



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

Драгана Н. Станишић

Ефекти пробиотика (*Lactobacillus Rhamnosus*) на пародонтопатију код мишева са хиперхомоцистеинемијом: улога дисбиозе

Докторска дисертација

Крагујевац, 2021. године



UNIVERZITET U KRAGUJEVCU
FAKULTET MEDICINSKIH NAUKA

Dragana N. Stanišić

**Efekti probiotika (*Lactobacillus Rhamnosus*) na
parodontopatiju kod miševa sa
hiperhomocisteinemijom: uloga disbioze**

Doktorska disertacija

Kragujevac, 2021. godine



UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC
FACULTY OF MEDICAL SCIENCES

Dragana N. Stanišić

**Effects of probiotic (*Lactobacillus Rhamnosus*)
on periodontal disease in mice with
hyperhomocysteinemia: the role of dysbiosis**

Doctoral Dissertation

Kragujevac, 2021

I Аутор
Име и презиме: Драгана Станишић
Датум и место рођења: 10.09.1992. године, Урошевац
Садашње запошљење: Факултет медицинских наука, Универзитет у Крагујевцу
II Докторска дисертација
Наслов: Ефекти пробиотика (<i>Lactobacillus Rhamnosus</i>) на пародонтопатију код мишева са хиперхомоцистеинемијом: улога дисбиозе
Број страница: 101
Број слика: 3 схеме; 5 слика; 10 фигура; 4 графика
Број библиографских података: 252
Установа и место где је рад израђен: Катедра за физиологију, Медицински факултет, Универзитет у Лујвилу, Кентаки, Сједињене Америчке Државе
Научна област (УДК): медицина
Ментори: Доц. др Невена Јеремић, доцент Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу; Проф. др Suresh Tyagi, редовни професор Медицинског факултета, Универзитета у Лујвилу, Кентаки, Сједињене Америчке Државе.
III Оцена и одбрана
Датум пријаве тезе: 12.06.2020. године
Број одлуке и датум прихватања теме докторске/уметничке дисертације: IV-03-708/12, 08.10.2020. године
Комисија за оцену научне заснованости теме и испуњености услова кандидата:
Проф. др Радмила Обрадовић, ванредни професор Медицинског факултета Универзитета у Нишу, за ужу научну област Пародонтологија и орална медицина, председник
Проф. др Владимир Живковић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Физиологија, члан
Доц. др Тамара Николић Турнић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Клиничка фармација, члан
Комисија за оцену и одбрану докторске/уметничке дисертације:
Датум одбране дисертације:

I Autor
Ime i prezime: Dragana Stanišić
Datum i mesto rođenja: 10.09.1992. godine, Uroševac
Sadašnje zapošljenje: Fakultet medicinskih nauka, Univerzitet u Kragujevcu
II Doktorska disertacija
Naslov: Efekti probiotika (<i>Lactobacillus Rhamnosus</i>) na parodontopatiju kod miševa sa hiperhomocisteinemijom: uloga disbioze
Broj stranica: 101
Broj slika: 3 sheme; 5 slika; 10 figura; 4 grafika
Broj bibliografskih podataka: 252
Ustanova i mesto gde je rad izrađen: Katedra za fiziologiju, Medicinski fakultet, Univerzitet u Lujvilu, Sjedinjene Američke Države.
Naučna oblast (UDK): medicina
Mentori: Doc. dr Nevena Jeremić, docent Fakulteta medicinskih nauka, Univerziteta u Kragujevcu; Prof. dr Suresh Tyagi, redovni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Lujvilu, Sjedinjene Američke Države
III Ocena i odbrana
Datum prijave teze: 12.06.2020. godine
Broj odluke i datum prihvatanja teme doktorske /umetničke disertacije: IV-03-708/12, 08.10.2020. godine
Komisija za ocenu naučne zasnovanosti teme i ispunjenosti uslova kandidata:
Prof. dr Radmila Obradović, vanredni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Nišu, za užu naučnu oblast Parodontologija i oralna medicina, predsednik
Prof. dr Vladimir Živković, vanredni profesor Fakulteta medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu, za užu naučnu oblast Fiziologija, član
Doc. dr Tamara Nikolić Turnić, docent Fakulteta medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu, za užu naučnu oblast Klinička farmacija, član
Komisija za ocenu i odbranu doktorske/umetničke disertacije:
Datum odbrane disertacije:

I Autor
Name and surname: Dragana Stanisic
Date and place of birth: 10.09.1992. Urosevac
Current employment: Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac
II Doctoral Dissertation
Title: Effects of probiotic (<i>Lactobacillus Rhamnosus</i>) on periodontal disease in mice with hyperhomocysteinemia: the role of dysbiosis
No. of pages: 101
No. of images: 3 schemes; 5 images; 10 figures; 4 graphics
No. of bibliographic data: 252
Institution and place of work: Department of Physiology, School of Medicine, University of Louisville, Kentucky, USA.
Scientific area (UDK): medicine
Mentors: Dr. Nevena Jeremić, Assistant professor of Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Serbia; Dr. Suresh Tyagi, Full professor at School of Medicine, University of Louisville, Kentucky, USA
III Grade and Dissertation Defense
Topic Application Date: 12.06.2020.
Decision number and date of acceptance of the doctoral/artistic dissertation topic: IV-03-708/12, 08.10.2020.
Commission for evaluation of the scientific merit of the topic and the eligibility of the candidate:
Assos. prof. Radmila Obradović, Associate professor of Medical Faculty, University of Nis for the narrower scientific field of Periodontology and Oral Medicine, president
Assos. prof. Vladimir Živković, Associate professor of Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac for the narrower scientific field of Physiology, member
Assis. prof. Tamara Nikolić Turnić, Assistant professor of Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac for the narrower scientific field of Clinical pharmacy, member
Commission for evaluation and defense of doctoral/artistic dissertation:
Date of Dissertation Defense:

САЖЕТАК

Увод: *Lactobacillus rhamnosus* (LGG) је грам позитивни факултативни анаероб, пробиотик, који не ферментира сахарозу и лактозу. С обзиром на антиминобна, антиинфламацијска и некарриогена својства, LGG би могао понудити смањење ризика, економски прихватљив начин у превенцији и лечењу пародонталне болести као и одличну опцију за постизање и одржавање пародонтолошког здравља.

Циљ: Циљ ове студије био је да се испитају ефекти LGG код здравих, мишева са пародонтопатијом (PD), мишева са урођеним недостатком цистатион β -синтетазе (хиперхомоцистеинемичних (HNCy) мишева) и мишева са дисбиозом, као и утицај урођеног недостатка цистатион β -синтетазе и дисбиозе на настанак PD.

Материјал и методе: У студији било је укључено 48 мишева, 36 мишева дивљег типа (*Wild type*, WT, C57BL/6J) и 12 мишева са урођеним недостатком цистатион β -синтетазе (CBS^{+/-} *knock-out* хетерозиготи, B6.129P2-Cbstm1Unc/J 002853) који су разврстани у следећих осам група: здрави мишеви (WT), мишеви третирани пробиотиком LGG, мишеви којима је индукована PD, мишеви којима је индукована PD и који су третирани пробиотиком LGG, CBS^{+/-} мишеви, CBS^{+/-} мишеви који су третирани пробиотиком LGG, мишеви којима је индукована дисбиоза, мишеви којима је индукована дисбиоза и који су третирани пробиотиком LGG. Третман LGG подразумевао је тромесечну примену перорално, у дози од 2.5×10^5 CFU дневно. Након третмана животиње су жртвоване и спроведене су микробиолошке анализе фецеса, измерен је гингивални проток крви *Laser Doppler*-ом, радиографска и хистоморфометријска анализа пародонталног ткива, зимографијска анализа активности матриксних металопротеиназа, *Western blot* анализа експресије протеина и квантитативна реакција ланчане полимеризације у реалном времену.

Резултати: LGG примњен код наведених група мишева показао је антиминобне и антиинфламацијске ефекте, побољшао опоравак пародонталног ткива и допринео очувању здравог. LGG је побољшао стање микробиоте код свих екперименталних група а тиме утицао и на побољшање PD и показао превентивно дејство у настанку исте. Такође, резултати су показали да дисбиоза и хиперхомоцистеинемична, у нашем случају као урођени поремећај, потпомажу настанку PD док хиперхомоцистеинемична, као индивидуални поремећај, индукује дисбиозу.

Закључак: LGG преко комплексних механизма остварује антиминобне, антиинфламацијске и превентивне ефекте у стању пародонтопатије. LGG доприноси побољшању и очувању пародонталног ткива мишева. HNCy и дисбиоза утичу и потпомажу настанку PD.

Кључне речи: *Lactobacillus rhamnosus*, пародонтопатија, HNCy, дисбиоза, пробиотици, MMP, микробиота

ABSTRACT

Introduction: *Lactobacillus rhamnosus* (LGG) is a gram positive facultative anaerobic, probiotic, which does not ferment sucrose and lactose. Given its antimicrobial, anti-inflammatory and non-cariogenic properties, LGG could offer risk reduction, an inexpensive way to prevent and treat periodontal disease as well as an excellent option for achieving and maintaining periodontal health.

Aim: The aim of this study was to examine the effects of LGG in healthy mice with periodontal disease (PD), mice with congenital cystation β -synthetase deficiency (hyperhomocysteinemic (HHcy) mice) and mice with dysbiosis, as well as the effect of congenital β -cystation deficiency synthetases and dysbioses on the formation of PD.

Material and methods: The study included 48 mice, 36 wild-type mice (Wild type, WT, C57BL/6J) and 12 mice with congenital cystation β -synthetase deficiency (CBS^{+/-} knock-out heterozygotes, B6.129P2 - Cbstm1Unc/J 002853) classified into the following eight groups: healthy mice (WT), mice treated with LGG probiotics, PD-induced mice, PD-induced mice treated with LGG probiotics, CBS^{+/-} mice, CBS^{+/-} mice treated with the LGG probiotic, mice induced by dysbiosis, mice induced with dysbiosis and treated with the probiotic LGG. LGG treatment required quarterly administration orally, at a dose of 2.5×10^5 CFU. After treatment, the animals were sacrificed and microbiological analyzes of feces, gingival blood flow was measured Laser Doppler, radiographic and histomorphometric analysis of periodontal tissue zymographic analysis of MMP activity, Western blot analysis of protein expression and quantitative real-time chain polymerization reaction were performed.

Results: LGG applied to these groups of mice showed antimicrobial and anti-inflammatory effects, improved periodontal tissue recovery and contributed to maintaining healthy. LGG improved the condition of the microbiota in all experimental groups and thus influenced the improvement of periodontitis and showed a preventive effect in its development. Also, the results showed that dysbiosis and hyperhomocysteinemia, in our case as a congenital disorder, contribute to the development of periodontitis while hyperhomocysteinemia, as an individual disorder, induces dysbiosis.

Conclusions: LGG through complex mechanisms achieves antimicrobial, anti-inflammatory and preventive effects in the periodontal disease. LGG contributes to the improvement and preservation of periodontal tissue in mice. HHcy and dysbiosis affect and promote the development of periodontitis.

Key words: *Lactobacillus rhamnosus*, periodontitis, HHcy, dysbiosis, probiotics, MMP, microbiota

САДРЖАЈ

1. УВОД	1
1.1. Пародонтопатија	1
1.1.1. Етиологија пародонтопатије	3
1.1.1.1. Дентални плак са микроорганизмима	3
1.1.1.2. Микроорганизми денталног плака	4
1.1.1.3. Нутритивни фактори, проток крви и матриксне металопротеиназе	5
1.1.1.4. Генетски фактори	7
1.1.1.5. Остали етиолошки фактори	8
1.1.2. Патогенеза пародонтопатије	8
1.1.2.1. Улога урођеног и стеченог имунитета у патогенези пародонтопатије	9
1.1.3. Терапија пародонтопатије	11
1.2. Пробиотици	11
1.2.1. Механизам дејства пробиотика	12
1.2.2. Индикације за употребу пробиотика	15
1.2.3. Пробиотици и орално здравље	15
1.2.4. Терапијско дејство пробиотика у пародонтопатији	16
1.3. Хомоцистеин и хиперхомоцистеинемија	18
1.3.1. Хомоцистеин – историјат, карактеристике и метаболизам	18
1.3.2. Хиперхомоцистеинемија	19
1.3.3. Улога хомоцистеина у ремоделовању костију и настанку пародонтопатије	20
1.4. Дисбиоза	23
1.4.1. Орални микробиом	24
1.4.2. Цревни микробиом	25
1.4.3. Улога дисбиозе у настанку пародонтопатије	27
2. ЦИЉЕВИ СТУДИЈЕ	30
3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ	32
3.1. Екперименталне животиње	33
3.2. <i>In vivo</i> екпериментални протокол	33
3.2.1. Липополисахаридом (<i>P.ginivalis</i>) индукована пародонтопатија	33
3.2.2. HFD индукована цревна дисбиза	35
3.2.3. Хронични третман мишева пробиотиком (<i>Lactobacillus rhamnosus</i>)	35
3.2.4. Генотипизација мишева	35
3.2.5. Гингивални проток крви мерен ласерским доплером	36
3.2.6. Микробиолошка анализа фецеса	36

3.3.	Жртововање животиња и сакупљање узорака крви.....	36
3.4.	<i>In vitro</i> екпериментални протокол.....	37
3.4.1.	Патохистолошка припрема ткива.....	37
3.4.2.	Бојење хематоксилин-еозином	37
3.4.3.	Бојење тартарат-резистентном фосфатазом	37
3.4.4.	Хистоморфометријске анализе пародонталног ткива	38
3.4.5.	Радиографија мандибула	38
3.4.6.	Одређивање концентрације хомоцистеина.....	39
3.4.7.	Одређивање концентрације липополисахарид везујућег протеина	39
3.4.8.	Одређивање експресије цитокина	39
3.4.9.	Одређивање активности матриксних металопроотеиназа	40
3.4.10.	Одређивање експресије протеина од интереса.....	40
3.4.11.	Квантитативна полимеразна ланчана реакција у реалном времену.....	41
3.5.	СТАТИСТИЧКА АНАЛИЗА	43
4.	РЕЗУЛТАТИ.....	45
4.1.	Утицај примењених третмана на телесну тежину и тежину мандибуле мишева	45
4.2.	Потврда генотипске разлике екперименталних мипева – генотипизација.....	46
4.3.	Утицај примењених третмана на системске вредности хомоцистеина	47
4.4.	Утицај примењених третмана на стање микробиоте мишева.....	48
4.5.	Утицај примењених третмана на системске вредности липополисахарид везујућег протеина.....	52
4.6.	Утицај примењених третмана на функционално ремоделовање пародонталног ткива.....	53
4.6.1.	Утицај примењених третмана на гингивални проток крви.....	53
4.6.2.	Утицај примењених третмана на патохистолошко стање пародонталог ткива	55
4.6.3.	Утицај примењених третмана стање пародонталог ткива-радиографска анализа.....	57
4.7.	Утицај примењених третмана на молекуларно ремоделовање пародонталног ткива.....	58
4.7.1.	Утицај примењених третмана на матриксно ремоделовање пародонталног ткива.....	58
4.7.2.	Утицај примењених третмана на експресију серумских цитокина.....	59
4.7.3.	Утицај примењених третмана на експресију протеина пародонталног ткива	61
4.7.4.	Утицај примењених третмана на експресију гена пародонталног ткива.....	63
5.	ДИСКУСИЈА.....	66
6.	ЗАКЉУЧЦИ	78
6.1.	БУДУЋА ИСТРАЖИВАЊА.....	80
7.	СКРАЋЕНИЦЕ.....	82
8.	ЛИТЕРАТУРА.....	84

I УВОД

1. УВОД

1.1. Пародонтопатија

Пародонтопатија је патолошки процес који захвата све делове пародонцијума који подржавају зубе и једно је од два најзаступљенија обољења усне дупље од које болује око 90% светске популације (*Pihlstrom et al., 2005*). Према извештају Светске Здравствене Организације, 15-20% одраслих широм света, средњих година, патило је од најтеже форме пародонталне болест која је резултирала губитком зуба, док 64,7 милиона становника Америке, 47,2%, старијих од 30 година, имају неки облик пародонталне болести (*World Health Organization, 2012*). Орално здравље људи у Републици Србији прати светску статистику. Наиме, око 70% нашег становништва у једном тренутку свог живота се јавило стоматологу због крварења десни, док је много већи број оних који су се јавили по губитку зуба због пародонтопатије (*Djukanović et al., 1983; Dakovic and Pavlovic, 2008*). Клинички знаци пародонтопатије су крварење при сондирању, гингивална рецесија, губитак епителног припоја, присуство пародонталних џепова и други. У зависности од присуства или одсуства епителног припоја и дубине пародонталних џепова, пародонтопатија се може класификовати на благи (епителни припој ≥ 3 mm и пародонтални џепови ≥ 5 mm), средњи (епителни припој ≥ 4 mm и пародонтални џепови ≥ 5 mm) и тежак (епителни припој ≥ 6 mm и пародонтални џепови ≥ 5 mm) облик (*Eke et al., 2012; Albandar, 2007*).

Пародонтопатија је најчешће хронично, запаљенско обољење које утиче на ткива која окружују зубе (*Eke et al., 2012*). Пре свега ово обољење је узроковано повећањем броја специфичних бактерија пародонта које могу постати патогене услед промене локалног окружења и инфламацијског одговора домаћина (*Albandar, 2007; Kinane, 2001; Rajakaruna et al., 2018*). Последица поменуте интеракције је разарање везивног ткива гингиве, периодонталног лигамента и алвеоларне кости (*Nikitakis et al., 2017*).

Периодонцијум је реч грчког порекла и састоји се од речи *περί*, што значи околно и *odont*, што значи зуб и представља један од најважнијих делова пародонцијума. Периодонцијум је претежно везивно ткиво, које окружује корен зуба и причвршћује га за алвеоларну кост (*Bartold and Van Dyke, 2013*). Локацијски је ово ткиво смештено у периодонталном простору, између цемента корена зуба и алвеоларне кости и представља део пародонта који је један од најважнијих у патогенези пародонталне болести (*Cekici et al., 2014*). Састав периодонцијума чине: колагена и еластична влака, многобројне ћелије (фибробласти, лимфоцити, полиморфнонуклеарни леукоцити и др.) крвни и лимфни судови, нерви, основна екстрацелуларна супстанца - протеини, хијалуронска киселина, матиксне металопроотеиназе (ММР) и други (*Kinane et al., 2017*). Периодонцијум има веома важну улогу у верификацији експерименталне и клиничке пародонтопатије (*Nanci and Bosshardt, 2006*). Поред периодонцијума, пародонцијум чине и гингива, цемент и алвеоларна кост. Гингива је део пародонцијума који је највише експониран и изложен утицајима спољашње средине и управо у томе се огледа и њена најважнија улога, заштитна. Чврсто је припојена за кост на којој лежи. Пристутство колагених влакана и одсуство субмукозе чини је непокретном и обезбеђује потребну чврстину, како би успешно заштитила пародонт (*Schroeder and Listgarten, 1997*). Анатомијски, дели се на слободну, интерденталну и фиксирану гингиву. Слободна или маргинална гингива простире се у пределу врата зуба, није припојена за подлогу због чега је и добила такав назив. Унутрашња површина слободне гингиве наставља се, у апикалном правцу прелазећи у припојни епител. Припојни епител обухвата врат зуба са свих страна и чврсто је припојен за цемент корена зуба, његова ширина износи од

0,23 mm до 1,35 mm. Сулкусни епител слободне гингиве и припојни епител не орожавају што чини овај део гингиве неотпорним и погодним за настанак инфламације (Nanci and Bosshardt, 2006; Schroeder and Listgarten, 1997). Припојни епител је изузетно танак и састоји се од 20-30 слојева ћелија. У апикалном делу број ћелија је толико мали да садржи само један слој где су ове ћелије међусобно слабо повезане а међућелијски простори већи што омогућава лакши настанак пародонталног џепа и пародонталне болести (Schroeder and Listgarten, 1997). Клинички посматрано, губитак алвеоларне кости и присуство пародонталног џепа су патогномични знаци пародонталне болест и њена превенција и лечење још увек представљају изазов (Nanci and Bosshardt, 2006; Schroeder and Listgarten, 1997; Donos, 2018; Mombelli, 2018). У експерименталним студијама губитак алвеоларне кости је патогномични знак пародонталне болести и представља растојање између цемента-глеђне границе (енгл. *cemento-enamel junction*, CEJ) и врха алвеоларне кости (енгл. *alveolar bone crest*, ABC) (Схема 1) (Semenoff et al., 2008). Губитак алвеоларне кости настаје услед активације остеокласта (ОС) и инактивације остеобласта (ОБ) (Kirkwood et al., 2007). Диференцијација моноцита у прекурсоре ОС узрокује појачану продукцију цитокина. Затим, ОС под утицајем истих, појачано експримирају рецепторе активације нуклеарног фактора капа-б (енгл. *Receptor activator of nuclear factor kappa-B*, RANK) и везују се за лиганде RANK-а (енгл. *Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand*, RANKL) на мембрани ОБ. Услед њиховог везивања, смањује се продукција коштаног протективног фактора остеопротегерина (OPG), појачано се активирају ОС и стимулише се остеокластогенеза (Kirkwood et al., 2007). ОС су ћелије које некада садрже преко стотину једара и нису увек присутне у периодонцијуму већ само када се одиграва ресорпција кости. Са друге стране ОБ су ћелије неправилног облика, локализоване дуж кости која се ствара. Ове ћелије претходно стварају коштани матрикс у који се касније депонују минералне соли (Kirkwood et al., 2007). Алвеоларна кост представља резервоар калцијума и у случају недостатка калцијума у крви, он се мобилише из костију и укључује у циркулацију (Chen et al., 2018; Confavreux, 2011).

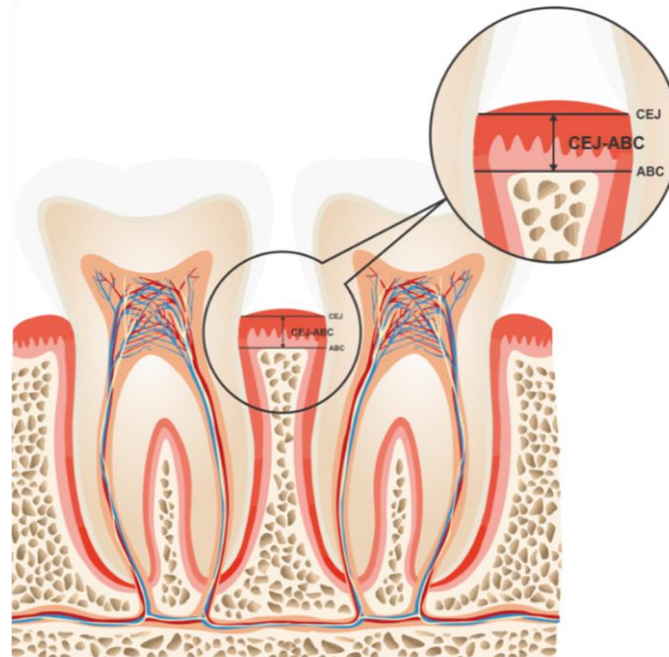


Схема 1. Схематски приказ ресорпције алвеоларне кости. Експериментално, ресорпција алвеоларне кости (CEJ-ABC) представља удаљеност између цемента глеђне границе (енгл. *cemento enamel junction*, CEJ) и алвеоларног коштаног гребена (енгл. *alveolar bone crest*, ABC).

Поред поремећаја на нивоу потпорног апарата зуба, пародонтопатија се сматра фактором ризика за бројне болести као што су кардиоваскуларне болести, плућне болести, дегенеративни мождани поремећаји попут Алцхајмерове болести, дијабетеса, атеросклерозе, реуматоидног артритиса, синдрома полицистичних јајника и других (Clarke, 2008; Tanguturi and Nagarakanti, 2018; Liccardo et al., 2019; Moghadam et al., 2017; de Molon et al., 2019). Уједно, пародонтопатија представља и манифестацију системских болести (Olsen et al., 2016).

Етиологија пародонтопатије је веома сложена и још увек није у потпуности разјашњена. Неравнотежа оралног микробиома, дентални плак и имунски систем домаћина имају централну улогу у етиопатогенези и настанку болести (Bartold and Van Dyke, 2013). Терапија пародонтопатије управо је и усмерена на елиминацију пародонтопатогених фактора, очувању здравља пародонта и јачању имунског система домаћина. Досадашња терапија пародонтопатије подразумева каузалну (субгингивални дебридман), хируршку терапију, употребу антисептика и антибиотика ради смањења патогеног оптерећења (Bui et al., 2019). Овим начином, број патогена се смањује али само привремено у року од неколико месеци док прекомерна употреба антибиотика доноси уједно и отпорност на антибиотике па су тако данас антибиотици све мање делотворни (Khalaf et al., 2016; Rhemrev et al., 2006). Узевши у обзир све поменуте факторе, постоји јасна потреба за будућим додатним превентивним и терапијским методама које могу спречити губитак кости (Bartold and Van Dyke, 2013). Повећан удео корисних бактерија које модулирају инфламацију и неравнотежу микробиома, могу се сматрати потенцијалном методом у превенцији или лечењу пародонталне болести. Примена пробиотика, као избор корисних бактерија, са својствима која модулирају запаљенски одговор домаћина, једна је од неколико новијих опција за решавање бактеријске неравнотеже и спречавање ресорпције алвеоларне кости код пародонталне болести. Овај третман може понудити смањење ризика, јефтин начин у превенцији или лечењу пародонталне болести као и одличну опцију за постизање и одржавање пародонталног здравља (McFarland, 2006; Gatej et al., 2018).

1.1.1. Етиологија пародонтопатије

Пародонтија је мултифакторијална болест чија етиологија није још увек прецизна и у потпуности схваћена. Кључни фактор развоја болести је повишен број и активност пародонтопатогених бактерија, односно дисбаланс оралног микробиома. Овај дисбаланс настаје као резултат измењених услова околине што за последицу доводи до инфламацијског одговора домаћина и побољшања или погоршања истог (Bartold and Van Dyke, 2013). Поред дисбаланса оралног микробиома, микроорганизама и денталног плака, фактори који учествују у настанку и прогресији пародонтопатије су наслеђе, фактори средине, нутритивни фактори, исхрана, старење, лоше навике попут употребе дувана, лоше технике прања зуба, бруксизам, хиперхормонистеинија, медикаменти попут блокатора синтезе калцијума, бројне токсичне материје и други (Gatej et al., 2018).

1.1.1.1. Дентални плак са микроорганизмима

Биолошки депозит микроорганизама на површини зуба али и на свим другим чврстим структурама у усној дупљи, назива се дентални плак. Настаје услед неадекватне оралне хигијене (Slots, 2017). Један mm^2 денталног плака садржи више од 500 различитих врста микроорганизама. Чине га интрацелуларни матрикс и микроорганизми. Интрацелуларни матрикс представља врсту хидратног гела у којем су урођене бактерије. Састављен је од органских материја, протеина, гликоротеина,

полисахарида и липида, и неорганичних материја као што су: калцијум, фосфор, флуор, натријум и калијум. Декстран, полисахарид из бактерија, служи као извор енергије и одговоран је за акумулацију бактерија (Slots, 2017; Marsh and Bradshaw, 1995).

Разликујемо фисурни, супрагингивални, субгингивални и протезни плак. Након три дана неодржавања оралне хигијене, долази до формирања супрагингивалног плака (Slots, 2017). У почетку, он се претежно састоји из грам-позитивних микроорганизама где након сазревања у њему доминирају Грам-негативне коке и бацили. Формирани супрагингивални плак после првог дана изазива инфламацију дуж маргиналне гингиве, а након пет дана гингивитис (Slots, 2017; Marsh and Bradshaw, 1995). Након формирања супрагингивалног плака и појаве гингивитиса, повећава се дубина гингивалног сулкуса чиме се стварају услови за формирање и настанак субгингивалног плака, каменца и пародонталног џепа (Slots, 2017).

1.1.1.2. Микроорганизми денталног плака

Микроорганизми денталног плака су главни узрок настанка пародонталне болести. У зависности од тока болести, зависи и доминација пародонтопатогених микроорганизама. Међу најважнијим изазивачима су: *Porphyromonas gingivalis* (*P.gingivalis*), *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Bacterioides forsythys* (*Tannerella forsythys*), *Prevotella intermedia* (Vieira Colombo et al., 2016). Поред микроорганизама, фактори околине и генетско наслеђе су подједнако важни у настанку пародонталне болести.

P.gingivalis је Грам-негативни анаероб, ахаролитичан непокретан патоген претежно одговоран за настанак хроничне пародонтопатије. Припада групи бактерија црвеног комплекса, заједно са бактеријама *Treponema denticola* и *Tannerella forsythia* (Grzech-Leśniak et al., 2018). Продукује ендотоксин, колагеназу, протеазу, инидол, масне киселине и др. Природни је члан оралног микробиома који може постати веома деструктиван. Захваљујући његовим морфолошким карактеристикама, пре свега фимбријама, има изузетну способност адхезије за ћелије домаћина. Овај процес праћен је интерсигнализацијом путем липида и уградњом бактерија у ране фагозома. Управо опстанак *P.gingivalis* зависи од активације аутофагије (Mysak et al., 2014; Gonyales et al., 2014; Hajishengallis, 2011).

Липополисахарид (LPS) *P.gingivalis* смештен у његовој спољашњој мембрани кључни је фактор у развоју пародонтопатије. Гингивални фибробласти, који су главни чланови везивног ткива гингиве, могу директно да интерагују са *P.gingivalis* и његовим бактеријским производима, укључујући LPS. LPS *P.gingivalis* стимулише имуне ћелије домаћина, посебно ћелије моноцитно макрофагног система. Ова стимулација резултира ослобађањем великог броја биоактивних супстанци, попут лизозомалних ензима, цитокина, реактивних кисеоничних врста, азот-моноксида и других, што доводи до оштећења ћелија, апоптозе и, на крају, упале (Mysak et al., 2014; Gonyales et al., 2014) посредством активације LPS/TLR₄/NF-κB сигналног пута (Hajishengallis, 2011). Овај процес доприноси патогенези пародонтопатије повећаном производњом проинфламацијских цитокина попут IL-1β и IL-6, и помоћу периферних Т помагачких CD₄ лимфоцита (Mysak et al., 2014; Gonyales et al., 2014; Hajishengallis, 2011; Olcyak et al., 2005; Vernal et al., 2014). *P.gingivalis*, серотипови K₁ и K₂, али не и други, повезани су са повећаном производњом RANKL и активацијом ОС. Све наведено сугерише да су ови серотипови одговорни за ресорпцију алвеоларне кости у патогенези пародонтопатије и да индукују снажан Th1 и Th17 имунски одговор (Salminen et al., 2014) услед чега долази до повећања концентрације активности MMP. Повећана

концентрација MMP, IL-1 β и *P.gingivalis* пљувачке је повезана са дужином пародонталних џепова и губитком алвеоларне кости као и крварењем при сондирању (Kato et al., 2014). Такође, LPS *P.gingivalis* инхибира активност алкалне фосфатазе и колагена типа 1 док са друге стране промовише пролиферацију ћелија и производњу IL-1 β и IL-6 (Deleon-Pennell et al., 2013).

LPS *P.gingivalis* циркулише кроз читав организам код преко 50% пацијената са пародонталном болешћу и повезан је са повећањем концентрације MMP у бројним органима и ткивима па је тако на пример системски LPS *P.gingivalis* стимулисао инфламацијски одговор у левој комори срца кроз активност MMP и довео до смањења срчане функције (Kadowaki et al., 2000). Такође, Poole и сарадници детектовали су LPS *P.gingivalis* у можданом ткиву пацијенти са Алцхајмеровом болешћу, сугеришући на последицу пародонтопатије у етиопатогенези дегенеративних можданих дисфункција (Poole et al., 2013).

Aggregatibacter actinomycetemcomitans, такође Грам-негативни анаероб који претежно учествује у настанку агресивне пародонтопатије, док код хроничних типова узрокује егзацербацију обољења. То је капнофилни, сахаролитичан бацил који продукује леукотоксан и на тај начин потпомаже деструкцију ткива. Овај бацил има изузетну способност пенетрације у гингивално ткиво па је често у терапији неопходна употреба антибиотика (Herbert et al., 2016).

Tannarella forsythis је још један Грам-негативан бацил одговоран за настанак хроничне пародонтопатије. Његово присуство уочено је у активним лезијама али и код рефракторне пародонтопатије. Има изузетну способност инвазије у пародонтално ткиво (Yost and Duran-Pinedo, 2018).

Prevotella intermedia је Грам-негативни анаеробни бацил који је доминантан у етиопатогенези улцеронекрозног гингивитиса. Припада групи субгингивалних врста одговорних за деструктивна обољења пародонта (Lopes et al., 2020).

1.1.1.3. Нутритивни фактори, проток крви и матриксне металопроотеиназе

Исхрана, сама по себи, не може да доведе до настанка пародонтопатије, међутим као последица дугогодишње неправилне исхране могу се јавити промене на гингиви и потпорном апарату зуба (Blasco-Baque et al., 2017, Moynihan and Petersen, 2004). Храна може утицати на пародонцијум конзистенцијом и саставом. Кашаста и мека храна фаворизује и повећава акумулацију плака док чврста храна потпомаже самочишћењу и појачава орожавање епитела (Moynihan and Petersen, 2004). Међутим, састав хране може утицати на промену оралног и цревног микробиома (Blasco-Baque et al., 2017). Дисбаланс микроорганизама може условити дисбиозу и на тај начин утицати на настанак пародонтопатије (Blasco-Baque et al., 2017). Тако на пример, исхрана богата мастима (енгл. *High fat diet*, HFD) узрокује повећање броја и функције пародонтопатогених бактерија и повећава липополисахаридну активацију и сигнализацију (Blasco-Baque et al., 2012). HFD такође промовише настанак пародонталне болести (Virto et al., 2018; Li et al., 2015) повећавањем нивоа цитокина и губитком алвеоларне кости (Virto et al., 2018; Fujita and Maki, 2016). Студија на анималном моделу указала је да HFD значајно утиче на повећање експресије проинфламацијских цитокина IL-1 β , IL-6 и TNF α у пародонталном ткиву (Pacios et al., 2012). Такође, Virto и сарадници у својој студији указали су на повећање губитка алвеоларне кости за 27,71% (2,28 μ m) у групи мишева храњених HFD (Virto et al., 2018).

HFD са једне стране доводи до неравнотеже добрих и лоших цревних бактерија и производње LPS (*Hersoug et al., 2018; Potter et al., 2016*) а са друге стране, HFD утиче на проток крви и крвне судове читавог организма (*Wilde et al., 2000; Bai et al., 2016*). Ткива пародонцијума, гингива, пародонтални лигамент и алвеоларна кост, су богато васкуларизована. За њихову функцију и исхрану неопходан је адекватан доток крви, као и здрав васкуларни ендотелни систем (*Veronesi et al., 2018; Nguyen et al., 2015; Komaki, 2019*). Равнотежа између MMP и њихових ткивних инхибитора је веома важна за одржавање здравља ендотелног система (*Declèves et al., 2013; Rodrigues and Granger, 2015*). Поремећаји активности локалног протока повезани су са смањеним микроваскуларним протоком крви и оксигенацијом ткива. Промене протока крви могу бити рани показатељ ендотелних, неурогених и миогених регулаторних механизма и сигнализирати почетак и напредовање микроваскуларне патофизиологије (*Clough et al., 2017; Ohsugi et al., 2019; Mitra et al., 2018*). HFD доприноси ендотелној дисфункцији и губитку ендотелног интегритета (*Clough et al., 2017; Mitra et al., 2018*). Након два сата од масног оброка, доказано је да HFD изазива оштећење ендотела васкуларном оклузијом и доводи до смањеног протока крви (*Bai et al., 2016; Münch et al., 2019*). Експерименталне студије су откриле да HFD узрокује губитак васкуларне еластичности, пре свега услед таложења штетних материја у зидовима крвних судова, што за узврат доводи до смањеног протока крви (*Declèves et al., 2013; Woese et al., 2000*). Смањен проток крви у пародонталном ткиву, посебно у гингиви, може узроковати настанак пародонталне болести.

Инфламацијски цитокини попут IL-1 β , IL-6 и TNF α укључени су у инфламацијски одговор домаћина на бактеријску инфекцију и повезани су са напредовањем пародонталне болести (*Cekici et al., 2014; Pacios et al., 2012*). Недавна студија је показала да истовремена изложеност макрофага LPS може покренути повећану производњу инфламацијских цитокина путем LPS/TLR₄ посредованог пута (*Jin et al., 2013*). Повећана производња проинфламацијских цитокина индукује повећану експресију и активност MMP. MMP су један од фактора који доводи до оштећења крвних судова и пародонталног ткива. То су цинк зависне ендопептидазе одговорне за разградњу ванћелијског матрикса (енгл. extracellular matrix, ECM). MMP селективно разграђују патолошки настао ECM у различитим моделима болести или повреда, али неправилном разградња ECM доводе до фиброзе у различитим ткивима (*Chen and Li, 2009*). Експресија и активност MMP-9 повећава се у експерименталној пародонтопатији, без обзира на метод индукције пародонталне болести (*Barreiros et al., 2018*). Ове студије указују на важност разградње ECM и MMP као још једног од фактора у развоју пародонталне болести.

На основу поменутих чињеница закључује се да HFD изазива оралну дисбиозу и дисбиозу црева (смањењем краткочланчаних масних киселина (енгл. *Short-chain fatty acid, SCFA*) и *Bacteroides* и повећаних *Firmicutes* и *Proteobacteria*) што резултира повећаном продукцијом LPS и активацијом LPS/TLR₄ сигналног пута у усној шупљини и гастроинтестиналном тракту. Хипотетички даље настаје настаје молекуларно ремоделовање пародонталног ткива, повећана продукција проинфламацијских цитокина IL-1 β , IL-6 и TNF α . Поменути молекули даље могу индуковати поремећај у експресији и активности MMP, ремоделовање матрикса и смањење протока крви у гингиви. Како последица поменутих чињеница, може доћи до функционалног ремоделовања пародонталног ткива, остеоклестогенезе, губитка алвеоларне кости и настанка пародонтопатије (Схема 2).

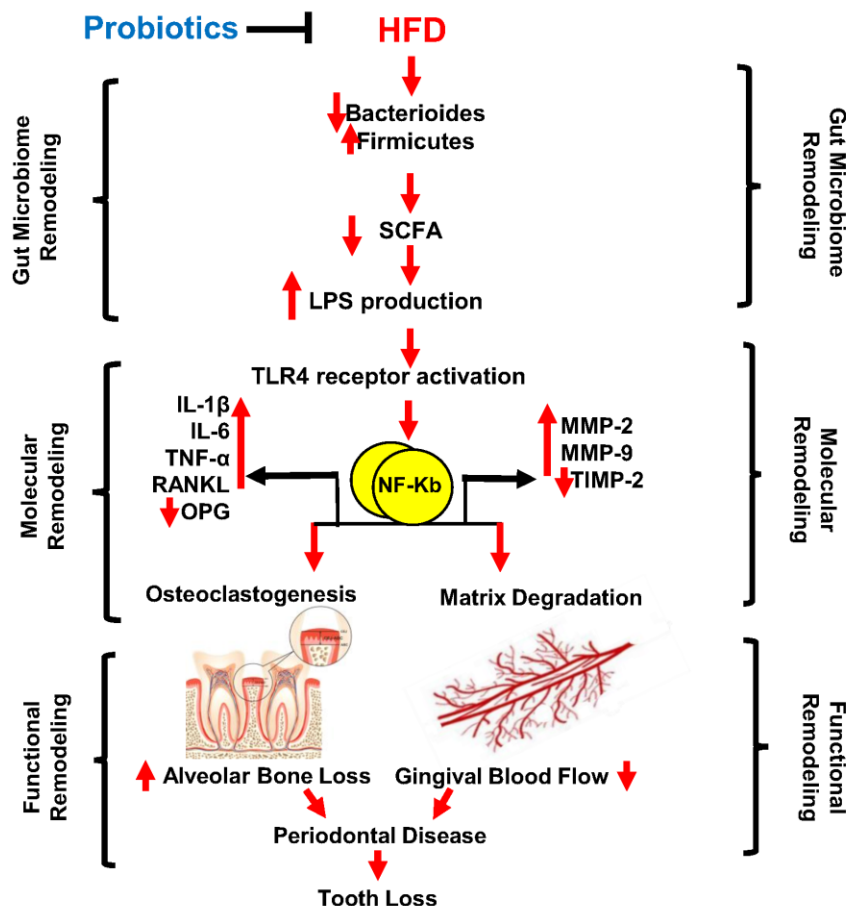


Схема 2. HFD изазива оралну дисбиозу и дисбиозу црева (смањењем кратколанчаних масних киселина (енгл. *Short-chain fatty acid*, SCFA) и *Bacteroides* и повећањем *Firmicutes* и *Proteobacteria*) што резултира повећаном продукцијом LPS и активацијом LPS/TLR4 сигналног пута у усној шупљини и гастроинтестиналном тракту. Последице, настаје молекуларно ремоделовање пародонталног ткива, повећањем продукције проинфламацијских цитокина IL-1β, IL-6 и TNF-α. Поменути молекули даље индукују поремећаје у експресији и активности MMP, ремоделовање матрикса и смањење протока крви у гингиви. Како последица поменутих чињеница, долази до функционалног ремоделовања пародонталног ткива, остеоклестогенезе и губитка алвеоларне кости и настанка пародонтопатије. Пробиотици могу помоћи у превенцији и терапији насталих помена.

Осим исхране, недостак појединих витамина, као на пример витамина В комплекса, који је саставни део фермената и неопходан за метаболичке процесе ћелија, има веома значајан утицај за одржавање оралне слузокоже (Neiva *et al.*, 2005). Услед недостатка ових витамина настаје инфламација гингиве (Kretsch *et al.*, 1991; Esaki *et al.*, 2010). Тако на пример, хиперхомоцистеинемија настала услед недостатка фолне киселине и витамина В12, узрокује поремећаје на нивоу продонцијума попут инфламације гингиве и појачаног крварења гингиве што за последицу може узроковати и потпомогнути настанак пародонтопатије (Bhardwaj *et al.*, 2015; Joseph *et al.*, 2011).

1.1.1.4. Генетски фактори

Генетско наслеђе је један од најважнијих етиолошких фактора многих болести а пародонтопатија се сматра једном од њих (Michalowicz *et al.*, 1991; Michalowicz *et al.*, 2000; Corey *et al.*, 1993). Ретки синдроми који утичу на фагоците, структуру епитела, везивног ткива или зуба, могу имати озбиљне манифестације у пародонцијуму. Тако су на пример, синдроми *Haim-Munk* и *Papillon-Lefevre* повезани са настанком пародонтопатије у раном детињству. Ови сидроми су ретки аутозомно рецесивни

поремећаји који се карактеришу раним губитком млечних и сталних зуба и узроковани су мутацијама гена катепсина С (*Hart et al., 1999; Toomes et al., 1999; Hart et al., 2000*). Такође, препубертетска пародонтопатија је одраз *Papillon-Lefevreov*-ог синдрома у неким породицама (*Corey et al., 1993*). Поред поменутих, озбиљне пародонталне промене карактеристичне су у *Kindlers, Chediak-Higashi* и *Ehlers-Danlos* (типови 4 и 8) синдромима (*Torres-Iberico et al., 2020; Kapferer-Seebacher et al., 2016; Kaplan et al., 2008*).

Подаци двоструко слепих студија показују да се етиолошки фактори код око половине популације оболелих од пародонтопатије могу преписати генетским факторима (*Hart et al., 1999; Toomes et al., 1999; Hart et al., 2000*). Досадашњи подаци показују да мутације гена цитокина или мутације гена у њиховој близини могу утицати на системски инфламацијски одговор људи оболелих од пародонтопатије (*Kornman et al., 1997, D'Aiuto et al., 2004*). Међутим, веома су мало истражени утицаји генетских поремећаја ензима који учествују у метаболизму хомоцистеина, попут ензима цистатоин β синтетазе, на пародонтални систем. Дефицит гена за цистатоин β синтетазу узрокује повећање нивоа хомоцистеина, амио киселине која је веома значајна у расту и развоју система и органа читавог организма, како пренатално тако и постнатално, међутим његов утицај, како урођени тако и стечени, на пародонтопатију је веома мало истражен (*Bhardwaj et al., 2015; Joseph et al., 2011*). Један од наших циљева био је управо испитати утицај хомоцистеина и хиперхомоцистеинемije на пародонтална ткива и настанак пародонталне болести.

1.1.1.5. Остали етиолошки фактори

Поред поменутих етиолошких фактора, бројни медикаменти, полни хормони, токсичне материје, емоционални стрес, старење, јатрогени фактори попут неадекватних испуна и оклузије могу утицати на настанак пародонталне болести. Антиепилептични лекови попут фенитоина изазивају увећање гингиве код више од 50% пацијената (*Joshi et al., 2017*). Антихипертензивни лекови, на пример нифедипин, имају нежељене ефекте који се такође манифестују увећањем гингиве (*Aral et al., 2015*). Имуноспресивна терапија циклоспорином код 30% пацијената изазива увећање гингиве док стероиди доводе до остеопоротичних промена који утичу на ресорпцију алвеоларне кости и бржи настанак пародонталне болести (*González-Jaranay et al., 2017*). Промене на нивоу полних хормона, као на пример у трудноћи, узрокују промене на нивоу денталног плака што се последично манифестује хроничним гингивитисом, такође доводе до настанка карактеристичних промена на нивоу гингиве и појачане инфламације (*González-Jaranay et al., 2017*). Дувански дим, као једна од токсичних супстанци, доказано повећава ризик за обољења пародонта делујући на васкулатуру, целуларни и хуморални имунски систем (*Leite et al., 2018*). Сви поменути фактори, могу утицати и поспешити настанак пародонтопатије, међутим како и на кој начин ће деловати управо зависи од одбрамбених способности домаћина.

1.1.2. Патогенеза пародонтопатије

Осим присуства денталног плака и пародонтопатогених бактерија, за настанак пародонтопатије неопходни су повољна средина тј. фаворизујући фактори и подложни домаћин (*Palmer et al., 2014*). Након 24 сата присуства денталног биофилма на зубним површинама, долази до настанка почетне фазе гингивитиса, пре свега до вазодилатације крвних судова услед чега долази до ексудације серума и протеина (*Page and Schroeder, 1976*). Као последица поменуте интеракције, у гингивалном сулкусу се повећава проток гингивалне течности која разблажује штетне супстанце

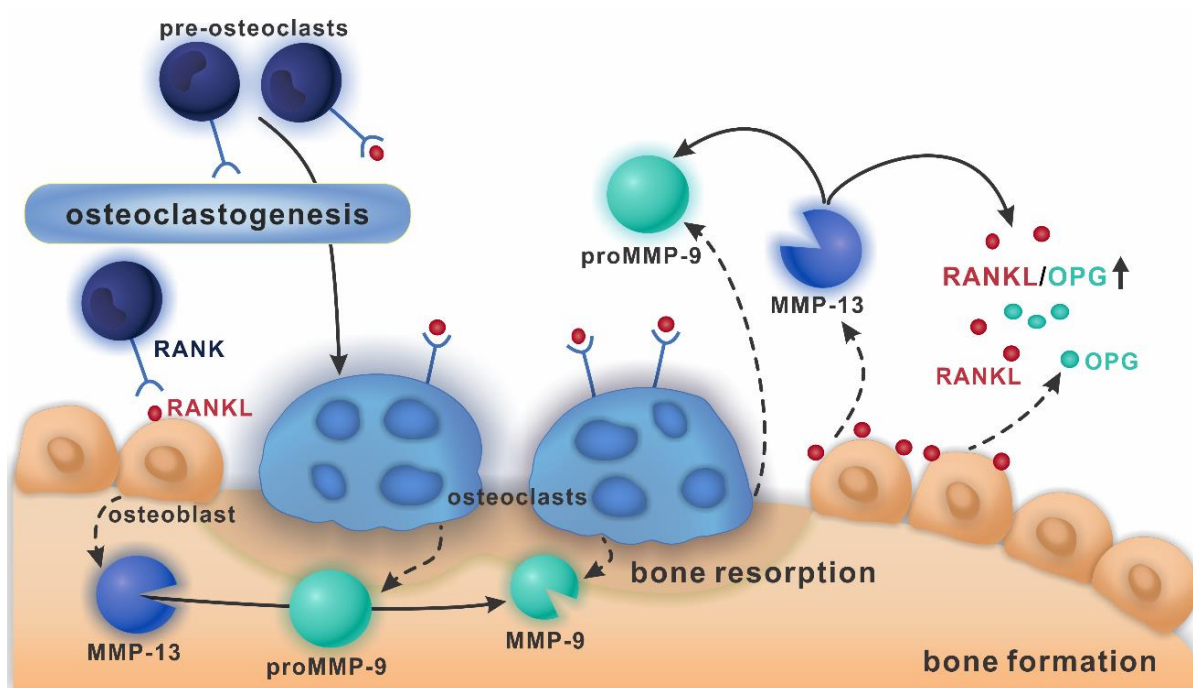
захваљујући присуству протеина - антитела, инхибитора протеаза, система комплемената и других док истовремено долази до повећаног дотока неутрофилних гранулоцита који су привучени позитивном хемотаксом. Осим неутрофилних гранулоцита, инфламацијски медијатори присутни у гингивитису су и мале количине Т лимфоцита. Уколико се дентални плак не уклони, у року од неколико дана долази до повећања целуларног инфилтратата што се клинички манифестује еритемом гингиве. Поменути инфилтрат изазива апоптозу фибробласта, дегенерацију колагених влакана, продубљивање припојног епитела и даљи продор бактерија који доводи до активације моноцитно-лимфоцитне популације и активације В лимфоцита, што условљава формирање пародонталног џепа и настанак пародонталне болести (*Offenbacher, 1996*).

В лимфоцити продукују специфична антитела и условљавају повећану продукцију инфламацијских медијатора и цитокина попут IL-1 β , TNF α и IL-6. Поменути инфламацијски медијатори узоркују деструкцију везивног ткива, губитак епителног припоја и губитак алвеоларне кости што се поново клинички манифестује као продубљивање пародонталних џепова. Даљим развојем болести, пародонтални џепови се продубљују и настаје такозвани *circulus vitiosus* који последично захтева екстракцију захваћеног зуба а самим тим и елиминисање узрочника локалне и могуће системске инфекције (*Page and Schroeder, 1976; Offenbacher, 1996*).

1.1.2.1. Улога урођеног и стеченог имунитета у патогенези пародонтопатије

Урођени и стечени имунски систем делују синергистички у одбрани организма од пародонтопатогених микроорганизама. Урођени имунитет је неспецифичан али делотворан и активан од тренутка излагања микроорганизама. Док са друге стране, стечени имунитет своју активност испољава након седам до десет дана по излагању пародонтопатогеним микроорганизама. Стечени имунитет је специфичан и самим тим прилагођен специфичним антигенима (*Kirkwood et al., 2007*). Урођени имунитет препознаје велики број страних антигена помоћу ограниченог малог броја рецептора. Један од најважнијих представника рецептора који препознају молекулске обрасце микроорганизама јесу рецептори слични толу (енгл. *Toll like receptor, TLR*). Ћелије урођеног имунског одговора препознају структуре на патогеним прокариотским ћелијама, попут Грам-негативних бактерија, које имају мали степен мутагености и називају се патогене молекуларне структуре чији је најважнији представник LPS. На површини многих ћелија у пародонцијуму налазе се TLR. Активација TLR након контакта са LPS доводи до програмиране ћелијске смрти изложене ћелије или до транскрипције гена унутар ћелије и производње инфламацијских цитокина (*Offenbacher and Salvi, 1999*). Активација епителних ћелија, Ларгенхансових ћелија и макрофага пародонцијума доводи до продукције цитокина, хемотаксе али и презентације антигена лимфоцитима. Такође, гингивални фибробласти осим продукције проинфламацијских цитокина, повећавају и експресију адхезивних молекула, док ОВ по излагању LPS инхибирају експресију OPG, најважнијег коштаног протективног фактора. Као последица поменутих фактора, ћелије строге коштане сржи се диференцирају у ОС и започињу ресорпцију алвеоларне кости процесом остеокластогенезе (*Offenbacher and Salvi, 1999*). Паралелно са овим процесом долази до активације стеченог имунског одговора и активације В лимфоцита, продукције специфичних антитела и инфламацијских цитокина. Са друге стране, Т лимфоцити реагују директно са антигеном патогена или интерреагују са другим ћелијама уз присуство костимулаторних фактора (*Cekici et al., 2014*). Свеобухватно, LPS као кључна патогена молекуларна структура пародонталне болести изазива конскрипцију инфламацијских ћелија, продукцију цитокина и литичких ензима од стране

неутрофилних гранулоцита, фибробласта и осталих ћелија, као и продукцију и активацију ОС. Осим тога, LPS повећава остеобластну експресију $IL-1\beta$, TNF α и RANKL-a, фактора који индукују пролиферацију, диференцијацију и активацију ОС (Cekici *et al.*, 2014). Услед активације ОС започиње остеокластогенеза и разарање алвеоларне кости помоћу молекуларне сигнализације три члана фамилије TNF, а то су RANKL, RANK и OPG. Ћелије моноцитно макрофагне лозе под утицајем $IL-1\beta$ и TNF α трансформишу се у прекурсоре ОС који на својој површини поседују RANK. Под утицајем истих, RANK се директним контактом везује за RANKL на мембрани ОБ при чему долази до активације, пролиферације и диференцијације прекурсора ОС у ОС чиме започиње остеокластогенеза. OPG, кога луче ОБ, има супротне ефекте у односу на RANKL. Као најзначајнији коштани протективни фактор, OPG инхибира остеокластогенезу на три начина: инхибицијом пролиферације и диференцијације прекурсора ОС; супримирањем активације зрелих ОС и индуковањем апоптозе ОС (Hofbauer *et al.*, 2000).



Фигура 1. Ресорпција алвеоларне кости. Под утицајем проинфламацијских цитокина, долази до продукције MMP од стране остеобласта и остеокласта. Остеобласти продукују MMP-13 која доводи до разградње колагена што последично утиче на ремоделовање матрикса костију заједно са зимогеном про MMP-9 и активном MMP-9, лучених од стране остеокласта. Појачана продукција и активација MMP-13 и MMP-9 са једне стране инхибира продукцију OPG а са друге стране поспешује активацију RANKL од стране остеобласта. На овај начин MMP-13 и MMP-9 потпомажу и учествују у ресорпцији алвеоларне кости.

Осим поменутих проинфламацијских цитокина, у процесу остеокластогенезе веома важну улогу имају MMP. Под утицајем проинфламацијских цитокина, долази до продукције MMP од стране ОБ и ОС. ОБ продукују MMP-13, познату и под називом колагеназа 3, која управо доводи до разградње колагена и последично утиче на ремоделовање матрикса костију заједно са зимогеном про MMP-9 и касније активном MMP-9 које су лучене од стране ОС. Појачана продукција и активација MMP-13 и MMP-9 са једне стране инхибира продукцију OPG а са друге стране поспешује активацију RANKL од стране ОБ. Уједно ово представља и начин на који MMP-13 и MMP-9 потпомажу и учествују у ресорпцији алвеоларне кости (Фигура 1).

1.1.3. Терапија пародонтопатије

Тренутна терапија пародонталне болести подразумева каузалну терапију – супрагингивални и субгингивални дебридман, хируршке интервенције и селективну употребу антибиотика и антисептика. Терапија има за циљ смањење броја оралних патогена у усној дупљи (*Quirynen et al., 2002*) и овај циљ се пре свега постиже адекватном и ефективном оралном хигијеном од стране пацијента и професионалним уклањањем чврстих и меких наслага од стране лекара. Базична, такозвана каузална терапија се састоји од прве фазе, која подразумева едукацију и мотивацију пацијента за одржавање оралне хигијене и уклањање супрагингивалних чврстих и меких наслага, док следећа, друга, фаза подразумева обраду пародонталних џепова односно субгингивално уклањање наслага и киретажу меког зида пародонталног џепа. У тежим формама болести након базичне терапије приступа се хируршкој терапији која има за циљ да уклони узрок болести, смањи пародонталне џекове и омогући максималну реституцију ткива (*Joseph et al., 2011*).

Као што смо раније поменули, субгингивалн дебридман, хируршке интервенције, употреба антибиотика и антисептика има за циљ смањење пародонтопатогених бактерија (*Quirynen et al., 2002*). Међутим, ови третмани доводе до привременог смањења бактерија и бактеријског оштећења, и врло често ове врсте терапија нису довољне за контролу пародонталне болести (*Quirynen et al., 2002; Tomasi et al., 2006*). Због свега тога је потребно применити додатне стратегије и методе у терапији исте. Примена корисних бактерија, пробиотика, са антимикуробним и антиинфламацијским својствима и дејством је један од нових приступа у терапији, контроли и превенцији пародонталне болести. Пробиотици могу смањити ризик за настанак пародонтопатије а са друге стране могу бити једноставна и економски прихватљива опција за лечење.

Узевши све у обзир, јасно је да постоји потреба за будућим додатним превентивним терапијама које могу спречити губитак кост али исто тако и усмерити одговор домаћина у превенцији исте (*Bartold and Van Dyke, 2017*). Примена пробиотика, са својствима која модулирају инфламацијски одговор домаћина, једна је од неколико нових опција за поновно успостављање бактеријске равнотеже и спречавање губитка костију код пародонталне болести (*Gatej et al., 2018*).

1.2. Пробиотици

Пробиотици су живи микроорганизми који дати у довољним количинама могу имати позитиван ефекат на здравље домаћина, а чија је добробит доказана у контролисаним студијама (*Hill et al., 2014*). Представљају део нормалне микрофлоре здравог организма (*Markowiak and Śliżewska, 2017*). Појам пробиотика појављује се почетком 20. века, а први повољни ефекти употребе запажени су и објављени 1907. године од стране руског имунолога, добитника Нобелове награде, Илије Иљича Мечникова (*Markowiak, 2013; Lilly and Stillwell, 1965*). Он је први научник који је поставио темеље „корисних бактерија” и познат је као „отац савремене имунологије”. Његова теорија старења заснива се на присуству токсичних бактерија у цревима, а доказао је да је дуговечност сељака са подручја Балкана последица конзумирања великих количина киселог млека које садржи лактобациле (*Markowiak, 2013*). Након дугогодишњег истраживања, 1965. уведен је термин „пробиотици”, *pro*, латинска реч, која значи за, и *biotikos*, грчка реч, која значи живот (*Lilly and Stillwell, 1965*). Једна од најобухватнијих дефиниција пробиотика је дефиниција *Schreyenmeir* и *de Vrese*-а која гласи: „Пробиотици су производи који садрже тачно дефинисане микроорганизме (или

су добијени из њих) у довољном броју, способни да мењају микрофлору (имплантацијом и колонизацијом) у одређеном делу људског организма, и на тај начин испољавају повољне ефекте на здравље људи” (*Elshaghabee et al., 2020*). Досадашња испитивања показују да пробиотици не могу заменити уништenu природну флору организма, међутим, као привремене колоније могу помоћи у обављању исте функције као природна флора, дајући природној флори довољно времена да се опорави. Пробиотске врсте се затим замењују природно обновљеном цревном флором (*Markowiak and Ślizewska, 2017*).

Најчешће коришћене врсте пробиотика припадају родовима *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Escherichia*, *Enterococcus*, *Bacillus* и сви су нормални становници дисајних путева, усне дупље, гастроинтестиналног тракта (ГИТ), вагине и коже (*Floch, 2014*). Лактобацили су грам-позитивни, факултативни анаероби у облику штапа. Неки од најпознатијих чланова који су изоловани и проучавани су *L. acidophilus*, *L. reuteri*, *L. bulgaricus*, *L. rhamnosus*, *L. salivarius* и *L. casei* (*Salehi et al., 2014; Britton et al., 2014*). Они се такође могу унети у организам путем намирница које их садрже, са циљем побољшања равнотеже миклофлоре ГИТ од које у великој мери зависи имуно функција цревне мукозе. Ове корисне бактерије су присутне у храни и напицима широм света као што су: јогурт, сир, кефир, кисели купус, јабуково сирће, темпех, итд (*Tannock, 1997*).

Пробиотици (бактерије и кваснице) су способни да изврше реколонијацију и обнове симбиозу између домаћина и поремећене микробиоте. Безбедни су, нису патогени, нису инвазивни нити канцерогени (*Gupta and Garg, 2009; Dimidi et al., 2019*). Њихова ефикасност зависи од следећих критеријума:

- да су бактерије живе;
- да поседују отпорност на желудачну киселину и деловање жучи;
- да постоји доказана ефикасност у контролисаним студијама на људима;
- да постоји доказана способност адхезије за ћелије епитела танког или дебелог црева;
- да постоји доказана способност стимулације дигестивног мукозног имунског система поред могуће стимулације системског имунског одговора;
- да је могућа способност производње антимикробних фактора;
- да је могућа способност довољне дужине боравка у дигестивном тракту након *per os* уноса ради остваривања ефекта;
- да не поседују патогеност, токсичност и алергијски потенцијал и
- да стабилност препарата омогућава константан број живих микроорганизама у препарату у току комплетног рока трајања (*stadlbauer, 2015*).

Пробиотски дијететски производи налазе се у облику растворљивих прашкова, таблета, ориблета, капсула, капи за оралну употребу али и жвакаћих гума. Пробиотске намирнице присутне на тржишту садрже минимум 10^8 живих бактерија у 100 ml производа. Ипак, препоручене дневне дозе крећу се од $2-5 \times 10^9$ што и јесте количина коју садржи већина дијететских препарата у појединачној дози (*Sniffen, 2018*).

1.2.1. Механизам дејства пробиотика

Пробиотици имају широк спектар дејства (Табела 1. и 2.). Механизам дејства се разликује у зависности од пробиотског соја. У већини случајева је за механизам дејства одговорна комбинација активности више сојева, због чега је објашњење механизма веома сложен и тежак задатак (*Gueimonde and Salminen, 2006*). Основни пут деловања

подразумева инхибицију раста патогених микроорганизама у ГИТ што заправо значи производњу антибактеријских супстанци, односно продукцију примарних метаболита: млечне киселине, диацетила, ацеталдехида, водоник пероксида, бактериоцине (протеинске супстанце са антимикуробним дејством које могу убити или инхибирати раст патогена) (Aral et al., 2015; Ricardo et al., 2019). Пробиотици се карактеришу способношћу адхезије за хранљиве материје, пре свега несварљиве угљене хидрате у дебелом цреву. Адхезија пробиотских сојева у ГИТ може бити специфична и неспецифична. Специфична адхезија означава везивање адхезина за површину бактеријских ћелија на цревном епителу. Неспецифична адхезија обухвата електростатске и хидрофобне интеракције које су често иницијална фаза која претходи специфичној адхезији (Bermudez-Brito et al., 2012a; Bermudez-Brito et al., 2012b). Такође, пробиотици имају способност модификације метаболичких процеса у ГИТ. Повећањем активности неких ензима, нпр. β -галактозидазе повећава се подношљивост лактозе, са друге стране, смањењем активности ензима који учествују у канцерогеним процесима као што су: β -глюкоронидаза, нитроредуктаза, азоредуктаза и стероид-7 α -дехидроксилаза инхибира се њихова улога у канцерогеним процесима (Szajewska and Kolodziej, 2015).

Табела 1. Механизам дејства пробиотика

Механизам дејства пробиотика
Производња метаболита (SCFA и хистамина)
Модулација састава и/или активности микробиоте домаћина
Модулација имуног система домаћина
Побољшање интегритета епителних баријера
Антикариогено дејство
Превенција губитка алвеоларне кости
Производња ензима (лактазе)
Синтеза витамина
Производња бактерицина
Сигнализација централног нервног система (неуротрансмитери)
Утицај на ниво хормона
Придржавају се слузокоже, инхибирају адхезију и/или раст патогена
Инхибиција експресије фактора вируленције патогена

Пробиотици могу деловати на домаћина модулацијом урођеног и стеченог имунског одговора, локалним или системским ефектом (Табела 2). Они смањују производњу проинфламацијских цитокина: $TNF\alpha$, $IL-1\beta$ и $IL-6$ а повећавају производњу антиинфламацијског цитокина $IL-10$ (González-Jaranay et al., 2017).

Табела 2. Локални и системски ефекти пробиотика на имунски систем.

Ефекти пробиотика на имунски систем		
Место деловања		Ефекти код људи и експерименталних животиња
Локални ефекти	Мукозна баријера	репарација и одржавање интестиналне баријере; повећана продукција мукуса
	Ентероцити	смањена сигнализација посредована $NF-kB$; повећана продукција $TGF-\beta$ и $PGE2$
	TLR	инхибиција TLR9 промена TLR2 <i>in vitro</i>
Системски ефекти	Дендритске ћелије	повећана активност у ГИТ
	Ефекторне Т ћелије	утицај на Th1 одговор
	Регулаторне Т ћелије	$CD4+$ $CD28+$ Т ћелије везане за оралну толеранцију продукују $IL-10$ и $TGF-\beta$; промовишу активност дендритске ћелије; локална продукција IgA
	В ћелије и антитела	повећање лимфног ткива; локална продукција IgA; промовише толерантну микросредину и смањује унос антигена у организам

Пробиотици су важни за развој и регулацију имунског система, синтезу аминокиселина, протеина и различитих витамина, апсорпцију калцијума, гвожђа и витамина D (Knol et al., 2005; Moro et al., 2002; Conlon and Bird, 2014). Како би остварили све ове ефекте пробиотици, као што је већ поменуто морају да преживе киселост желуца али и утицај жучи. Као резултат тога пребиотски олигосахариди стижу у дебело црево несварени. У колону/дебелом цреву коменсалне бактерије конзумирају несварене пребиотске олигосахариде и производе SCFA. SCFA условљава повећање нивоа ацетата и смањење нивоа пропионата што узрокује смањење рН средине, стимулише перисталтику црева, потпомаже експресивну реапсорпцију воде и калцијума из колоне, стимулише раст добрих бактерија, инхибира раст лоших, и утиче на смањење нивоа липида у крви (Knol et al., 2005; Moro et al., 2002; Conlon and Bird, 2014). Поред SCFA, изузетно важну улогу у механизму дејства пробиотика имају витамини групе К. Витамин К2, фармохинон, је продукт „добрих” цревних бактерија (Ponziani et al., 2017; Zhang et al., 2015; Karl et al., 2017). Смањење овог витамина доприноси развоју остеопорозе и промена на костима (Rangel et al., 2018). Витамин К2 је иницијатор минерализације и калцификације костију и јако је важан у осификацији истих. Важност витамина К огледа се и у његовој неизоставној улози у синтези и модификацији остеокалцина (Myneni and Mezey, 2017; Miggiano and Robilotta, 2005; Debaux et al., 2019; Nelsestuen et al., 2000; Sanguineti et al., 2016; Villa et al., 2017; Knapen et al., 2018; Theuwissen et al., 2012). Остеокалцин је беланчевинасти хормон

који се налази у костима и дентину. Луче га претежно остеобласти и често се користи као биохемијски маркер у процесу стварања костију. Примећено је да су виши нивои остеокалцина у серуму у позитивној корелацији са повећањем минералне густине костију (Ducy et al., 1996; Ling et al., 2016). Протеин остеокалцин који се везује за калцијум, чини то само у присуству поменутог витамина К. У студијама се користи као мерило активности остеобласта што указује на важност микробиоте црева у ремоделацији костију а уједно и ремоделацији целокупног пародонталног ткива (Shazam et al., 2020; Afacan et al., 2020; Ozçaka et al., 2011; Ying et al., 2018).

1.2.2. Индикације за употребу пробиотика

Највећи број индикација за употребу пробиотика добијене су из експерименталних и клиничких студија. Терапијска употреба пробиотика сматра се успешном у третману антибиотицима изазване дијареје (Ozçaka et al., 2011) и путничке дијареје (Schnadower et al., 2018; Freedman et al., 2018). Позитивни ефекти су уочени у терапији иритабилног колона (Ortiz-Lucas et al., 2013), интолеранције на лактозу (de Vrese et al., 2001), инфламацијског обољења црева (Ciorba, 2012), карцинома колона (Zhang et al., 2015), атопичног дерматитиса (Huang et al., 2017), хиперхолестеролемије (Shimizu et al., 2015) и гојазности (Sanchez et al., 2014). Дејство пробиотика такође је доказано у многим патолошким стањима попут некротизирајућег ентероколитиса, пептичног улкуса, хроничног гастритиса (*Helicobacter pylori*) али ни њихово дејство у оралној патологији не заостаје. Доказано је њихово антикариогено (Gatej et al., 2018; Nackaerts et al., 2008) и антигљивично (*Candida albicans*) дејство (Krzyściak et al., 2017). Поред наведеног, на експерименталном моделу пародонтитиса показано је превентивно и антиресорптивно дејство пробиотика (Gruner et al., 2016; Bustamante et al., 2020).

1.2.3. Пробиотици и орално здравље

Током протеклих година, истаживања указују на корисност пробиотика по орално здравље (Gruner et al., 2016, Bustamante et al., 2020). Пробиотици утичу на производњу млечне киселине која има антибактеријско дејство, водоник пероксида са антисептичким дејством, као и антивирусних и антигљивичних средства која сузбијају патогене (Corr et al., 2009, Spinler et al., 2017; Bermudez-Brito et al., 2012a; Bermudez-Brito et al., 2012b; Bustamante et al., 2020). Студије су показале да комбинација различитих врста пробиотских сојева доводи до синергистичног појачавања њихових појединачних ефеката. Нове терапије пробиотицима укључују одговор домаћина и у модулацији пародонталне болести (Nackaerts et al., 2008; Messori et al., 2013). У доступној литератури, предложено је неколико механизма дејства пробиотика на орално здравље:

1. конкуренција патогеним бактеријама за места адхезије на површинама зуба;
2. модификација услова оралне средине променом рН и/или оксидационо-редукционог потенцијала;
3. производња антимикуробних супстанци;
4. стимулација неспецифичног имунитета и модулација хуморалног и ћелијског имунског одговора (Gueimonde and Salminen, 2006; Devine and Marsh, 2009; Bustamante et al., 2020; Nackaerts et al., 2008; Messori et al., 2013; Ballini et al., 2019).

1.2.4. Терапијско дејство пробиотика у пародонтопатији

Пробиотици заузимају веома важно место у превенцији и терапији пародонтопатије (Gruner et al., 2016; Teughels et al., 2013). Имуномодулаторно дејство пробиотских бактерија варира у зависности од тога ком соју и врсти припадају као и од саме врсте препарата (живи пробиотик, мртви или супернатант) (Gatej et al., 2018, Gao et al., 2017). Из тог разлога, њихова терапијска индикација би требало да буде веома пажљиво одабрана. У терапији пародонтопатије, пробиотици могу додатно утицати на одговор домаћина, могу се користити као помоћна средства приликом конвенционалне терапије или као монотерапија у случају немогућности каузалне терапије.

Студије које су се бавиле проучавањем утицаја пробиотика на пародонтална ткива, указују на значајно смањење гингивалног плака, плак индекса, крварења при сондирању и гингивалне инфламације у пробиотичким групама (Teughels et al., 2013; Szkaradkiewicz et al., 2014; Ince et al., 2015). Најчешће проучавани сојеви у терапији пародонтопатије припадају роду *Lactobacillus*. До данас, највећи број студија је проучавао ефекте пробиотика *L.reuteri* (Teughels et al., 2013; Szkaradkiewicz et al., 2014; Ince et al., 2015), међутим дејство *Lactobacillus Rhamnosus GG* (LGG) у пародонтопатији није у потпуности истражено. Недавне експерименталне студије на мишевима проучавале су профилактичко и терапијско дејство LGG у стању пародонтитиса (Gatej et al., 2018, Gatej et al., 2020). Након 44 дана третмана, Gatej и сарадници доказали су да LGG ефикасно сузбија губитак костију у мишјем моделу индукованог пародонтитиса без обзира на начин давања, орално или локалном апликацијом. Њихови резултати показали су да је терапија LGG, пре индуковања пародонтитиса, сузбила одговор домаћина и резултирала значајно мањим губитком костију и упалом за све групе које су лечене пробиотицима у поређењу само са болешћу. Према закључцима ових студија LGG је имао значајан заштитни ефекат на губитак алвеоларне кости без обзира на начин давања и да његов ефекат може бити повезан не само са променама оралног микробиома него и са променама микробиома црева (Gatej et al., 2018). Иста група аутора проучавала је повезаност промене оралног и цревног микробиома са настанком пародонтопатије као и дејство LGG на исте. Резултати показују да су *P.gingivalis* и *F.nucleatum*, као узрочници пародонтопатије, изазвали упалу широм ГИТ, појачали експресију IL-6 и довели до промене микробиома црева. Орално давање LGG у мишјем моделу индукованог пародонтитиса узроковало је промене у саставу цревног микробиома (обнављајући састав микробиома), смањену упалу ткива у дванаестопалачном цреву, смањење нивоа IL-6 у илеуму и тзв „цревно ојачавање” међутим, потребне су додатне студије како би се испитао механизам и настанак поменутих промена (Gatej et al., 2020).

Поред експерименталних студија на мишевима, експерименти, претежно на пацовима и псима, којима је био индукован пародонтитис а након тога примењен третман различитим врстама пробиотика или њиховом комбинацијом, указали су да пробиотици одлажу и смањују инфламацију у поређењу са контролном групом. У рандомизираној студији, 32 пацова са пародонтопатијом индукованом лигатуром, третирани су пробиотиком *Bacillus subtilis*, током 44 дана. Третман пробиотицима ове врсте, смањио је губитак алвеоларне кости и заштитио танко црево од реактивних промена изазваних пародонталном болешћу (Messora et al., 2013). Foureaux и сарадници су након 44-оро дневног третмана *B. subtilis*-ом експерименталног пародонтитиса пацова закључили да суплементација пробиотицима може смањити разградњу пародонталног ткива пацова али и да овакав вид терапије има значајне имуномодулаторне ефекте у ГИТ (Foureaux et al., 2014). Nackaerts и сарадници у својој

експерименталној студији спроведеној на псима третираним пробиотицима у трајању од 12 недеља указују на значајан пораст густине алвеоларних костију (*Teughels et al., 2013*). *Teughels* и сарадници, који су користили исти модел пародонталне болести, у својој студији применили су, локално, следећу комбинацију пробиотика: *Streptococcus salivarius*, *S. sanguinis* и *S. mitis* на површину корена зуба паса, након скалирања, у трајању од 12 недеља. Закључили су да употреба ове комбинације пробиотика значајно смањује крварење приликом сондирања, што указује на смањење инфламације, смањење укупних анаеробних бактерија и одлагање реколонијације цепова од стране патогена у поређењу са контролном групом (*Teughels et al., 2007*).

L. brevis пастиле, коришћене су у терапији хроничне пародонтопатије са циљем процене антиинфламацијских ефеката овог пробиотика. *L. brevis* је довео до потпуног нестанка или побошања клиничких параметара. Гингивални индекс и плак индекс су били смањени у групи третираној пробиотицима. Такође, *L. brevis* узроковао је значајно смањење нивоа нитрита и нитрата, простангладина E2 (PGE2), MMP и интерферона γ (INF- γ) у узорцима пљувачке. Антиинфламацијски ефекати *L. brevis* остварени су захваљујући његовој способности да спречи производњу азотних азот монооксида и самим тим продукцију PGE 2 и активирање MMP (*Riccia et al., 2007*). *L. salivarius* је у терапији благе и умерене хроничне пародонтопатије такође значајно смањено гингивални и плак индекс као и дубину пародонталног цепа код пушача у поређењу са плацебо групом испитаника. *L. reuteri* пастиле које су коришћене током 12 недеља код одраслих особа са претходно нелеченим хроничним пародонтитисом (*Teughels et al., 2013*) утицале су на смањење дубине пародонталног цепа али и значајно смањење броја бактерија *P.gingivalis* што указује да *L. reuteri* може бити користан додаток нехируршкој терапији, тј. скалирању. У студији сличног дизајна, коришћене су таблете *L. reuteri* у циљу терапије хроничне пародонтопатије. *L. reuteri* је значајно побољшао индекс крварења у суклуси, смањено дубину пародонталног цепа као и дубину епителног припоја. Нивои проинфламацијских цитокина TNF α , IL-1 β и IL-17 били су нижи у леченој групи (*Szkaradkiewicz et al., 2014*). *L. reuteri* утиче значајно на смањење нивоа MMP-8 и повећање нивоа TIMP-1 у стању прогресивног пародонтитиса (*Ince et al., 2015*).

Са друге стране, клиничка примена LGG је веома мало истражена. LGG је грам позитивни штапићасти факултативни анаероб, способан да преживи низак ниво рН вредности у желуцу и жучне киселине у дванаестопалачном цреву. Један је од најчешће коришћених пробиотских микроорганизама у свету. *Sherwood Gorbach* и *Barry Goldin* су 1983. године изоловали LGG (ATCC 53103) из узорака фецеса здравог човека одакле потиче и његов назив „GG” (*Papizadeh et al., 2016*). Патент за ову врсту пробиотика поднели су 17. априла 1985. године, са приступним бројем 53103 америчке колекције култура (ATCC) након чега је и класификован под обележјем ATCC 53103. За патент LGG (ATCC 53103) је потврђено да је стабилан у желудачној киселини и жучи, да има велику способност адхезије за ћелије црева и да ствара млечну киселину. Од времена када је откривен, проучаван је његов здравствени ефекат и тренутно је сој LGG (ATCC 53103) пробиотска бактерија укључена у више од 800 научних студија. Различити здравствени ефекти су добро документовани, укључујући превенцију и лечење гастроинтестиналних инфекција и дијареја, и стимулацију имунолошких одговора који промовишу вакцинацију или чак спречавају одређене алергијске симптоме (*Szajewska and Kolodziej, 2015; Schnadower et al., 2018; Freedman et al., 2018; Ortiz-Lucas et al., 2013; Huang et al., 2017*).

Захваљујући карактеристичној морфологији и пилама које поседује, LGG се задржава дуже у ГИТ и представља унутрашњу облогу пробавног система (178). Доказано је да LGG инхибира пролиферацију ћелија и биосинтезу полиамина, као и да индукује апоптозу у различитим канцерогеним ћелијама ГИТ код људи (Zhang et al., 2015). Студије доказују и његово дејство у превенцији и терапији атопичног дерматитиса (Huang et al., 2017), хиперхолестеролемије (Shimizu et al., 2015) и гојазности (Sanchez et al., 2014). Овај пробиотик не ферментише сахарозу и лактозу и доказано је да значајно смањује ризик од каријеса (Gruner et al., 2016, Jiang et al., 2018). Такође је доказано да *in vivo* има противупална својства (Lin et al., 2009) међутим, његово дејство у терапији пародонтопатије није у потпуности истражено.

Комбинација пробиотика LGG и *Bifidobacterium lactis* BB-12108 показала је значајане резултате у побољшању здравља гингиве код адолесцената, узраста 13-15 година и смањила број пародонтопатогених бактерија *P.gingivalis* и *A. actinomycetemcomitans* у току четворонедељног третмана (Alanzi et al., 2018). Међутим, иста комбинација пробиотика код одраслих није утицала на микробни састав пљувачке али је показала значајан ефекат на стање пародонта у смислу смањења количине денталног плака, инфламације гингиве и њихових параметара (Toiviainen et al., 2015). Студије које су користиле пробиотике код пацијената са хроничним пародонтитисом показују висок степен хетерогености пробиотских сојева, хетерогеност примењене дозе, начина администрације као и у дужини трајања терапије. Како дејство LGG у пародонталој болести није у потпуности истражено, потребне су додатне студије како би се испитао механизам дејства и ефекат истог. С обзиром на његова некариогена и антиинфламацијска својства, LGG се може показати као добар кандидат у превенцији и терапији пародонталне болести.

Студије на животињама показале су утицај пробиотика на стање оралног микробиома и ограничен утицај на параметре пародоната као и већ познат утицај на цревну микробиоту али због релативно мало расположивих података неопходне су додатне студије како би се разумео механизам њиховог дејства на пародонталну болест. Уопштено гледано, пробиотици могу бити повољна, нискоризична и једноставна опција у превенцији и лечењу пародонталне болести.

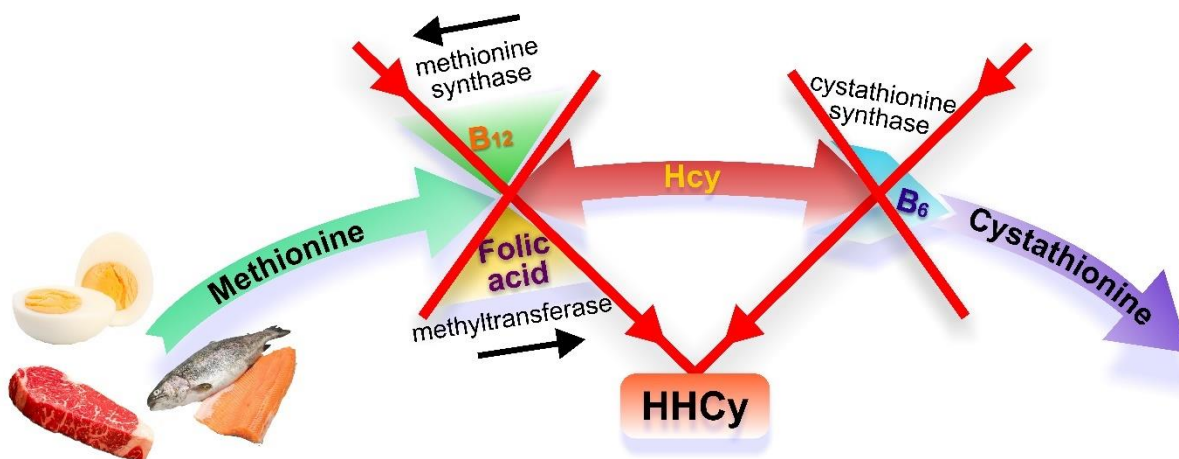
1.3. Хомоцистеин и хиперхомоцистеинемиа

1.3.1. Хомоцистеин – историјат, карактеристике и метаболизам

Као што смо раније поменули, хомоцистеин и његове повишене вредности могу бити један од узрока пародонталне болести. Хомоцистеин (Hcy) је аминокиселина, непотеинског порекла, која у својој структури садржи сумпор и добија се биосинтезом преко метаболичког пута метионина, есенцијалне аминокиселине којом су богате бројне намирнице, нарочито месо, јаја и риба (Olsen et al., 2018). На значај Hcy први су указали Butz и du Vigneaud давне 1932. године у свом истраживању о инсулину, на Универзитету Illinois. Загревањем метионина, у сумпорној киселини, открили су аминокиселину сличне хемијске структуре цистеину, Hcy, због чега су добили Нобелову награду 1955 године (Woese et al., 2000; Warnecke and Bestor, 2000; Rosenthal, 1982). Наколико година касније Kilmer McCully указао је на значај Hcy у патофизиологији атеросклерозе и насталих последичних поремећаја кардиоваскуларног система. Kilmer McCully је описао случај узнапредовале атеросклерозе у артеријама ткива и органа деце са високим концентрацијама Hcy, хомоцистеин дисулфида и цистатиона у плазми и урину (McCully, 1969). Ова студија постала је основа хомоцистеинске теорије атеросклерозе, и од тада бројни истраживачи

испитују утицај хомоцистеина на системе и органе читавог организма као и молекуларне механизме који посредују у њиховим нежељеним ефектима (Zhang *et al.*, 2016; Cheng *et al.*, 2011). Код особа са пародонтопатијом примећен је значајно повишен број кардиоваскуларних болести, насталих последицима утицајем атеросклерозе, што може бити последица високих концентрација Нсу (Hamilton *et al.*, 2017). Међутим, утицај Нсу у етиопатогенези пародонтопатије је веома мало истражен. Joseph и сарадници 2011. године су први пут указали на утицај и промене нивоа хомоцистеина код пацијената са хроничном пародонтопатијом (Joseph *et al.*, 2011).

Сама синтеза Нсу одвија се током процеса синтезе цистеина у оквиру катаболизма метионина (Bhardwaj *et al.*, 2015). У физиолошким условима, Нсу се може метаболирати трансулфурацијом у цистатион помоћу ензима цистатион β -синтетаза (CBS) (Jakubowski, 2000; Pizzolo *et al.*, 2011). За овај процес неопходан је витамин В6. У случају поремећаја овог метаболичког пута, долази до накупљања Нсу у ћелијама, услед чега се Нсу може конвертовати у токсичнији облик - хомоцистеин тиолактон. Хомоцистеин тиолактон веома лако ступа у реакције са аминок групама већине протеина, при чему се награђују хомоцистеинил групе, које су са протеинима повезане пептидним везама, при чему знатно могу утицати на њихову активност (Jakubowski, 2000). Са друге стране, у реметилационом циклусу Нсу се може реконвертовати у метионин у присуству коензима В12 и фолне киселине (В9) (Brazzelli *et al.*, 2010). Синтеза Нсу из метионина одвија се под утицајем ензима метионин-трансферазе, док се реконвертовање одвија у присуству метионин синтазе (Tinelli *et al.*, 2019) (Фигура 2).



Фигура 2. Синтеза хомоцистеина (Нсу) из метионина (Мет) помоћу метионин трансферазе. Нсу се поново претвара у метионин (Мет) метионин синтазом. Коензими који су укључени у ове процесе су витамин В12 и фолна киселина. У другој реакцији, Нсу се помоћу коензима претвара у цистатионин посредством цистатион β -синтазе и витамина В6. Недостатак било ког коензима или самог ензима може довести до поремећаја у метаболизму Нсу узрокујући хиперхомоцистеинију (ННсу).

1.3.2. Хиперхомоцистеинија

У хуманој плазми Нсу постоји у различитим облицима. Већи део Нсу, око 70%, је везан за протеине плазме, пре свега за албумине, око 20-30% формира хомоцистеинске димере, или димере са другим тиолима, а само око 2% Нсу постоји у слободном облику (Hankey and Eikelboom, 1999). Хиперхомоцистеинија (ННсу) је стање које карактерише пораст укупних вредности Нсу у плазми изнад 15 $\mu\text{mol/l}$. ННсу

настаје због неравнотеже фактора који су укључени у метаболизам Нсу. Узроци ННсу могу се сврстати у четири главне категорије:

1. генетски поремећаји ензима који учествују у метаболизму Нсу (нпр. CBS);
2. недовољан унос фолата, витамина В12 и витамина В6;
3. повећани унос метионина и
4. смањена функција бубрега (*Hankey and Eikelboom, 1999*).

У случају када Нсу не може бити конвертован у цистеин или реконвертован у метионин, углавном због дефицита системске прекомерне искоришћености коензима, нивои Нсу у крвној плазми расту и настаје ННсу (*Joseph et al., 2011*). Такође, вредности Нсу у плазми су зависне од метаболизма Нсу у јетри и бубрезима (*Schalinske and Smazal, 2012*). Поједине студије су показале да повишене вредности Нсу могу бити фактор ризика за појаву кардиоваскуларних болести (*Ganguly and Alam, 2015; Lominadze et al., 2006; Heinz et al., 2009*). ННсу примарно доводи до патолошких промена на васкуларном ендотелу и до липидне пероксидације, што може изазвати болест периферних артерија и атеротромбозу (*Joseph et al., 2011*). Повишене вредности Нсу доказано су присутне код бубрежних и болести централног нервног система као што је Алцхајмерова болест (*Smith et al., 2010; Sen et al., 2009*). ННсу такође може бити регистрована у плазми особа које су оболеле од епилепсије и Паркинсонове болести (*Belcastro and Striano, 2012; Siniscalchi et al., 2006*). Са друге стране, у неким студијама показано је да вредности Нсу у плазми могу бити биомаркер код инфламацијских болести, попут реуматоидног артритиса али и фактор ризика за повећану учесталост коштаных фрактура (*Wällberg-Jonsson et al., 2002; Schroecksnael et al., 2003*).

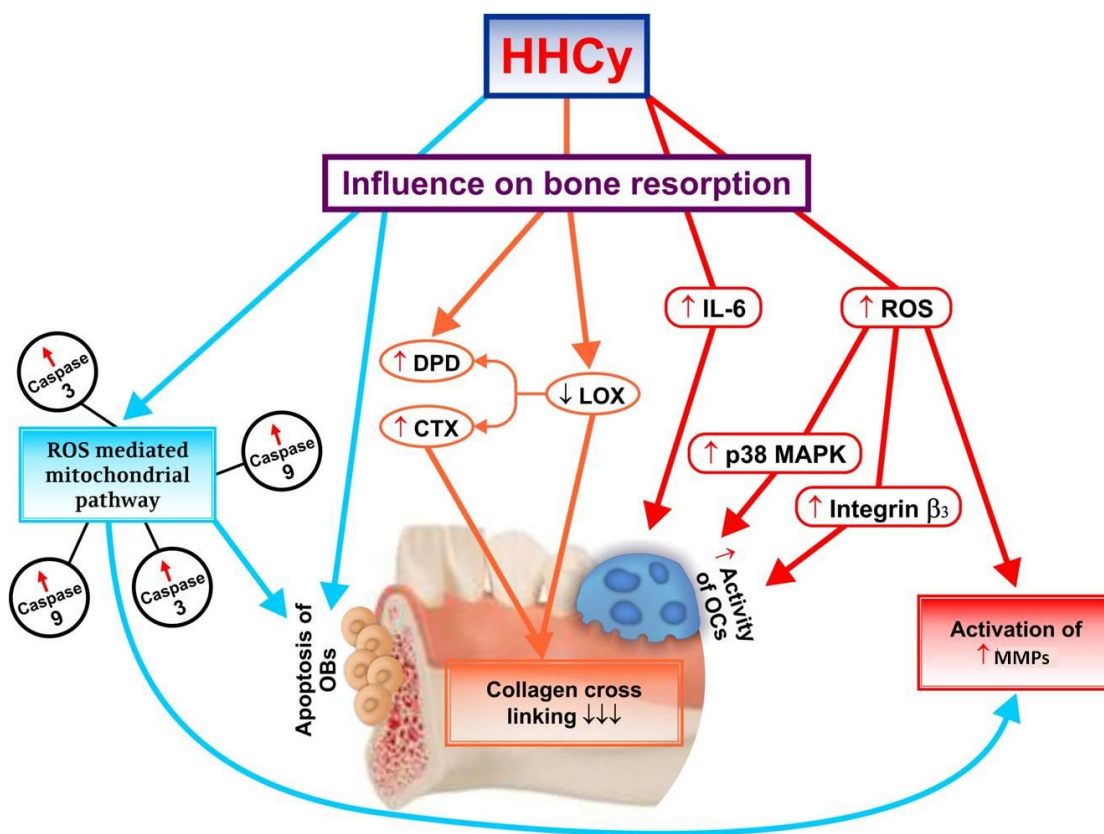
1.3.3. Улога хомоцистеина у ремоделовању костију и настанку пародонтопатије

Осим потврђеног фактора ризика за развој кардиовакуларних болести (*Ganguly and Alam, 2015; Lominadze et al., 2006; Heinz et al., 2009*), ННсу има потенцијалну улогу у ремоделовању коштаных структура и такође је један од фактор ризика за рани настанак остеопорозе и коштаных фрактура код старијих пацијената. Коштано ремоделовање је физиолошки процес који врше ОБ и ОС са циљем да обезбеде калцијум за различите процесе у организму (*Vacek et al., 2013*). Сматра се да ННсу утиче на коштану ресорпцију повећањем активности ОС и смањењем активности ОБ али такође и смањењем протока крви кроз кост. Са друге стране у студији *Herrmann* и сарадника, показано је да се Нсу може везати за колаген тип 1 из коштаног екстрацелуларног матрикса преко тиол амино групе. На тај начин долази до смањења јачине костију као последица нарушене микроархитектуре (*Herrmann et al., 2009*). Повећана коштана ресорпција може бити стимулисана ННсу што се објашњава чињеницом да ННсу стимулише синтезу проинфламацијског маркера IL-6, што повећава диференцијацију и развој ОС (*Thaler et al., 2011*). *Thaler* и сарадници су показали да ННсу доводи до порозности коштаног матрикса инхибицијом готово свих коштаных структура које су есенцијалне за стабилизацију и умрежавање колагена. Узрок оваквог дејства ННсу је заправо њена инхибиција лизил оксидазе (LOX), ензима који катализује први корак који води до формирања колагене мреже (*Thaler et al., 2011*) (Фигура 3). У студији *Gerdhem* и сарадника, 2007. године, показано је да су повећани нивои укупног Нсу у серуму повезани са повећањем коштаног ремоделовања (ресорпција и стварање), серумских маркера умрежавања телопептида колагена типа 1 (CTX), серумског TRACP5b, серумског остеокалцина, уринарног деоксиридинолина (DPD) и паратиреоидног хормона (PTH), такође и са ниском густином коштане масе (*Genco and Borgnakke, 2013*). Закључили су да је висок ниво серумског Нсу фактор

ризика за настанак коштаных фрактура код старијих жена. Њихови резултати су сагласни са претходном студијом о утицају Нсу на умрежавање колагена где су показали да жене са високим вредностима Нсу имају више вредности СТХ и DPD. Познато је да су DPD и СТХ важни за умрежавање колагена и да се секретују током ресорпције кости (*Genco and Borgnakke, 2013*).

Још један пут који указује на утицај Нсу у коштаног ресорпцији је стимулација стварања ОС заједно са повећаним стварањем интрацелуларних реактивних кисеоничних врста (ROS) (*Koh et al., 2006*). Главни пут настанка интрацелуларних ROS је преко повећане активности р38 митоген-активирани протеин киназе (МАРК) и интегрин β3. Такође, потврђено је да антиоксиданс, N-ацетил цистеин (NAC) блокира стварање ROS-а и формирање ОС, које је индуковала ННсу. На овај начин NAC смањује ресорпцију кости, активност р38 МАРК и ниво интегрин β3. Резултати ове студије сугеришу да је повећана ресорпција кости под утицајем Нсу повезана са повећаном остеопорозом која доводи до већег ризика од фрактура код особа са средњим и тешким обликом ННсу. Чињеницу да NAC редукује оксидациони стрес и да ННсу индукује апоптозу ћелија које су укључене у процес стварања кости, показали су у студији *Kim* и сарадници (*Kim et al., 2006*). Њихови резултати сугеришу да ННсу индукује и апоптозу ОБ и њихових прекурсора преко ROS-посредованог митохондријалног пута где су главни фактори апоптозе каспаза-3 и каспаза-9. Као последица апоптозе ОБ настаје редуковано формирање кости и развој остеопорозе (217). Други извор ROS је интрацелуларни калцијум из NMDA-R1. Нсу учествује као лиганд за NMDA-R1, чиме се регулише унос калцијума. Он учествује у ослобађању ROS из ћелија, при чему ROS даље доводи до активације MMP из про MMP у MMP (*Suzuki et al., 2013*) (Фигура 3).

Коштана ресорпција изазвана високим вредностима циркулишућег Нсу у крви је повезана са променама у алвеоларној кости и пародонтопатијом. Пародонтопатија је хронична инфламацијска болест која настаје као одговор на бактеријске продукте, нарочито на *Porphyromonas gingivalis* изазивајући продукцију проинфламацијских цитокина као што су TNFα, IL-1β, IL-6 и IL-8 (*Bhardwaj et al., 2015; Suzuki et al., 2013*). Повећане вредности ових цитокина доводе до инфламацијске каскаде која утиче на метаболизам метионина и хомеостазу Нсу. Са друге стране, познато је да хронична инфламацијска болест повећава системско инфламацијско оптерећење које има тенденцију да смањи доступност витамина у организму. У те витаминима убрајају се и они који имају улогу кофактора у метаболизму Нсу тако да њихова истрошеност индиректно указује на повезаност пародонтопатије и ННсу (*Schroecksadel et al., 2004*). Повезаност Нсу са пародонтопатијом није довољно разјашњена у литератури. Постоји само неколико студија које су истраживале ову повезаност (*Bhardwaj et al., 2015, Olsen et al., 2018*). У студији *Joseph* и сарадника 2011 године, показано је да су повишене вредности Нсу у плазми присутне код клинички здравих Индијских пацијената са хроничном пародонтопатијом али они нису пронашли значајну разлику у вредностима Нсу у плазми код пацијената са средњим и тешким обликом пародонтопатије упркос чињеници да су повишене вредности Нсу биле последица перзистентне имуно-инфламацијске активације изазване пародонталним бактеријама (*Bhardwaj et al., 2015*). Из инфламацијских пародонталних џепова ослобађа се IL-6 који интерагује са витамином В6 и стога може компромитовати активност цистатионин-β-синтазе (*McCarty, 2000*). Ово може нарушити метаболизам Нсу и његову конверзију у цистатион, па вредности Нсу расту.



Фигура 3. Утицај хиперхомоцистеинемије (HHCy) на ресорпцију костију. HHCy путем митохондријског пута посредованог реактивним врстама кисеоника (ROS) узрокује апоптозу остеобласта; ОБ (преко активирања каспазе -3 и каспазе-9). Такође, HHCy инхибира LOX ензим који је неопходан за умрежавање колагена, а самим тим може довести до смањења чврстоће костију. HHCy такође регулише проинфламацијске цитокине као што је IL-6 који заузврат ступа у интеракцију са витамином B6 и смањује његову доступност узрокујући даље повишење нивоа Hcy. Овај пут доводи до повећања активности остеокласта (OC) и ресорпције костију. Опсежна генерација ROS стимулише активности p38 MAPK, интегрин β_3 и матриксних металопротеиназе (MMP), што даље убрзава стварање OC, ресорпцију костију, губитак везивног ткива и на крају губитак костију и настанак пародонтопатије.

Друга претпоставка је да IL-6 може активирати Т помоћне ћелије и довести до ослобађања интерферона- γ . То даље стимулише макрофаге и моноците, који утичу на формирање ROS-а, што не може бити елиминисано антиоксидансима због хроничне инфламације (McCarty, 2000). Акумулирани ROS утиче на витамин B12 и тетра hidrofolat, па се њихове вредности смањују (Bhardwaj et al., 2015). Ови витамини су коензими који учествују у реконверзији Hcy у метионин и ово је још један начин где је метаболизам Hcy погођен хроничном инфламацијом, у овом случају пародонтопатијом. Bhardwaj и сарадници су такође показали да је хронична пародонтопатија повезана са повишеним вредностима Hcy. Они су утврдили да након 12 недеља нехируршке терапије пародонтопатије (уклањање чврстих наслага, киретажа џепова) постоји значајно смањење инфламације у пародонцијуму и да се вредности Hcy у плазми смањују ($11.34 \pm 1.87 \mu\text{mol/L}$) што све указује да нехируршка терапија пародонтопатије доводи до нормализације хомеостазе Hcy. Један од закључака ове студије је да се витамин B6 и фолна киселина могу комбиновати са нехируршком терапијом пародонтопатије због њиховог синергистичког ефекта на примарну и секундарну превенцију кардиоваскуларних болести (Brazzelli et al., 2010). Поменуто је да пародонтопатија има сличан имуно-инфламацијски профил као реуматоидни артритис, па су слични и механизми преко којих Hcy бива повећан у пародонтопатији

(Schroeksnadel et al., 2003, Lazzarini et al., 2007). То се може објаснити чињеницом да оштећена пародонтална ткива могу убрзати реметилационе реакције ДНК и РНК и да ове реакције доводе до ослобађања S-аденозилхомоцистеина (SAH) и Нсу у плазми, повећавајући даље вредности Нсу и изазивајући ННсу.

Као што је већ поменуто, ННсу утиче на ремоделовање костију (Behera et al., 2017), али такође представља и већи ризик за постоперативне васкуларне компликације (Niro et al., 2018). Ове чињенице такође указују да ННсу може утицати на ресорпцију кости и постоперативни ток пародонтопатије. Из свега горе поменутог можемо закључити како је врло вероватно да ННсу узрокује промене у пародонталном ткиву а чини се да улога унетих нутритивних компоненти има највећи утицај на хомеостазу Нсу а самим тим и на цревну и оралну микробиоту што у крајњем резултира олакшаним настанак пародонтне болести.

1.4. Дисбиоза

Током последњих година све је више интересовања и покушаја у разумевању микробиома, генома свих наших микроба. Напредовање технологије, техника секвенционирања генома и метагеномских анализа омогућили су научницима да проучавају стање микробиома и његове функције као и да истражују интеракције микробиома и домаћина како у здрављу тако и у болести. Процењује се да људски микробиом има 100 трилиона микроба, свеукупне површине од око 300 m². Већина ових микроба живи у нашим цревима (Moon, 2016; Schroeder and Bäckhed, 2016). Микробиота се састоји од заједница бактерија, вируса и гљивица које живе у симбиози а чак преко 90% микробиома чине бактерије па се оне зато и сматрају најодговорнијим за опште стање микробиома. У здравом људском интестиналном тракту може се сместити најмање 1000 различитих врста бактерија од којих су најбројније и најважније две бактеријске врсте, *Bacteroidetes* и *Firmicutes*. Велики метагеномски пројекти, попут Европске метагеномије цревног тракта човека пронашли су 3,3 милиона јединствених гена бактерија цревног тракта који кодирају протеине што је далеко више у поређењу са целокупним људским геномом који има око 23000 гена што објашњава до којих све проблема може довести нарушавање њихове равнотеже (Qin et al., 2010). Људски микробиом има опсежне функције као што су развој имунитета, одбрана од патогена, исхрана домаћина, производња масних киселина кратког ланца важних за метаболизам енергије домаћина, синтеза витамина, складиштење масти као и утицај на људско понашање, што га чини суштинским органом тела без којег не бисмо функционисали правилно (Qin et al., 2010).

За разлику од генома домаћина, који је релативно сталан, микробиом је динамичан и мења се развојем и утицајем фактора окружења као што су исхрана и употреба антибиотика (Lozupone et al., 2012). Најдраматичније промене у саставу јављају се у раном детињству и у бројним болестима (Palmer et al., 2007). На цревни микробиом новорођенчета утиче гестацијска старост, начин порођаја, врста хране (мајчино млеко или храњење адаптираним млеку), нутритивни статус мајке (прекомерна тежина или потхрањеност) и употреба антибиотика (Meropol et al., 2015). Промене у саставу микробиома такође су веома важне у патогенези бројних болести. Значајно је утврдити да ли је микробна неравнотежа повезана са болестима као и њен утицај на исте (Goulet, 2015). Гојазност, метаболичке болести, гастроинтестиналне болести, аутоимуне болести, алергије и карциноми су повезани са повећаним броја штетних бактерија и смањеним бројем корисних бактеријских врста (Goulet, 2015). Бројни подаци сугеришу да терапија дисбиозе може помоћи у лечењу многих болести. Сматра се да би употреба пробиотика и пребиотика подстакла ширење корисних

бактерија и обнављање добрих бактеријских заједница, али ови приступи се још увек истражују.

1.4.1. Орални микробиом

Усна дупља је почетни део гастроинтестиналног тракта. Колонизирана је бројним врстама микроорганизама. Микрофлора усне дупље садржи око 700 различитих врста микроорганизама (*Diaz et al., 2016; Graves et., 2019*). Микроорганизми, примарно локализовани у усној дупљи, могу бити узрок инфекција на удаљеним органима и ткивима домаћина. У последње време много је пажње посвећено њиховом могућем учешћу у настанку и развоју кардиоваскуларних, респираторних и гастроинтестиналних обољења. Све је више доказа да системске болести, попут дијабетеса, реуматоидног артритиса и системског еритематозног лупуса, које карактерише повећана упала, нарушавају оралну микробиоту (*Graves et., 2019*). Студије снажно указују да IL-17 игра веома важну улогу и да је кључни посредник у овом процесу (*Graves et., 2019*).

Код здравих особа, микроорганизми усне дупље су у одговарајућој равнотежи. Промена ове равнотеже повезана је са патогенезом оралних болести као што је пародонтопатија, али и са формирањем каријеса, лихена, леукоплакије, оралног карцинома и пери-имплантитиса (*Corrêa et al., 2019; Gao et., 2018*) (**Фигура 4**). Постоје докази који указују на то да пародонтална болест представља дисбиотично стање оралног микробиома (*Fiorillo et al., 2019*). Код пародонтопатије, највероватније постоји промена у саставу оралног микробиома или промене у бактеријској патогености, што се данас назива орална дисбиоза. Такође се верује да пародонтопатију покрећу бактерије које су већ присутне у усној шупљини. (*Griffen et al., 2012*). Развој пародонтопатије карактеришу не само квантитативне већ и квалитативне промене оралног микробиома (*Payne et., 2019; Zhang et al., 2018*). У студијама на мишијем моделу пародонталне болести доказана је промена како у квантитативном, тако и у квалитативном саставу популације коменсалних микроба: аналогно пародонталној болести код људи (*Costalonga and Herzberg, 2014*). Квалитативне промене се јављају као резултат конкурентности међу микробним врстама, што доводи до повећане продукције бактеријских токсина који су такође патогени. Као резултат променитих промена долази до деструктивних поремећаја пародонталних ткива и ресорпције алвеоларне кости (*Costalonga and Herzberg, 2014*). Када је оштећен имунски одговор настаје ослобађање MMP, неутрофила и Т лимфоцита што утиче на покретање губитка алвеоларне кости и убрзавања пародонталне болести (*Jones et al., 2000; Slawik et al., 2011*). Исхрана представља један од кључних аспеката који утичу на оралну хомеостазу микробиома. На пример, употреба рафинисаних угљених хидрата у исхрани највише доприноси поремећају оралног микробиома, пре свега се то односи на употребу сахарозе (*Gao et al., 2018; Jones et al., 2000*). Промене у гингивалном сулкусу и настанак пародонталне болести су повезане са променама у исхрани и са начином живота. У Јужној Америци, посебно у удаљеним амазонским селима, људи који живе у шумама мање су изложени селективности модерног стила исхране и стога су генетски мање разнолики од мултирасних и мултиетничких урбаних људи или друштава. То се заиста одражава на стоматогнатни систем јер орални микробиом показује ограничену микробиолошку разноликост у усној дупљи у односу на ону код урбаних људи. Слично томе, ескимска племена показивала су ниску преваленцију пародонталних болести и каријеса све до увођења савремене исхране у своје окружење (*Vartoukian et al., 2009; Kristoffersen and Bang, 1973*) што значи да су савремена прехрана и начин живота

наметали промене у пародонталном ткиву што је довело до лакшег и бржег настанка пародонталне болести (*Gao et al., 2018; Jones et al., 2000*).

Бактерије црвеног комплекса, заједно са бактеријама наранцастог комплекса, који укључује и *Prevotella spp.*, *Fusobacterium spp.* и *Parvimonas micra*, првобитно су биле окарактерисане истраживањима самих култура бактерија а недавно су ове бактерије потврђене коришћењем ДНК-ДНК хибридизације применом савремене технологије секвенционирања. Ови бактеријски комплекси који чине орални микробиом уско су повезани са дубином пародонталног џепа. Алати за секвенционирање такође су олакшали повезаност између пародонтопатије и претходно некултивисаних бактеријских врста. Да би се објаснила појава пародонтопатије са једним или више патогена, недавно је предложена хипотеза о дисбиози која тврди да се прелазак из здраве средине у стање пародонталне болести одражава у промени бактеријске заједнице и бактеријских врста у пародонталном џепу (*Veeranki and Tyagi, 2017*). Пародонтална терапија, супрагингивални и субгингивални дебридман или пародонтална хирургија смањују број бактерија црвеног и наранцастог комплекса и доводе до ребаланса оралног биофилма (*Jones et al., 2000*). Превентивне и допунске терапије, на пример пробиотицима, би могле знатно утицати на одржавање равнотеже и на побољшање оралног микробиома и допринети спречавању настанка болести.

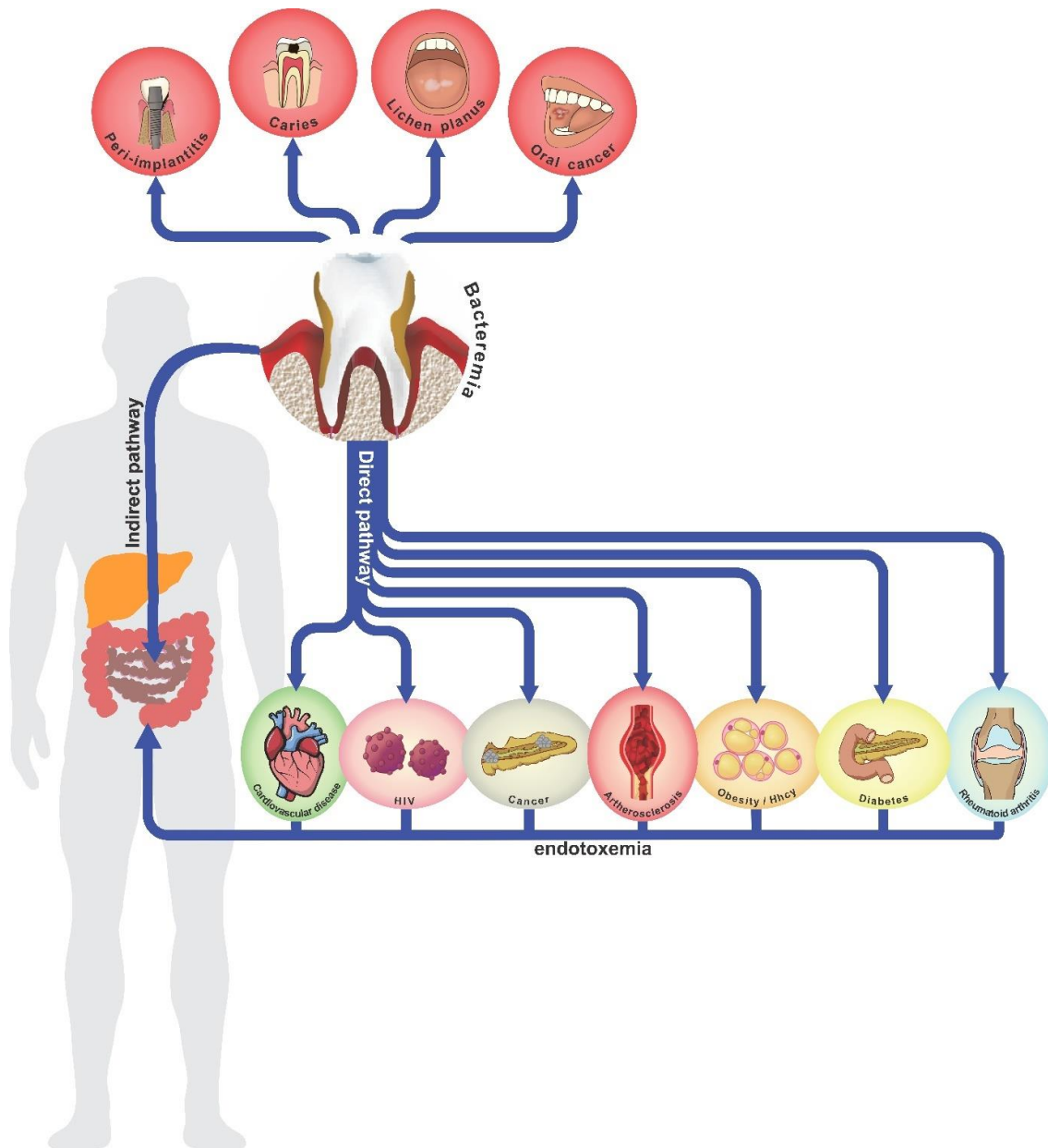
1.4.2. Цревни микробиом

Познато је да неравнотежа између добре и лоше микробне популације, посебно у цревима, изазива системске болести (*Gentschew and Ferguson, 2012*). Свака промена микробиома црева може довести до промена оралног микробиома и обрнуто. Слuzница гастроинтестиналног тракта представља улазно место за микроорганизме (*Corrêa et al., 2019*). Примарно место колонизације бактерија у људском телу је ГИТ. Цревну флору формира више од 1000 врста бактерија. Она је првенствено састављена од анаеробних бактерија које чине више од 99% цревних микроба као што су *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Actinomycetes* и *Archaeobacteria*. Више од 90% поменутих чине *Firmicutes* и *Bacteroidetes* (*Corrêa et al., 2019*). Пропорција *Firmicutes* и *Bacteroidetes* се разликује према старосној групи и веома је важна у дијагнози дисбаланса цревне микробиоте. Ова пропорција код новорођенчади износи 0,4, код одраслих 10,9 а код старије популације 0,6 (*Mariat et al., 2009*). Одржаватање одговарајуће равнотеже цревне микробиоте је од круцијалне важности ради очувања здравља читавог организма.

Болести гастроинтестиналног система настају као резултат сложених интеракција између генетичких, имунских, микробиолошких и фактора животне средине (*Chivero et al., 2019; Baumgart et al., 2007*). Губитак толеранције на антигене стимулише диференцијацију Т помагачких лимфоцита и производњу проинфламацијских цитокина TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-23 и хемокина. Инфламцијске ћелије које привлаче цитокине и хемокине тада ослобађају неспецифичне инфламацијске супстанце које доводе до значајних оштећења црева (*Radford-Smith and Pandeya, 2006; Atarashi et al., 2017*).

Чланови оралне и орофарингеалне микробиоте до црева долазе гутањем пљувачке, и путем хране и пића. Пљувачка садржи огроман број оралних бактерија за које се зна да су ретки колонизатори здравог ГИТ и ретко присутни у истом. Међутим, у случајевима тешких болести забележен је повећан број оралних бактерија у цревима, нпр. код инфламацијских болести црева, цирозе јетре, примарног склерозирајућег холангитиса, ХИВ инфекције, карцинома дебелог црева и гастроезофагеалне

рефлуксне болести (Vartoukian et al., 2009; Gentschew et al., 2017; Baumgart et al., 2007; Atarashi et al., 2017). Дисбиотско окружење црева је претежно заступљено у болестима као што су метаболички синдром, дијабетес, гојазност и хипертензија, а сама дисбиоза утиче на стање усне дупље и погоршање стања потпорног апарата зуба, што доводи до настанка пародонталне болест (Corrêa et al., 2019). Два потенцијална механизма везе између пародонталне и системских болести су бактеријемаја која потиче из пародонталних цепова и системска дифузија медијатора упале такође из насталих пародонталних цепова. Други механизми, попут оштећења функције интестиналне баријере потенцијално помажу у индуковању модулације имунског профила црева. Орална дисбиоза настала дисбиозом црева такође може резултирати ендотоксемијом и системском инфламацијом (**Фигура 4**). *P.gingivalis*, одговорни микроорганизам оралне дисбиозе, изазива дисрегулацију у ГИТ. Промене оралног микробиома могу бити и последица дејства алкохола, цигарета и системског хроничног запаљења која последично могу утицати на напредовање већ постојеће болести као на пример цирозе јетре (Ahn et al., 2011). Показало се да су пародонталне болести повезане са повећаним ризиком за појаву карцинома панкреаса. Орални патогени *P.gingivalis* и *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* спадају у једне од најчешћих етиолошких фактора за настанак карцинома панкреаса (Ahn et al., 2011).



Фигура 4. Потенцијални механизми који повезују пародонтална стања са системским обољењима пацијената. Два потенцијална механизма везе пародонталне и системских болести су бактеријемија која потиче из пародонталних ткива и системска дифузија медијатора упале из лезије цепова (*direct pathway*). Орална дисбиоза настала дисбиозом црева такође може резултирати ендотоксемијом и системском инфламацијом цепова (*indirect pathway*).

1.4.3. Улога дисбиозе у настанку пародонтопатије

Колонизацијом слузнице ГИТ, микрофлора активира урођени и стечени имунски одговор домаћина. Антиген презентујуће ћелије присутне у слузокожи ГИТ, презентују антигене наивним Т лимфоцитима. Када антиген презентујуће ћелије ступе у контакт са антигенима микроорганизама, започињу продукцију цитокина који затим усмеравају диференцијацију Т лимфоцита у Th1, Th2 и Th17 лимфоците. Тако на пример, у улцерозном колитису, Кроновој болести, у инфламацијским болестима црева доминирају Th1 лимфоцити, који продукују IL-6, TNF α и интерферон γ али такође активно учествују и Th17 лимфоцити, који продукују IL-17 и IL-23 (Torres et al., 2017).

Састав оралног микробиома варира од једног интраоралног места до другог што зависи од имунског одговора домаћина (Knol, 2005). Једна бактерија није довољна да изазове пародонталну болест, али одговарајући микробиом у оквиру којег бактерије делују синергистички тако да потенцирају способност домаћина да одговори и заштити се, активирајући тако урођени имунски одговор. Присуство и количина бактерија оралног микробиома је у директној корелацији са прогресијом дубине пародонталног џепа. Џепови дубине веће од 4 mm садрже *Treponema*, *Sinergistetes*, *Porphiromonas*, *Prevotella*, *Sinergists* и *Tannerella* род бактерија (Hutter et al., 2003). У дубљим пародонталним џеповима налазе се и *Megasfere*, *Lachnospiraceae*, *Filifactor*, *Negativicutes*, *Seleomonas* родови. Док се у најдубљим пародонталним џеповима налазе родови *Erisipelotrichia*, *Erisipelothric* и *Bulleidia* (Hajishengallis et al., 2011; Anh et al., 2011; Griffen et al., 2012). Из поменутих разлога, недавно је предложена хипотеза о дисбиози, која тврди да се прелазак из здравог стања у стање пародонталне болести одражава променама бактеријских заједница у пародонталном џепу (242). Уколико се код особа изолује непатогена бактеријска флора неће доћи ни до инвазије потенцијално патогених микроорганизама при чему онда не долази до инфламације пародонцијума. Међутим, уколико дође до накупљања денталног биофилма, после 24 сата долази до развоја почетних лезија гингивитиса (98).

Адекватном пародонталном терапијом могуће је смањити број пародонтопатогених бактерија до поновног успостављања уравнотеженог оралног биофилма (Costalonga and Herzberg, 2014; Jones et al., 2000). Да би се промовисала здрава цревна микробиота и спречиле и излечиле гастроинтестиналне болести, регулисао гингивални проток крви и спречио последични настанак пародонтопатије, неопходно је превентивне и терапијске методе побољшати и допунити пробиотицима.

II
ЦИЉЕВИ
СТУДИЈЕ

2. ЦИЉЕВИ СТУДИЈЕ

Општи циљ студије био је испитати ефекте пробиотика (*Lactobacillus rhamnosus*) на пародонтопатију код мишева са хиперхомоцистеинемijом.

Специфични циљеви били су:

- утврдити присуство пародонтопатије код мишева са хиперхомоцистеинемijом и мишева храњених масном храном;
- испитати утицај хиперхомоцистеинемije на настанак пародонтопатије;
- утврдити присуство дисбиозе код мишева са хиперхомоцистеинемijом и мишева храњених масном храном;
- испитати утицај хиперхомоцистеинемije на настанак цревне дисбиозе;
- испитати утицај цревне дисбиозе на пародонтопатију;
- испитати експресију гена, протеина и MMP који посредују у процесу инфламацијског одговора у пародонталном ткиву мишева.

III
МАТЕРИЈАЛ И
МЕТОДЕ

3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

Све процедуре које су коришћене у овом истраживању су прегледане и након тога одобрене од стране Институционалног одбора за негу и употребу животиња (*Institutional Animal Care and Use Committee - IACUC*) Универзитета у Лујвилу, Кенктаки, САД (број: 19592). У даљем раду са животињама поштоване су смернице Националног завода за здравство Сједињених Америчких Држава (*National Institutes of Health – NIH*).

Ово истраживање се сврстава у експерименталну студију, изведену на укупно 48 мишева, 36 мишева дивљег типа *WT* (C57BL/6J) и 12 *knock-out CBS^{+/-}* (B6.129P2-Cbstm1Unc/J 002853) мишева, хетерозигота, мушког пола просечне телесне тежине 20 грама.

На почетку студије, мишеви су били подељени у 8 група:

1. мишеви *WT* (*WT* група);
2. мишеви *WT* који су били третирани пробиотиком (*Lactobacillus rhamnosus*) перорално у дози од 2.5×10^5 CFU дневно, у периоду од 12 недеља (*WT+LGG* група);
3. мишеви *WT* којима је била индукована пародонтопатија *LPS* (*PD* група);
4. мишеви *WT* којима је била индукована пародонтопатија *LPS* и који су били третирани пробиотиком (*Lactobacillus rhamnosus*) перорално у дози од 2.5×10^5 CFU дневно, у периоду од 12 недеља (*PD+LGG* група);
5. мишеви *CBS^{+/-}* (*CBS^{+/-}* група);
6. мишеви *CBS^{+/-}* који су били третирани пробиотиком (*Lactobacillus rhamnosus*) перорално у дози од 2.5×10^5 CFU дневно, у периоду од 12 недеља (*CBS^{+/-} +LGG* група);
7. мишеви *WT* који су били храњени специјалном храном богатом мастима у периоду од 12 недеља (*HFD* група);
8. мишеви *WT* који су били храњени специјалном храном богатом мастима и који су били третирани пробиотком (*Lactobacillus rhamnosus*) перорално у дози од 2.5×10^5 CFU дневно, у периоду од 12 недеља (*HFD+LGG* група).

У свакој од поменутих група, по 6 животиња је укључено у студију.

3.1. Екперименталне животиње

За потребе истраживања коришћени су мишеви дивљег типа *WT* (C57BL/6J) и *knock-out CBS^{+/-}* (B6.129P2-Cbstm1Unc/J 002853) мишеви, хетерозиготи, мушког пола, старости 8 недеља који су претходно купљени од лабораторије Џексон (Бар Харбор, МЕ, САД) (*Jackson Laboratory; Bar Harbor, ME, USA*).

Одговарајућа храна (стандардна или храна са високим садржајем масти, у зависности од групе) и вода су обезбеђени *ad libitum*. Стандардна дијета садржала је 20% протеина, 53% скроба, 9% масти и 5% влакана, док је исхрана са високим садржајем масти (*HFD*) садржала 15.3% протеина, 42.7% скроба и 42.0% масти (*TD.88137; Harlan Laboratories Inc., Indianapolis, IN, USA*).

У тренутку жртвовања мишеви су били стари 20 недеља.

Ради лакшег праћења, опис експерименталног протокола ове студије подељен је на два дела: *in vivo* (испитивани ефекти на живим мишевима) и *in vitro* (на пародонталном ткиву). Процедуре, поступци и параметри који су *in vivo* и *in vitro* спроведени у овом истраживању, приказани су на **Схеми 3**.

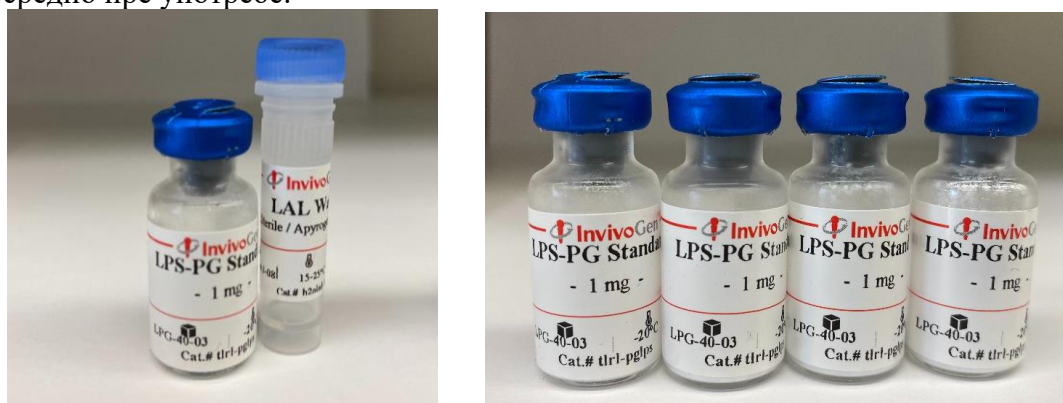
3.2. *In vivo* екпериментални протокол

In vivo екперименталне процедуре изведене на мишевима укључују индуковање пародонтопатије, индуковање цревне дисбиозе, третман пробиотком (*Lactobacillus rhamnosus*) и све параметре мерене током трајања екперименталног протокола.

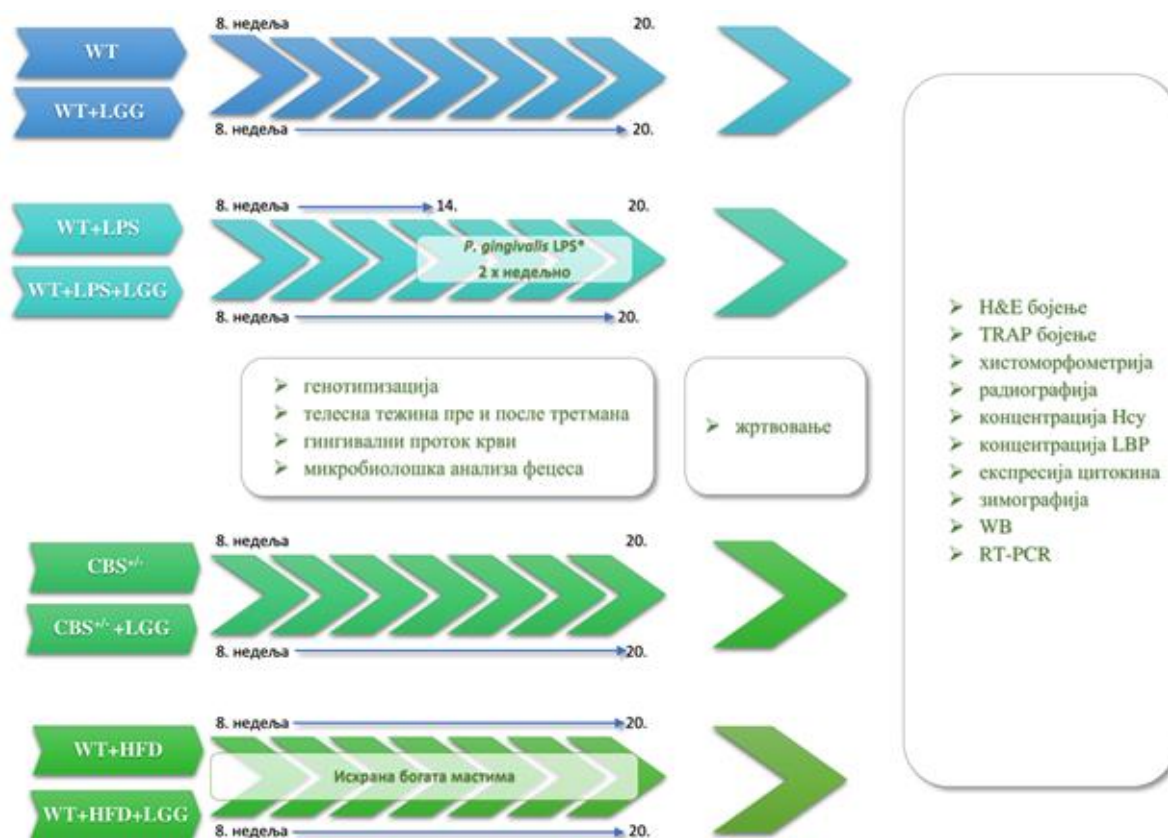
3.2.1. Липополисахаридом (*P.gingivalis*) индукована пародонтопатија

Липополисахарид (енгл. *Lipopolysaccharide*, LPS) је кључна молекуларна структура у настанку пародонтопатије и одговорна је за почетак остеокластогенезе (*Kirkwood et al., 2007*). У више наврата, показано је да липополисахарид бактерије *P.gingivalis* изазива бројне штетне цитотоксичне ефекте на пародонтална али и на бројна остала ткива мишева, пацова, али и човека (*Palaska et al., 2016; Fiorillo et al., 2019*).

Липополисахарид бактерије *P.gingivalis* LPS-PG (каталожка ознака производа: tlr1-pglps) коришћен у овом истраживању је купљен од *InvivoGen, 10515 Vista Sorrento Pkwy, Сан Дијего, Калифорнија, Сједињене Америчке Државе (Слика 1)*. Чуван је на -20°C у својој оригиналног бочици. Раствор LPS-PG припремљен је непосредно пре употребе.



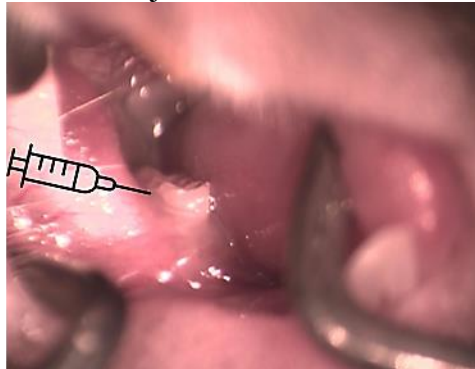
Слика 1. Оригинална фотографија бочица липополисахарида бактерије *P.gingivalis* LPS-PG коришћених у овом истраживању (*InvivoGen, San Diego, CA, USA*).



Поред бројних модела изазивања пародонталне болести, модел индуковања LPS је један од најчешћих. Превасходно зависи од типа бактерије из које се LPS изолује али и од примењене дозе и дужине њене примене. Најћешће примењивана доза липополисахарид бактерије *P.ginigivalis* износи 1-2 μ l (10-20 μ g) *Porphyromonas gingivalis*-LPS интердентално, у пределу између првог и другог максиларног или мандибуларног молара, два до три пута недељно, у трајању од 6 недеља (Zhang *et al.*, 2018).

У нашој студији, пародонтопатија је индукована код мишева интрагингивалним убризгавањем 2 μ l (20 μ g) *Porphyromonas gingivalis*-LPS (*In vivo*Gen, San Diego, CA, USA) у пределу интерденталне папиле између првог и другог мандибуларног молара (Слика 2), два пута недељно, у периоду од 6 недеља. Претходно, мишеви су анестезирани интраперитонеалним убризгавањем следеће комбинације анестетика: кетамин (енгл. *Ketamine* 80 mg/kg) и ксилазин (енгл. *Xylazine*;

10 mg/kg). Након анестезирања, мишеви су фиксирани на постоље за интервенције при чему им је индукована пародонтопатија.



Слика 2. Оригинална фотографија места апликавања *Porphyromonas gingivalis*-LPS (InvivoGen, San Diego, CA, USA) у пределу интерденталне папиле између првог и другог мандибуларног молара

3.2.2. HFD индукована цревна дисбиоза

У циљу индуковања цревне дисбиозе, мишеви су храњени специјалном храном богатом мастима (TD.88137; Harlan Laboratories Inc., Indianapolis, IN, USA) у периоду од 12 недеља (Hiyari et al., 2015; He et al., 2018; Murphy et al., 2015). Исхрана са високим садржајем масти (енгл. High fat diet, HFD) (каталожка ознака производа: TD.88137) коришћена у овом истраживању је купљена од Harlan Laboratories Inc., Индијанаполис, Индијана, Сједињене Америчке Државе. Садржала је 15.3% протеина, 42.7% скроба и 42.0% масти. 24 сата пре жртвовања експерименталних животиња, сакупљен је фецес за микробиолошку анализу и верификацију дисбиозе црева.

3.2.3. Хронични третман мишева пробиотиком (*Lactobacillus rhamnosus*)

У циљу терапијске процедуре пародонтопатије, коришћен је пробиотик *Lactobacillus rhamnosus* (LGG) (ATCC[®] 53103). Како би се опонашао најчешћи и најједноставнији пут примене пробиотика, LGG је даван перорално, у дози од 2.5×10^5 CFU у периоду од 12 недеља (Murphy et al., 2015; George et al., 2020).

Пробиотик *Lactobacillus rhamnosus* (ATCC[®] 53103) (каталожка ознака производа LOT 19345CLG5) коришћен у овом истраживању је купљен је од Culturelle, i-Health, Inc./Culturelle 55 Sebethe Drive Cromwell, CT 06416, Сједињене Америчке Државе. LGG је чуван на собној температури и примењиван је у складу са препорукама произвођача.

3.2.4. Генотипизација мишева

Узорци репа мишева су сакупљени и коришћени за генотипску анализу коришћењем ланчане реакције полимеразом (PCR) према препорукама лабораторије Џексон (Бар Харбор, МЕ, САД) (Jackson Laboratory; Bar Harbor, ME, USA). За изолацију ДНК из узорака репа мишева коришћен је кит *DNeasy tissue kit* (Qiagen cat #69506) Jane Williams: X4996 купљен од Sigma-Aldrich, Сент Луис, Мисури, Сједињене Америчке Државе. Узорци репа величине 0,3 - 0,5 cm сакупљени су и сачувани у стерилној епрувети. Након тога, додато је 180 μ l ALT пуфера и 20 μ l К протеиназе (Qiagen Cat #1010654), вортексовано и инкубирано на температури 55°C током целе ноћи. Након инкубације и 15 секунди вортекса, додато је 400 μ l пуфера *AL-ethanol mixture* и снажно промешано вортексом и центрифугирано у трајању од једног минута на 8000 обртаја. Затим се одговарајућом процедуром изоловала ДНК и према препорукама лабораторије Џексон (Бар Харбор, МЕ, САД) (Jackson Laboratory; Bar

Harbor, ME, USA) спроведене су ланчане реакције полимеразом (PCR). Коришћени прајмери у генотипизацији мишева приказани су у **Табели 3** (George et al., 2020).

Табела 3. Коришћени прајмери у генотипизацији мишева.

Коришћени прајмери у генотипизацији мишева	
Назив гена	Секвенца (5'-3')
Mutant Reverse	CGT GCA ATC CAT CTT GTT CA
Common	GAT TGC TTG CCT CCC TAC TG
Wild type Reverse	AGC CAA CTT AGC CCT TAC CC

3.2.5. Гингивални проток крви мерен ласерским доплером

Под интраперитонеалном комбинацијом анестетика кетамина (Ketamine; 80 mg/kg) и ксилазина (Xylazine; 10 mg/kg), свака животиња је стављена у лежећи положај, а гингивални проток крви је мерен ласерским доплером (енгл. *Laser Doppler*) помоћу *Speckle Contrast Imager (Moor FLPI, Wilmington, DE, USA)* на собној температури. Камера је била постављена на 15 центиметара од букалне површине гингиве у пределу првог левог мандибуларног молара. Гингивални проток крви мерен је на брзини приказа од 25 Hz, уз временску константу од једне секунде и времену експозиције камере од 20 m/sec. Контрастне слике су обрађене да би се створила слика живог флукса кодирана бојом, а траг јединице флукса такође је забележен током 2 минута код свих животиња. Подаци су изражени као јединица флукса (енгл. *flux unit; fu*) (Ke et al., 2015; Clarke and Shephard, 1984; George et al., 2018).

3.2.6. Микробиолошка анализа фецеса

Узорци фецеса су сакупљани 24h пре жртвовања животиња и након тога анализирани у компанији *Microbiome Insights Inc. Attention: Malcolm Kendall; Vancouver, BC V6R 4K6; Canada*. Урађене су следеће анализе ради детекције дисбиозе црева: анализа кратколанчаних масних киселина (SCFA), екстракција и секвенционирање ДНК и припрема узорака према већ постојећој бази података (*DNA Extraction + Library preparation and sequencing on the Illumina Next Seq (2X 150 BP)*) (Kozich et al., 2013; Gatej et al., 2018).

3.3. Жртвовање животиња и сакупљање узорака крви

Животиње су жртвоване методом цервикалне дислокације. Након жртвовања животиња, изоловане су мандибуле за даљу анализу. Крв је сакупљена након жртвовања, пункцијом абдоминалне аорте. Након коагулације 30 минута на собној температури, серум је изолован центрифугирањем (20 минута на 3000 rpm) и замрзнут на -80 °C за даљу анализу.

3.4. *In vitro* експериментални протокол

3.4.1. Патохистолошка припрема ткива

Након излоловања, мандбуле су 24 часа, на температури од 4°C, фиксиране у 4% свеже припремљеном параформалдехиду купљеног од компаније *Sigma-Aldrich*, Сент Луис, Мисури, Сједињене Америчке Државе. Након фиксације, мандбуле су узастопно испране по 15 минута, на температури од 4°C, са 5%, 10% и 15% раствором глицерола, купљених од компаније *American Bioanalytical*, Натик, Масачусетс, Сједињене Америчке Државе. Затим су мандбуле декалцификоване у 10% раствору EDTA (енгл. *Ethylenediaminetetraacetic Acid Tetrasodium Salt Dihydrate, EDTA*), купљеног од компаније *Sigma-Aldrich*, Сент Луис, Мисури, Сједињене Америчке Државе, у току 14 дана, на температури од 4°C. Једном дневно током овог периода, узорци су мешани и раствори EDTA су дневно мењани. Након тога припремљени су парафински блокови и сечени на микротому (дебљине 5µm) (*Alshammari et al., 2017; Lian et al., 2020*).

3.4.2. Бојење хематоксилин-еозином

Хематоксилин-еозин је техника бојења у хистологији која се данас најчешће користи у патохистолошким анализама, за дијагнозу болести. У нашој студији коришћен је *Mayer*-ов протокол за хистолошко бојење парафинских секција хематоксилином. Парафинске секције су депарафинисане у раствору *CitriSolv®* купљеног од компаније *Decon laboratories inc. King of Prussia*, Пенсилванија, Сједињене Америчке Државе. Потом су ткива рехидратисана у опадајућим концентрацијама етанола, 100%, 95%, 80%, 70%, током 10 минута. Секције су затим испране дестилованом водом током 10 минута, након тога бојене *Mayer*-овим хематоксилином током 5 минута, а потом испране текућом водом, 5 минута. Након испирања, секције су бојене еозином у трајању од два минута и дехидратисане у растућим концентрацијама етанола, 70%, 80%, 90%, 95%, после чега су секције ткива потопљене у апсолутни алкохол два пута, током 10 минута, а затим два пута у ксилолу. На самом крају, секције ткива су премазане *Richard-Allan Scientific™ Cytoseal™ XYL* купљеног од компаније *Thermo Fisher Scientific*, Синсинати, Охајо, Сједињене Америчке Државе и прекривене покровним стаклима. После двадесетчетворочасовног сушења, препарати су анализирани под светлосним микроскопом при увећању x20 (200 µm) (*EVOS Cell Imaging Systems, Thermo Fisher Scientific*, Сједињене Америчке Државе) (*Alshammari et al., 2017; Lian et al., 2020*).

3.4.3. Бојење тартарат-резистентном фосфатазом

Активност остеокласта дуж гребена алвеоларне кости измерена је између првог и другог мандибуларног молара на хистолошким парафинским секцијама дебљине 5 µm. Остеокласти су откривени бојењем за тартарат-резистентну фосфатазу (енгл. *tartrate-resistant acid phosphatase, TRAP*), према упутствима произвођача, коришћењем кита *Acid Phosphatase, Leukocyte (TRAP) Kit*, купљеног од компаније *Sigma-Aldrich*, Сент Луис, Мисури, Сједињене Америчке Државе. Хистолошке секције су депарафинизоване ксилолом у трајању од 30 секунди а затим испране дестилованом водом претходно загрејаној на температури од 37°C. Након тога секције су бојене TRAP раствором током 60 минута на 37°C. Затим су секције испране дестилованом водом и бојене хематоксилином током два минута. Остеокласти су идентификовани као позитивно обојени за TRAP, присутни дуж гребена алвеоларне кости. Одређен је број присутних остеокласта увећањем x60 (*EVOS Cell Imaging Systems, Thermo Fisher*

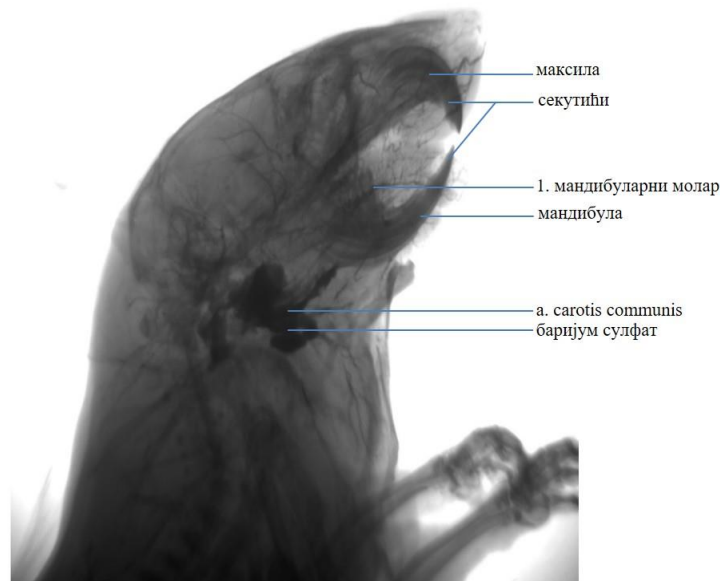
Scientific, Сједињене Америчке Државе) помоћу софтвера за анализу слике (*ImageJ 1.36* и *IMAGE-PRO* компаније *Media Cybernetics*, Silver Spring, MD, Сједињене Америчке Државе). Подаци су представљени као број остеокласта по μm кости (*Alshammari et al.*, 2017; *Lian et al.*, 2020).

3.4.4. Хистоморфометријске анализе пародонталног ткива

Хистоморфометријска анализа региона између првог и другог мандибуларног молара обухвата следеће параметре: апикалну миграцију епитела (пад епитела), ресорпцију алвеоларне кости, број полиморфонуклеарних неутрофила, фибробласта, остеокласта као и инфламацијску ћелијску инфилтрацију, интегритет алвеоларне кости и цемента. Узорци су се анализирали и скоровали на следећи начин: 0 - инфилтрација инфламацијских ћелија одсутна или је ретка (ограничена на регион маргиналне гингиве, алвеоларна кост и цемент су очувани); 1 - умерена ћелијска инфилтрација (инфламацијска ћелијска инфилтрација присутна у целокупном гингивалном ткиву, почетна алвеоларна ресорпција и интактан цемент зуба); 2 - наглашена ћелијска инфилтрација (инфламацијска ћелијска инфилтрација присутна у гингиви и периодонталном лигаменту, наглашена ресорпција алвеоларне кости и делимична ресорпција цемента); 3 - наглашена ћелијска инфилтрација (потпуна ресорпција алвеоларне кости и цемента зуба) (*Araújo et al.*, 2017). Пад епитела је дефинисан мерењем удаљености од цементно глеђне границе (енгл. *cemento enamel junction*, CEJ) до припојног епитела док је ресорпција алвеоларне кости измерена као удаљеност између CEJ и алвеоларног коштаног гребена (енгл. *alveolar bone crest*, ABC) (**Схема 1**). Мерења су поновљена 3 пута, а резултати су представљени као растојања у μm . Сlike су снимљене при увећању $\times 20$ ($200 \mu\text{m}$) и анализирани помоћу система за анализу слика (*ImageJ 1.36*). За хистоморфометријску анализу инфламацијских ћелија анализирано је десет поља димензија $45 \times 50 \mu\text{m}$ из сваког интерденталног подручја, између првог и другог мандибуларног молара. У сваком од подручја која су од интереса, укупан број ћелија (полиморфонуклеарни неутрофили, фибробласти и остеокласти) се бројао ручно из слика снимљених при $\times 60$ увећању на хистолошким препаратима обојеним Н&Е и TRAP, као што је претходно описано (*Alshammari et al.*, 2017; *Lian et al.*, 2020). На основу морфолошких карактеристика ћелија идентификовали смо фибробласте, полиморфонуклеарне неутрофиле и остеокласте. Подаци су приказани као број сваке врсте ћелија по пољу димензија $45 \times 50 \mu\text{m}$.

3.4.5. Радиографија мандибула

Након жртвовања животиња, мандибуле су изоловане и испране фосфатним пуферисаним физиолошким раствором (енгл. *Phosphate Buffered Saline*; PBS). Одмах након припреме, мандибуле су смештене у рендгенску комору и биле снимљене ренген апаратом *Kodak in-Vivo Imaging Sistem FX Pro (In-Vivo FX PRO; BRUKER Corporation, 11011 Torreyana Rd., San Diego USA)*. Мандубиле су снимљене високо продорним фосфорним екраном од 31 киловотажног (енгл. *Kilo Voltage Peak*; KVP) рендгенског излагања током 3 минута (*Behera et al.*, 2018) (**Слика 3**). Након тога, слике су анализирани помоћу система за анализу слика (*ImageJ 1.36*).



Слика 3. Оригинална фотографија примене радиографског снимања миша апаратом *Kodak in-Vivo Imaging Sistem FX Pro (In-Vivo FX PRO; BRUKER Corporation, 11011 Torreyana Rd., San Diego USA)*. Као пример, убризган је баријум сулфат при константном притиску у *a.carotis communis* ради ангиографије и визуелизације крвних судова максиле и мандибуле.

3.4.6. Одређивање концентрације хомоцистеина

Концентрација хомоцистеина измерена је ELISA методом. Из серума мишева, према утврђеном протоколу произвођача, коришћен је кит *Homocysteine Assay Kit (Fluorometric)* (каталожка ознака производа: ab228559) купљен од *Sigma-Aldrich*, Сент Луис, Мисури, Сједињене Америчке Државе. Узорци серума додати су у палету на одговарајућим местима, затим је додат пуфер *Homocysteine Assay Buffer са Disulphide Reducing Agent*. Смеша је инкубирана на 37°C, 30 минута на шејкеру. Након инкубације, свим узорцима додат је *Homocysteine Enzyme Mix*, након чега је смеша инкубирана на собној температури, 5 минута, заштићена од светлости. Додат је *Fluorogenic Developer Mix*, инкубиран 15 минута уз константно мешање. Након 10 минута резултати су очитани на вредности $E_x/E_m=658/708$, израчунате и презентоване према препорукама произвођача.

3.4.7. Одређивање концентрације липополисахарид везујућег протеина

Концентрација липополисахарид везујућег протеина (енгл. *Lipopolysaccharide Binding Protein; LBP*) је мерена ELISA методом у складу са утврђеним протоколом произвођача, из серума мишева. Коришћени је кит *Mouse LBP ELISA Kit* (каталожки број производа: ab213876) купљен од *Abcam, Cambridge, MA, USA* (*Chivero et al., 2019*).

3.4.8. Одређивање експресије цитокина

Анализа експресије цитокина је мерена из серума мишева у складу са утврђеним протоколом произвођача. Коришћени је кит *Proteome Profiler Mouse XL Cytokine Array* (каталожки број производа: ARY028) купљен од *R&D Systems, Inc. Minneapolis, MN, USA* (*Behera et al., 2018*).

3.4.9. Одређивање активности матриксних металопроотеиназа

Ван ћелијски матрикс представља комплексну мрежу структурних и функционалних молекула које имају важну улогу у одржавању ћелијске и ткивне структуре и функције. Осим утицаја на физиолошке процесе, последњих деценија све је важнија његова улога у бројним патолошким стањима (као што су реуматоидни артритис, остеоартритис, акутне и хроничне болести срца, пародонтална болест, прогресија карцинома). MMP су породица цинк и калцијум зависних ендопептидаза које разграђују ван ћелијски матрикс. Луче се у зимогеном, неактивном облику, као про-MMP. MMP-2 и MMP-9 припадају групи желатиназа и најчешће се детектују методом желатинске зимографије. Разликују се од осталих MMP што у својој структури поред три основна подручја (проензимски, каталитички и термални домен) садрже додатни домен са три каскадна споја која се поналају (лично на фибронектин тип II) а приликом каталитичког раздвајања интереагују са колагеном и желатином. MMP-9 садржи домен који је хомологан колагену типа V (Tyagi et al., 2009; Snoek-van Beurden and Von den Hoff, 2005; Steffensen et al., 1995; Hunt and Tyagi, 2002).

Желатин зимографија је метода која омогућава детекцију MMP-2 и MMP-9 и њихову активност у биолошким узорцима. Метода се заснива на способности желатиназа да разграде желатин (денатурисани колаген). Узорци мандибуле су подвргнути раздвајању протеина електрофорезом са натријумдодецил сулфат полиакриламидом (енгл. *Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*, SDS-PEG) у гелу који садржи супстрат за протеиназе, желатин (0,1%). Након раздвајања у гелу, протеиназе се даље денатуришу и хидролизују. Подручја без обојености на позадини обојеној плаво указују на желатинозну активност. Јасно дигестиране области представљаће MMP активност, којима се приступа помоћу покретања претходно обојених маркера молекулске тежине које су квантификоване дензитометријски коришћењем *Un-Scan-It* софтвера (*Silk Scientific Inc., Orem, UT*) (Tyagi et al., 2009; Steffensen et al., 1995).

3.4.10. Одређивање експресије протеина од интереса

Колориметријске методе одређивања концентрације протеина заснивају се на хемијској реакцији протеина са различитим агенсима при чему се развијају карактеристичне боје. Интензитет настале боје је пропорционалан са концентрацијом протеина. На тачност и резултате мерења утиче врста протеина тако да различити протеини, једнаке концентрације могу показати различите степене апсорпције. Из тог разлога, неопходно је користити контролни протеин (енгл. *Bovine serum albumin*, BSA) и у слепој проби садржати све компоненте које садржи и узорак којем меримо концентрацију протеина како би се елиминисао њихов утицај на вредност апсорпције.

За анализирање експресије протеина у пародонталном ткиву свих експерименталних група коришћена је метода Вестерн блот. Процес обухвата следеће фазе: хомогенизација ткива, одређивање концентрације протеина хомогенизованог ткива, припрема протеина/узорака за анализу, припрема гелова за електрофорезу, електрофореза на гелу, трансфер протеина на мембрану, блокирање мембрано-неспецифичног везивања антитела на мембрану, инкубација мембране примарним антителом, инкубација мембране секундарним антителом, детекција сигнала и анализирање резултата.

Мандибуле су хомогенизоване и лизирани у радиоимунопреципитацијском пуферу за лизу (RIPA) допуњеним коктелом инхибитора протеазе, фенил метан сулфонилфлуоридом (PMSF) и натријум-ортованадатом купљеним од компаније

Sigma-Aldrich, Сент Луис, Мисури, Сједињене Америчке Државе. Затим су лизати центрифугирани на 5900 обртаја током 10 минута, након чега су изоловани преципити (протеини). Концентрација протеина одређивала се тестом процене протеина Бредфорд реагенсом да би се обезбедила једнака концентрација протеина. Након тога, узорци су анализирани Вестерн блот анализом као што је претходно описано (*Li et al.*, 2019). Интензитет опсега анализирао се коришћењем *BioRad ImageLab* софтвера. Сви протеини од интереса: IL-1 β , TNF α , IL-10, RANKL, OPG, TIMP-1 (Табела 4) су нормализовани у односу на вредности GAPDH.

Табела 4. Примарна антитела и њихове каталожке ознаке коришћене у овој студији.

Примарна антитела и њихове каталожке ознаке коришћене у овој студији	
Примарно антитело	Каталожка ознака
IL-1 β	SC7884
TNF α	ab215188
RANKL	Ab225820
OPG	Ab45039
IL-10	Ab183910
GADPH	Lot: 3291345

3.4.11. Квантитативна полимеразна ланчана реакција у реалном времену

Укупна РНК из пародонталног ткива је изолована према упутствима произвођача помоћу TRIzol реагенса (*Invitrogen, Carlsbad*, Калифорнија, Сједињене Америчке Државе). Затим је извршена реверзна транскрипција РНК (μg) помоћу комплета за cDNA (*High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Applied Biosystems, Foster City*, Калифорнија, Сједињене Америчке Државе). Квантитативна полимеразна ланчана реакција у реалном времену (енгл. *real-time quantitative polymerase chain reaction*, qPCR) је изведена помоћу *Thermo Scientific Luminaris Color HiGreen qPCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City*, Калифорнија, Сједињене Америчке Државе) и мРНК специфичних прајмера за: IL-1 β , TNF α , IL-10, RANKL, OPG, MMP-2, MMP-9, TIMP2, *P.gingivalis*. GAPDH је коришћен као контролни ген (*Invitrogen, Carlsbad*, Калифорнија, Сједињене Америчке Државе) (Табела 5). Квантитативна полимеразна ланчана реакција у реалном времену (енгл. *real-time quantitative polymerase chain reaction*, RT-PCR) је рађен у *LightCycler® 96 Instrument (Roche)*. Подаци су анализирани и релативна експресија гена је прерачуната према *Livak*-у и *Schmittgen*-у (). Квантификација наведених маркера је изведена у свим групама.

Табела 5. PCR специфични прајмери коришћени у овој студији.

PCR специфични прајмери коришћени у овој студији		
Назив гена	Секвенца F (5'-3')	Секвенца R (5'-3')
TNF α	CATCTTCTCAAATTCGAGTGACAA	TGGGAGTAGACAAGGTACAACCC
IL-1 β	GAAATGCCATTTGACAGTG	CTGGATGCTCTCACTAGGACA
IL-6	CTGCAAGAGACTTCCATCCA	CAGGTCTGTTGGGAGTGGT
IL-10	AGATCTCCGAGATGCCTTCA	CCGTGGAGCAGGTGAAGAAT
RANKL	CAGCATCGCTCTGTTCCCTGTA	CTGCGTTTTTCATGGAGTCTCA
OPG	ACCCAGAAACTGGTCATCAGC	CTGCAATACACACACTCATCACT
MMP-2	CTGATGGCACCCATTTACACCT	GATCTGAGCGATGCCATCAAA
MMP-9	AGAGATGCGTGGAGAGTCGAA	AAGGTTTGGAACTGCCCCAGG
TIMP2	CAAGTTCTTCGCCTGCATCAA	TCGAAACCCTTGGAGGCTT
GADPH	AGGTCGGTGTGAACGGTTTG	TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA

3.5. СТАТИСТИЧКА АНАЛИЗА

Статистичка анализа свих података је спроведена на следећи начин:

1. За анализу параметара у зависности од њихове природе, рачунала се: проценти, фреквенција, узорачка средња вредност, узорачка медијана, узорачка стандардна девијација, ранг и 95% интервали поверења;
2. За испитивање нормалности расподеле користи смо *Kolmogorov Smirnov* и *Shapiro Wilk* тестове;
3. За тестирање разлика између параметара користио се *Mann-Whitney* тест, Фишеров тест апсолутне вероватноће, једнофакторска или двофакторска анализа варијансе (*ANOVA*). Приликом тестирања разлика између параметара, употребљавао се непараметријски аналог једнофакторске анализе варијансе, *Kruskal-Wallis H* тест, са нивоом значајности од 0,05.
4. За тестирање повезаности између континуалних варијабли са другим испитиваним параметрима, употребљен је непараметријски статистички тест корелације и *Spearman*-ов коефицијент корелације, на основу којег је дефинисан смер и јачина њихове повезаности;
5. Подаци су бити анализирани коришћењем програма *GraphPad Prism* верзија 8.0.2. Резултати експеримента су изражени као средња вредност \pm стандардна девијација (енгл. Standard Deviation, SD). Статистички значајна разлика у добијеним вредностима између група сматра се када је $p < 0.05$.

IV

РЕЗУЛТАТИ

4. РЕЗУЛТАТИ

4.1. Утицај примењених третмана на телесну тежину и тежину мандибуле мишева

Примењени третмани утицали су на телесну тежину, тежину мандибуле као и на однос телесне тежине према тежини мандибуле мишева (График 1). Телесна тежина PD мишева била је значајно снижена у поређењу са контролном групом. У CBS^{+/-} групи нису уочене статистички значајне разлике, док је тромесечни третман масном исхраном (HFD група) значајно повећао телесну тежину у поређењу са контролном групом (График 1А). Третман пробиотком LGG, одржао је нивое телесне тежине у PD+LGG и CBS^{+/-}+LGG групи док је у групи HFD+LGG значајно смањio у поређењу са HFD групом мишева (График 1А). Тежина мандибуле свих непробиотски третираних екперименталних мишева била је значајно снижена у поређењу са контролном групом (График 1В). Третман пробиотком LGG значајно је повећао тежину мандибуле у свим групама у поређењу са њиховим екперименталним групама (График 1В). Односи телесне тежине и тежине мандибуле били су статистички већи код свих непробиотски третираних екперименталних мишева док је третман пробиотком LGG значајно је смањio овај однос (График 1С).

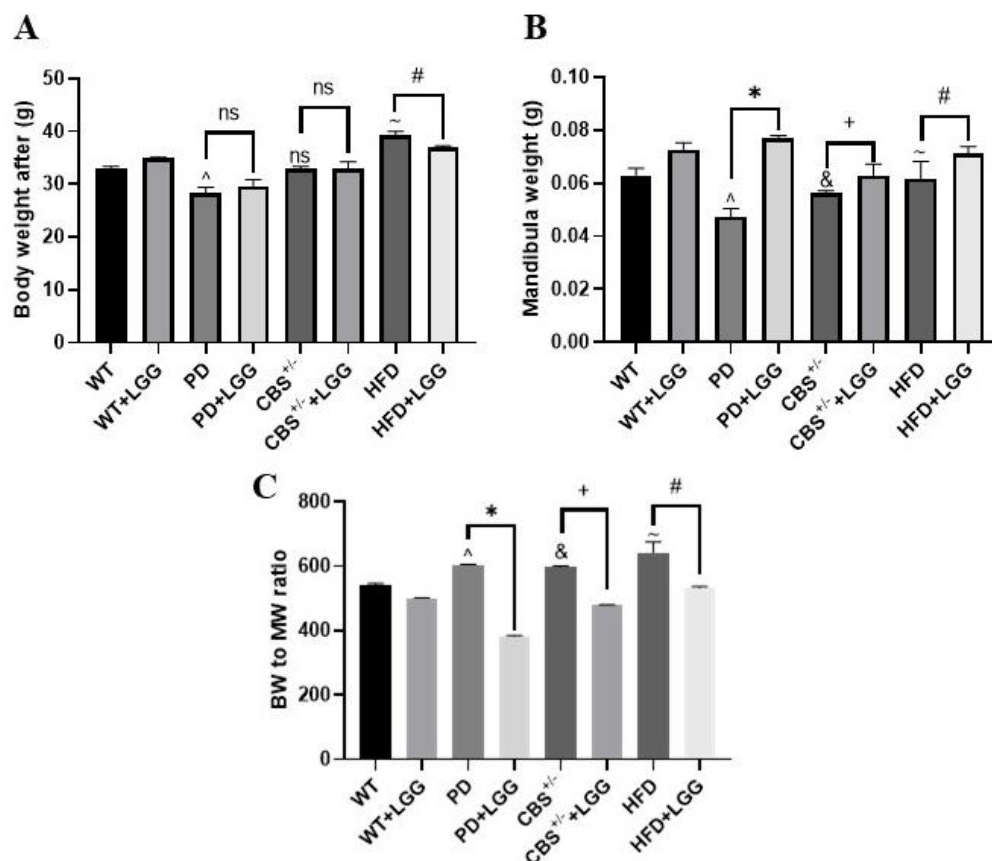
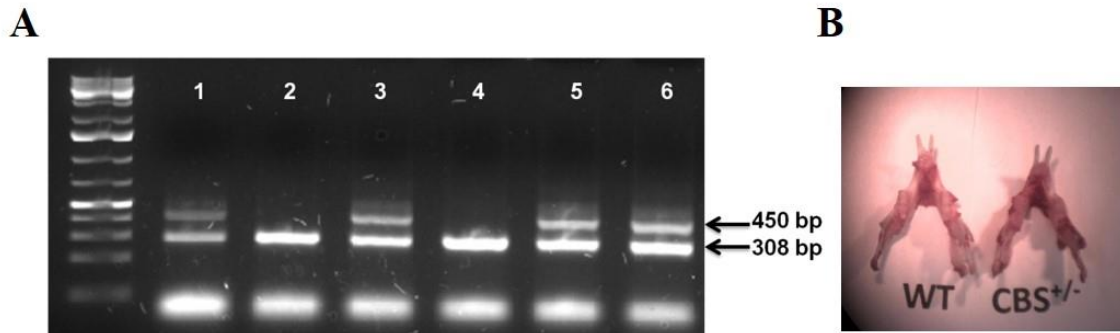


График 1. Утицај примењених третмана на телесну тежину (А), тежину мандибуле (В) и однос телесне тежине према тежини мандибуле мишева (С). Вредности су приказане као средња вредност \pm SD, n =6, по групи. nsP<0,05; ^ P<0,05 PD vs. WT; &P<0,05 CBS^{+/-} vs. WT; ~P<0,05 HFD vs. WT; *P<0,05 PD+LGG vs. PD; +P<0,05 CBS^{+/-}+LGG vs. CBS^{+/-}; #P<0,05 HFD+LGG vs. HFD.

4.2. Потврда генотипске разлике екперименталних мишева – генотипизација

Узорци хетерозиготних $CBS^{+/-}$ мишева на гелу екпримирани су траке на нивоу 450 и 308 базних парова (bp), док су узорци мишева дивљег типа ($CBS^{+/+}$) експримирати једну траку на вредности 308 bp (**Фигура 5А**). Уочене су визуелне разлике (**Фигура 5В**) и разлике у тежини мандибиле $CBS^{+/-}$ мишева (**График 1В**).



Фигура 5. Гел након електрофорезе узорака (А) и оригинална фотографије визуелне разлике између мишева дивљег типа и $CBS^{+/-}$ мишева. Узорци хетерозиготних $CBS^{+/-}$ мишева на гелу екпримирани су траке на нивоу 450 и 308 bp (1, 3, 5, 6), док су узорци мишева дивљег типа ($WT/CBS^{+/+}$) експримирати једну траку на вредности 308 bp (2, 4).

4.3. Утицај примењених третмана на системске вредности хомоцистеина

Нивои Нсу у серуму били су значајно повећани у непробиотски третираним екперименталим групама у поређењу са контролном групом (График 2). Третман пробиотком LGG значајно је смањио вредности Нсу у PD+LGG, CBS^{+/-}+LGG и HFD+LGG групама у поређењу са њиховим екперименталним групама (График 2).

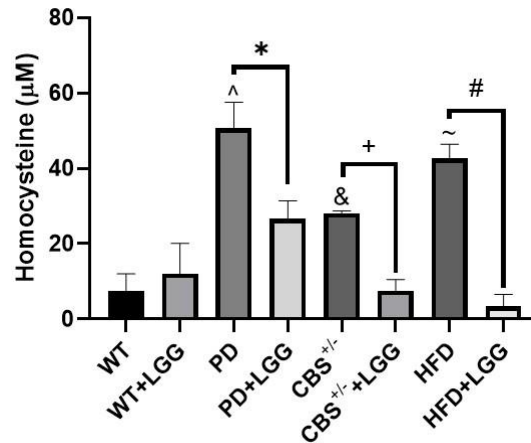
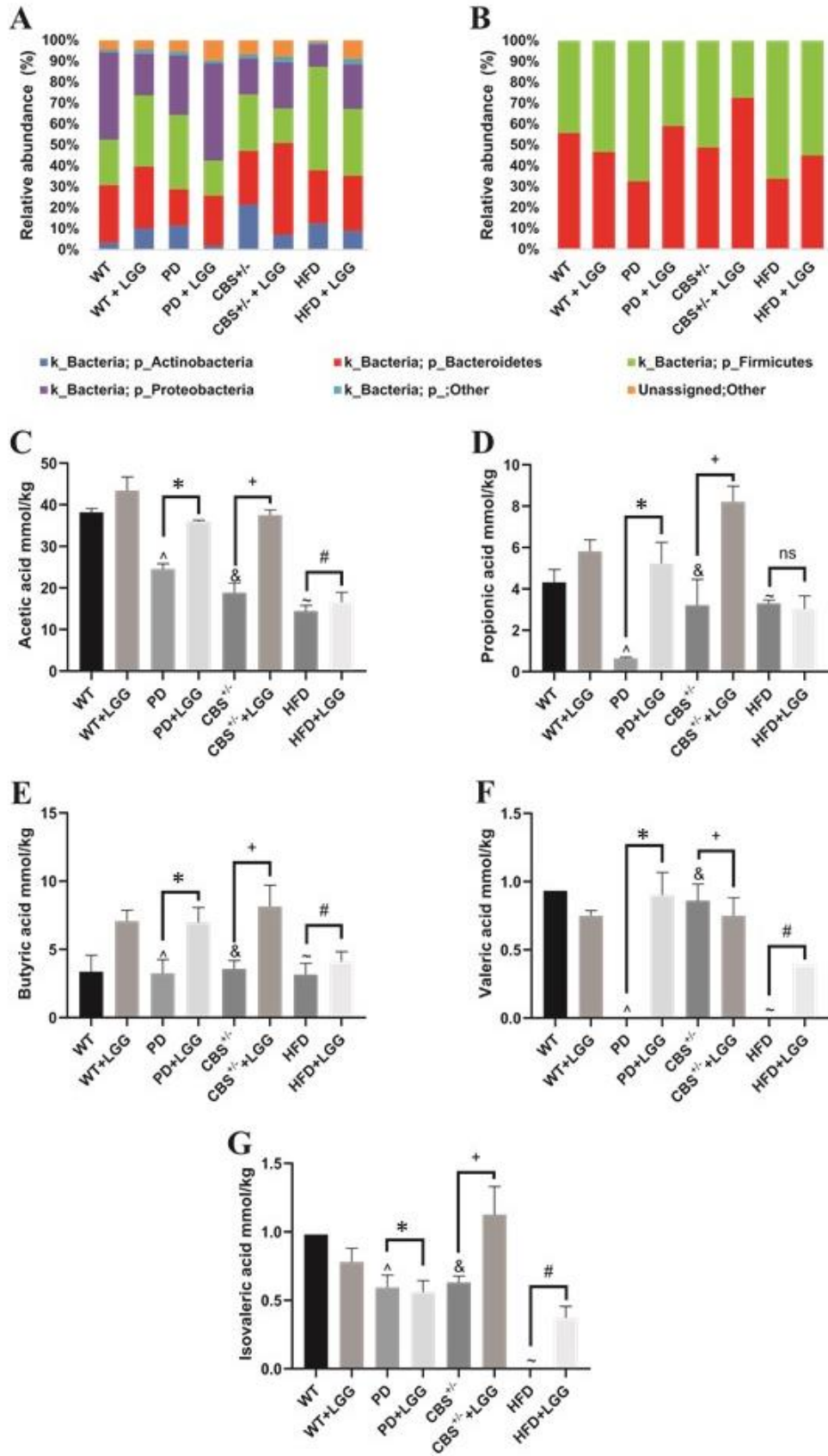
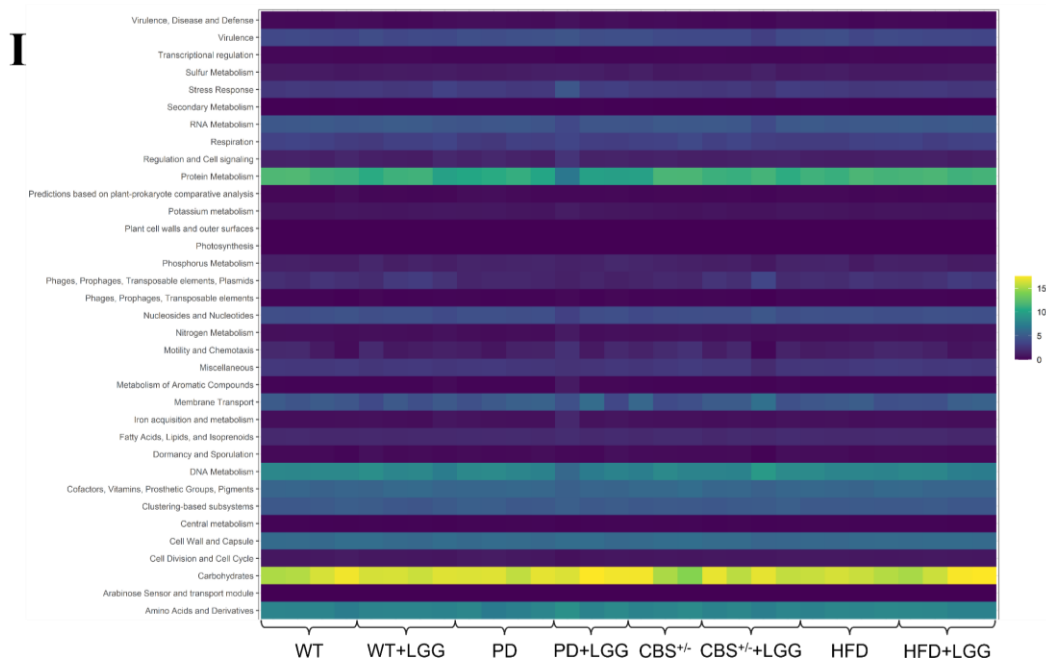


График 2. Утицај примењених третмана на системске вредности хомоцистеина. Вредности су приказане као средња вредност \pm SD, n =6, по групи. ^ P<0,05 PD vs. WT; &P<0,05 CBS^{+/-} vs. WT; ~P<0,05 HFD vs. WT; *P<0,05 PD+LGG vs. PD; +P<0,05 CBS^{+/-}+LGG vs. CBS^{+/-}; #P<0,05 HFD+LGG vs. HFD.

4.4. Утицај примењених третмана на стање микробиоте мишева

Узорци фецеса су сакупљени 24h пре жртвовања животиња након чега су били анализирани. Метагеномске анализе потврдиле су присуство дисбиозе у непробиотски третираним екперименталним групама (**Фигура 6**). На нивоу врсте (*phylum*) бактерија уочене су промене на нивоу *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria* и *Actinobacteria*. Уочено је значајно повећање процентуалне затупљености *Firmicutes* и смањење *Bacteroidetes* као и дисбаланс осталих врста у непробиотски третираним екперименталним групама у поређењу са контролном групом (**Фигура 6А**). Третман пробиотиком LGG значајно је смањив и регулисао ове вредности у PD+LGG, CBS^{+/-}+LGG и HFD+LGG групама у поређењу са њиховим екперименталним групама (**Фигура 6А**). Такође однос између *Firmicutes* и *Bacteroidetes* потврдио је поменуте резултате (**Фигура 6В**). Екстракција, секвенционирање ДНК и анализе SCFA показале су значајно смањење сирћетне (**Фигура 6С**), пропионске (**Фигура 6Д**), маслачне (**Фигура 6Е**), валеричне (**Фигура 6Ф**) и изовалеричне (**Фигура 6Г**) кратколанчане масне киселине у непробиотски третираним екперименталним групама у поређењу са контролном групом (**Фигура 6С-Г**). Третман пробиотиком LGG значајно је смањив и регулисао ове вредности у PD+LGG, CBS^{+/-}+LGG и HFD+LGG групама у поређењу са њиховим екперименталним групама (**Фигура 6С-Г**) осим у групи CBS^{+/-}+LGG где резултати пропионске киселине нису показали значајне промене (**Фигура 6Д**). Такође, уочене су промене функције гена анализом функције *Shallow Shotgun Sequencing* у свим екперименталним групама (**Фигура 6Н-И**). Најизраженије промене уочене су у метаболизму протеина, аминокиселина, масних киселина и њихових деривата, у метаболизму липида и карбохидрата (**Фигура 6Н-И**).





Фигура 6. Утицај примењених третмана на на стање микробиоте мишева. График релативне процентуалне заступљености врсте (*phylum*) бактерија на нивоу *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria* и укупни проценат релативне заступљености свих других бактерија као и неидентификованих бактерија. Уочено је значајно повећање процентуалне заступљености *Firmicutes* и смањење *Bacteroidetes* и дисбаланс осталих врста у непробиотски третираним експерименталним групама у поређењу са контролном групом. Третман пробиотком LGG значајно је смањило и регулисало ове вредности у PD+LGG, CBS+/-+LGG и HFD+LGG групама у поређењу са њиховим експерименталним групама (А). График релативне заступљености *Firmicutes* и *Bacteroidetes* изражен у процентима (%). Уочено је значајно повећање процентуалне заступљености *Firmicutes* и смањење *Bacteroidetes* (В). График концентрације кратколанчаних масних киселина (SCFA), сирћетне (С), пропионске (D), маслачне (Е), валеричне (F) и изовалеричне (G) кратколанчане масне киселине изражен у mmol/kg узорака. Вредности су приказане као средња вредност \pm SD, n =6, по групи. ^{ns}P<0,05; [^]P<0,05 PD vs. WT; [&]P<0,05 CBS+/- vs. WT; [~]P<0,05 HFD vs. WT; ^{*}P<0,05 PD+LGG vs. PD; ⁺P<0,05 CBS+/-+LGG vs. CBS+/-; [#]P<0,05 HFD+LGG vs. HFD. Хитмапе функционалних анализа микробиоте експерименталних мишева (H, I).

4.5. Утицај примењених третмана на системске вредности липополисахарид везујућег протеина

Нивои LBP у серуму били су значајно повећани у непобиотски третираним екперименталним групама у поређењу са контролном групом (**График 3**). Третман пробиотиком LGG значајно је смањио вредности LBP у PD+LGG, CBS^{+/-}+LGG и HFD+LGG групама у поређењу са њиховим екперименталним групама (**График 3**).

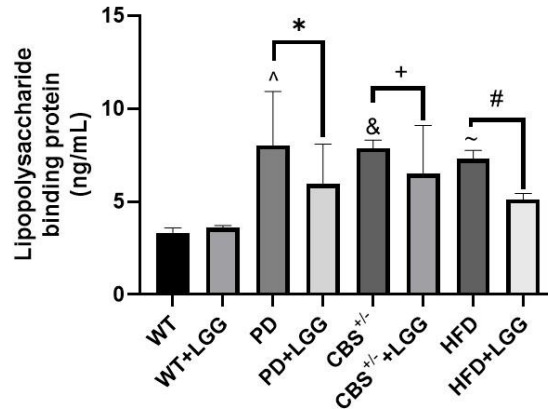
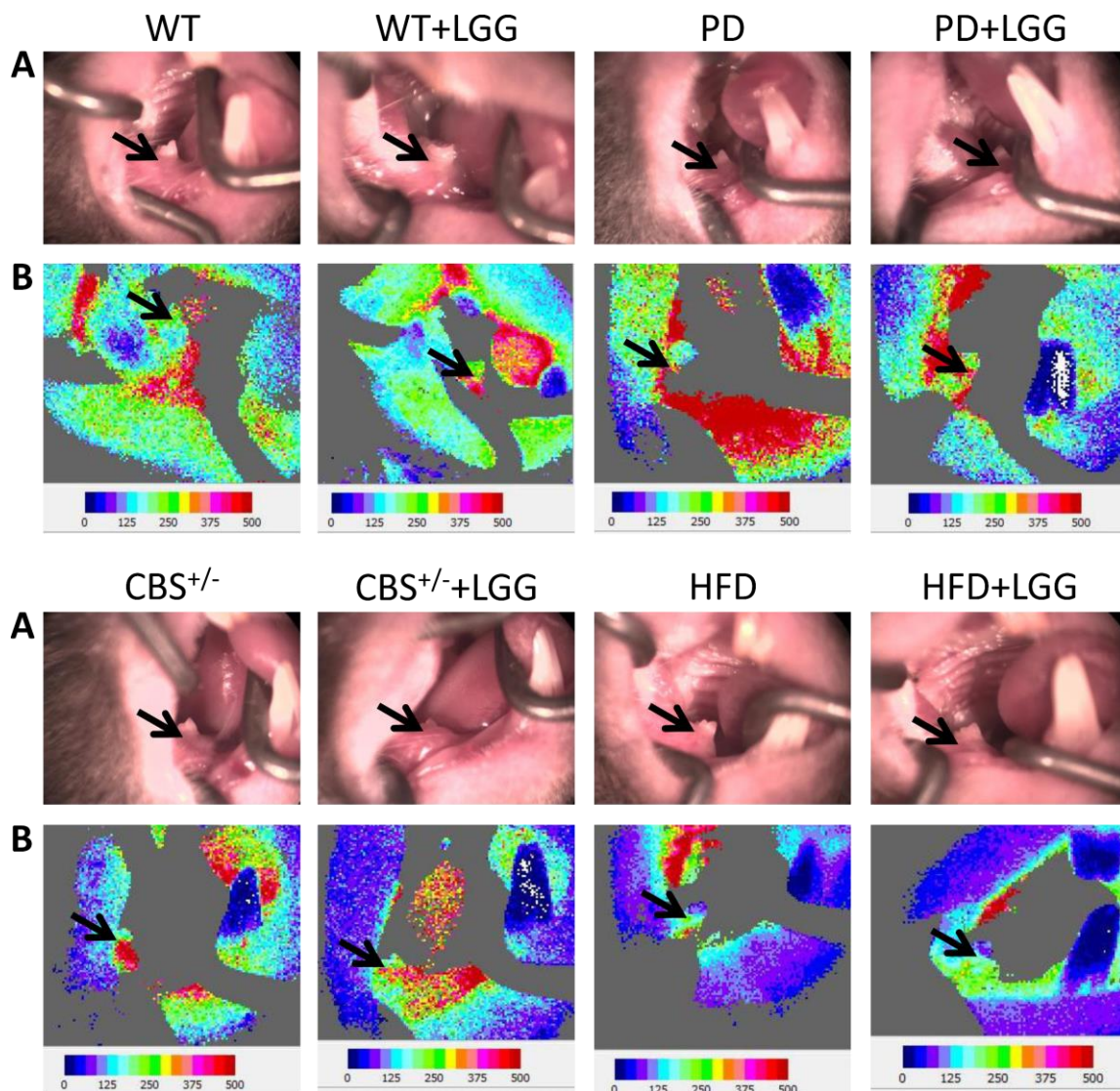


График 3. Утицај примењених третмана на системске вредности липополисахарид везујућег протеина. Вредности су приказане као средња вредност \pm SD, n =6, по групи. ^ P<0,05 PD vs. WT; &P<0,05 CBS^{+/-} vs. WT; ~P<0,05 HFD vs. WT; *P<0,05 PD+LGG vs. PD; +P<0,05 CBS^{+/-}+LGG vs. CBS^{+/-}; #P<0,05 HFD+LGG vs. HFD.

4.6. Утицај примењених третмана на функционално ремоделовање пародонталног ткива

4.6.1. Утицај примењених третмана на гингивални проток крви

Акутни третман LPS уроковао је статистички значајно повећање гингивалног протока крви у PD групи мишева, у поређењу са контролном групом, који је настао као последица прве линије одбране организма (Слика 4). Са друге стране, хронични тромесечни третман масном храном довео је до значајног смањења протока крви у гингиви у односу на контролну групу мишева (Табела 6). Такође, смањење гингивалног протока уочено је и у CBS^{+/-} групи мишева (Слика 4, Табела 6). Третман пробиотком LGG побољшао је гингивални проток крви и нормализовао вредности у третираним PD+LGG, CBS^{+/-}+LGG и HFD+LGG групама (Слика 4, Табела 6).



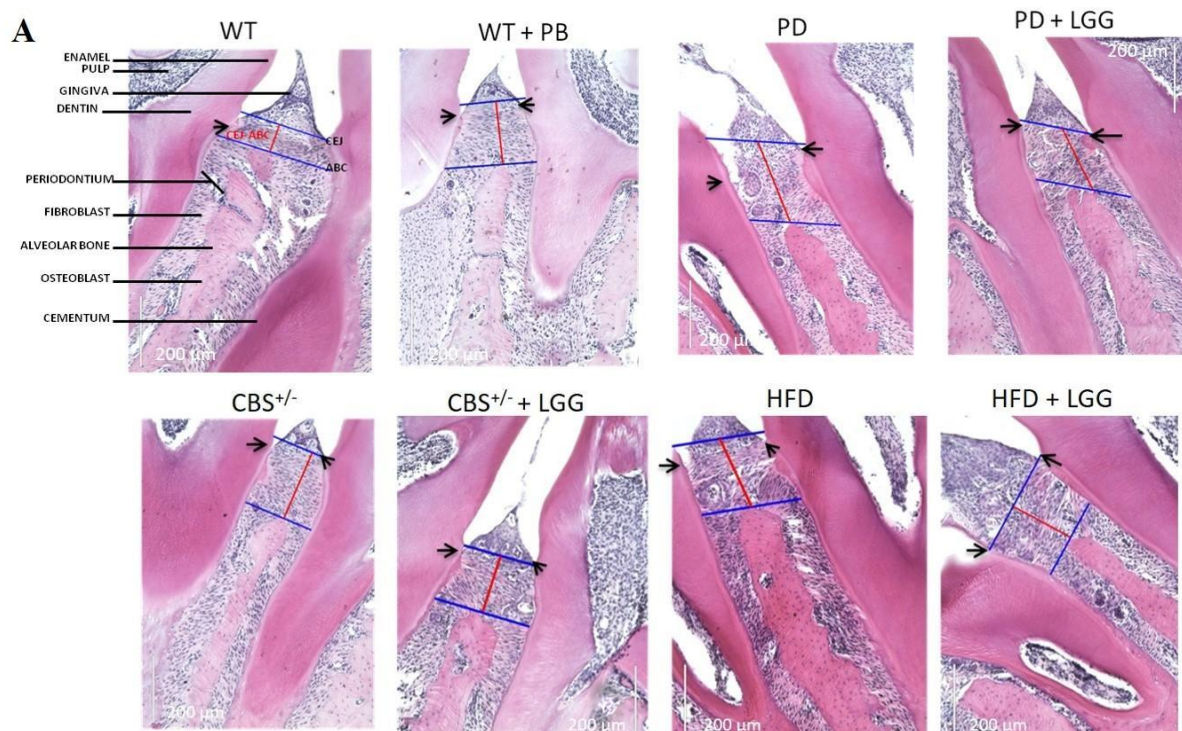
Слика 4. Утицај примењених третмана на гингивални проток крви мишева. Оригиначне фотографије букалане гингиве десне мандибуле експерименталних мишева (А). Црне стрелице показују место мерења гингивалног протока крви. Оригиначне фотографије мерења протока крви гингиве *Laser Doppler*-ом (В).

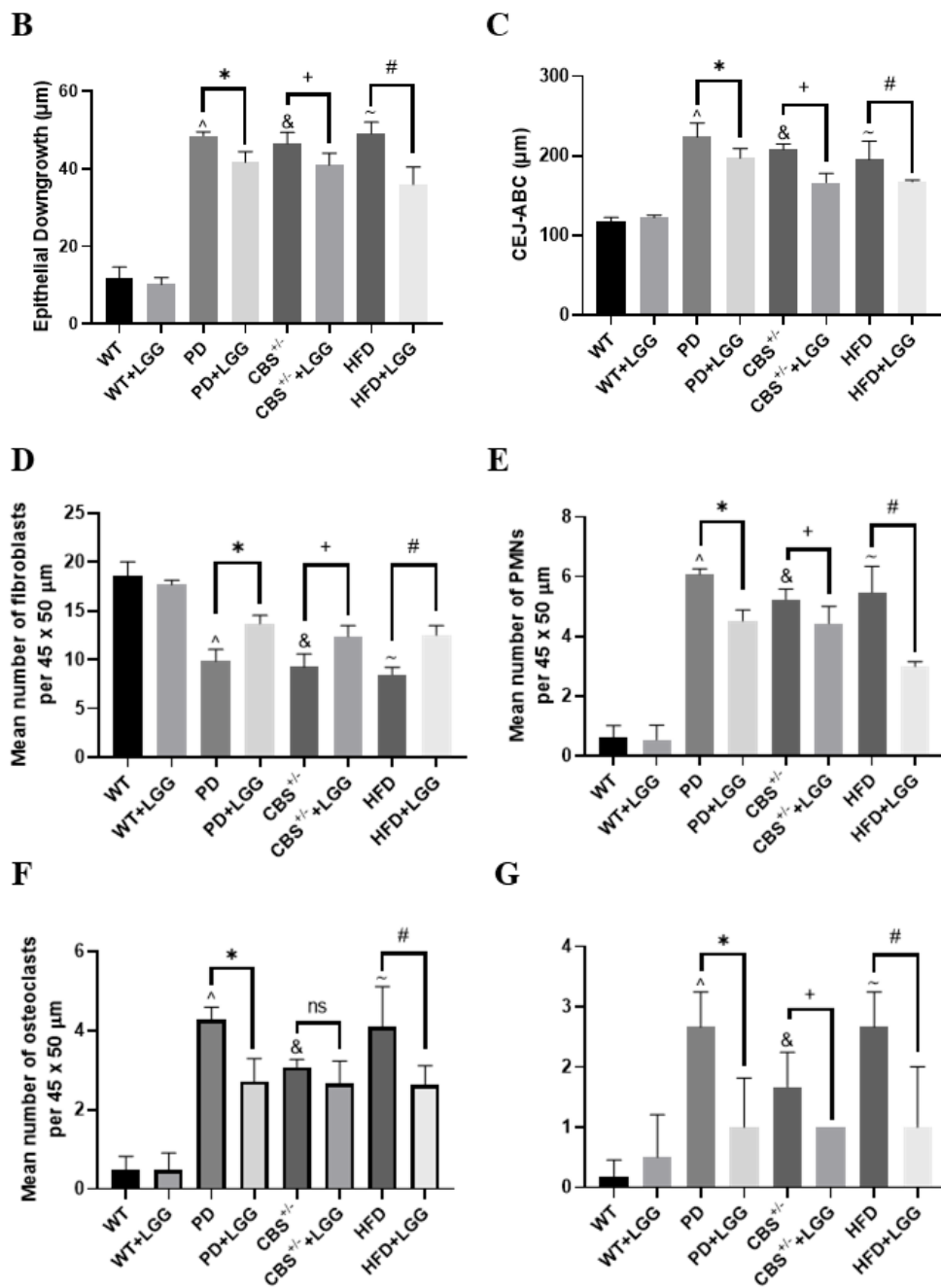
Табела 6. Утицај примењених третмана на гингивални проток крви мишева. Вредности су приказане у јединицама флукса (PU) као средња вредност \pm SD, n =6, по ргрупи. $^{\wedge}$ p<0,05 PD vs. WT; $^{\&}$ p<0,05 CBS^{+/-} vs. WT; $^{\sim}$ p<0,05 HFD vs. WT; * p<0,05 PD+LGG vs. PD; $^+$ p<0,05 CBS^{+/-}+LGG vs. CBS^{+/-}; $^{\#}$ p<0,05 HFD+LGG vs. HFD.

Утицај примењених третмана на гингивални проток крви мишева				
Група	WT	WT+LGG	PD	PD+LGG
Јединица флукса (PU)	264,6 \pm 9,5	247,5 \pm 8,3	297,1 \pm 10,6 [^]	258,3 \pm 18,4 [*]
Група	CBS ^{+/-}	CBS ^{+/-} +LGG	HFD	HFD+LGG
Јединица флукса (PU)	219,9 \pm 16,5 ^{&}	251 \pm 14,6 ⁺	215,2 \pm 10,9 [~]	247,7 \pm 9,1 [#]

4.6.2. Утицај примењених третмана на патохистолошко стање пародонталог ткива

Примењени третмани утицали су на пад епителног припоја, губитак алвеоларне кости, на број фибробласта, PMN-а, остеокласта и свеукуоног инфламацијског сора (Фигура 7). Уочено је статистички значајно повећање пада епителног припоја (Фигура 7А,В), губитака алвеоларне кости (Фигура 7А,С), броја PMN-а (Фигура 7А,Е), остеокласта (Фигура 7А,Ф) и свеукуоног инфламацијског сора (Фигура 7А,Г), док је број фибробласта био значајно смањен у непробиотски третираним екперименталим групама у поређењу са контролном групом (Фигура 7А,Д). Третман пробиотицима LGG значајно је смањео и одржао ниво епителног припоја (Фигура 7В), губитак алвеоларне кости (Фигура 7С), свеукуоног инфламацијског сора (Фигура 7Г), на број PMN-а (Фигура 7Е) и остеокласта (Фигура 7Ф) у PD+LGG и HFD+LGG групама (Фигура 7) док су у групи CBS^{+/-}+LGG уочене све све поменуте статистички значајне разлике осим броја остеокласта чија вредност није значајно промењена (Фигура 7Г). Број фибробласта значајно је повишен у свим пробиотски третираним групама у поређењу са својим екперименталним групама (PD, HFD и CBS^{+/-} групе) (Фигура 7Д).

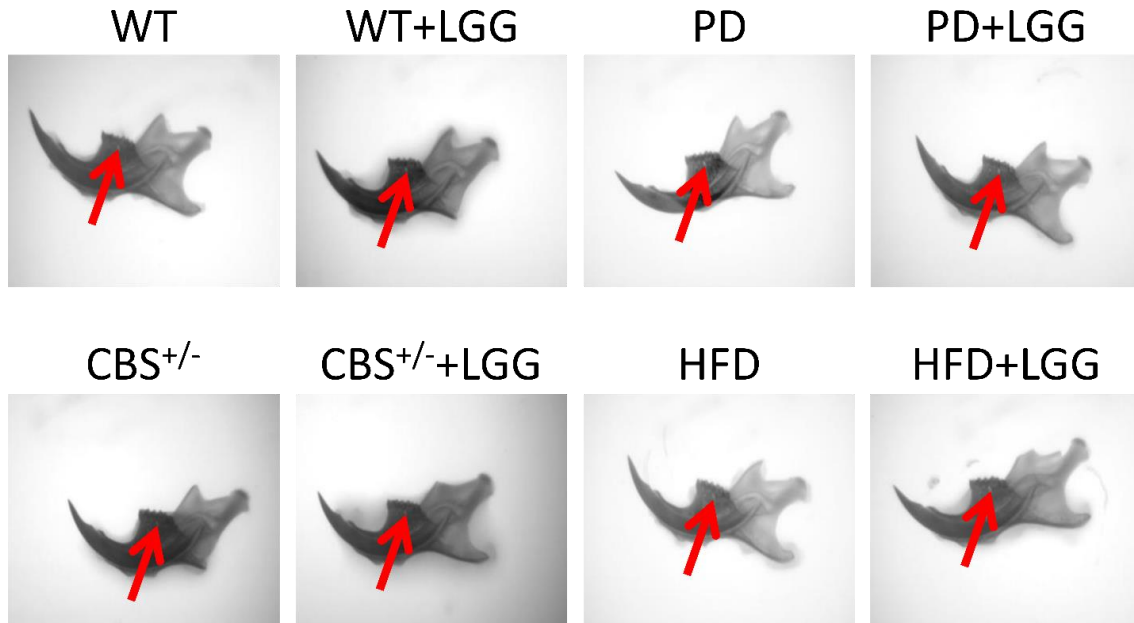




Фигура 7. Репрезентативни приказ обојеног пародонталног ткива леве мандибуле хематоксилин/еозин техником, увећање 20 х; скала 200 μm (А). Цене стрелице показују место новонасталог епителног припоја. Горња плаве линије показују цементно глеђну границу док доње плаве линије врх алвеоларне кости. Црвена линија показује губитак алвеоларне кости тј. дистанцу између цементно глеђну границе и врха алвеоларне кости. Графици (В-Н) показују утицај примењених третмана на пад епителног припоја (В), губитак алвеоларне кости (С), на број фибробласта (Д), PMN-а (Е), остеокласта (Ф) и свеукупног инфламацијског скорa (Г). Вредности су приказане као средња вредност \pm SD, n =6, по групи. ^{ns}P<0,05; [^] P<0,05 PD vs. WT; [&]P<0,05 CBS^{+/-} vs. WT; [~]P<0,05 HFD vs. WT; ^{*}P<0,05 PD+LGG vs. PD; ⁺P<0,05 CBS^{+/-}+LGG vs. CBS^{+/-}; [#]P<0,05 HFD+LGG vs. HFD.

4.6.3. Утицај примењених третмана стање пародонталог ткива-радиографска анализа

Да су примењени третмани утицали на стање пародонталног ткива и мандибуле потврдили смо радиографијом. Радиографски, дескриптивно, уочена је ресорпција алвеоларне кости мандибуле у непобиотски третираним екперименталим групама у поређењу са контролном групом док је третман пробиотицима LGG смањио поменуте промене у пробиотици третираним групама (Слика 5).

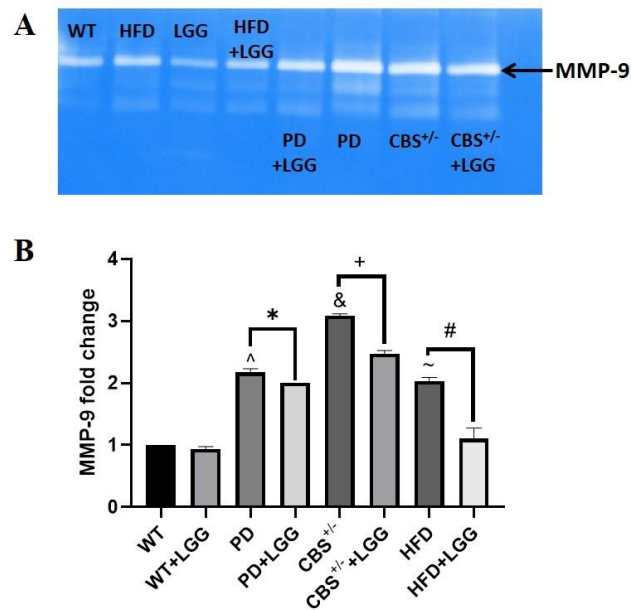


Слика 5. Утицај примењених третмана на стање радиографско стање пародонталог ткива. Црвене стрелице показују место ресорпције алвеоларне кости.

4.7. Утицај примењених третмана на молекуларно ремоделовање пародонталног ткива

4.7.1. Утицај примењених третмана на матрично ремоделовање пародонталног ткива

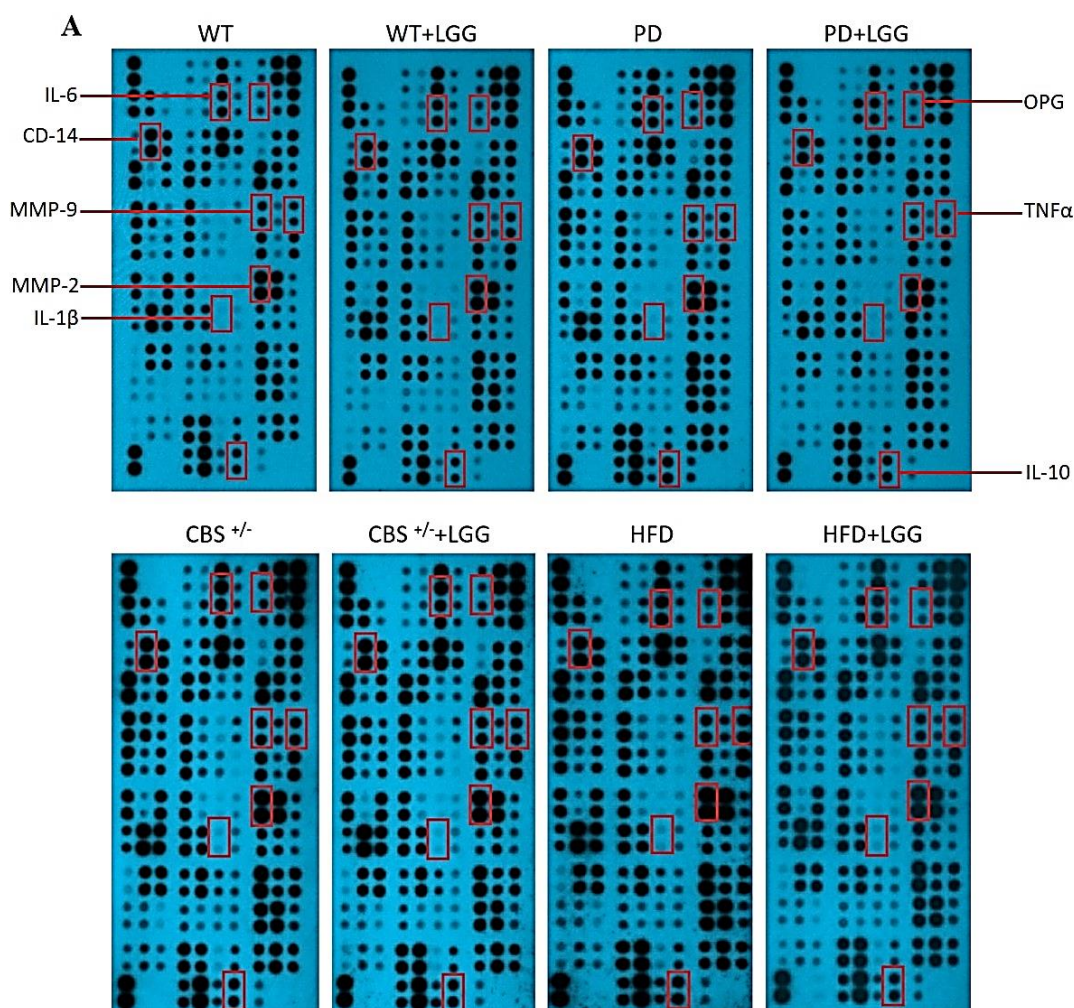
Експресија MMP-9 у пародонталном ткиву, мерена желатин зимографијом, значајно је повећана у непробиотски третираним експерименталним групама у поређењу са контролном групом (**Фигура 8А**). Третман пробиотком LGG значајно је смањио експресију MMP-9 у PD+LGG, CBS^{+/-}+LGG и HFD+LGG групама у поређењу са њиховим експерименталним групама (**Фигура 8В**).

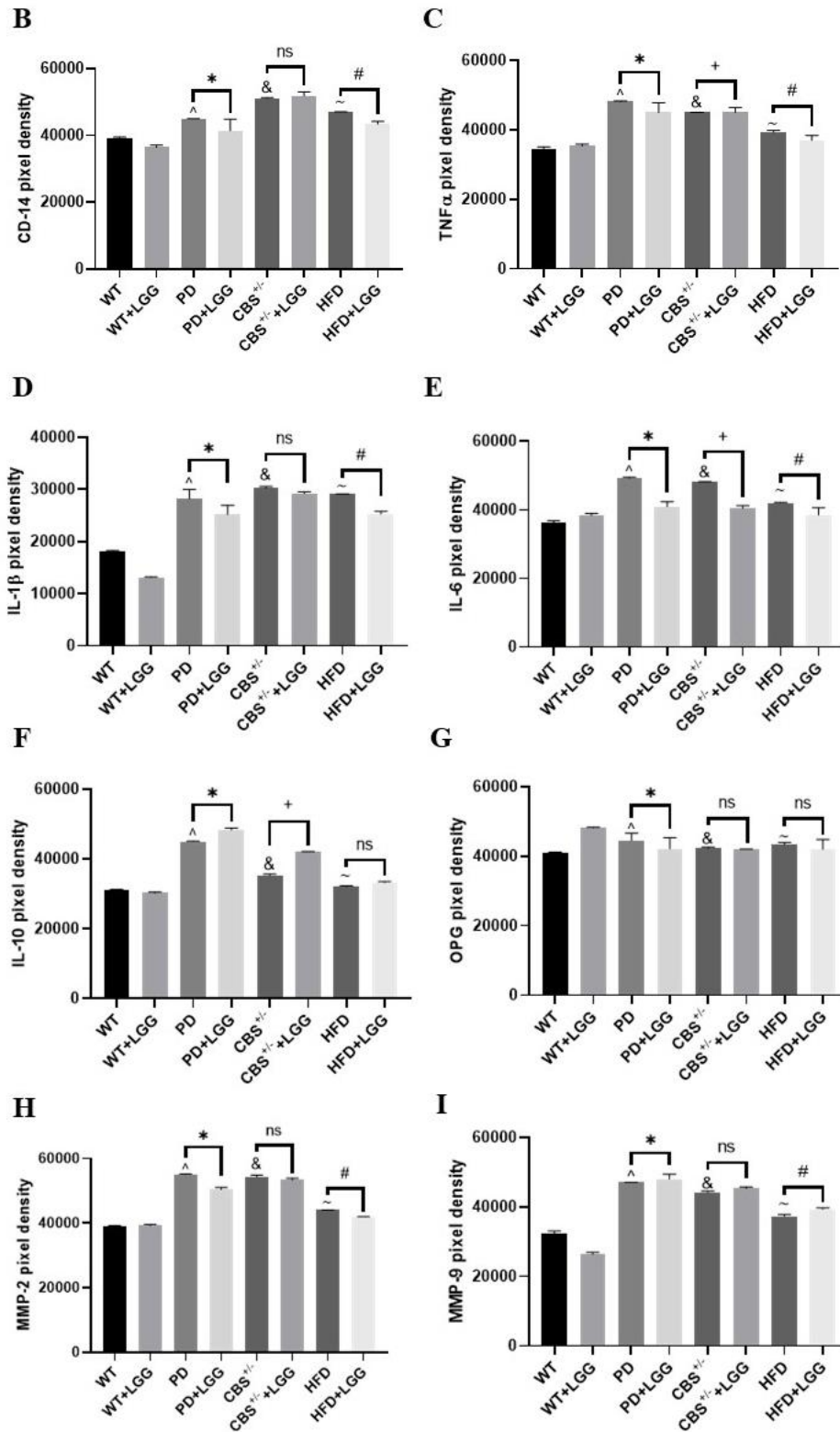


Фигура 8. Зимографијска анализа утицаја примењених третмана на експресију MMP-9 у пародонталном ткиву мишева. Мембрана након зимографијске анализе узорака (**А**) и графички приказ анализе исте (**В**). Вредности су приказане као средња вредност \pm SD, n = 6, по групи. [^] P < 0,05 PD vs. WT; [&] P < 0,05 CBS^{+/-}+LGG vs. CBS^{+/-}; ^{*} P < 0,05 PD+LGG vs. PD; ⁺ P < 0,05 CBS^{+/-}+LGG vs. CBS^{+/-}; [#] P < 0,05 HFD+LGG vs. HFD.

4.7.2. Утицај примењених третмана на експресију серумских цитокина

Релативна експресија CD-14, IL-1 β , IL-6, IL-10, OPG, RANKL, MMP-2, MMP-9 и TIMP-2 из серума мишева је мерена коришћењем кита Proteome Profiler Mouse XL Cytokine Array (каталогски број производа: ARY028) купљен од R&D Systems, Inc. Minneapolis, MN, USA. Уочено је значајно повећање експресије свих поменутих молекула у непробиотски третираним експерименталним групама у поређењу са контролном групом (Фигура 9A-I). Третман пробиотком LGG значајно је смањио експресију свих поменутих гена у PD+LGG групи у поређењу са PD групом мишева (Фигура 9A-I). Међутим, статистички значајна разлика није уочена у експресији CD-14, IL-1 β , OPG, MMP-2 и MMP-9 у групи CBS^{+/-} + LGG (Фигура 9A,B,D,G,H,I) и у експресији IL-10 и OPG у групи HFD+LGG (Фигура 9A,F,G) у поређењу са њиховим експерименталним групама.

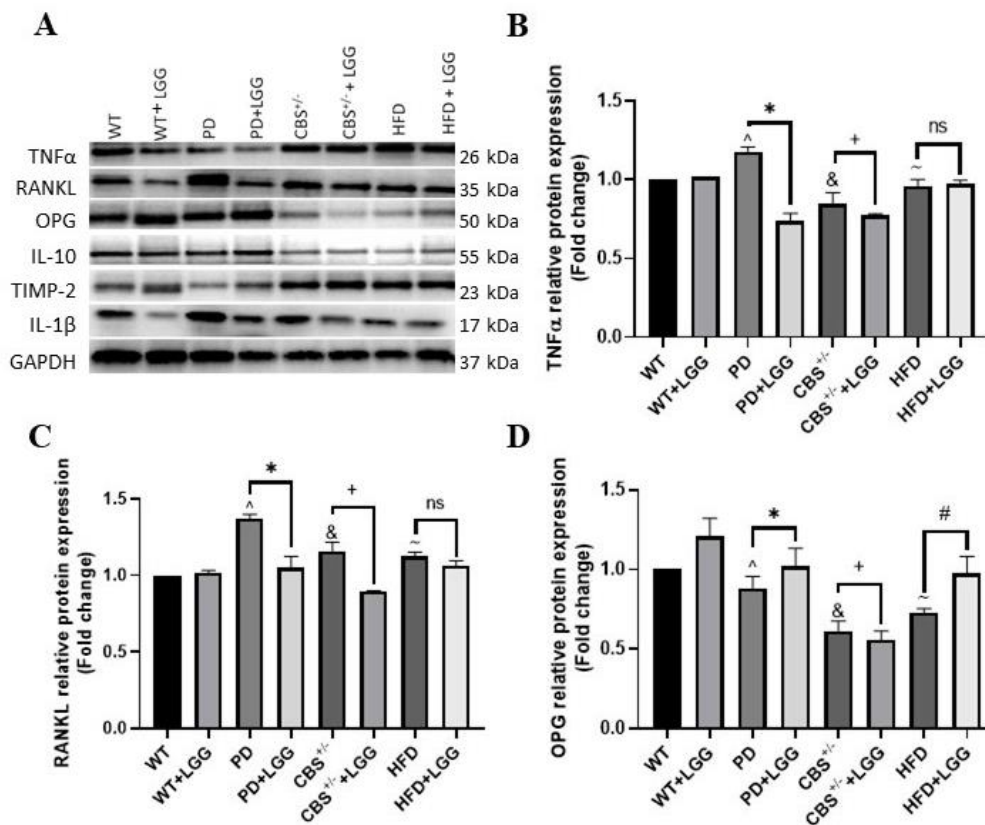


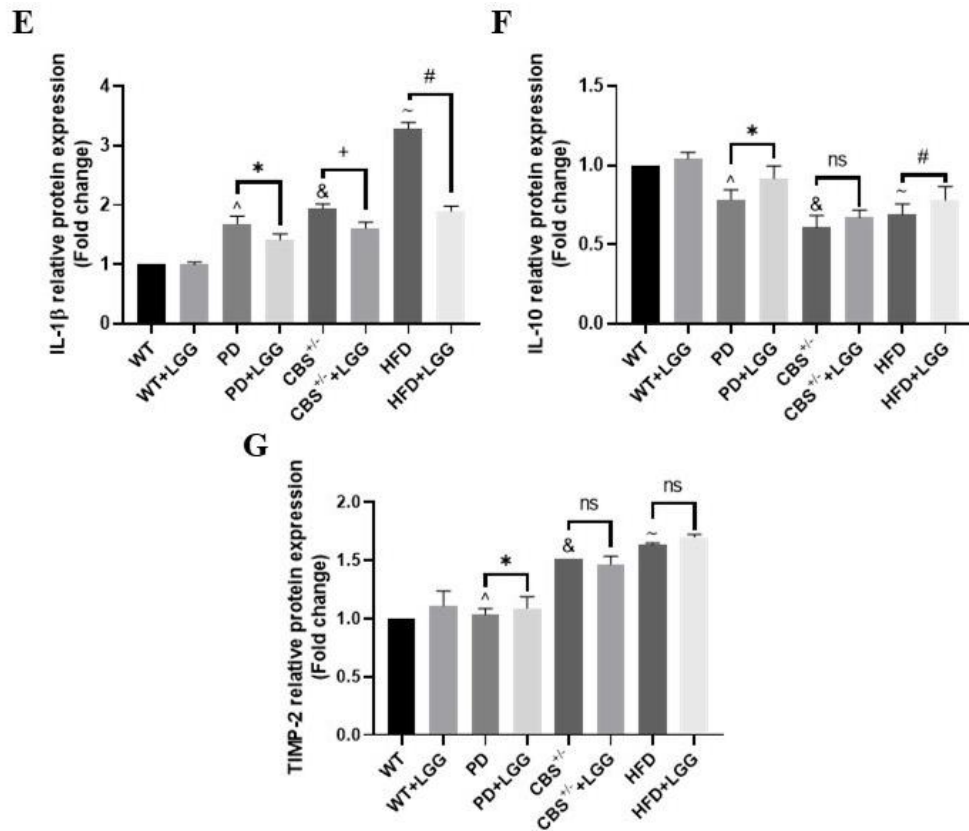


Фигура 9. Утицај примењених третмана на експресију серумских CD-14, IL-1 β , IL-6, IL-10, OPG, RANKL, MMP-2, MMP-9 и TIMP-2 молекула. Мембране *Proteome Profiler Mouse XL Cytokine Array* након очитане експресије (А). Графички приказ експресије серумских молекула CD-14 (В), TNF α (С), IL-1 β (Д), IL-6 (Е) IL-10 (Ф), OPG (Г), MMP-2 (H) и MMP-9 (I) изразен у пикселима. Вредности су приказане као средња вредност \pm SD, n =6, по групи. ^{ns}P<0,05; [^] P<0,05 PD vs. WT; [&]P<0,05 CBS^{+/-} vs. WT; [~]P<0,05 HFD vs. WT; ^{*}P<0,05 PD+LGG vs. PD; ⁺P<0,05 CBS^{+/-}+LGG vs. CBS^{+/-}; [#]P<0,05 HFD+LGG vs. HFD.

4.7.3. Утицај примењених третмана на експресију протеина пародонталног ткива

Релативна експресија TNF α , IL-1 β , IL-10, OPG, RANKL и TIMP-2 у пародонталном ткиву, анализирани Вестерн блот меродом, значајно су повећане у свим непобиотски третираним експерименталним групама у поређењу са контролном групом (Фигура 10А-Г). Третман побиотком LGG значајно је смањио експресију свих поменутих гена у PD+LGG групи у поређењу са PD групом мишева (Фигура 10А-Г). Међутим, статистички значајна разлика није уочена у експресији IL-10 и OPG у групи CBS^{+/-} + LGG (Фигура 10А,Ф,Г) и у експресији TNF α , RANKL и TIMP-2 у групи HFD+LGG (Фигура 10А-С,Ф,Г) у поређењу са њиховим експерименталним групама.

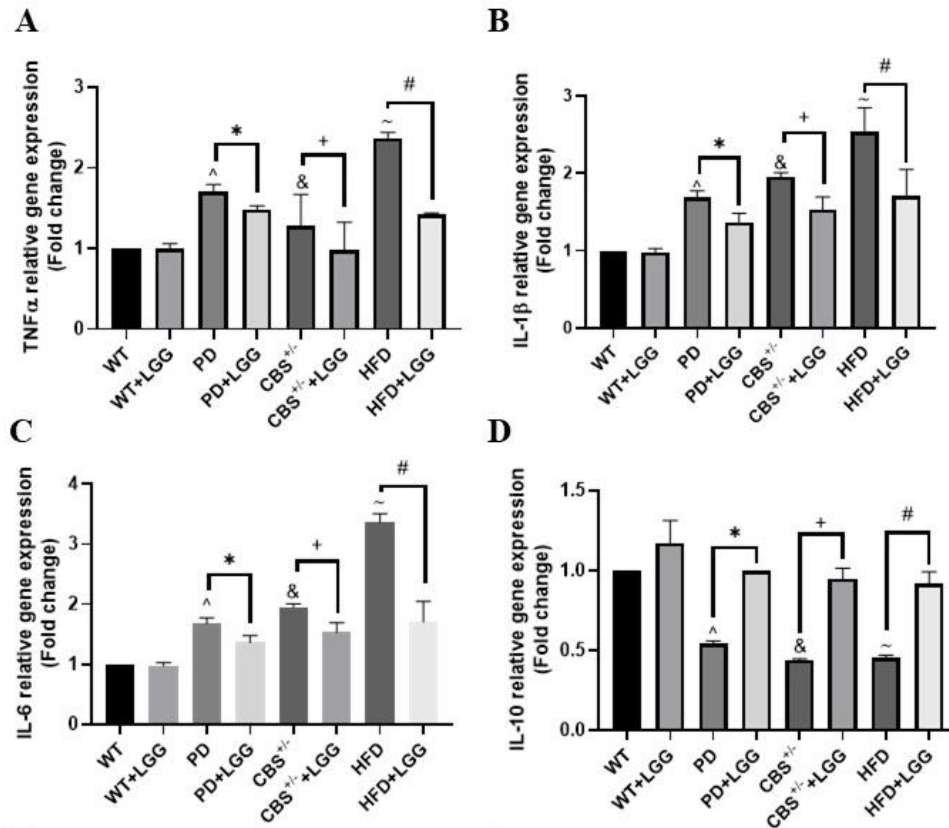




Фигура 10. Утицај примењених третмана на експресију TNF α , IL-1 β , IL-10, OPG, RANKL и TIMP-2 протеина у пародонталном ткиву. Вестерн блоте мембране након електрофорезе (А). Графички приказ релативна експресија IL-1 β (В), RANKL (С), OPG (Д), IL-1 β (Е), IL-10 (Ф) и TIMP-2 (Г) протеина пародонталног ткива. Вредности су приказане као средња вредност \pm SD, n =6, по групи. ^{ns}P<0,05; [^]P<0,05 PD vs. WT; [&]P<0,05 CBS^{+/-} vs. WT; [~]P<0,05 HFD vs. WT; ^{*}P<0,05 PD+LGG vs. PD; ⁺P<0,05 CBS^{+/-}+LGG vs. CBS^{+/-}; [#]P<0,05 HFD+LGG vs. HFD.

4.7.4. Утицај примењених третмана на експресију гена пародонталног ткива

Релативна експресија $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, IL-6 , IL-10 , OPG , RANKL , MMP-2 , MMP-9 и TIMP-2 гена у пародонталном ткиву, мерена PCR методом, значајно су повећане у непуботиотски третираним експерименталним групама у поређењу са контролном групом (График 4А-И). Третман пуботиотком LGG значајно је смањио експресију свих поменутих гена у $\text{PD}+\text{LGG}$, $\text{CBS}^{+/-}+\text{LGG}$ и $\text{HFD}+\text{LGG}$ групама у поређењу са њиховим експерименталним групама (График 4А-И).



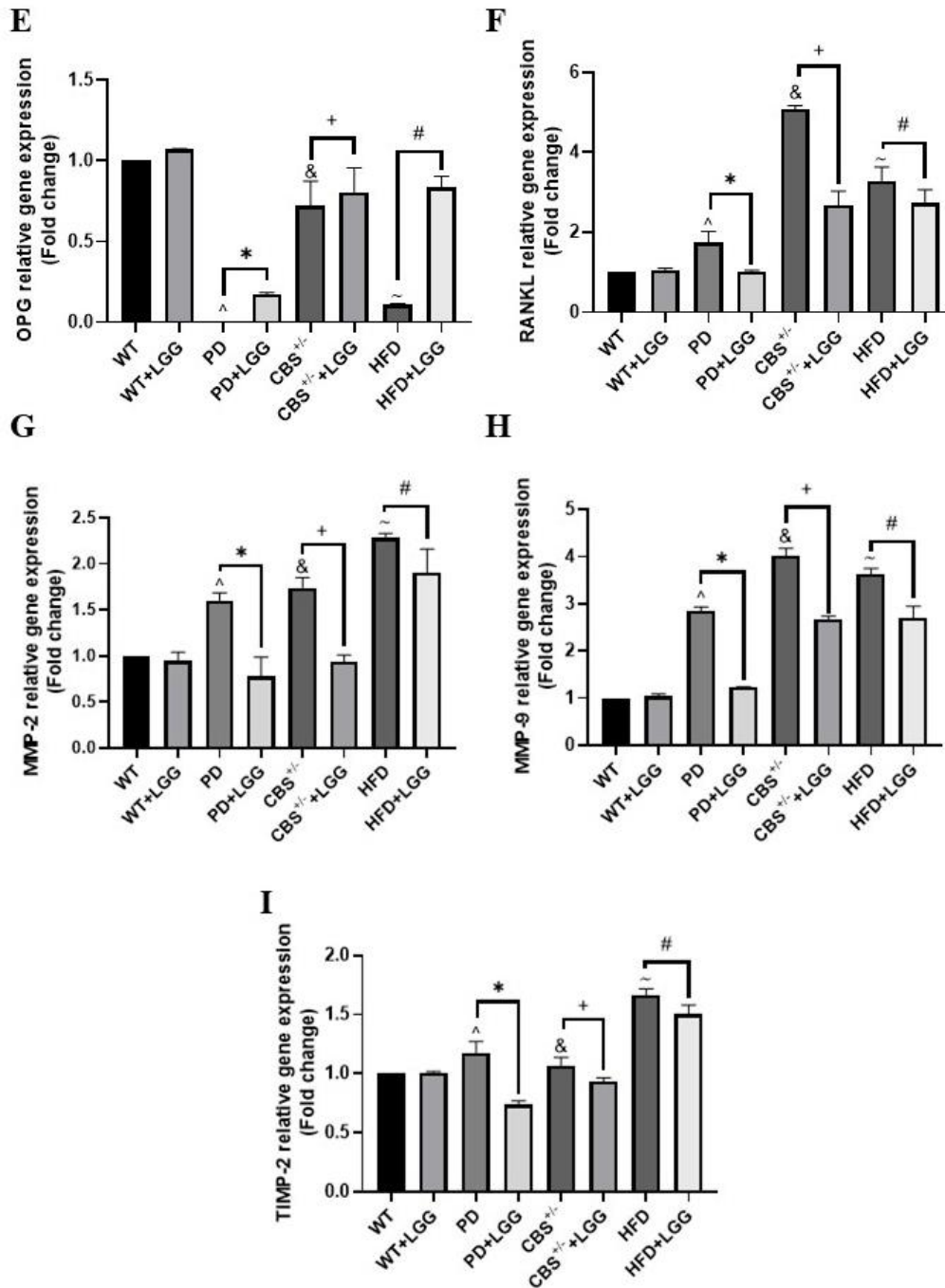


График 4. Утицај примењених третмана на експресију TNF α (A), IL-1 β (B), IL-6 (C), IL-10 (D), OPG (E), RANKL (F), MMP-2 (G), MMP-9 (H) и TIMP-2 (I) gena пародонталног ткива. Вредности су приказане као средња вредност \pm SD, n = 6, по групи. ^ P < 0,05 PD vs. WT; & P < 0,05 CBS^{+/-} vs. WT; ~ P < 0,05 HFD vs. WT; * P < 0,05 PD+LGG vs. PD; + P < 0,05 CBS^{+/-}+LGG vs. CBS^{+/-}; # P < 0,05 HFD+LGG vs. HFD.

V

ДИСКУСИЈА

5. ДИСКУСИЈА

Основни циљ студије је био испитати ефекте пробиотика LGG на пародонтопатију код мишева. Избор пробиотика LGG, као терапеутског средства, у овој докторској дисертацији је заснован на широкој и актуелној употреби пробиотика у последњих десет година и њихових позитивних ефеката у стоматологији и медицини, па самим тим, и могућој локалној и системској терапијској употреби у пародонтологији. У нашем истраживању је коришћен системски терапијски приступ употребе LGG имајући у виду чешћу употребу и већу учесталост овог начина примене у медицини.

Будући да се механизам дејства пробиотика на орална ткива заснива на конкуренцији патогеним бактеријама за места адхезије на површинама зуба, производњи антимикробних супстанци и стимулацији неспецифичног имунског одговора, примарни циљ ове студије био је испитати ефекте пробиотика LGG на пародонтопатију код мишева са ННсу. Потврђен је позитивни ефекат LGG у превенцији и терапији пародонтопатије на микробиолошком, молекуларном и функционалном нивоу. На микробиолошком нивоу, значајним повећањем производње антимикробних супстанци, SCFA, чиме се повећала процентуална заступљености и раст „добрих“ бактерија *Bacteroidetes* на нивоу врсте а смањила заступљеност и инхибирао раст *Firmicutes* чиме се и одржала равнотежа осталих бактерија у експерименталним групама. Такође, *Shallow Shotgun Sequencing* анализом, потврђен је позитивни ефекат LGG на функције гена у метаболизму липида, протеина и аминокиселина. Ефекти LGG, на молекуларном нивоу, потврђени су помоћу широког спектра анализа, почевши од анализе системских вредности LBP, нивоа серумских цитокина, експресије серумских цитокина, анализе експресије гена и протеина и MMP пародонталног ткива. Резултати су показали утицај LGG на регулацију имунског одговара деловањем на серумске и цитокине пародонталног ткива и утицајем на смањење матричног ремоделовања пародонталног ткива смањењем MMP-9. Како би се комплетирали ефекте LGG у патофизиологији пародонталне болести, измерене су вредности гингивалног протока крви *Laser Doppler*-ом и извршена је хистоморфометријска и радиографска анализа пародонталног ткива. LGG побољшао је гингивални проток крви и нормализовао његове вредности у свим третираним групама, регулисао ниво епителног припоја, превенирао и смањено губитак алвеоларне кости, број PMN, остеокласта и спречио смањење броја фибробласта. Поменуте анализе, пружиле су информације да LGG делује превентивно на настанак али и као терапија пародонталне болести и да се на једноставан и економски прихватљив начин може користити као помоћно, додатно или терапијско средство у терапији пародонтопатије.

С обзиром да је пародонтопатија мултифакторијално обољење, посебна пажња усмерена је ка опису, проучавању и поређењу утицаја хиперхомоцитеинемичке, урођене и стечене, исхране богате мастима и дисбиозе на настанак пародонтопатије код мишева. Како би смо потврдили присуство пародонтопатије, поред контролне, CBS^{+/-} и HFD групе мишева, у истраживање је укључена група мишева PD, којима је индукована пародонтопатија и која је заправо била контролна група за верификацију исте. На основи досадашњих опажених резултата и доступних литературних података, ова студија је прва која је испитивала утицај хиперхомоцитеинемичке на настанак пародонтопатије код мишева, што отвара ново поље истраживања и потенцијални а сада потврђени, још један етиолошки фактор пародонтопатије – хомоцитеин. У овој студији смо заправо доказали да је хиперхомоцитеинемичка један од етиолошких фактора пародонталне болести. Такође, установили смо да пародонтопатија доводи до повишених вредности хомоцитеина у крви што потврђује могућност повезаности кардиоваскуларних обољења и пародонталне болести (*Joseph et al., 2011; Bhardwaj et*

al., 2015; *Bandyopadhyay et al.*, 2010; *Taylor et al.*, 1998). Урођена хиперхомоцистеинемиа, услед недостатка и поремећаја на нивоу метионинског циклуса, попут недостатка ензима и коензима, на пример ензима CBS, витамина B12, B6 и фолне киселине, узрокују настанак пародонтопатије (*Bhardwaj et al.*, 2015).

У последњој деценији све је већи ризик од настанка кардиоваскуларних болести код пацијената оболелих од пародонтопатије (*Bandyopadhyay et al.*, 2010; *Taylor et al.*, 1998), као пионири у овој студији, поред *Joseph* и сарадника и *Bhardwaj* и сарадника (*Joseph et al.*, 2011; *Bhardwaj et al.*, 2015), заинтересовали смо се да испитамо ефекте хомоцистеина, као једне од најважнијих аминокиселина у етиопатогенези кардиоваскуларних болести и преренаталном и постнаталном расту и развоју, у настанку пародонтопатије. На основу прегледане доступне литературе, наша студија је прва експериментална студија која је испивала утицај хомоцистеина на пародонтална ткива мишева. Као експериментални модел хиперхомоцистеинемиа користили смо CBS^{+/-} мишеве, на основу клинички потврђеног утицаја IL-6 пародонталних џепова пацијената оболелих од хроничне пародонтопатије на витамин B6, чиме се нарушава активност CBS ензима (*Bhardwaj et al.*, 2015), сматрали смо да би урођени недостатак овог ензима, са сигурнишћу условио настанак пародонтопатије, што смо у нашој студији и потврдили. Стога, имали смо за циљ да кроз дизајнирање два модела болести, хроничне пародонтопатије са једне стране и урођене ННсу са друге стране, утврдимо узрочно последични утицај истих.

ННсу може настати генотипским утицајем, поремећајем ензима и коензима који учествују у метионинском циклусу, али и фенотипским утицајем, услед прекомерног уноса метионина или недостатка витамина B6, B12 и фолата. Као патолошко стање, ННсу доводи до поремећаја на нивоу бројних органа као што су срце, мозак, бубрези и мишићи (*Givvmani et al.* 2011; *Smith et al.* 2010; *Haim et al.* 2007; *Sen et al.* 2009; *Smith et al.* 2010). Такође, ННсу је фактор ризика многих болести укључујући и атеросклеротичну васкуларну болест у церебралним, коронарним и периферним крвним судовима (*Pan et al.*, 2017). Доступна литература указује да су патофизиолошки процеси, пародонтопатије и ННсу, окарактерисани инфламацијским одговором и инфилтрацијом PMN. Ова два обољења сматрају се узрочно последично повезаним (*Joseph et al.*, 2011; *Bhardwaj et al.*, 2015). У нашој студији, по први пут, указали смо на постојање разлика у пародонталном ткиву CBS^{+/-} мишева у поређењу са контролном групом мишева (WT група) као и утицај Нсу и ННсу на пародонцијум и појаву пародонталне болести. Пре свега, како би потврдили генотипске разлике експерименталних мишева, извршена је генотипизација мишева. На основу познате методологије потврђене литературним подацима (*George et al.*, 2020), узорци CBS^{+/-} хетерозиготних мишева експримирали су две траке на нивоу 308 bp и 450 bp, на агарозном гелу, чиме смо потврдили урођени генетски недостатак CBS ензима (**Фигура 5**). Такође, како би потврдили ННсу, мерене су системске вредности Нсу у серуму мишева. Повишене вредности Нсу, очекивано, биле су присутне у CBS^{+/-} групи мишева (**График 2**), што је у корелацији са резултатима досадашњих студија (*Pushpakumar et al.*, 2015; *Zhang et al.*, 2021). Затим, по први пут, према сазнањима доступне литературе, извршена је патохистолошка анализа пародонталног ткива CBS^{+/-} мишева. У CBS^{+/-} групи мишева уочен је пад епителног припоја (**Фигура 7A,B**), губитак алвеоларне кости (**Фигура 7A,C**; **Слика 6**), смањење броја фибробласта (**Фигура 7D**), повећањем броја PMN (**Фигура 7E**), повећањем броја остеокласта (**Фигура 7F**) и свеукупног инфламацијског скорa (**Фигура 7G**). Ова запажања су у складу са претходним студијама потврде пародонталне болести (*Alshammari et al.*, 2019). *Alshammari* и сарадници у њиховом експерименталном моделу пародонтопатије код мишева, указују на пораст инфламацијске ћелијске

инфилтрације, повећањем броја PMN и смањењем броја фибробласта у поређењу са WT групом мишева (*Alshammari et al., 2019*). Тако, у поређењу са резултатима наше студије и у циљу потврде пародонталне болести, потврдили смо да HHCy (CBS^{+/-} група мишева) присутном хроничном инфламацијом, потврђеним повећаним бројем PMN и нарушеним инфламацијским одговором (**Фигура 10, График 4**), помажу у покретању разарања пародонцијума и настанку пародонталне болести.

Морфометријским и хистоморфометријским анализама установили смо деградацију пародонцијума и присуство ресорпције алвеоларне кости (**Слика 5, Фигура 7А, С**). Хистоморфометријска анализа извршена је у складу са претходним студијама (*Semenoff et al., 2008*). Избор методологије и мерење ED и CEJ-ABC на хистолошком H&E препарату као упоредни параметар губитка епителног припоја и ресорпције алвеоларне кости код људи, за процену дубине и присуства пародонталног џепа, односно патогномичног знака пародонталне болести код мишева извршен је на основу потврђене литературе (*Mitsuda et al., 2002; Breivik et al., 2006; Susin and Rösing, 2003*). Хистоморфометријском анализом потврђен је пораст удаљеност CEJ-ABC у групи CBS^{+/-} мишева, што указује на постојање пародонтопатије (**Фигура 7А, С; Слика 5**). Средња удаљеност CEJ-ABC и средња вредност ED била је измерена у μm . Средња удаљеност CEJ-ABC била је статистички значајно већа у групи CBS^{+/-} мишева у поређењу са контролном групом ($p < 0,0033$). CEJ-ABC CBS^{+/-} мишева износила је $202,31 \pm 2,12 \mu\text{m}$ у поређењу са контролном групом чија је вредност износила $114,2 \pm 1,71 \mu\text{m}$ (**Фигура 7А, С**). Такође, уочено је статистички значајно повећање вредности ED CBS^{+/-} групе, $47,42 \pm 1,29 \mu\text{m}$ на супрот контроли, чија је вредност износила $10,9 \pm 0,94 \mu\text{m}$ (**Фигура 7А, В**). Третман LGG пробиотицима значајно је побољшао поменуте параметре (**Фигура 7**). У поређењу наших резултата са резултатима студије сличног дизајна, где су *Alshammari* и сарадници такође индуковали пародонтопатију на експерименталном моделу мишева, потврђујемо нашу хипотезу. Резултати њихове студије указују да су вредности ED и CEJ-ABC, такође изражене у μm , статистички значајно веће у групи у којој је индукована пародонтопатија, CEJ-ABC износио је $149,81 \mu\text{m}$ наспрам контролне групе чија је вредност износила $101,46 \mu\text{m}$ (*Alshammari et al., 2019*). Како би смо потврдили поменуте анализе, све параметре упоредивали смо са групом PD ради потврде свих вредности и корелације међу групама у циљу верификације свих параметара пародонтопатије. На основу поменутих резултата у поређењу нашем студијом, можемо закључити да је пародонтопатија присутна у моделу CBS^{+/-} мишева без додатог индуковања или покретача и стимулуса пародонталне болести (**Фигура 7**).

Како би се организам одбранио од пародонтопатогених микроорганизама неопходна је активација урођеног и стеченог имунског одговора. Урођени имунски систем индетификује велики број страних антигена помоћу лимитираног броја рецептора (*Kirkwood et al., 2007*). На пример, LPS, саставни део ћелијске мембране Грам-негативних микроорганизама, кључна је патогена молекуларна структура у патогенези пародонталне болести. Имајући ову чињеницу у виду, наш модел пародонталне болести заснивао се управо на директном, локалном а касније и последичном системском дејству LPS бактерије *P.gingivalis*. Овај механизам основа је патогенезе пародонталне болести а самим тим хипотезирали смо да пародонтопатија код CBS^{+/-} мишева настаје истим механизмом. Како би се LPS могао транспортовати неопходно је да прође одговарајуће баријере у усној дупљи и гастроинтестиналном тракту. Услед повећања броја пародонтопатогених бактерија долази до промена у оралном али и цревном микробиому при чему настаје дисбиоза (*Lozurone et al., 2012; Semenkovich et al., 2015; Jandhyala et al., 2015; Bai et al., 2016; De Luca and Shoenfeld, 2019; Jia et al., 2019; Curtis et al., 2020*). Дисбиоза, олакшава транспорт њених токсина

до удаљених органа и ткива. *Bacteroidetes* и *Firmicutes* представљају две најважнија бактеријске врсте микробиома црева. Промене заступљености и односа ове две врсте бактерија повезане су са настанком многих болести али са настанком пародонтопатије (Yu et al., 2019; Chen et al., 2017). Анализом микробиоте установили смо значајно повећање бактерија *Firmicutes*-а уз истовремено значајно смањење заступљеност *Bacteroidetes*-а (Фигура 6А) у групи CBS^{+/-} мишева у поређењу са контролном групом. Тромесечни третман LGG-ом смањило је укупну бројност *Firmicutes*-а и значајно повећао заступљеност *Bacteroidetes*-а (Фигура 6А). Студија Beckera и сарадника указује да примати имају слични састав цревне микробиоте као и људи. Ова група научника, истраживала је међусобне промене у структури микробиоте црева чиме су указали на утицај *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Archaeobacteria* и *Actinomycetes* на експресију цитокина и његових посредника (Becker et al., 2019). Ова запажања били у складу са резултатима наше студије (Фигура 6А,В; Фигура 9; Фигура 10; График 4). Поменути резултати потврђују постојање дисбиозе код CBS^{+/-} мишева, што подразумева да урођени недостатак CBS ензима, тачније урођена HNSу узрокује настанак дисбиозе. Међутим, у групама стечене хиперомоцистеинемije HNSу (група HFD мишева и група PD мишева) (График 2), такође је детектовано присуство дисбиозе (Фигура 6). Са те стране, ови резултати сугеришу да и стечено настала HNSу услед поремећаја на нивоу фолата или поремећаја на нивоу метионинског циклуса доприносе настанку дисбиозе. С обзиром да нема студија о поменутих чињеницама, нити података о утицају HNSу на настанак дисбиозе и дисбиозе на настанак HNSу, ово је прва студија која је доказала присуство истих. Међутим, неопходне су додатне студије како би се установио механизам настанка ова два узрочно последишна обољења као и постојећа веза међу њима.

Телије урођене имуности, као што смо у претходним поглављима објаснили, индетицикују LPS помоћу рецептора сличних толу, међутим, да би их активирали неопходно је учешће молекуларних структура као што су LBP и CD-14 (Schumann and Latz, 2000). LBP је свестран протеински молекул који учествује у многобројним функцијама имунског система попут имунске регулације и преноса липида (Schumann et al., 1996). LBP је кључни играч у урођеној имунској одбрани против бактеријских инфекција (Bingle and Craven, 2004). Концентрације LBP у серуму, у физиолошким границама крећу се између 5 и 10 µg/ml, док током акутних фаза болести, вредности се повећавају до 200 µg/ml (Tobias et al., 1992). Експресија и функција LBP су снажно повезане са контролом бактеријских инфекција. Најистакнутији задатак LBP-а је његова улога као дела сензорског апарата за Грам-негативне липополисахариде (Beutler and Rietschel, 2003). Као растворљив протеин прве класе акутне фазе за кога се везује LPS у серуму, тако везани преносе се растворљивим мембранским усидреним кластером диференцијације CD-14 до сигналног рецептора TLR4 (Schromm et al., 2001). Активација комплекса рецептора CD-14/TLR4 покреће проинфламацијски и антиинфламацијски имунски одговора, што за последицу индукује производњу инфламацијских цитокина IL-1, IL-6 и TNFα, литичких ензима и активацију ОС (Ren et al., 2009; Rossol et al., 2011; Vreugdenhil et al., 1999; Schumann et al., 1996). Ако су нерегулисане, ове реакције домаћина могу узроковати подледице, као што су сепса или септички шок (Cohen, 2002). На основу поменутих чињеница, још један од наших циљева, био је да испитамо утицај примењених третмана на системске вредности LBP (График 3) и експресију кластера диференцијације CD-14 (Фигура 9). Осим локалног ефекта, овај начин нам је омогућио да испитамо како и на који начин LPS пародонтопатогених и цревних бактерија утиче на читав организам. Нивои LBP били су значајно повишени у CBS^{+/-} групи мишева, као и код осталих непробитостки третираних група, у поређењу са контролном WT групом мишева, што нам указује на

присуство LPS у серуму ове групе мишева и присутну инфламацијску реакцију (**График 3**). Како би заокружили целокупно дејство комплекса LPS/LBP/CD-14, измерена је релативна експресија CD-14 у серуму мишева. Резултати су показали да експресија CD-14 значајно повишена у групи CBS^{+/-} мишева у поређењу са контроном групом (**Фигура 9В**) што је био случај и у претходно поменутих студијама. LGG статистички значајно је нормализовао и смањено експресију CD-14 у серуму мишева пробитотски третираних група (**Фигура 9В**). Студије *in vivo* показале да мишеви са недостатком LBP имају смањени инфламацијски одговор и већу стопу преживљавања након излагања LPS у поређењу са дивљим типом, тј. контролном групом мишева (*Wurfel et al., 1997*). У исто време мишеви са недостатком LBP имају ослабљену способност елиминисања системских бактеријских инфекција (*Knapp et al., 2003*). Занимљиво је да је LBP такође повезан са другим инфламацијским поремећајима, попут метаболичког синдрома и атеросклерозе чија је патогенеза слична патогенези пародонталне болести (*Hubacek et al., 2002; Gonzalez-Quintela et al., 2013*) а сада и са хиперхомоцистеинемijом као стањем присутним у дисбиозе (**График 3, Фигура 6**).

LPS повећава остеобластичну експресију молекула као што су IL-1 β , TNF α и RANKL (*Alshammari et al., 2017; Ozer et al., 2015*) што је у корелацији са резултатима наше студије (**Фигура 9; Фигура 10**). Поменути молекули индукују активност, дужи животни век и диференцијацију остеокласта. IL-1 β , TNF α , IL-6 и RANKL као инфламацијски фактори, повишени су у стању пародонтопатије (*Alshammari et al., 2017; Ozer et al., 2015*). Међутим, и у стању ННсу повећана је производња проинфламацијских цитокина IL-1 β , TNF α , IL-6 на шта такође указују и резултати наше студије, у групи CBS^{+/-} мишева у поређењу са контролном групом (**Фигура 9, Фигура 10, График 4**). Имајући у виду да смо први који су се бавили испитивањем пародонталног ткива CBS^{+/-} мишева, није било студије истог дизајна са којима бисмо могли поредити резултате. Међутим, будући на механизам настанка пародонталне болести и ресорпције алвеоларне кости, наше резултате можемо поредити са резултатима *Behra* и сарадника који су упоређивали нивое експресије TNF α бутне кости мишева дивљег типа и CBS^{+/-} мишева. Експресија TNF α бутне кости била је значајно повећана у групи CBS^{+/-} мишева у поређењу са контролном групом (*Behra et al., 2018*), што је у корелацији са резултатима наше студије (**График 4**). ННсу посредством цитокина и поремећајем у метионинском циклусу утиче на ремоделовање костију и њихову ресорпцију. На основу свих података можемо закључити да повећана експресија инфламацијских цитокина изазваних урођеном или стеченом ННсу делују синергично и поспешују настанак пародонталне болести. Све укупно, повишен број PMN, смањен број фибробласта и присутна ресорпција алвеоларне кости код CBS^{+/-} мишева потврдили су и тежину пародонталне болести. Ови подаци могу послужити као основа за дијагнозу пародонталне болести и за развој потенцијалне терапије у регенерацији алвеоларне кости код особа са повишеним нивоом Нсу.

Осим поменутих фактора, начин исхране, хранљиве материје и различите врсте дијета предствљају фактор ризика за настанак пародонтопатије у смислу утицаја на количину и квалитет денталног плака. Шта више, поменути фактори битно утичу на инфламацијски одговор домаћина на орални микробни биофилм при чему додатно поспешују настанак пародонтопатије. *Merchant* и сарадници указали су на повезаности исхране, у смислу уноса целог зрна и ризика од настанка пародонтопатије међу особама мушког пола у Сједињеним Америчким државама. Мушкарци чија се исхрана заснивала на уносу целих зрна имали су 23% мање шансе да развију пародонтопатију (*Merchant et al., 2006*). У другој студији код испитаника који су били на дијети са високим садржајем влакана и са мало масти, значајно се смањило крварење из гингиве, смањила се дубина цепа и ублажио губитак епителног припоја

чиме су указали на важност исхране у очувању потпорног апарата зуба (Kondo et al., 2014). Такође, доказано је да исхрана богата воћем и поврћем са високим садржајем влакна, β -каротена и витамина С, доприноси бољем стању потпорног апарата зуба међу непушачима, али не и међу пушачима (Dodington et al., 2015). Са друге стране, исхрана богата мастима доприноси не само гојазности већ и настанку пародонтопатије (Virto et al., 2018; Li et al., 2015). Систематски прегледи и студије мета-анализе показују да је гојазност повезана са настанком и прогресијом пародонталне болест (Nascimento et al., 2015; Moura-Grec et al., 2014; Gaio et al., 2016). У студији мета-анализе, гојазност је била повезана са ризиком од настанка пародонталне болести у 25 студија (Moura-Grec et al., 2014). Такође, мета анализом Nascimento и сарадника доказано је да одрасли који имају прекомерну телесну тежину или су постали гојазни имају повећан ризик од развоја пародонтопатије у поређењу са особама које су имале нормалну тежину (Nascimento et al., 2015). У литератури новијег датума, уочава се и утицај пола. у Бразилској популацији, где је гојазност допринела повећању губитка епителног припоја код жене али не и код мушкараца (Gaio et al., 2016). Међутим, најважнији утицај на настанак пародонтопатије исхрана доприноси путем промене микробиома црева. Микробиота црева има веома важну улогу у физиологији човековог организма. Састав и функција микробиоте зависи од фактора животне средине као што су исхрана, употреба лекова, присуство токсина, али и од генетских фактора (Lozupone et al., 2012; Semenkovich et al., 2015; Jandhyala et al., 2015). Промена микробиома црева утиче на настанк бројних болести, укључујући пародонталну болест (Bai et al., 2016; De Luca and Shoenfeld, 2019; Jia et al., 2019; Curtis et al., 2020). Као што смо поменули, *Bacteroidetes* и *Firmicutes* представљају две најважнија бактеријске врсте које чине 90% микробиома црева. Промене заступљености и односа ове две врсте бактерија повезане су са настанком пародонталне болести (Yu et al., 2019; Chen et al., 2017). Кључну улогу у саставу али и променама микробиоте црева има исхрана. У року од неколико дана након промена у исхрани, састав цревне флоре бива значајно промењен (Ng et al., 2014; Scott et al., 2013). Клинички и експериментално, претходне студије али и наша студија, показале су да, поред значајног повећања телесне тежине (**График 1**), дуготрајна исхрана HFD има штетне ефекте на физиологију дигестивног тракта што доводи до промена у микробиолошком саставу црева, коју карактерише доминација *Firmicutes* у односу на *Bacteroidetes*, што је у корелацији са резултатима наше студије (**Фигура 6В**) и указује на присуство дисбиозе (Turnbaugh et al., 2008). Открили смо да је HFD значајно повећала укупан број *Firmicutes*-а истовремено смањујући заступљеност *Bacteroidetes*-а (**Фигура 6А**) а да је третман пробиотком LGG значајно смањило укупну бројност *Firmicutes*-а и повећао заступљеност *Bacteroidetes*-а (**Фигура 6А**). Студија Beckera и сарадника указује да примати имају слични састав цревне микробиоте као људи. Они су указали на повећање заступљености *Prevotellaceae* и *Bacteroidetes* у студијама о Кроновој болести. Ова група научника, истраживала је међусобне промене у структури микробиоте црева чиме су указали на утицај *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Archaeobacteria* и *Actinomycetes* на експресију цитокина и његових посредника (Becker et al., 2019). Ова запажања у складу су са резултатима наше студије (**Фигура 6А,В; Фигура 9; Фигура 10; График 4**). Узимајући поменути чињенице и резултате наше студије у разматрање, можемо закључити да осим рода и врсте, и сојеви бактерије могу имати утицај на састав и функцију микробиоте исто тако у битној мери као и сама врста а на који начин ће се ефекти испољити представља ново поље истраживања на чему ће се базирати будуће студије.

Свака промена састава микробиоте црева утиче на производњу одређене количине метаболита а једни од најважнијих јесу SCFA. Најчешће врсте SCFA произведене у цревима су ацетатна или такозвана сирћентна киселина, бутерна

киселина, пропионска киселина, валеријанска или пентанска киселина и изовалеријанска, тачније 3-метилбутанска кратколанчана масна киселина (*Lu et al., 2014; Yang et al., 2019*). Као веома важни метаболити, SCFA играју значајну улогу у многим болестима и метаболичким поремећајима попут гојазности и дијабетеса (*Al-Lahham et al., 2011; Tolhurst et al., 2012*). Такође, ферментација анаеробних бактерија, која доводи до производње SCFA, могу бити повезане са етиопатогенезом пародонтопатије (*Tsuda et al., 2010; Niederman et al., 1997*). Истраживањем у нашој студији резултати су показали значајно смањење ацетатне (**Фигура 6C**), пропионске (**Фигура 6D**), бутерне (**Фигура 6E**), валеријанска (**Фигура 6F**) и изовалеријске киселина (**Фигура 6G**) у узорцима фецеса у групи HFD у поређењу са контролном групом. Такође, значајан пораст ацетатне (**Фигура 6C**), бутерне (**Фигура 6E**), валеријанске (**Фигура 6F**) и изовалеријанске киселине (**Фигура 6G**) био је примећен у групама третираним пробиотиком LGG у поређењу са контролном групом и групом HFD, док се вредност пропионске киселине након пробиотског третмана није значајно променила (**Фигура 6D**). Овакви резултати се могу објаснити чињеницом да ниже вредности пропионске киселине под дејством пробиотика LGG на овај начин утичу на перисталтику црева и са једне стране доприносе ихибирању раста такозваних лоших бактерија у цревима, а са друге стране утичу на смањење липида у крви а на тај начин и на крвоток пародонцијума (*Conlon and Bird, 2014; Knol et al., 2005*). Сnižени нивои пропионске и бутерне киселине пронађени су у гингивалној течности пацијената са хроничним пародонтопатијом, што је за последицу онемогућило чврсто везивање епителних ћелија и припојног епитела и тиме узроковало продирање бактерија и разарање пародонталног ткива зуба (*Takigawa et al., 2008; Qiqiang et al., 2012; Niederman et al., 1997*). Такође, бутерна киселина коју производе пародонтопатогене бактерије доприноси настанку пародонталне болести (*Sueno and Ochiai, 2018*). Студије *Sueno* и *Ochiai* указују да повишене вредности бутерне киселине у гингиви након терапије пародонтопатије утичу на смањење инфламације смањењем инфламацијских цитокина IL-1 β , TNF α , Каспазе 1 и Каспазе 12 (*Sueno and Ochiai, 2018*). Резултати наше студије у корелацији су са поменутиим резултатима и указују да смањење SCFA (**Фигура 6 C-G**) утиче на повећање маркера запаљења као што су IL-1 β , TNF α и IL-6 у пародонталном ткиву (**Фигура 10; График 4 А, В, С**) али и у системској циркулацији (**Фигура 9**), што сугерише на дисеминацију бактерија и њених токсина. Третман пробиотком LGG утицао је на повећање продукције SCFA (**Фигура 6 C-G**) и на инфламацијски статус пародонталног ткива (**График 4**). Ова запажања, у нашем случају, сугерише да HFD кроз смањење SCFA и поремећаја на нивоу инфламацијског одговора могу узроковати смањење гингивалног протока крви и појаву пародонталне болести (**Схема 2**).

LPS, као најважнија компонента мембране Грам-негативних бактерија, везују се за TLR4 (**Схема 2**) и активира урођени имунски одговор. Повишен ниво експресије овог рецептора примећен је у HFD групи мишева у студији групе научника *Wei* и сарадника (*Wei et al., 2020*). Везивање LPS на TLR4 катализује, као што смо поменули, локални и системски везан протеин LPS, LBP. За производњу LBP одговорни су хепатоцити. Нивои LBP у крви повећани су код пацијената који болују од агресивне и хроничне пародонтопатије (*Wohlfeil et al., 2012; Soolari et al., 1999*). У нашој студији мерили смо ниво LBP у серуму мишева са циљем открића још једног потенцијалног пута пародонталне болести: HFD/црева дисбиоза - LPS/LBP/TLR4 сигнални пут - гингивални проток крви-пародонтопатија (**Схема 2**). Резултати наше студије показали су да је LBP значајно повећан у групи HFD у поређењу са контролом групе, док је у групи HFD+LGG забележено снижење нивоа LBP у поређењу са HFD групом (**График 3**). Резултати показују да је HFD дисбиозом црева и смањењем продукције SCFA

допринео повећаној пропустљивости црева и на тај начин олакшао дисеминацију бактерија и токсина кроз читав организам повећањем нивоа LBP који је у овом случају носач LPS док је LGG на једноставан и лак начин, системским деловањем на нивоу дигестивног тракта, повећањем продукције SCFA, спречио пропустљивост црева и на тај начин утицао на смањење продукције LBP, где с обзиром да нема присутног LPS у системској циркулацији нема повећања нивоа њеног носача. Ове чињенице у корелацији су са резултатима претходних студија (Wei et al., 2020; Knol et al., 2005; Moro et al., 2002; Conlon and Bird, 2014; Stadlbauer, 2015)

На основу не тако давне студије, истраживали смо улогу HFD у нарушавању имунског одговора и његову могућност оштећење пародонталног ткива (Muluke et al., 2016). Измерена је експресија TNF α , IL-1 β , IL-6, RANKL и OPG у пародонталном ткиву мишева. Постоје докази који указују на то да је пародонтална болест дисбиотичко стање оралног микробиома (Payne et al., 2019). Такође, верује се да је пародонтопатија покренута од стране бактерија које су већ присутне у усној дупљи, а не увођењем нових егзогенних сојева (Corrêa et al., 2019). Квалитативно и квантитативно измењени микроорганизми усне дупље индукују појачан имунски одговор (Graves et al., 2019; Gao et al., 2018). Тако измењени микроорганизми могу да индукују и системску инфламацију доспевањем микроорганизма у лумен црева, дисеминацијом проинфламацијских цитокина (IL-1 β , IL-6, TNF α) хематогено и дисеминацијом бактерија хематогено. Цревна дисбиоза узрокује повећање пропустљивости слузокоже црева услед чега настаје ендоксемија и системска инфламација (Torres et al., 2017). Као последица системске инфламације настаје и појачана ресорпција костију. Продукцијом проинфламацијских цитокина IL-1 β , IL-17, TNF α промовише се преживљавање, пролиферација и активност ОС, а са друге стране супримира се активност ОБ. Цитокини IL-1 β , IL-17, TNF α утичу на ОБ да појачано ослобађају RANKL који се даље везује за прекурсоре ОС и промовише генезу ОС. Повећавањем броја ОС настаје ресорпција костију (Torres et al., 2017; Hajishengallis, 2015). Када микроорганизми доспеју у ткиво, интерагују са ћелијама имунског система као што су макрофаги и дендринскећелије. Поменуте ћелије продукују проинфламацијске цитокине. Продукција IL-23 промовише развој Th17 лимфоцита (Torres et al., 2017). У таквим околностима настаје доминација Th17 имунског одговора што утиче на фибробласте да ослобађајући фактор стимулације колоније за гранулоците и хемокине који регрутују неутрофиле. Неутрофили ослобађају хемокине који селективно регрутују још Th17 лимфоцита. Проинфламацијски цитокини као што су IL-1 β , IL-6, TNF α промовишу остеокластогенезу и ресорпцију костију. Интерферон γ индиректно повећава губитак коштаног ткива појачаном активношћу антиген-презентујућих ћелија и активацијом Т лимфоцита (Nikitakis et al., 2017; Kirkwood et al., 2006). Т лимфоцити индукују ресорпцију алвеоларне кости смањењем остеокластогенетског потенцијала прекурсора ОС. На овај начин системске болести црева, узроковане дисбиозом црева и генерализованом инфламацијом могу допринети ресорпцији алвеоларних костију. HFD промовише развој пародонтопатије и гингивитиса системским и локалним инфламацијским одговором. Blasco-Baque и сарадници доказали су да је експресија TNF α , IL-1 β , IL-6, RANKL и OPG значајно повећана у пародонталном ткиву HFD мишева (Blasco-Baque et al., 2012). Инфламацијски цитокини као што су TNF α , IL-1 β и IL-6 су укључени у инфламацијски одговор домаћина на бактеријску инфекцију и повезани су са напредовањем пародонталне болести (Cekici et al., 2014; Pacios et al., 2012). Недавна студија показала је да истовремена изложеност макрофага LPS, компонената мембране Грам-негативних бактерија и палмитинској киселини, покреће повећану производњу инфламацијских цитокина путем прередованог пута LPS/TLR4 (Jin et al., 2013). Нашим

анализама пародонталног ткива мишева открили смо да су HFD животиње заиста показале већу експресију TNF α , IL-1 β , IL-6 и RANKL (**График 4 А,В,С,Ф; Фигура 10 А,В,Е**) и нижу експресију OPG (**График 4Е; Фигура 10 С**) у поређењу са контролним животињама, што сугерише да HFD промовише локалну инфламацијску реакцију као одговор на присутну инфекцију (**График 4**). RANKL и OPG као најважнији сигнални молекули у метаболизму костију (*Boyce and Xing, 2007*), указују нам на ресорпцију и почетак ремоделовања алвеоларне кости. HFD инхибира експресију OPG и промовише и утиче на повећану експресију RANKL (*Wang et al., 2020; Rezende Yanagihara et al., 2017*) што потврђује и корелација ових резултатима са резултатима наше студије (**График 4; Фигура 10**). Третман пробиотком LGG утицао је значајно на смањење експресије TNF α , IL-1 β , IL-6 и RANKL (**График 4 А,В,С,Ф; Фигура 10 А,В,Е**) и повећање експресије OPG (**График 4Е; Фигура 10 С**). Након третмана пробиотком, како би апсолутно утврдили цитокински профил, анализа цитокина вршена је у серуму и у пародонталном ткиву *Western blot* и PCR методом. Анализом цитокина серума уочена је статистички значајна разлика међу пробиотски третираним и нетретираним групама у експресији TNF α , IL-1 и IL-6 (**Фигура 10 А,С,Е**), међутим статистички значајна разлика у експресији IL-1 β и OPG у серуму између група третираних пробиотиком и не третираних група (**Фигура 10 А,Д,Г**). Предпостављамо да је узрок томе примена хроничног третмана која је условила промене само локално у пародонталном ткиву. Статистички значајна разлика између група третираних пробиотиком LGG и група нетретираних пробиотиком у експресију TNF α , IL-1 β , IL-6, OPG и RANKL само је потврдила нашу предпоставку (**Фигура 10, График 4**). Поменути резултати у корелацији су са резултатима *Jorjão* и сарадника (*Jorjão et al., 2015*) о ефектима пробиотика LGG на инфламацијске цитокине TNF α , IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10, IL-12 што сугерише на ефекте LGG на модулацију али и стимулацију имунског одговора домаћина. Такође, ефекти пробиотика сличног механизма дејства, *L.brevis* у терапији пародонтопатије показали су превентивни ефекат на ресорпцију алвеоларне кости али и на смањење експресије TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-17А у третираним групама у поређењу са контролном групом. Такође, третиране животиње су имале мање анаеробних бактерија и више аеробних бактерија у поређењу са животињама које нису биле третиране поменути пробиотиком. Ови резултати указују на антибактеријске и имуномодулаторне ефекте пробиотика у терапији пародонтопатије (*Maekawa and Hajishengallis, 2014*).

Повећана производња проинфламацијских цитокина индукује повећану активност и експресију MMP. Претходне експерименталне студије су утврдиле да HFD узрокује губитак васкуларне еластичности, првенствено услед таложења штетних материја у зидовима крвних судова, што заузврат доводи до смањеног протока крви (*Mitra et al., 2018; Yuan et al., 2019; Declèves et al., 2013*). Будући да су MMP један од фактора који узрокује оклузију и оштећење крвних судова и пародонталног ткива, мерена је експресија MMP-2, MMP-9 и TIMP-2 у пародонталном ткиву мишева. MMP могу селективно разградити патолошки измењен ванћелијски матрикс у различитим болестима, што је њихова позитивна карактеристика, међутим неправилна разградња ванћелијског матрикса доводи до фиброзе у различитим ткивима (*Chen and Li, 2009*). Нашим истраживањем установили смо да су MMP-2 и MMP-9 значајно повишене код мишева у HFD групи (**График 4 Г,Н**), док је HFD+LGG група, група третирана пробиотком, показала снижену експресију MMP-2 и MMP-9 у поређењу са HFD групом (**График 4 Г,Н**). Експресија и активност MMP-9 повећавају се у експерименталној пародонтопатији без обзира на метод индуковања пародонтопатије (*Barreiros et al., 2018*). Ове студије указују на важност ремоделовања ванћелијског

матрикса као једног од фактора у развоју пародонталне болести. Према сазнањима из доступне литературе, активност и експресија MMP-9 у нашој студији измерена је методом желатин зимографије у пародонталном ткиву мишева по први пут. Резултати су показали да је активност MMP значајно повећана код мишева у групи HFD, док је третман LGG значајно смањено ниво активности MMP-9 у поређењу са групом HFD (**Фигура 8 А,В**). У овој студији, по први пут је пародонтално ткиво анализирано методом желатин зимографије и нисмо имали одговарајуће податке са којима бисмо упоредили наше резултате.

Два сата након оброка, доказано је да HFD изазива оштећење ендотела васкуларном оклузијом и доводи до смањења протока крви што је у складу са нашим резултатима (*Münch et al., 2019; Bui et al., 2019*). Користили смо HFD како би утврдили њен утицај на пародонтална ткива који може бити директан, на усну дупљу, или индиректан, на крвне судове, проток крви или гастроинтестинални тракт (**Схема 2**). Проток крви у гингиви указује на циркулацију у гингивалном и пародонталном ткиву али и на исхрану и функцију ткива. Проток крви у гингиви измерили смо коришћењем *Laser Doppler*. У регији букалне гингиве првог десног мандибуларног молара, гингивални проток крви (GBF) је износио $215,2 \pm 10,9$ јединице флуksа у HFD групи, док је у контролној групи износио $264,6 \pm 9,5$ јединица флуksа (**Слика 4; Табела 6**). Услед HFD дошло је до смањења GBF. Третман LGG у групи HFD+ LGG побољшао је GBF и вратио на нормалне вредности, $247,5 \pm 9,1$ јединица флуksа (**Табела 6**). По први пут у нашој студији приказан је утицај HFD на GBF код мишева, као и третман пробиотком LGG код истих (**Слика 4**). *Vaab* и *Oberg* у својој студији сугерисали су промене у морфологији и васкуларизацији крвних судова повезане са раним клиничким знацима гингивитиса код пса који су утицали на гингивални проток крви у инфламираној гингиви (*Vaab and Oberg, 1987*). Такође, у експерименталним студијама на зечевима потвђена су три предиспонирајућа фактора за појава гингивитиса, смањен проток крви у гингиви, стрес и никотин. Ове студије су потврдиле смањење GBF током исхемије код зечева (*Clarke and Shephard, 1984*).

Као последица свих поменутих поремећаја настаје пародонтална болест. Како бисмо потврдили пародонтопатију код свих експерименталних група користили смо хистоморфометријску анализу као што је наведено у претходним студијама (*Semenoff et al., 2008*). ED и CEJ-ABC као хистолошки параметри указују нам на губитак припојног епитела и ресорпцију алвеоларне кости (*Breivik et al., 2006; Susin and Rösing, 2003*). Хистоморфометријском анализом утврдили смо повећање удаљености CEJ-ABC у групи са HFD, али и као што смо поменули у групи CBS^{+/-}, што указује на постојање пародонталне болести (**Фигура 7**). Средња вредност CEJ-ABC и ED, у μm , била је статистички значајно већа у групи HFD и CBS^{+/-} мишева ($p < 0,05$ у односу на контролну групу) (**Фигура 7 В,С**). На основу студија сличног дизајна можемо закључити на основу добијених вредности CEJ-ABC и ED можемо закључити постојање пародонталне болести у групи HFD и CBS^{+/-} мишева. Група PD коришћена је као позитивна контролна група чије су вредности биле подједнаке са експерименталним HFD и CBS^{+/-} групама. Поређењем свих експерименталних група, највеће разарање пародонталног ткива уочено је у групи HFD а затим у групи CBS^{+/-} у поређењу са осталим групама. Поменути чиницима указали смо да је дисбиоза имала најзначајнији утицај на настанак пародонтопатије али и истовремени утицај на све поменуте експерименталне групе.

Нашом студијом обезбедили смо теоријске и експерименталне доказе о дисбиотичком механизму, смањењу GBF и њиховом утицају на развој пародонталне болести као и доказе о успешности терапије пробиотиком LGG. Међутим, специфични механизми и клинички ефекат HFD, HFDу и LGG у пародонталној болести захтевају

даља истраживања. Студије о сигурност употребе пробиотика су такође потребне, посебно за процену нежељених ефеката.

VI

ЗАКЉУЧЦИ

6. ЗАКЉУЧЦИ

На основу сумираних добијених резултата у нашој студији, изведени су следећи закључци:

- На основу хистоморфометријских, цитокинских и функционалних анализа пародонталног ткива утврдили смо присуство пародонтопатије код мишева са хиперхомоцистеинемом и мишева храњених масном храном;
- Најизраженија пародонтопатија и промене пародонталног ткива уочене су у групи мишева храњених масном храном што указује на важност, значај и утицај дисбиозе у настанку пародонтопатије;
- Недостатак цистатионин β-синтазе код мишева, као модела урођене хиперхомоцистеинемје, допринео је настанку пародонтопатије, генетски али и последицима утицајем на цитокински профил пародонталног ткива, стимулишући синтезу проинфламацијског маркера IL-6, који је допринео повећању диференцијације и активност ОС, условио ресорпцију алвеоларне кости и тиме допринео настанку пародонтопатије;
- На основу микробиолошких анализа фецеса, смањењем проукције SCFA, дисбалансом односа бактерија *Bacteroides/Firmicutes*, смањењем броја *Bacteroides* и повећањем *Firmicutes*, утврдили смо присуство дисбиозе код мишева са хиперхомоцистеинемом и мишева храњених масном храном;
- Најизраженија дисбиоза уочена је у групи мишева којима је индукована пародонтопатија што указује на важност дисеминације пародонтопатогених микроорганизама на утицај последично настале дисбиозе;
- Повишен ниво хомоцистеина у серуму, као и урођени недостатак цистатионин β-синтазе, утицао је на настанак цревне дисбиозе на основу добијених резултата микробиолошких анализа фецеса, анализа SCFA, екстракције и секвенционирања ДНК мишева;
- На основу микробиолошких анализа фецеса, хистоморфометријских, цитокинских и функционалних анализа пародонталног ткива уочено је да је цревна дисбиоза утицала на настанак пародонтопатије;
- На основу цитокинских анализа, маркери IL-1β, TNFα и IL-10, учествовали су у процесу инфламацијског одговора и посредовали у настанку пародонтопатије код свих експерименталних група мишева;
- На основу анализа пародонтопатије, RANKL и OPG учествовали су у процесу инфламацијског одговора и посредовали у настанку пародонтопатије код свих експерименталних група мишева;
- На основу анализе MMP-2, MMP-9 и TIMP-2 утврђена је њихова улога у процесу инфламацијског одговора и предовање у настанку пародонтопатије код свих експерименталних група мишева;
- LGG третман показао је профилактички и терапијски ефекат на пародонтопатију код мишева са хиперхомоцистеинемом и мишева храњених масном храном. LGG третман, пре свега, допринео је очувању цревне микробиоте повећањем продукције SCFA, равнотеже присутних бактерија и функције гена;

- LGG третман допринео је очувању физиолошких и смањењу патолошких експерсија цитокина и матриксних металопротеиназа од значаја, у пародонталном ткиву мишева. Такође, утицао је на функционалне параметре пародонталног ткива, попут гингивалног протока крви и хистоморфометријских параметара;
- LGG третман допринео је смањењу нивоа хомоцистеина у серуму и очувању физиолошких граница код здравих мишева што потенцијално доказује и његово терапијско и профилактичко дејство не само на пародонтопатију, већ и друга обољења повезана са хиперхомоцистеинемом.

6.1. БУДУЋА ИСТРАЖИВАЊА

Иако бројна истраживања током последњих неколико година указују на ефикасност пробиотика у терапији пародонтопатије, многи ефекти пробиотика LGG и аспекти његовог деловања на пародонтална ткива нису у потпуности разјашњени и истражени. Резултати наше студије могу подстаћи на будућа истраживања посвећена испитивању ефеката LGG у различитим фазама и моделима пародонталне болести. Такође, од изузетног значаја било би испитати локалне ефекте LGG у превенцији и терапији исте. Узевши у разматрање објављене резултате нашег истраживања и резултате претходних студија, LGG би могао бити значајан кандидат у терапији пародонталне болести, као превентивно средство, помоћно средство приликом конвенционалне терапије али и као монотерапија у случају немогућности каузалне терапије, као на пример код кардиоваскуларних пацијената што је кроз модел хиперхомоцистеинемije био један циљева наше студије. Међутим, неопходна су додатна истраживања како би се разјаснили одговорни механизми превентивних и терапијских ефеката LGG.

Нашим истраживањем показано је више позитивних ефеката LGG тремана кроз различите моделе пародонтопатије и удржених болести, међутим, поставља се питање да ли LGG терапију можемо применити код људи. Како метаболизам животиња и људи није у потпуности исти, експериментална истраживања могу послужити као добра основа за клиничка истраживања. На основу поменутог разлога, да би се започело са применом LGG код људи, неопходне су клиничке студије у којима би се испитивали системски и локални ефекти LGG на пародонтална ткива људи. Иако се на основу добијених резултата наше студије може закључити да се LGG има превентивне и терапијске ефекте у терапији пародонтопатије, неопходна су даља истраживања у којима би се испитивали клинички, локални и системске, ефекти али и могући нежељени ефекти примене LGG.

VII
СКРАЋЕНИЦЕ

7. СКРАЋЕНИЦЕ

- ABC** – *alveolar bone crest*
bp – базни парови
BSA – *Bovine Serum Albumin*
CBS – цистатоин β -синтетаза
CEJ – *cemento enamel junction*
CTX – серумски телопептид колагена типа један
DPD – деоксиипиридинолина
EDTA – *Ethylen Diamine Tetratra Acid*
H&E – хематоксилин и еосин
Hcy – хомоцистеин
HFD – *high fat diet*
HHcy – хиперхомоцистеинемија
INF- γ – интерферон гама
KVP – *Kilo Voltage Peak*
LBP – *Lipopolysaharide Binding Protein*
LGG – *Lactobacillus rhamnosus*
LOX – лизил оксидаза
LPS – липополисахарид
LPS-PG – липополисахарид *Porphyromonas gingivalis*
МАРК – митоген активирани протеин киназе
ММР – матриксне металопротеиназе
НАС – N-ацетил цистеин
ОБ – остеобласт
ОС – остеокласт
OPG – остеопротегерин
PBS – *Phosphate Buffered Saline*
PCR – ланчана реакција полимеразе
PD – пародонтопатија
PMN – полиморфонуклеари
PMSF – фенил метан сулфонилфлуорид
Porphyromonas gingivalis – *P. gingivalis*
PTH – паратиреоидни хормон
RANK – *receptor activator of nuclear factor kappa-B*
RANKL – *receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand*
ROS – реактивне врсте кисеоника
RT-PCR – ланчана реакција полимеразе у реалном времену
SAH – S-аденозилхомоцистеин
SCFA – *Short chain fatty acid*
SD – стандардна девијација
SDS-PEG – *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacralamide Gel Electrophoresis*
TLR – *Toll like receptor*
TRAP – *Tartrate Resistant Acid Phosphatase*
WT – *wild type*
ГИТ – гастроинтестинални тракт
ДНК – дезоксирибонуклеинска киселина

VIII
ЛИТЕРАТУРА

8. ЛИТЕРАТУРА

- Ahn J, Yang L, Paster BJ, Ganly I, Morris L, Pei Z, Hayes RB. Oral microbiome profiles: 16S rRNA pyrosequencing and microarray assay comparison. *PLoS One*. 2011;6:e22788.
- Alanzi A, Honkala S, Honkala E, Varghese A, Tolvanen M, Söderling E. Effect of *Lactobacillus rhamnosus* and *Bifidobacterium lactis* on gingival health, dental plaque, and periodontopathogens in adolescents: a randomised placebo-controlled clinical trial. *Benef Microbes*. 2018;9:593-602.
- Albandar JM. Periodontal disease surveillance. *J Periodontol*. 2007;78:1179-81.
- Alshammari A, Amar S. Proposal for a novel murine model of human periodontitis using *Porphyromonas gingivalis* and type II collagen antibody injections. *Saudi Dent J*. 2019;31(2):181-187.
- Alshammari A, Patel J, Al-Hashemi J, Cai B, Panek J, Huck O, Amar S. Kava-241 reduced periodontal destruction in a collagen antibody primed *Porphyromonas gingivalis* model of periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2017;44(11):1123-1132.
- Araújo AA, Pereira ASBF, Medeiros CACX, Brito GAC, Leitão RFC, Araújo LS, Guedes PMM, Hiyari S, Pirih FQ, Araújo Júnior RF. Effects of metformin on inflammation, oxidative stress, and bone loss in a rat model of periodontitis. *PLoS One*. 2017;12(8):e0183506.
- Atarashi K, Suda W, Luo C, Kawaguchi T, Motoo I, Narushima S, Kiguchi Y, Yasuma K, Watanabe E, Tanoue T, Thaiss CA, Sato M, Toyooka K, Said HS, Yamagami H, Rice SA, Gevers D, Johnson RC, Segre JA, Chen K, Kolls JK, Elinav E, Morita H, Xavier RJ, Hattori M, Honda K. Ectopic colonization of oral bacteria in the intestine drives TH1 cell induction and inflammation. *Science*. 2017;358:359-365.
- Bai Y, Wei Y, Wu L, Wei J, Wang X, Bai Y. C/EBP β Mediates Endoplasmic Reticulum Stress Regulated Inflammatory Response and Extracellular Matrix Degradation in LPS-Stimulated Human Periodontal Ligament Cells. *Int J Mol Sci*. 2016;17(3):385.
- Ballini A, Cantore S, Saini R, et al. Effect of activated charcoal probiotic toothpaste containing *Lactobacillus paracasei* and xylitol on dental caries: a randomized and controlled clinical trial. *J Biol Regul Homeost Agents*. 2019;33:977-981.
- Bandyopadhyay D, Marlow NM, Fernandes JK, Leite RS. Periodontal disease progression and glycaemic control among Gullah African Americans with type-2 diabetes. *J Clin Periodontol*. 2010;37(6):501-9.
- Barreiros D, Nelson P Filho, Paula-Silva FWG, Oliveira KMH, Lucisano MP, Rossi A, Silva LAB, Küchler EC, Silva RAB. MMP2 and MMP9 are Associated with Apical Periodontitis Progression and Might be Modulated by TLR2 and MyD88. *Braz Dent J*. 2018;29(1):43-47.
- Bartold PM, Van Dyke TE. Periodontitis: a host-mediated disruption of microbial homeostasis. *Unlearning learned concepts. Periodontol 2000*. 2013;62(1):203-17.

- Baumgart M, Dogan B, Rishniw M, Weitzman G, Bosworth B, Yantiss R, Orsi RH, Wiedmann M, McDonough P, Kim SG, Berg D, Schukken Y, Scherl E, Simpson KW. Culture independent analysis of ileal mucosa reveals a selective increase in invasive *Escherichia coli* of novel phylogeny relative to depletion of Clostridiales in Crohn's disease involving the ileum. *ISME J*. 2007;1:403-18.
- Behera J, Bala J, Nuru M, Tyagi SC, Tyagi N. Homocysteine as a Pathological Biomarker for Bone Disease. *J Cell Physiol*. 2017;232:2704-2709.
- Behera J, George AK, Voor MJ, Tyagi SC, Tyagi N. Hydrogen sulfide epigenetically mitigates bone loss through OPG/RANKL regulation during hyperhomocysteinemia in mice. *Bone*. 2018;114:90-108.
- Belcastro V, Striano P. Antiepileptic drugs, hyperhomocysteinemia and B-vitamins supplementation in patients with epilepsy. *Epilepsy Res*. 2012;102:1-7.
- Bermudez-Brito M, Muñoz-Quezada S, Gomez-Llorente C, et al. Human intestinal dendritic cells decrease cytokine release against *Salmonella* infection in the presence of *Lactobacillus paracasei* upon TLR activation. *PLoS One*. 2012a;7:e43197.
- Bermudez-Brito M, Plaza-Díaz J, Muñoz-Quezada S, Gómez-Llorente C, Gil A. Probiotic mechanisms of action. *Ann Nutr Metab*. 2012b;61:160-174.
- Beutler B, Rietschel ET. Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin. *Nat Rev Immunol*. 2003;3(2):169-76.
- Bhardwaj S, Prabhuji ML, Karthikeyan BV. Effect of non-surgical periodontal therapy on plasma homocysteine levels in Indian population with chronic periodontitis: a pilot study. *J Clin Periodontol*. 2015;42:221-7.
- Bingle CD, Craven CJ. Meet the relatives: a family of BPI- and LBP-related proteins. *Trends Immunol*. 2004;25(2):53-5.
- Blasco-Baque V, Garidou L, Pomié C, Escoula Q, Loubieres P, Le Gall-David S, Lemaitre M, Nicolas S, Klopp P, Waget A, Azalbert V, Colom A, Bonnaure-Mallet M, Kemoun P, Serino M, Burcelin R. Periodontitis induced by *Porphyromonas gingivalis* drives periodontal microbiota dysbiosis and insulin resistance via an impaired adaptive immune response. *Gut*. 2017;66:872-885.
- Blasco-Baque V, Serino M, Vergnes JN, Riant E, Loubieres P, Arnal JF, Gourdy P, Sixou M, Burcelin R, Kemoun P. High-fat diet induces periodontitis in mice through lipopolysaccharides (LPS) receptor signaling: protective action of estrogens. *PLoS One*. 2012;7:e48220.
- Boyce BF, Xing L. The RANKL/RANK/OPG pathway. *Curr Osteoporos Rep*. 2007;5(3):98-104.
- Brazzelli V, Grasso V, Fornara L, Moggio E, Gamba G, Villani S, Borroni G. Homocysteine, vitamin B12 and folic acid levels in psoriatic patients and correlation with disease severity. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2010;23:911-6.

- Breivik T, Gundersen Y, Osmundsen H, Fonnum F, Opstad PK. Neonatal dexamethasone and chronic tianeptine treatment inhibit ligature-induced periodontitis in adult rats. *J Periodontal Res.* 2006;41(1):23-32.
- Bui FQ, Almeida-da-Silva CLC, Huynh B, Trinh A, Liu J, Woodward J, Asadi H, Ojcius DM. Association between periodontal pathogens and systemic disease. *Biomed J.* 2019;42:27-35.
- Bustamante M, Oomah BD, Mosi-Roa Y, Rubilar M, Burgos-Díaz C. Probiotics as an Adjunct Therapy for the Treatment of Halitosis, Dental Caries and Periodontitis. *Probiotics Antimicrob Proteins.* 2020;12:325-334.
- Cekici A, Kantarci A, Hasturk H, Van Dyke TE. Inflammatory and immune pathways in the pathogenesis of periodontal disease. *Periodontol 2000.* 2014;64(1):57-80.
- Chen T, Shi Y, Wang X, Wang X, Meng F, Yang S, Yang J, Xin H. High-throughput sequencing analyses of oral microbial diversity in healthy people and patients with dental caries and periodontal disease. *Mol Med Rep.* 2017;16(1):127-132.
- Chen X, Li Y. Role of matrix metalloproteinases in skeletal muscle: migration, differentiation, regeneration and fibrosis. *Cell Adh Migr.* 2009;3:337-41.
- Cheng Z, Jiang X, Kruger WD, Praticò D, Gupta S, Mallilankaraman K, Madesh M, Schafer AI, Durante W, Yang X, Wang H. Hyperhomocysteinemia impairs endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated vasorelaxation in transgenic cystathionine beta synthase-deficient mice. *Blood.* 2011;118:1998-2006.
- Chivero ET, Ahmad R, Thangaraj A, Periyasamy P, Kumar B, Kroeger E, Feng D, Guo ML, Roy S, Dhawan P, Singh AB, Buch S. Cocaine Induces Inflammatory Gut Milieu by Compromising the Mucosal Barrier Integrity and Altering the Gut Microbiota Colonization. *Sci Rep.* 2019;9:12187.
- Ciorba MA. A gastroenterologist's guide to probiotics. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2012;10:960-968.
- Clarke B. Normal bone anatomy and physiology. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2008;3 Suppl 3(Suppl 3):S131-9.
- Clarke NG, Shephard BC. The effects of epinephrine and nicotine on gingival blood flow in the rabbit. *Arch Oral Biol.* 1984;29:789-93.
- Clough GF, Kuliga KZ, Chipperfield AJ. Flow motion dynamics of microvascular blood flow and oxygenation: Evidence of adaptive changes in obesity and type 2 diabetes mellitus/insulin resistance. *Microcirculation.* 2017;24.
- Cohen J. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature.* 2002;420(6917):885-91.
- Confavreux CB. Bone: from a reservoir of minerals to a regulator of energy metabolism. *Kidney Int.* 2011;79(121):S14-9.
- Corey LA, Nance WE, Hofstede P, et al. Self-reported periodontal disease in a Virginia twin population. *J Periodontol.* 1993;64:1205-08.

- Corr SC, Hill C, Gahan CG. Understanding the mechanisms by which probiotics inhibit gastrointestinal pathogens. *Adv Food Nutr Res.* 2009;56:1-15.
- Corrêa JD, Fernandes GR, Calderaro DC, Mendonça SMS, Silva JM, Albiero ML, Cunha FQ, Xiao E, Ferreira GA, Teixeira AL, Mukherjee C, Leys EJ, Silva TA, Graves DT. Oral microbial dysbiosis linked to worsened periodontal condition in rheumatoid arthritis patients. *Sci Rep.* 2019;9:8379.
- Costalonga M, Herzberg MC. The oral microbiome and the immunobiology of periodontal disease and caries. *Immunol Lett.* 2014;162:22-38.
- Cueno ME, Ochiai K. Gingival Periodontal Disease (PD) Level-Butyric Acid Affects the Systemic Blood and Brain Organ: Insights Into the Systemic Inflammation of Periodontal Disease. *Front Immunol.* 2018;9:1158.
- Curtis MA, Diaz PI, Van Dyke TE. The role of the microbiota in periodontal disease. *Periodontol 2000.* 2020;83(1):14-25.
- D'Aiuto F, Parkar M, Brett PM, et al. Gene polymorphisms in pro-inflammatory cytokines are associated with systemic inflammation in patients with severe periodontal infections. *Cytokine.* 2004;28:29–34.
- Dakovic D, Pavlovic MD. Periodontal disease in children and adolescents with type 1 diabetes in Serbia. *J Periodontol.* 2008;79:987-92.
- De Luca F, Shoenfeld Y. The microbiome in autoimmune diseases. *Clin Exp Immunol.* 2019;195(1):74-85.
- de Molon RS, Rossa C Jr, Thurlings RM, Cirelli JA, Koenders MI. Linkage of Periodontitis and Rheumatoid Arthritis: Current Evidence and Potential Biological Interactions. *Int J Mol Sci.* 2019;20:4541.
- de Vrese M, Stegelmann A, Richter B, Fenselau S, Laue C, Schrezenmeir J. Probiotics--compensation for lactase insufficiency. *Am J Clin Nutr.* 2001;73(2 Suppl):421S-429S.
- Declèves AE, Rychak JJ, Smith DJ, Sharma K. Effects of high-fat diet and losartan on renal cortical blood flow using contrast ultrasound imaging. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2013;305:F1343-51.
- Deleon-Pennell KY, de Castro Brás LE, Lindsey ML. Circulating Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide resets cardiac homeostasis in mice through a matrix metalloproteinase-9-dependent mechanism. *Physiol Rep.* 2013;1:e00079.
- Devine DA, Marsh PD. Prospects for the development of probiotics and prebiotics for oral applications. *J Oral Microbiol.* 2009;1.
- Diaz PI, Hoare A, Hong BY. Subgingival Microbiome Shifts and Community Dynamics in Periodontal Diseases. *J Calif Dent Assoc.* 2016;44:421-35.
- Djukanović D, Zelić O, Arsenijević V. Effects of oral hygiene on periodontal tissues in a town in Yugoslavia. *Community Dent Oral Epidemiol.* 1983;11(2):86-9.

Dodington DW, Fritz PC, Sullivan PJ, Ward WE. Higher Intakes of Fruits and Vegetables, β -Carotene, Vitamin C, α -Tocopherol, EPA, and DHA Are Positively Associated with Periodontal Healing after Nonsurgical Periodontal Therapy in Nonsmokers but Not in Smokers. *J Nutr.* 2015;145(11):2512-9.

Donos N. The periodontal pocket. *Periodontol 2000.* 2018;76:7-15.

Eke PI, Page RC, Wei L, Thornton-Evans G, Genco RJ. Update of the case definitions for population-based surveillance of periodontitis. *J Periodontol.* 2012;83:1449-54.

Esaki M, Morita M, Akhter R, Akino K, Honda O. Relationship between folic acid intake and gingival health in non-smoking adults in Japan. *Oral Dis.* 2010;16(1):96-101.

Fiorillo L, Cervino G, Laino L, D'Amico C, Mauceri R, Tozum TF, Gaeta M, Cicciù M. *Porphyromonas gingivalis*, Periodontal and Systemic Implications: A Systematic Review. *Dent J (Basel).* 2019;7:114.

Foureaux Rde C, Messori MR, de Oliveira LF, et al. Effects of probiotic therapy on metabolic and inflammatory parameters of rats with ligature-induced periodontitis associated with restraint stress. *J Periodontol.* 2014;85:975-983.

Freedman SB, Williamson-Urquhart S, Farion KJ, Gouin S, Willan AR, Poonai N, et al. Multicenter Trial of a Combination Probiotic for Children with Gastroenteritis. *N Engl J Med* 2018;379:2015-26.

Fujita Y, Maki K. High-fat diet-induced obesity triggers alveolar bone loss and spontaneous periodontal disease in growing mice. *BMC Obes.* 2016;3:1.

Gaio EJ, Haas AN, Rösing CK, Oppermann RV, Albandar JM, Susin C. Effect of obesity on periodontal attachment loss progression: a 5-year population-based prospective study. *J Clin Periodontol.* 2016;43(7):557-65.

Ganguly P, Alam SF. Role of homocysteine in the development of cardiovascular disease. *Nutr J.* 2015;14:6.

Gao C, Ganesh BP, Shi Z, et al. Gut Microbe-Mediated Suppression of Inflammation-Associated Colon Carcinogenesis by Luminal Histamine Production. *Am J Pathol.* 2017;187:2323-2336.

Gao L, Xu T, Huang G, Jiang S, Gu Y, Chen F. Oral microbiomes: more and more importance in oral cavity and whole body. *Protein Cell.* 2018;9:488-500.

Gatej SM, Bright R, Weyrich LS, et al. Probiotic *Lactobacillus Rhamnosus GG* Protects Against *P. Gingivalis* And *F. Nucleatum* Gut Dysbiosis. *J Int Acad Periodontol.* 2020;22:18-27.

Gatej SM, Marino V, Bright R, et al. Probiotic *Lactobacillus rhamnosus GG* prevents alveolar bone loss in a mouse model of experimental periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2018;45:204-212.

Genco RJ, Borgnakke WS. Risk factors for periodontal disease. *Periodontol 2000.* 2013;62:59-94.

- Gentschew L, Ferguson LR. Role of nutrition and microbiota in susceptibility to inflammatory bowel diseases. *Mol Nutr Food Res*. 2012;56:524-35.
- George AK, Behera J, Kelly KE, Mondal NK, Richardson KP, Tyagi N. Exercise Mitigates Alcohol Induced Endoplasmic Reticulum Stress Mediated Cognitive Impairment through ATF6-Herp Signaling. *Sci Rep*. 2018;8:5158.
- George AK, Singh M, Pushpakumar S, Homme RP, Hardin SJ, Tyagi SC. Dysbiotic 1-carbon metabolism in cardiac muscle remodeling. *J Cell Physiol*. 2020;235:2590-2598.
- Givvimani S, Qipshidze N, Tyagi N, Mishra PK, Sen U, Tyagi SC. Synergism between arrhythmia and hyperhomo-cysteinemia in structural heart disease. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol*. 2011;3(2):107-19.
- Gonzalez-Quintela A, Alonso M, Campos J, Vizcaino L, Loidi L, Gude F. Determinants of serum concentrations of lipopolysaccharide-binding protein (LBP) in the adult population: the role of obesity. *PLoS One*. 2013;8(1):e54600.
- Goulet O. Potential role of the intestinal microbiota in programming health and disease. *Nutr Rev*. 2015;73 Suppl 1:32-40.
- Graves DT, Corrêa JD, Silva TA. The Oral Microbiota Is Modified by Systemic Diseases. *J Dent Res*. 2019;98:148-156.
- Griffen AL, Beall CJ, Campbell JH, Firestone ND, Kumar PS, Yang ZK, Podar M, Leys EJ. Distinct and complex bacterial profiles in human periodontitis and health revealed by 16S pyrosequencing. *ISME J*. 2012;6:1176-85.
- Gruner D, Paris S, Schwendicke F. Probiotics for managing caries and periodontitis: Systematic review and meta-analysis. *J Dent*. 2016;48:16-25 .
- Grzech-Leśniak K, Matys J, Dominiak M. Comparison of the clinical and microbiological effects of antibiotic therapy in periodontal pockets following laser treatment: An in vivo study. *Adv Clin Exp Med*. 2018;27:1263-1270.
- Gueimonde M, Salminen S. New methods for selecting and evaluating probiotics. *Dig Liver Dis*. 2006;38 Suppl 2:S242-S247.
- Haim M, Tanne D, Goldbourt U, Doolman R, Boyko V, Brunner D, Sela BA, Behar S. Serum homocysteine and long-term risk of myocardial infarction and sudden death in patients with coronary heart disease. *Cardiology*. 2007;107(1):52-6.
- Hajishengallis G, Liang S, Payne MA, Hashim A, Jotwani R, Eskin MA, McIntosh ML, Alsam A, Kirkwood KL, Lambris JD, Darveau RP, Curtis MA. Low-abundance biofilm species orchestrates inflammatory periodontal disease through the commensal microbiota and complement. *Cell Host Microbe*. 2011;10:497-506.
- Hajishengallis G. Immune evasion strategies of *Porphyromonas gingivalis*. *J Oral Biosci*. 2011;53:233-240.
- Hajishengallis G. Periodontitis: from microbial immune subversion to systemic inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2015;15:30-44.

- Hamilton JA, Hasturk H, Kantarci A, Serhan CN, Van Dyke T. Atherosclerosis, Periodontal Disease, and Treatment with Resolvins. *Curr Atheroscler Rep*. 2017;19:57.
- Hankey GJ, Eikelboom JW. Homocysteine and vascular disease. *Lancet*. 1999;354:407-13.
- Hart TC, Hart PS, Bowden DW, et al. Mutations of the cathepsin C gene are responsible for Papillon-Lefevre syndrome. *J Med Genet*. 1999;36:881-87.
- Hart TC, Hart PS, Michalec MD, et al. Haim-Munk syndrome and Papillon-Lefevre syndrome are allelic mutations in cathepsin C. *J Med Genet*. 2000;37:88-94.
- He C, Cheng D, Peng C, Li Y, Zhu Y, Lu N. High-Fat Diet Induces Dysbiosis of Gastric Microbiota Prior to Gut Microbiota in Association With Metabolic Disorders in Mice. *Front Microbiol*. 2018;9:639.
- Heinz J, Kropf S, Luley C, Dierkes J. Homocysteine as a risk factor for cardiovascular disease in patients treated by dialysis: a meta-analysis. *Am J Kidney Dis*. 2009;54:478-89.
- Herbert BA, Novince CM, Kirkwood KL. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, a potent immunoregulator of the periodontal host defense system and alveolar bone homeostasis. *Mol Oral Microbiol*. 2016;31:207-27.
- Herrmann M, Tami A, Wildemann B, Wolny M, Wagner A, Schorr H, Taban-Shomal O, Umanskaya N, Ross S, Garcia P, Hübner U, Herrmann W. Hyperhomocysteinemia induces a tissue specific accumulation of homocysteine in bone by collagen binding and adversely affects bone. *Bone*. 2009;44:467-75.
- Hersoug LG, Møller P, Loft S. Role of microbiota-derived lipopolysaccharide in adipose tissue inflammation, adipocyte size and pyroptosis during obesity. *Nutr Res Rev*. 2018;31:153-163.
- Hiyari S, Atti E, Camargo PM, et al. Heritability of periodontal bone loss in mice. *J Periodontol Res*. 2015;50:730-736.
- Huang R, Ning H, Shen M, Li J, Zhang J, Chen X. Probiotics for the treatment of atopic dermatitis in children: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Front Cell Infect Microbiol* 2017;7:392.
- Hubacek JA, Pitha J, Skodová Z, Adámková V, Podrapska I, Schmitz G, Poledne R. Polymorphisms in the lipopolysaccharide-binding protein and bactericidal/permeability-increasing protein in patients with myocardial infarction. *Clin Chem Lab Med*. 2002;40(11):1097-100.
- Hunt MJ, Tyagi SC. Peroxisome proliferators compete and ameliorate Hcy-mediated endothelial cell activation. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2002;283(4):C1073-9.
- Hutter G, Schlagenhaut U, Valenza G, Horn M, Burgemeister S, Claus H, Vogel U. Molecular analysis of bacteria in periodontitis: evaluation of clone libraries, novel phylotypes and putative pathogens. *Microbiology (Reading)*. 2003;149:67-75.
- İnce G, Gürsoy H, İpçi ŞD, Cakar G, Emekli-Alturfan E, Yılmaz S. Clinical and Biochemical Evaluation of Lozenges Containing *Lactobacillus reuteri* as an Adjunct to

- Non-Surgical Periodontal Therapy in Chronic Periodontitis. *J Periodontol.* 2015;86:746-54.
- Jakubowski H. Homocysteine thiolactone: metabolic origin and protein homocysteinylation in humans. *J Nutr.* 2000;130:377S-381S.
- Jandhyala SM, Talukdar R, Subramanyam C, Vuyyuru H, Sasikala M, Nageshwar Reddy D. Role of the normal gut microbiota. *World J Gastroenterol.* 2015;21(29):8787-803.
- Jia X, Jia L, Mo L, Yuan S, Zheng X, He J, Chen V, Guo Q, Zheng L, Yuan Q, Xu X, Zhou X. Berberine Ameliorates Periodontal Bone Loss by Regulating Gut Microbiota. *J Dent Res.* 2019;98(1):107-116.
- Jiang Q, Kainulainen V, Stamatova I, Korpela R, Meurman JH. *Lactobacillus rhamnosus* GG in Experimental Oral Biofilms Exposed to Different Carbohydrate Sources. *Caries Res.* 2018;52:220-229.
- Jin J, Zhang X, Lu Z, Perry DM, Li Y, Russo SB, Cowart LA, Hannun YA, Huang Y. Acid sphingomyelinase plays a key role in palmitic acid-amplified inflammatory signaling triggered by lipopolysaccharide at low concentrations in macrophages. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2013;305:E853-67.
- Jones DB, Niendorff WJ, Broderick EB. A review of the oral health of American Indian and Alaska Native elders. *J Public Health Dent.* 2000;60 Suppl 1:256-60.
- Jorjão AL, de Oliveira FE, Leão MV, Carvalho CA, Jorge AO, de Oliveira LD. Live and Heat-Killed *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 May Induce Modulatory Cytokines Profiles on Macrophages RAW 264.7. *ScientificWorldJournal.* 2015;2015:716749.
- Joseph R, Nath SG, Joseraj MG. Elevated plasma homocysteine levels in chronic periodontitis: a hospital-based case-control study. *J Periodontol.* 2011;82:439-44.
- Kadowaki T, Nakayama K, Okamoto K, Abe N, Baba A, Shi Y, Ratnayake DB, Yamamoto K. *Porphyromonas gingivalis* proteinases as virulence determinants in progression of periodontal diseases. *J Biochem.* 2000;128:153-9.
- Kapferer-Seebacher I, Pepin M, et al. Periodontal Ehlers-Danlos Syndrome Is Caused by Mutations in C1R and C1S, which Encode Subcomponents C1r and C1s of Complement. *Am J Hum Genet.* 2016;99(5):1005-1014.
- Kaplan J, De Domenico I, Ward DM. Chediak-Higashi syndrome. *Curr Opin Hematol.* 2008;15(1):22-9.
- Kato H, Taguchi Y, Tominaga K, Umeda M, Tanaka A. *Porphyromonas gingivalis* LPS inhibits osteoblastic differentiation and promotes pro-inflammatory cytokine production in human periodontal ligament stem cells. *Arch Oral Biol.* 2014;59:167-75.
- Khalaf H, Nakka SS, Sandén C, Svärd A, Hulténby K, Scherbak N, Aili D, Bengtsson T. Antibacterial effects of *Lactobacillus* and bacteriocin PLNC8 $\alpha\beta$ on the periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis*. *BMC Microbiol.* 2016;16:188.
- Kim DJ, Koh JM, Lee O, Kim NJ, Lee YS, Kim YS, Park JY, Lee KU, Kim GS. Homocysteine enhances apoptosis in human bone marrow stromal cells. *Bone.* 2006;39:582-90.

Kinane DF, Stathopoulou PG, Papapanou PN. Periodontal diseases. *Nat Rev Dis Primers*. 2017;3:17038.

Kinane DF. Causation and pathogenesis of periodontal disease. *Periodontol* 2000. 2001;25:8-20.

Kirkwood KL, Cirelli JA, Rogers JE, Giannobile WV. Novel host response therapeutic approaches to treat periodontal diseases. *Periodontol* 2000. 2007;43:294-315.

Kirkwood KL, Taba MJr, Rossa CJr, Preshaw PM, Giannobile WV. Molecular biology of the host-microbe interaction in periodontal diseases: selected topics. In Newman MG, Takei HH, Klokkevold PR, Carranza FA eds. *Carranza's Clinical Periodontology* 10th ed. St. Louis:Saunders Elsevier, 2006;259-274.

Knapp S, de Vos AF, Florquin S, Golenbock DT, van der Poll T. Lipopolysaccharide binding protein is an essential component of the innate immune response to *Escherichia coli* peritonitis in mice. *Infect Immun*. 2003;71(12):6747-53.

Knol J, Scholtens P, Kafka C, et al. Colon microflora in infants fed formula with galacto- and fructo-oligosaccharides: more like breast-fed infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2005;40:36-42.

Koh JM, Lee YS, Kim YS, Kim DJ, Kim HH, Park JY, Lee KU, Kim GS. Homocysteine enhances bone resorption by stimulation of osteoclast formation and activity through increased intracellular ROS generation. *J Bone Miner Res*. 2006;21:1003-11.

Komaki M. Pericytes in the Periodontal Ligament. *Adv Exp Med Biol*. 2019;1122:169-186.

Kondo K, Ishikado A, Morino K, Nishio Y, Ugi S, Kajiwara S, et al. A high-fiber, low-fat diet improves periodontal disease markers in high-risk subjects: a pilot study. *Nutr Res*. 2014;34(6):491-8.

Kornman KS, Crane A, Wang HY, et al. The interleukin-1 genotype as a severity factor in adult periodontal disease. *J Clin Periodontol*. 1997;24:72-77.

Kozich JJ, Westcott SL, Baxter NT, Highlander SK, Schloss PD. Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the MiSeq Illumina sequencing platform. *Appl Environ Microbiol*. 2013;79:5112-5120.

Kretsch MJ, Sauberlich HE, Newbrun E. Electroencephalographic changes and periodontal status during short-term vitamin B-6 depletion of young, nonpregnant women. *Am J Clin Nutr*. 1991;53:1266-74.

Kristoffersen T, Bang G. Periodontal disease and oral hygiene in an Alaskan Eskimo population. *J Dent Res*. 1973;52:791-6.

Krzyściak W, Kościelniak D, Papież M, et al. Effect of a *Lactobacillus Salivarius* Probiotic on a Double-Species *Streptococcus Mutans* and *Candida Albicans* Caries Biofilm. *Nutrients*. 2017;9:1242.

Lazzerini PE, Capecci PL, Selvi E, Lorenzini S, Bisogno S, Galeazzi M, Laghi Pasini F. Hyperhomocysteinemia, inflammation and autoimmunity. *Autoimmun Rev*. 2007;6:503-9.

- Li H, Zhong X, Li W, Wang Q. Effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on experimental periodontitis and AhR/NF- κ B/NLRP3 inflammasome pathway in a mouse model. *J Appl Oral Sci.* 2019;27:e20180713.
- Li Y, Lu Z, Zhang X, Yu H, Kirkwood KL, Lopes-Virella MF, Huang Y. Metabolic syndrome exacerbates inflammation and bone loss in periodontitis. *J Dent Res.* 2015;94:362-70.
- Lian J, Wu X, Liu Y, Qiu W, Zhu X, Wang X, Meng S, Valverde P, Steffensen B, Tu Q, Pan J, Chen J. Potential roles of miR-335-5p on pathogenesis of experimental periodontitis. *J Periodontal Res.* 2020;55:191-198.
- Liccardo D, Cannavo A, Spagnuolo G, Ferrara N, Cittadini A, Rengo C, Rengo G. Periodontal Disease: A Risk Factor for Diabetes and Cardiovascular Disease. *Int J Mol Sci.* 2019;20:1414.
- Lin PW, Myers LE, Ray L, et al. Lactobacillus rhamnosus blocks inflammatory signaling in vivo via reactive oxygen species generation. *Free Radic Biol Med.* 2009;47:1205-1211.
- Lominadze D, Roberts AM, Tyagi N, Moshal KS, Tyagi SC. Homocysteine causes cerebrovascular leakage in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2006;290:H1206-13.
- Lopes MP, Cruz ÁA, Xavier MT, Stöcker A, Carvalho-Filho P, Miranda PM, Meyer RJ, Soledade KR, Gomes-Filho IS, Trindade SC. Prevotella intermedia and periodontitis are associated with severe asthma. *J Periodontol.* 2020;91:46-54.
- Lozupone CA, Stombaugh JI, Gordon JI, Jansson JK, Knight R. Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature.* 2012;489:220-30.
- Maekawa T, Hajishengallis G. Topical treatment with probiotic Lactobacillus brevis CD2 inhibits experimental periodontal inflammation and bone loss. *J Periodontal Res.* 2014;49(6):785-91.
- Mariat D, Firmesse O, Levenez F, Guimarães V, Sokol H, Doré J, Corthier G, Furet JP. The Firmicutes/Bacteroidetes ratio of the human microbiota changes with age. *BMC Microbiol.* 2009;9:123.
- Marsh PD, Bradshaw DJ. Dental plaque as a biofilm. *J Ind Microbiol.* 1995;15:169-75.
- McCarty MF. Increased homocyst(e)ine associated with smoking, chronic inflammation, and aging may reflect acute-phase induction of pyridoxal phosphatase activity. *Med Hypotheses.* 2000;55:289-93.
- McCully KS. Vascular pathology of homocysteinemia: implications for the pathogenesis of arteriosclerosis. *Am J Pathol.* 1969;56:111-28
- McFarland LV. Meta-analysis of probiotics for the prevention of antibiotic associated diarrhea and the treatment of Clostridium difficile disease. *Am J Gastroenterol.* 2006;101:812-22.
- Merchant AT, Pitiphat W, Franz M, Joshipura KJ. Whole-grain and fiber intakes and periodontitis risk in men. *Am J Clin Nutr.* 2006;83(6):1395-400.

- Meropol SB, Edwards A. Development of the infant intestinal microbiome: A bird's eye view of a complex process. *Birth Defects Res C Embryo Today*. 2015;105:228-39.
- Messora MR, Oliveira LF, Foureaux RC, et al. Probiotic therapy reduces periodontal tissue destruction and improves the intestinal morphology in rats with ligature-induced periodontitis. *J Periodontol*. 2013;84:1818-1826.
- Michalowicz BS, Aeppli DP, Kuba RK, et al. A twin study of genetic variation in proportional radiographic alveolar bone height. *J Dent Res*. 1991;70:1431-35.
- Michalowicz BS, Diehl SR, Gunsolley JC, et al. Evidence of a substantial genetic basis for risk of adult periodontitis. *J Periodontol*. 2000;71:1699-707.
- Mitra R, Qiao J, Madhavan S, O'Neil GL, Ritchie B, Kulkarni P, Sridhar S, van de Ven AL, Kemmerling EMC, Ferris C, Hamilton JA, Ebong EE. The comparative effects of high fat diet or disturbed blood flow on glycocalyx integrity and vascular inflammation. *Transl Med Commun*. 2018;3:10.
- Moghadam SA, Shirzaiy M, Risbaf S. The Associations between Periodontitis and Respiratory Disease. *J Nepal Health Res Counc*. 2017;15:1-6.
- Mombelli A. Microbial colonization of the periodontal pocket and its significance for periodontal therapy. *Periodontol 2000*. 2018;76:85-96.
- Moon Y. Microbiome-Linked Crosstalk in the Gastrointestinal Exposome towards Host Health and Disease. *Pediatr Gastroenterol Hepatol Nutr*. 2016;19:221-228.
- Moura-Grec PG, Marsicano JA, Carvalho CA, Sales-Peres SH. Obesity and periodontitis: systematic review and meta-analysis. *Cien Saude Colet*. 2014;19(6):1763-72.
- Moynihan P, Petersen PE. Diet, nutrition and the prevention of dental diseases. *Public Health Nutr*. 2004;7:201-26.
- Muluke M, Gold T, Kiefhaber K, Al-Sahli A, Celenti R, Jiang H, Cremers S, Van Dyke T, Schulze-Späte U. Diet-Induced Obesity and Its Differential Impact on Periodontal Bone Loss. *J Dent Res*. 2016 ;95(2):223-9.
- Münch NS, Fang HY, Ingermann J, et al. High-Fat Diet Accelerates Carcinogenesis in a Mouse Model of Barrett's Esophagus via Interleukin 8 and Alterations to the Gut Microbiome. *Gastroenterology*. 2019;157:492-506.e2.
- Murphy EA, Velazquez KT, Herbert KM. Influence of high-fat diet on gut microbiota: a driving force for chronic disease risk. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2015;18(5):515-20.
- Mysak J, Podzimek S, Sommerova P, Lyuya-Mi Y, Bartova J, Janatova T, Prochazkova J, Duskova J. *Porphyromonas gingivalis*: major periodontopathic pathogen overview. *J Immunol Res*. 2014;2014:476068.
- Nackaerts O, Jacobs R, Quirynen M, Rober M, Sun Y, Teughels W. Replacement therapy for periodontitis: pilot radiographic evaluation in a dog model. *J Clin Periodontol*. 2008;35:1048-1052.

- Nanci A, Bosshardt DD. Structure of periodontal tissues in health and disease. *Periodontol 2000*. 2006;40:11-28.
- Nascimento GG, Leite FR, Do LG, Peres KG, Correa MB, Demarco FF, Peres MA. Is weight gain associated with the incidence of periodontitis? A systematic review and meta-analysis. *J Clin Periodontol*. 2015;42(6):495-505.
- Neiva RF, Al-Shammari K, Nociti FH Jr, Soehren S, Wang HL. Effects of vitamin-B complex supplementation on periodontal wound healing. *J Periodontol*. 2005;76:1084-91.
- Nguyen CM, Kim JW, Quan VH, Nguyen BH, Tran SD. Periodontal associations in cardiovascular diseases: The latest evidence and understanding. *J Oral Biol Craniofac Res*. 2015;5:203-6.
- Niederman R, Buyle-Bodin Y, Lu BY, Robinson P, Naleway C. Short-chain carboxylic acid concentration in human gingival crevicular fluid. *J Dent Res*. 1997;76(1):575-9.
- Nikitakis NG, Papaioannou W, Sakkas LI, Kousvelari E. The autoimmunity-oral microbiome connection. *Oral Dis*. 2017;23:828-839.
- Niro A, Sborgia G, Sborgia A, Alessio G. Hyperhomocysteinemia in bilateral anterior ischemic optic neuropathy after conventional coronary artery bypass graft: a case report. *J Med Case Rep*. 2018;12:11.
- Ohsugi Y, Nagashima Y, Nakatsu S, Sato K, Chiba A, Fujinaka H, Yano Y, Niki Y. Age-related changes in gingival blood flow parameters measured using laser speckle flowmetry. *Microvasc Res*. 2019;122:6-12.
- Olsen I, Taubman MA, Singhrao SK. *Porphyromonas gingivalis* suppresses adaptive immunity in periodontitis, atherosclerosis, and Alzheimer's disease. *J Oral Microbiol*. 2016;8:33029.
- Olsen T, Øvrebø B, Turner C, Bastani NE, Refsum H, Vinknes KJ. Combining Dietary Sulfur Amino Acid Restriction with Polyunsaturated Fatty Acid Intake in Humans: A Randomized Controlled Pilot Trial. *Nutrients*. 2018;10:1822.
- Ortiz-Lucas M, Tobias A, Saz P, Sebastian JJ. Effect of probiotic species on irritable bowel syndrome symptoms: A bring up to date meta-analysis. *Rev Esp Enferm Dig* 2013;105:19-36.
- Ozçaka O, Nalbantsoy A, Bıçakçı N, Köse T, Buduneli N. Plasma levels of C-telopeptide pyridinoline cross-links of type I collagen and osteocalcin in chronic periodontitis. *Inflammation*. 2011;34:203-208.
- Pacios S, Kang J, Galicia J, Gluck K, Patel H, Ovaydi-Mandel A, Petrov S, Alawi F, Graves DT. Diabetes aggravates periodontitis by limiting repair through enhanced inflammation. *FASEB J*. 2012;26(4):1423-30.
- Palaska I, Gagari E, Theoharides TC. The effects of *P. gingivalis* and *E. coli* LPS on the expression of proinflammatory mediators in human mast cells and their relevance to periodontal disease. *J Biol Regul Homeost Agents*. 2016;30:655-664.
- Palmer C, Bik EM, DiGiulio DB, Relman DA, Brown PO. Development of the human infant intestinal microbiota. *PLoS Biol*. 2007;5:e177.

- Papizadeh M, Nahrevanian H, Rohani M, Hosseini SN, Shojaosadati SA. Lactobacillus rhamnosus Gorbach-Goldin (GG): A Top Well-Researched Probiotic Strain. *J Med Bacteriol.* 2016;5:pp.46-59.
- Payne MA, Hashim A, Alsam A, Joseph S, Aduse-Opoku J, Wade WG, Curtis MA. Horizontal and Vertical Transfer of Oral Microbial Dysbiosis and Periodontal Disease. *J Dent Res.* 2019;98:1503-1510.
- Pihlstrom BL, Michalowicz BS, Johnson NW. Periodontal diseases. *Lancet.* 2005;366:1809-20.
- Pizzolo F, Blom HJ, Choi SW, Girelli D, Guarini P, Martinelli N, Stanzial AM, Corrocher R, Olivieri O, Friso S. Folic acid effects on s-adenosylmethionine, s-adenosylhomocysteine, and DNA methylation in patients with intermediate hyperhomocysteinemia. *J Am Coll Nutr.* 2011;30:11-8.
- Poole S, Singhrao SK, Kesavalu L, Curtis MA, Crean S. Determining the presence of periodontopathic virulence factors in short-term postmortem Alzheimer's disease brain tissue. *J Alzheimers Dis.* 2013;36(4):665-77.
- Potter GD, Cade JE, Grant PJ, Hardie LJ. Nutrition and the circadian system. *Br J Nutr.* 2016;116:434-42.
- Pushpakumar S, Kundu S, Narayanan N, Sen U. DNA hypermethylation in hyperhomocysteinemia contributes to abnormal extracellular matrix metabolism in the kidney. *FASEB J.* 2015;29(11):4713-25.
- Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, Nielsen T, Pons N, Levenez F, Yamada T, Mende DR, Li J, Xu J, Li S, Li D, Cao J, et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature.* 2010;464:59-65.
- Qiqiang L, Huanxin M, Xuejun G. Longitudinal study of volatile fatty acids in the gingival crevicular fluid of patients with periodontitis before and after nonsurgical therapy. *J Periodontal Res.* 2012;47(6):740-9.
- Rajakaruna GA, Negi M, Uchida K, et al. Localization and density of Porphyromonas gingivalis and Tannerella forsythia in gingival and subgingival granulation tissues affected by chronic or aggressive periodontitis. *Sci Rep.* 2018;8:9507.
- Rezende Yanagihara G, Carminati Shimano R, Atsuko Tida J, Suzuki Yamanaka J, Yasuyo Fukada S, Mardegan Issa JP, Shimano AC, Tavares JM. Influence of High-Fat Diet on Bone Tissue: An Experimental Study in Growing Rats. *J Nutr Health Aging.* 2017;21(10):1337-1343.
- Rhemrev GE, Timmerman MF, Veldkamp I, Van Winkelhoff AJ and Van der Velden U. Immediate effect of instrumentation on the subgingival microflora in deep inflamed pockets under strict plaque control. *Journal of Clinical Periodontology* 2006;33:42-48.
- Riccia DN, Bizzini F, Perilli MG, et al. Anti-inflammatory effects of Lactobacillus brevis (CD2) on periodontal disease. *Oral Dis.* 2007;13:376-385.

- Rodrigues SF, Granger DN. Blood cells and endothelial barrier function. *Tissue Barriers*. 2015;3:e978720.
- Rosenthal G.A. *Plant Nonprotein Amino and Imino Acids*. Academic Press; New York, NY, USA: 1982. p. 272.
- Salminen A, Gursoy UK, Paju S, Hyvärinen K, Mäntylä P, Buhlin K, Könönen E, Nieminen MS, Sorsa T, Sinisalo J, Pussinen PJ. Salivary biomarkers of bacterial burden, inflammatory response, and tissue destruction in periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2014;41:442-50.
- Sanchez M, Darimont C, Drapeau V, Emady-Azar S, Lepage M, Rezzonico E, et al. Effect of *Lactobacillus rhamnosus* CGMCC1.3724 supplementation on weight loss and maintenance in obese men and women. *Br J Nutr* 2014;111:1507-19.
- Schalinske KL, Smazal AL. Homocysteine imbalance: a pathological metabolic marker. *Adv Nutr*. 2012;3:755-62.
- Schnadower D, Tarr PI, Casper TC, Gorelick MH, Dean JM, O'Connell KJ, et al. *Lactobacillus rhamnosus* GG versus Placebo for Acute Gastroenteritis in Children. *N Engl J Med* 2018;379:2002-14.
- Schroecksadel K, Frick B, Kaser S, Wirleitner B, Ledochowski M, Mur E, Herold M, Fuchs D. Moderate hyperhomocysteinaemia and immune activation in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Chim Acta*. 2003;338:157-64.
- Schroecksadel K, Frick B, Wirleitner B, Winkler C, Schennach H, Fuchs D. Moderate hyperhomocysteinemia and immune activation. *Curr Pharm Biotechnol*. 2004;5:107-18.
- Schroeder BO, Bäckhed F. Signals from the gut microbiota to distant organs in physiology and disease. *Nat Med*. 2016;22:1079-1089.
- Schroeder HE, Listgarten MA. The gingival tissues: the architecture of periodontal protection. *Periodontol* 2000. 1997;13:91-120.
- Schromm AB, Lien E, Henneke P, Chow JC, Yoshimura A, Heine H, Latz E, Monks BG, Schwartz DA, Miyake K, Golenbock DT. Molecular genetic analysis of an endotoxin nonresponder mutant cell line: a point mutation in a conserved region of MD-2 abolishes endotoxin-induced signaling. *J Exp Med*. 2001;194(1):79-88.
- Schumann RR, Kirschning CJ, Unbehauen A, Aberle HP, Knope HP, Lamping N, Ulevitch RJ, Herrmann F. The lipopolysaccharide-binding protein is a secretory class 1 acute-phase protein whose gene is transcriptionally activated by APRF/STAT/3 and other cytokine-inducible nuclear proteins. *Mol Cell Biol*. 1996;16(7):3490-503.
- Schumann RR, Latz E. Lipopolysaccharide-binding protein. *Chem Immunol*. 2000;74:42-60.
- Semenkovich CF, Danska J, Darsow T, Dunne JL, Huttenhower C, Insel RA, McElvaine AT, Ratner RE, Shuldiner AR, Blaser MJ. American Diabetes Association and JDRF Research Symposium: Diabetes and the Microbiome. *Diabetes*. 2015;64(12):3967-77.

Semenoff TA, Semenoff-Segundo A, Bosco AF, Nagata MJ, Garcia VG, Biasoli ER. Histometric analysis of ligature-induced periodontitis in rats: a comparison of histological section planes. *J Appl Oral Sci.* 2008;16(4):251-6.

Sen U, Basu P, Abe OA, Givvimani S, Tyagi N, Metreveli N, Shah KS, Passmore JC, Tyagi SC. Hydrogen sulfide ameliorates hyperhomocysteinemia-associated chronic renal failure. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2009;297:F410-9.

Shimizu M, Hashiguchi M, Shiga T, Tamura HO, Mochizuki M. Meta-analysis: effects of probiotic supplementation on lipid profiles in normal to mildly hypercholesterolemic individuals. *PLoS One* 2015;10:e0139795.

Siniscalchi A, Gallelli L, Mercuri NB, Ibbadu GF, De Sarro G. Role of lifestyle factors on plasma homocysteine levels in Parkinson's disease patients treated with levodopa. *Nutr Neurosci.* 2006;9:11-6.

Slawik S, Staufenbiel I, Schilke R, Nicksch S, Weinspach K, Stiesch M, Eberhard J. Probiotics affect the clinical inflammatory parameters of experimental gingivitis in humans. *Eur J Clin Nutr.* 2011;65:857-63.

Slots J. Periodontitis: facts, fallacies and the future. *Periodontol 2000.* 2017;75:7-23.

Smith AD, Smith SM, de Jager CA, Whitbread P, Johnston C, Agacinski G, Oulhaj A, Bradley KM, Jacoby R, Refsum H. Homocysteine-lowering by B vitamins slows the rate of accelerated brain atrophy in mild cognitive impairment: a randomized controlled trial. *PLoS One.* 2010;5(9):e12244.

Snoek-van Beurden PA, Von den Hoff JW. Zymographic techniques for the analysis of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Biotechniques.* 2005;38:73-83.

Soolari AS, Champagne C, Punzi JS, Amar S, Van Dyke TE. Serum modulation of neutrophil response to *Porphyromonas gingivalis* LPS in periodontal disease. *J Int Acad Periodontol.* 1999;1(4):101-9.

Spinler JK, Auchtung J, Brown A, et al. Next-Generation Probiotics Targeting *Clostridium difficile* through Precursor-Directed Antimicrobial Biosynthesis. *Infect Immun.* 2017;85:e00303-17.

Steffensen B, Wallon UM, Overall CM. Extracellular matrix binding properties of recombinant fibronectin type II-like modules of human 72-kDa gelatinase/type IV collagenase. High affinity binding to native type I collagen but not native type IV collagen. *J Biol Chem.* 1995;270:11555-66.

Susin C, Rösing CK. Effect of variable moderate chronic stress on ligature-induced periodontal disease in Wistar rats. *Acta Odontol Scand.* 2003;61(5):273-7.

Suzuki N, Yoneda M, Hirofuji T. Mixed red-complex bacterial infection in periodontitis. *Int J Dent.* 2013;2013:587279.

Szajewska H, Kolodziej M. Systematic review with meta-analysis: *Saccharomyces boulardii* in the prevention of antibiotic-associated diarrhoea. *Aliment Pharmacol Ther* 2015;42:793-801.

- Szkaradkiewicz AK, Stopa J, Karpiński TM. Effect of oral administration involving a probiotic strain of *Lactobacillus reuteri* on pro-inflammatory cytokine response in patients with chronic periodontitis. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2014;62:495-500.
- Takigawa S, Sugano N, Nishihara R, Koshi R, Murai M, Yoshinuma N, Ochiai K, Ito K. The effect of butyric acid on adhesion molecule expression by human gingival epithelial cells. *J Periodontal Res*. 2008;43(4):386-90.
- Tanguturi SC, Nagarakanti S. Polycystic Ovary Syndrome and Periodontal disease: Underlying Links- A Review. *Indian J Endocrinol Metab*. 2018;22:267-273.
- Taylor GW, Burt BA, Becker MP, Genco RJ, Shlossman M, Knowler WC, Pettitt DJ. Non-insulin dependent diabetes mellitus and alveolar bone loss progression over 2 years. *J Periodontol*. 1998;69(1):76-83.
- Teughels W, Durukan A, Ozcelik O, Pauwels M, Quirynen M, Haytac MC. Clinical and microbiological effects of *Lactobacillus reuteri* probiotics in the treatment of chronic periodontitis: a randomized placebo-controlled study. *J Clin Periodontol*. 2013;40:1025-1035.
- Teughels W, Newman MG, Coucke W, et al. Guiding periodontal pocket recolonization: a proof of concept. *J Dent Res*. 2007;86:1078-1082.
- Thaler R, Agsten M, Spitzer S, Paschalis EP, Karlic H, Klaushofer K, Varga F. Homocysteine suppresses the expression of the collagen cross-linker lysyl oxidase involving IL-6, Fli1, and epigenetic DNA methylation. *J Biol Chem*. 2011;286:5578-88.
- Tinelli C, Di Pino A, Ficulle E, Marcelli S, Feligioni M. Hyperhomocysteinemia as a Risk Factor and Potential Nutraceutical Target for Certain Pathologies. *Front Nutr*. 2019;6:49.
- Tobias PS, Mathison J, Mintz D, Lee JD, Kravchenko V, Kato K, Pugin J, Ulevitch RJ. Participation of lipopolysaccharide-binding protein in lipopolysaccharide-dependent macrophage activation. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1992;7(3):239-45.
- Toiviainen A, Jalasvuori H, Lahti E, et al. Impact of orally administered lozenges with *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 on the number of salivary mutans streptococci, amount of plaque, gingival inflammation and the oral microbiome in healthy adults. *Clin Oral Investig*. 2015;19:77-83.
- Toomes C, James J, Wood AJ, et al. Loss-of-function mutations in the cathepsin C gene result in periodontal disease and palmoplantar keratosis. *Nat Genet*. 1999;23: 421–24.
- Torres J, Mehandru S, Colombel JF, Peyrin-Biroulet L. Crohn's disease. *Lancet*. 2017;389:1741-1755.
- Torres-Iberico R, Condori-Fernández Y, Apagüño-Ruiz C, Andia-Ticona M, Pomar-Morante R. Kindler Syndrome: A Multidisciplinary Management Approach. *Actas Dermosifiliogr*. 2020;111(9):775-780. English, Spanish. doi: 10.1016/j.ad.2019.04.013.
- Tyagi N, Moshal KS, Sen U, et al. H₂S protects against methionine-induced oxidative stress in brain endothelial cells. *Antioxid Redox Signal*. 2009;11:25-33.

- Vacek TP, Kalani A, Voor MJ, Tyagi SC, Tyagi N. The role of homocysteine in bone remodeling. *Clin Chem Lab Med.* 2013;51:579-90.
- Vartoukian SR, Palmer RM, Wade WG. Diversity and morphology of members of the phylum "synergistetes" in periodontal health and disease. *Appl Environ Microbiol.* 2009;75:3777-86.
- Veeranki S, Tyagi SC. Dysbiosis and Disease: Many Unknown Ends, Is It Time to Formulate Guidelines for Dysbiosis Research? *J Cell Physiol.* 2017;232:2929-2930.
- Vernal R, Díaz-Zúñiga J, Melgar-Rodríguez S, Pujol M, Diaz-Guerra E, Silva A, Sanz M, Garcia-Sanz JA. Activation of RANKL-induced osteoclasts and memory T lymphocytes by *Porphyromonas gingivalis* is serotype dependant. *J Clin Periodontol.* 2014;41:451-9.
- Veronesi F, Borsari V, Sartori M, Orciani M, Mattioli-Belmonte M, Fini M. The use of cell conditioned medium for musculoskeletal tissue regeneration. *J Cell Physiol.* 2018;233:4423-4442.
- Vieira Colombo AP, Magalhães CB, Hartenbach FA, Martins do Souto R, Maciel da Silva-Boghossian C. Periodontal-disease-associated biofilm: A reservoir for pathogens of medical importance. *Microb Pathog.* 2016;94:27-34.
- Virto L, Cano P, Jiménez-Ortega V, Fernández-Mateos P, González J, Esquifino AI, Sanz M. Obesity and periodontitis: An experimental study to evaluate periodontal and systemic effects of comorbidity. *J Periodontol.* 2018;89:176-185.
- Vreugdenhil AC, Dentener MA, Snoek AM, Greve JW, Buurman WA. Lipopolysaccharide binding protein and serum amyloid A secretion by human intestinal epithelial cells during the acute phase response. *J Immunol.* 1999;163(5):2792-8.
- Wällberg-Jonsson S, Cvetkovic JT, Sundqvist KG, Lefvert AK, Rantapää-Dahlqvist S. Activation of the immune system and inflammatory activity in relation to markers of atherothrombotic disease and atherosclerosis in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 2002;29:875-82.
- Wang C, Wang J, Chen K, Pang H, Li X, Zhu J, Ma Y, Qiu T, Li W, Xie J, Zhang J. Caprylic acid (C8:0) promotes bone metastasis of prostate cancer by dysregulated adipogenic balance in bone marrow. *Cancer Sci.* 2020;111(10):3600-3612.
- Warnecke PM, Bestor TH. Cytosine methylation and human cancer. *Curr Opin Oncol.* 2000;12:68-73.
- Wei L, Yue F, Xing L, Wu S, Shi Y, Li J, Xiang X, Lam SM, Shui G, Russell R, Zhang D. Constant Light Exposure Alters Gut Microbiota and Promotes the Progression of Steatohepatitis in High Fat Diet Rats. *Front Microbiol.* 2020;11:1975.
- Wilde DW, Massey KD, Walker GK, Vollmer A, Grekin RJ. High-fat diet elevates blood pressure and cerebrovascular muscle Ca(2+) current. *Hypertension.* 2000;35:832-7.
- Woese CR, Olsen GJ, Ibba M, Söll D. Aminoacyl-tRNA synthetases, the genetic code, and the evolutionary process. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2000;64:202-36.

Wohlfeil M, Scharf S, Siegelin Y, Schacher B, Oremek GM, Sauer-Eppel H, Schubert R, Eickholz P. Increased systemic elastase and C-reactive protein in aggressive periodontitis (CLOI-D-00160R2). *Clin Oral Investig.* 2012;16(4):1199-207.

World Health Organization. Fact Sheet Number 318. April 2012. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs318/en/> 2012; [accessed 11/12/2015].

Wurfel MM, Monks BG, Ingalls RR, Dedrick RL, Delude R, Zhou D, Lamping N, Schumann RR, Thieringer R, Fenton MJ, Wright SD, Golenbock D. Targeted deletion of the lipopolysaccharide (LPS)-binding protein gene leads to profound suppression of LPS responses *ex vivo*, whereas *in vivo* responses remain intact. *J Exp Med.* 1997;186(12):2051-6.

Yost S, Duran-Pinedo AE. The contribution of *Tannerella forsythia* dipeptidyl aminopeptidase IV in the breakdown of collagen. *Mol Oral Microbiol.* 2018;33:407-419.

Yu XL, Chan Y, Zhuang L, Lai HC, Lang NP, Keung Leung W, Watt RM. Intra-oral single-site comparisons of periodontal and peri-implant microbiota in health and disease. *Clin Oral Implants Res.* 2019;30(8):760-776.

Yuan W, Ma C, Zhou Y, Wang M, Zeng G, Huang Q. Negative regulation of eNOS-NO signaling by over-SUMOylation of PPAR γ contributes to insulin resistance and dysfunction of vascular endothelium in rats. *Vascul Pharmacol.* 2019;122-123:106597.

Zhang HP, Wang YH, Cao CJ, Yang XM, Ma SC, Han XB, Yang XL, Yang AN, Tian J, Xu H, Zhang MH, Jiang YD. A regulatory circuit involving miR-143 and DNMT3a mediates vascular smooth muscle cell proliferation induced by homocysteine. *Mol Med Rep.* 2016;13:483-90.

Zhang J, Yu C, Zhang X, Chen H, Dong J, Lu W, Song Z, Zhou W. *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide induces cognitive dysfunction, mediated by neuronal inflammation via activation of the TLR4 signaling pathway in C57BL/6 mice. *J Neuroinflammation.* 2018;15:37.

Zhang YJ, Li S, Gan RY, Zhou T, Xu DP, Li HB. Impacts of gut bacteria on human health and diseases. *Int J Mol Sci.* 2015;16:7493-7519.

БИОГРАФИЈА

Др Драгана Станишић, рођена је 10. септембра 1992. године у Урошевцу, Република Србија. Основну школу „Нада Поповић” и средњу „Медицинску школу“ завршила је у Крушевцу. Школске 2011/2012. године уписала је Интегрисане академске студије стоматологије на Медицинском факултету, Универзитета у Нишу који је завршила 2017. године са просечном оценом 9,05. Докторске академске студије уписала је на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу школске 2017/2018. године, изборно подручје Истраживања у стоматологији. Од 2017. године је запошљена на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, као клинички асистент за ужу научну област Пародонтологија и орална медицина, а од 2019. године као истраживач приправник за ужу научну област Пародонтологија и орална медицина. Специјализацију из Пародонтологије и оралне медицине уписала је 2018. године на Факултету медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу.

Од октобра 2019. године до 31. децембра 2020. године, била је на усавршавању у Сједињеним Америчким Државама, на Универзитету у Лујвилу, држава Кентаки, као гостујући докторант стипендиста (*Visiting Ph.D. Scholar*), где је обављала истраживање на тему „*Investigate potential roles of MMPs & their regulators toward tissue/organ matrix remodeling*“, као и на тему њене докторске дисертације. Такође, током боравка у USA била је учесник пројекта „*Reversing Skeletal Muscle Myopathy by Hydrogen Sulfide*“ (*NIN grant No. GB180634*). Током 15 месеци боравка била је укључена у више научно-истраживачких студија у области физиологије и стоматологије, кроз које је научила бројне савремене научно-истраживачке технике рада.

Учествује на Јуниор пројекту „Испитивање повезаности промена у усној дупљи и квалитета живота болесника са примарним Сјегреновим синдромом лечених у болници” финансираног од стране Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу.

БИБЛИОГРАФИЈА

1. **Stanisic D**, Jeremic N, Majumder S, Pushpakumar S, George A, Singh M, Tyagi SC. High Fat Diet Dysbiotic Mechanism of Decreased Gingival Blood Flow. *Front Physiol.* 2021;12:625780. DOI: 10.3389/fphys.2021.625780 **M21**
2. **Stanisic D**, George AK, Smolenkova I, Singh M, Tyagi SC. Hyperhomocysteinemia: an instigating factor for periodontal disease. *Can J Physiol Pharmacol.* 2021;99(1):115-123. DOI: 10.1139/cjpp-2020-0224 **M23**
3. **Stanisic D**, Jovanovic M, George AK, Homme RP, Tyagi N, Singh M, Tyagi SC. Gut microbiota and the periodontal disease: role of hyperhomocysteinemia. *Can J Physiol Pharmacol.* 2021;99(1):9-17. DOI: 10.1139/cjpp-2020-0215 **M23**
4. **Stanisic D**, Obradovic O, Vujovic S, Jovanovic M, Zivkovic V. Connection of periodontal disease and diabetes mellitus: the role of matrix metalloproteinases and oxidative stress. *Ser J Exp Clin.* 2019. DOI: 10.2478/sjocr-2019-0051 **M51**

ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Драгана Станишић _____, изјављујем да докторска дисертација под насловом:


Ефекти пробиотика (*Lactobacillus Rhamnosus*) на пародонтопатију код мишева са хиперхомоцистеинемijом: улога дисбиозе

_____ која је одбрањена на _____ Универзитета у Крагујевцу представља *оригинално ауторско дело* настало као резултат *сопственог истраживачког рада*.

Овом Изјавом такође потврђујем:

- да сам *једини аутор* наведене докторске дисертације,
- да у наведеној докторској дисертацији *нисам извршио/ла повреду* ауторског нити другог права интелектуалне својине других лица,
- да умножени примерак докторске дисертације у штампаној и електронској форми у чијем се прилогу налази ова Изјава садржи докторску дисертацију истоветну одбрањеној докторској дисертацији.

У _____, _____ године,


_____ потпис аутора

ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Драгана Станишић _____,

дозвољавам

не дозвољавам

Универзитетској библиотеци у Крагујевцу да начини два трајна умножена примерка у електронској форми докторске дисертације под насловом:

Ефекти пробиотика (*Lactobacillus Rhamnosus*) на пародонтопатију код мишева са хиперхомоцистеинемijом: улога дисбиозе

која је одбрањена на _____

Универзитета у Крагујевцу, и то у целини, као и да по један примерак тако умножене докторске дисертације учини трајно доступним јавности путем дигиталног репозиторијума Универзитета у Крагујевцу и централног репозиторијума надлежног министарства, тако да припадници јавности могу начинити трајне умножене примерке у електронској форми наведене докторске дисертације путем *преузимања*.

Овом Изјавом такође

дозвољавам

не дозвољавам¹

¹ Уколико аутор изабере да не дозволи припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци, то не искључује право припадника јавности да наведену докторску дисертацију користе у складу са одредбама Закона о ауторском и сродним правима.

припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од следећих *Creative Commons* лиценци:

- 1) Ауторство
- 2) Ауторство - делити под истим условима
- 3) Ауторство - без прерада
- 4) Ауторство - некомерцијално
- 5) Ауторство - некомерцијално - делити под истим условима
- 6) Ауторство - некомерцијално - без прерада²

У _____, _____ године,


_____ потпис аутора

² Молимо ауторе који су изабрали да дозволе припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци да заокруже једну од понуђених лиценци. Детаљан садржај наведених лиценци доступан је на: <http://creativecommons.org.rs/>