAT1-NFKBIL1-LTA Region of Major Histocompatibility Complex Class III Associates with Periodontitis. *Infection and Immunity* 2014;82:1939-48.
- [164] Johansson, N, Westermarck, J, Leppä, S, Häkkinen, L, Koivisto, L, Lopez-Otin, C, et al. Collagenase 3 (matrix metalloproteinase 13) gene expression by HaCaT keratinocytes is enhanced by tumor necrosis factor α and transforming growth factor β . *Cell Growth and Differentiation-Publication American Association for Cancer Research* 1997;8:243-50.
- [165] Di Paola, R, Mazzon, E, Muià, C, Crisafulli, C, Terrana, D, Greco, S, et al. Effects of etanercept, a tumour necrosis factor- α antagonist, in an experimental model of periodontitis in rats. *British Journal of Pharmacology* 2007;150:286-97.
- [166] Graves, DT, Delima, AJ, Assuma, R, Amar, S, Oates, T, Cochran, D. Interleukin-1 and Tumor Necrosis Factor Antagonists Inhibit the Progression of Inflammatory Cell Infiltration Toward Alveolar Bone in Experimental Periodontitis. *Journal of Periodontology* 1998;69:1419-25.
- [167] Rossomando, EF, Kennedy, JE, Hadjimichael, J. Tumour necrosis factor alpha in gingival crevicular fluid as a possible indicator of periodontal disease in humans. *Archives of Oral Biology* 1990;35:431-4.
- [168] Lee, H-J, Kang, I-K, Chung, C-P, Choi, S-M. The subgingival microflora and gingival crevicular fluid cytokines in refractory periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology* 1995;22:885-90.
- [169] Mohamed, HG, Idris, SB, Ahmed, MF, Åström, AN, Mustafa, K, Ibrahim, SO, et al. Influence of type 2 diabetes on local production of inflammatory molecules in adults with and without chronic periodontitis: a cross-sectional study. *BMC oral health* 2015;15:86.
- [170] Ikezawa, I, Tai, H, Shimada, Y, Komatsu, Y, Galicia, JC, Yoshie, H. Imbalance between soluble tumour necrosis factor receptors type 1 and 2 in chronic periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology* 2005;32:1047-54.
- [171] Ikezawa-Suzuki, I, Shimada, Y, Tai, H, Komatsu, Y, Tanaka, A, Yoshie, H. Effects of treatment on soluble tumour necrosis factor receptor type 1 and 2 in chronic periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology* 2008;35:961-8.

LITERATURA

- [172] König, A, Mühlbauer, RC, Fleisch, H. Tumor necrosis factor α and interleukin-1 stimulate bone resorption in vivo as measured by urinary [^3H]tetracycline excretion from prelabeled mice. *Journal of Bone and Mineral Research* 1988;3:621-7.
- [173] Thomson, BM, Mundy, GR, Chambers, TJ. Tumor necrosis factors alpha and beta induce osteoblastic cells to stimulate osteoclastic bone resorption. *The Journal of Immunology* 1987;138:775-9.
- [174] Abu-Amer, Y, Ross, FP, Edwards, J, Teitelbaum, SL. Lipopolysaccharide-stimulated osteoclastogenesis is mediated by tumor necrosis factor via its P55 receptor. *The Journal of Clinical Investigation* 1997;100:1557-65.
- [175] Pfeilschifter, J, Chenu, C, Bird, A, Mundy, GR, Roodman, DG. Interleukin-1 and tumor necrosis factor stimulate the formation of human osteoclastlike cells in vitro. *Journal of Bone and Mineral Research* 1989;4:113-8.
- [176] Zou, W, Hakim, I, Tschöp, K, Endres, S, Bar-Shavit, Z. Tumor necrosis factor- α mediates RANK ligand stimulation of osteoclast differentiation by an autocrine mechanism†. *Journal of Cellular Biochemistry* 2001;83:70-83.
- [177] Zhang, Y-H, Heulsmann, A, Tondravi, MM, Mukherjee, A, Abu-Amer, Y. Tumor Necrosis Factor- α (TNF) Stimulates RANKL-induced Osteoclastogenesis via Coupling of TNF Type 1 Receptor and RANK Signaling Pathways. *Journal of Biological Chemistry* 2001;276:563-8.
- [178] Konttinen, YT, Xu, J-W, Päätiälä, H, Imai, S, Waris, V, Li, T-F, et al. Cytokines in aseptic loosening of total hip replacement. *Current Orthopaedics* 1997;11:40-7.
- [179] Li, J, Sarosi, I, Yan, X-Q, Morony, S, Capparelli, C, Tan, H-L, et al. RANK is the intrinsic hematopoietic cell surface receptor that controls osteoclastogenesis and regulation of bone mass and calcium metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2000;97:1566-71.
- [180] Kotake, S, Nanke, Y. Effect of TNF α on osteoblastogenesis from mesenchymal stem cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 2014;1840:1209-13.
- [181] Huang, H, Zhao, N, Xu, X, Xu, Y, Li, S, Zhang, J, et al. Dose-specific effects of tumor necrosis factor alpha on osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Cell Proliferation* 2011;44:420-7.

LITERATURA

- [182] Hess, K, Ushmorov, A, Fiedler, J, Brenner, RE, Wirth, T. TNF α promotes osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells by triggering the NF- κ B signaling pathway. *Bone* 45:367-76.
- [183] Briolay, A, Lencel, P, Bessueille, L, Caverzasio, J, Buchet, R, Magne, D. Autocrine stimulation of osteoblast activity by Wnt5a in response to TNF- α in human mesenchymal stem cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2013;430:1072-7.
- [184] The Genomes Project, C. A global reference for human genetic variation. *Nature* 2015;526:68-74.
- [185] Brookes, AJ. The essence of SNPs. *Gene* 1999;234:177-86.
- [186] The NCBI Handbook (Internet). McEntyre J, Ostell J, editors: National Center for Biotechnology Information (US); 2002-.
- [187] Damrongrungruang, T, Ogawa, H, Hori-Matsumoto, S, Minagawa, K, Hanyu, O, Sone, H, et al. Correlation between SNP genotypes and periodontitis in Japanese type II diabetic patients: a preliminary study. *Odontology* 2014;
- [188] Jacob, CO, Lewis, GD, McDevitt, HO. MHC class II-associated variation in the production of tumor necrosis factor in mice and humans: Relevance to the pathogenesis of autoimmune diseases. *Immunologic research* 1991;10:156-68.
- [189] Glenn, CL, Wang, WY, Benjafield, AV, Morris, BJ. Linkage and association of tumor necrosis factor receptor 2 locus with hypertension, hypercholesterolemia and plasma shed receptor. *Human molecular genetics* 2000;9:1943-9.
- [190] Dutra, WO, Moreira, PR, Souza, PEA, Gollob, KJ, Gomez, RS. Implications of cytokine gene polymorphisms on the orchestration of the immune response: Lessons learned from oral diseases. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 2009;20:223-32.
- [191] Hajeer, AH, Hutchinson, IV. TNF- α gene polymorphism: Clinical and biological implications. *Microscopy research and technique* 2000;50:216-28.
- [192] Zelová, H, Hošek, J. TNF- α signalling and inflammation: interactions between old acquaintances. *Inflamm Res* 2013;62:641-51.
- [193] Wihlborg, C, Sjöberg, J, Intaglietta, M, Axdorph, U, Pisa, EK, Pisa, P. Tumour necrosis factor- α cytokine promoter gene polymorphism in Hodgkin's disease and chronic lymphocytic leukaemia. *British journal of haematology* 1999;104:346-9.

LITERATURA

- [194] Wilson, AG, Symons, JA, McDowell, TL, McDevitt, HO, Duff, GW. Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor α promoter on transcriptional activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1997;94:3195-9.
- [195] Vischetti, M, Zito, F, Donati, MB, Iacoviello, L. Analysis of gene-environment interaction in coronary heart disease: fibrinogen polymorphisms as an example. *Italian heart journal: official journal of the Italian Federation of Cardiology* 2002;3:18-23.
- [196] Aoki, T, Hirota, T, Tamari, M, Ichikawa, K, Takeda, K, Arinami, T, et al. An association between asthma and TNF-308G/A polymorphism: meta-analysis. *Journal of human genetics* 2006;51:677-85.
- [197] Ferreira, AC, Almeida, S, Tavares, M, Canedo, P, Pereira, F, Regalo, G, et al. NOD2/CARD15 and TNFA, but not IL1B and IL1RN, are associated with Crohn's disease. *Inflammatory bowel diseases* 2005;11:331-9.
- [198] Ristić, S, Lovrečić, L, Starčević-Čizmarević, N, Brajenović-Milić, B, Šega Jazbec, S, Sepčić, J, et al. Tumor Necrosis Factor- α -308 Gene Polymorphism in Croatian and Slovenian Multiple Sclerosis Patients. *European Neurology* 2007;57:203-7.
- [199] Menges, T, König, IR, Hossain, H, Little, S, Tchatalbachev, S, Thierer, F, et al. Sepsis syndrome and death in trauma patients are associated with variation in the gene encoding tumor necrosis factor*. *Critical care medicine* 2008;36:1456-e6.
- [200] Bouhaha, R, Baroudi, T, Ennafaa, H, Vaillant, E, Abid, H, Sassi, R, et al. Study of TNF α -308G/A and IL6 -174G/C polymorphisms in type 2 diabetes and obesity risk in the Tunisian population. *Clinical Biochemistry* 2010;43:549-52.
- [201] Wang, N, Huang, K, Zou, H, Shi, Y, Zhu, J, Tang, W, et al. No Association Found Between the Promoter Variants of TNF- α and Diabetic Retinopathy in Chinese Patients with Type 2 Diabetes. *Current Eye Research* 2008;33:377-83.
- [202] Dabhi, B, Mistry, KN. Oxidative stress and its association with TNF- α -308 G/C and IL-1 α -889 C/T gene polymorphisms in patients with diabetes and diabetic nephropathy. *Gene* 2015;562:197-202.
- [203] Rodrigues, KF, Pietrani, NT, Sandrim, VC, Vieira, CMAF, Fernandes, AP, Bosco, AA, et al. Association of a Large Panel of Cytokine Gene Polymorphisms with Complications and Comorbidities in Type 2 Diabetes Patients. *Journal of Diabetes Research* 2015;2015:9.

LITERATURA

- [204] Boraska, V, Rayner, NW, Groves, CJ, Frayling, TM, Diakite, M, Rockett, KA, et al. Large-scale association analysis of TNF/LTA gene region polymorphisms in type 2 diabetes. *BMC medical genetics* 2010;11:69.
- [205] Mahajan, A, Tabassum, R, Chavali, S, Dwivedi, O, Chauhan, G, Tandon, N, et al. Obesity-dependent association of TNF-LTA locus with type 2 diabetes in North Indians. *J Mol Med* 2010;88:515-22.
- [206] Boraska, V, Zeggini, E, Groves, CJ, Rayner, NW, Škrabić, V, Diakite, M, et al. Family-based analysis of tumor necrosis factor and lymphotoxin- α tag polymorphisms with type 1 diabetes in the population of South Croatia. *Human Immunology* 2009;70:195-9.
- [207] Golshani, H, Haghani, K, Dousti, M, Bakhtiyari, S. Association of TNF- α 308 G/A Polymorphism With Type 2 Diabetes: A Case–Control Study in the Iranian Kurdish Ethnic Group. *Osong Public Health and Research Perspectives* 2015;6:94-9.
- [208] Dhamodharan, U, Viswanathan, V, Krishnamoorthy, E, Rajaram, R, Aravindhan, V. Genetic association of IL-6, TNF- α and SDF-1 polymorphisms with serum cytokine levels in diabetic foot ulcer. *Gene* 2015;565:62-7.
- [209] Sesti, LFC, Crispim, D, Canani, LH, Polina, ER, Rheinheimer, J, Carvalho, PS, et al. The -308G>A Polymorphism of the TNF Gene Is Associated With Proliferative Diabetic Retinopathy in Caucasian Brazilians With Type 2 Diabetes Association of TNF -308G>A Polymorphism With PDR. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 2015;56:1184-90.
- [210] Lindholm, E, Bakhtadze, E, Cilio, C, Agardh, E, Groop, L, Agardh, C-D. Association between LTA, TNF and AGER Polymorphisms and Late Diabetic Complications. *PLoS ONE* 2008;3:e2546.
- [211] Fassmann, A, Holla, LI, Buckova, D, Vasku, A, Znojil, V, Vanek, J. Polymorphisms in the +252(A/G) lymphotoxin-alpha and the -308(A/G) tumor necrosis factor-alpha genes and susceptibility to chronic periodontitis in a Czech population. *Journal of Periodontal Research* 2003;38:394-9.
- [212] Özer Yücel, Ö, Berker, E, Mesci, L, Eratalay, K, Tepe, E, Tezcan, İ. Analysis of TNF- α (-308) polymorphism and gingival crevicular fluid TNF- α levels in aggressive and chronic periodontitis: A preliminary report. *Cytokine* 2015;72:173-7.

LITERATURA

- [213] Ho, Y-P, Lin, Y-C, Yang, Y-H, Chou, Y-H, Ho, K-Y, Wu, Y-M, et al. Analysis of tumor necrosis factor- α -308 and lymphotoxin- α +252 gene polymorphisms in Taiwanese patients with periodontitis. *Journal of Dental Sciences* 2015;10:316-22.
- [214] Yang, W, Jia, Y, Wu, H. Four tumor necrosis factor alpha genes polymorphisms and periodontitis risk in a Chinese population. *Human Immunology* 2013;74:1684-7.
- [215] Hendley, TM, Sanders, JJ, Palesch, Y, Pandey, JP. Polymorphic cytokine genotypes as markers of disease severity in adult periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology* 1999;26:705-9.
- [216] Galbraith, GMP, Steed, RB, Sanders, JJ, Pandey, JP. Tumor Necrosis Factor Alpha Production by Oral Leukocytes: Influence of Tumor Necrosis Factor Genotype. *Journal of Periodontology* 1998;69:428-33.
- [217] Ding, C, Ji, X, Chen, X, Xu, Y, Zhong, L. TNF- α gene promoter polymorphisms contribute to periodontitis susceptibility: evidence from 46 studies. *Journal of Clinical Periodontology* 2014;41:748-59.
- [218] Schulz, S, Schlitt, A, Lutze, A, Lischewski, S, Seifert, T, Dudakiewa, T, et al. The importance of genetic variants in TNF α for periodontal disease in a cohort of coronary patients. *Journal of Clinical Periodontology* 2012;39:699-706.
- [219] Liu, B, Yu, N, Tan, L-s, Liu, J-b, Guo, Y, Pan, Y-p. [A study of frequency of TNF alpha gene with type 2 diabetes mellitus with chronic periodontitis]. *Shanghai Kou Qiang Yi Xue* 2011;20:169-73.
- [220] Sharma, N, Joseph, R, Arun, R, Chandni, R, Srinivas, K, Banerjee, M. Cytokine gene polymorphism (interleukin-1 β + 3954, Interleukin-6 [- 597/- 174] and tumor necrosis factor- α - 308) in chronic periodontitis with and without type 2 diabetes mellitus. *Indian Journal of Dental Research* 2014;25:375.
- [221] Bidwell, J, Keen, L, Gallagher, G, Kimberly, R, Huizinga, T, McDermott, M, et al. Cytokine gene polymorphism in human disease: on-line databases. *Genes and immunity* 1999;1:3-19.
- [222] Messer, G, Spengler, U, Jung, MC, Honold, G, Blömer, K, Pape, GR, et al. Polymorphic structure of the tumor necrosis factor (TNF) locus: an NcoI polymorphism in the first intron of the human TNF-beta gene correlates with a variant amino acid in position 26 and a reduced level of TNF-beta production. *The Journal of experimental medicine* 1991;173:209-19.

LITERATURA

- [223] Kaňková, K, Stejskalová, A, Pácal, L, Tschoplová, S, Hertlová, M, Krusová, D, et al. Genetic risk factors for diabetic nephropathy on chromosomes 6p and 7q identified by the set-association approach. *Diabetologia* 2007;50:990-9.
- [224] Majetschak, M, Krehmeier, U, Ostroverkh, L, Blömeke, B, Schäfer, M. Alterations in leukocyte function following surgical trauma: Differentiation of distinct reaction types and association with tumor necrosis factor gene polymorphisms. *Clinical and diagnostic laboratory immunology* 2005;12:296-303.
- [225] Abraham, LJ, French, M, Dawkins, R. Polymorphic MHC ancestral haplotypes affect the activity of tumour necrosis factor-alpha. *Clinical & Experimental Immunology* 1993;92:14-8.
- [226] Verjans, GM, Kijlstra, A, Van Linden, SMD, van Eys, GJ, de Waal, LP. Restriction fragment length polymorphism of the tumor necrosis factor region in patients with ankylosing spondylitis. *Arthritis & Rheumatism* 1991;34:486-9.
- [227] Fraile, A, Nieto, A, Beraun, Y, Vlnasco, J, Mataran, L, Martin, J. Tumor necrosis factor gene polymorphisms in ankylosing spondylitis. *Tissue antigens* 1998;51:386-90.
- [228] Chung, JH, Cho, BY, Lee, HK, Kim, TG, Han, H, Koh, CS. The tumor necrosis factor beta* 1 allele is linked significantly to HLA-DR8 in Koreans with atrophic autoimmune thyroiditis who are positive for thyrotropin receptor blocking antibody. *Journal of Korean medical science* 1994;9:155-61.
- [229] Demeter, J, Porzolt, F, Rämisch, S, Schmidt, D, Schmid, M, Messer, G. Polymorphism of the tumour necrosis factor-alpha and lymphotoxin-alpha genes in chronic lymphocytic leukaemia. *British journal of haematology* 1997;97:107-12.
- [230] Fugger, L, Morling, N, Ryder, L, Georgsen, J, Jakobsen, B, Svejgaard, A, et al. Nco I Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) of the Tumor Necrosis Factor (TNF α) region in four autoimmune diseases. *Tissue Antigens* 1989;34:17-22.
- [231] Mizuki, N, Inoko, H, Sugimura, K, Nishimura, K, Nakamura, S, Tanaka, H, et al. RFLP analysis in the TNF-beta gene and the susceptibility to alloreactive NK cells in Behcet's disease. *Investigative ophthalmology & visual science* 1992;33:3084-90.
- [232] Hollá, LI, Fassmann, A, Vašků, A, Znojil, V, Vaněk, J, Vácha, J. Interactions of Lymphotoxin α (TNF- β), Angiotensin-Converting Enzyme (ACE), and Endothelin-1

LITERATURA

- (ET-1) Gene Polymorphisms in Adult Periodontitis. *Journal of Periodontology* 2001;72:85-9.
- [233] Vasconcelos, DFP, da Silva, MA, #xf4, Dias, n, Marques, MR, J, dB, et al. Lymphotoxin-Alpha Gene Polymorphism +252A/G (rs909253, A/G) Is Associated with Susceptibility to Chronic Periodontitis: A Pilot Study. *ISRN Dentistry* 2012;2012:5.
- [234] Montazeri, S, Nalliah, S, Radhakrishnan, AK. Association between polymorphisms in human tumor necrosis factor-alpha (-308) and -beta (252) genes and development of gestational diabetes mellitus. *Diabetes Research and Clinical Practice* 2010;88:139-45.
- [235] Stayoussef, M, Zidi, I, Mansour, J, Moumni, I, Almawi, W, Mahjoub, T. Association of Lymphotoxin Alpha Polymorphism with Type 1 Diabetes in a Tunisian Population. *Biochem Genet* 2014;52:79-89.
- [236] Nishimura, M, Obayashi, H, Mizuta, I, Hara, H, Adachi, T, Ohta, M, et al. TNF, TNF receptor type 1, and allograft inflammatory factor-1 gene polymorphisms in Japanese patients with type 1 diabetes. *Human Immunology* 2003;64:302-9.
- [237] Kim, J-Y, Moon, S-M, Ryu, H-J, Kim, J-J, Kim, H-T, Park, C, et al. Identification of regulatory polymorphisms in the TNF-TNF receptor superfamily. *Immunogenetics* 2005;57:297-303.
- [238] Kammoun-Krichen, M, Bougacha-Elleuch, N, Makni, K, Mnif, M, Jouida, J, Abid, M, et al. A potential role of TNFR gene polymorphisms in autoimmune thyroid diseases in the Tunisian population. *Cytokine* 2008;43:110-3.
- [239] Glossop, JR, Nixon, NB, Dawes, PT, Hassell, AB, Matthey, DL. No association of polymorphisms in the tumor necrosis factor receptor I and receptor II genes with disease severity in rheumatoid arthritis. *Journal of Rheumatology* 2003;30:1406-9.
- [240] Waschke, KA, Villani, A-C, Vermeire, S, Dufresne, L, Chen, T-C, Bitton, A, et al. Tumor Necrosis Factor Receptor Gene Polymorphisms in Crohn's Disease: Association with Clinical Phenotypes. *Am J Gastroenterol* 2005;100:1126-33.
- [241] Pierik, M, Vermeire, S, Steen, KV, Joossens, S, Claessens, G, Vlietinck, R, et al. Tumour necrosis factor- α receptor 1 and 2 polymorphisms in inflammatory bowel disease and their association with response to infliximab. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 2004;20:303-10.

LITERATURA

- [242] Shimada, Y, Tai, H, Endo, M, Kobayashi, T, Yamazaki, K, Yoshie, H, editors. Analysis of TNF receptors Polymorphisms in Japanese patients with aggressive periodontitis. JOURNAL OF DENTAL RESEARCH; 2002: INT AMER ASSOC DENTAL RESEARCHI ADR/AADR 1619 DUKE ST, ALEXANDRIA, VA 22314-3406 USA.
- [243] Pantelidis, P, Lympny, P, Foley, P, Fanning, G, Welsh, K, Du Bois, R. Polymorphic analysis of the high-affinity tumor necrosis factor receptor 2. Tissue antigens 1999;54:585-91.
- [244] Till, A, Rosenstiel, P, Krippner-Heidenreich, A, Mascheretti-Croucher, S, Croucher, PJP, Schäfer, H, et al. The Met-196 → Arg Variation of Human Tumor Necrosis Factor Receptor 2 (TNFR2) Affects TNF- α -induced Apoptosis by Impaired NF- κ B Signaling and Target Gene Expression. Journal of Biological Chemistry 2005;280:5994-6004.
- [245] Geurts, JM, Janssen, RG, van Greevenbroek, MM, van der Kallen, CJ, Cantor, RM, Bu, X-d, et al. Identification of TNFRSF1B as a novel modifier gene in familial combined hyperlipidemia. Human molecular genetics 2000;9:2067-74.
- [246] Peral, B, San Millán, JL, Castello, R, Moghetti, P, Escobar-Morreale, HF. The methionine 196 arginine polymorphism in exon 6 of the TNF receptor 2 gene (TNFRSF1B) is associated with the polycystic ovary syndrome and hyperandrogenism. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 2002;87:3977-83.
- [247] Shimada, Y, Tai, H, Endo, M, Kobayashi, T, Akazawa, K, Yamazaki, K. Association of tumor necrosis factor receptor type 2+ 587 gene polymorphism with severe chronic periodontitis. Journal of clinical periodontology 2004;31:463-9.
- [248] Park, B, Park, J, Jun, JK, Choi, KS, Suh, M. Gender Differences in the Association of Smoking and Drinking with the Development of Cognitive Impairment. PLoS ONE 2013;8:
- [249] Nielsen, NR, Zhang, ZF, Kristensen, TS, Netterstrøm, B, Schnohr, P, Grønbaek, M. Self reported stress and risk of breast cancer: Prospective cohort study. British Medical Journal 2005;331:548-50.
- [250] Lalić, N, Zamaklar, M, Pudar, G, Kocić, R, Antić, S, Pešić, M, et al. Nacionalni vodič dobre kliničke prakse DIABETES MELLITUS. Drugo izmenjeno i dopunjeno ed.

LITERATURA

Milašinović G, editor. Beograd: Agencija za akreditaciju zdravstvenih ustanova Srbije; 2012.

[251] Silness, J, Løe, H. Periodontal Disease in Pregnancy II. Correlation Between Oral Hygiene and Periodontal Condition. *Acta Odontologica Scandinavica* 1964;22:121-35.

[252] O'Leary, TJ, Drake, RB, Naylor, JE. The Plaque Control Record. *Journal of Periodontology* 1972;43:38-.

[253] Susanto, H, Nesse, W, Dijkstra, P, Hoedemaker, E, van Reenen, Y, Agustina, D, et al. Periodontal inflamed surface area and C-reactive protein as predictors of HbA1c: a study in Indonesia. *Clin Oral Invest* 2012;16:1237-42.

[254] Nesse, W, Linde, A, Abbas, F, Spijkervet, FKL, Dijkstra, PU, De Brabander, EC, et al. Dose-response relationship between periodontal inflamed surface area and HbA1c in type 2 Diabetics. *Journal of Clinical Periodontology* 2009;36:295-300.

[255] Savage, A, Eaton, KA, Moles, DR, Needleman, I. A systematic review of definitions of periodontitis and methods that have been used to identify this disease. *Journal of Clinical Periodontology* 2009;36:458-67.

[256] Armitage, GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Annals of periodontology* 1999;4:1-6.

[257] Mullis, KB, Faloona, FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in enzymology* 1987;155:335.

[258] Altarac, S, Šerman, D, Jurin, M, Gamulin, S, Veček, N. Poliakrilamid gel elektroforeza serumskih i tkivnih proteina u bolesnica s tumorom maternice i jajnika 1988.

[259] Leonard, DGB. *Molecular Pathology in Clinical Practice*: Springer Science & Business Media; 2007. 624 p.

[260] Crowther, RJ. *The ELISA Guidebook*. Second Edition ed. Walker JM, editor: Humana Press; 2009.

[261] Montane, J, Cadavez, L, Novials, A. Stress and the inflammatory process: a major cause of pancreatic cell death in type 2 diabetes. *Diabetes, metabolic syndrome and obesity: targets and therapy* 2014;7:25.

LITERATURA

- [262] Ouyang, Y, Virasch, N, Hao, P, Aubrey, MT, Mukerjee, N, Bierer, BE, et al. Suppression of human IL-1 β , IL-2, IFN- γ , and TNF- α production by cigarette smoke extracts. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2000;106:280-7.
- [263] Wirtz, PH, von Känel, R, Kunz-Ebrecht, S, Ehlert, U, Fischer, JE. Enhanced glucocorticoid sensitivity of cytokine release from circulating leukocytes stimulated with lipopolysaccharide in healthy male smokers. *Brain, Behavior, and Immunity* 2004;18:536-43.
- [264] Khan, S, Saub, R, Vaithilingam, RD, Safii, SH, Vethakkan, SR, Baharuddin, NA. Prevalence of chronic periodontitis in an obese population: a preliminary study. *BMC oral health* 2015;15:114.
- [265] Addy, CL, Gavrilu, A, Tsiodras, S, Brodovicz, K, Karchmer, AW, Mantzoros, CS. Hypoadiponectinemia is associated with insulin resistance, hypertriglyceridemia, and fat redistribution in human immunodeficiency virus-infected patients treated with highly active antiretroviral therapy. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2003;88:627-36.
- [266] Gale, EA, Gillespie, KM. Diabetes and gender. *Diabetologia* 2001;44:3-15.
- [267] Verthelyi, D, Klinman, DM. Sex hormone levels correlate with the activity of cytokine-secreting cells in vivo. *Immunology* 2000;100:384-90.
- [268] Surwit, RS, van Tilburg, MAL, Zucker, N, McCaskill, CC, Parekh, P, Feinglos, MN, et al. Stress Management Improves Long-Term Glycemic Control in Type 2 Diabetes. *Diabetes Care* 2002;25:30-4.
- [269] Wirtz, PH, Känel, Rv, Emini, L, Suter, T, Fontana, A, Ehlert, U. Variations in anticipatory cognitive stress appraisal and differential proinflammatory cytokine expression in response to acute stress. *Brain, Behavior, and Immunity* 2007;21:851-9.
- [270] Li, H, Yang, H, Ding, Y, Aprecio, R, Zhang, W, Wang, Q, et al. Experimental periodontitis induced by *Porphyromonas gingivalis* does not alter the onset or severity of diabetes in mice. *Journal of Periodontal Research* 2013;48:582-90.
- [271] Su, Y, Wang, D, Xuan, D, Ni, J, Luo, S, Xie, B, et al. Periodontitis as a Novel Contributor of Adipose Tissue Inflammation Promotes Insulin Resistance in a Rat Model. *Journal of Periodontology* 2013;84:1617-26.

LITERATURA

- [272] Michalowicz, BS, Diehl, SR, Gunsolley, JC, Sparks, BS, Brooks, CN, Koertge, TE, et al. Evidence of a substantial genetic basis for risk of adult periodontitis. *Journal of periodontology* 2000;71:1699-707.
- [273] Rađenović-Petković, T, Pejčić, T, Videnović-Ivanov, J, Jevtović-Stoimenov, T, Janković, I, Nastasijević-Borovac, D, et al. Tumor necrosis factor alpha gene polymorphism in serbian patients with sarcoidosis. *Srpski arhiv za celokupno lekarstvo* 2013;141:169-72.
- [274] Jevtovic-Stoimenov, T, Kocic, G, Pavlovic, D, MaCukanovic-Golubovic, L, Marjanovic, G, Djordjevic, V, et al. Polymorphisms of tumor-necrosis factor- α -308 and lymphotoxin- α + 250: Possible modulation of susceptibility to apoptosis in chronic lymphocytic leukemia and non-Hodgkin lymphoma mononuclear cells. *Leukemia & Lymphoma* 2008;49:2163-9.
- [275] Popadic, S, Savic, E, Markovic, M, Ramic, Z, Medenica, L, Pravica, V, et al. TNF, IL12B, and IFNG Gene Polymorphisms in Serbian Patients with Psoriasis. *Annals of dermatology* 2015;27:128-32.
- [276] Kostić, M, Nikolić, N, Ilić, B, Jelovac, D, Trakilović, S, Božović, M, et al. Association of TNF-R2 (676T> G) single nucleotide polymorphism with head and neck cancer risk in the Serbian population. *Archives of Biological Sciences* 2013;65:387-93.
- [277] Sakellari, D, Katsares, V, Georgiadou, M, Kouvatsi, A, Arsenakis, M, Konstantinidis, A. No correlation of five gene polymorphisms with periodontal conditions in a Greek population. *Journal of Clinical Periodontology* 2006;33:765-70.
- [278] Al-Azzam, SI, Khabour, OF, Alzoubi, KH, Ghanma, MW, Alhasan, AY. The role of TNF- α G-308A promoter polymorphism in glycemic control in Type 2 diabetes patients. *J Endocrinol Invest* 2014;37:113-8.
- [279] Gordon, A, Lagan, A, Aganna, E, Cheung, L, Peters, C, McDermott, M, et al. TNF and TNFR polymorphisms in severe sepsis and septic shock: a prospective multicentre study. *Genes and immunity* 2004;5:631-40.
- [280] Sainz, J, Salas-Alvarado, I, Lopez-Fernandez, E, Olmedo, C, Comino, A, Garcia, F, et al. TNFR1 mRNA expression level and TNFR1 gene polymorphisms are predictive markers for susceptibility to develop invasive pulmonary aspergillosis. *International journal of immunopathology and pharmacology* 2010;23:423-36.

LITERATURA

- [281] Vendrell, J, Broch, M, Fernandez-Real, JM, Gutiérrez, C, Simón, I, Megia, A, et al. Tumour necrosis factor receptors (TNFRs) in Type 2 diabetes. Analysis of soluble plasma fractions and genetic variations of TNFR2 gene in a case-control study. *Diabetic Medicine* 2005;22:387-92.
- [282] Heesen, M, Kunz, D, Bachmann-Mennenga, B, Merk, HF, Bloemeke, B. Linkage disequilibrium between tumor necrosis factor (TNF)- α -308 G/A promoter and TNF- β Nco I polymorphisms: Association with TNF- α response of granulocytes to endotoxin stimulation. *Critical Care Medicine* 2003;31:211-4.
- [283] Wu, TL, Tsai, CC, Wang, YY, Ho, KY, Wu, YM, Hung, HC, et al. The association between the RAGE G82S polymorphism, sRAGE and chronic periodontitis in Taiwanese individuals with and without diabetes. *Journal of Periodontal Research* 2015;50:881-9.
- [284] Lucena, KCR, Corrêa, MP, Leão, JC, de Souza, PRE, Cimões, R, Carvalho, AdAT. Influence of polymorphisms in osteoprotegerin on susceptibility to periodontal disease in patients with type 2 diabetes. *Revista Odonto Ciência (Journal of Dental Science)* 2013;28:41-6.
- [285] Costa Araújo, N, De Aguiar Bello, DM, Crovella, S, De Souza, PRE, Donos, N, Cimões, R. Mannose binding lectin genes (MBL2) polymorphisms and the periodontal disease in diabetic patients. *Revista Odonto Ciencia* 2011;26:203-8.
- [286] Fernández-Real, J, Gutierrez, C, Broch, M, Casamitjana, R, Vendrell, J, Ricart, W. Insulin response to intravenous glucose correlates with plasma levels of the tumor necrosis factor receptor-1. *Diabetes care* 1999;22:868-70.
- [287] Nguyen-Khac, E, Houchi, H, Daoust, M, Dupas, JL, Naassila, M. Lack of association between tumour necrosis factor receptor types 1 and 2 gene polymorphism and severe acute alcoholic hepatitis. *European journal of gastroenterology & hepatology* 2010;22:794-800.
- [288] Ortiz, P, Bissada, NF, Palomo, L, Han, YW, Al-Zahrani, MS, Panneerselvam, A, et al. Periodontal Therapy Reduces the Severity of Active Rheumatoid Arthritis in Patients Treated With or Without Tumor Necrosis Factor Inhibitors. *Journal of Periodontology* 2009;80:535-40.

LITERATURA

- [289] Kiortsis, DN, Mavridis, AK, Vasakos, S, Nikas, SN, Drosos, AA. Effects of infliximab treatment on insulin resistance in patients with rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis. *Annals of the rheumatic diseases* 2005;64:765-6.
- [290] Dominguez, H, Storgaard, H, Rask-Madsen, C, Steffen Hermann, T, Ihlemann, N, Baunbjerg Nielsen, D, et al. Metabolic and Vascular Effects of Tumor Necrosis Factor- α Blockade with Etanercept in Obese Patients with Type 2 Diabetes. *Journal of Vascular Research* 2005;42:517-25.
- [291] Winzen, R, Wallach, D, Kemper, O, Resch, K, Holtmann, H. Selective up-regulation of the 75-kDa tumor necrosis factor (TNF) receptor and its mRNA by TNF and IL-1. *The Journal of Immunology* 1993;150:4346-53.
- [292] Aderka, D, Engelmann, H, Maor, Y, Brakebusch, C, Wallach, D. Stabilization of the bioactivity of tumor necrosis factor by its soluble receptors. *The Journal of experimental medicine* 1992;175:323-9.

EVIDENCIONI KARTON

Karton broj:

Grupa:

1. Kontrolna
2. Parodontopatija+sistemski zdravi
3. Parodontopatija+dm₂

1. Generalije

Ime:	
Pol	m <input type="checkbox"/> ž <input type="checkbox"/>
Broj telefona:	
Datum rođenja:	
Zaposlenje, zanimanje	

2. Kriterijumi za isključenje pacijenata iz studije

- antibiotici u prethodna 3 meseca
- antiinflamatorni lekovi u prethodna 3 meseca
- terapija parodontopatije u prethodnih godinu i po dana
- menstruacija, dojenje, trudnoća
- prisustvo sistemskih oboljenja osim dijabetesa
- gojaznost (BMI index > 30kg/m²)
- svakodnevna upotreba lokalnih oralnih antiseptika
- prisustvo bilo kog oralnog oboljenja sem karijesa i parodontopatije
- istorija bilo kog maligniteta
- manje od 20 zuba (ne računaju se treći molari)
- prisustvo oraalnih oboljenja sem karijesa i parodontopatije
- povreda u prethodnih 6 meseci

3. Lična anamneza

<input type="checkbox"/> BMI (kg/m ²)= <ul style="list-style-type: none"> • Telesna masa= • Telesna visina= 	
<input type="checkbox"/> Krvna slika i biohemijske analize	
<ul style="list-style-type: none"> • Glukoza • HbA_{1c}= • HDL • LDL • Hol • Tgc 	<ul style="list-style-type: none"> • Er • Hgb • MCV • MCH • MCHC • Fibrinogen • Sedimentacija

3a- Dijabetes melitus grupa

Godina dijagnostikovanja dijabetesa	
Godina početka terapije	
Terapija <ul style="list-style-type: none"> • Oralni hipoglikemici • Kombinovana terapija • Insulin 	Komplikacije dijabetesa <ul style="list-style-type: none"> • Retinopatija • Nefropatija • Periferna neuropatija • Komplikacije na perifernim ks • Makrovaskularne komplikacije <ul style="list-style-type: none"> ○ Oboljenja koronarnih ks/infarkt miokarda ○ Cerebrovaskularna oboljenja/šlog

3b- nivo stresa

Intenzitet stresa	Nivo stresa
0= bez stresa	(intenzitet + frekvenca)
1=nizak	
2=umeren	0-1=nizak nivo stresa
3=visok intenzitet	
Učestalost stresa	2-4= umeren nivo stresa
0= nikad/retko	
1= mesečno	5-6=visok nivo stresa
2= nedeljno	
3= dnevno	

3c. Fizička aktivnost:

- Vrsta _____
 - Aerobno vežbanje
 - Anaerobno vežbanje
- Učestalost
 - Redovno (>2 puta nedeljno)
 - Neredovno/povremeno
 - Bez fizičke aktivnosti
- Intenzitet
 - Slab
 - Umeren
 - Jak

4. Porodična anamneza

5. Loše navike

<input type="checkbox"/> Reumatoidna i autoimuna oboljenja	<input type="checkbox"/> Pušenje*
<input type="checkbox"/> Dijabetes tip 1 tip2	<input type="checkbox"/> Alkohol
<input type="checkbox"/> Parodontopatija A C	<input type="checkbox"/> Disanje na usta
	<input type="checkbox"/> Bruksizam/stiskanje zuba
	<input type="checkbox"/> Grickanje stranih predmeta

*Pušenje cigara:

- pušači
 - $N < 10$ cigareta na dan
 - $N \geq 10$ cigareta na dan
- nepušači (nikad nisu pušili cigare)
- bivši pušači
 - ostavili pušenje pre manje od 5 godina
 - ostavili pušenje pre više od 5 godina

PPY=

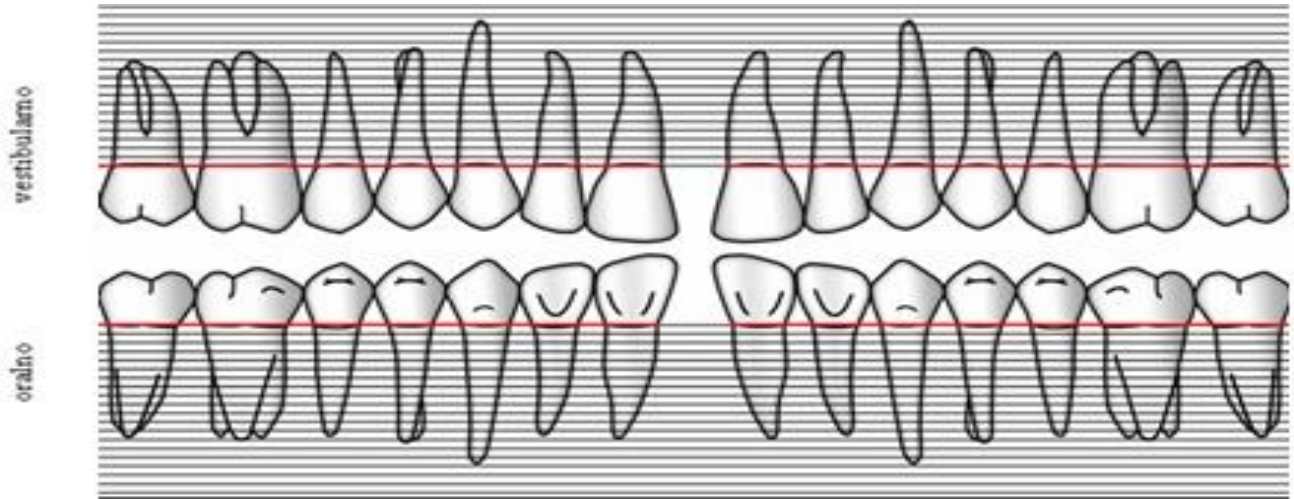
Broj zuba u ustima: _____

Prisustvo protetskih nadoknada u ustima:

- ne
- da
 - mobilne
 - fiksne

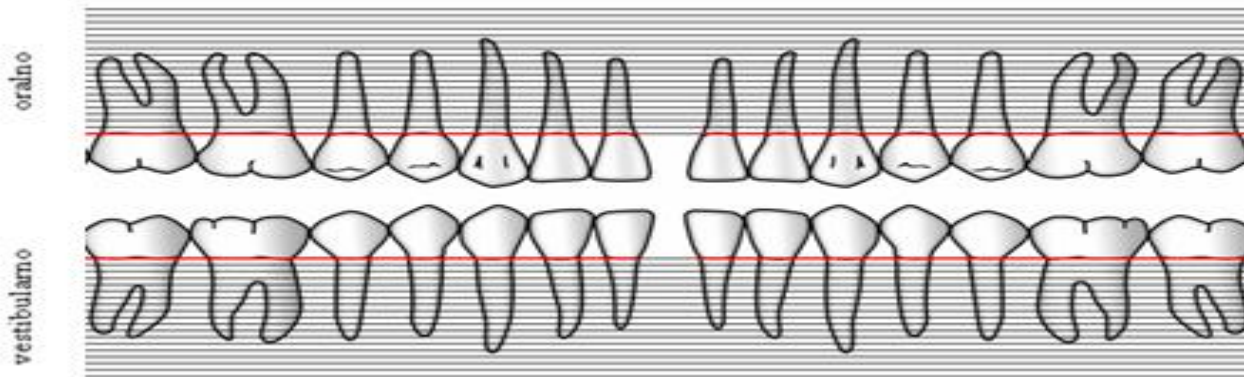
KLINIČKA MERENJA

PI														
KNP														
DS														
NPE														
	17	16	15	14	13	12	11	21	22	23	24	25	26	27



	17	16	15	14	13	12	11	21	22	23	24	25	26	27
PI														
KNP														
DS														
NPE														

PI														
KNP														
DS														
NPE														
	47	46	45	44	43	42	41	31	32	33	34	35	36	37



	47	46	45	44	43	42	41	31	32	33	34	35	36	37
PI														
KNP														
DS														
NPE														

uzorke uzeo

potpis ispitanika

Datum

- PI=
- BOP=
- DS=
- NPE=
- PESA=
- PISA=

PODACI O AUTORU

Doktor stomatologije Sanja Matić je rođena 16. februara 1984. godine u Negotinu. Stomatološki fakultet Univerziteta u Beogradu upisala je 2003. godine, a diplomirala 2009. godine sa prosečnom ocenom 9,64. U toku studija bavila se studentskim naučno-istraživačkim radom i kao autor ili koautor učestvovala na pet studentskih kongresa. Akademske 2008/2009. godine učestvovala u nastavi kao demonstrator na Klinici za bolesti zuba. Nakon obavljenog pripravničkog staža na klinikama Stomatološkog fakulteta u Beogradu i Doma zdravlja Vračar u Beogradu, stručni ispit za doktore stomatologije je položila 28. aprila 2010. godine. Doktorske studije upisala je akademske 2009/2010. godine iz naučne oblasti Oralna medicina i parodontologija. Položila je sve ispite predviđene planom i programom sa prosečnom ocenom 9,69. Od upisa doktorskih studija do januara 2011. godine bila je stipendista Fondacije za razvoj naučnog i umetničkog podmlatka i stipendista Ministarstva nauke i tehnološkog razvoja (angažovana na projektu broj 145042). Januara 2011. godine angažovana je kao pripravnik na projektu Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije pod nazivom „Interakcija etiopatogenetskih mehanizama parodontopatije i periimplantitisa sa sistemskim bolestima današnjice“ broj 41008. Kao student doktorskih studija od 2011. godine volonterski je učestvovala u praktičnoj nastavi studenata IV i V godine studija na Klinici za oralnu medicinu i parodontologiju.

Dr Sanja Matić je autor ili koautor deset radova saopštenih na domaćim i međunarodnim studentkim kongresima i osam radova saopštenih na međunarodnim naučnim skupovima (M34). Autor je dva rada objavljena časopisima indeksiranim u bazi SCI liste (M23).

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а _____ Сања Матић _____

број индекса _____ 4011/2009 _____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

«Утицај полиморфизама гена за инфламаторне цитокине и њихове рецепторе на ниво циркулишућих цитокина и клиничке параметре код пацијената са хроничном пародонтопатијом и дијабетес мелитусом типа 2»

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

Потпис докторанда

У Београду, ____ април 2016.

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора _____ Сања Матић _____

Број индекса _____ 4011/2009 _____

Студијски програм _____ Докторске студије _____

Наслов рада «Утицај полиморфизама гена за инфламаторне цитокине и њихове рецепторе на ниво циркулишућих цитокина и клиничке параметре код пацијената са хроничном пародонтопатијом и дијабетес мелитусом типа 2»

Ментор ___Проф Ана Пуцар, Проф Јелена Милашин _____

Потписани/а _____ Сања Матић _____

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

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

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

Потпис докторанда

У Београду, _____ април 2016. _____

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

«Утицај полиморфизама гена за инфламаторне цитокине и њихове рецепторе на ниво циркулишућих цитокина и клиничке параметре код пацијената са хроничном пародонтопатијом и дијабетес мелитусом типа 2» која је моје ауторско дело.

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

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

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

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

Потпис докторанда

У Београду, ____ април 2016.

1. Ауторство - Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. Ауторство – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.