

UNIVERZITET U BEOGRADU

STOMATOLOŠKI FAKULTET

Aleksandar S. Jakovljević

**DETEKCIJA I GENOTIPIZACIJA
HUMANOG CITOMEGALOVIRUSA I
EPŠTAJN-BAR VIRUSA U HRONIČNIM
PERIAPIKALNIM LEZIJAMA**

Doktorska disertacija

Beograd, 2017

UNIVERSITY OF BELGRADE
SCHOOL OF DENTAL MEDICINE

Aleksandar S. Jakovljević

**DETECTION AND GENOTYPISATION OF
HUMAN CYTOMEGALOVIRUS AND
EPSTEIN-BARR VIRUS IN CHRONIC
PERIAPICAL LESIONS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2017

MENTOR

Doc. dr Miroslav Andrić

Docent, Klinika za Oralnu hirurgiju
Stomatološki fakultet Univerziteta u Beogradu

KOMENTOR

Prof. dr Aleksandra Knežević

Vanredni profesor, Institut za mikrobiologiju i imunologiju
Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

KOMISIJA ZA ODBRANU ZAVRŠENE DOKTORSKE DISERTACIJE

Prof. dr Aleksa Marković

Redovni profesor, Klinika za Oralnu hirurgiju
Stomatološki fakultet Univerziteta u Beogradu

Prof. dr Jelena Milašin

Redovni profesor, OJ Institutski predmeti, Humana genetika
Stomatološki fakultet Univerziteta u Beogradu

Doc. dr Maja Miletić

Docent, OJ Institutski predmeti, Patološka fiziologija
Stomatološki fakultet Univerziteta u Beogradu

Doc. dr Katarina Beljić-Ivanović

Docent, Klinika za bolesti zuba
Stomatološki fakultet Univerziteta u Beogradu

Prof. dr Tanja Jovanović

Redovni profesor, Institut za mikrobiologiju i imunologiju,
Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

DATUM ODBRANE:

ZAHVALNICA

Najpre se zahvaljujem svojim mentorima Doc. dr Miroslavu Andriću i Prof. dr Aleksandri Knežević na znanju, požrtvovanosti, entuzijazmu, ljudskosti i dobroti koje su nesebično delili sa mnom i koji su mi pomogli da ovu doktorsku disertaciju privedem kraju.

Takođe, veliku zahvalnost dugujem Prof. dr Jeleni Milašin rukovodiocu projekta „Genetička kontrola i molekularni mehanizmi u malignim, inflamatornim i razvojnim patologijama orofacijalne regije“ Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije (br. 175075) i Prodekanu za nauku Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu bez čijeg nesebičnog angažovanja, stručne pomoći i ljudske podrške ovaj rad ne bi bio moguć.

Zahvaljujem se i Prof. dr Tanji Jovanović rukovodiocu projekta „Medicinski značaj genetičke varijabilnosti virusa“ Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije (br. 175073) i Prodekanu za nastavu Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu na podršci i stručnoj pomoći tokom realizacije ove doktorske disertacije.

Za pomoć i podršku tokom realizacije ove doktorske disertacije zahvalnost dugujem i nastavnicima i kolegama sa Klinike za oralnu hirurgiju, Klinike za bolesti zuba i OJ Institutskih predmeta Stomatološkog fakultet Univerziteta u Beogradu, te kolegama sa Instituta za mikrobiologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

Najzad, želim da se zahvalim i svojoj porodici, posebno supruzi Tamari, na razumevanju, podršci, pažnji i ljubavi koji su mi pruženi tokom izrade ove doktorske disertacije.

Ovu doktorsku disertaciju posvećujem svojoj kćerci Anđeliki i svom pokojnom ocu Savi.

Beograd, februar 2017. godine

dr Aleksandar Jakovljević

DETEKCIJA I GENOTIPIZACIJA HUMANOG CITOMEGALOVIRUSA I EPŠTAJN-BAR VIRUSA U HRONIČNIM PERIPIKALNIM LEZIJAMA

KRATAK SADRŽAJ

UVOD. Periapikalne lezije karakteriše hronična zapaljenska reakcija koja uzrokuje razgradnju alveolarnog koštanog tkiva u predelu vrha korena avitalnih zuba. Dosadašnja istraživanja pokazuju da su bakterijski mikroorganizmi i njihovi štetni produkti najčešći uzročnici nastanka zapaljenske reakcije u apeksnom parodontijumu. Početkom 21. veka dokazano je prisustvo herpesvirusa u tkivu periapikalnih lezija i postavljena je hipoteza da pomenuti virusi učestvuju u procesu njihovog nastanka po modelu kojim doprinose razgradnji alveolarnog koštanog tkiva, kao i u marginalnom parodontitisu. Do danas je publikovano 20 istraživanja koja su ispitivala učestalost herpesvirusne infekcije u tkivu periapikalnih lezija. Rezultati istraživanja ukazuju da su Epštajn-Bar virus (EBV) i Humani citomegalovirus (HCMV) najčešće detektovani pripadnici porodice *Herpesviridae* u periapikalnim lezijama. Pojedina istraživanja su pokazala da su herpesvirusi češće detektovani u simptomatskim i velikim u odnosu na asimptomatske i male lezije. Međutim, njihova uloga u patogenezi periapikalnih lezija još uvek nije u potpunosti razjašnjena. Iako se smatra da genetička varijabilnost herpesvirusa može uticati na odnos virusa i imunskog odgovor domaćina, u naučnoj literaturi još uvek nema podataka o učestalosti pojedinih genotipova EBV i HCMV u periapikalnim lezijama. Takođe, nedovoljno je ispitan odnos povećanog broja genskih kopija herpesvirusa i nivoa proinflamatornih citokina u patogenezi periapikalnih lezija.

CILJ ISTRAŽIVANJA. Ovo istraživanje je imalo za cilj da odredi učestalost prisustva, broja genskih kopija i vrste genotipova EBV i HCMV u tkivu periapikalnih lezija i kontrolnog pulpnog tkiva, kao i da uporedi dobijeni nalaz među periapikalnim lezijama sa različitim kliničkim, radiološkim i patohistološkim karakteristikama. Takođe, cilj ovog istraživanja bio je i da se odredi vrednost proinflamatornih citokina (TNF- α , IL-1 β i IL-6) u tkivu periapikalnih lezija i kontrolnog pulpnog tkiva, te da se dobijene vrednosti uporede sa brojem genskih kopija EBV i HCMV u ispitivanom uzorku.

MATERIJAL I METOD. U istraživanju je analizirano 100 uzoraka hroničnih periapikalnih lezija i 25 uzoraka kontrolnog pulpnog tkiva. Uzorci su prikupljeni od

zdravih pacijenata kod kojih je indikovana resekcija vrha korena zuba ili hirurško vađenje imaktiranih umnjaka. *Nested PCR* (engl. *Polymerase Chain Reaction*) je korišćen za određivanje prisustva EBV i HCMV, kao i za određivanje EBNA-2 EBV genotipova (EBV-1, EBV-2). Za detekciju gB HCMV genotipova (gB I – gB IV) u HCMV *nested PCR* pozitivnim uzorcima korišćena je RFLP (engl. *Restriction Fragment Length Polymorphism*) metoda. *TaqMan real-time PCR* je korišćen za određivanje broja genskih kopija herpesvirusa. Najzad, nivo proinflamatornih citokina (TNF- α , IL-1 β i IL-6) određivan je upotrebom ELISA (engl. *Enzyme-linked immunosorbent assay*) metode.

REZULTATI. EBV bio je značajno češće detektovan u periapikalnim lezijama u odnosu na kontrolno pulpno tkivo (76% naspram 24%, $P=0.020$). Takođe, HCMV bio je značajno učestaliji u uzorcima periapikalnih lezija u odnosu na neinflamiranu pulpu (54% naspram 28%, $P=0.020$). Dodatno, EBV bio je značajno češće detektovan u periapikalnim lezijama u poređenju sa HCMV (76% naspram 54%, $P=0.001$). Statistička analiza nije pokazala postojanje značajne razlike u detekciji HCMV i EBV između simptomatskih i asimptomatskih, velikih i malih periapikalnih lezija, te periapikalnih granuloma i radikularnih cisti. U ispitivanom uzorku detektovana su oba ispitivana genotipa EBV. EBV-1 bio je zastupljen u većini EBV *nested PCR* pozitivnih uzoraka periapikalnih lezija (u 74 od 76 uzoraka), dok je EBV-2 bio detektovan u svega 6 od 76 uzoraka periapikalnih lezija. Uočene razlike bile su statistički značajne ($P=0.001$). Od moguća 4, detektovana su samo 2 genotipa HCMV. gB-II bio je značajno češće detektovan u odnosu na gB-I u ispitivanom uzorku (42 naspram 12, $P=0.036$). Nije postojala značajna razlika u učestalosti genotipova EBV i HCMV između periapikalnih lezija sa različitim kliničkim, radiološkim i patohistološkim karakteristikama. Broj genskih kopija EBV bio je povećan u 12 od 76 *nested PCR* pozitivnih uzoraka periapikalnih lezija (15.8%). Prosečan broj kopija EBV iznosio je 6.3×10^5 po ml, dok je standardna devijacija iznosila $\pm 1.1 \times 10^6$ kopija/ml. Broj genskih kopija HCMV bio je povećan u svega 4 od 54 *nested PCR* pozitivna uzorka periapikalnih lezija (7.4%). Broj detektovanih HCMV kopija varirao je u opsegu 1×10^3 do 5.4×10^6 . Prosečan broj kopija HCMV iznosio je 1.4×10^6 po ml, dok je standardna devijacija iznosila $\pm 2.7 \times 10^6$ kopija/ml. Vrednosti IL-1 β i IL-6 bile su statistički značajno veće u periapikalnim lezijama u odnosu na kontrolno pulpno tkivo ($P=0.001$,

P=0.001). Takođe, vrednosti IL-1 β i IL-6 bile su značajno veće u simptomatskim u odnosu na asimptomatske periapikalne lezije (P=0.001, P=0.035). Pored toga, vrednosti IL-1 β bile su značajno veće u velikim u odnosu na male periapikalne lezije i u radikularnim cistama u odnosu na periapikalne granulome (P=0.007, P=0.004). Statistička analiza je pokazala da nije bilo razlike u vrednostima proinflammatoryh citokina između EBV i HCMV pozitivnih i negativnih periapikalnih lezija. Takođe, nije uočena značajna korelacija između povećanog broja genskih kopija EBV i HCMV i nivoa proinflammatoryh citokina u ispitivanom uzorku.

ZAKLJUČCI. Periapikalne lezije karakteriše učestalije prisustvo EBV i HCMV u odnosu na kontrolno pulpno tkivo, pri čemu se EBV značajno češće javlja u odnosu na HCMV. EBV-1 i HCMV gB-II su najučestaliji genotipovi analiziranih herpesvirusa u našem uzorku. Povećan broj genskih kopija EBV i HCMV detektovan je u malom broju periapikalnih lezija (ukupno 16), što ukazuje na nisku učestalost aktivne herpesvirusne infekcije u ispitivanom uzorku. Periapikalne lezije karakterišu se i povećanim vrednostima IL-1 β , IL-6 u odnosu na neinflamiranu pulpu. Simptomatske lezije karakterišu se većom produkcijom IL-1 β , IL-6 u odnosu na asimptomatske periapikalne lezije, pri čemu su vrednosti IL-1 β veće i u velikim u odnosu na male periapikalne lezije, te u radikularnim cistama u odnosu na periapikalne granulome. Nepostojanje korelacije između broja genskih kopija herpesvirusa i nivoa proinflammatoryh citokina može biti posledica male učestalosti aktivne herpesvirusne infekcije u ispitivanom uzorku.

Ključne reči: Hronične periapikalne lezije, pulpa zuba, Epštajn-Bar virus, Humani citomegalovirus, Epštajn-Bar virus nuklearni protein-2, glikoprotein B, Faktor nekroze tumora-alfa, Interleukin-1 beta, Interleukin-6.

Naučna oblast: Medicinske nauke - Stomatologija

Uža naučna oblast: Bazične i kliničke stomatološke nauke

UDK broj: 616.314.165-002.32:578.825(043.3)

DETECTION AND GENOTYPISATION OF HUMAN CYTOMEGALOVIRUS AND EPSTEIN-BARR VIRUS IN CHRONIC PERIAPICAL LESIONS

SUMMARY

INTRODUCTION. Periapical lesions are characterized by chronic inflammation and destruction of tooth-supporting tissues in the periapical area of non-vital teeth. Previous studies confirmed that polymicrobial infection of endodontic origin is essential for its development. At the beginning of 21st century herpesviruses have been detected in tissue samples of periapical lesions. It has been hypothesized that concomitant herpesviral infection may contribute to the pathogenesis of apical periodontitis in the same way as it has been proposed for marginal periodontitis. Up to now, 20 studies investigated the occurrence of herpesviral infection in apical periodontitis. Their results indicate that Epstein-Barr virus (EBV) and Human cytomegalovirus (HCMV) are the most frequently detected species of *Herpesviridae* family in apical periodontitis. Previous studies showed that herpesviruses occurred more frequently in symptomatic and large compared to asymptomatic and small periapical lesions. However, their exact role in the pathogenesis of apical periodontitis has not been fully elucidated. Although it is considered that a great diversity of viral strains may influence the course and severity of disease there are no scientific data about the occurrence of different EBV and HCMV genotypes in apical periodontitis samples. Furthermore, there is a lack of data about the relationship between levels of pro-inflammatory cytokines and herpesviral copy number in the pathogenesis of apical periodontitis.

AIMS. This study aimed to detect the occurrence of HCMV and EBV, to assess their copy number and the distribution of their genotypes in periapical lesions and healthy control tissues. Additionally, this study aimed to compare these findings between symptomatic and asymptomatic, large and small periapical lesions, and periapical granulomas and radicular cysts. The goal of the study was also to determine the levels of pro-inflammatory cytokines (TNF- α , IL-1 β and IL-6) in periapical lesions and healthy control tissues, and to correlate these data with the copy number of investigated herpesviruses.

MATERIALS AND METHODS. One hundred samples of apical periodontitis and 25 samples of healthy pulp tissues were used in this study. Samples were collected from individuals in good general health who required surgical apicoectomy or surgical removal of impacted third molars. A nested PCR method was used to detect HCMV, EBV and EBV EBNA-2 genotypes (EBV-1, EBV-S). The HCMV gB genotypes (gB I – gB IV) were determined by restriction fragment length polymorphisms analysis. The TaqMan real-time PCR was used to determine infectious agent counts in HCMV and EBV nested PCR positive samples. The concentrations of pro-inflammatory cytokines (TNF- α , IL-1 β and IL-6) were determined with a commercial enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits.

RESULTS. Apical periodontitis lesions harbored EBV at significantly higher rate compared with control pulpal tissues (76% versus 54%, $P=0.020$). Furthermore, HCMV was detected in periodontitis at significantly higher rate than in pulp controls (54% versus 28%, $P=0.020$). Moreover, EBV occurred more frequently in apical periodontitis compared to HCMV (76% versus 54%, $P=0.001$). Significant differences were not observed in detection of HCMV and EBV regarding clinical, radiographic and histopathological features of apical periodontitis lesions. Both EBV EBNA-2 genotypes were detected in examined sample. There was a statistically significant difference in the distribution of EBV genotypes in both periapical lesions and healthy controls ($P=0.001$), EBV-1 was more frequently detected compared to EBV-2. Regarding the HCMV gB genotypes occurrence, out of 4 possible genotypes, only types I and II were detected. HCMV gB II was more frequently detected among apical periodontitis lesions compared with gB type I (42 versus 12, $P=0.036$). Significant differences were not observed in distribution of HCMV and EBV genotypes regarding clinical, radiographic and histopathological features of apical periodontitis lesions. The nested PCR positive samples were further analyzed using the real-time PCR to determine the number of viral copies. Only 12 out of 76 EBV (15.8 %) and 4 out of 54 HCMV (7.4 %) nested PCR positive samples shown increased viral copy numbers above the limit of 125 copies/ml. The number of EBV copies in periapical lesions varied from 460 to 3.500.000 copies/ml. PCR-positive periapical lesions showed mean EBV counts of 6.27×10^5 . On the other hand, the number of HCMV copies in periapical lesions varied from 1.050 to 5.400.000 copies/mL with the mean HCMV counts of 1.4×10^6 . The levels of IL-1 β and

IL-6 were significantly higher in periapical lesions compared to healthy control (P=0.001, P=0.001, respectively). Furthermore, the levels of IL-1 β and IL-6 were significantly higher in symptomatic compared to asymptomatic periapical lesions (P=0.001, P=0.035, respectively). Moreover, values of IL-1 β were significantly higher in large compared to small periapical lesions and in radicular cysts compared to periapical granulomas (P=0.007, P=0.004, respectively). There were no significant differences in the levels of TNF- α , IL-1 β and IL-6 between HCMV and EBV positive and negative apical periodontitis lesions. Furthermore, the Spearman's correlation did not reveal significant association between the levels of analyzed pro-inflammatory cytokines and herpesviral copy numbers in examined sample.

CONCLUSIONS. Periapical lesions are characterized with higher occurrence of HCMV and EBV compared to healthy pulp tissue, whereas EBV was more frequently detected compared to HCMV. EBV-1 and HCMV gB-II are the most frequent genotypes of analyzed herpesviruses. This study reported low viral loads of EBV and HCMV in examined sample. Periapical lesions are characterized with higher values of IL-1 β and IL-6 compared to healthy pulp tissue. Furthermore, values of IL-1 β and IL-6 were higher in symptomatic compared to asymptomatic periapical lesions. The absence of correlation between herpesviral copy number and the level of pro-inflammatory cytokines might be a consequence of low occurrence of active EBV and HCMV infections in our sample.

Scientific field: Medical Sciences – Dentistry

Specific scientific field: Basic and clinical dental sciences

UDC number: 616.314.165-002.32:578.825(043.3)

SADRŽAJ

I UVOD	1
1. Hronične periapikalne lezije	2
1.1. Definicija, epidemiologija i klasifikacija hroničnih periapikalnih lezija.....	2
1.2. Etiologija hroničnih periapikalnih lezija.....	10
1.3. Patogeneza hroničnih periapikalnih lezija.....	13
2. Uloga herpesvirusa u etiopatogenezi hroničnih periapikalnih lezija	16
2.1. Opšte karakteristike virusa iz familije <i>Herpesviridae</i>	16
2.2. Epstein-Barr virus.....	20
2.3. Humani Citomegalovirus.....	22
2.4. Herpesvirusi kao etiološki faktori u nastanku hroničnih periapikalnih lezija.....	25
3. Uloga proinflammatoryh citokina u etiopatogenezi hroničnih periapikalnih lezija	29
3.1. Opšte karakteristike citokina.....	29
3.2. Proinflammatoryh citokini od značaja za patogenezu hroničnih periapikalnih lezija.....	31
3.2.1. Faktor nekroze tumora – alfa (TNF- α).....	31
3.2.2. Interleukin 1-beta (IL-1 β).....	32
3.2.3. Interleukin 6 (IL-6).....	33
3.3. Veza između proinflammatoryh citokina i herpesvirusa u patogenezu hroničnih periapikalnih lezija.....	33
II NAUČNA OSNOVA PROBLEMA	37
III CILJEVI ISTRAŽIVANJA	42
IV MATERIJAL I METOD	44
1. Etički standard istraživanja	45

2. Klinički deo istraživanja.....	45
2.1. Uzorak istraživanja i kriterijumi za uključivanje i isključivanje ispitanika.....	46
2.2. Anamneza, klinički i radiološki pregled.....	46
2.3. Prikupljanje uzorka.....	48
3. Laboratorijski deo istraživanja.....	49
3.1. Izolacija DNK iz uzoraka tkiva.....	49
3.2. Određivanje prisustva i genotipova herpesvirusa u ispitivanim uzorcima.....	50
3.3. Određivanje broja genskih kopija herpesvirusa.....	56
3.4. Određivanje koncentracije proinflammatoryh citokina.....	57
4. Statistička obrada podataka.....	60
V REZULTATI.....	61
1. Opšte karakteristike uzorka.....	62
2. Rezultati sekvenciranja HCMV i EBV pozitivnih uzoraka.....	65
3. Prisustvo herpesvirusa u ispitivanom uzorku.....	71
4. Zastupljenost genotipova herpesvirusa u ispitivanom uzorku.....	73
5. Kvantifikacija herpesvirusa u ispitivanom uzorku.....	75
6. Vrednosti proinflammatoryh citokina u ispitivanom uzorku.....	77
VI DISKUSIJA.....	85
1. Analiza učestalosti detekcije i broja genskih kopija HCMV i EBV u ispitivanom uzorku.....	86
2. Analiza učestalosti pojedinih genotipova HCMV i EBV u ispitivanom uzorku.....	94
3. Analiza dobijenih vrednosti proinflammatoryh citokina u ispitivanom uzorku.....	96

4. Pravci budućih istraživanja.....	99
VII ZAKLJUČCI.....	101
VIII LITERATURA.....	103
IX PRILOZI.....	128
1. Prilog 1 - Radni karton ekperimentalne grupe istraživanja.....	129
2. Prilog 2 - Radni karton kontrolne grupe istraživanja.....	131
X BIOGRAFIJA AUTORA.....	133

Izjava o autorstvu

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Izjava o korišćenju

I UVOD

1. HRONIČNE PERIAPIKALNE LEZIJE

1.1. DEFINICIJA, EPIDEMIOLOGIJA I KLASIFIKACIJA HRONIČNIH PERIAPIKALNIH LEZIJA

Apeksni parodontcijum se sastoji od tri, međusobno čvrsto anatomske i funkcionalno, povezane tkiva: korenskog cementa, periodoncijuma i alveolarne kosti. Tkivo pulpe i periodoncijuma takođe je anatomske i funkcionalno povezano, bez jasne granice između ove dve celine, zbog čega se ova dva bliska tkiva često nazivaju pulpno-periodoncijumski kompleks ^{46, 84}.

Hronične periapikalne lezije predstavljaju grupu patoloških promena koje nastaju u predelu apeksnog parodontcijuma zuba sa avitalnom pulpom. U osnovi, to je hronična zapaljenska reakcija tkiva apeksnog parodontcijuma koja je posledica kontinuiranog dejstva štetnih toksina iz nekrotičnog kanala korena zuba koje dovode do razgradnje pomenutih tkiva ^{147, 167, 168, 225, 255}.

Hronične periapikalne lezije su veoma česte patološke promene koje se sreću u usnoj duplji. Prema istraživanju sprovedenom u desetogodišnjem periodu (1975-1985 godina) na Klinici za oralnu hirurgiju, Stomatološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, čak jedna trećina od oko 12.000 hirurških intervencija je sprovedena u cilju hirurškog lečenja periapikalnih lezija ¹⁶⁷. Novija istraživanja na svetskom nivou ukazuju da periapikalne lezije predstavljaju veoma rasprostranjen zdravstveni problem koji se sve češće dovodi u vezu sa narušavanjem sveopšteg zdravlja stanovništva ^{55, 60, 204, 205}. Učestalost detekcije ovih patoloških stanja prema istraživanju Eriksen-a i saradnika iz 2002. godine pokazuje da se prevalencija periapikalnih lezija u evropskim zemljama kreće između 30 i 70% ⁵⁶. Prema analizi rezultata sistematskog pregleda iz 2012. godine ¹⁵⁹, periapikalne lezije bile su detektovane na 16.208 od 300.861 ispitivanih zuba (5.4%). Navedeni podaci govore da je svaki ispitanik uključen u istraživanje imao detektovanu najmanje jednu periapikalnu leziju. Najnoviji rezultati o učestalosti periapikalnih lezija na srpskoj populaciji prikazani su od strane Ilića i saradnika 2014. godine ⁸¹. Njihovi rezultati su pokazali prisustvo periapikalnih lezija na 227 od 3526 ispitivanih zuba (6.4%), što je u skladu sa rezultatima zemalja u okruženju ^{64, 164}.

Mnogobrojna istraživanja su potvrdila da je najveći broj periapikalnih lezija detektovan kod zuba kod kojih je uočeno neadekvatno punjenje korenskog kanala ^{55, 56, 81, 159, 164}. Prospektivna studija Kirkevang-a i saradnika ⁹⁹ ispitivala je potencijalne faktore rizika koji su doveli do nastanka periapikalnih lezija kod 473 pacijenta u periodu između 1997 i 2003 godine. Kod 170 od ukupno 473 pacijenata došlo je do nastanka lezije u šestogodišnjem periodu praćenja, pri čemu je logistička regresiona analiza pokazala da su pacijenti sa neadekvatnim restaurativnim ispunima i/ili neadekvatnim punjenjem korenskog kanala imali 3.9 i 6.4 puta veće šanse za razvoj navedenih patoloških stanja ⁹⁹. Iako su rezultati dosadašnjih istraživanja oprečni, njihov zajednički zaključak je da se periapikalne lezije najčešće uočavaju kod pacijenta starosne dobi između 40 i 49 godina života, pri čemu nije pokazana razlika u učestalosti u odnosu na pol pacijenata. Takođe, pokazano je da se periapikalne lezije češće uočavaju na zubima sa kompleksnim kanalnim sistemom, poput premolara i molara. S druge strane, pojedine studije pokazale su veću učestalost lezija na frontalnim zubima, što se objašnjava većom učestalošću navedene grupe zuba u ovim istraživanjima. Naime, zbog estetskih razloga frontalni zubi u najvećem broju slučajeva su očuvani, dok loši socioekonomski uslovi za posledicu imaju relativno često ekstrahovanje molara i premolara ^{21, 55, 56, 64, 99, 81, 159, 164}.

U poslednjih 20 godina poseban akcenat stavljen je na ispitivanje uticaja hroničnih periapikalnih lezija na opšte zdravlje stanovništva ^{128, 156, 204, 205, 223}. Eksperimentalna studija Zhang-a i saradnika ²⁵³ pokazala je da dolazi do povećanja nivoa C-reaktivnog proteina (CPR), interleukina (IL)-12 i IL-6 u organizmu pacova, kojima je indukovano nastanak periapikalne lezije. Ovi autori su takođe pokazali razvoj patoloških promena na aortnom luku, jetri i slezini ispitivanih životinja nakon 6 nedelja praćenja. Sistematski pregled i meta-analiza Gomesa i saradnika ⁶⁶ pokazali su povećanje nivoa serumskog imunoglobulina (Ig) A, IgG i IgM kod pacijenata sa periapikalnim lezijama u odnosu na zdrave kontrole. Dalje, sistematskim pregledom Khalighinejad-a i saradnika ⁹⁷ ukazano je na povezanost prisustva periapikalnih lezija i kardiovaskularnih oboljenja, šećerne bolesti i hroničnih oboljenja jetre. Uzimajući u obzir navedene podatke, a u cilju da se izbegnu potencijalne sistemske komplikacije, veliku pažnju treba usmeriti na prevenciju nastanka periapikalnih lezija.

Klasifikacija periapikalnih lezija na osnovu etioloških, kliničkih, radioloških ili histoloških karakteristika vrši se u cilju njihovog lakšeg prepoznavanja i izbora

najboljeg postupka lečenja. Ipak, jedina precizna klasifikacija promena u tkivima može se izvršiti na osnovu patohistološke analize uzorka lezije ^{168, 255}. Jednu od prvih klasifikacija periapikalnih lezija, baziranu na radiološkim karakteristikama, predložio je Albrecht 1860. godine. Kasnije se u literaturi pominje nekoliko klasifikacija vršenih po različitim kriterijumima u kojima je opisan čitav niz različitih entiteta periapikalnih lezija ^{2, 168, 255}. U okviru ove doktorske disertacije biće prikazano nekoliko klasifikacija koje su trenutno aktuelne i na osnovu kojih se vrši dijagnostika i lečenje pomenutih patoloških stanja. Jedna od ponuđenih klasifikacija periapikalnih lezija prihvaćena od strane brojnih istraživača je Wein-ova klasifikacija (Tabela 1.1) ²⁴³. Nakon ove klasifikacije usledilo je nekoliko novih, koje su uglavnom predstavljale njenu modifikaciju i bile dopunjene pojedinim patohistološkim karakteristikama ispitivanih lezija.

Tabela 1.1. Wein-ova klasifikacija periapikalnih lezija

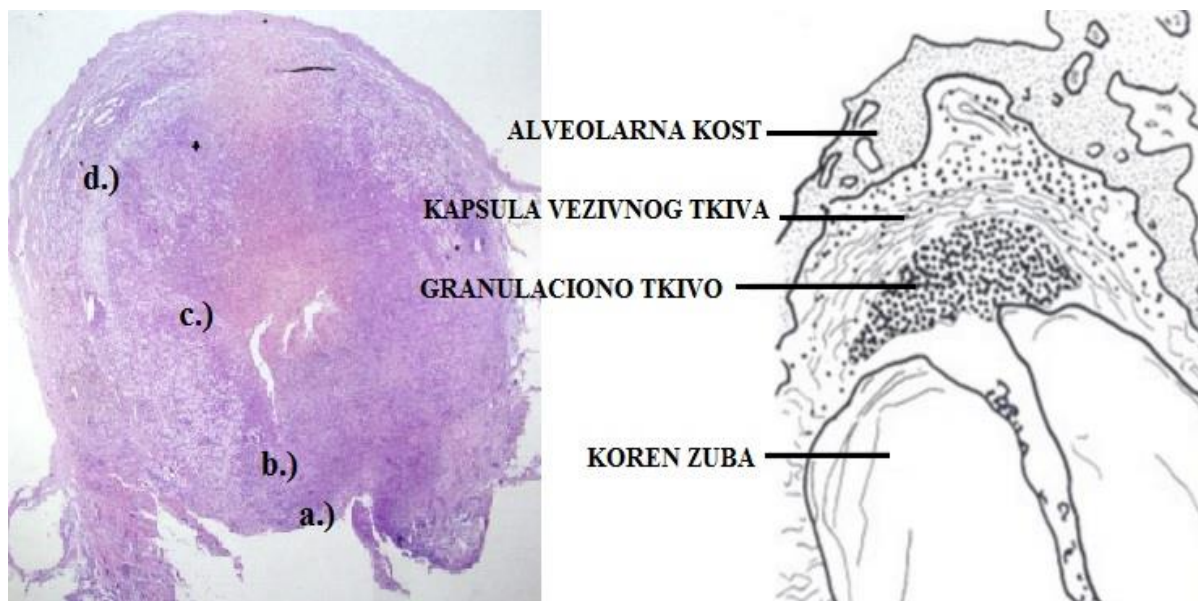
A – Periapiksna osteoskleroza (Osteitis condensans)
B – Početni hronični apeksni parodontitis (Incipient chronic apical parodontitis)
C – Uznapredovali hronični apeksni parodontitis (Advanced chronic apical parodontitis):
Periapikalni granulom (Periapical granuloma)
Hronični periapikalni apsces (Chronic periapical abscess)
Periapikalna cista (Periapical cyst)

Jedna od klasifikacija koja je takođe prihvaćena od strane brojnih istraživača i čija se upotreba preporučuje u dodiplomskoj i posle diplomskoj literaturi Klinike za oralnu hirurgiju, Stomatološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu je klasifikacija koja je zasnovana na patohistološkim karakteristikama periapikalnih lezija. Prvi put je predstavljena od strane Hirsch-a i saradnika 1979. godine ⁷⁷, a poznatija je po tome što su je u istraživanju za klasifikaciju lezija koristili Spatafore i saradnici 1990. godine ²²⁴. U okviru ove klasifikacije sve hronične periapikalne lezije su podeljene na: periapikalne granulome, radikularne ciste, periapikalne ožiljke i ostale lezije.

Periapikalni granulom predstavlja proliferaciju hroničnog zapaljenskog tkiva koje je okruženo fibroznom vezivnim tkivom u predelu vrha korena zahvaćenog zuba

(Slika 1.1) ^{111, 146, 148, 168, 225, 255}. U zavisnosti od sastava i dominacije pojedinih komponenti hroničnog zapaljenja granulomi se mogu podeliti na granulomatozne, fibrozne ili eksudativne ^{111, 146, 148, 168, 225, 255}. Sastav ćelija zapaljenskog infiltrata varira u zavisnosti od faze razvoja granuloma, prisustva kliničkih simptoma i metoda koje se koriste u detekciji i kvantifikaciji ćelija ^{62, 115, 122, 123, 129, 170, 251}. Najdominantnije ćelije zapaljenskog infiltrata su limfociti i makrofagi ^{62, 115, 122, 123, 129, 170, 251}. U odnosu na vrstu limfocita, T-limfociti su dominantniji u pojedinim fazama razvoja granuloma u odnosu na B-limfocite, pri čemu su CD4+ pomoćnički limfociti brojniji od CD8+ citotoksičnih limfocita ^{14, 31, 40, 41, 185, 232}. T-pomoćnički limfociti tipa 1 (Th1) su dominantniji u inicijalnoj fazi razvoja periapikalnog granuloma ^{14, 31, 40, 41, 185, 232}. S druge strane, prisustvo B-limfocita, plazmocita i Th2 ćelija karakteristično je za kasnu fazu razvoja ^{14, 31, 40, 41, 185, 232}. Kod manjeg broja granuloma uočava se prisustvo i džinovskih multijedarnih ćelija oko stranog tela koje se nalaze oko materijala za punjenje kanala korena zuba ili kristala holesterola ^{146, 148}. Nair i saradnici su pokazali da je u strukturi određenog broja granuloma moguće uočiti prisustvo epitelnih ćelija ^{151, 152}. One potiču od Malassez-ovih epitelnih ostataka i pod određenim uslovima imaju mogućnost proliferacije ^{146, 148, 168, 255}.

U potpuno razvijenoj formi periapikalnog granuloma može se razlikovati više zona odbrane tkiva apeksnog parodontijuma od dejstva različitih štetnih noxi ^{131, 168, 255}. U predelu apeksnog foramena zuba zahvaćenog zapaljenskim procesom nalazi se **zona nekroze** koja se karakteriše nekrotičnim sadržajem sastavljenim od mrtvih ćelija okolnog tkiva i njihovih komponenti, kao i ćelija zapaljenskog infiltrata. Zatim se uočava **zona kontaminacije** koju čine toksične materije koje difunduju iz kanala korena i eksudat. Kao odgovor na prisustvo hroničnog zapaljenja dolazi do formiranja mladog granulacionog tkiva u **zoni iritacije**. U poslednjoj zoni, **zoni stimulacije**, fibroblasti produkuju kolagen u vidu traka koje formiraju kolagenu kapsulu koja ograničava patološki proces i teži da ga resorbuje (Slika 1.1) ^{131, 168, 255}.

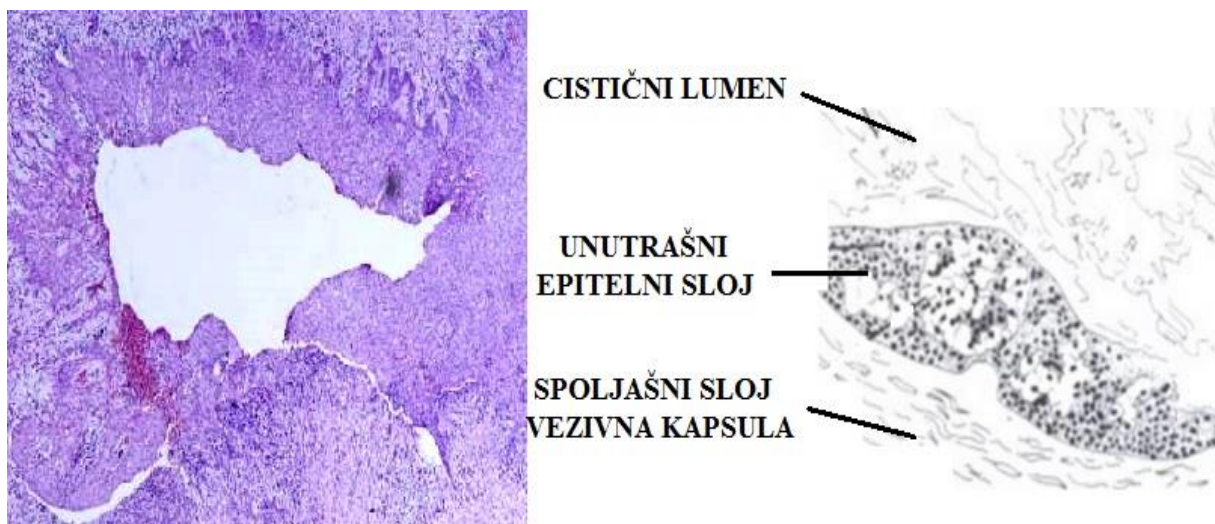


Slika 1.1. Patohistološki i šematski prikaz periapikalnog granuloma. Oznake na slici: a.) zona nekroze; b.) zona kontaminacije; c.) zona iritacije; i d.) zona stimulacije.

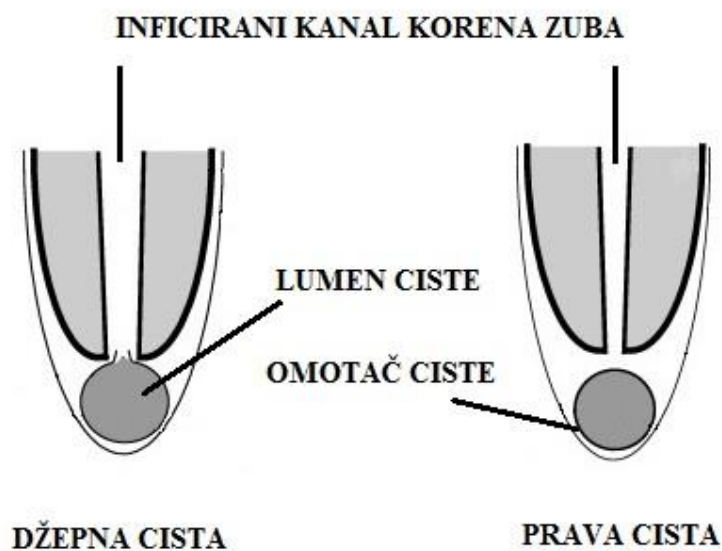
Radikularne (periapikalne) ciste predstavljaju grupu hroničnih periapikalnih lezija nastalih daljim razvojem periapikalnog granuloma koji u svom sastavu sadrži epitelnu ćelijsku komponentu ^{146, 148, 149, 167, 168, 255}. Incidencija radikularnih cisti među periapikalnim lezijama varira između 6 i 55% ^{147, 209}, a najčešća su vrsta viličnih cista (oko 50% svih cisti) ²²⁹. Patohistološka struktura radikularnih cisti je karakteristična i čine je dva dela. Unutrašnji omotač ciste izgrađen je od pločastoslojevitog epitela bez orožavanja koji ograničava njen lumen. U okviru epitela uočavaju se zone ćelija zapaljenskog infiltrata. Spoljašnji sloj izgrađen je od snopova kolagenih vlakana između kojih se takođe mogu uočiti zone ćelija zapaljenskog infiltrata. U spoljašnjem sloju cista mogu se uočiti i holesterolski kristali okruženi multijedrnim džinovskim ćelijama tipa oko stranog tela, eritrociti i hemosiderinske pigmentacije (Slika 1.2) ^{146, 148, 149, 229}.

Radikularne ciste se mogu podeliti u dve grupe, a osnovna razlika je u odnosu cističnog lumena prema apikalnom otvoru kanala korena zuba. Prvu grupu čine **prave ciste** (*engl. true cysts*) kod kojih je cistični lumen u potpunosti zatvoren i nema komunikaciju sa apikalnim otvorom. Sa druge strane, kod **džepnih cisti** (*engl. pocket cysts*) cistični lumen je široko otvoren prema apikalnom foramenu (Slika 1.3). Mnogobrojna istraživanja su pokazala da prave ciste čine više od polovine svih

radikularnih cista ^{152, 209}. Radikularne ciste mogu se podeliti i na apikalne i lateralne u zavisnosti od mesta njihovog nastanka. Dodatno, posebnu vrstu radikularnih cisti čine rezidualne ciste, koje se razvijaju u alveolarnoj kosti vilica i porekla su periapikalnog zapaljenskog tkiva koje je zaostalo nakon vađenja zuba zahvaćenog zapaljenskim procesom ²²⁹.



Slika 1.2. Patohistološki i šematski prikaz radikularne ciste.



Slika 1.3. Šematski prikaz prave i džepne radikularne ciste

Pored periapikalnog granuloma i radikularne ciste, Spatafore i saradnici ²²⁴ su u okviru vrsta periapikalnih lezija opisali postojanje i periapikalnog ožiljka kosti. Ono se nalazi u predelu vrha korena hirurški lečenih zuba i na radiografskom nalazu imitira prisustvo granuloma. Za razliku od periapikalnog granuloma reč je o asimptomatskoj promeni koja predstavlja proces regeneracije koštanog tkiva u apikalnom parodontijumu i izgrađena je od kolagenizovanog, hipocelularnog, fibroznog tkiva ^{77, 167, 168, 224}.

U okviru ostalih lezija prema klasifikaciji Spatafore-a i saradnika opisuju se različite benigne i maligne lezije koje se mogu razviti u predelu vrha korena zuba, a svojim radiološkim karakteristikama mogu da podsećaju na hronične periapikalne lezije. Tako je u literaturi zabeleženo da se u periapikalnom predelu mogu dijagnostikovati i druga patološka stanja poput: cementno-osealne displazije, osificirajućeg fibroma, osteoblastoma, plazmocitoma, odontogenog miksoma, intrakoštanog limfoma, osteosarkoma i druge promene ^{77, 167, 168, 224}.

2009. godine Američko udruženje endodontista (*engl. American Association of Endodontists*) predložilo je upotrebu klasifikacije patoloških promena u apeksnom parodontijumu zasnovanu na dijagnostičkim kriterijumima ⁶⁵. Podela patoloških stanja izvršena je na osnovu znakova i simptoma bolesti koji se mogu uočiti, a razlikuju se u odnosu na zdravo periapikalno tkivo (Tabela 1.2).

Na kraju, treba ukazati i na klasifikaciju patoloških promena u apikalnom parodontijumu prema Svetskoj Zdravstvenoj Organizaciji (SZO) ²⁴⁷. Naime, prema Internacionalnoj klasifikaciji bolesti (MKB 10), patološke promene apeksnog parodontijuma svrstane su u poglavlje IX (K00-K93) – Oboljenja digestivnog sistema tj. njegovo podpoglavlje K00-K14 – Oboljenja usne šupljine, pljuvačnih žlezda i viličnih kostiju (Tabela 1.3).

Tabela 1.2. Klasifikacija promena u apeksnom parodonticijumu na osnovu znakova i simptoma oboljenja prema Američkom udruženju endodontista.

Zdravo periapikalno tkivo	Zub sa zdravim periapikalnim tkivom koje nije osetljivo na perkusiju ili palpaciju. Lamina dura oko vrha korena zuba je intaktna, a veličina periodontalnog prostora je uniformna.
Simptomatski apikalni parodontitis	Prisustvo zapaljenja u predelu apeksnog parodonticijuma koje se karakteriše prisustvom bola prilikom zagrižaja, perkusije ili palpacije zuba. Može i ne mora se uočavati radiološki, poput rasvetljenja u predelu vrha korena zuba.
Asimptomatski apikalni parodontitis	Prisustvo zapaljenja i razgradnje tkiva apeksnog parodonticijuma. Radiološki se uočava kao rasvetljenje u predelu vrha korena zahvaćenog zuba bez prisustva simptoma oboljenja.
Akutni apikalni apsces	Zapaljenska reakcija koja nastaje kao posledica infekcije i nekroze pulpnog tkiva. Karakteriše se brzim početkom nastanka, pojavom spontanog bola, osetljivošću zuba na dodir, formiranjem gnoja i otoka u predelu zahvaćenog tkiva.
Hronični apikalni apsces	Zapaljenska reakcija koja nastaje kao posledica infekcije i nekroze pulpnog tkiva. Karakteriše se sporijim nastankom, blagom osetljivošću zuba na dodir ili nepostojanjem osetljivosti zuba, povremenim oslobađanjem gnojnog sadržaja u predelu fistule.
Kondenzirajući osteitis	Predstavlja reakciju alveolarnog koštanog tkiva na zapaljenje i radiološki se uočava kao difuzna senka u predelu vrha korena zuba.

Tabela 1.3. Klasifikacija oboljenja apeksnog parodonticijuma prema SZO

Šifra oboljenja	Vrsta oboljenja
K04.4	Akutni apikalni parodontitis pulpnog porekla
K04.5	Hronični apikalni parodontitis – periapikalni granulom
K04.6	Periapikalni apsces sa fistulom – dentalni i dentoalveolarni
K04.7	Periapikalni apsces bez fistule – dentalni, dentoalveolarni i periapikalni
K04.8	Radikalna cista – apikalna, periapikalna i rezidualna

1.2. ETIOLOGIJA HRONIČNIH PERIPIKALNIH LEZIJA

Hronične periapikalne lezije razvijaju se u apeksnom parodontijumu zuba koji je lišen vitalnog pulpnog tkiva^{211, 228}. U osnovi, najčešće su posledica nekroze pulpe, iako se mogu razviti u apeksnom parodontijumu zuba kod kog je pulpa uklonjena endodontskim tretmanom^{148, 211, 225, 228}. Periapikalne lezije predstavljaju multikauzalno oboljenje s obzirom da nekroza pulpnog tkiva može biti uzrokovana različitim etiološkim faktorima^{148, 211, 225, 228}. Svi etiološki faktori koji dovode do nastanka periapikalnih lezija podeljeni su na: biološke-mikrobiološke, fizičke i hemijske faktore^{148, 167, 168, 225, 255}.

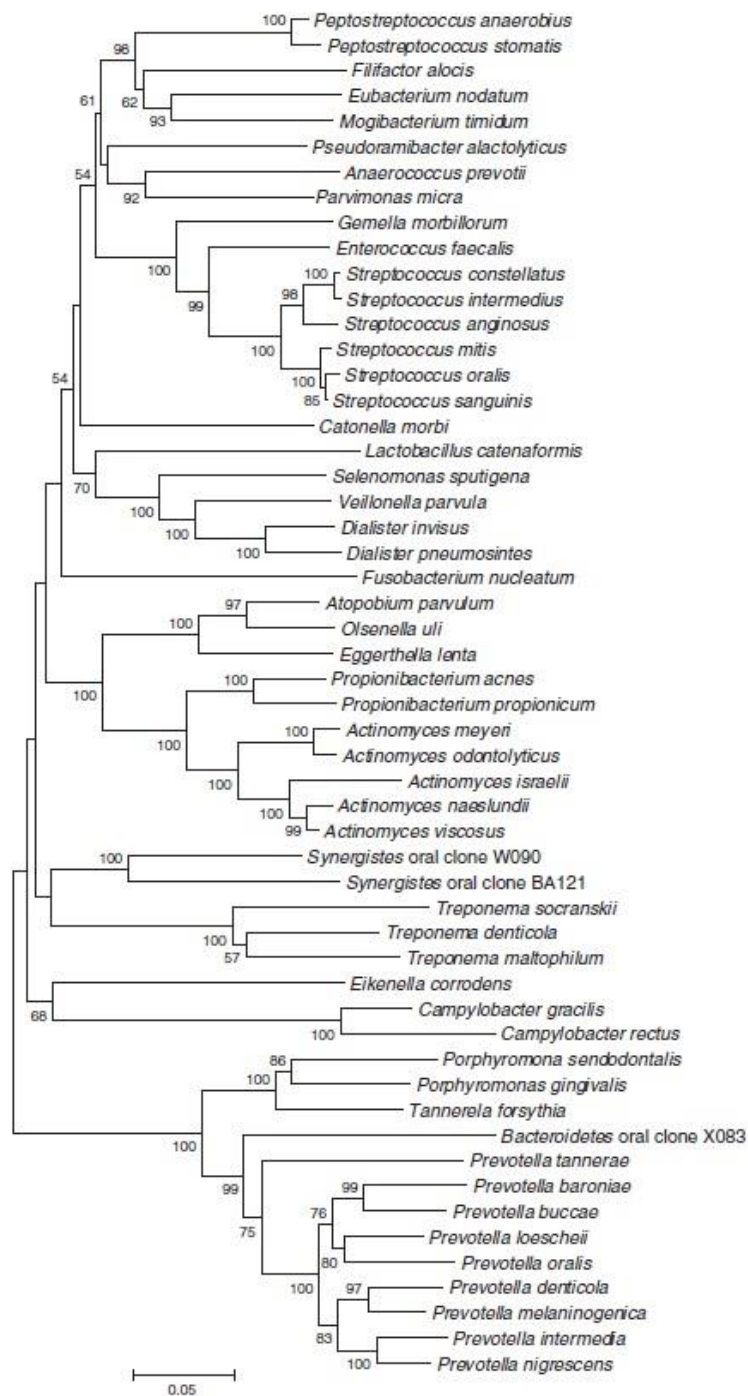
Iako različiti faktori doprinose nastanku periapikalnih lezija, uvreženo je mišljenje da je nekroza pulpnog tkiva u najvećem broju slučajeva uzrokovana prodorom mikroorganizama. Tako se periapikalne lezije smatraju infektivnim oboljenjem, pri čemu su uzročnici najčešće bakterije poreklom iz korenskog kanala avitalnih zuba. Opisano je da bakterije do pulpnog tkiva mogu dospeti na različite načine. Najčešći način je putem direktne komunikacije pulpnog tkiva sa usnom dupljom što je posledica prisustva nelečene karijesne lezije. U literaturi se navode i drugi načini kontaminacije pulpnog tkiva: ogoljeni dentinski tubuli, pulpno-periodontalne komunikacije, lateralni i apikalni akcesorni kanali, te hematogeni i limfogeni put kontaminacije^{148, 167, 168, 211, 225, 228, 255}.

Prisustvo bakterija u nekrotičnom pulpnom tkivu dokazano je davne 1890. godine¹³⁹. Međutim, uloga bakterija u nastanku periapikalnih lezija potvrđena je tek 1965. godine u ekperimentalnom istraživanju Kakehashi-ja i saradnika⁹². Oni su napravili artefijelnu komunikaciju pulpnog tkiva molara pacova sa usnom dupljom. U periodu praćenja od 42 dana u grupi neobeskličenih pacova patohistološkom analizom potvrđen je razvoj hronične periapikalne lezije u predelu apeksnog parodontijuma. S druge strane, u grupi obeskličenih pacova patohistološka analiza nije potvrdila nastanak periapikalne lezije⁹². Istraživanja koja su usledila potvrdila su njihov nalaz i dokazala prisustvo različitih bakterijskih vrsta u inficiranom kanalu korena zuba zahvaćenog periapikalnim lezijama^{20, 93, 150, 245}.

Infekcija pulpnog tkiva razvija se u sredini sa prethodno sterilnim uslovima, zbog čega se pretpostavljalo da bilo koji mikroorganizam može biti uzročnik nastanka zapaljenske reakcije. Razvojem molekularnih metoda detekcije mikroorganizama naučnici su došli do saznanja da su bakterije u inficiranom korenskom kanalu organizovane u strukturi biofilma^{17, 161, 163, 181, 215}. Biofilm, kao zajednica mikroorganizama u matriksu bakterijskog i salivarnog porekla, predstavlja kompleksni biološki sistem u kome međusobni odnos njegovih činilaca doprinosi očuvanju metaboličkih aktivnosti zajednice^{161, 163, 181}. Najnovija istraživanja, zasnovana na sekvenciranju 16S ribozomalne RNK bakterija, potvrdila su prisustvo preko 1.000 različitih bakterijskih vrsta u usnoj duplji¹⁹⁸. Dalje, istraživanja Siqueira-e i saradnika potvrdila su prisustvo preko 460 različitih bakterijskih vrsta u inficiranim kanalima korenova analiziranih zuba^{183, 212, 214}. Identifikovani bakterijski mikroorganizmi najčešće su svrstavani u sledeće razrede: *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Fusobacteria*, *Proteobacteria*, *Spirochaetes* i *Synergistetes*¹⁸.

U početnim fazama infekcije mikroflorom kanala korena dominiraju aerobne i fakultativno anaerobne bakterije, da bi vremenom usled utroška kiseonika došlo do povećanja broja obligatno anaerobnih mikroorganizama^{168, 255}. Istraživanja su pokazala da iako je bakterijska flora inficiranog kanala polimikrobna, bakteriološki nalaz individualno varira od osobe do osobe^{199, 214}. Dodatno, istraživanja pokazuju da nijedna bakterijska vrsta zasebno nije odgovorna za nastanak infekcije nego je infekcija posledica međusobne interakcije 20 do 30 najčešće identifikovanih bakterijskih vrsta (Slika 1.4)^{199, 214}.

Uloga navedenih mikroorganizama u nastanku i progresiji periapikalnih lezija omogućena je dejstvom bakterijskih faktora virulencije. Faktore virulencije bakterija čine strukturne komponente njihovih ćelija i/ili njihovi ekstracelularni produkti koji im omogućavaju ispoljavanje štetnog dejstva na tkiva domaćina²¹³. Najznačajniji faktori virulencije bakterija koje naseljavaju inficirane kanale korena zuba prikazani su u tabeli 1.4.



Slika 1.4. Filogenetska analiza bakterijskih mikroorganizama inficiranog kanala korena zuba zasnovana na sekvenciranju 16S rRNK. Preuzeto iz ¹⁸.

Tabela 1.4. Faktori virulencije bakterija koji naseljavaju inficirane kanale korena zuba sa hroničnim periapikalnim lezijama.

STRUKTURNE KOMPONENTE	EKSTRACELULARNI PRODUKTI
1. Endotoksin - lipopolisaharid	1. Enzimi – proteinaze, hijaluronidaze
2. Peptidoglikan	2. Egzotoksin - leukotoksin
3. Lipoteihoična kiselina	3. Proteini toplotnog šoka
4. Proteini spoljašnje membrane	4. Krajnji produkti metabolizma
5. Fimbrije i flagele	
6. Bakterijska DNK	

Pored bioloških, nekroza pulpnog tkiva može biti uzrokovana i mehaničkim etiološkim faktorima. Istraživanja su pokazala da trauma u predelu zuba, kao posledica pada, udarca ili frakture, može uzrokovati nekrozu pulpnog tkiva usled potpunog prekida snabdevanja krvlju apeksnog parodontijuma ^{168, 225, 255}. Posebnu vrstu mehaničko-jatrogenih oštećenja periapikalnih struktura čine mikrotraume nastale kao posledica neadekvatnih restaurativnih ispuna. Oni uzrokuju mehaničke povrede nervno-vaskularnog stabla koji ulazi u kanal korena preko apeksnog otvora što dovodi do razvoja zapaljenske reakcije ²⁵⁵.

Zapaljenska reakcija u apeksnom parodontijumu može se razviti i kao posledica dejstva hemijskih etioloških faktora. Naime, hemijska oštećenja najčešće nastaju kao posledica primene jakih antiseptičkih sredstava za irigaciju ili medikaciju kanala tokom endodontske obrade kanalnog sistema zuba ^{160, 168, 255}. Istraživanja su pokazala da i primena različitih preparata za opturaciju kanala korena zuba mogu uzrokovati nastanak zapaljenske reakcije u apeksnom parodontijumu ^{79, 168, 255}.

1.3. PATOGENEZA HRONIČNIH PERIPIKALNIH LEZIJA

Prema savremenim shvatanjima, patogeneza hroničnih periapikalnih lezija objašnjava se imunskim odgovorom organizma na dejstvo različitih štetnih noksi u predelu apeksnog parodontijuma. Kako je ranije rečeno, periapikalne lezije su u najvećem broju slučajeva uzrokovane štetnim dejstvom bakterijskih mikroorganizmama i njihovih produkata iz kanala korena zuba. Stoga možemo reći da su nastale promene u

tkivu apeksnog parodontijuma direktna posledica međusobnog odnosa štetnog dejstva bakterijskih mikroorganizama i imunskog odgovora domaćina^{67, 131, 146, 148, 225, 228}.

U tkivu apeksnog parodontijuma razvija se nespecifična zapaljenska reakcija koja ima za cilj eliminaciju štetnog dejstva uzočnika i ograničavanje širenja nastale zapaljenske reakcije^{148, 225}. Intenzitet, forma i tok zapaljenske reakcije u apeksnom parodontijumu zavise od dužine trajanja nadražaja, vrste i broja mikroorganizama, stepena njihove virulentnosti, kao i sposobnosti organizma da se odbrani od istih^{148, 168, 225, 255}. U okviru imunskog odgovora domaćina aktiviraju se reakcije urođenog i stečenog imuniteta, što uzrokuje prisustvo različitih odbrambenih ćelija i humoralnih medijatora zapaljenja. Patohistološki posmatrano periapikalne lezije predstavljaju produktivno zapaljenje koje se najpre odlikuje formiranjem granulacionog tkiva, a potom i cističnih formacija čije su funkcije istovremeno odbrambene (zapaljenske,) ali i produktivne (resorpcijske)^{168, 255}.

Hronično zapaljenje u predelu apeksnog parodontijuma razvija se kao posledica dugotrajnog dejstva štetnih noksi iz kanala korena zuba kada njihov intenzitet nadjača odbrambene kapacitete organizma. Dobro je poznata činjenica da destruktivni procesi u tkivu nisu posledica isključivo štetnih noksi koje produkuju same bakterije iz kanala korena zuba, nego su i posledica dejstva supstanci koje sekretuje sam imunski sistem domaćina kao odgovor na prisustvo bakterija^{67, 131, 146, 148, 225, 228}. Rana faza zapaljenske reakcije karakteriše se dejstvom različitih medijatora zapaljenja (vazoaktivni amini, metaboliti arahidonske kiseline, proinflamatorni citokini, proteinski sistem plazme i dr.). Ovi medijatori će sa jedne strane voditi vaskularnim promenama u tkivu (vazodilataciji i povećanoj permeabilnosti krvnih sudova), daljoj aktivaciji i migraciji neutrofilnih granulocita i makrofaga, a sa druge strane će dovesti do aktivacije antigen prezentujućih ćelija i aktiviranja ćelija specifičnog imuniteta. Neutrofilni granulociti doprinose razgradnji periapikalnog tkiva oslobađanjem enzima (matriksne metaloproteinaze-MMP), citotoksičnih supstanci (slobodni radikali, reaktivne kiseoničke i azotne vrste), proinflamatornih citokina (faktor nekroze tumora -alfa (TNF- α), IL-1 β , IL-6 i dr.) i stimulacijom ekspresije liganda receptorskog aktivatora za nuklearni faktor κ B (RANKL)^{67, 130}. Koncept patogeneze periapikalnih lezija sa aspekta specifičnog imuniteta objašnjen je odnosom pomoćničkih T limfocita^{62, 115, 122, 123, 129, 170, 251}. U aktivnoj fazi zapaljenja dominira Th1 ćelijski odgovor, pri čemu su CD4+

limfociti brojniji od CD8+ limfocita. Otkriće Th17 dodatno je objasnilo ulogu specifičnog imuniteta u patogenezi periapikalnih lezija³¹. Ove ćelije čvrsto su povezane sa osteoklastnom aktivnošću, jer indukuje ekspresiju MMP-a u fibroblastima, endotelnim i epitelnim ćelijama, kao i ekspresiju RANKL-a na osteoblastima. S druge strane, prisustvo B-limfocita, plazmocita i Th2 ćelija karakteristično je za kasnu fazu razvoja periapikalnih lezija i dovodi se u vezu sa remisijom zapaljenskog procesa i reparacijom oštećenog tkiva^{14, 40, 41, 185, 232}.

Sa patohistološkog aspekta u središtu zapaljenske reakcije apikalnog parodontcijuma nalazi se zona nekroze sastavljena od mrtvih ćelija tkiva, ćelija odbrane i prodrlih mikroorganizama. Oko zone nekroze nalazi se proliferativno granulaciono tkivo sa prisutnim ćelijama hroničnog zapaljenja. U cilju sprečavanja širenja zapaljenske reakcije, aktivirani fibroblasti formiraju splet kolagenih vlakana koji ograničavaju čitav proces prema alveolarnom koštanom tkivu. Kontinuiranim dejstvom štetnih noksi dolazi do proliferacije prisutnog epitelnog tkiva koje vodi poreklo Malessez-ovih epitelnih ostrvaca, što za posledicu uzrokuje nastanak mikrocistične pukotine, njenog rasta i posledičnog nastanka radikularne ciste u predelu apeksnog parodontcijuma^{148, 168, 225, 255}.

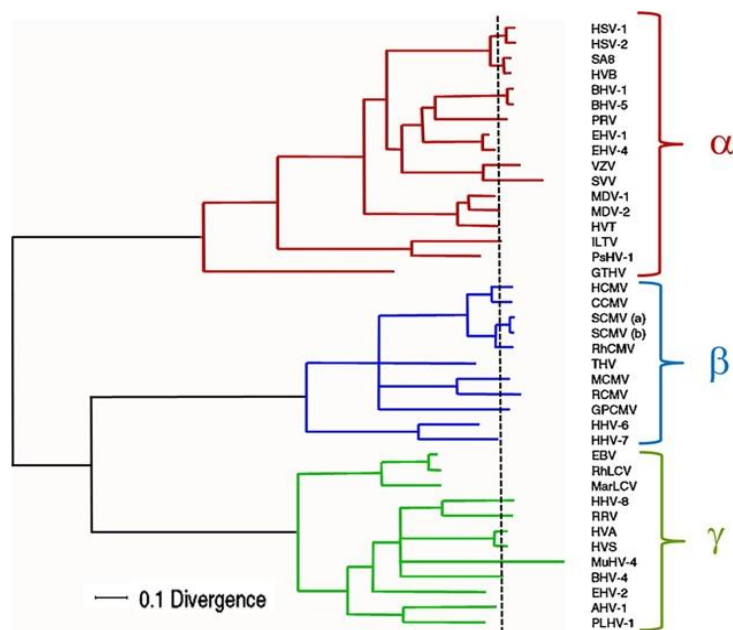
Proliferacija zapaljenskog tkiva praćena je resorpcijom alveolarnog koštanog tkiva u periapikalnom predelu^{130, 137}. Homeostaza koštanog tkiva u organizmu osigurana je balansiranom aktivnošću osteoblasta, osteoklasta i medijatora zapaljenja^{177, 178}. U uslovima kontinuiranog prisustva štetne nokse u apeksnom parodontcijumu dolazi do izraženog dejstva medijatora zapaljenja, pre svega proinflamatornih citokina, koji preko aktivacije RANKL-a dovode do intenzivne osteoklastogeneze. Aktivirani osteoklasti vrše resorpciju koštanog tkiva što predstavlja jednu od najznačajnijih posledica zbivanja u periapikalnom predelu^{22, 78, 130, 137}.

Svi sastavni elementi zapaljenske reakcije u apeksnom parodontcijumu čine složen sistem imunskog odgovora domaćina, pri čemu još uvek nije dovoljno ispitana njihova interakcija i tačni mehanizmi kojima se pojedini delovi tako složenog sistema aktiviraju i uzrokuju nastanak koštane resorpcije.

2. ULOGA HERPESVIRUSA U ETIOPATOGENEZI HRONIČNIH PERIAPIKALNIH LEZIJA

2.1. OPŠTE KARAKTERISTIKE VIRUSA IZ FAMILIJE *HERPESVIRIDAE*

Herpesviridae je naziv za veliku familiju DNK virusa koja obuhvata više od 100 različitih vrsta virusa rasprostranjenih kod ljudi i životinja. Do sada je poznato da 8 humanih herpesvirusa izazivaju nastanak infekcije kod ljudi^{90, 144, 165}. Prema poslednjoj klasifikaciji Internacionalnog komiteta za taksonomiju virusa (*engl. International Committee on Taxonomy of Viruses, (ICTV)*)⁹⁸, familija *Herpesviridae* podeljena je na tri podfamilije: *Alphaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae* i *Gammaherpesvirinae* (Tabela 2.1). Prvobitni taksonomski kriterijumi bazirali su se na biološkim svojstvima virusa, brzini replikacije i tipu ćelije u kojima se uspostavlja latencija. Kasnije, usvojili su se dodatni kriterijumi koji se odnose na homologiju i specifične filogenetske odnose genoma^{90, 144, 165}. Filogenetsko stablo familije *Herpesviridae* predstavljeno je na slici 2.1.



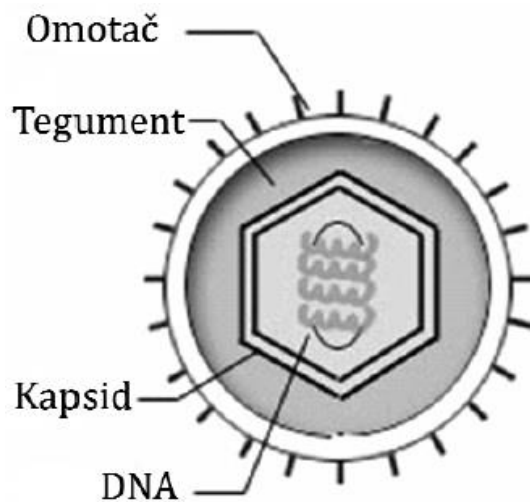
Slika 2.1. Filogenetsko stablo familije *Herpesviridae*. Preuzeto iz⁶⁹.

Tabela 2.1. Klasifikacija humanih herpesvirusa.

Familija <i>Herpesviridae</i>
Podfamilija <i>Alphaherpesvirinae</i>
Rod <i>Simplexvirus</i>
- <i>Humani alphaherpesvirus 1 - Herpes simplex virus 1 (HSV-1)</i>
- <i>Humani alphaherpesvirus 2 - Herpes simplex virus 2 (HSV-2)</i>
Rod <i>Varicellovirus</i>
- <i>Humani alphaherpesvirus 3 - Varicella-zoster virus (VZV)</i>
Podfamilija <i>Betaherpesvirinae</i>
Rod <i>Cytomegalovirus</i>
- <i>Humani betaherpesvirus 5 - Humani cytomegalovirus (CMV)</i>
Rod <i>Roseolovirus</i>
- <i>Humani betaherpesvirus 6A- Humani herpesvirus 6A (HHV-6A)</i>
- <i>Humani betaherpesvirus 6B- Humani herpesvirus 6B (HHV-6B)</i>
- <i>Humani betaherpesvirus 7 - Humani herpesvirus 7 (HHV-7)</i>
Podfamilija <i>Gammaherpesvirinae</i>
Rod <i>Lymphocryptovirus</i>
- <i>Humani gammaherpesvirus 4 - Epstein-Barr virus (EBV)</i>
Rod <i>Rhadinovirus</i>
- <i>Humani gammaherpesvirus 8 - Humani herpesvirus 8 (KSHV) - HHV8</i>

Osnovno obeležje herpesvirusa je njihova sposobnost uspostavljanja perzistentne doživotne infekcije po tipu latentne infekcije. Posle primarne infekcije, virus ostaje u organizmu i uspostavlja perzistenciju odnosno latenciju u određenim ćelijama. Povremeno, pod uticajem određenih nespecifičnih endogenih i egzogenih faktora kao što su stres, hormonski disbalans, zračenje, medicinske intervencije i dr., dolazi do reaktivacije virusa. Pri tome se javljaju simptomatske ili asimptomatske rekurentne infekcije^{90, 144, 165}.

Virion herpesvirusa je veličine oko 150-200 nm i sadrži kapsid ikozaedarne simetrije (100-110nm). Virusna čestica se sastoji od dvolančane, linearne DNK sa terminalno umnoženim krajevima, koju okružuje kapsid izgrađen od 162 prizmatične kapsomere. Oko nukleokapsida se nalazi tegument fibrilarne strukture i spoljašnjeg omotača koji potiče od jedarne membrane inficirane ćelije (slika 2.2). U omotaču se nalaze glikoproteini koji formiraju izdanke veličine 8-10 nm. Iako je organizacija genoma svih herpesvirusa ista, dužina i složenost genoma različita je za svaki herpesvirus. Najduži genom ima CMV oko 220 kbp, a najkraći VZV 120 kbp^{90, 144, 165}.

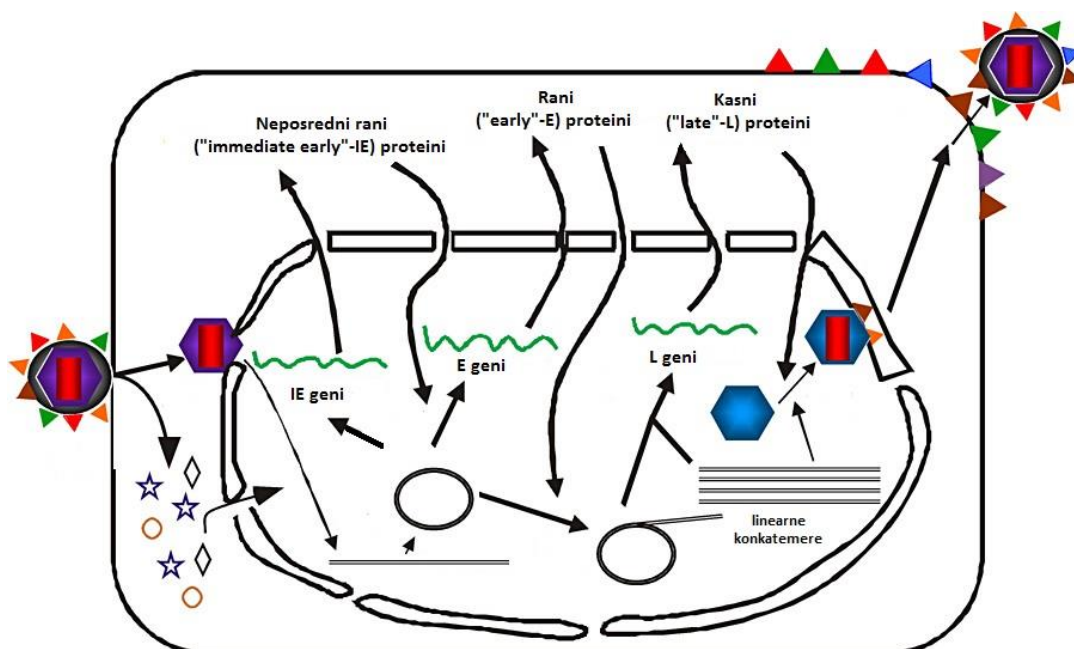


Slika 2.2. Šematski prikaz strukture viriona herpesvirusa. Preuzeto iz ⁹⁰.

Replikacija herpesvirusa počinje vezivanjem virusnih glikoproteina za ćelijske receptore. Posle fuzije virusnog omotača sa ćelijskom membranom nukleokapsid ulazi u ćeliju. Posle dekapidacije, koja se odvija na nivou jedarnih pora, virusni genom se oslobađa u jedru. Dolazi do kaskadne ekspresije virusnog genoma preko najranijeg seta alfa gena, potom ranih beta i kasnih gama gena. Posle sinteze DNK polimeraze (beta proteina), odvija se replikacije virusne DNK po principu "kotrljajućeg obruča" (*engl. rolling circle*), pri čemu se sintetišu konkatemere, sastavljene iz većeg broja linearnih kopija virusnog genoma. Strukturni proteini virusnog kapsida formiraju prokapsid. Terminalni proteini prokapsida iz konkatemera isecaju linearne kopije virusne DNK, ugrađuju je u prokapsid, pri čemu se formiraju zreli nukleokapsidi. Nukleokapsidi izlaze iz jedra pupljenjem pri čemu stiču spoljašnji omotač od jedarne membrane, a zatim napuštaju ćeliju egzocitozom ili lizom inficirane ćelije (Slika 2.3) ^{90, 144, 165}.

Infekcije herpesvirusima su ubikvitarne i prisutne svuda u svetu, tako da je preko 90% populacije inficirano ovim virusima. Podjednako oboljevaju i žene i muškarci, nezavisno od godišnjeg doba. Rezervoar humanih herpesvirusa je čovek. Do primarne infekcije dolazi najčešće respiratornim putem ili kontaktom preko epitelnih ćelija (HSV, VZV, CMV, EBV, HHV 6 i 7), seksualnim kontaktom (HSV, CMV) ili parenteralnim putem (CMV, EBV). Primarna infekcija se događa u detinjstvu i posle toga virus ostaje doživotno u organizmu u latentnom stanju. U toj fazi pritenosti

virusa, dolazi do ekspresije samo ograničenog broja nestrukturnih virusnih gena. U određenim situacijama usled dejstva nespecifičnih endogenih i egzogenih faktora dolazi do reaktivacije virusa sa kliničkim manifestnim ili asimptomatskim infekcijama ^{90, 144, 165}.



Slika 2.3. Šematski prikaz replikacije herpesvirusa. Preuzeto iz ⁹⁰.

Herpesvirusi izazivaju niz bolesti, pri čemu primarna infekcija i reaktivacija istog virusa može da zahvati različite ćelije i organske sisteme i da izazove pojavu različitih kliničkih oboljenja. Poseban značaj imaju infekcije u grupi imunokompromitovanih osoba, kod kojih reaktivacija virusa može da dovede do veoma teških i ozbiljnih oboljenja, koja zahtevaju poseban tretman i terapiju ^{90, 144, 165}.

Virusološka dijagnostika herpesvirusnih infekcija se zasniva na primeni brojnih testova za izolovanje i identifikaciju virusa direktno u kliničkom materijalu. Za praćenje virusnih infekcija koriste se različite molekularne tehnike. Serološka dijagnostika je značajna za dokazivanje primarnih infekcija, ali se ne može koristiti za dijagnostiku reaktivacije virusa ^{90, 144, 165}.

2.2. EPSTEIN-BARR VIRUS

Epstein-Barr virus (EBV) ili *Humani Herpesvirus 4* pripada podfamiliji *Gammaherpesvirinae* i rodu *Lymphocryptovirus*. EBV je otkriven sredinom 60-tih godina prošlog veka upotrebom elektronske mikroskopije u kulturama ćelija Burkittovog limfoma⁵⁴. Epstein i saradnici prikazali su razlike novootkrivenog virusa u odnosu na druge predstavnike herpesvirusa, te tako, EBV postaje prvi humani tumorski virus i prototip buduće “onkogene” podfamilije *Gammaherpesvirinae*. EBV ima visok onkogeni potencijal, i povezuje se sa nastankom određenih tumora u ljudi, poput Burkittovog limfoma i nazofaringealnog karcinoma⁵⁴. Takođe, prisutan je i u limfoproliferativnim bolestima koje se javljaju kod imunokompromitovanih osoba¹¹⁹.

EBV je ubikvitaran i jedan je od najrasprostranjenijih humanih virusa. Čak 90% ljudi starosti preko 40 godina života ima specifična IgG-antitela kao dokaz kontakta s virusom^{90, 119, 144}. Najčešće se prenosi direktnim kontaktom, odnosno salivom koja sadrži veliku koncentraciju aktivno replikovanog virusa, mada je moguć prenos transfuzijom ili transplantacijom organa i kostne srži^{90, 119, 144}.

Morfološke karakteristike EBV se ne razlikuju od opštih morfoloških karakteristika familije *Herpesviridae*¹¹⁹. Dodatno treba napomenuti da se u virusnom omotaču nalazi 11 glikoproteina: MA (membranski antigen) kompleks koji čine gp350/220 (BLLF-1) i gH (gp85, BXLF-2), odgovoran za vezivanje i penetraciju virusa u ćeliju; kompleks gN (BLRF-1) i gM (BBRF-3) čija je uloga u sazrevanju virusa; gB kompleks (gp110, BALF-4) odgovoran za otpuštanje virusa iz litično inficirane ćelije; i 4 proteina omotača nedovoljno ispitanih funkcija: gp78 (BILF-2), gp150 (BDLF-3), gp60 (BILF-1) i BMRF-2^{3, 113}. Genom EBV čini linearna dvolančana DNK dužine 184 kb, sa kapacitetom za kodiranje oko 80 proteina^{90, 119}.

Primarna EBV infekcija obično se događa u prvoj dekadi života, posebno u sredinama sa nižim higijensko-ekonomskim standardom, a najčešće prolazi asimptomatski. U razvijenijim sredinama primarna infekcija najčešće nastaje između 15. i 24. godine života i tada je u 50-70% slučajeva klinički manifestna^{90, 144, 165}.

U zavisnosti od ekspresije pojedinih virusnih gena prisustvo EBV u ćelijama može se manifestovati aktivnom, produktivnom (litičkom), odnosno latentnom ili

neproduktivnom infekcijom. Antigeni EBV su, na osnovu životnog ciklusa virusa u kojima dolazi do njihove ekspresije, svrstani u dve grupe. Produkti litičkih gena učestvuju u replikativnoj fazi, a produkti latentnih gena omogućuju latentnu infekciju. Tokom produktivne (litične) infekcije eksprimira se oko 80 virusnih proteina: aktivatori transkripcije, faktori DNK replikacije, i strukturni proteini poput virusnog kapsidnog antigena (VCA). U latentnoj infekciji eksprimiran je ograničen set od 6 gena koji kodiraju nuklearne proteine (EBNA-1, -2, -3A, -3B, -3C, -LP), 3 gena za latentne membranske proteine (LMP-1, -2A, -2B) i 2 male nekodirajuće RNK (EBER-1 i -2)^{4, 90, 144, 165}.

Aktivna infekcija nastaje *in vivo* tokom primoinfekcije virusom u epitelnim ćelijama orofarinksa i pljuvačnim žlezdama. Zapravo, kada EBV uđe u organizam kroz usta putem salive dospeva do Waldeyer-ovog tonzilarnog prstena orofarinksa u čijem epitelu započinje njegova aktivna replikacija i posledična infekcija. U okviru aktivne infekcije virus prolazi kroz razvojni ciklus uz oslobađanje infektivnih virusnih čestica. Posle primarne infekcije virus ostaje doživotno latentan u B limfocitima čoveka. EBV zapravo inficira naivne B limfocite u lokalnom limfnom tkivu, što pokreće njihovu aktivaciju i transformaciju u limfoblaste. U transformisanim limfoblastima genom EBV se nalazi obično u vidu cirkularnih epizoma i retko je integrisan u genom ćelije domaćina. Nastali limfoblasti su visoko imunogeni te bivaju odstranjeni od strane EBV-specifičnih citotoksičnih T limfocita usled čega dolazi do pojave limfocitoze i atipičnih limfocita. Međutim, preživljavanje virusa moguće je zahvaljujući suprimiranju imunogenih proteina B limfocita usled čega postaju "nevidljivi" za imunološko prepoznavanje. Memorijski B limfociti mogu, usled recirkulacije, da se vrate u faringealni predeo. Tada dolazi do diferencijacije u plazma ćelije i pokretanja litičke infekcije sa kompletnom virusnom replikacijom i aktivnim izlučivanjem virusa putem salive¹⁰⁸. Na taj način, virus obezbeđuje nove ćelijske rezervoare i prenos na novog domaćina. Kod doživotnih EBV nosilaca, male količine virusa mogu se dokazati u ispirku guše i salivi^{90, 119, 144}. Iako je primarna EBV infekcija kod imunokompetentnih osoba u većini slučajeva asimptomatska ili se manifestuje u vidu infektivne mononukleoze, kod imunokompromitovanih osoba EBV infekcija često dovodi do pojave brojnih limfoproliferativnih bolesti, kao što su benigne, poliklonalne hiperplazije ili pojave malignih limfoma¹⁰⁶.

Smatra se da genetička varijabilnost EBV može uticati na ishod odnosa virusa sa imunskim odgovorom domaćina ^{113, 119, 173}. Polimorfizmi gena koji kodiraju EBV nuklearne antigene EBNA-2, EBNA-3A, EBNA-3B, EBNA-3C i EBNA-LP predstavljaju osnov za podelu na EBV genotip 1 (EBV-1) i EBV-2. U zavisnosti od lokusa, genotipovi pokazuju 53-84% identičnosti među sekvencama, sa najmanjim varijacijama u okviru EBNA-2 gena. Zbog toga je osnovna genotipizacija EBV zapravo vezana za polimorfizam EBNA-2 gena ^{47, 121, 201}.

Ranija istraživanja su pokazala da genotipovi EBV imaju različitu geografsku distribuciju, pri čemu je EBV-1 učestaliji u većini populacija ^{35, 254}, uključujući i srpsku populaciju ^{12, 13}. S druge strane, u pojedinim regionima sveta kao što su Nova Gvineja i ekvatorijalna Afrika, distribucija oba genotipa približno je jednaka. U prilog različite geografske distribucije govore i činjenice da se EBV-2 može naći kod skoro polovine endemskih Burkitt-ovih limfoma Afrike, dok je EBV-1 zastupljen u 85% endemskih nazofaringealnih karcinoma Tajvana ²³¹. Primećeno je, takođe, da je EBV-1 učestaliji kod imunokompetentnih osoba ¹⁷¹, a da imunokompromitovani nosioci najčešće imaju EBV-2 ²⁰². Istraživanja su pokazala da imunokompromitovane osobe mogu imati i oba EBV genotipa, što se objašnjava kao superinfekcija tipom 2 u toku imunosupresije ²⁶. Učestalost pojedinih genotipova EBV ispitivana je na uzorcima hroničnog parodontitisa ²⁴⁸ i peri-implantitisa ⁸⁹, pri čemu je pokazana veća zastupljenost EBV-1 u odnosu na EBV-2. S druge strane, učestalost različitih genotipova EBV još uvek nije istražena u uzorcima hroničnih periapikalnih lezija.

2.3. HUMANI CITOMEGALOVIRUS

Humani citomegalovirus (HCMV) ili *Humani Herpesvirus 5* pripada podfamiliji *Betaherpesvirinae* i rodu *Cytomegalovirus* 141. Pronađen je sredinom 50-tih godina prošlog veka od strane tri različite istraživačke grupe koje su međusobno sarađivale u cilju njegovog otkrivanja ^{188, 220, 244}. Upotrebom elektronske mikroskopije njegovo prisustvo uočeno je u tkivu pljuvačnih i limfnih žlezda u vidu virusnih čestica koje formiraju krupne inkluzije u jedru inficiranih ćelija sa okolnim „halo“ efektom poput „sovinog oka“. Pored navedenog izgleda, HCMV karakteriše i najduži genom veličine 220 kbp što ga razlikuje od ostalih pripadnika familije *Herpesviridae*. Ovaj virus je

jedan od najčešćih uzročnika kongenitalnih infekcija novorođenčadi, ali i oportunističkih infekcija kod imunokompromitovanih i transplantiranih bolesnika ¹¹⁰.

HCMV je takođe ubikvitaran, te spada u grupu najrasprostranjenijih humanih virusa. Epidemiološka istraživanja su pokazala da 50–85% čitave populacije do 40. godine života poseduje antitela na HCMV. Iako veoma rasprostranjen, HCMV nije visoko kontagiozan, tako da je za horizontalnu ili vertikalnu transmisiju virusa neophodan direktan kontakt, obično sa telesnim tečnostima inficirane osobe (saliva, sperma, vaginalni sekret, krv i majčino mleko) ²⁸⁻³⁰.

Ni morfološke karakteristike HCMV se mnogo ne razlikuju od opštih morfoloških karakteristika familije *Herpesviridae*. Karakteristično je da virusni omotač HCMV sadrži 6 glikoproteina: gpUL55(gB), gpUL73(gN), gpUL74(gO), gpUL75(gH), UL100(gM) i gpUL115(gL) uključenih u proces ulaska virusa u ćeliju, diseminaciju virusa i sazrevanje viriona. Genom HCMV čini linearna dvolančana DNK dužine od 220 kbp, sa kapacitetom za kodiranje oko 100 proteina ^{90, 110, 141, 144}.

Primarne infekcije HCMV najčešće se dešavaju u najranijem detinjstvu i tada je infekcija najčešće asimptomatska. Novorođenčad se mogu zaraziti intrauterino, perinatalno prolaskom kroz porođajni kanal HCMV-pozitivne majke ili postnatalno majčinim mlekom. U dobi malog i školskog deteta do infekcije dolazi putem salive, dok je u adolescentnoj i odrasloj dobi najčešći prenos polnim putem. Produktivna infekcija koja se dešava tokom primoinfekcije najčešće počinje replikacijom u epitelu sluzokože preko koje je ostvaren kontakt virusa i domaćina. Značajno je da je produktivna infekcija moguća u relativno ograničenom broju ćelija, pre svega fibroblastima, epitelnim i endotelnim ćelijama, makrofagima i ćelijama glatke muskulature ^{90, 110, 141}. Replikacija u permisivnim ćelijama regulisana je ekspresijom virusnih gena koji su, uglavnom u odnosu na vreme ekspresije, klasifikovani u tri grupe – α (najraniji rani), β (rani) i γ (kasni). Ciklus replikacije HCMV je relativno dugačak, tako da nakon produkcije nekoliko hiljada kopija virusnog genoma po inficiranoj ćeliji, do oslobađanja novih virusa dolazi 24 do 48 časova nakon prodora u ćeliju. U inficiranoj ćeliji nastaju tri tipa virusnih čestica – virioni, neinfektivne partikule sa omotačem i gusta tela, koje formiraju krupne inkluzije u jedru. Nakon replikacije dolazi do diseminacije virusa, zahvaljujući monocitima i cirkulišućim endotelnim ćelijama. Kao rezultat sistemskog

širenja virusa dolazi do infekcije u tkivima i organima prema kojima CMV pokazuje specifičan tropizam, a to su pre svega epitelne ćelije duktusa pljuvačnih žlezda, žučne kese, bubrežnih tubula, ali i drugih organa. Na ovaj način stvaraju se uslovi za izlučivanje virusa preko telesnih tečnosti^{23, 24}. Posle primarne infekcije, virus ostaje u latentnom stanju. Latentna infekcija se ostvaruje u progenitorima monocita kostne srži i monocitima krvi. Reaktivacija latentne infekcije je uslovljena diferencijacijom monocita u tkivne makrofage u uslovima lokalnog zapaljenja ili alogene stimulacije²²¹. U imunskom odgovoru na HCMV infekciju ključnu ulogu imaju mehanizmi urođenog i stečenog ćelijskog imuniteta, pri čemu je značaj ćelija prirodnih ubica (NK ćelija) i citotoksičnih T limfocita u kontroli infekcije uveliko dokazana. Međutim, tokom evolutivnog razvoja HCMV je razvio niz mehanizama kojima omogućava dugotrajno održavanje u organizmu domaćina^{140, 187, 222}.

Za razliku od EBV, genom HCMV pokazuje veću genetičku varijabilnost. Prethodna istraživanja vršila su podelu genotipova HCMV na osnovu razlika u sekvencama različitih gena virusa^{110, 141, 144, 240}. Međutim, najučestalija podela HCMV na genotipove izvršena je na osnovu razlika u sekvenci gena UL55 koji kodira HCMV glikoprotein B (gB)¹⁷³. On je strukturni glikoprotein virusnog omotača koji dokazano učestvuje u penetraciji virusa u permissivne ćelije, transmisiji virusa i fuziji inficiranih ćelija. Razlikujemo 4 genotipa HCMV (gB I-IV) koja pokazuju različitu geografsku distribuciju i patogenost¹⁷³. Iako se smatra da gB-I ima manji stepen virulentnosti u odnosu na ostale genotipove HCMV, on je najučestaliji genotip u kongenitalnim HCMV infekcijama⁶. S druge strane, gB-II i gB-III imaju veći stepen virulencije i najčešće se detektuju u oportunističkim infekcijama imunokompromitovanih i transplantiranih pacijenata (124, 125). Ranija istraživanja pokazala su veću učestalost gB-II u odnosu na ostale genotipove HCMV u hroničnom paradontitisu i periimplantitisu^{33, 237}. S druge strane, ispitivanje prisustva različitih genotipova HCMV još uvek nije analizirano u uzorcima tkiva hroničnih periapikalnih lezija.

2.4. HERPESVIRUSI KAO ETIOLOŠKI FAKTORI U NASTANKU HRONIČNIH PERIAPIKALNIH LEZIJA

Bakterije iz kanala korena avitalnih zuba i njihovi štetni produkti dokazani su uzročnici nastanka zapaljenske reakcije u apeksnom parodontijumu. Pored bakterijskih mikroorganizama u kanalu korena avitalnih zuba dokazano je prisustvo i drugih mikroorganizama, pre svega, araha i gljivica^{18, 212, 214}.

Prva istraživanja koja povezuju nastanak zapaljenske reakcije u apeksnom parodontijumu sa prisustvom virusa datiraju iz perioda 60-tih godina prošlog veka^{176, 206}. Rauch je 1958. godine u eksperimentalnom *in vitro* istraživanju pokušao da iz uzoraka kanala korena zuba sa nekrotičnom pulpom kultiviše viruse u bubrenim ćelijama primata. Međutim, virusi nisu bili izolovani iz ćelijskih kultura inokuliranih sa uzorcima nekrotičnih kanala pacijenata prikupljenim papirnim poenima¹⁷⁶. Dalje, 1962. godine Shindell je u metodološki sličnom istraživanju ispitivao prisustvo virusa u HeLa i humanim amnionskim kulturama ćelija pri čemu je i u ovom slučaju nalaz bio negativan²⁰⁶. Kao zaključak navedenih istraživanja istaknuto je da usled negativnih rezultata virusi nisu uzročnici zapaljenskih promena u apikalnom parodontijumu.

Danas, analizirajući rezultate prethodno navedenih istraživanja, dobijeni negativni nalaz bio je zapravo i očekivan. Naime, savremena spoznaja o životnom ciklusu virusa, i potrebe živih ćelija domaćina za proces njihove replikacije i latencije, sugerišu da virus ne može da preživi u kanalu korena zuba sa nekrotičnom pulpom¹⁸. Bez obzira na vrstu ćelija u kojima je pokušana kultivacija virusa, oni nisu mogli biti izolovani, jer nisu ni bili prisutni u nekrotičnom pulpnom tkivu odakle je uziman uzorak za inokulaciju. To su potvrdili i rezultati savremenih istraživanja koji ukazuju na nemogućnost detekcije herpesvirusa u uzorcima tkiva ireverzibilnog pulpitisa i nekrotične pulpe^{72, 186}.

Razvojem savremenih tehnika molekularne biologije i njihovom upotrebom u svakodnevnoj dijagnostici virusnih infekcija otvara se novo poglavlje u virusnoj etiopatogenezi periapikalnih lezija.

Detekciji virusa u tkivima periapikalnih lezija prethodila su istraživanja na polju utvrđivanja virusne etiopatogeneze u različitim formama parodontitisa. Naime, u

istraživanjima Parra-a, Contreras-a i Slots-a iz 1996. godine upotrebom metode lančane reakcije polimeraze (*engl. polymerase chain reaction (PCR)*) dokazana je veća učestalost detekcije HCMV i EBV u eksudatu parodontalnog odnosno gingivalnog džepa kod pacijenata sa uznapredovalom parodontopatijom u odnosu na pacijente sa gingivitisom^{42, 162}. U seriji istraživanja koja su usledila pokazana je aktivna replikacija herpesvirusa dokazivanjem transkripcije iRNK RT-PCR tehnikom (PCR kome prethodi reverzna transkripcija), kao i povećan broj genskih kopija herpesvirusa upotrebom *real-time* PCR tehnike (PCR u „realnom vremenu“) u različitim formama parodontitisa u odnosu na zdravu kontrolu^{43, 94, 102, 103}. Dobijeni rezultati naveli su istoimene istraživače da imenuju viruse iz familije *Herpesviridae* kao dodatne uzročnike nastanka parodontitisa^{44, 217}.

Nedugo zatim, Sabeti i saradnici ispitivali su prisustvo herpes virusa u tkivu hroničnih periapikalnih lezija, smatrajući da navedeni virusi učestvuju u procesu njihovog nastanka po modelu kojim doprinose razgradnji alveolarnog koštanog tkiva, kao i u marginalnom parodontitisu^{194, 195}. Najpre, ispitivano je prisustvo aktivne infekcije HCMV, EBV i Herpes simplex virusa (HSV) u uzorcima periapikalnih lezija koji su prikupljeni u toku apikotomije¹⁹⁵. Analizirano je 16 uzoraka, 13 simptomatskih i jedna asimptomatska periapikalna lezija i 2 uzorka zdravog periapikalnog tkiva. Od 14 periapikalnih lezija, HCMV je bio prisutan u njih 13, uključujući i jednu asimptomatsku. EBV je detektovan u 8 od 13 simptomatskih lezija, a HSV nije detektovan ni u jednom uzorku. U dva uzorka periapikalnog tkiva bez patoloških promena nije identifikovan ni jedan od ispitivanih virusa. U okviru istraživanja pokazano je i da je koinfekcija HCMV i EBV bila značajno češća u grupi većih periapikalnih lezija (>5x7mm)¹⁹⁵.

Primenjujući istu metodologiju, ovi autori su analizirali prisustvo virusa u sedam simptomatskih i sedam asimptomatskih periapikalnih lezija, pri čemu su simptomatske lezije bile one koje su pokazivale kliničke znake akutnog zapaljenja (bol, otok, palpatornu ili perkutornu osetljivost)¹⁹⁴. Aktivna HCMV infekcija bila je prisutna u svih 7 simptomatskih i jednoj asimptomatskoj leziji. EBV infekcija detektovana je u 6 simptomatskih i jednoj asimptomatskoj leziji, dok je HSV bio uočen samo u jednoj asimptomatskoj leziji. Analizirajući ove rezultate, autori su zaključili da postoji veza

između egzacerbacije periapikalnog zapaljenja i aktivne replikacije ovih virusa i da je moguće da HCMV i EBV imaju određenu ulogu u patogenezi periapikalnih lezija.

Od 2003. godine kada su sprovedena prva istraživanja pa sve do početka pisanja ove doktorske disertacije objavljeno je 20 studija koje su se bavile prisustvom i ulogom herpesvirusa u etiopatogenezi hroničnih periapikalnih lezija ^{5, 73-75, 91, 116, 126, 158, 189-192, 194-196, 218, 226, 236, 249, 250}. Sveobuhvatna analiza publikovanih istraživanja u ovoj oblasti pokazala je da su EBV i HCMV najčešće detektovani virusi iz familije *Herpesviridae* u tkivima hroničnih periapikalnih lezija ⁸⁵. Međutim, i dalje postoje različiti podaci o učestalosti njihove detekcije. Ranija istraživanja sprovedena na manjem broju uzoraka tkiva periapikalnih lezija pokazala su veću učestalost HCMV u odnosu na EBV ^{158, 194, 195, 218, 249}. Sa druge strane, istraživanja koja su usledila, a koja su sprovedena na većem uzorku uz upotrebu senzitivnijih i specifičnijih metoda za detekciju herpesvirusa, ukazala su na veću učestalost EBV u odnosu na HCMV ^{73-75, 116, 190, 226, 236, 250}. Zajednička karakteristika većine publikovanih studija je da su herpesvirusi značajno češće detektovani u tkivima periapikalnih lezija u odnosu na kontrolno zdravo tkivo ^{73-75, 116, 250}. Dalje, rezultati pokazuju veću učestalost herpesvirusa u simptomatskim u odnosu na asimptomatske i u velikim u odnosu na male periapikalne lezije ^{74, 116, 194, 218, 236, 249}. Kvantitativna analiza herpesvirusa do sada je sprovedena samo u 4 studije na relativno malom broju uzoraka tkiva periapikalnih lezija (ukupno 110) ^{126, 190, 226, 236}. Rezultati istraživanja ukazuju na evidentne razlike u broju genskih kopija EBV i HCMV u periapikalnim lezijama između pomenutih studija. U dva istraživanja potvrđena je značajna razlika u broju genskih kopija EBV između simptomatskih i asimptomatskih lezija ^{190, 236}. Dodatno, Makino i saradnici su potvrdili razliku u broju kopija EBV između periapikalnih lezija i kontrolnog zdravog tkiva ¹²⁶. Iako je pokazano da različiti genotipovi EBV i HCMV mogu uticati na tok i ozbiljnost kliničke slike nastalog oboljenja, njihovo prisustvo u tkivima periapikalnih lezija još uvek nije analizirano.

Na osnovu objavljenih istraživanja do sada su postavljene dve moguće hipoteze o ulozi herpesvirusa u patogenezi periapikalnih lezija. **Prvu hipotezu** postavili su Slots i saradnici 2003. godine, i ona je zasnovana na sinegrijskom odnosu herpesvirusa i patogenih bakterijskih vrsta kanala korena zuba ²¹⁹. U suštini, navedeni sinergizam se ogleda u činjenici da bakterije i njihovi štetni produkti iz kanala korena zuba uzrokuju hemotaksu ćelija imunskog odgovora u kojima herpesvirusi održavaju latenciju, na

mesto zapaljenja u apeksnom parodonticijumu. U uslovima povećanog stvaranja medijatora zapaljenja dolazi do reaktivacije herpesvirusa koji u daljem toku zapaljenja periapikalnog tkiva imaju dvostruku ulogu. Naime, herpesvirusi imaju mogućnost ispoljavanja **direktnog** citopatogenog dejstva na fibroblaste, epitelne i endotelne ćelije, kao i ćelije imunskog sistema^{119, 141}. Pošto navedene ćelije učestvuju u izgradnji gradivnih elemenata apeksnog parodonticijuma njihovim oštećenjem dolazi do razgradnje periapikalnog tkiva, a samim tim je onemogućena i njegova regeneracija. Herpesvirusi doprinose oštećenju tkiva i **indirektnim** putem tako što uobličavaju imunski odgovor domaćina. Zapravo, u odbrani organizma od virusnih infekcija učestvuju elementi celularnog imuniteta. Herpesvirusna infekcija doprinosi povećanoj aktivnosti T-citotoksičnih limfocita na mestu zapaljenja koji svojim efektorskim mehanizmima mogu doprineti dodatnom oštećenju periapikalnog tkiva. Nadalje, povećana je aktivnost T-pomoćničkih limfocita koji dovode do intenzivne produkcije proinflatornih citokina, čime dodatno stimulišu tkivnu resorpciju. Herpesvirusi imaju mogućnost i utišavanja imunskog odgovora uobličavanjem dejstva molekula imunskog prepoznavanja. T i B limfociti svoje aktivnosti izvršavaju nakon prepoznavanja antigena pomoću molekula glavnog kompleksa tkivne podudarnosti I i II (*engl. major histocompatibility complex* (MHC)). Međutim, peptidne komponente herpesvirusa imaju mogućnost vezivanja za glikoproteine navedenih molekula i na taj način onemogućavaju njihovu ekspresiju na površini ćelije što dovodi do održavanja virusa u latentnom stanju^{140, 234}. Takođe, ovim aktivnostima odbrana organizma od virusa je svedena na dejstvo ćelija prirodnih ubica (*engl. natural killer* (NK)). Međutim, istraživanja su pokazala da su herpesvirusi razvili mehanizam intenzivne lize NK ćelija na mestu zapaljenja, što dodatno slabi imunski odgovor domaćina²³³.

U okviru predložene hipoteze autori su naveli da je odnos između herpesvirusa i bakterija dvosmeran. Zapravo, mehanizmima uobličavanja imunskog odgovora herpesvirusi stvaraju pogodno tlo za dalji razvoj bakterijskih mikroorganizama na mestu zapaljenja^{10, 157}. Takođe, istraživanja su pokazala da eksprimirani proteini herpesvirusa na inficiranim ćelijama domaćina služe bakterijama kao nova mesta za vezivanje što im omogućava lakše ispoljavanje patogenog dejstva^{1, 57}.

Druga hipoteza proistekla je iz istraživanja Ferreire i saradnika 2011. godine koji su detektovali prisustvo različitih herpesvirusa u jako malom broju uzoraka akutnog

periapikalnog apscesa^{58, 59}. Ovi istraživači naveli su da detekcija herpesvirusa u uzorcima periapikalnog tkiva zahvaćenog zapaljenjem predstavlja epifenomen koji je uzrokovan bakterijskom infekcijom, a posledica je hemotakse ćelija imunskog sistema na mesto zapaljenja u kojima virusi održavaju latenciju. Takođe, autori su naveli da prisustvo virusne DNK u uzorcima tkiva periapikalnih lezija neminovno ne podrazumeva i njihovu ulogu u patogenezi navedenih patoloških stanja^{58, 59}.

3. ULOGA PROINFLAMATORNIH CITOKINA U ETIOPATOGENEZI HRONIČNIH PERIAPIKALNIH LEZIJA

3.1. OPŠTE KARAKTERISTIKE CITOKINA

Citokini (grč. „*cytos*“ - ćelija; i „*kinein*“ - pomerati se) predstavljaju solubilne polipeptidne ili glikopeptidne molekule relativno male molekularne mase (6-70 kDa). To su biološki aktivne molekule koje mogu biti sekretovane od raznih ćelija u ljudskom organizmu, a najčešće ih proizvode ćelije urođenog i stečenog imunskog odgovora¹.

Prvobitna nomenklatura citokina bila je bazirana na njihovom poreklu, odnosno na tipu ćelija koje ih proizvode. Tako su citokini urođenog imunskog odgovora koje su proizvodili mononuklearni fagociti nazvani *monokini*, dok su citokini stečenog imunskog odgovora, sekretovani od strane T limfocita, nazvani *limfokini*. Istraživanja koja su usledila potvrdila su da različiti citokini mogu biti proizvodjeni od različitih tipova ćelija, te je zbog toga prihvaćeno zajedničko ime za ove molekule – *citokini*. S druge strane, izraz *interleukin* ostao je u upotrebi i označava grupu bioloških medijatora odgovornih za međusobnu interakciju leukocita⁸⁸.

Vrsta i količina sekrecije pojedinih citokina zavisi od vrste i stepena diferencijacije ćelije koja je podstaknuta na sekreciju. Aktivnost citokina zavisi od njihove koncentracije i jačine ekspresije specifičnih receptora na površini ciljne ćelije. Oni deluju preko specifičnih receptora u samoj ciljnoj ćeliji ili na njenoj ćelijskoj membrani. Povećanje ekspresije citokinskih receptora nastaje usled antigene stimulacije T i B limfocita. Nakon vezivanja za specifične receptore citokini dovode do transkripcije gena sa posledičnim fenotipskim ili funkcionalnim promenama ciljne ćelije. Na mnoge efektorne ćelije citokini deluju kao regulatori ćelijske deobe ili kao faktori rasta. Tako da kao rezultat dejstva citokina dolazi do proliferacije, diferencijacije

i aktivacije efektorskih ćelija imunskog sistema (T, B limfocita i makrofaga). Sinteza i otpuštanje citokina regulisana je mehanizmom negativne povratne sprege koji se zasniva na inhibiciji ekspresije specifičnih receptora na ciljnim ćelijama^{25, 36, 134}.

Iako predstavljaju veliku i heterogenu grupu biološki aktivnih molekula citokini ipak imaju određene zajedničke karakteristike. Dokazano je da je dejstvo citokina pleotropno. Naime, oni ne deluju specifično na određene tipove ćelije, nego svoj efekat ispoljavaju na različitim tipovima ćelija što uslovljava nastanak različitih bioloških efekata u organizmu. Takođe, oni pokazuju svojstvo redundantnosti, što znači da više različitih citokina deluje na isti način na ciljnu ćeliju. Citokini mnoge svoje efekte mogu da ostvaruju udruženim, sinergističkim delovanjem, ali je pokazano da njihovo delovanje može biti i antagonističko. Aktivnost citokina može biti sistemska i lokalna. Većina citokina deluje u blizini mesta sinteze, na same ćelije koje ih okružuju (autokrina aktivnost) ili na okolne ćelije (parakrina aktivnost). Takođe, citokini mogu da ispolje i sistemsko dejstvo kada putem cirkulacije dospeju do udaljenih mesta gde ispoljavaju svoju aktivnost (endokrina aktivnost)^{70, 230}.

Postoje različite podele citokina, međutim najčešće su podeljeni na osnovu primarne biološke aktivnosti, tako da razlikujemo:

a.) Citokini – medijatori i regulatori nespecifične imunosti

U nespecifičnoj imunskoj reakciji učestvuje čitava mreža citokina (IL-1, IL-6, IL-10, IL-12, IL-15, IFN, TNF, hemokini i dr.) koje produkuju ćelije mononuklearnofagocitnog sistema i dendritične ćelije. Većina ovih citokina ispoljava svoju aktivnost na endotelnim ćelijama i leukocitima stimulišući ranu fazu zapaljenskog odgovora domaćina.

b.) Citokini – medijatori i regulatori specifične imunosti

Citokine ove grupe (IL-2, IL-4, IL-5, IL-13, Interferon (IFN)- γ , transformišući faktor rasta beta (TGF- β) i dr.) uglavnom produkuju T limfociti u odgovoru na specifične strane antigene. Navedeni citokini učestvuju u proliferaciji i diferencijaciji T limfocita, kao i regulaciji delovanja T efektorskih limfocita.

c.) Citokini koji stimulišu hematopoezu

Ovi citokini se proizvode od strane stromalnih ćelija kostne srži. Svoj stimulatorni efekat ispoljavaju na rast i diferencijaciju nezrelih ćelija leukocitne loze.

3.2. PROINFLAMATORNI CITOKINI OD ZNAČAJA ZA PATOGENEZU HRONIČNIH PERI-APIKALNIH LEZIJA

Aktivnost citokina u organizmu je zasnovana na njihovoj međusobnoj povezanosti pomoću složene mreže odbrambenih ćelija, specifičnih receptora i signala za njihovu produkciju. Poznato je da citokini mogu biti pozitivni, ali i negativni regulatori imunskog odgovora, odnosno da pored pozitivnih mogu uzokovati i štetna dejstva na tkivo domaćina. Shodno tome, svi citokini na osnovu navedenih svojstava mogu se podeliti na proinflamatorne i antiinflamatorne citokine^{52, 53}. U okviru ove doktorske disertacije posebna pažnja biće posvećena ulozi proinflamatornih citokina (TNF- α , IL-1 β i IL-6) u patogenezi hroničnih periapikalnih lezija. U narednom delu biće opisane opšte karakteristike TNF- α , IL-1 β i IL-6.

3.2.1. FAKTOR NEKROZE TUMORA – ALFA

Faktor nekroze tumora-alfa (*engl. Tumor Necrosis Factor-Alpha* (TNF- α)) član je superfamilije strukturno sličnih molekula koji su od ključnog značaja za veliki broj bioloških procesa u ćelijama sisara¹. Otkriven je kao citokin koji je važan u indukciji hemoragijske nekroze tumora, pa otuda i njegov naziv^{34, 68}. Ranija istraživanja su pokazala da se razlikuju dve forme TNF: TNF- α (raniji naziv kaheksin) i TNF- β (limfotoksin)¹⁶⁹.

TNF- α se sintetise kao monomerni transmembranski protein (tmTNF) koji se inkorporira u membranu ćelija kao homotrimer. Ovde biva isečen od strane matriksne metaloproteinaze TACE (*engl. TNF Alpha Converting Enzyme*) u solubilnu formu koja cirkuliše takođe kao trimer (sTNF). Obe forme TNF su biološki aktivne i proizvode ih razne ćelije imunskog sistema, pre svega aktivirani makrofagi, ali takođe i T- i B-limfociti, NK ćelije, dendritične ćelije i monociti. Svoje dejstvo ostvaruje posredstvom dve vrste receptora TNFR1 i TNFR2. To su membranski glikoproteini koji specifično vezuju TNF, te su prisutni na gotovo svim ćelijama u organizmu. Ovi receptori se razlikuju po svojim ekspresionim profilima, afinitetu za ligand, strukturi citoplazmatskog repa i aktivaciji nishodnih signalnih puteva. TNFR1 je ekspimiran na

većini ćelija i može biti aktiviran vezivanjem kako tmTNF tako i sTNF, sa preferencijom vezivanja sTNF, dok je TNFR2 eksprimiran na imunskim i endotelnim ćelijama i aktiviran se uglavnom od strane tmTNF^{124, 169, 238}.

Bez obzira koje ga ćelije proizvode on ispoljava proinflamatorno dejstvo i ima značajnu ulogu u mnogim biološkim procesima u organizmu. TNF- α dovodi do nekroze i apoptoze tumora, učestvuje u odbrani domaćina od bakterijskih i virusnih infekcija, predstavlja endogeni pirogen koji izaziva groznicu. Dodatno, on je jedan od ključnih medijatora u akutnom i hroničnom zapaljenju. Pored toga što može da uzrokuje sopstvenu sekreciju, TNF- α stimuliše sekreciju drugih proinflamatornih citokina i hemokina. Pokazana je i njegova štetna uloga u brojnim autoimunskim oboljenjima, poput reumatoidnog artritisa, inflamatorne bolesti creva, multiple skleroze i sistemskog eritemskog lupusa^{11, 39, 138}.

3.2.2. INTERLEUKIN 1-BETA

Danas je poznato da interleukin-1 (IL-1) predstavlja porodicu od oko 11 citokina koji imaju veoma značajnu ulogu u regulaciji imunskog odgovora domaćina u toku zapaljenske reakcije. Kao član te porodice IL-1 β je tipični predstavnik proinflamatornih citokina i proizvode ga mnogobrojne ćelije uključujući makrofage, monocite, NK ćelije, leukocite, limfocite, fibroblaste, endotelne i epitelne ćelije. Pored IL-1 β razlikujemo i IL-1 α . Specifično je da ove dve forme pokazuju strukturnu identičnost manju od 30%, ali se vezuju za iste membranske receptore i imaju istu biološku aktivnost^{51, 210}.

IL-1 β se sintetizuje kao prekursor, a sekretuje kao zreli protein koji biva proteolitički razgrađen cistein proteaza kaspazom-1 da bi postao biološki aktivan. Svoj efekat ispoljava vezivanjem za membranski receptor IL-1R. Ovaj citokin može da ispolji i lokalno i sistemsko dejstvo. Naime, ustanovljeno je njegovo dejstvo u aktivaciji proteina akutne faze, prostaglandina, drugih citokina, te indukciji sinteze kolagena i kolagenaze. Takođe, stimuliše proliferaciju limfocita, produženu produkciju limfokina od strane T ćelija i imunoglobulina od strane plazma ćelija. Značaj IL-1 β na sistemskom nivou potvrđen je njegovom ulogom u patogenezi šoka, groznice, zarastanja rana i procesu hematopoeze^{1, 25, 36, 70, 88, 134, 138, 230}.

3.2.2. INTERLEUKIN-6

Interleukin-6 (IL-6) pripada grupi proinflammatoryh citokina, ali može pokazivati i antiinflammatoryno dejstvo. Produkuju ga različite vrste ćelija uključujući, monocite, makrofage, T i B limfocite, fibroblaste, hepatocite, endotelne i nervne ćelije. Aktivan oblik IL-6 je homodimer koji svoje dejstvo ispoljava vezivanjem za specifične receptore na površini ciljnih ćelija. Proinflammatoryna uloga IL-6 potvrđena je njegovim učešćem u ranoj fazi zapaljenja. Međutim, IL-6 se karakteriše i inhibicijom aktivnosti TNF- α i IL-1 β što ukazuje na njegovu antiinflammatorynu aktivnost^{83, 100, 154}.

IL-6 ima veoma širok spektar i bioloških aktivnosti. U nespecifičnom imunskom odgovoru stimuliše sintezu proteina jetre i produkciju neutrofila. S druge strane, u okviru specifičnog imunskog odgovora IL-6 stimuliše proliferaciju T i B limfocita, te podstiče stvaranje imunoglobulina od strane aktiviranih B limfocita. IL-6 ostvaruje značajnu ulogu u procesu hematopoeze. Naime, on stimuliše sazrevanje megakariocita, fragmenataciju njihove membrane i sintezu trombocitnih proteina^{1, 25, 36, 70, 88, 134, 138, 230}.

3.3. VEZA IZMEĐU PROINFLAMATORNIH CITOKINA I HERPESVIRUSA U PATOGENEZI HRONIČNIH PERIAPIKALNIH LEZIJA

Mnogobrojna istraživanja dokazala su da proinflammatory citokini kao biološki aktivni molekuli predstavljaju medijatore zapaljenja koji doprinose nastanku i progresiji hroničnih periapikalnih lezija^{130, 131, 207, 208, 239}.

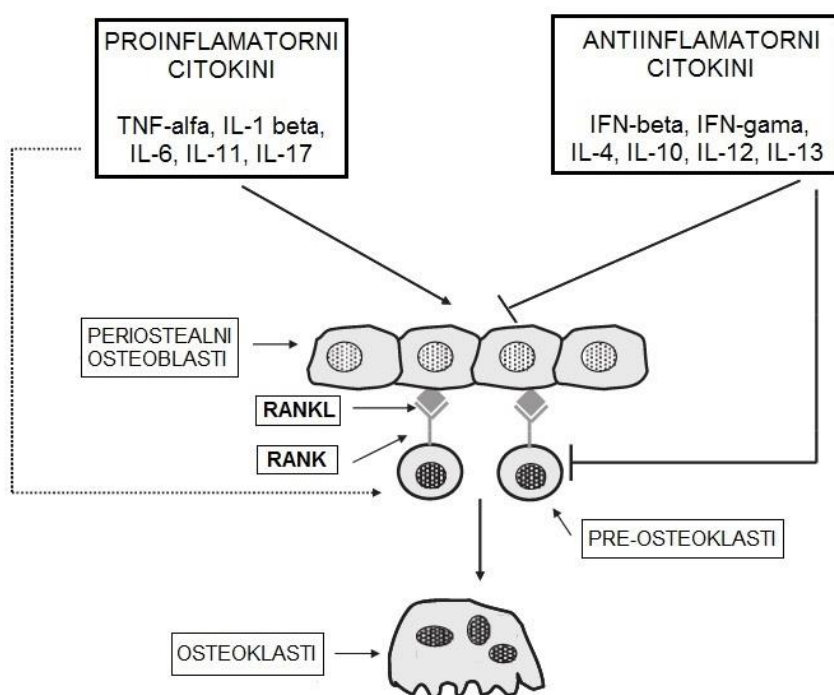
Devedesetih godina prošlog veka dokazano je prisustvo TNF- α , IL-1 β i IL-6 u eksudatu i tkivu periapikalnih lezija^{15, 16, 197}. Kawashima i Stashenko su 1999. godine ispitivali prisustvo i promenu vrednosti proinflammatoryh citokina u veštački nastalim periapikalnim lezijama na eksperimentalnom modelu pacova⁹⁵. Njihovi rezultati su pokazali da je u periodu intenzivne koštane razgradnje u periapikalnom predelu i širenju lezije između 7. i 14. dana došlo do značajnog povećanja vrednosti posmatranih citokina. Navedeni autori istakli su u zaključku istraživanja da je resorpcija alevolarne kosti pacova posledica štetnog dejstva proinflammatoryh citokina čije su vrednosti u toku nastanka lezija bile povećane⁹⁵.

U istraživanjima koja su usledila uočene su povećane vrednosti TNF- α , IL-1 β i IL-6 u tkivima humanih periapikalnih lezija^{8, 63, 127, 172, 174}. Naime, istraživanja su

pokazala da su vrednosti IL-6 značajno povišene u simptomatskim i velikim u odnosu na asimptomatske i male periapikalne lezije ^{8, 172, 174}. Gazivoda i saradnici su 2009. godine pokazali da su i vrednosti TNF- α i IL-1 β značajno povišene u simptomatskim u odnosu na asimptomatske periapikalne lezije ⁶³. Dalje, Martinho i saradnici su 2012. godine poredili nivo ekspresije proinflammatoryh citokina i vrednosti endotoksina produkovanog od strane bakterija iz kanala korena zuba zahvaćenih periapikalnim lezijama ¹²⁷. Rezultati istraživanja potvrdili su značajnu pozitivnu korelaciju između povećane koncentracije endotoksina bakterija i povećane ekspresije proinflammatoryh citokina (TNF- α , IL-1 β , IL-6 i prostaglandina E₂ (PGE₂)). Takođe, pokazano je da su nivoi ekspresije proinflammatoryh citokina bili u značajnoj pozitivnoj korelaciji sa radiološkim i kliničkim karakteristikama periapikalnih lezija ¹²⁷. U zaključku istraživanja navedeno je da proinflammatoryh citokini doprinose nastanku i razvoju periapikalnih lezija što je objašnjeno njihovom ulogom u procesu osteoklastogeneze i koštane resorpcije u periapeksu. Autori su takođe zaključili da bakterijski štetni produkti (endotoksin) doprinose povećanju produkcije citokina na mestu zapaljenja ¹²⁷.

Homeostaza koštanog tkiva u ljudskom organizmu posledica je balansiranog delovanja osteoblasta, osteoklasta i različitih medijatora zapaljenja ^{107, 177, 178}. Razvojem istraživanja na polju osteoimunologije dokazano je da značajnu ulogu u homeostazi koštanog tkiva ima triplet molekula RANK/RANKL/OPG koji su deo TNF/TNFR superfamilije citokina i receptora ⁷⁸. RANKL u uslovima normalnog koštanog metabolizma ekspimiraju osteoblasti, dok je u zapaljenju ekspimiran i od strane T i B limfocita, fibroblasta i mononuklearnih ćelija. RANK (receptor aktivator nuklearnog faktora κ B) je površinski ćelijski transmembranski receptor, ekspimiran na monocitno/makrofagnoj liniji ćelija, B i T limfocitima, dendritičnim ćelijama, fibroblastima, kao i prekursorima i zrelim osteoklastima. Po vezivanju RANKL za RANK dolazi do transformacije preosteoklasta u osteoklaste, potom i njihove aktivacije što uzrokuje nastanak koštane resorpcije. Treći član ovog sistema je osteoprotežerin (OPG) a proizvode ga fibroblasti i epitelne ćelije. On je prirodni inhibitor RANKL, jer je sposoban da se veže za RANKL i na taj način spreči vezivanje RANKL-a za RANK. Sabeti i saradnici ¹⁹³ su 2005. godine dokazali prisustvo RANKL u tkivima periapikalnih lezija, dok su te iste godine Zhang i Peng ²⁵² dokazali njegovo prisustvo u tkivu veštački indukovane periapikalne lezije pacova. Nedugo zatim, Kawashima i

saradnici ispitivali su odnos RANK/RANKL/OPG i proinflammatoryh citokina (TNF- α , IL-1 β , IL-6) u tkivu periapikalnih lezija pacova ⁹⁶. Njihovi rezultati su pokazali da su se vrednosti RANKL i ispitivanih citokina istovetno povećavale i da su bile najveće 14. dana razvoja lezije, što je pokazalo njihovu povezanost u procesu osteoklastogeneze i koštane resorpcije periapikalnog tkiva. U istraživanjima koja su usledila dokazan je međusobni odnos proinflammatoryh citokina i RANKL u resorpciji alveolarnog koštanog tkiva ^{22, 49, 136}. Pokazano je da proinflammatoryh citokini doprinose osteoklastogenezi stimulisanjem produkcije RANKL u zapaljenju. U daljem toku, nastali molekuli RANKL vezuju se za RANK i doprinose diferencijaciji preosteoklasta u osteoklaste koji dalje vrše resorpciju koštanog tkiva (Slika 3.1).



Slika 3.1. Međusobni odnos RANKL i proinflammatoryh citokina u procesu razgradnje alveolarnog koštanog tkiva.

Početak 21. veka nizom istraživanja je pokazano da primarna infekcija EBV i HCMV doprinosi povećanju produkcije proinflammatoryh citokina na mestu zapaljenja ^{82, 135, 142, 200}. Tako se infekcija HCMV povezivala sa povećanom produkcijom IL-1 β , IL-6, IL-12, TNF- α , i IFN- γ ^{32, 166}, dok su nivoi IL-1 β , IL-1Ra, IL-6, IL-8, IL-18, TNF-

α , i IFN- γ bili povećani u toku EBV infekcije^{45, 120}. Dodatno, Slots je smatrao da herpesvirusi mogu doprineti patogenezi periapikalnih lezija povećanjem nivoa proinflammatoryh citokina na mestu zapaljenja²¹⁹.

Do sada su samo 3 istraživanja ispitivala povezanost prisustva herpesvirusa i nivoa proinflammatoryh citokina u tkivima periapikalnih lezija^{74, 190, 250}. Yildirim i saradnici su ispitivali prisustvo EBV i HCMV DNK, kao i mRNK transkripata za RANKL, OPG, transformišući faktor rasta-beta (engl. *Transforming Growth Factor* (TGF)- β), faktor stimulacije kolonije (engl. *Colony Stimulating Factor* (CSF)) i monocitno hemotaksični protein-1 (engl. *Monocyte chemoattractant protein* (MCP)-1) u 12 uzoraka tkiva periapikalnih lezija i 12 uzoraka neinflamiranog pulpnog tkiva²⁵⁰. Rezultati istraživanja pokazali su značajno veće prisustvo RANKL u periapikalnim lezijama u odnosu na kontrolno tkivo. S druge strane, autori nisu pronašli značajnu povezanost između prisustva herpesvirusa i analiziranih citokina u ispitivanom uzorku²⁵⁰.

Sabeti i saradnici su 2012. godine ispitivali odnos prisustva EBV i HCMV i nivoa ekspresije mRNK za TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-10 i IFN- γ između 9 simptomatskih i 6 asimptomatskih lezija¹⁹⁰. Autori navode da su HCMV i EBV značajnije zastupljeni u simptomatskim u odnosu na asimptomatske lezije. Takođe, nivoi ekspresije svih ispitivanih citokina bili su značajno veći u simptomatskim u odnosu na asimptomatske lezije. Autori su naveli da je postojala i značajna korelacija između EBV, HCMV, TNF- α , IFN- γ , IL-1 β , IL-6 i IL-12 u simptomatskim periapikalnim lezijama. Poslednje istraživanje provedeno je 2013. godine od strane Hernadi i saradnika⁷⁴. Autori su ispitivali učestalost detekcije EBV i HCMV, kao i nivo ekspresije mRNK za TNF- α i TGF- β u 58 uzoraka periapikalnih lezija i 20 uzoraka zdravog gingivalnog tkiva. Rezultati istraživanja su pokazali da je jedino vrednost TNF- α bila značajno povećana u EBV pozitivnim u odnosu na EBV negativne periapikalne lezije⁷⁴.

Prikazana istraživanja sprovedena su na relativno malom broju uzoraka (ukupno 76). Potrebno je sprovesti studije na većem broju uzoraka tkiva periapikalnih lezija u cilju dodatnog ispitivanja i eventualnog utvrđivanja uloge herpesvirusa u stimulaciji sekrecije proinflammatoryh citokina.

II NAUČNA OSNOVA PROBLEMA

Periapikalne lezije se karakterišu hroničnom zapaljenskom reakcijom koja uzrokuje razgradnju alveolarnog koštanog tkiva u predelu vrha korena avitalnih zuba^{130, 225}. Hirurško lečenje ovih patoloških stanja predstavlja jedan od najčešćih operativnih zahvata u oralnoj hirurgiji, pri čemu potencijalne komplikacije nelečenih periapikalnih lezija mogu dovesti do ozbiljnih infekcija dubokih prostora glave i vrata¹⁶⁷.

U osnovi njihovog nastanka je nekroza pulpnog tkiva koja može biti uzrokovana različitim etiološkim faktorima¹⁴⁸. Dosadašnja istraživanja ukazuju da su bakterijski mikroorganizmi i njihovi štetni produkti najčešći uzročnici nastanka zapaljenske reakcije u apeksnom parodontijumu^{92, 143, 183, 211}.

Šezdesetih godina prošlog veka sprovedena su prva istraživanja koja su pokušala da ukažu na virusnu etiologiju u nastanku hroničnih periapikalnih lezija. Međutim, rezultati *in vitro* istraživanja nisu dokazali prisustvo virusa u ispitivanim ćelijskim kulturama^{176, 206}. Sredinom devedesetih godina prošlog veka prisustvo virusa iz porodice *Herpesviridae* dokazano je upotrebom metode lančane reakcije polimeraze u parodontalnim džepovima pacijenata sa dijagnostikovanim marginalnim parodontitisom^{42, 162}. Nedugo zatim, dokazavši prisustvo herpes virusa u tkivu hroničnih periapikalnih lezija, Sabeti i saradnici^{194, 195} postavili su hipotezu da navedeni virusi učestvuju u procesu njihovog nastanka po modelu kojim doprinose razgradnji alveolarnog koštanog tkiva kao i u marginalnom parodontitisu.

Iako su rezultati dosadašnjih istraživanja pokazali da su EBV i HCMV najčešće identifikovani herpes virusi u tkivima hroničnih periapikalnih lezija, i dalje postoje različiti podaci o učestalosti njihove detekcije^{85, 86}. Rezultati ranijih istraživanja sprovedenih na manjem broju uzoraka tkiva periapikalnih lezija pokazala su veću učestalost HCMV u odnosu na EBV^{194, 195, 218, 249}. Sa druge strane, istraživanja koja su usledila, a koja su sprovedena na većem uzorku uz upotrebu senzitivnijih i specifičnijih metoda za detekciju herpes virusa, ukazala su na veću učestalost EBV u odnosu na HCMV^{74, 75, 226, 236}. Smatra se da su uočene razlike posledica primene različitih kriterijuma za uključivanje pacijenata u istraživanja, upotrebe različitih dijagnostičkih metoda za detekciju herpesvirusa i razlika u njihovoj geografskoj distribuciji na svetskom nivou. Prethodna istraživanja izvršena na našoj populaciju analizirala su učestalost HCMV u tkivima odontogenih cisti, pri čemu je HCMV bio prisutan u 18 od

33 uzorka radikularnih cisti (54.5 %) i u 6 od 10 uzoraka odontogenih keratocističnih tumora (60 %) ⁵. Međutim, u našoj populaciji još uvek nije analizirana učestalost oba virusa u tkivima hroničnih periapikalnih lezija u odnosu na njihove kliničke, radiografske i histološke karakteristike.

Takođe, pokazano je da različiti genotipovi herpes virusa imaju značajnu ulogu u uobličavanju imunog odgovora domaćina, te da mogu različito da utiču na tok i težinu nastalog oboljenja ¹⁷³. Razlikuju se četiri genotipa HCMV (I–IV), podeljenih na osnovu nukleotidne sekvence gena za glikoprotein B (gB), strukturne komponente virusnog omotača koji učestvuje u procesu regulacije ulaska virusa u ćeliju, širenja infekcije i moduliranja procesa transkripcije u ćeliji ^{37, 153}. U zavisnosti od alelnog polimorfizma gena koji regulišu EBV nuklearni antigen 2 (EBNA-2) poznata su dva genotipa EBV (1 i 2). EBNA-2 služi kao transkripcioni faktor EBV koji učestvuje u ekspresiji gena za proteine virusne membrane ⁴⁷. U kliničkim uslovima, uočeno je da je gB-I najučestaliji kod kongenitalno inficiranih novorođenčadi i HIV-pozitivnih pacijenata, dok su gB II i gB III češći kod pacijenata sa transplantiranim organima ^{6, 33, 237}. S druge strane, EBV-1 je učestaliji kod zdravih osoba, dok se EBV-2 češće detektuje kod HIV-pozitivnih osoba ^{171, 202}. Učestalost pojedinih genotipova HCMV i EBV do sada je ispitivana samo u uzorcima hroničnog parodontitisa i peri-implantitisa ^{89, 248}. HCMV gB-II i EBV-1 bili su učestaliji u odnosu na druge analizirane genotipove u navedenim patološkim stanjima u odnosu na zdrava kontrolna tkiva. Ipak, još uvek ne postoje rezultati o učestalosti pojedinih genotipova navedenih virusa u tkivima hroničnih periapikalnih lezija. Takođe, nije ispitivana njihova učestalost u pogledu prisustva simptoma, veličine i patohistoloških tipova periapikalnih lezija.

Povećan broj genskih kopija herpes virusa ukazuje na prisustvo aktivne infekcije u zahvaćenom tkivu usled reaktivacije virusa ^{102, 103, 179, 180}. Reaktivacija herpes virusa može nastati u različitim uslovima, i vezana je uglavnom za pad imunskog odgovora domaćina. Nakon reaktivacije herpes virusi naseljavaju različite ćelije u ljudskom organizmu (makrofagi, T i B limfociti, fibroblasti, epitelne ćelije itd.) usled čega ispoljavaju svoja štetna dejstva ²¹⁶. Dosadašnji rezultati ukazuju na povećan broj genskih kopija EBV i HCMV u tkivima hroničnih periapikalnih lezija ^{190, 226}. Međutim, još uvek je nedovoljno ispitana povezanost povećanog broja genskih kopija virusa u

hroničnim periapikalnim lezijama sa različitim kliničkim, radiološkim i histopatološkim karakteristikama.

Proinflamatorni citokini imaju značajnu ulogu u patogenezi hroničnih periapikalnih lezija^{63, 118}. Usled prisustva štetnog agensa, kao odgovor imunskog sistema domaćina, na mestu zapaljenja dolazi do oslobađanja različitih medijatora zapaljenja, uključujući proinflamatorne citokine^{130, 225}. Povećana koncentracija proinflamatornih citokina, između ostalog, stimuliše produkciju receptorskog aktivatora za nuklearni faktor κ B ligand (RANKL) koji dovodi do povećane osteoklastogeneze i posledične resorpcije koštanog tkiva^{101, 242}. S druge strane, pokazano je da HCMV i EBV stimulišu produkciju različitih proinflamatornih citokina u organizmu domaćina¹⁴². Rezultati dosadašnjih istraživanja ukazuju na povećanu koncentraciju proinflamatornih citokina u tkivima hroničnih periapikalnih lezija^{63, 136}. Međutim, do sada je nedovoljno ispitan uticaj prisustva herpes virusa (EBV i HCMV) na promenu koncentracije proinflamatornih citokina (TNF- α , IL-1 β i IL-6) u tkivu periapikalnih lezija. Imajući u vidu da herpes virusi imaju mogućnost uobličavanja imunskog odgovora domaćina, pri čemu utiču na tok i težinu oboljenja, bilo bi opravdano ispitati da li postoji razlika u koncentraciji proinflamatornih citokina u hroničnim periapikalnim lezijama sa različitom kliničkom slikom u zavisnosti od prisustva herpes virusa. Ako se uzme u obzir da povećana koncentracija proinflamatornih citokina, aktivacijom RANKL-a, stimuliše osteoklastogenezu onda bi radi rasvetljavanja uloge herpes virusa u patogenezi periapikalnih lezija bilo neophodno utvrditi da li se vrednosti proinflamatornih citokina razlikuju između hroničnih periapikalnih lezija sa različitom veličinom u zavisnosti od prisustva herpes virusa. Takođe, u ranijim istraživanjima nije bilo pokušaja da se utvrdi da li postoji korelacija između broja genskih kopija herpes virusa i koncentracije proinflamatornih citokina u tkivima hroničnih periapikalnih lezija.

Imajući sve prethodno navedeno u vidu, postavljena je *radna hipoteza* da se herpes virusi češće detektuju u hroničnim periapikalnim lezijama nego u uzorcima neinflamirane pulpe zuba, kao i da između ovih grupa postoji razlika u broju genskih kopija ispitivanih virusa, distribuciji genotipova HCMV i EBV, kao i u koncentracijama proinflamatornih citokina (TNF- α , IL-1 β i IL-6). Takođe, očekuje se da se iste razlike uoče i u grupama manjih i asimptomatskih u odnosu na veće i simptomske

periapikalne lezije. Najzad, očekuje se pozitivna korelacija između povećanog broja genskih kopija herpes virusa i koncentracije analiziranih proinflamatornih citokina.

III CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Imajući u vidu da su rezultati dosadašnji istraživanja o učestalosti HCMV i EBV u uzorcima tkiva hroničnih periapikalnih lezija oprečni, te da do sada nije ispitivano prisustvo različitih genotipova herpes virusa i međusobna korelacija broja genskih kopija herpes virusa sa vrednostima proinflammatoryh citokina u hroničnim periapikalnim lezijama, postavljeni su sledeći ciljevi istraživanja:

1. utvrditi učestalost prisustva i broj genskih kopija HCVM i EBV u uzorcima tkiva hroničnih periapikalnih lezija.

2. utvrditi učestalost prisustva i broj genskih kopija HCVM i EBV u uzorcima zdravog tkiva zubne pulpe intaktnih donjih trećih molara.

3. uporediti odnos kliničkog, radiološkog i patohistološkog nalaza pacijenata eksperimentalne grupe sa prisustvom i brojem genskih kopija HCVM i EBV.

4. utvrditi prisustvo različitih genotipova HCMV i EBV u tkivima eksperimentalne i kontrolne grupe ispitanika.

5. odrediti koncentraciju proinflammatoryh citokina (TNF- α , IL-1 β i IL-6) u uzorcima tkiva eksperimentalne i kontrolne grupe ispitanika.

6. ustanoviti da li postoji korelacija između koncentracije proinflammatoryh citokina (TNF- α , IL-1 β i IL-6) i prisustva i broja genskih kopija HCVM i EBV u uzorcima hroničnih periapikalnih lezija.

IV MATERIЈAL I METODE

1. ETIČKI STANDARD ISTRAŽIVANJA

Ova kliničko-laboratorijska studija preseka sprovedena je u periodu od aprila 2013. godine do jula 2016. godine. Istraživanje je sprovedeno na Klinici za oralnu hirurgiju Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu, u Laboratoriji za bazična istraživanja Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu i Laboratoriji za virusologiju, Instituta za mikrobiologiju i imunologiju, Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

Istraživanje je odobreno od strane Etičkog komiteta Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu (broj odluke:36/29-2013). Svi ispitanici su u pisanoj formi i usmenim putem informisani o ciljevima istraživanja, dobrobiti i eventualnim rizicima. Pre početka istraživanja, od svih uključenih ispitanika dobijen je potpisan informisani pristanak. Sve kliničke i laboratorijske procedure sprovedene u okviru predloženog istraživanja bile su u skladu sa etičkim principima Helsinške deklaracije i Dobre kliničke prakse. Ispitanici su u bilo kojoj fazi istraživanja imali mogućnost da dobrovoljno prekinu učešće. Takođe, na zahtev lekara istraživača, ukoliko je bilo utvrđeno da se nisu u potpunosti pridržavali predloženog protokola, ispitanici su mogli biti isključeni iz daljeg istraživanja.

Doktorska disertacija predstavlja deo istraživanja koje se obavlja u okviru projekta Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Vlade Republike Srbije, OI175075, pod nazivom “Genetička kontrola i molekularni mehanizmi u malignim, inflamatornim i razvojnim patologijama orofacijalne regije”.

2. KLINIČKI DEO ISTRAŽIVANJA

Klinički deo istraživanja obuhvatao je niz postupaka koji su imali za cilj prikupljanje uzoraka za dalja laboratorijska istraživanja, kao i prikupljanje podataka koji su korišćeni prilikom statističke obrade uzorka. U okviru ovog dela opisani su: proces odabira pacijenata koji su bili uključeni u istraživanje na osnovu unapred utvrđenih kriterijuma, prikupljanje anamnestičkih podataka, klinički i radiološki pregled pacijenata te prikupljanje uzoraka eksperimentalne i kontrolne grupe istraživanja.

2.1. UZORAK ISTRAŽIVANJA I KRITERIJUMI ZA UKLJUČIVANJE I ISKLJUČIVANJE ISPITANIKA

Istraživanje koje je predmet ove doktorske disertacije obuhvatilo je ukupno 125 pacijenata Klinike za oralnu hirurgiju Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu koji su bili podeljeni u dve grupe – ekperimentalnu i kontrolnu grupu istraživanja. Svi pacijenti uključeni u istraživanje bili su zdrave osobe bez sistemskih oboljenja koje su prema klasifikaciji Američkog udruženja anesteziologa (*engl. American Society of Anesthesiologists (ASA)*) svrstani u ASA I ili ASA II kategoriju²⁴⁶.

Ekperimentalna grupa je obuhvatila 100 uzoraka tkiva hroničnih periapikalnih lezija prikupljenih u toku hirurške intervencije od 100 pacijenata Klinike za oralnu hirurgiju Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Kod svih pacijenata je odgovarajućim kliničkim i radiološkim metodama pregleda pre uključenja u istraživanje postavljena dijagnoza i indikacija za hirurško lečenje hronične periapikalne lezije. Iz istraživanja su isključeni svi pacijenti sa dubinom parodontalnog džepa preko 4 mm i/ili vertikalnom frakturom korena zuba zahvaćenog hroničnim periapikalnim procesom.

Kontrolna grupa je obuhvatila 25 uzoraka zdravog pulpnog tkiva prikupljenih od 25 pacijenata Klinike za oralnu hirurgiju Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu kod kojih je bilo indikovano hirurško vađenje impaktiranih umnjaka u gornjoj i donjoj vilici. Svi umnjaci iz kojih je izvađeno pulpno tkivo bili su bez prisustva karijesnih lezija, restaurativnih ispuna, fraktura u kruničnom i/ili korenskom delu zuba i sa kompletno završenim rastom korena.

Imunokompromitovani pacijenti ili pacijenti koji su u toku 3 meseca pre kliničkog pregleda i hirurške intervencije koristili antibiotsku, antivirusnu ili imunosupresivnu terapiju su bili isključeni iz istraživanja.

2.2. ANAMNEZA, KLINIČKI I RADIOLOŠKI PREGLED

Anamnestički podaci pacijenata uključenih u istraživanje prikupljeni su pomoću istraživačkog kartona (Prilog 1 i 2). Za sve pacijente najpre su registrovani opšti podaci o polu i starosti. Nadalje, prikupljeni su anamnestički podaci o glavnim tegobama pacijenta, odnosno razlozima javljanja lekaru i dosadašnjem toku bolesti. Posebno su registrovani podaci o eventualnim epizodama akutne infekcije (da li ih je bilo i koliko

često) i do tada sprovedenom lečenju (antibiotska terapija, vađenje zuba, incizije i druge mere hirurškog lečenja). U okviru lične anamneze registrovani su podaci o opštem zdravstvenom stanju, upotrebi lekova i registrovanim alergijskim reakcijama na različite alergene.

Klinički pregled pacijenata izvođen je neposredno pre planirane hirurške intervencije u okviru kog su registrovani podaci o kliničkoj slici i lokalizaciji periapikalne lezije⁷¹. Registrovano je prisustvo spontanog bola u predelu periapikalne lezije 48 sati pre i u trenutku izvođenja kliničkog pregleda. Zatim su registrovani: palpatorna osetljivost zahvaćenog predela, perkutorna osetljivost zuba koji su u kontaktu sa lezijom, prisustvo crvenila, otoka, fistule na sluzokoži i/ili koži te deformacije alveolarnog nastavka. Na osnovu anamneze i kliničkog pregleda hronične periapikalne lezije u okviru eksperimentalne grupe su podeljene na simptomatske i asimptomatske. Simptomatske periapikalne lezije okarakterisane su prisustvom spontanog bola, bolne osetljivosti na perkusiju i palpaciju i pojave bola pri zagrižaju. S druge strane, lezije koje nisu imale prethodno navedene karakteristike, a kod kojih je radiološki nalaz ukazivao na rasvetljenje u predelu vrha korena zahvaćenog zuba, registrovane su kao asimptomatske periapikalne lezije^{71,75}.

Analizom standardnih retroalveolarnih snimaka i ortopantomograma određivan je položaj, veličina, ograničenost i odnos periapikalne lezije prema okolnim strukturama. Veličina lezije određivana je merenjem najvećeg meziodistalnog i kraniokaudalnog dijametra na ortopantomogramu, nakon čega je bila izračunata srednja vrednost ovih dimenzija. Na osnovu dobijenih vrednosti sve periapikalne lezije bile su podeljene na velike, čiji je dijametar bio preko 5x7mm i male, sa dijametrom manjim od 5x7mm^{71,75}.

Na osnovu patohistoloških karakteristika uzorci tkiva ekperimentalne grupe bili su svrstani u dve podgrupe: periapikalni granulom ili radikularna cista. Podaci o patohistološkoj dijagnozi lezija dobijani su iz istorije bolesti pacijenata. Patohistološka analiza obavljena je u Laboratoriji za patohistološka ispitivanja Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu primenom standardnih metoda analize uzoraka tkiva.

2.3. PRIKUPLJANJE UZORKA

Uzorci tkiva hroničnih periapikalnih lezija prikupljani su u toku hirurške intervencije. Resekcija vrha korena i uklanjanje tkiva hronične periapikalne lezije sprovedeno je uz poštovanje aseptičnih uslova rada. Nakon primene odgovarajuće tehnike anestezije i pripreme operativnog polja, sluzokoža i zubi u predelu intervencije dodatno su prebrisavani rastvorom povidon-jodida. Zatim je izvođenjem planiranog reza i odizanjem mukoperiostalnog režnja eksponiran odgovarajući deo vilične kosti. Uklanjanjem kosti rotirajućim instrumentima pristupalo se hroničnoj periapikalnoj leziji. Potom je, u skladu sa planiranom intervencijom, uklanjano u celosti tkivo hronične periapikalne lezije. Tokom čitavog opisanog postupka vođeno je računa o tome da se svede na najmanju moguću meru eventualna kontaminacija operativne regije pljuvačkom. Nakon uklanjanja tkivo je podeljeno na tri jednaka dela. Prvi deo tkiva čuvan je u sterilnoj plastičnoj tubici u fiziološkom rastvoru na -70°C i korišćen je za izolaciju DNK. Drugi deo tkiva, čuvan u istim uslovima, korišćen je za određivanje koncentracije proinflatornih citokina. Treći deo tkiva je potapan u 10% formalin i upućivan na histopatološku analizu.

Uzorci kontrolnog pulpnog tkiva prikupljani su nakon vađenja impaktiranih umnjaka. Nakon primene odgovarajuće tehnike anestezije i pripreme operativnog polja, sluzokoža i zubi u predelu intervencije dodatno su prebrisavani rastvorom povidon-jodida. Po izvođenju planiranog reza i odizanja mukoperiostalnog režnja eksponiran je odgovarajući deo vilične kosti. Uklanjanjem kosti rotirajućim instrumentima pristupalo se impaktiranom umnjaku koji je vađen upotrebom odgovarajućeg instrumentarijuma. Upotrebom rotirajućih instrumenata uklonjen je krunični deo gleđi u cilju pristupanja pulpnom tkivu. Pulpno tkivo je ekstirpirano pomoću sterilnih endodontskih instrumenata odgovarajuće veličine. Uzorci pulpnog tkiva čuvani su u sterilnom fiziološkom rastvoru na -70°C do izvođenja planiranih laboratorijskih analiza.

3. LABORATORIJSKI DEO ISTRAŽIVANJA

U okviru laboratorijskog dela istraživanja najpre je izvršena izolacija DNK iz uzoraka tkiva eksperimentalne i kontrolne grupe. Potom je izvršeno niz laboratorijskih ispitivanja koja su imala za cilj određivanje prisustva, vrste genotipova i broja genskih kopija HCMV i EBV u ispitivanom uzorku. Takođe, ova ispitivanja imala su za cilj da se utvrdi i koncentracija proinflamatornih citokina (TNF- α , IL-1 β i IL-6) u uzorcima tkiva.

3.1. IZOLACIJA DNK IZ UZORAKA TKIVA

Svi smrznuti uzroci tkiva eksperimentalne i kontrolne grupe odmrzavani su na sobnoj temperaturi neposredno pre izvođenja planiranih analiza. Tkiva iz kojih je planirana izolacija DNK homogenizovana su mašinskim homogenizatorom (UP50H; Hielscher, Teltow, Nemačka). Dobijeni homogenizat tkiva potom je centrifugiran na 5000 obrtaja u trajanju od 10 minuta, nakon čega je supernatant odbacivan, a dobijeni talog korišćen u procesu izolacije DNK. Izolacija DNK vršena je pomoću komercijalnog izolacionog kompleta KAPA Express Extract Kit® (Kapa Biosystems, Inc. Wilmington, MA, SAD) prema uputstvu proizvođača. Dobijenom talogu tkiva za izolaciju DNK, a u svrhu dobijanja finalne zapremine od 50 μ l, dodavane su sledeće komponente:

- 2 μ l enzima (KAPA Express Extract Enzyme (1 U/ μ L))
- 5 μ l pufera (10X KAPA Express Extract Buffer)
- 43 μ l dejonizovane vode (Ambion® Nuclease-Free Water, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD)

Reakciona smeša je potom inkubirana u PCR aparatu po sledećem režimu: 10 minuta na 75 °C (aktivacija enzima), a zatim još 5 minuta na 95 °C (deaktivacija proteaze iz kita). Nakon inkubacije sledilo je vorteksovanje reakcione smeše u trajanju do 5 sekundi i centrifugiranje na 13000 obrtaja u trajanju od 1 minut. Sterilnim plastičnim pipetorima izdvajan je supernatant sa izdvojenom DNK u sterilne plastične tubice i čuvan na -20 °C do daljih analiza.

3.2. ODREĐIVANJE PRISUSTVA I GENOTIPOVA HERPES VIRUSA U ISPITIVANIM UZORCIMA

Prisustvo EBV i HCMV određivano je upotrebom „umetnute“ metode lančane reakcije polimeraze (*engl. nested Polymerase Chain Reaction (PCR)*). PCR podrazumeva amplifikaciju unapred određene sekvence DNK u *in vitro* uslovima. Uzimajući u obzir da PCR metoda predstavlja imitaciju procesa replikacije DNK, ona je bazirana na dejstvu termostabilne DNK polimeraze (najčešće *Taq* polimeraze) koja učestvuje u sintezi novog komplementarnog lanca DNK. Sinteza komplementarnog DNK lanca omogućena je i primenom specifičnih prajmera, koji zapravo predstavljaju dva oligonukleotida koji odgovaraju krajevima sekvence koju je potrebno amplifikovati. Na taj način data sekvenca se umnožava više miliona puta. Reakcija se odigrava kroz više ciklusa, na precizno definisanoj temperaturi, pri čemu se svaki ciklus sastoji iz tri osnovna koraka:

- termičke denaturacije DNK, čime se razdvajaju komplementarni lanci DNK i omogućava vezivanje prajmera. Ovo se postiže inkubacijom reakcione smeše na 95°C;
- hibridizacije prajmera sa matricom, koja se izvodi na temperaturi od 42°C do 65°C, u zavisnosti od dužine i sekvence prajmera;
- elongacije (ekstenzije) prajmera, što podrazumeva ugradnju slobodnih nukleotida na njihovim 3' krajevima, pod dejstvom *Taq* polimeraze, na temperaturi od 72°C.

Ovaj niz reakcija ponavlja se kroz 25 do 40 ciklusa, čime se broj sintetisanih fragmenata DNK eksponencijalno umnožava, budući da svaki novosintetisani fragment služi kao matrica za nastavak reakcije.

Nested PCR, kao jedna od modifikacija osnovnog PCR metoda, predstavlja senzitivniji i specifičniji metod. Proces amplifikacije DNK odvija se u dva koraka uz upotrebu dva para prajmera. Najpre se upotrebom spoljašnjeg para prajmera umnožava „širi“ deo ciljane nukleotidne sekvence. U drugom koraku kao osnova za detekciju upotrebljava se dobijeni amplifikat iz prvog koraka i upotrebljavaju se još specifičniji set unutrašnjih prajmera koji amplifikuju „uži“ deo ciljane nukleotidne sekvence. Na taj način dobija se mnogo veći prinos u odnosu na standarni PCR metod, čime je povećana

senzitivnost, dok upotreba dvostrukog seta prajmera povećava specifičnost same reakcije.

Za potrebe ovog istraživanja, reakcionu smešu ukupne zapremine od po 25 μ l u oba kruga *nested PCR*, činili su sledeći reagensi:

- Pufer - 1 X KAPA Taq buffer A with 1.5 mmol/L MgCl₂ (Kapa Biosystems, Inc. Wilmington, MA, SAD),
- Joni Mg²⁺ - 1.5 mmol/L MgCl₂ (Kapa Biosystems, Inc. Wilmington, MA, SAD),
- Nukleotidi - 0.4 mmol/L deoxynucleosides triphosphates (dNTP Set; Qiagen, Venlo, Holandija),
- Prajmeri - 400 nmol/L forward, reverse (Metabion GmbH, Nemačka),
- Dejonizovana voda – dd H₂O (Ambion® Nuclease-Free Water, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD),
- *Taq* polimeraza–1 U Taq DNA polymerase (KAPA Taq DNK Polymerase, Kapa Biosystems, Inc. Wilmington, MA, SAD).

Koncentracije upotrebljenih reagenasa za oba kruga *nested PCR* prikazane su u tabeli 3.1.

Tabela 3.1. Reakciona smeša *nested PCR* analize

Reagensi	Koncentracija izražena u μ l	
	I krug <i>nested PCR</i>	II krug <i>nested PCR</i>
H ₂ O	11	13.5
Pufer	2.5	2.5
MgCl ₂	1.5	1
Nukleotidi	1	1
Prajmer Forward	2	2
Prajmer Reverse	2	2
Taq polimeraza	0.2	0.2
Uzorak DNK	5	3
Ukupno	25	25

Za detekciju HCMV pomoću *nested PCR* metode korišćena su dva seta prajmera (spoljašnji i unutrašnji) koji su kodirali sekvencu gena za glikoprotein B (gB). Za detekciju EBV u prvom krugu *nested PCR* korišćen je zajednički set spoljašnjih prajmera koji su kodirali sekvencu gena za EBV nuklearni antigen 2 (EBNA-2). U drugom krugu *nested PCR* za EBV upotrebljena su dva različita seta unutrašnjih prajmera, gde se na osnovu alelnog polimorfizma gena za EBNA-2 u krajnjem produktu identifikovalo prisustvo jednog od dva poznata genotipa EBV (EBV 1 ili 2). Na taj način, pored detekcije, izvršena je i genotipizacija EBV u ispitivanom uzorku. Sekvence i veličine baznih produkata prajmera upotrebljenih u istraživanju prikazane su u tabeli 3.2.

Tabeli 3.2. Sekvence prajmera upotrebljenih za *nested PCR* analizu

Ciljni molekul	Sekvenca prajmera	Veličina amplifikata (bp)
HCMV (gB)		
Spoljašnji Fw	5'-CAGTTGACCGTACTGCAC-3'	489
Spoljašnji Rv	5'-GGTATCAAGCAAAAATCT-3'	
Unutrašnji Fw	5'-GAAACGCGCGGCAATCGG-3'	301
Unutrašnji Rv	5'-TGGAACCTCGAACGTTTGG-3'	
EBV (EBNA-2)		
Spoljašnji Fw	5'-AGGGATGCCTGGACACAAGA-3'	596
Spoljašnji Rv	5'-TGGTGCTGCTGGTGGTGGCAA-3'	
EBV-1		
Unutrašnji Fw	5'-TCTTGATAGGGATCCGCTAGGATA-3'	497
Unutrašnji Rv	5'-ACCGTGGTTCTGGACTATCTGGATC-3'	
EBV-2		
Unutrašnji Fw	5'-CATGGTAGCCTTAGGACATA-3'	165
Unutrašnji Rv	5'-AGACTTAGTTGATGCTGCCCTAG-3'	

U cilju potvrde specifičnosti upotrebljenih prajmera izvršeno je dodatno sekvenciranje DNK nasumično odabranih produkata drugog kruga *nested PCR* za oba ispitivana virusa. Način sekvenciranja bazirao se na metodi završetka lanca sa fluorescentno obeleženim didezoksiribonukleotidima ²⁰³. Postupak je obuhvatao prečišćavanje PCR produkta pomoću komercijalnog kita QIAGEN MinElute Purification Kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Nemačka) prema uputstvu proizvođača.

Nakon ovoga sledila je reakcija cikličnog sekvenciranja koja je rađena za svaki DNK lanac pojedinačno. Reakcione smeše sastavljene su od komponenti komercijalnog Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing seta (Applied Biosystems, Foster City, SAD)-mix i pufer, po jedan unutrašnji prajmer (0,25 μ M), 2 μ l prečišćenog PCR produkta i vodu (Eppendorf, Hamburg, Nemačka) do ukupne zapremine od 10 μ l. Sve reakcije cikličnog sekvenciranja vršene su u Master Cycler Gradient PCR uređaju (Eppendorf, Hamburg, Nemačka) prema sledećem protokolu: inicijalna denaturacija na 96°C tokom 1 minuta, 40 ciklusa: 96°C – 10 sek, 50°C – 5 sek, 60°C – 4 min.

Nakon prečišćavanja produkata cikličnog sekvenciranja sa izopropanolom usledila je kapilarna elektroforeza koja se izvodila u ABI Prism 310 Genetic Analyser system-u (Applied Biosystems, Foster City, SAD). Za analizu sekvenci korišćen je SequenceAnalysis 5.1 softver (Applied Biosystems, Foster City, SAD). Dobijene sekvence upoređivane su sa dokumentovanim sekvencama ispitivanih virusa u bazi podataka GenBank pomoću BLAST softvera (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Oba kruga *nested PCR* za ispitivane herpes viruse izvođena su kroz tri faze u DNA Thermal Cycler (PeqStar, PeqLab, Erlangen, Germany) uređaju. Uslovi PCR reakcije za oba ispitivana herpes virusa prikazani su u tabeli 3.3. Pozitivna i negativna kontrola bile su uključene u svaku PCR reakciju. Uzorci izolovane DNK pacijenta sa potvrđenom dijagnozom HCMV i EBV infekcije poslužili su kao pozitivna kontrola. S druge strane, dejonizovana voda (Ambion® Nuclease-Free Water, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) koja je dodavana u reakcionu smešu umesto izolovane DNK ispitivanog uzorka predstavljala je negativnu kontrolu PCR reakcije.

Provera dobijenih PCR produkata izvršena je elektroforezom na 8% poliakrilamidnom (PAA) gelu (20 V/cm u Tris borat EDTA puferu). Elektroforeza nukleinskih kiselina je metoda kojom se određuje veličina njihovih fragmenata i koja je

bazirana na razlikama u pokretljivosti markomolekula kada se nađu u kolu jednosmerne struje. Razlike u pokretljivosti zavise od molekularne mase (manji molekuli brže putuju), prostorne konformacije molekula (linearni molekuli putuju sporije od spiralnih) i najbitnije od vrste naelektrisanja (nukleinske kiseline su negativno naelektrisane zbog prisustva fosfatnih grupa pa putuju od katode ka anodi).

Tabela 3.3. Uslovi *nested PCR* reakcije

<i>Nested PCR</i>	Početna denaturacija	Denaturacija	Hibridizacija	Elongacija	Finalna elongacija	Broj ciklusa
HCMV						
I krug	95° C 5 m	95° C 30 s	52° C 30 s	72° C 1 m	72° C 5 m	x 35
II krug	95° C 5 m	95° C 30 s	60° C 30 s	72° C 1 m	72° C 5 m	x 35
EBV						
I krug	95° C 3 m	95° C 30 s	52° C 45 s	72° C 1 m	72° C 5 m	x 30
EBV-1/EBV-2						
II krug	95° C 3 m	95° C 30 s	57° C 30 s	72° C 90 s	72° C 7 m	x 40

U našem istraživanju korišćena je vertikalna elektroforeza u kontinuiranom sistemu (Apollo instrumentation, Brussels, Belgija) sa 1X Tris-Borat EDTA (5xTBE) puferom. Za proveru dužine fragmenata korišćen je marker (Thermo Scientific GeneRuler 100 bp DNA Ladder®, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD) koji predstavlja fragmente DNK poznatih dužina.

Po završetku elektroforeze gelovi su bojani 1% etidijum–bromidom (Ethidium Bromide Solution 1%®, AppliChem GmbH, Heidelberg, Nemačka), koji ima sposobnost umetanja između lanaca DNK molekula i fluoresciranja pod UV svetlom.

Amplifikovani fragmenti vizuelizovani su pomoću ultraljubičastog transiluminatora (Benchtop UV Transilluminators, UVP, LLC, Upland, CA, SAD), na talasnoj dužini od 300 nm. Veličina ciljne sekvence procenjivana je poređenjem položaja ispitivanih PCR produkata sa položajem DNK fragmenata poznatih dužina u gelu. Pozitivnim nalazima smatralo se prisustvo produkata HCMV i EBV odgovarajuće veličine prikazanih u tabeli 3.2.

Prisustvo genotipova HCMV određivano je pomoću analize dužine restrikcionih fragmenata (*engl. Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)*). Ova metoda je zasnovana na sposobnosti restrikcionog enzima (endonukleaze) da izvrši presecanje PCR produkta na karakterističnoj poziciji, specifičnoj za dati enzim. Kao rezultat, dobijaju se dva ili više fragmenata koji se potom vizualizuju na PAA gelu.

U našem slučaju, restrikcija PCR produkta drugog kruga *nested PCR* za HCMV vršena je restrikcionim enzimom Rsa I (Fast digest Rsa I, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD). Restrikciona smeša, ukupne zapremine 20 µl, sadržavala je 7 µl vode, 2 µl pufera, 1 µl enzima Rsa I i 10 µl PCR produkta. Ovako pripremljena smeša inkubirana je na 37°C tokom 10 minuta. Nakon završene inkubacije 15 µl produkta restrikcione digestije podvrgnuto je separaciji elektroforezom uz marker (Thermo Scientific GeneRuler 50 bp DNA Ladder®, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD) kao što je prethodno opisano (8% PAA gel, 20 V/cm u Trisborat EDTA puferu). Nakon elektroforeze, vršeno je bojenje gela u etidijum bromidu. Amplifikovani fragmenti vizuelizovani su pomoću ultraljubičastog transiluminatora, na talasnoj dužini od 300 nm. Pozitivnim nalazima, smatralo se prisustvo sledećih produkata:

- 239 bp i 66 bp za genotip I gB HCMV gena,
- 239 bp i 63 bp za genotip II gB HCMV gena,
- 195 bp, 63 bp i 41 bp za genotip III gB HCMV gena,
- 195 bp, 66 bp i 44 bp za genotip IV gB HCMV gena.

3.3. ODREĐIVANJE BROJA GENSKIH KOPIJA HERPES VIRUSA

Određivanje apsolutnog broja genskih kopija EBV i HCMV vršeno je upotrebom modifikovane PCR metode koja u „realnom vremenu“ (*engl. real-time PCR*) omogućava praćenje amplifikacije nakon svakog ciklusa PCR. Kvantifikacija herpes virusa određivana je u uzorcima koji su bili pozitivni nakon primene *nested PCR* metode.

Najčešće korišćeni metod *real-time PCR-a* je *Taqman* metod u kome se koristi specifična proba koja hibridizuje za ciljnu nukleinsku kiselinu. U našem slučaju *real-time PCR* zasnovan je na korišćenju fluorescentnim bojama obeleženih proba, tzv. *FRET* (*engl. Fluorescence Resonance Energy Transfer*) probe. Navedene probe su dužine od 20 do 30 nukleotida i poseduju sekvencu koja je komplementarna sekvenci fragmenta DNK koji se umnožava PCR reakcijom. Proba je na 5' kraju obeležena tzv. „reporter“ fluorescentnom bojom (odašiljač), a na 3' kraju je obeležena tzv. „quencher“ fluorescentnom bojom (prigušivač). Kada proba nije vezana za ciljnu nukleinsku kiselinu ne dolazi do emisije fluorescencije. Na odgovarajućoj temperaturi, proba hibridizuje sa specifičnom sekvencom ciljne DNK, a zatim biva isečena dejstvom *Taq* polimeraze koja u toku umnožavanja ciljne DNK ugrađuje nove nukleotide u 5'→3' pravcu počevši od prajmera pa do regiona za koji se vezala proba. Sečenjem probe sintetiše se novi DNK lanac tako da se umnožavanje ciljne DNK nesmetano nastavlja, ali se time „reporter“ boja udaljava od „kvenčer“ boje i počinje da emituje jaču fluorescenciju koja se meri. Intenzitet fluorescencije je direktno proporcionalan količini utrošene probe odnosno količini umnožene ciljne sekvence DNK³⁸.

Sekvence proba korišćenih u našem istraživanju za kvantifikaciju herpes virusa bile su sledeće: 5'-FAM TCC TGC AGC TAT TTC TGG TCG CAT CA TAMRA-3' za EBV i 5'-FAM CTC TAT CTG ACA TAC ACA AGT AAA TCC ACG TCC CA TAMRA-3' za HCMV. U slučaju kvantifikacije EBV korišćen je set prajmera kojima je amplifikovana sekvenca Bam Hi-W region EBV gena, dok je za HCMV korišćen set prajmera kojima je amplifikovana sekvenca IE (*engl. immediate-early*) HCMV gena. Sekvence seta prajmera korišćenih za kvantifikaciju EBV bile su sledeće: 5'-ACG TAA GCC AGA CAG CAG CC-3' i 5'-TTT GTG TGG ACT CCT GGC G-3'. S druge strane, za kvantifikaciju HCMV korišćeni su prajmeri 5'-CGC TCA CAT GCA AGA GTT

AAT CTT C-3' i 5'-AAC TCG GTA AGT CTG TTG ACA TGT ATG-3'. Specifičnost korišćenih prajmera potvrđena je u prethodnim istraživanjima⁷⁶.

Amplifikacija, analiza rezultata i njihova vizuelizacija izvršena je pomoću SDS programa verzija 1.4 na ABI PRISM 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Waltham, MA, SAD) uređaju. Reakciona smeša ukupne zapremine od 25 µl za oba ispitivana virusa bila je sastavljena od 12.5 µl real time PCR Master Mix-a (Probe Fast qPCR Kit Master Mix (2x) universal, Kapa Biosystems, Wilmington, MA, SAD), 0.4 µl Low Rox-a, po 2 µl (10 µmol) svakog prajmera, 1 µl (100 pmol) TaqMan probe, 2.1 µl vode (Eppendorf, Hamburg, Nemačka) i 5 µl izolovane DNK ispitivanog uzorka.

Temperaturni profil *real-time PCR* obuhvatao je inicijalni korak aktivacije DNK polimeraze na 95⁰C u trajanju od 10 minuta nakon čega je sledilo 40 ciklusa sastavljenih od prvog koraka na temperaturi od 95⁰C u trajanju od 15 sekundi i drugog koraka na temperaturi od 60⁰C u trajanju od 1 minuta. U procesu kvantifikacije herpes virusa upotrebljavana su serijska razblaženja komercijalnih standarda (quany EBV (BamHI-W region), quany CMV (IEA region), Clonit S.r.l., Milano, Italija) u rasponu od 10³ do 10⁶ kopija virusa po ml. Dobijeni broj kopija virusa množen je sa 125 da bi se dobijena vrednost prilagodila stepenu razblaženja uzorka.

3.4. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE PROINFLAMATORNIH CITOKINA

Koncentracije proinflamatornih citokina određivane su pomoću enzimskog imunotesta – ELISA (*engl. Enzyme-linked immunosorbent assay*). U osnovi ELISA tehnike postoje dve reakcije: imunološka i hemijska. Imunološku reakciju, koja se ne vizuelizuje, predstavlja reakcija antigena i antitela. Reakcija enzima i supstrata predstavlja hemijsku reakciju, pri čemu se dobijeni produkt razgradnje oboji i reakciju načini vidljivom. U našem istraživanju određivane su koncentracije TNF- α , IL-1 β i IL-6 u celokupnom uzorku tkiva primenom komercijalnih ELISA setova:

- Human TNF alpha ELISA Ready-SET-Go!® (eBioscience Inc., San Diego, SAD),
- Human IL-1 beta ELISA ReadySET-Go!® (eBioscience Inc., San Diego, SAD),
- Human IL-6 ELISA Ready-SETGo!® (eBioscience Inc., San Diego, SAD).

Sva tri ELISA seta zasnovana su na tzv. indirektnoj „sandwich“ ELISA metodi pomoću koje se određuje prisustvo i koncentracija antigena u uzorku, pri čemu antitelo za detekciju nije obeleženo enzimom, nego se upotrebljava dodatno anti-Ig antitelo koje je obeleženo enzimom. Dodatne karakteristike ELISA setova prikazane su u Tabeli 3.4.

Delovi uzoraka tkiva koji su predviđeni za određivanje koncentracije proinflamatornih citokina bili su odmrznuti i potom tretirani u trajanju od 10 minuta sa 1 ml rastvora PBS koji je u sebi sadržavao 0.1 % nejonski deterdžent Igepal CA-630 (Sigma Aldrich, St.Louise, MO, SAD) ¹³². Nakon navedenog koraka, sva tkiva su bila homogenizovana mašinskim homogenizatorom (UP50H; Hielscher, Teltow, Nemačka). Dobijeni homogenizat tkiva potom je centrifugiran na 5000 obrtaja u trajanju od 10 minuta, nakon čega je supernatant odvajan u sterilne plastične tubice i čuvan na - 20° C do početka analize.

Procedura je urađena prema uputstvu proizvođača i obuhvatala je niz faza koje su bile iste za sva tri ispitivana citokina:

- oblaganje bunarčića u pločama sa specifičnim antitelima (inkubacija preko noći na +4°C) i ispiranje
- dodavanje uzoraka i standarda u bunarčiće (inkubacija 2h na sobnoj temperaturi) i ispiranje
- dodavanje detekcionih antitela obeleženih biotin-avidin HRP enzimskim sistemom (inkubacija 1h na sobnoj temperaturi) i ispiranje da bi se otklonila nevezana antitela
- dodavanje supstrata (tetrametilbenzidin), inkubacija od 30 minuta na sobnoj temperaturi i ispiranje
- dodavanje stop rastvora (2N H₂SO₄) koji zaustavlja dalju enzimsku aktivnost
- očitavanje apsorbance na 450nm

Intenzitet dobijene boje je direktno proporcionalan količini vezanih medijatora u ispitivanom materijalu. Evaluacija intenziteta boje je izvršena pomoću spektrofotometra Reader 270 (bioMérieux, Genève, Švajcarska) na talasnoj dužini od 450 nm. Potom je izmerena optička gustina, odnosno absorbanca, korišćena za određivanje koncentracije ispitivanih proinflamatornih citokina primenom kalibracione krive. Koncentracija

ispitivanih citokina je izražavana u pg/ml a na osnovu vrednosti koeficijenta determinacije R^2 linearne regresije. Jednačine za izračunavanje koncentracije proinflammatoryh citokina i vrednosti R^2 za svaku od jednačina dobijene su u Microsoft EXCEL programu i prikazane su tabeli 3.4.

Tabela 3.4. Karakteristike upotrebljenih ELISA setova

Ispitivan citokin	Minimalna vrednost detekcije (pg/ml)	Opseg standardne krive (pg/ml)	Jednačina za izračunavanje koncentracije	Vrednost R^2
TNF- α	4	4-500	$y=170.81xAB-0.1572$	0.9991
IL-1 β	4	4-500	$y=64.986xAB-6.7935$	0.9991
IL-6	2	2-200	$y = 65.875xAB -10.758$	0.9902

AB – vrednosti izmerene apsorbance

4. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

Statistička analiza prikupljenih podataka izvršena je u statističkom softverskom paketu IBM SPSS Statistics for Windows Software (Version 20.0; IBM Corp, Armonk, NY, SAD).

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

Hi-kvadrat (χ^2 , *Chi-square Test*) i Fišerov test egzaktne verovatnoće (*Fisher's exact Test*) korišćeni su za poređenje učestalosti pojavljivanja analiziranih atributivnih obeležja posmatranja između analiziranih grupa.

Izbor testa za analizu numeričkih obeležja posmatranja zavisio je od prirode raspodele podataka. U cilju određivanja normalnosti raspodele korišćen je Kolmogorov-Smirnov test (*Kolmogorov-Smirnov Test*). U slučaju normalne raspodele korišćen je Studentov T test (*Student's t-Test*), i jednofaktorska analiza varijanse (*ANOVA*) sa Bonferonijevom korekcijom (*Bonferroni correction*) za analizu razlika između grupa. Kod raspodele različite od normalne korišćen je Kraskal-Wallisov test (*Kruskal-Wallis Test*), a za međugrupnu analizu Man Vitnijev U test (*Mann Whitney U Test*). Korelacija između merenih parametara određivana je pomoću Spirmanovog koeficijenta korelacije (*Spearman's rank correlation coefficient*). Statistička značajnost definisana je za $p < 0.05$.

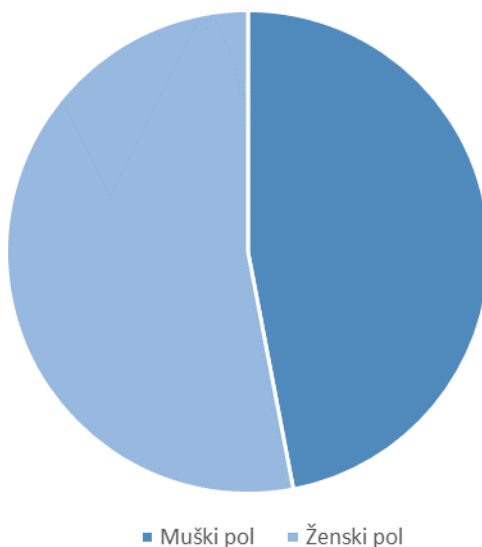
V REZULTATI

1. OPŠTE KARAKTERISTIKE UZORKA

U istraživanje je bilo uključeno 125 pacijenata podeljenih u dve grupe istraživanja – ekperimentalnu i kontrolnu grupu. Stotinu pacijenata kod kojih je bila indikovana hirurška intervencija resekcije vrha korena zuba zahvaćenog hroničnom periapikalnom lezijom činili su ekperimentalnu grupu istraživanja. Kontrolnu grupu činilo je 25 pacijenata kod kojih je bilo indikovano hirurško vađenje impaktiranih umnjaka u donjoj i/ili gornjoj vilici.

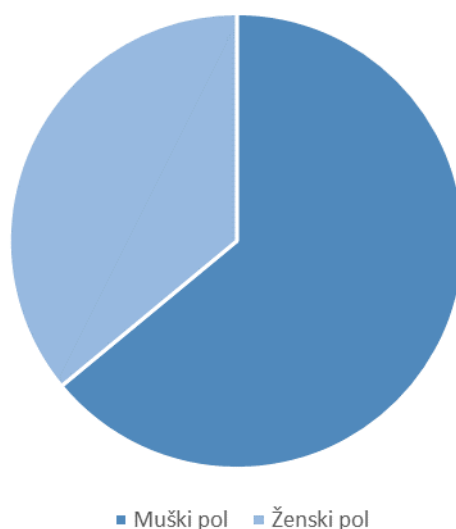
Ekperimentalnu grupu činilo je 47 osoba muškog pola i 53 osobe ženskog pola (grafikon 5.1). U kontrolnoj grupi bilo je 16 osoba muškog pola i 9 osoba ženskog pola (grafikon 5.2). Nije uočena statistički značajna razlika u odnosu na pol između ispitivanih grupa istraživanja (χ^2 test, $P=0.179$).

Eksperimentalna grupa istraživanja



Grafikon 5.1. Distribucija pacijenata u eksperimentalnoj grupi po polu.

Kontrolna grupa istraživanja



Grafikon 5.2. Distribucija pacijenata u kontrolnoj grupi po polu.

Distribucija pacijenata ispitivanih grupa u odnosu na godine života prikazana je u tabeli 5.1. Analiza srednjih vrednosti godina života pokazuje da su pacijenti sa periapikalnim lezijama značajno stariji od pacijenata sa impaktiranim umnjacima. (Mann-Whitney U-test, $P=0.001$).

Tabela 5.1. Distribucija pacijenata iz eksperimentalne i kontrolne grupe u odnosu na godine života.

Pol	Godine života (srednja vrednost \pm SD)	
	Eksperimentalna grupa	Kontrolna grupa
Muški	39.8 \pm 15.3	24.1 \pm 3.1
Ženski	41.3 \pm 13.9	17.3 \pm 1.6
Ukupno	40.6 \pm 14.5 ^a	21.6 \pm 4.2

^a $P=0.001$ (Mann-Whitney U-test); SD, standardna devijacija.

Eksperimentalna grupa je na osnovu ispitivanih karakteristika periapikalnih lezija podeljena u nekoliko podgrupa. Na osnovu prisustva znakova i simptoma oboljenja sve periapikalne lezije su podeljene na simptomatske i asimptomatske lezije. U ispitivanom uzorku 34 periapikalne lezije bile su svrstane u podgrupu simptomatskih lezija, dok je 66 lezija bilo svrstano u podgrupu asimptomatskih periapikalnih lezija.

U odnosu na radiološki procenjenju veličinu sve periapikalne lezije su podeljene na velike ($>5 \times 7$ mm) i male ($\leq 5 \times 7$ mm) lezije. U ispitivanom uzorku 69 lezija je bilo svrstano u velike, dok je 31 lezija bila svrstana u male periapikalne lezije. Na kraju, na osnovu patohistoloških karakteristika sve periapikalne lezije su podeljene na periapikalne granulome i radikularne ciste. U ispitivanom uzorku 57 lezija je bilo okarakterisano kao periapikalni granulom, dok su 43 lezije svrstane u podgrupu radikularnih cista. Demografske karakteristike pacijenata svrstanih u navedene podgrupe istraživanja prikazane su u tabelama 5.2. i 5.3.

Tabela 5.2. Distribucija pacijenata ispitivanih podgrupa u odnosu na godine života.

Ispitivane podgrupe	Godine života (srednja vrednost \pm SD)	P vrednost ^a
Simptomatska (n=34)	41.8 \pm 16.0	0.833
Asimptomatska (n=66)	40.0 \pm 13.8	
Velika ($>5 \times 7$ mm) (n=69)	40.3 \pm 15.4	0.387
Mala ($\leq 5 \times 7$ mm) (n=31)	41.3 \pm 12.4	
Periapikalni granulom (n=57)	39.4 \pm 13.5	1.000
Radikularna cista (n=43)	42.2 \pm 15.8	

^a Mann-Whitney U-test; SD, standardna devijacija; n, broj uzoraka.

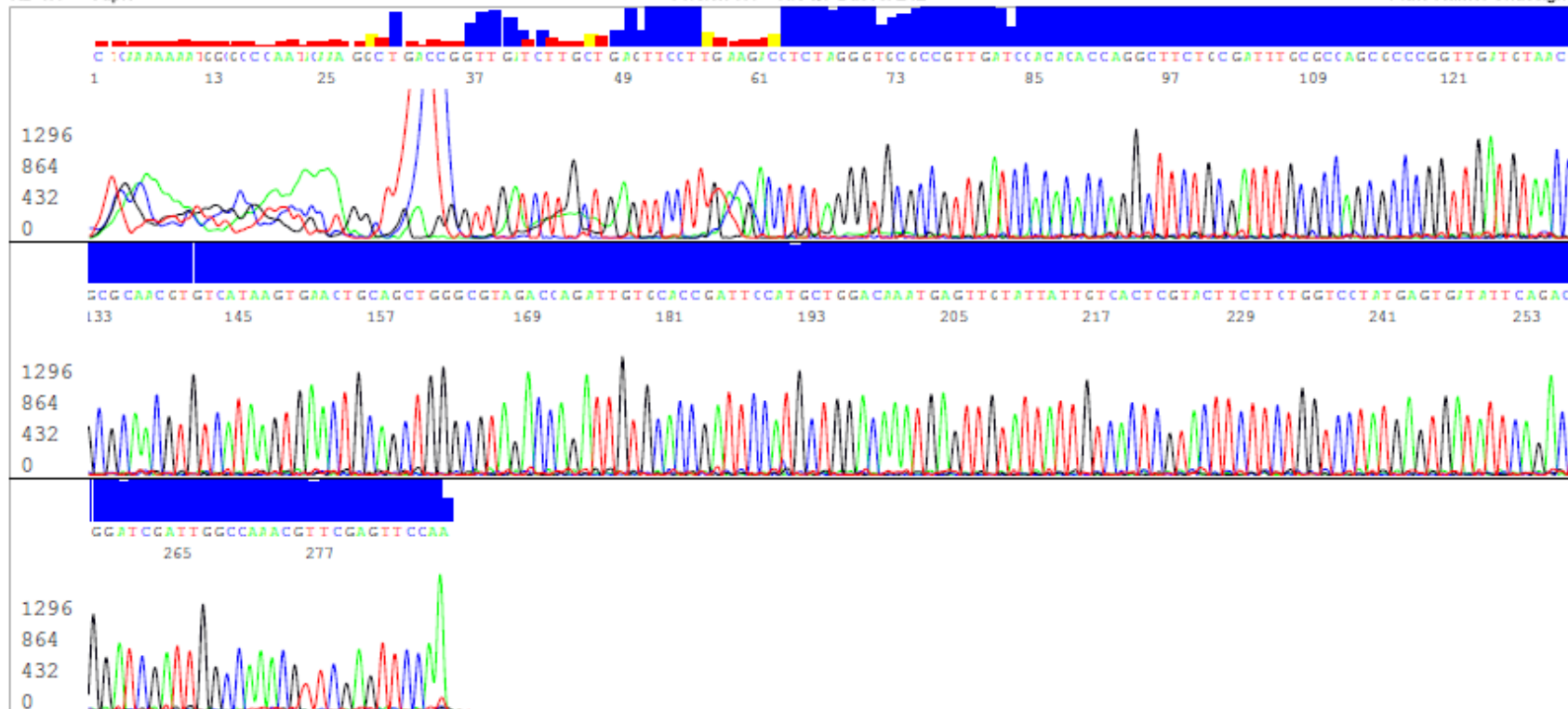
Tabela 5.3. Distribucija pacijenata ispitivanih podgrupa u odnosu na pol.

Ispitivane podgrupe	Pol (muški/ženski)	P vrednost ^a
Simptomatska (n=34)	17/17	0.697
Asimptomatska (n=66)	30/36	
Velika (>5x7 mm) (n=69)	38/31	0.180
Mala (≤ 5x7 mm) (n=31)	9/22	
Periapikalni granulom (n=57)	25/32	0.545
Radikalna cista (n=43)	22/21	

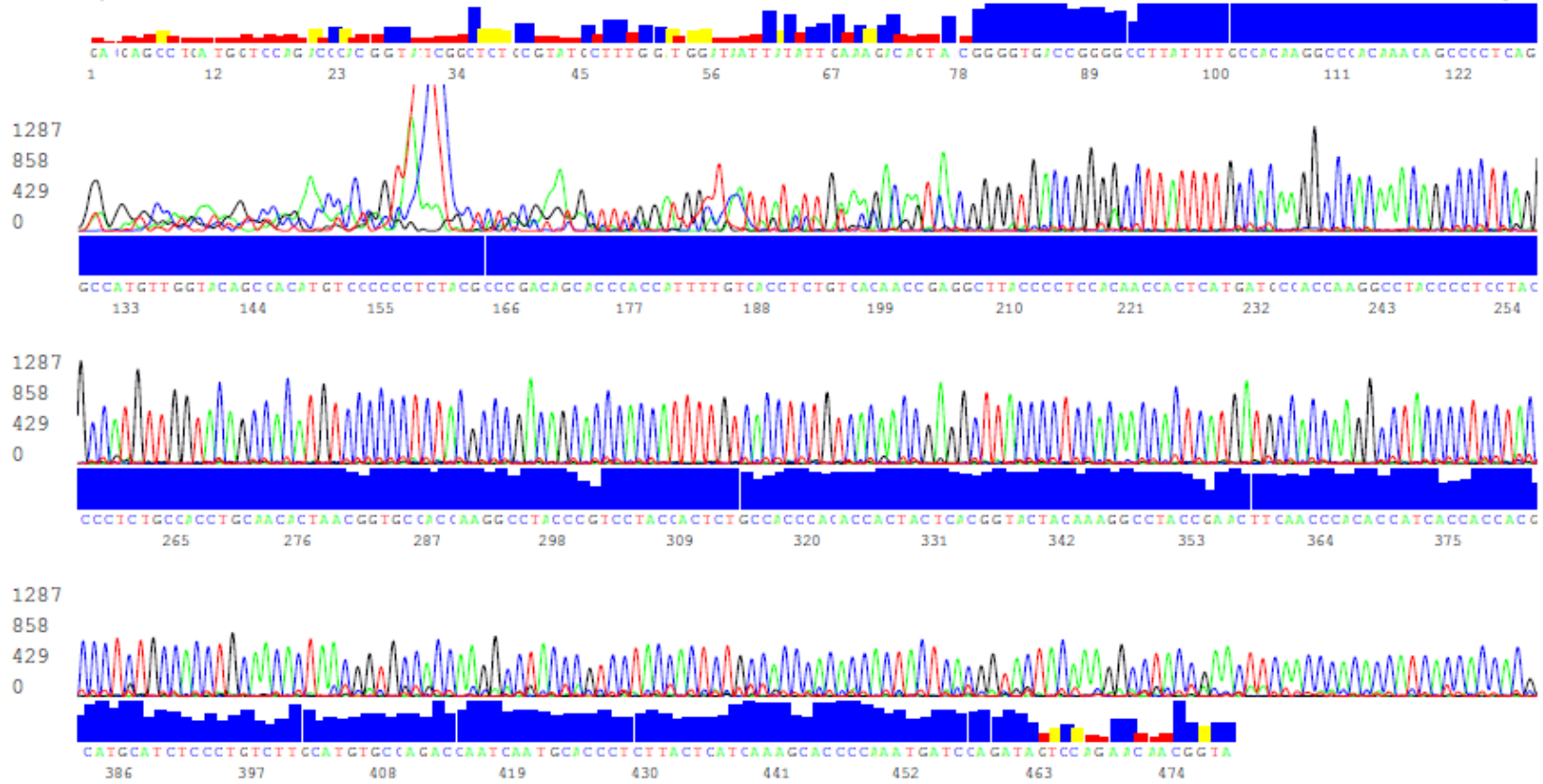
^a χ^2 - test; n, broj uzoraka.

2. REZULTATI SEKVENCIRANJA HCMV I EBV POZITIVNIH UZORAKA

U cilju potvrde specifičnosti upotrebljenih prajmera u *nested PCR* metodi za dokazivanje HCMV i EBV, primenom metode direktnog sekvenciranja metodom po Sanger-u, izvršeno je određivanje redosleda nukleotida DNK nasumično odabranih produkata drugog kruga *nested PCR* i to za 2 pozitivna HCMV uzorka (broj 66 i 84) i jednog EBV pozitivnog uzorka (broj 46). Rezultati sekvenciranja dobijeni su u vidu elektroferograma (Slika 5.1 i 5.2).



Slika 5.1. Izgled elektroferograma HCMV pozitivnog uzorka broj 66



Slika 5.2. Izgled elektroferograma EBV pozitivnog uzorka broj 46

Svaka dobijena sekvenca u 5' pravcu, kao i reverzno komplementarna sekvenca u 3' pravcu za svaki od ispitivanih uzoraka, međusobno su upoređene i određena je konsenzus sekvenca korišćenjem SeqScape v2.1 programskog paketa (Applied Biosystems, Foster City, SAD). Dobijene konsenzus nukleotidne sekvence 2 HCMV izolata i jednog EBV izolata su prikazane u tabeli 5.4.

Tabela 5.4. Nukleotidne sekvence dobijenih izolata

ID	HCMV
Br. 66	GAAACGCGCGGCAATCGGTTTGTGTAATGGCCGAGAGAATGGCTG ACGGGTTGATCTTGCTGAGTTCCTTGAAGACCTCTAGGGTGCGCCGTT GATCCACACACCAGGCTTCTGCGATTTGCGCCAGCGCCCGGTTGATG TAACCGCGCAACGTGTCATAAGTGAAGTGCAGCTGGGCGTAGACCAG ATTGTGCACCGATTCCATGCTGGACAAATGAGTTGTATTATTGTCACT CGTACTTCTTCTGGTCCTATGAGTGATATTCAGACTGGATCGATTGGC CAAACGTTTCGAGTTCC
Br. 84	TGAAACGCGCGGCAATCGGTTTGTGTAATGGCCGAGAGAATGGCT GACGGGTTGATCTTGCTGAGTTCCTTGAAGACCTCTAGGGTGCGCCG TTGATCCACACACCAGGCTTCTGCGATTTGCGCCAGCGCCCGGTTGA TGTAACCGCGCAACGTGTCATAAGTGAAGTGCAGCTGGGCGTAGACC AGATTGTGCACCGATTCCATGCTGGACAAATGAGTTGTATTATTGTC ACTCGTACTTCTTCTGGTCCTATGAGTGATATTCAGACTGGATCGATT GGCCAAACGTTTCGAGTTCC
ID	EBV
Br. 46	CTAATTATATTGTAAGACAATCACGGGGTGACCGGGGCCTTATTTTGC CACAAGGCCACAAACAGCCCCTCAGGCCATGTTGGTACAGCCACAT GTCCCCCTCTACGCCCAGCAGCACCACCATTTTGTACCTCTGTAC AACCGAGGCTTACCCCTCCACAACCACTCATGATGCCACCAAGGCCTA CCCCTCCTACCCCTCTGCCACCTGCAACACTAACGGTGCCACCAAGGC CTACCCGTCTTACCACTCTGCCACCCACCACTACTCACGGTACTAC AAAGGCCTACCGAACTTCAACCCACACCATCACCACCACGCATGCATC TCCCTGTCTTGCATGTGCCAGACCAATCAATGCACCCTCTTACTCATCA AAGCACCCCAAATGATCCAGATA

Upotrebom BLAST programa dobijene konsenzus sekvence su upoređene sa sekvencama CMV i EBV referentnih sojeva i izolata, dostupnim u GenBank bazi podataka (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Dobijene nukleotidne sekvence dva HCMV pozitivna uzorka potvrdila je specifičnost unutrašnjih prajmera za gB gen HCMV genoma i pokazala 99% sličnosti sa genomom HCMV (HHV5) izolata 658_JKS_6 (Accession number FJ820977.1) (Slika 5.3).

BLAST®

Basic Local Alignment Search Tool

[NCBI/BLAST/blastn suite/](#) Formatting Results - UZB97YAZ014

[Formatting options](#)
[Download](#)
[Blast report description](#)

Nucleotide Sequence (301 letters)

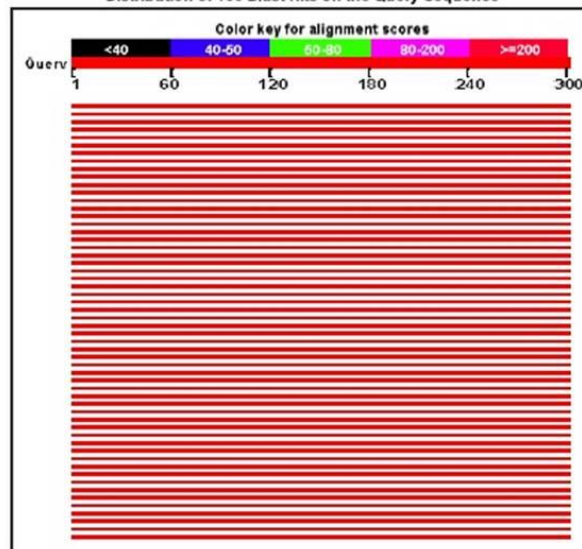
RID [UZB97YAZ014](#) (Expires on 07-23 22:48 pm)

Query ID [k||Query_13659](#)
 Description None
 Molecule type nucleic acid
 Query Length 301

Database Name nr
 Description Nucleotide collection (nt)
 Program BLASTN 2.2.32+

[Graphic Summary](#)

Distribution of 100 Blast Hits on the Query Sequence

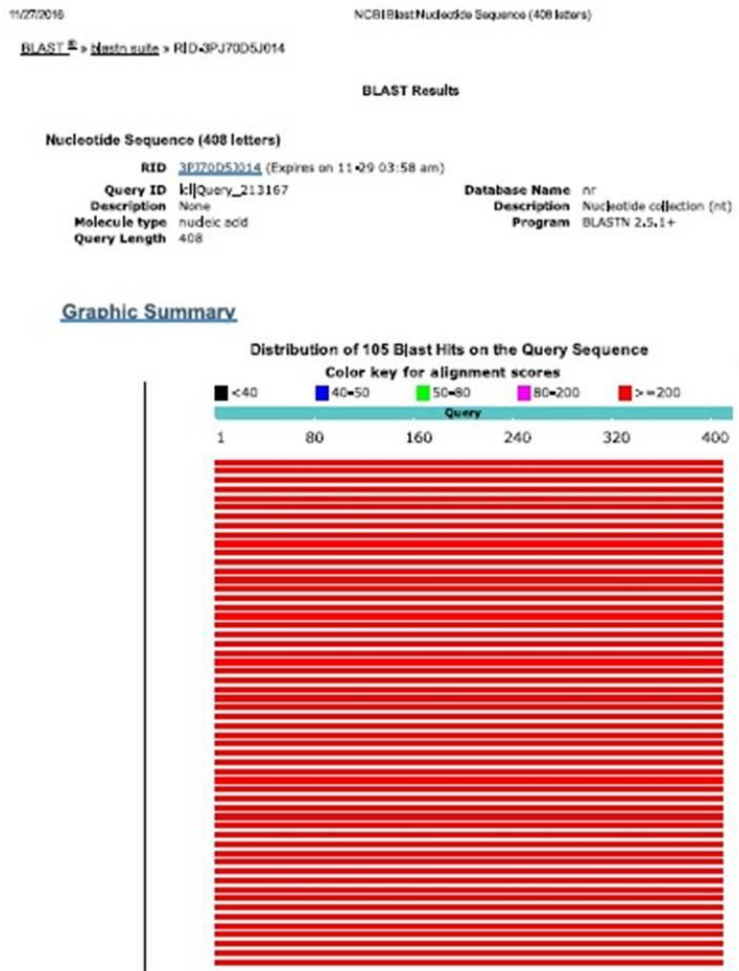
[Descriptions](#)

Sequences producing significant alignments:

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Human herpesvirus 5 isolate 658_JKS_6 envelope glycoprotein B (UL55) gene, partial cds	551	551	100%	3e-153	99%	FJ820977.1
Human herpesvirus 5 strain BE/4/2010, complete genome	545	545	100%	1e-151	99%	KP745728.1
Human herpesvirus 5 strain BE40/2011, complete genome	545	545	100%	1e-151	99%	KP745722.1
Human herpesvirus 5 strain CZ/1/2013, complete genome	545	545	100%	1e-151	99%	KP745691.1
Human herpesvirus 5 strain PAV16, complete genome	545	545	100%	1e-151	99%	KJ872539.1
Human herpesvirus 5 strain HAN22, complete genome	545	545	100%	1e-151	99%	JX512206.1

Slika 5.3. Analiza konsenzus sekvence HCMV izolata primenom BLAST programa

Dobijena nukleotidna sekvenca EBV pozitivnog uzorka potvrdila je specifičnost unutrašnjih prajmera za EBNA2 gen EBV genoma i pokazala 100% sličnosti sa genomom EBV (HHV4) izolata LC2 (Accession number KT823507.1) (Slika 5.4).



Descriptions

Sequences producing significant alignments:

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Human herpesvirus 4 isolate LC2, partial genome	754	754	100%	0.0	100%	KT823507.1
Human herpesvirus 4 isolate LC1, partial genome	754	754	100%	0.0	100%	KT823506.1
Human herpesvirus 4 DNA, complete genome, strain: YCCEL1	754	754	100%	0.0	100%	AP015016.1
Human herpesvirus 4 DNA, complete genome, strain: SNU-719	754	754	100%	0.0	100%	AP015015.1
Human herpesvirus 4 strain HU11393, partial genome	754	754	100%	0.0	100%	KP968261.1
Human herpesvirus 4 strain MP, partial genome	754	754	100%	0.0	100%	KP968258.1

Slika 5.4. Analiza konsenzus sekvence EBV izolata primenom BLAST programa

3. PRISUSTVO HERPESVIRUSA U ISPITIVANOM UZORKU

Prisustvo EBV i HCMV u ispitivanom uzorku dokazivano je upotrebom *nested PCR* metode.

EBV je bio prisutan u tri četvrtine uzoraka periapikalnih lezija naprema samo jedne četvrtine u kontrolnom pulpnom tkivu. Upotrebljeni χ^2 -test pokazao je da je uočena razlika bila statistički značajna ($P=0.020$) (Tabela 5.5).

HCMV je takođe bio značajno učestaliji u periapikalnim lezijama u odnosu na neinflamiranu pulpu (χ^2 -test, $P=0.020$). Naime, rezultati pokazuju da je HCMV bio prisutan u više od jedne polovine uzoraka periapikalnih lezija (54%). S druge strane, prisustvo HCMV je dokazano u samo jednoj trećini uzoraka neinflamiranih pulpi (Tabela 5.5).

Dodatno, EBV bio je značajno češće detektovan u periapikalnim lezijama u poređenju sa HCMV (χ^2 -test, $P=0.001$).

Tabela 5.5. Prisustvo herpesvirusa u ispitivanom uzorku.

Ispitivani herpesvirusi	Grupa istraživanja		P vrednost ^a
	Periapikalne lezije (n=100)	Neinflamirana pulpa (n=25)	
EBV	pozitivan uzorak n (%)	76 (76%)	0.020
	negativan uzorak n (%)	24 (24%)	
HCMV	pozitivan uzorak n (%)	54 (54%)	0.020
	negativan uzorak n (%)	46 (46%)	

^a χ^2 -test; n, broj uzoraka.

EBV bio je detektovan u približno podjednakom broju simptomatskih i asimptomatskih, te velikih i malih periapikalnih lezija. Razlika nije postojala ni u prisustvu EBV između periapikalnih granuloma i radikularnih cista (Tabela 5.6).

Tabela 5.6. Prisustvo EBV u analiziranim podgrupama.

Ispitivane podgrupe	EBV		P vrednost ^a
	Pozitivan n (%)	Negativan n (%)	
Simptomatska (n=34)	27 (79.4)	7 (20.6)	0.803
Asimptomatska (n=66)	49 (74.2)	17 (25.8)	
Velika (>5x7 mm) (n=69)	54 (78.3)	15 (21.7)	0.612
Mala (≤ 5x7 mm) (n=31)	22 (71)	19 (29)	
Periapikalni granulom (n=57)	41 (77.6)	16 (28.1)	0.472
Radikularna cista (n=43)	35 (81.4)	8 (18.6)	

^a χ^2 - test; n, broj uzoraka.

Ni u slučaju prisustva HCMV u simptomatskim i asimptomatskim, malim i velikim periapikalnim lezijama, te periapikalnim granulomima i radikularnim cistama nisu uočene značajne razlike (Tabela 5.7).

Tabela 5.7. Prisustvo HCMV u analiziranim pogrupama.

Ispitivane podgrupe	HCMV		P vrednost ^a
	Pozitivan n (%)	Negativan n (%)	
Simptomatska (n=34)	18 (52.9)	16 (47.1)	1.000
Asimptomatska (n=66)	36 (54.5)	30 (45.5)	
Velika (>5x7 mm) (n=69)	40 (57.9)	29 (42.1)	0.196
Mala (≤ 5x7 mm) (n=31)	14 (45.2)	17 (54.8)	
Periapikalni granulom (n=57)	29 (50.9)	28 (49.1)	0.542
Radikularna cista (n=43)	25 (58.1)	18 (41.9)	

^a χ^2 - test; n, broj uzoraka.

4. ZASTUPLJENOST GENOTIPOVA HERPESVIRUSA U ISPITIVANOM UZORKU

U okviru istraživanja analizirano je prisustvo različitih genotipova EBV i HCMV. Na osnovu alelnog polimorfizma za EBNA-2 gen upotrebom *nested PCR* metode određivano je prisustvo genotipova EBV-1 i EBV-2. *Nested PCR* i RFLP metode korišćene su da bi se odredilo prisustvo genotipova HCMV (gB I-IV).

U ispitivanom uzorku detektovana su oba genotipa EBV. EBV-1 bio je detektovan u većini EBV pozitivnih uzoraka periapikalnih lezija i neinflamiranog pulpnog tkiva. S druge strane, EBV-2 bio je detektovan u jako malom procentu u ispitivanom uzorku, što je bilo statistički značajno (χ^2 - test, P=0.001).

Interesantno je da su u 4 uzorka periapikalnih lezija istovremeno detektovana oba genotipa EBV (Tabela 5.8).

Tabela 5.8. Učestalost genotipova EBV u ispitivanom uzorku.

Ispitivani uzorak	EBV		P vrednost ^a
	EBV-1 n (%)	EBV-2 n (%)	
Periapikalne lezije (n=100)	74 (74)	6 (6)	0.001
Neinflamirana pulpa (n=25)	6 (24)	1 (4)	
Simptomatska (n=34)	26 (76.5)	3 (8.8)	0.686
Asimptomatska (n=66)	48 (72.7)	3 (4.5)	
Velika (>5x7 mm) (n=69)	54 (78.3)	3 (4.5)	0.147
Mala (≤ 5x7 mm) (n=31)	20 (64.5)	3 (9.7)	
Periapikalni granulom (n=57)	39 (68.4)	5 (8.8)	0.143
Radikularna cista (n=43)	35 (81.4)	1 (2.3)	

^a χ^2 - test, n, broj uzoraka.

Od četiri moguće varijante genotipova HCMV samo su genotipovi gB-I i gB-II detektovani u ispitivanom uzorku. U većini HCMV pozitivnih periapikalnih lezija i neinflamiranih pulpi detektovan je gB-II. Dodatno, gB-I bio je prisutan u znatno manjem procentu ispitivanih uzoraka. Primenom χ^2 – testa pokazano je da su navedene razlike statistički značajne (P=0.036) (Tabela 5.9).

Tabela 5.9. Učestalost genotipova HCMV u ispitivanom uzorku.

Ispitivani uzorak	HCMV		P vrednost ^a
	gB-I n (%)	gB-II n (%)	
Periapikalne lezije (n=100)	12 (12)	42 (42)	0.036
Neinflamirana pulpa (n=25)	0 (0)	7 (28)	
Simptomatska (n=34)	3 (8.8)	15 (44.1)	0.779
Asimptomatska (n=66)	9 (13.6)	27 (40.9)	
Velika (>5x7 mm) (n=69)	10 (14.5)	30 (43.5)	0.362
Mala (≤ 5x7 mm) (n=31)	2 (6.5)	12 (38.7)	
Periapikalni granulom (n=57)	6 (10.5)	23 (40.4)	0.738
Radikularna cista (n=43)	6 (14)	19 (44.2)	

^a χ^2 - test, n, broj uzoraka.

5. KVANTIFIKACIJA HERPESVIRUSA U ISPITIVANOM UZORKU

Broj kopija EBV i HCMV određivan je pomoću *real-time PCR* u uzorcima eksperimentalne i kontrolne grupe u kojima je, prethodno, *nested PCR* metodom detektovano prisustvo ovih virusa.

Od 76 periapikalnih lezija i 6 neinflamiranih pulpi, koji su bili EBV pozitivni primenom *nested PCR*, povećan broj virusnih kopija detektovan je u 12 uzoraka periapikalnih lezija (15.8%). Broj detektovanih kopija EBV varirao je u opsegu od 4.6×10^2 do 3.5×10^6 kopija/ml. Prosečan broj kopija EBV iznosio je 6.3×10^5 po ml, dok je standardna devijacija iznosila $\pm 1.1 \times 10^6$ kopija/ml (Tabela 5.10).

Tabela 5.10. Broj genskih kopija EBV u ispitivanom uzorku.

	Broj kopija EBV
	Srednja vrednost \pm SD
	Medijana (min-max) kopija/ml
Periapikalne lezije (n=12)	$6.3 \times 10^5 \pm 1.1 \times 10^6$ 2.9×10^3 (4.6×10^2 - 3.5×10^6)
Simptomatska (n=5)	$3.4 \times 10^5 \pm 4.3 \times 10^5$ 9.7×10^4 (9.3×10^3 - 9.6×10^5)
Asimptomatska (n=7)	$8.3 \times 10^5 \pm 1.5 \times 10^6$ 2.9×10^3 (4.6×10^2 - 3.5×10^6)
Velika ($>5 \times 7$ mm) (n=9)	$8.3 \times 10^5 \pm 1.3 \times 10^6$ 9.7×10^4 (1.3×10^3 - 3.5×10^6)
Mala ($\leq 5 \times 7$ mm) (n=3)	$6.8 \times 10^3 \pm 8.9 \times 10^3$ 2.9×10^3 (4.6×10^2 - 1.7×10^4)
Periapikalni granulom (n=5)	$1.3 \times 10^5 \pm 2.8 \times 10^5$ 9.3×10^3 (4.6×10^2 - 6.3×10^5)
Radikularna cista (n=7)	$9.8 \times 10^5 \pm 1.4 \times 10^6$ 9.7×10^4 (1.3×10^3 - 3.5×10^6)

n, broj uzoraka; SD, standardna devijacija; min. minimum; max-maksimum; ml, mililitar.

Povećan broj kopija HCMV detektovan je u svega 4 (7.4%) periapikalne lezije od ukupno 54 HCMV pozitivna uzorka iz ove grupe i 7 HCMV pozitivnih uzoraka neinflamirane pulpe. Broj detektovanih HCMV kopija varirao je u opsegu 1×10^3 do 5.4×10^6 . Prosečan broj kopija HCMV iznosio je 1.4×10^6 po ml, dok je standardna devijacija iznosila $\pm 2.7 \times 10^6$ kopija/ml (Tabela 5.11).

Tabela 5.11. Broj genskih kopija HCMV u ispitivanom uzorku.

	Broj kopija HCMV
	Srednja vrednost \pm SD
	Medijana (min-max) kopija/ml
Periapikalne lezije (n=4)	$1.4 \times 10^6 \pm 2.7 \times 10^6$ 3×10^3 (1×10^3 - 5.4×10^6)
Simptomatska (n=4)	$1.4 \times 10^6 \pm 2.7 \times 10^6$ 3×10^3 (1×10^3 - 5.4×10^6)
Asimptomatska (n=0)	0.0 ± 0.0 0.0 (0.0-0.0)
Velika ($>5 \times 7$ mm) (n=4)	$1.4 \times 10^6 \pm 2.7 \times 10^6$ 3×10^3 (1×10^3 - 5.4×10^6)
Mala ($\leq 5 \times 7$ mm) (n=0)	0.0 ± 0.0 0.0 (0.0-0.0)
Periapikalni granulom (n=0)	0.0 ± 0.0 0.0 (0.0-0.0)
Radikalna cista (n=4)	$1.4 \times 10^6 \pm 2.7 \times 10^6$ 3×10^3 (1×10^3 - 5.4×10^6)

n, broj uzoraka; SD, standardna devijacija; min. minimum; max-maksimum; ml, mililitar.

6. VREDNOSTI PROINFLAMATORNIH CITOKINA U ISPITIVANOM UZORKU

Nivo proinflammatoryh citokina, TNF- α , IL-1 β i IL-6, u ispitivanom uzorku određivan je primenom ELISA metode. Prag detekcije za TNF- α iznosio je 4 pg/ml, a za IL-1 β i IL-6 očitavane su vrednosti koje su bile iznad 2 pg/ml. TNF- α je bio detektovan u 23 uzorka periapikalnih lezija i u 10 uzoraka neinflamirane pulpe. IL-1 β i IL-6 bili su detektovani u 47 odnosno 58 uzoraka periapikalnih lezija, dok su njihove koncentracije u neinflamiranom pulpnom tkivu bile ispod limita detekcije.

Vrednosti analiziranih citokina u periapikalnim lezijama i neinflamiranoj pulpi prikazane su u tabeli 5.12. Vrednosti IL-1 β i IL-6 bile su statistički značajno veće u periapikalnim lezijama u odnosu na neinflamirano pulpno tkivo (Mann-Whitney U-test, P=0.001, P=0.001). S druge strane, vrednosti TNF- α bile su približno jednake u posmatranim grupama istraživanja.

Treba napomenuti da je dokazana značajna pozitivna korelacija između vrednosti IL-1 β i IL-6 u uzorcima periapikalnih lezija (Spearman's correlation, $\rho=0.297$, P=0.013).

Tabela 5.12. Vrednosti proinflammatoryh citokina u ispitivanom uzorku.

Analizirani citokini	Periapikalne lezije	Neinflamirana pulpa	P vrednost ^a
TNF- α	13.1 \pm 56.4	11.2 \pm 16.8	0.544
Srednja vrednost \pm SD			
Medijana (min-max) pg/ml	0.0 (0.0-463.3)	0.0 (0.0-56.4)	
IL-1 β	17.5 \pm 41.3	0.0 \pm 0.0	0.001
Srednja vrednost \pm SD			
Medijana (min-max) pg/ml	0.0 (0.0-222.4)	0.0 (0.0-0.0)	
IL-6	20.5 \pm 44.5	0.0 \pm 0.0	0.001
Srednja vrednost \pm SD			
Medijana (min-max) pg/ml	4.1 (0.0-228.6)	0.0 (0.0-0.0)	

^a Mann-Whitney U-test; SD, standardna devijacija; min, minimum; max, maksimum.

Analizirajući vrednosti proinflammatoryh citokina u periapikalnim lezijama pokazano je da su vrednosti IL-1 β i IL-6 bile statistički značajno veće u simptomatskim u odnosu na asimptomatske lezije (Mann-Whitney U-test; P=0.001, P=0.035) (Tabela 5.13).

Nadalje, vrednosti IL-1 β su statistički značajno veće i u velikim u odnosu na male periapikalne lezije (Mann-Whitney U-test; P=0.007). Značajno veće vrednosti IL-1 β uočene su i u radikalnim cistama poredivši ih sa vrednostima u periapikalnim granulomima (Mann-Whitney U-test; P=0.004) (Tabela 5.13).

Tabela 5.13. Vrednosti proinflammatoryh citokina u analiziranim podgrupama.

	TNF- α *	IL-1 β *	IL-6*
Simptomatska (n=34)	18.4 \pm 79.7 0.0 (0.0-463.3)	23.3 \pm 32.8 ^a 9.6 (0.0-124.7)	26.1 \pm 53.3 ^b 8.6 (0.0-238.6)
Asimptomatska (n=66)	10.3 \pm 39.9 0.0 (0.0-306.1)	14.5 \pm 45 0.0 (0.0-222.4)	17.6 \pm 39.4 1.1 (0.0-194.1)
Velika (>5x7 mm) (n=69)	12.1 \pm 56.6 0.0 (0.0-463.3)	24 \pm 48.3 ^c 5 (0.0-222.4)	24.4 \pm 51.6 4.5 (0.0-238.6)
Mala (\leq 5x7 mm) (n=31)	15.2 \pm 56.7 0.0 (0.0-306.1)	3.0 \pm 5.1 0.0 (0.0-21.3)	11.8 \pm 19.6 2.5 (0.0-89.2)
Periapikalni granulom (n=57)	10 \pm 42.5 0.0 (0.0-306.1)	7.2 \pm 16.5 4.2 (0.0-90.3)	14.9 \pm 35.5 2.5 (0.0-238.6)
Radikalna cista (n=43)	17.1 \pm 71 0.0 (0.0-463.3)	31.2 \pm 57.6 ^d 9.3 (0.0-222.4)	27.9 \pm 53.7 7.4 (0.0-208.3)

* Vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost \pm standardna devijacija, medijana (minimum-maksimum) pg/ml.

^a P=0.001 (Mann-Whitney U-test); vrednosti IL-1 β između simptomatskih i asimptomatskih lezija.

^b P=0.035 (Mann-Whitney U-test); vrednosti IL-6 između simptomatskih i asimptomatskih lezija.

^c P=0.007 (Mann-Whitney U-test); vrednosti IL-1 β između malih i velikih lezija.

^d P=0.004 (Mann-Whitney U-test); vrednosti IL-1 β između periapikalnih granuloma i radikalnih cista.

U okviru istraživanja dodatno su analizirane vrednosti proinflammatoryh citokina u EBV i HCMV pozitivnim i negativnim periapikalnim lezijama. Iako je pokazano da su srednje vrednosti koncentracija IL-1 β bile veće u EBV pozitivnim u odnosu na EBV negativne lezije, kao i vrednosti IL-6 u EBV i HCMV pozitivnim u odnosu na negativne periapikalne lezije uočene razlike nisu bile statistički značajne (Tabele 5.14, 5.15).

Tabela 5.14. Vrednosti proinflammatoryh citokina u EBV pozitivnim i EBV negativnim periapikalnim lezijama.

Analizirani citokini	Periapikalne lezije		P vrednost ^a
	EBV pozitivna	EBV negativna	
TNF- α *	12.3 \pm 55.4 0.0 (0.0-463.3)	15.2 \pm 60.1 0.0 (0.0-306.1)	0.540
IL-1 β *	20.3 \pm 46.5 0.0 (0.0-222.4)	9.4 \pm 18.6 0.0 (0.0-86.5)	0.341
IL-6*	24.4 \pm 50.6 4.7 (0.0-238.6)	9.2 \pm 12.8 1.3 (0.0-38.7)	0.647

*Vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost \pm standardna devijacija, medijana (minimum-maksimum) pg/ml.

^a Mann-Whitney U-test.

Tabela 5.15. Vrednosti proinflammatoryh citokina u HCMV pozitivnim i HCMV negativnim periapikalnim lezijama

Analizirani citokini	Periapikalne lezije		P vrednost ^a
	HCMV pozitivna	HCMV negativna	
TNF- α *	11.4 \pm 43.2 0.0 (0.0-306.1)	15.0 \pm 69.2 0.0 (0.0-463.3)	0.230
IL-1 β *	14.8 \pm 33.4 0.0 (0.0-173.1)	20.6 \pm 49.2 2.6 (0.0-222.4)	0.649
IL-6*	23.6 \pm 48.2 5.0 (0.0-238.6)	16.8 \pm 39.8 1.1 (0.0-194.1)	0.403

*Vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost \pm standardna devijacija, medijana (minimum-maksimum) pg/ml.

^a Mann-Whitney U-test.

Vrednosti proinflammatoryh citokina u EBV pozitivnim i EBV negativnim periapikalnim lezijama sa različitom kliničkom slikom prikazane su u tabeli 5.15. Evidentno je da su koncentracije IL-1 β bile značajno veće u EBV pozitivnim simptomatskim u odnosu na asimptomatske lezije (Mann-Whitney U-test, P=0.018). Dodatno, vrednosti IL-1 β bile su značajno veće i u EBV negativnim simptomatskim u odnosu na asimptomatske lezije (Mann-Whitney U-test, P=0.003) (Tabela 5.16). Vrednosti ostalih citokina nisu se značajno razlikova između ispitivanih grupa.

Tabela 5.16. Vrednosti proinflammatoryh citokina u EBV pozitivnim i negativnim periapikalnim lezijama sa različitom kliničkom slikom.

Analizirani citokini	EBV pozitivna		EBV negativna	
	Simptomatska	Asimptomatska	Simptomatska	Asimptomatska
TNF- α *	22.7 \pm 91.0 0.0 (0.0-463.3)	6.7 \pm 16.6 0.0 (0.0-92.4)	4.5 \pm 10.2 0.0 (0.0-29.1)	20.0 \pm 72.0 0.0 (0.0-306.1)
IL-1 β *	22.9 \pm 34.6 ^a 8.1 (0.0-124.7)	19.0 \pm 52.1 0.0 (0.0-222.4)	24.8 \pm 28.2 ^b 21.4 (0.0-86.5)	2.6 \pm 4.4 0.0 (0.0-11.8)
IL-6*	31.2 \pm 60.0 9.0 (0.0-238.6)	20.7 \pm 45.2 2.7 (0.0-194.1)	9.3 \pm 9.3 7.1 (0.0-25.9)	9.2 \pm 14.4 0.0 (0.0-38.7)

* Vrednosti predstavljene kao srednja vrednost \pm standardna devijacija, medijana (minimum-maksimum) pg/ml.

^a P=0.018 (Mann-Whitney U-test); vrednosti IL-1 β između EBV pozitivnih simptomatskih i asimptomatskih lezija.

^b P=0.003 (Mann-Whitney U-test); vrednosti IL-1 β između EBV negativnih simptomatskih i asimptomatskih lezija.

U slučaju HCMV pozitivnih periapikalnih lezija značajno su bile povećane vrednosti IL-6 između simptomatskih i asimptomatskih lezija (Mann-Whitney U-test, P=0.003). S druge strane, u HCMV negativnim periaikalnim lezijama samo su vrednosti IL-1 β bile značajno veće između simptomatskih u odnosu na asimptomatske lezije (Mann-Whitney U-test, P=0.004) (Tabela 5.17).

Tabela 5.17. Vrednosti proinflamatornih citokina u HCMV pozitivnim i negativnim periapikalnim lezijama sa različitim kliničkom slikom.

Analizirani citokini	HCMV pozitivna		HCMV negativna	
	Simptomatska	Asimptomatska	Simptomatska	Asimptomatska
TNF- α *	6.4 \pm 16.9 0.0 (0.0-54.7)	13.9 \pm 51.7 0.0 (0.0-306.1)	31.9 \pm 115.3 0.0 (0.0-463.3)	6.0 \pm 17.6 0.0 (0.0-92.4)
IL-1 β *	22.1 \pm 32.2 5.9 (0.0-100.9)	11.2 \pm 33.9 0.0 (0.0-173.1)	24.7 \pm 34.6 ^b 11.8 (0.0-124.7)	18.5 \pm 55.8 0.0 (0.0-222.4)
IL-6*	42.4 \pm 68.7 ^a 16.2 (0.0-238.6)	14.2 \pm 30.9 2.7 (0.0-147.5)	7.7 \pm 13.3 3.7 (0.0-52.9)	21.6 \pm 47.9 0.0 (0.0-194.1)

* Vrednosti predstavljene kao srednja vrednost \pm standardna devijacija, medijana (minimum-maksimum) pg/ml.

^a P=0.003 (Mann-Whitney U-test); vrednosti IL-6 između HCMV pozitivnih simptomatskih i asimptomatskih lezija.

^b P=0.004 (Mann-Whitney U-test) vrednosti IL-1 β između HCMV negativnih simptomatskih i asimptomatskih lezija.

Analiza vrednosti proinflamatornih citokina pokazuje da su jedino koncentracije IL-1 β bile značajno veće u velikim u odnosu na male EBV pozitivne periapikalne lezije (Mann-Whitney U-test, P=0.032). S druge strane, uočene vrednosti ispitivanih citokina između malih i velikih EBV negativnih periapikalnih lezija nisu se značajno razlikovale (Tabela 5.18).

Vrednosti proinflamatornih citokina u HCMV pozitivnim velikim i malim periapikalnim lezijama nisu se značano razlikovale. Međutim, vrednosti IL-1 β bile su značajno veće u velikim u odnosu na male HCMV negativne periapikalne lezije (Mann-Whitney U-test, P=0.035) (Tabela 5.19).

Tabela 5.18. Vrednosti proinflammatoryh citokina u EBV pozitivnim i negativnim periapikalnim lezijama u odnosu na veličinu.

Analizirani citokini	EBV pozitivna		EBV negativna	
	Mala	Velika	Mala	Velika
TNF- α *	6.9 \pm 20.7 0.0 (0.0-92.4)	14.4 \pm 53.7 0.0 (0.0-463.3)	30.5 \pm 91.8 0.0 (0.0-306.1)	4.0 \pm 10.1 0.0 (0.0-36.2)
IL-1 β *	2.8 \pm 4.1 0.0 (0.0-10.9)	26.9 \pm 53 ^a 5.0 (0.0-222.4)	3.4 \pm 6.9 0.0 (0.0-21.3)	13.8 \pm 23.1 8.2 (0.0-86.5)
IL-6*	14.4 \pm 22.5 4.3 (0.0-89.2)	28.2 \pm 57.4 5.3 (0.0-238.6)	7.0 \pm 13.4 0.0 (0.0-38.7)	10.9 \pm 13.3 3.1 (0.0-37.3)

* Vrednosti predstavljene kao srednja vrednost \pm standardna devijacija, medijana (minimum-maksimum) pg/ml.

^a P=0.032 (Mann-Whitney U-test); vrednosti IL-1 β između EBV pozitivnih velikih i malih lezija.

Tabela 5.19. Vrednosti proinflammatoryh citokina u HCMV pozitivnim i negativnim periapikalnim lezijama u odnosu na veličinu.

Analizirani citokini	HCMV pozitivna		HCMV negativna	
	Mala	Velika	Mala	Velika
TNF- α *	22.4 \pm 81.7 0.0 (0.0-306.1)	7.6 \pm 15.9 0.0 (0.0-54.7)	9.4 \pm 22.9 0.0 (0.0-92.4)	18.4 \pm 85.8 0.0 (0.0-463.3)
IL-1 β *	1.8 \pm 3 0.0 (0.0-7.8)	19.4 \pm 37.9 2.5 (0.0-173.1)	3.9 \pm 6.2 0.0 (0.0-21.3)	30.4 \pm 59.9 ^a 9.5 (0.0-222.4)
IL-6*	15.6 \pm 25.3 4.6 (0.0-89.2)	26.4 \pm 54 6 (0.0-238.6)	8.6 \pm 13.5 0.0 (0.0-47.4)	21.6 \pm 48.8 2.1 (0.0-194.1)

* Vrednosti predstavljene kao srednja vrednost \pm standardna devijacija, medijana (minimum-maksimum) pg/ml.

^a P=0.035 (Mann-Whitney U-test); vrednosti IL-6 između HCMV negativnih velikih i malih lezija.

Analizirane vrednosti proinflammatoryh citokina u EBV i HCMV pozitivnim i negativnim periapikalnim lezijama sa različitim patohistološkim karakteristikama prikazane su u tabelama 5.20. i 5.21.

Vrednosti ispitivanih proinflammatoryh citokina u EBV pozitivnim periapikalnim granulomima i radikularnim cistama nisu se značajno razlikovali. Međutim, u EBV negativnim lezijama srednje vrednosti koncentracija IL-1 β bile su značajno veće u periapikalnim granulomima u odnosu na radikularne ciste (Mann-Whitney U-test, P=0.001). Dodatno, vrednosti IL-6 bile su značajno veće u EBV negativnim radikularnim cistama u odnosu na periapikalne granulome (Mann-Whitney U-test, P=0.006) (Tabela 5.20).

Tabela 5.20. Vrednosti proinflammatoryh citokina u EBV pozitivnim i negativnim periapikalnim lezijama sa različitim patohistološkim karakteristikama.

Analizirani citokini	EBV pozitivna		EBV negativna	
	Periapikalni granulom	Radikularna cista	Periapikalni granulom	Radikularna cista
TNF- α *	6.1 \pm 17 0.0 (0.0-92.4)	19.3 \pm 78.6 0.0 (0.0-463.3)	18.6 \pm 72.1 0.0 (0.0-306.1)	7.6 \pm 13.1 0.0 (0.0-36.2)
IL-1 β *	9 \pm 19.1 0.0 (0.0-90.3)	33 \pm 62.6 5 (0.0-222.4)	23.3 \pm 28.2 10.6 (0.0-86.5)	3.3 \pm 7.12 ^a 0.0 (0.0-21.5)
IL-6*	19.4 \pm 41.7 4.9 (0.0-238.6)	30 \pm 59.2 4.5 (0.0-208.3)	5.1 \pm 10.4 0.0 (0.0-38.7)	18.5 \pm 13.6 ^b 21.2 (0.0-37.3)

* Vrednosti predstavljene kao srednja vrednost \pm standardna devijacija, medijana (minimum-maksimum) pg/ml.

^a P=0.001 (Mann-Whitney U-test); vrednosti IL-1 β između EBV negativnih periapikalnih granuloma i radikularnih cista.

^b P=0.006 (Mann-Whitney U-test); vrednosti IL-6 između EBV negativnih periapikalnih granuloma i radikularnih cista.

Razlike u vrednosti proinflammatoryh citokina između HCMV pozitivnih periapikalnih granuloma i radikularnih cista takođe nisu bile značajne. U HCMV negativnim radikularnim cistama vrednosti IL-1 β bile su značajno veće u odnosu na vrednosti u periapikalnim granulomima (Mann-Whitney U-test, P=0.026) (Tabela 5.21).

Tabela 5.21. Vrednosti proinflammatoryh citokina u HCMV pozitivnim i negativnim periapikalnim lezijama sa različitim patohistološkim karakteristikama.

Analizirani citokini	HCMV pozitivna		HCMV negativna	
	Periapikalni granulom	Radikalarna cista	Periapikalni granulom	Radikalarna cista
TNF- α *	13.7 \pm 57.1 0.0 (0.0-306.1)	8.8 \pm 17.3 0.0 (0.0-54.7)	6.2 \pm 18.3 0.0 (0.0-92.4)	28.7 \pm 108.7 0.0 (0.0-463.3)
IL-1 β *	6.6 \pm 15.5 0.0 (0.0-71.8)	24.4 \pm 44.9 5 (0.0-173.1)	7.8 \pm 17.7 0.0 (0.0-90.3)	40.6 \pm 72.1 ^a 11.0 (0.0-222.4)
IL-6*	21.3 \pm 47.3 3.7 (0.0-238.6)	26.3 \pm 50.2 7.4 (0.0-208.3)	8.3 \pm 14.2 0.0 (0.0-52.9)	30.1 \pm 59.7 7.4 (0.0-194.1)

* Vrednosti predstavljene kao srednja vrednost \pm standardna devijacija, medijana (minimum-maksimum) pg/ml.

^a P=0.026 (Mann-Whitney U-test); vrednosti IL-1 β između HCMV negativnih periapikalnih granuloma i radikalarnih cista.

Na kraju, korelaciona analiza nije pokazala značajnu povezanost između izmerenih vrednosti proinflammatoryh citokina i broja genskih kopija EBV i HCMV u periapikalnim lezijama (Tabela 5.22).

Tabela 5.22. Korelacija između vrednosti proinflammatoryh citokina i broja genskih kopija EBV i HCMV u periapikalnim lezijama.

Analizirani citokini	Broj genskih kopija*	
	EBV	HCMV
TNF- α	0.107	-0.110
IL-1 β	0.127	-0.051
IL-6	0.175	0.036

* Spirman's correlation, ρ , vrednosti koeficijenta korelacije

VI DISKUSIJA

Dosadašnja epidemiološka istraživanja potvrdila su da hronične periapikalne lezije predstavljaju jedno od najčešćih patoloških stanja u usnoj duplji ^{21, 55, 56, 64, 99, 81, 159, 164}. Iako je reč o učestalim promenama, još uvek u potpunosti nisu razjašnjeni mehanizmi pomoću kojih različiti etiološki faktori, pre svega herpesvirusi, doprinose njihovom nastanku i razvoju, te razgradnji alveolarnog koštanog tkiva.

Rezultati ovog istraživanja još jednom su potvrdili poznate karakteristike hroničnih periapikalnih lezija. Naime, srednja vrednost godina života pacijenata sa periapikalnim lezijama bila je značajno veća nego u grupi pacijenata sa impaktiranim umnjacima, od kojih su prikupljeni uzorci kontrolnog pulpnog tkiva (40.6 ± 14.5 naspram 21.6 ± 4.2 godina). Dobijeni rezultat je očekivan, jer se kod mlađe populacije pacijenata najčešće i izvodi intervencija hirurškog vađenja impaktiranih umnjaka. Dodatno, nije uočena značajna razlika u distribuciji periapikalnih lezija prema polovima. Prikazani rezultati su u skladu sa prethodnim istraživanjima u kojima se navodi da se periapikalne lezije najčešće uočavaju kod pacijenta starosne dobi između 40 i 49 godina života, pri čemu nije pokazana razlika u učestalosti u odnosu na pol ^{21, 55, 56, 64, 99, 81, 159, 164}. Dalje, uočeno je da su dve trećine uzoraka periapikalnih lezija činile asimptomatske i velike lezije, što prvenstveno ukazuje na njihov hroničan karakter ^{146, 148}. Uzimajući u obzir patohistološke karakteristike lezija, pokazali smo da su periapikalni granulomi bili učestaliji u odnosu na radikularne ciste. Ovakav ishod je takođe u skladu sa ranije publikovanim istraživanjima ^{109, 152}.

6.1. ANALIZA UČESTALOSTI DETEKCIJE I BROJA GENSKIH KOPIJA HCMV I EBV U ISPITIVANOM UZORKU

Mnogobrojna dosadašnja istraživanja ispitivala su prisustvo herpesvirusa u tkivima hroničnih periapikalnih lezija ^{5, 73-75, 91, 116, 126, 158, 189-192, 194-196, 218, 226, 236, 249, 250}. Njihovi rezultati su izdvojili HCMV i EBV kao najčešće detektovane viruse u odnosu na ostale pripadnike porodice *Herpesviridae*. Do sada, Andrić i saradnici ⁵ su 2007. godine sprovedli jedino istraživanje na našoj populaciji u okviru kojeg je ispitivano prisustvo HCMV u tkivima odontogenih cisti, uključujući i radikularne ciste, kao predstavnike hroničnih periapikalnih lezija. Analiza učestalosti HCMV pokazala je da je HCMV bio prisutan u 18 od 33 uzorka radikularnih cisti (54.5 %) i u 6 od 10 uzoraka odontogenih keratocističnih tumora (60 %) ⁵.

U našem istraživanju, po prvi put, ispitivano je prisustvo oba herpesvirusa, HCMV i EBV u 100 uzoraka periapikalnih lezija i 25 uzoraka kontrolnog pulpnog tkiva naše populacije. Rezultati ovog istraživanja ukazuju da je EBV bio zastupljen u dve trećine uzoraka (76%) periapikalnih lezija, dok je HCMV bio detektovan u nešto više od polovine ispitivanog uzorka (54%). Statistička analiza je pokazala da je EBV bio značajno učestaliji u periapikalnim lezijama u odnosu na HCMV. Takođe, oba ispitivana virusa bila su značajno češće detektovana u uzorcima periapikalnih lezija u odnosu na pulpno tkivo. Rezultati našeg istraživanja u skladu su sa ranije publikovanim studijama koje se pokazale da su herpesvirusi češće detektovani u tkivima periapikalnih lezija u odnosu na zdravo kontrolno tkivo ^{74, 116, 250}. Tako su Li i saradnici ¹¹⁶ pokazali da je EBV bio značajno učestaliji u tkivima periapikalnih lezija (22 od 53 uzorka, 44%) u odnosu na kontrolno pulpno tkivo gde virus nije bio detektovan. Takođe, Hernadi i saradnici ⁷⁴ su 2013. godine pokazali statistički značajno veću zastupljenosti EBV u periapikalnim lezijama (44 od 58 uzoraka, 76%) u odnosu na zdravo gingivalno tkivo gde je virus detektovan u svega 2 uzorka. Iako na malom broju uzoraka (12 periapikalnih lezija i 12 kontrolnih pulpnih tkiva), interesanto je spomenuti da su Yildirim i saradnici ²⁵⁰ prikazali statistički značajno veću zastupljenost dualne HCMV/EBV infekcije u grupi sa simptomatskim lezijama. S druge strane, u istraživanju Verduga i saradnika ²³⁶ iz 2015. godine nije uočena statistički značajna razlika između prisustva HCMV i EBV u periapikalnim lezijama i njihove detekcije u kontrolnom uzorku koje je u ovom slučaju bila pljuvačka. Nepostojanje značajne razlike između ispitivanih grupa moglo bi se objasniti upotrebom pljuvačke koja sama po sebi predstavlja rezervoar analiziranih virusa ^{80, 90, 119}.

U okviru ove doktorske disertacije ispitivana je učestalost prisustva HCMV i EBV u periapikalnim lezijama sa različitim kliničkim, radiološkim i patohistološkim karakteristikama. Uočeno je da su HCMV i EBV bili skoro podjednako zastupljeni u ispitivanim podgrupama istraživanja. Statistička analiza nije pokazala postojanje značajne razlike u detekciji HCMV i EBV između simptomatskih i asimptomatskih, velikih i malih periapikalnih lezija, te periapikalnih granuloma i radikularnih cisti. Ispitivanje prisustva herpesvirusa u simptomatskim i velikim u odnosu na asimptomatske i male periapikalne lezije vršeno je u cilju potvrđivanja njihove uloge u patogenezi hroničnih periapikalnih lezija. Shodno ranije postavljenoj hipotezi ²¹⁹,

smatrano je da različitim direktnim i indirektnim mehanizmima herpesvirusi mogu da dovedu do egzacerbacije hroničnog zapaljenskog procesa u apeksnom parodontijumu i dodatne resorpcije alveolarnog koštanog tkiva. Tako su zagovornici navedene hipoteze početkom 21. veka prikazali da su HCMV i EBV češće detektovani u simptomatskim i velikim u odnosu na asimptomatske i male periapikalne lezije ^{192, 194, 195, 218}. Međutim, treba napomenuti da su navedene studije sprovedene od iste grupe istraživača, na populaciji stanovništva sa istog geografskog područja i na relativno malom broju uzoraka (ukupno 67 uzoraka, pri čemu je ukupan broj uzoraka po studiji varirao od 5 do 34 uzorka) ^{192, 194, 195, 218}.

Primenom iste metodologije Yazdi i saradnici ²⁴⁹ su analizirali učestalost detekcije HCMV i EBV između 28 simptomatskih i 22 asimptomatske periapikalne lezije na iranskoj populaciji. Njihovi rezultati su pokazali da je postojala statistički značajna razlika isključivo u detekciji HCMV između ispitivanih grupa, dok je EBV bio detektovan samo u po jednoj simptomatskoj i asimptomatskoj leziji. S druge strane, Sunde i saradnici ²²⁶ ispitivajući učestalost detekcije HCMV i EBV između 18 simptomatskih i 22 asimptomatske lezije na norveškoj populaciji uočili su značajno veću učestalost EBV u simptomatskim u odnosu na asimptomatske lezije, pri čemu HCMV nije bio detektovan u ispitivanom uzorku. Slični rezultati predstavljeni su i od strane Hernadi i saradnika ⁷⁵ koji su na mađarskoj populaciji stanovništva uočili značajno češću zastupljenost samo EBV u simptomatskim u odnosu na asimptomatske periapikalne lezije. Za razliku od rezultata predstavljenih istraživanja, a u skladu sa našim rezultatima, Li i saradnici ¹¹⁶ nisu uočili statistički značajnu razliku u detekciji HCMV i EBV između 51 simptomatske i 31 asimptomatske periapikalne lezije.

Sveobuhvatna analiza učestalosti prisustva HCMV i EBV između simptomatskih i asimptomatskih periapikalnih lezija sprovedena je u sistematskom pregledu i meta-analizi Jakovljevića i Andrića iz 2014. godine ⁸⁵. Naime, u okviru meta-analize uključeno je ukupno 6 studija koje su primenjivale istu metodologiju (PCR reakcija reverzne transkripcije) za dokazivanje prisustva herpesvirusa. Osnovni cilj istraživanja bio je da se na ukupnom broju uzoraka svih 6 studija (244 uzorka, 141 simptomatskih i 103 asimptomatskih lezija) ispita postojanje razlike u detekciji HCMV i EBV između simptomatskih i asimptomatskih periapikalnih lezija. Rezultati meta-analize, koja je ukazala na prisustvo umerene heterogenosti između uključenih studija usled različitog

broja analiziranih uzoraka, pokazali su nepostojanje statistički značajne razlike u detekciji HCMV i EBV između simptomatskih i asimptomatskih lezija ⁸⁵.

Iako nakon ispitivanja našeg uzorka nismo uspeli da uočimo statistički značajnu razliku u učestalosti HCMV i EBV između radiološki procenjenih velikih i malih periapikalnih lezija, nekoliko dosadašnjih istraživanja prikazalo je suprotne rezultate ^{74, 75, 191}. Hernadi i saradnici su u svoja dva istraživanja ^{74, 75} naveli da je EBV bio učestaliji u velikim u odnosu na male periapikalne lezije. Dodatno, rezultati Sabeti-ja i saradnika ¹⁹¹ ukazuju na učestaliju zastupljenost dualne HCMV/EBV infekcije u velikim u odnosu na male periapikalne lezije.

Do sada su samo 3 studije ispitivale učestalost herpesvirusa među periapikalnim granulomima i radikularnim cistama ^{91, 116, 196}. Tako su Kabak i saradnici ⁹¹ upotrebom imunohistohemije pokazali prisustvo HSV u 5 uzoraka radikularnih cista, dok nijedan uzorak periapikalnog granuloma nije bio pozitivan. Naši rezultati su u skladu sa rezultatima Saboia-Danta i saradnika ¹⁹⁶ i Li-ja i saradnika ¹¹⁶ koji nisu pronašli značajnu razliku u detekciji HCMV i EBV između periapikalnih granuloma i radikularnih cisti.

Prisustvo očiglednih razlika u rezultatima do sada objavljenih istraživanja moguće je objasniti na dva osnovna načina. Najpre, potrebno je ukazati na bitne razlike u metodologiji istraživanja između do sada publikovanih studija. Treba naglasiti da među analiziranim istraživanjima postoji očigledna razlika u broju analiziranih uzoraka i postojanju kontrolne grupe istraživanja. Tako je, na primer, publikovano istraživanje u okviru kojeg je ispitivano prisustvo herpesvirusa u svega 5 uzoraka periapikalnih lezija ¹⁹², dok sa druge strane postoje studije sa po 40 uzoraka eksperimentalne i kontrolne grupe istraživanja ⁷⁵. Naše istraživanje se karakteriše najvećim brojem ispitivanih uzoraka (ukupno 125, 100 uzoraka tkiva periapikalnih lezija i 25 kontrolnog pulpnog tkiva) u odnosu na sve do sada publikovane studije koje su se bavile detekcijom herpesvirusa.

Dalje, većina studija je za dokazivanje prisustva herpesvirusa koristila PCR metodu ^{5, 73-75, 116, 158, 189-192, 194, 195, 218, 236, 249, 250}, dok je sa druge strane u samo par istraživanja primenjena metoda imunohistohemije ^{91, 126, 196, 226}. PCR reakcija u osnovi predstavlja metodu kojom se u ispitivanom uzorku identifikuje prisustvo određene,

unapred definisane, sekvence DNK. Zahvaljujući tome, ova tehnika omogućava vrlo specifičnu identifikaciju mikroorganizama u ispitivanom uzorku. Takođe, primenjena lančana reakcija je i visoko senzitivna metoda detekcije. Naime, ukoliko je tražena sekvenca DNK prisutna PCR može da traje dok se ne utroše sve reakcione komponente. Danas se u svetu koristi više različitih modifikacija osnovne PCR metode ³⁸. U našem slučaju, opredelili smo se za upotrebu *nested PCR* metode koja se karakteriše visoko izraženom senzitivnošću i specifičnošću same reakcije. Proces amplifikacije DNK se u ovom slučaju odvija u dva koraka uz upotrebu dva para prajmera („unutrašnji“ i „spoljašnji“). Dvostruka PCR reakcija omogućava mnogo veći prinos u odnosu na standardni PCR metod, čime je povećana senzitivnost, dok upotreba dvostrukog seta prajmera povećava specifičnost same reakcije.

S druge strane, upotrebom *nested PCR* metode nije moguće napraviti razliku između detekcije latentne i aktivne, klinički značajne, herpesvirusne infekcije. Naime, poznato je da se nakon primarne infekcije HCMV i EBV održavaju u latentnom stanju. EBV se u latentnom stanju u ljudskom organizmu održava u B-limfocitama, dok HCMV to čini u progenitornim ćelijama monocita kostne srži i monocitima krvi. U određenim situacijama usled dejstva nespecifičnih endogenih i egzogenih faktora dolazi do reaktivacije virusa što uzrokuje nastanak aktivnih, klinički značajnih i najčešće manifestnih infekcija u ljudskom organizmu. Slots i saradnici ²¹⁹ smatraju da se patološko dejstvo herpesvirusa u nastanku i razvoju periapikalnih lezija ispoljava upravo u toku aktivne replikacije virusa. Sa tim u vezi, veliki broj studija ^{73-75, 116, 190-192, 194, 195, 218, 249} je za detekciju aktivne herpesvirusne infekcije koristio PCR reakciju reverzne transkripcije (*RT-PCR*), kojom se dokazuje prisustvo mRNK za određeni protein virusa. Ukoliko se analizira sekvenca RNK za protein koji se sintetiše u kasnoj fazi formiranja virusne čestice, njeno prisustvo predstavlja potvrdu aktivne replikacije virusa u ispitivanom uzorku.

Iako *RT-PCR* može uspešno da posluži za razlikovanje latentne od aktivne herpesvirusne infekcije ona ima isti nedostatak kao i osnovna varijanta PCR metode – visoku senzitivnost. Zapravo, primena *RT-PCR* metoda može navesti na zaključak da se radi o klinički značajnoj, aktivnoj herpesvirusnoj infekciji i onda kada se zapravo detektuje samo kratkotrajna replikacija relativno malog broja virusa. Interesantno je spomenuti rezultate istraživanja Li-ja i saradnika ¹¹⁶ i Hernadi-ja i saradnika ⁷⁵ koji su

detektovali herpesvirusnu infekciju u istim uzorcima tkiva periapikalnih lezija primenom dve različite PCR metode (*nested* i *RT-PCR*). Tako je u oba slučaja pokazano da je DNK herpesvirusa, dokazivana primenom *nested PCR* metode, bila češće detektovana u poređenju sa mRNK herpesvirusa čije je prisustvo dokazivano primenom *RT-PCR* metode ^{75, 116}. Rezultati njihovih istraživanja ukazuju da je mnogo veća verovatnoća da se primenom *nested PCR* metode detektuje virusna DNK iz ćelija u kojima oni ostvaruju latentnu infekciju i koje se pri tome nalaze u tkivu hroničnog zapaljenskog procesa privučeni od strane hemotaksičnih faktora različitog porekla.

Drugi značajan uzrok postojanja razlika u detekciji herpesvirusa u tkivima periapikalnih lezija između do sada publikovanih istraživanja odnosi se na različitu distribuciju herpesvirusa u svetu. Naime, iako su oba ispitivana herpesvirusa široko rasprostranjena, epidemiološke studije pokazuju da njihova distribucija zavisi od geografskih, socioekonomskih i etničkih karakteristika ispitivane populacije ^{28, 29, 35, 144, 165, 254}. Tako je utvrđeno da su herpesvirusne infekcije mnogo češće u slabo razvijenim zemljama sveta poput zemalja Južne Amerike, Afrike i Azije, dok je prevalencija znatno niža u Sjedinjenim Američkim Državama (SAD) i zemljama Zapadne Evrope ^{28, 29, 35, 144, 165, 254}. Većina do sada objavljenih studija koje su detektovale herpesviruse u uzorcima periapikalnih lezija vršena su na populaciji stanovništva SAD ^{116, 189, 190-192, 194, 195, 218, 236}. Rezultati tih istraživanja su u skladu sa seroprevalencijom herpesvirusa među stanovništvom SAD ^{29, 184}. Takođe, pokazano je da je seroprevalencija herpesvirusa među transplantiranim pacijentima u Iranu ²²⁷ i Mađarskoj ²³⁵, davaocima krvi u Turskoj ¹⁴⁵ i pacijentima sa hematološkim oboljenjima u Brazilu ⁵⁰ u skladu sa nivoom detekcije herpesvirusa u uzorcima periapikalnih lezija u navedenim zemljama.

Na našoj populaciji sproveden je mali broj istraživanja koja su ispitivala prisustvo HCMV i EBV infekcije ^{13, 104, 175}. Tako su Banko i saradnici ¹³ prikazali veoma veliku učestalost EBV infekcije u tkivima nazofaringealnog karcinoma (30/32, 93,75%). Takođe, Radunović i saradnici ¹⁷⁵ detektovali su HCMV u 65 od 92 uzorka (70.6%) tumora pljuvačnih žlezda. Sa druge strane, Kujić-Kapuljica i saradnici ¹⁰⁴ identifikovali su aktivnu HCMV infekciju kod 10 od 49 pacijenata (20.5%) kod kojih je izvršena transplantacija matičnih ćelija u dvogodišnjem periodu praćenja. Kao što je ranije navedeno, jedina studija koja je ispitivala prisustvo HCMV u uzorcima periapikalnih lezija na našoj populaciji pokazala je da je HCMV prisutan u 18 od 33

uzorka (54.5%) radikularnih cisti ⁵. Na osnovu prikazanih rezultata moglo bi se reći da su rezultati ove doktorske disertacije o učestalosti HCMV i EBV u periapikalnim lezijama u saglasnosti sa učestalošću herpesvirusne infekcije u različitim oboljenjima posmatrano u okviru naše populacije.

U predloženoj hipotezi o ulozi herpesvirusa u patogenezi periapikalnih lezija poseban akcenat se stavlja na dvosmeran odnos između bakterijskih vrsta prisutnih u kanalu korena zuba zahvaćenog periapikalnim procesom i herpesvirusa ²¹⁹. Između ostalog, navedeno je da virusni proteini eksprimirani na površini inficiranih ćelija služe bakterijama kao nova mesta za vezivanje što im omogućava lakše ispoljavanje patogenog dejstva ^{57, 125}. S druge strane, navodi se da zapaljenski proces u apeksnom paradoncijumu izazvan bakterijskom infekcijom uzrokuje hemotaksu ćelija imunskog odgovora u kojima herpesvirusi održavaju latenciju na mesto zapaljenja ²¹⁹. Sa tim u vezi, treba ukazati i na različitu geografsku distribuciju bakterijskih vrsta. Naime, upotrebljavajući istu metodologiju, PCR metodu za detekciju specifičnih bakterijskih vrsta, u uzorcima akutnog periapikalnog apscesa među pacijenatima sa dve različite geografske lokacije (Portland, SAD i Rio de Ženeiro, Brazil) dokazano je prisustvo različitih bakterijskih vrsta ^{19, 182}. Tako su *P. intermedia*, *P. nigrescens*, *P. tanneriae*, *F. nucleatum* i *P. gingivalis* bile najčešće identifikovane bakterijske vrste studije iz SAD-a ¹⁹, dok su *T. denticola* i *T. forsythia* bile najzastupljenije među populacijom u Brazilu ¹⁸². Navedeni rezultati ukazuju da bi razlike i u geografskoj distribuciji bakterijskih vrsta mogle da utiču na razlike u detekciji herpesvirusa u uzorcima periapikalnih lezija među istraživačima.

Ranija istraživanja su pokazala da povećan broj genskih kopija virusa u analiziranom materijalu ukazuje na intenzivnu replikaciju virusa, što govori u prilog postojanja aktivne virusne infekcije ^{179, 180}. Shodno tome, određivanje broja genskih kopija herpesvirusa u uzorcima periapikalnih lezija može da posluži kao metoda izbora za razlikovanje aktivne od latentne herpesvirusne infekcije ^{179, 180}. Kvantitativna analiza herpesvirusa do sada je sprovedena samo u 4 studije na relativno malom broju uzoraka tkiva periapikalnih lezija (ukupno 110) ^{126, 190, 226, 236}. Rezultati istraživanja ukazuju na evidentne razlike u broju genskih kopija EBV i HCMV u periapikalnim lezijama između pomenutih studija. Tako su Sunde i saradnici ²²⁶, Sabeti i saradnici ¹⁹⁰ i Verdugo i saradnici ²³⁶ pokazali značajnu razliku u broju genskih kopija EBV između

simptomatskih i asimptomatskih lezija. Dodatno, Makino i saradnici su potvrdili razliku u broju kopija EBV između periapikalnih lezija i kontrolnog zdravog tkiva ¹²⁶. Sa druge strane, rezultati našeg istraživanja pokazali su da je od 76 EBV *nested PCR* pozitivnih uzoraka samo 12 uzoraka imalo povećan broj genskih kopija (prosečna vrednost i standardna devijacija, $6.3 \times 10^5 \pm 1.1 \times 10^6$ kopija/ml). U slučaju 54 HCMV *nested PCR* pozitivna uzorka samo su 4 bila sa povećanim brojem genskih kopija (prosečna vrednost i standardna devijacija, $1.4 \times 10^6 \pm 2.7 \times 10^6$ kopija/ml). Ovakvi rezultati ukazuju da je u malom broju uzoraka naše studija bila prisutna aktivna herpesvirusna infekcija.

Slične rezultate dobili su Botero i saradnici ²⁷ u istraživanju u kojem su poredili tri različite tehnike za određivanje prisustva HCMV u uzorcima subgingivalnog plaka i gingivalno cervikalne tečnosti kod pacijenata sa agresivnom i hroničom parodontopatijom. Naime, iz dobijenih uzoraka subgingivalnog plaka najpre je izolavana DNK, a potom je korišćen *nested PCR* za dokazivanje prisustva HCMV, dok je *TaqMan real-time PCR* korišćen za određivanje broja virusnih kopija. Dodatno, HCMV je kultivisan i izolovan iz ćelijskih kultura gingivalnih fibroblasta koje su korišćene za inokulaciju uzoraka gingivalno cervikalne tečnosti pacijenata sa parodontopatijom. Rezultati navedenog istraživanja pokazali su da je u najvećem broju slučajeva HCMV dijagnostikovao upotrebom *nested PCR* metode (u 35 od 44 uzorka, 79.5%), zatim upotrebom *real-time PCR* (u 21 od 44 uzorka, 47.7%), a najmanje izolacijom HCMV iz kulture ćelija i to iz samo jednog uzorka (2.3%) ²⁷. Takođe, u studijama koje su usledile, upotrebom *real-time PCR* za detekciju herpesvirusne infekcije u uzrocima različitih formi parodontopatije pokazana je niska stopa detekcije virusa ^{48, 155}. U zaključku navedenih istraživanja navodi se da mali broj uzoraka sa povećanim brojem genskih kopija virusa sugeriše na odustvo aktivne herpesvirusne infekcije u ispitivanim patološkim stanjima.

6.2. ANALIZA UČESTALOSTI POJEDINIH GENOTIPOVA HCMV I EBV U ISPITIVANOM UZORKU

Prethodna istraživanja su pokazala da genetička varijabilnost herpesvirusa može uticati na ishod odnosa virusa sa imunskim odgovorom domaćina ^{113, 119, 173}. Kako je većina prethodnih studija pokazala da su HCMV i EBV najčešće detektovani herpesvirusi u uzorcima periapikalnih lezija, interesanto je bilo ispitati učestalost pojedinih genotipova HCMV i EBV u navedenih uzorcima. Dodatni značaj predstavlja i činjenica da se dosadašnja istraživanja nisu bavila ispitivanjem učestalost detekcije genotipova HCMV i EBV u periapikalnim lezijama.

Do sada je poznato da polimorfizmi gena koji kodiraju EBV nuklearne antigene EBNA-2, EBNA-3A, EBNA-3B, EBNA-3C i EBNA-LP predstavljaju osnov za podelu na EBV genotip 1 (EBV-1) i EBV-2. U zavisnosti od lokusa, genotipovi pokazuju 53-84% identičnosti među sekvencama, sa najmanjim varijacijama u okviru EBNA-2 gena. Zbog toga je osnovna genotipizacija EBV zapravo vezana za polimorfizam EBNA-2 gena ^{47, 121, 201}. S druge strane, genom HCMV pokazuje veću genetičku varijabilnost. Prethodna istraživanja vršila su podelu genotipova HCMV na osnovu razlika u sekvencama različitih gena virusa ^{110, 141, 144, 240}. Međutim, najučestalije primenjena podela HCMV na genotipove izvršena je na osnovu razlika u sekvenci gena UL55 koji kodira HCMV glikoprotein B (gB), te tako razlikujemo 4 HCMV gB genotipa (gB I-IV) ¹⁷³.

Rezultati našeg istraživanja pokazali su da su genotipovi EBV-1 i gB-II najučestaliji u uzorcima periapikalnih lezija. Naime, u većini uzoraka periapikalnih lezija EBV-1 je bio dominantniji u odnosu na EBV-2 (74 naspram 6 pozitivnih uzoraka). S druge strane, od moguća 4 genotipa HCMV detektovani su samo gB I i gB II. Rezultati su pokazali da je gB II bio dominantan u odnosu na gB I u uzorcima periapikalnih lezija (42 naspram 12 pozitivnih uzoraka). Međutim, naši rezultati su pokazali da nije bilo značajne razlike u učestalosti pojedinih genotipova među periapikalnim lezijama sa različitim kliničkim, radiološkim i patohistološkim karakteristikama.

Kako do sada različiti genotipovi navedenih virusa nisu ispitivani u uzorcima periapikalnih lezija, dobijene rezultate ćemo uporediti sa nalazom genotipova HCMV i

EBV u uzorcima hroničnog parodontitisa ²⁴⁸, peri-implantitisa i mukozitisa ⁸⁹. 2007. godine Wu i saradnici ²⁴⁸ su ispitivali učestalost detekcije pojedinih genotipova HCMV i EBV u uzorcima gingivitisa, hroničnog parodontitisa i zdravoj kontroli. Njihovi rezultati su pokazali da su najčešće detektovani genotipovi među ispitivanim uzorcima upravo EBV-1 i gB-II. Dodatno, pokazali su da nalaz dualne infekcije gB-II/EBV-1 povećava šansu za nastanak hroničnog parodontitisa u ispitivanom uzorku (OR=28.875, 95%CI 6.82-253.27) u odnosu na monoinfekciju navedenim genotipovima EBV (OR=2.000, 95%CI 1.95-73.04) i HCMV (OR=3.679, 95%CI 1.96-6.96) (106). Janković i saradnici ⁸⁹ su ispitivali učestalost genotipova HCMV i EBV u uzorcima peri-implantitisa, mukozitisa i zdravoj kontroli. Njihovi rezultati su takođe pokazali da su najučestaliji genotipovi u ispitivanom uzorku EBV-1 i gB-II. Takođe, pokazana je značajna razlika u učestalosti navedenih genotipova između uzoraka peri-implantitisa, mukozitisa i zdrave kontrole ⁸⁹.

Sve tri studije pokazale su da su EBV-1 i gB-II najučestaliji genotipovi EBV i HCMV u ispitivanim uzorcima. Takođe, treba naglasiti da su pacijenti uključeni u sva tri istraživanja bili imunokompetentni, oni koji najmanje tri meseca pre uključivanje u studiju nisu koristili imunosupresivnu, antuviralnu i/ili antibiotsku terapiju. Ovim bi se moglo objasniti odsustvo HCMV genotipova gB-III i IV koji su svojstveni za imunokompromitovane i transplantirane pacijente ³³. Sada kada je pokazano koji su to genotipovi koji se najčešće detektuju, te da su oni povezani za lošijom kliničkom prognozom, makar u slučaju hroničnog parodontitisa ²⁴⁸ i peri-implantitisa ⁸⁹, interesantno bi bilo istražiti da li prisustvo navedenih virusnih genotipova može imati uticaj na lošiji ishod terapijskih modaliteta koji se primenjuju u lečenju navedenih patoloških stanja.

Na kraju, potrebno je spomenuti i istraživanje Hernadi-i i saradnika iz 2011. godine ⁷³ u kome je pored ispitivanja učestalosti HCMV i EBV ispitivana i učestalost detekcije genotipova A i B Humanog herpesvirusa 6 (HHV-6) na 40 uzoraka periapikalnih lezija i 40 uzoraka kontrolnog pulpnog tkiva. Autori istraživanja navode da nije bilo značajne razlike između HHV6-A i HHV6-B u uzorcima periapikalnih lezija i kontrolne grupe. Međutim, navodi se da je genotip HHV6-B bio značajno učestaliji u simptomatskim i većim periapikalnim lezijama u odnosu na HHV6-A ⁷³.

6.3. ANALIZA DOBIJENIH VREDNOSTI PROINFLAMATORNIH CITOKINA U ISPITIVANOM UZORKU

Mnogobrojna istraživanja na humanim i animalnim uzorcima tkiva dokazala su da proinflamatorni citokini kao biološki aktivni molekuli predstavljaju medijatore zapaljenja koji doprinose nastanku i progresiji hroničnih periapikalnih lezija^{130, 131, 207, 208, 239}. Naime, pokazano je da proinflamatorni citokini doprinose razgradnji koštanog tkiva stimulisanjem produkcije RANKL-a u zapaljenskim reakcijama. Na taj način produkovane molekule RANKL-a vezuju se za svoje ćelijske receptore-RANK što uzrokuje diferencijaciju preosteoklasta u osteoklaste koji dovode do resorpcije koštanog tkiva^{22, 49, 96, 136}.

Rezultati našeg istraživanja pokazali su da je nivo IL-1 β i IL-6 statistički značajno veći u uzorcima tkiva hroničnih periapikalnih lezija u odnosu na kontrolno pulpno tkivo. Takođe, pokazano je da su vrednosti IL-1 β i IL-6 veće u grupi simptomatskih u odnosu na asimptomatske periapikalne lezije. Analizirajući vrednosti IL-1 β uočili smo da su one bile statistički značajno veće u velikim u odnosu na male periapikalne lezije, kao i u radikularnim cistama u odnosu na periapikalne granulome. Dobijeni rezultati našeg istraživanja su u skladu sa rezultatima prethodno publikovanih studija. Gazivoda i saradnici⁶³ i Martinho i saradnici¹²⁷ takođe su pokazali da su vrednosti IL-1 β statistički značajno veće u simptomatskim u odnosu na asimptomatske periapikalne lezije. S druge strane, nekoliko istraživanja nije potvrdilo postojanje značajne razlike u vrednostima IL-1 β između ispitivanih grupa^{7, 117, 133}. Ranija istraživanja pokazala su da su i vrednosti IL-6 značajno veće u simptomatskim u odnosu na asimptomatske periapikalne lezije^{63, 172, 174}. Dobijeni rezultati upućuju da se periapikalne lezije sa izraženom kliničkom slikom karakterišu povećanom produkcijom proinflamatornih citokina (IL-1 β , IL-6).

Osim sinergističkog dejstva proinflamatornih citokina pokazano je da visoke vrednosti IL-1 β mogu stimulisati dodatnu produkciju IL-6⁵². Takođe, dokazano je i da IL-6 direktno direktno stimuliše povećanje produkcije IL-1 β u kulturama ćelija kostne srži¹⁰⁵. Pozitivna korelacija između IL-1 β i IL-6 dokazana je kako u našem, tako i u prethodna dva istraživanja^{63, 127}, pri čemu je pokazano da povećanje vrednosti jednog citokina uzorokuje povećanje drugog. Za razliku od IL-1 β i IL-6, nije uočeno značajno

povećanje vrednosti TNF- α između posmatranih grupa. Slične rezultate pokazali su i Ataoglu i saradnici ⁷, te Pršo i saradnici ¹⁷², koji nisu pronašli značajno povećane vrednosti TNF- α u simptomatskim u odnosu na asimptomatske periapikalne lezije.

Važno je spomenuti da značajno povećane vrednosti IL-1 β u velikim u odnosu na male periapikalne lezije, kao u radikularnim cistama u odnosu na periapikalne granulome u našem uzorku ukazuju na povezanost između povećane produkcije IL-1 β i povećane resorpcije koštanog tkiva u zapaljenju što potvrđuju i rezultati ranije publikovanih studija ^{22, 49, 96, 136}.

Prisustvo herpesvirusa u uzorcima tkiva periapikalnih lezija ne predstavlja direktan dokaz o doprinosu virusa u patogenezi ovih lezija. Zbog toga je ova doktorska disertacija imala za cilj da analizira povezanost prisustva herpesvirusa i nivoa proinflamatornih citokina u ispitivanom uzorku. Naime, ranija istraživanja su pokazala da primarna infekcija EBV i HCMV doprinosi povećanju produkcije proinflamatornih citokina na mestu zapaljenja ^{82, 135, 142, 200}. Tako se infekcija HCMV povezivala sa povećanom produkcijom IL-1 β , IL-6, IL-12, TNF- α , i IFN- γ ^{32, 166}, dok su nivoi IL-1 β , IL-1Ra, IL-6, IL-8, IL-18, TNF- α , i IFN- γ bili povećani u toku EBV infekcije ^{42, 120}. Dodatno, Slots je smatrao da herpesvirusi mogu doprineti patogenezi periapikalnih lezija povećanjem nivoa proinflamatornih citokina na mestu zapaljenja ²¹⁹.

U okviru ove doktorske disertacije analizirane su vrednosti proinflamatornih citokina (TNF- α , IL-1 β i IL-6) u periapikalnim lezijama u zavisnosti od prisustva ispitivanih herpesvirusa. Naši rezultati su pokazali da iako su vrednosti IL-1 β i IL-6 bile veće u EBV pozitivnim u odnosu na EBV negativne periapikalne lezije nije postojala statistički značajna razlika između posmatranih grupa. Dodatno, uočeno je da su vrednosti IL-6 bile veće i u HCMV pozitivnim u odnosu na HCMV negativne periapikalne lezije, ali opet bez statistički značajne razlike. S druge strane, Hernadi i saradnici ⁷⁴ su pokazali da su vrednosti TNF- α statistički značajno veće u EBV pozitivnim u odnosu na EBV negativne periapikalne lezije. Postojanje razlike u dobijenim rezultatima između prikazanih istraživanja moguće je objasniti nalazom prisustva aktivne EBV infekcije u analiziranom uzorku Hernadi i saradnika ⁷⁴. Naime, autori su upotrebom *RT-PCR* metode dokazali prisustvo aktivne EBV infekcije u 44 od 58 analiziranih uzoraka periapikalnih lezija. Međutim, prisustvo aktivne infekcije

drugih analiziranih virusa je bilo znatno niže (HCMV, 7 pozitivnih uzoraka; HHV-6A, 4 pozitivna uzorka; HHV-6B, 9 pozitivnih uzoraka i HHV-8, ni jedan pozitivan uzorak), zbog čega, verovatno kao i u našem slučaju, nije bilo značajne razlike u vrednostima proinflammatoryh citokina u grupama periapikalnih lezija sa i bez navedenih virusa ⁷⁴.

Takođe, poredili smo vrednosti izmerenih proinflammatoryh citokina u HCMV i EBV pozitivnim i negativnim periapikalnim lezijama sa različitim kliničkim, radiološkim i patohistološkim karakteristikama. Dobijeni rezultati su pokazali da su vrednosti IL-1 β bile značajno povećane u simptomatskim u odnosu na asimptomatske periapikalne lezije, bez obzira na prisustvo EBV. Dalje, pokazano je da su vrednosti IL-6 bile značajno veće kod simptomatskih HCMV pozitivnih periapikalnih lezija u odnosu na asimptomatske. Sa druge strane, uočene su značajno veće vrednosti IL-1 β kod simptomatskih ali HCMV negativnih periapikalnih lezija u odnosu na asimptomatske HCMV negativne lezije. Zbog prisustva jako malog broja lezija sa aktivnom herpesvirusnom infekcijom (12 uzoraka za EBV i 4 uzorka za HCMV) sa jedne strane, i značajno povišenih vrednosti IL-1 β i IL-6 u simptomatskim u odnosu na asimptomatske periapikalne lezija bez obzira na prisustvo herpesvirusa sa druge strane, naša pretpostavka je da herpesvirusi u stanju latentne infekcije nisu odgovorni za stimulaciju produkcije proinflammatoryh citokina. U prilog tome govori i nepostojanje značajne pozitivne korelacije između broja genskih kopija virusa i izmerenih vrednosti proinflammatoryh citokina u našem uzorku. U prilog ovim pretpostavkama govori i istraživanje Sabeti-ja i saradnika iz 2012. godine ¹⁹⁰. U navedenom istraživanju autori su poredili vrednosti TNF- α , IFN- γ , IL-1 β , IL-6, IL-10 i IL-12 između 9 simptomatskih i 6 asimptomatskih periapikalnih lezija. Upotrebom *real-time RT-PCR* metode autori su pokazali da su HCMV i EBV bili detektovani sa povećanim brojem genskih kopija u 5 i 8 simptomatskih lezija, dok sa druge strane oba virusa nisu bila detektovana u asimptomatskim periapikalnim lezijama. Takođe, pokazali su da je postojala značajna razlika u nivou svih ispitivanih citokina između simptomatskih i asimptomatskih periapikalnih lezija ¹⁹⁰.

6.4. PRAVCI BUDUĆIH ISTRAŽIVANJA

Uzimajući u obzir da su mnogobrojna dosadašnja istraživanja potvrdila prisustvo herpesvirusa u uzorcima tkiva hroničnih periapikalnih lezija prirodno se nameće razmišljanje o njihovoj ulozi u patogenezi ovih patoloških stanja.

Za razliku od ranijih istraživanja, danas se ipak može reći da prisustvo aktivne herpesvirusne infekcije u tkivu periapikalnih lezija može da utiče na uobličavanje kliničke slike ovog oboljenja. To su pokazali rezultati istraživanja u kojima je uočena pozitivna korelacija između prisustva aktivne herpesvirusne infekcije u simptomatskim i asimptomatskim lezijama i povećanih vrednosti proinflammatoryh citokina. U cilju još jače potvrde navedenih pretpostavki, bilo bi interesantno ispitati da li postoji razlika u nivou proinflammatoryh citokina i stepenu koštane razgradnje između grupa periapikalnih lezija sa potvrđenom aktivnom i latentnom herpesvirusnom infekcijom.

Pored svega, najveću nedorečenost i dalje predstavljaju jasni patofiziološki mehanizmi pomoću kojih bi herpesvirusi mogli da utiču na nastanak i razvoj periapikalnih lezija, kao i na razgradnju alveolarnog koštanog tkiva. Na osnovu do sada poznatih činjenica i u cilju rasvetljenja uloge herpesvirusa u patogenezi periapikalnih lezija naša istraživačka grupa je 2015. godine predložila novu hipotezu o ulozi herpesvirusa u patogenezi hroničnih periapikalnih lezija⁸⁷. Naime, poznato je da povećana koncentracija RANKL-a dovodi do diferencijacije preosteoklasta u osteoklaste i razgradnje koštanog tkiva. Novija istraživanja su pokazala da se povećana koncentracija RANKL-a javlja u stanju oksidativnog stresa u organizmu^{9, 114, 241}. Takođe, istraživanja na različitim kulturama ćelija su pokazala uticaj EBV na povećanje produkcije parametara oksidativnog stresa¹¹². Upravo ovakvi pokazatelji naveli su nas da postavimo hipotezu prema kojoj EBV u tkivu periapikalnih lezija provocira nastanak oksidativnog stresa, što dovodi do povećane produkcije RANKL-a i intenzivne razgradnje aleolarnog koštanog tkiva. Klinički i laboratorijski deo istraživanja u okviru predložene hipoteze su gotovi tako da se nadamo da će dobijeni rezultati rasvetliti jedan od potencijalnih patofizioloških mehanizama dejstva herpesvirusa.

Treba imati na umu da sva do sada sprovedena istraživanja nisu bila u stanju da utvrde da li herpesvirusi mogu izolovano, bez bakterija, da izazovu zapaljensku reakciju u apeksnom parodontijumu i da dovedu do nastanka periapikalnog granuloma i

radikularne ciste. U cilju izučavanja tog pitanja, odgovore bi mogao da ponudi i kvalitetno osmišljen eksperimentalni model sa inficiranim ili imunizovanim laboratorijskim životinjama.

VII ZAKLJUČCI

Na osnovu rezultata sprovedenih istraživanja mogu se doneti sledeći zaključci:

1. EBV i HCMV značajno češće se detektuju u uzorcima hroničnih periapikalnih lezija u odnosu na kontrolno pulpno tkivo;
2. EBV se značajno češće detektuje u hroničnim periapikalnim lezijama nego što je to slučaj sa HCMV-om;
3. ne postoji razlika u prisustvu EBV i HCMV između simptomatskih i asimptomatskih, velikih i malih periapikalnih lezija te periapikalnih granuloma i radikularnih cista;
4. povećan broj genskih kopija EBV i HCMV detektovan je u svega 12% odnosno 4% analiziranih uzoraka, što ukazuje na nisku učestalost aktivne infekcije herpesvirusima u periapikalnim lezijama;
5. povećan broj genskih kopija EBV i HCMV nije bio prisutan u uzorcima kontrolnog pulpnog tkiva;
6. EBV-1 genotip bio je značajno učestaliji u odnosu na EBV-2 u uzorcima tkiva periapikalnih lezija i kontrolnog pulpnog tkiva;
7. u ispitivanom uzorku uočene su samo 2 varijante genotipova HCMV, pri čemu je gB-II bio značajno učestaliji u odnosu na gB;
8. uočene su značajno povećane koncentracije IL-1 β i IL-6 u tkivu periapikalnih lezija u odnosu na kontrolno pulpno tkivo;
9. vrednosti IL-1 β i IL-6 bile su značajno veće u simptomatskim u odnosu na asimptomatske periapikalne lezije;
10. vrednosti IL-1 β bile su značano povećane kod velikih u odnosu na male periapikalne lezije, kao i u radikularnim cistama u odnosu na periapikalne granulome;
11. nije uočena značajna razlika u nivou proinflamatornih citokina između EBV i HCMV pozitivnih i negativnih periapikalnih lezija;
12. nije uočena značajna korelacija između broja genskih kopija herpesvirusa i izmerenih vrednosti proinflamatornih citokina u ispitivanom uzorku.

VIII LITERATURA

1. Abbas AK, Lichtman AH. Osnovna imunologija: funkcije i poremećaji imunskog sistema. Beograd: DATASTATUS; 2008.
2. Abbott PV. Classification, diagnosis and clinical manifestations of apical periodontitis. *Endod Topics*. 2004;8:36-54.
3. Amon W, Binné UK, Bryant H, Jenkins PJ, Karstegl CE, Farrell PJ. Lytic cycle gene regulation of Epstein-Barr virus. *J Virol*. 2004;78:13460-9.
4. Amon W, Farrell PJ. Reactivation of Epstein-Barr virus from latency. *Rev Med Virol*. 2005;15:149-56.
5. Andric M, Milasin J, Jovanovic T, Todorovic L. Human cytomegalovirus is present in odontogenic cysts. *Oral Microbiol Immunol*. 2007;22:347-51.
6. Arista S, De Grazia S, Giammanco GM, Di Carlo P, Iannitto E. Human cytomegalovirus glycoprotein B genotypes in immunocompetent, immunocompromised, and congenitally infected Italian populations. *Arch Virol*. 2003;148:547-54.
7. Ataoğlu T, Ungör M, Serpek B, Haliloğlu S, Ataoğlu H, Ari H. Interleukin-1beta and tumour necrosis factor-alpha levels in periapical exudates. *Int Endod J*. 2002;35:181-5.
8. Azuma MM, Samuel RO, Gomes-Filho JE, Dezan-Junior E, Cintra LT. The role of IL-6 on apical periodontitis: a systematic review. *Int Endod J*. 2014;47:615-21.
9. Bai XC, Lu D, Liu AL, et al. Reactive oxygen species stimulates receptor activator of NF-kappaB ligand expression in osteoblast. *J Biol Chem*. 2005;280:17497-506.
10. Bakaletz LO. Viral potentiation of bacterial superinfection of the respiratory tract. *Trends Microbiol*. 1995;3:110-4.
11. Balkwill F. Tumor necrosis factor or tumor promoting factor? *Cytokine Growth Factor Rev*. 2002;13:135-41.
12. Banko A, Lazarevic I, Cupic M, Stevanovic G, Boricic I, Jovanovic T. Carboxy-terminal sequence variation of LMP1 gene in Epstein-Barr-virus-associated mononucleosis and tumors from Serbian patients. *J Med Virol*. 2012;84:632-42.

13. Banko AV, Lazarevic IB, Folic MM, et al. Characterization of the Variability of Epstein-Barr Virus Genes in Nasopharyngeal Biopsies: Potential Predictors for Carcinoma Progression. *PLoS One*. 2016;11:e0153498.
14. Barkhordar RA, Desouza YG. Human T-lymphocyte subpopulations in periapical lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1988;65:763-6.
15. Barkhordar RA, Hayashi C, Hussain MZ. Detection of interleukin-6 in human dental pulp and periapical lesions. *Endod Dent Traumatol*. 1999;15:26-7.
16. Barkhordar RA, Hussain MZ, Hayashi C. Detection of interleukin-1 beta in human periapical lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1992;73:334-6.
17. Baumgartner JC. Microbiological and molecular analysis of endodontic infections. *Endod Topics*. 2004;7:35-51.
18. Baumgartner JC, Siqueira JF Jr., Sedgley CM, Kishen A. Microbiology of Endodontic Disease. In: Ingle JI, Bakland LK, Baumgartner JC, editors. *Ingle's Endodontics*. Hamilton: BC Decker Inc.; 2008.
19. Baumgartner JC, Siqueira JF Jr, Xia T, Róças IN. Geographical differences in bacteria detected in endodontic infections using polymerase chain reaction. *J Endod*. 2004;30:141-4.
20. Bergenholtz G. Micro-organisms from necrotic pulp of traumatized teeth. *Odontol Revy*. 1974;25:347-58.
21. Berlinck T, Tinoco JM, Carvalho FL, Sassone LM, Tinoco EM. Epidemiological evaluation of apical periodontitis prevalence in an urban Brazilian population. *Braz Oral Res*. 2015;29:1-7.
22. Belibasakis GN, Rechenberg DK, Zehnder M. The receptor activator of NF- κ B ligand-osteoprotegerin system in pulpal and periapical disease. *Int Endod J*. 2013;46:99-111.
23. Boeckh M. Complications, diagnosis, management, and prevention of CMV infections: current and future. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2011;2011:305-9.

24. Boeckh M, Geballe AP. Cytomegalovirus: pathogen, paradigm, and puzzle. *J Clin Invest.* 2011;121:1673-80.
25. Bona CA, Revillard JP. Cytokines and cytokines receptors. Physiology and pathological disorders. Oxfordshire: Taylor and Francis library: 2005.
26. Borisch B, Finke J, Hennig I, et al. Distribution and localization of Epstein-Barr virus subtypes A and B in AIDS-related lymphomas and lymphatic tissue of HIV-positive patients. *J Pathol.* 1992;168:229-36.
27. Botero JE, Vidal C, Contreras A, Parra B. Comparison of nested polymerase chain reaction (PCR), real-time PCR and viral culture for the detection of cytomegalovirus in subgingival samples. *Oral Microbiol Immunol.* 2008;23:239-44.
28. Cannon MJ. Congenital cytomegalovirus (CMV) epidemiology and awareness. *J Clin Virol.* 2009;46:S6-10.
29. Cannon MJ, Schmid DS, Hyde TB. Review of cytomegalovirus seroprevalence and demographic characteristics associated with infection. *Rev Med Virol.* 2010;20:202-13.
30. Cannon MJ, Westbrook K, Levis D, Schleiss MR, Thackeray R, Pass RF. Awareness of and behaviors related to child-to-mother transmission of cytomegalovirus. *Prev Med.* 2012;54:351-7.
31. Cardoso CR, Garlet GP, Crippa GE, et al. Evidence of the presence of T helper type 17 cells in chronic lesions of human periodontal disease. *Oral Microbiol Immunol.* 2009;24:1-6.
32. Carlquist JF, Edelman L, Bennion DW, Anderson JL. Cytomegalovirus induction of interleukin-6 in lung fibroblasts occurs independently of active infection and involves a G protein and the transcription factor, NF- κ B. *J Infect Dis.* 1999;197:1094–100.
33. Carraro E, Granato CF. Single human cytomegalovirus gB genotype shed in multiple sites at the time of diagnosis in renal transplant recipients. *J Med Virol.* 2003;70:240-3.

34. Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1975;72:3666-70.
35. Chang CM, Yu KJ, Mbulaiteye SM, Hildesheim A, Bhatia K. The extent of genetic diversity of Epstein-Barr virus and its geographic and disease patterns: a need for reappraisal. *Virus Res*. 2009;143:209-21.
36. Charo IF, Ransohoff RM. The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *N Engl J Med* 2006; 354: 610-621.
37. Chou SW, Dennison KM. Analysis of interstrain variation in cytomegalovirus glycoprotein B sequences encoding neutralization-related epitopes. *J Infect Dis*. 1991;163:1229-34.
38. Cikota B, Janezić A, Magić Z. Quantification of gene expression using the polymerase chain reaction. *Vojnosanit Pregl*. 2002;59:551-6.
39. Clark IA. How TNF was recognized as a key mechanism of disease. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2007;18:335-43.
40. Colić M, Gazivoda D, Vučević D, et al. Regulatory T-cells in periapical lesions. *J Dent Res*. 2009;88:997-1002.
41. Colić M, Gazivoda D, Vučević D, Vasilijić S, Rudolf R, Lukić A. Proinflammatory and immunoregulatory mechanisms in periapical lesions. *Mol Immunol*. 2009;47:101-13.
42. Contreras A, Slots J. Mammalian viruses in human periodontitis. *Oral Microbiol Immunol* 1996;11:381-6.
43. Contreras A, Zadeh HH, Nowzari H, Slots J. Herpesvirus infection of inflammatory cells in human periodontitis. *Oral Microbiol Immunol*. 1999;14:206-212.
44. Contreras A, Slots J. Herpesviruses in human periodontal disease. *J Periodontal Res*. 2000;35:3-16.

45. D'Addario M, Ahmad A, Xu JW, Menezes J. Epstein-Barr virus envelope glycoprotein gp350 induces NF- κ B activation and IL-1 β synthesis in human monocytes-macrophages involving PKC and P13-K. *FASEB J.* 1999;13:2203–13.
46. Danilović V, Radujković-Kuburović G. *Oralna histologija i embriologija.* Beograd: Zavod za udžbenike; 2012.
47. Dambaugh T, Hennessy K, Chamnankit L, Kieff E. U2 region of Epstein-Barr virus DNA may encode Epstein-Barr nuclear antigen 2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1984;81:7632-6.
48. Dawson DR, Wang C, Danaher RJ, et al. Real-time polymerase chain reaction to determine the prevalence and copy number of Epstein-Barr virus and cytomegalovirus DNA in subgingival plaque at individual healthy and periodontal disease sites. *J Periodontol.* 2009;80:1133-40.
49. de Brito LC, Teles FR, Teles RP, Totola AH, Vieira LQ, Sobrinho AP. T-lymphocyte and cytokine expression in human inflammatory periapical lesions. *J Endod.* 2012;38:481-5.
50. de Matos SB, Meyer R, Lima FW. Seroprevalence and serum profile of cytomegalovirus infection among patients with hematologic disorders in Bahia State, Brazil. *J Med Virol.* 2011;83:298-304.
51. Dinarello CA. Interleukin-1. *Cytokine Growth Factor Rev.* 1997;8:253-65.
52. Dinarello CA. Proinflammatory cytokines. *Chest.* 2000;118:503-8.
53. Dinarello CA. Role of pro- and anti-inflammatory cytokines during inflammation: experimental and clinical findings. *J Biol Regul Homeost Agents.* 1997;11:91-103.
54. Epstein MA, Henle G, Achong BG, Barr YM. Morphological and biological studies on a virus in cultured lymphoblasts from Burkitt's lymphoma. *J Exp Med.* 1965;121:761-70.
55. Eriksen HM. Epidemiology of apical periodontitis. In: Ørstavik D, Pitt Ford TR, editors. *Essential Endodontology. Prevention and Treatment of Apical Periodontitis.* 1st ed. London: Blackwell Science;1998.

56. Eriksen HM, Kirkevang LL, Petersson K. Endodontic epidemiology and treatment outcome: general consideration. *Endod Topics*. 2002;2:1-9.
57. Fainstein V, Musher DM, Cate TR. Bacterial adherence to pharyngeal cells during viral infection. *J Infect Dis*. 1980;141:172-6
58. Ferreira DC, Rôças IN, Paiva SS, et al. Viral-bacterial associations in acute apical abscesses. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2011a;112:264-71.
59. Ferreira DC, Paiva SSM, Carmo FL, et al. Identification of herpesviruses types 1 to 8 and human papillomavirus in acute apical abscesses. *J Endod*. 2011b;37:10-6.
60. Figdor D. Apical periodontitis: a very prevalent problem. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2002;94:651-2.
61. Fukada SY, Silva TA, Garlet GP, Rosa AL, da Silva JS, Cunha FQ. Factors involved in the T helper type 1 and type 2 cell commitment and osteoclast regulation in inflammatory apical diseases. *Oral Microbiol Immunol*. 2009;24:25-31.
62. Gao Z, Mackenzie IC, Rittman BR, Korszun AK, Williams DM, Cruchley AT. Immunocytochemical examination of immune cells in periapical granulomata and odontogenic cysts. *J Oral Pathol*. 1988;17:84-90.
63. Gazivoda D, Dzopalic T, Bozic B, Tatomirovic Z, Brkic Z, Colic M. Production of proinflammatory and immunoregulatory cytokines by inflammatory cells from periapical lesions in culture. *J Oral Pathol Med*. 2009;38:605-11.
64. Georgopoulou MK, Spanaki-Voreadi AP, Pantazis N, Kontakiotis EG, Morfis AS. Periapical status and quality of root canal fillings and coronal restorations in a Greek population. *Quintessence Int*. 2008;39:e85-92.
65. Glickman GN. AAE Consensus Conference on Diagnostic Terminology: background and perspectives. *J Endod*. 2009;35:1619-20.
66. Gomes MS, Blattner TC, Sant'Ana Filho M, et al. Can apical periodontitis modify systemic levels of inflammatory markers? A systematic review and meta-analysis. *J Endod*. 2013;39:1205-17.

67. Graunaite I, Lodiene G, Maciulskiene V. Pathogenesis of apical periodontitis: a literature review. *J Oral Maxillofac Res.* 2012;2:1-15.
68. Green S, Dobrjansky A, Carswell EA, et al. Partial purification of a serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1976;73:381-5.
69. Grose C. Pangaea and the Out-of-Africa Model of Varicella-Zoster Virus Evolution and Phylogeography. *J Virol.* 2012;86:9558-65.
70. Habenicht A. Growth factors, differentiation factors and cytokines. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag; 1990.
71. Handysides RA, Jaramillo DE, Ingle JI. Examination, evaluation, diagnosis and treatment planning. In: Ingle J, Bakland I, Baumgartner J, editors. *Ingle's Endodontics.* Hamilton, CA: BC Decker, INC., 2008.
72. Heling I, Morag-Hezroni M, Marva E, Hochman N, Zakay-Rones Z, Morag A. Is herpes simplex virus associated with pulp/periapical inflammation? *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2001;91:359-6.
73. Hernádi K, Csoma E, Adám B, et al. Association of human herpesvirus 6 subtypes with symptomatic apical periodontitis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2011;112:401-6.
74. Hernádi K, Gyöngyösi E, Mészáros B, et al. Elevated tumor necrosis factor-alpha expression in periapical lesions infected by Epstein-Barr virus. *J Endod.* 2013;39:456-60.
75. Hernádi K, Szalmás A, Mogyorósi R, et al. Prevalence and activity of Epstein-Barr virus and human cytomegalovirus in symptomatic and asymptomatic apical periodontitis lesions. *J Endod.* 2010;36:1485-9.
76. Hill CE, Harris SB, Culler EE, Zimring JC, Nolte FS, Caliendo AM. Performance characteristics of two real-time PCR assays for the quantification of Epstein-Barr virus DNA. *Am J ClinPathol.* 2006;125:665-71.
77. Hirsch JM, Ahlström U, Henrikson PA, Heyden G, Peterson LE. Periapical surgery. *Int J Oral Surg.* 1979;8:173-85.

78. Hofbauer LC, Heufelder AE. Role of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and osteoprotegerin in bone cell biology. *J Mol Med (Berl)*. 2001;79:243-53.
79. Holland GR. A histological comparison of periapical inflammatory and neural responses to two endodontic sealers in the ferret. *Arch Oral Biol*. 1994;39:539-44.
80. Idesawa M, Sugano N, Ikeda K, et al. Detection of Epstein-Barr virus in saliva by real-time PCR. *Oral Microbiol Immunol*. 2004;19:230-2.
81. Ilić J, Vujašković M, Tiháček-Šojić L, Milić-Lemić A. Frequency and quality of root canal fillings in an adult Serbian population. *Srp Arh Celok Lek*. 2014;142:663-8.
82. Imanishi J. Expression of cytokines in bacterial and viral infections and their biochemical aspects. *J Biochem*. 2000;127:525-30.
83. Ishihara K, Hirano T. IL-6 in autoimmune disease and chronic inflammatory proliferative disease. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2002;13:357-68.
84. Ivanović I, Santini A. *Pulpa i apeksni parodontcijum*. U: Milenković P, urednik. *Patološka fiziologija*. Beograd: Univerzitet u Beogradu; 2003.
85. Jakovljević A, Andrić M. Human cytomegalovirus and Epstein-Barr virus in etiopathogenesis of apical periodontitis: a systematic review. *J Endod*. 2014;40:6-15.
86. Jakovljević A, Andrić M, Knežević A, Beljić-Ivanović K, Miletić M, Jovanović T, Kesić L, Milasin J. Herpesviruses in periapical pathoses: an updated systematic review. In: Ongrádi J, editor. *Herpesviridae*. Rijeka:InTech;2016.
87. Jakovljević A, Andrić M, Miletić M, et al. Epstein-Barr virus infection induces bone resorption in apical periodontitis via increased production of reactive oxygen species. *Med Hypotheses*. 2016;94:40-2.
88. Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik M. *Imunobiology: The immune system in health and disease*. New York: General Publishing; 2001.
89. Janković S, Aleksić Z, Dimitrijević B, Leković V, Milinković I, Kenney B. Correlation between different genotypes of human cytomegalovirus and Epstein-Barr virus and peri-implant tissue status. *Aust Dent J*. 2011;56:382-8.

90. Jovanović T, Marković Lj. *Virusologija-udžbenik za student medicine*. Beograd: Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu; 2008.
91. Kabak SL, Kabak YS, Anischenko SL. Light microscopic study of periapical lesions associated with asymptomatic apical periodontitis. *Ann Anat*. 2005;187:185-94.
92. Kakehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1965;20:340-349.
93. Kantz WE, Henry CA. Isolation and classification of anaerobic bacteria from intact pulp chambers of non-vital teeth in man. *Arch Oral Biol*. 1974;19:91-6.
94. Kamma JJ, Contreras A, Slots J. Herpes viruses and periodontopathic bacteria in early-onset periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2001;28:879-885.
95. Kawashima N, Stashenko P. Expression of bone-resorptive and regulatory cytokines in murine periapical inflammation. *Arch Oral Biol*. 1999;44:55-66.
96. Kawashima N, Suzuki N, Yang G, et al. Kinetics of RANKL, RANK and OPG expressions in experimentally induced rat periapical lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2007;103:707-11.
97. Khalighinejad N, Aminoshariae MR, Aminoshariae A, Kulild JC, Mickel A, Fouad AF. Association between systemic diseases and apical periodontitis. *J Endod*. 2016;42:1427-34.
98. King AM, Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz EJ. *Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. San Diego: Elsevier Academic Press, 2012.
99. Kirkevang LL, Vaeth M, Hörsted-Bindslev P, Bahrami G, Wenzel A. Risk factors for developing apical periodontitis in a general population. *Int Endod J*. 2007;40:290-9.
100. Kishimoto T. The biology of interleukin-6. *Blood*. 1989;74:1-10.
101. Kobayashi K, Takahashi N, Jimi E, Udagawa N, Takami M, Kotake S, et al. Tumor necrosis factor alpha stimulates osteoclast differentiation by a mechanism independent of the ODF/RANKL-RANK interaction. *J Exp Med*. 2000;191:275-86.

102. Kubar A, Saygun I, Ozdemir A, Yapar M, Slots J. Real-time polymerase chain reaction quantification of human cytomegalovirus and Epstein-Barr virus in periodontal pockets and the adjacent gingiva of periodontitis lesions. *J Periodontal Res.* 2005;40:97-104.
103. Kubar A, Saygun I, Yapar M, Ozdemir A, Slots J. Real-time PCR quantification of cytomegalovirus in aggressive periodontitis lesions using TaqMan technology. *J Periodontal Res.* 2004;39:81-86.
104. Kuljić-Kapulica N, Stamatović D, Savić D, Jovanović D, Tukić L, Andjelković N. Monitoring of cytomegalovirus infection after allogeneic stem cell transplantation. *Vojnosanit Pregl.* 2010;67:375-8.
105. Kurihara N, Bertolini D, Suda T, Akiyama Y, Roodman GD. IL-6 stimulates osteoclast-like multinucleated cell formation in long term human marrow cultures by inducing IL-1 release. *J Immunol.* 1990;144:4226-30.
106. Kutok JL, Wang F. Spectrum of Epstein-Barr virus-associated diseases. *Annu Rev Pathol.* 2006;1:375-404.
107. Kwan Tat S, Padrines M, Théoleyre S, Heymann D, Fortun Y. IL-6, RANKL, TNF-alpha/IL-1: interrelations in bone resorption pathophysiology. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2004;15:49-60.
108. Laichalk LL, Thorley-Lawson DA. Terminal differentiation into plasma cells initiates the replicative cycle of Epstein-Barr virus in vivo. *J Virol.* 2005;79:1296-307.
109. Lalonde ER, Luebke RG. The frequency and distribution of periapical cysts and granulomas. An evaluation of 800 specimens. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1968;25:861-8.
110. Landolfo S, Gariglio M, Gribaudo G, Lembo D. The human cytomegalovirus. *Pharmacol Ther.* 2003;98:269-97.
111. Langeland K, Block RM, Grossman LI. A histopathologic and histobacteriologic study of 35 periapical endodontic surgical specimens. *J Endod.* 1977;3:8-23.

112. Lassoued S, Ben Ameer R, Ayadi W, Gargouri B, Ben Mansour R, Attia H. Epstein-Barr virus induces an oxidative stress during the early stages of infection in B lymphocytes, epithelial, and lymphoblastoid cell lines. *Mol Cell Biochem.* 2008;313:179-86.
113. Lawrence S, Young LS, Arrand JR, Murray PG. EBV gene expression and regulation. In: Arvin A, editor. *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis.* Cambridge: Cambridge University Press, 2007.
114. Lee NK, Choi YG, Baik JY, et al. A crucial role for reactive oxygen species in RANKL induced osteoclast differentiation. *Blood.* 2005;106:852-9.
115. Liapatas S, Nakou M, Rontogianni D. Inflammatory infiltrate of chronic periradicular lesions: an immunohistochemical study. *Int Endod J.* 2003;36:464-71.
116. Li H, Chen V, Chen Y, et al. Herpesviruses in endodontic pathoses: association of Epstein-Barr Virus with irreversible pulpitis and apical periodontitis. *J Endod.* 2009;35:23-9.
117. Lim GC, Torabinejad M, Kettering J, Linkhardt TA, Finkelman RD. Interleukin 1-beta in symptomatic and asymptomatic human periradicular lesions. *J Endod.* 1994;20:225-7.
118. Liu YC, Lerner UH, Teng YT. Cytokine responses against periodontal infection: protective and destructive roles. *Periodontol 2000.* 2010;52:163-206.
119. Longnecker RM, Kieff E, Cohen JI. Epstein-Barr Virus. In: Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields Virology.* Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, Wolters Kluwer; 2013.
120. Lotz M, Tsoukas CD, Fong S, Dinarello CA, Carson DA, Vaughan JH. Release of lymphokines after Epstein Barr virus infection in vitro. I. Sources of and kinetics of production of interferons and interleukins in normal humans. *J Immunol.* 1996;136:3636-42.
121. Lucchesi W, Brady G, Dittrich-Breiholz O, Kracht M, Russ R, Farrell PJ. Differential gene regulation by Epstein-Barr virus type 1 and type 2 EBNA2. *J Virol.* 2008;82:7456-66.

122. Lukić A, Danilović V, Petrović R. Comparative immunohistochemical and quantitative analysis of inflammatory cells in symptomatic and asymptomatic chronic periapical lesions. *Vojnosanit Pregl.* 2008;65:435-40.
123. Lukic A, Arsenijević N, Vujanić G, Ramić Z. Quantitative analysis of the immunocompetent cells in periapical granuloma: correlation with the histological characteristics of the lesions. *J Endod.* 1990;16:119-22.
124. MacEwan DJ. TNF receptor subtype signalling: differences and cellular consequences. *Cell Signal* 2002;14:477-92.
125. Mackowiak PA, Goggans M, Torres W, Dal Nogare A, Luby JP, Helderman H. Relationship between cytomegalovirus and colonization of the oropharynx by gram-negative bacilli following renal transplantation. *Epidemiol Infect.* 1991;107:411-20.
126. Makino K, Takeichi O, Hatori K, Imai K, Ochiai K, Ogiso B. Epstein-Barr virus infection in chronically inflamed periapical granulomas. *PLoS One.* 2015;10:e0121548.
127. Martinho FC, Chiesa WM, Leite FR, Cirelli JA, Gomes BP. Correlation between clinical/radiographic features and inflammatory cytokine networks produced by macrophages stimulated with endodontic content. *J Endod.* 2012;38:740-5.
128. Marton IJ. How does the periapical inflammatory process compromise general health? *Endod Topics.* 2004;8:3-14.
129. Marton IJ, Kiss C. Characterization of inflammatory cell infiltrate in dental periapical lesions. *Int Endod J.* 1993;26:131-6.
130. Márton IJ, Kiss C. Overlapping protective and destructive regulatory pathways in apical periodontitis. *J Endod.* 2014;40:155-63.
131. Márton IJ, Kiss C. Protective and destructive immune reactions in apical periodontitis. *Oral Microbiol Immunol.* 2000;15:139-50.
132. Matalka KZ, Tutunji MF, Abu-Baker M, Abu Baker Y. Measurement of protein cytokines in tissue extracts by enzyme-linked immunosorbent assays: application to lipopolysaccharide-induced differential milieu of cytokines. *Neuro Endocrinol Lett.* 2005;26:231-6.

133. Matsuo T, Ebisu S, Nakanishi T, Yonemura K, Harada Y, Okada H. Interleukin-1 alpha and interleukin-1 beta periapical exudates of infected root canals: correlations with the clinical findings of the involved teeth. *J Endod.* 1994;20:432-5.
134. Meager A. *The Molecular Biology of Cytokines.* Oxford: Wiley; 1998.
135. Melchjorsen J, Sørensen LN, Paludan SR. Expression and function of chemokines during viral infections: from molecular mechanisms to in vivo function. *J Leukoc Biol.* 2003;74:331-43.
136. Menezes R, Garlet TP, Letra A, et al. Differential patterns of receptor activator of nuclear factor kappa B ligand/osteoprotegerin expression in human periapical granulomas: possible association with progressive or stable nature of the lesions. *J Endod.* 2008;34:932-8.
137. Metzger Z, Abramovitz I. Periapical Lesions of Endodontic Origin. In: Ingle JI, Bakland LK, Baumgartner JC, editors. *Ingle's Endodontics.* Hamilton: BC Decker Inc.; 2008.
138. Milenković P. Biološki aktivni molekuli-citokini i faktori rasta kao medijatori međucelijske komunikacije i njihov značaj u patofiziološkim procesima. U: Milenković P., urednik. *Patološka fiziologija.* Beograd: Univerzitet u Beogradu; 2003.
139. Miller WD. *The micro-organisms of the human mouth.* Philadelphia: White Dental Mfg. Co.; 1890.
140. Mocarski ES Jr. Immune escape and exploitation strategies of cytomegaloviruses: impact on and imitation of the major histocompatibility system. *Cell Microbiol.* 2004;6:707-17.
141. Mocarski ES Jr, Shenk T, Griffiths PD, Pass RF. Cytomegaloviruses. In: Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields Virology.* Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, Wolters Kluwer; 2013.
142. Mogensen TH, Paludan SR. Virus-cell interactions: impact on cytokine production, immune evasion and tumor growth. *Eur Cytokine Netw.* 2001;12:382-90.

143. Möller AJ, Fabricius L, Dahlén G, Ohman AE, Heyden G. Influence on periapical tissues of indigenous oral bacteria and necrotic pulp tissue in monkeys. *Scand J Dent Res.* 1981;89:475-484.
144. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Human Herpesviruses. In: Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA, editors. *Medical Microbiology*. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2013.
145. Mutlu B, Günlemez A, Türker G, Gökalp AS, Willke A. Is serologic screening necessary in the donor bloods for cytomegalovirus seronegative blood transfusion to risky patients?. *Mikrobiyol Bul.* 2008;42:337-41.
146. Nair PN. Apical periodontitis: a dynamic encounter between root canal infection and host response. *Periodontol 2000.* 1997;13:121-148.
147. Nair PN. New perspectives on radicular cysts: do they heal? *Int Endod J.* 1998;31:155-60.
148. Nair PN. Pathogenesis of apical periodontitis and the causes of endodontic failures. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2004;15:348-81.
149. Nair PNR. Non-Microbial Endodontic Disease. In: Ingle JI, Bakland LK, Baumgartner JC, editors. *Ingle's Endodontics*. Hamilton: BC Decker Inc.; 2008.
150. Nair PNR. Light and electron microscopic studies of root canal flora and periapical lesions. *J Endod.* 1987;13:29-39.
151. Nair PNR, Schmid-Meier E. An apical granuloma with epithelial integument. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1986;62:698-703.
152. Nair PNR, Pajarola G, Schroeder HE. Types and incidence of human periapical lesions obtained with extracted teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1996;81:93-102.
153. Navarro D, Paz P, Tugizov S, Topp K, La Vail J, Pereira L. Glycoprotein B of human cytomegalovirus promotes virion penetration into cells, transmission of infection from cell to cell, and fusion of infected cells. *Virology.* 1993;197:143-58.

154. Neurath MF, Finotto S. IL-6 signaling in autoimmunity, chronic inflammation and inflammation-associated cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2011;22:83-9.
155. Nibali L, Atkinson C, Griffiths P, et al. Low prevalence of subgingival viruses in periodontitis patients. *J Clin Periodontol.* 2009;36:928-32.
156. Olsen I, van Winkelhoff AJ. Acute focal infections of dental origin. *Periodontol 2000.* 2014;65:178-89.
157. Ongrádi J, Sallay K, Kulcsár G. The decreased antibacterial activity of oral polymorphonuclear leukocytes coincides with the occurrence of virus-carrying oral lymphocytes and epithelial cells. *Folia Microbiol (Praha).* 1987;32:438-47.
158. Ozbek SM, Ozbek A, Yavuz MS. Detection of Human Cytomegalovirus and Epstein-Barr Virus in Symptomatic and Asymptomatic Apical Periodontitis Lesions by Real-time PCR. *Med Oral Patol Oral Cir.* 2013;18:811-6.
159. Pak JG, Fayazi S, White SN. Prevalence of periapical radiolucency and root canal treatment: a systematic review of cross-sectional studies. *J Endod.* 2012;38:1170-6.
160. Pascon EA, Leonardo MR, Safavi K, Langeland K. Tissue reaction to endodontic materials: methods, criteria, assessment, and observations. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1991;72:222-37.
161. Paster BJ, Dewhirst FE. Molecular microbial diagnosis. *Periodontol 2000.* 2009;51:38-44.
162. Parra B, Slots J. Detection of human viruses in periodontal pockets using polymerase chain reaction. *Oral Microbiol Immunol.* 1996;11:289-93.
163. Pavlica D, Čakić S. *Oralna mikrobiologija.* Beograd: Zavod za udžbenike; 2008.
164. Persić R, Kqiku L, Brumini G, et al. Difference in the periapical status of endodontically treated teeth between the samples of Croatian and Austrian adult patients. *Croat Med J.* 2011;52:672-8.
165. Pellett PE, Roizman B. Herpesviridae. In: Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields Virology.* Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, Wolters Kluwer; 2013.

166. Peterson PK, Gekker G, Chao CC, et al. Human cytomegalovirus-stimulated peripheral blood mononuclear cells induce HIV-1 replication via a tumor necrosis factor- α -mediated mechanism. *J Clin Investig.* 1992;89:574–80.
167. Petrović V. Hronične periapikalne lezije. U: Todorović L, urednik. *Oralna hirurgija*. Beograd: Nauka; 2007.
168. Petrović V, Čolić S. *Periapikalne lezije*. Beograd: Velarta; 2001.
169. Pfeffer K. Biological functions of tumor necrosis factor cytokines and their receptors. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2003;14:185-91.
170. Piattelli A, Artese L, Rosini S, Quaranta M, Musiani P. Immune cells in periapical granuloma: morphological and immunohistochemical characterization. *J Endod.* 1991;17:26-9.
171. Polz D, Podsiadło Ł, Stec A, Polz-Dacewicz M. Prevalence of EBV genotypes in Polish, Taiwanese and Arabic healthy students and association between genotypes and 30-bp deletion in the LMP-1 gene phylogenetic analysis. *Pol J Microbiol.* 2014;63:105-9.
172. Prso IB, Kocjan W, Simić H, et al. Tumor necrosis factor-alpha and interleukin 6 in human periapical lesions. *Mediators Inflamm.* 2007;2007:38210.
173. Puchhammer-Stöckl E, Görzer I. Cytomegalovirus and Epstein-Barr virus subtypes--the search for clinical significance. *J Clin Virol.* 2006;36:239-48.
174. Radics T, Kiss C, Tar I, Márton IJ. Interleukin-6 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in apical periodontitis: correlation with clinical and histologic findings of the involved teeth. *Oral Microbiol Immunol.* 2003;18:9-13.
175. Radunovic M, Tomanovic N, Novakovic I, et al. Cytomegalovirus induces Interleukin-6 mediated inflammatory response in salivary gland cancer. *J BUON.* 2016;21:1530-36.
176. Rauch B. Attempts to isolate a virus from infected root canals and periapical tissue using monkey kidney cells cultures. *J Canad Dent A.* 1958;24:404-10.

177. Rauner M, Sipos W, Pietschmann P. Osteoimmunology. *Int Arch Allergy Immunol.* 2007;143:31-48.
178. Rauner M, Sipos W, Thiele S, Pietschmann P. Advances in osteoimmunology: pathophysiologic concepts and treatment opportunities. *Int Arch Allergy Immunol.* 2013;160:114-25.
179. Razonable R, Asberg A, Rollag H, et al. Viral load suppression as measured by a CMV test calibrated to the WHO international standard is predictive of CMV disease resolution in transplant recipients. *Clin Infect Dis.* 2013;56:1546–53.
180. Razonable RR, Hayden RT. Clinical utility of viral load in management of cytomegalovirus infection after solid organ transplantation. *Clin Microbiol Rev.* 2013;26:703-27.
181. Ricucci D, Siqueira JF Jr. Biofilms and apical periodontitis: study of prevalence and association with clinical and histopathologic findings. *J Endod.* 2010;36:1277-88.
182. Rôças IN, Baumgartner JC, Xia T, Siqueira JF Jr. Prevalence of selected bacterial named species and uncultivated phylotypes in endodontic abscesses from two geographic locations. *J Endod.* 2006;32:1135-8.
183. Rôças IN, Siqueira JF Jr. Root canal microbiota of teeth with chronic apical periodontitis. *J Clin Microbiol.* 2008;46:3599-606.
184. Rochford R, Cannon MJ, Sabbe RE, et al. Common and idiosyncratic patterns of cytokine gene expression by Epstein-Barr virus transformed human B cell lines. *Viral Immunol.* 1997;10:183-95.
185. Rodini CO, Lara VS. Study of the expression of CD68+ macrophages and CD8+ T cells in human granulomas and periapical cysts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2001;92:221-7.
186. Rosaline H, Satish ES, Kandaswamy D. Detection of presence or absence of herpes simplex virus, Epstein Barr virus and human cytomegalovirus in infected pulp using a polymerase chain reaction. *Aust Endod J.* 2009;35:9-12.

187. Rossini G, Cerboni C, Santoni A, et al. Interplay between human cytomegalovirus and intrinsic/innate host responses: a complex bidirectional relationship. *Mediators Inflamm.* 2012;2012:607276.
188. Rowe WP, Hartley JW, Waterman S, et al. Cytopathogenic agent resembling human salivary gland virus recovered from tissue cultures of human adenoids. *Pro Soc Exp Biol Med.* 1956;92:418–24.
189. Sabeti M, Daneshmand A, Simon JH, et al. Cytomegalovirus-infected inflammatory cells in dental periapical lesions. *Oral Microbiol Immunol.* 2009;24:434-6.
190. Sabeti M, Kermani V, Sabeti S, et al. Significance of human cytomegalovirus and Epstein - Barr virus in inducing cytokine expression in periapical lesions. *J Endod.* 2012;38:47-50.
191. Sabeti M, Slots J. Herpesviral-bacterial coinfection in periapical pathosis. *J Endod.* 2004;30:69-72.
192. Sabeti M, Simon JH, Nowzari H, et al. Cytomegalovirus and Epstein-Barr virus active infection in periapical lesions of teeth with intact crowns. *J Endod.* 2003c;29:321-3.
193. Sabeti M, Simon J, Kermani V, Valles Y, Rostein I. Detection of receptor activator of NF-kappa beta ligand in apical periodontitis. *J Endod.* 2005;31:17-8.
194. Sabeti M, Simon JH, Slots J. Cytomegalovirus and Epstein-Barr virus are associated with symptomatic periapical pathosis. *Oral Microbiol Immunol.* 2003b;18:327-8.
195. Sabeti M, Valles Y, Nowzari H, et al. Cytomegalovirus and Epstein-Barr virus DNA transcription in endodontic symptomatic lesions. *Oral Microbiol Immunol.* 2003a;18:104-8.
196. Saboia-Dantas CJ, Coutrin de Toledo LF, Sampaio-Filho HR, et al. Herpesviruses in asymptomatic apical periodontitis lesions: an immunohistochemical approach. *Oral Microbiol Immunol.* 2007;22:320-5.

197. Safavi KE, Rossomando EF. Tumor necrosis factor identified in periapical tissue exudates of teeth with apical periodontitis. *J Endod.* 1991;17:12-4.
198. Saito D, Leonardo Rde T, Rodrigues JL, Tsai SM, Höfling JF, Gonçalves RB. Identification of bacteria in endodontic infections by sequence analysis of 16S rDNA clone libraries. *J Med Microbiol.* 2006;55:101-7.
199. Sakamoto M, Siqueira JF Jr, Rôças IN, Benno Y. Bacterial reduction and persistence after endodontic treatment procedures. *Oral Microbiol Immunol.* 2007;22:19-23.
200. Salazar-Mather TP and Hokeness KL. Cytokine and chemokine networks: pathways to antiviral defense. *Curr Top Microbiol Immunol* 2006;313:29-46.
201. Sample J, Young L, Martin B, et al. Epstein-Barr virus types 1 and 2 differ in their EBNA-3A, EBNA-3B, and EBNA-3C genes. *J Virol.* 1990;64:4084-92.
202. Santos L, Azevedo K, Silva L, Oliveira L. Epstein-Barr virus in oral mucosa from human immunodeficiency virus positive patients. *Rev Assoc Med Bras (1992).* 2014;60:262-9.
203. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1977;74:5463-7.
204. Segura-Egea JJ, Martín-González J, Cabanillas-Balsera D, Fouad AF, Velasco-Ortega E, López-López J. Association between diabetes and the prevalence of radiolucent periapical lesions in root-filled teeth: systematic review and meta-analysis. *Clin Oral Investig.* 2016;20:1133-41.
205. Segura-Egea JJ, Martín-González J, Castellanos-Cosano L. Endodontic medicine: connections between apical periodontitis and systemic diseases. *Int Endod J.* 2015;48:933-51.
206. Shindell E. Studies on the possible presence of a virus in subacute and chronic periapical granulomas. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1962;15:1382-4.

207. Silva TA, Garlet GP, Fukada SY, Silva JS, Cunha FQ. Chemokines in oral inflammatory diseases: apical periodontitis and periodontal disease. *J Dent Res.* 2007;86:306-19.
208. Silva TA, Garlet GP, Lara VS, Martins W Jr, Silva JS, Cunha FQ. Differential expression of chemokines and chemokine receptors in inflammatory periapical diseases. *Oral Microbiol Immunol.* 2005;20:310-6.
209. Simon JH. Incidence of periapical cysts in relation to the root canal. *J Endod.* 1980;6:845-8.
210. Sims JE, Smith DE. The IL-1 family: regulators of immunity. *Nat Rev Immunol.* 2010;10:89-102.
211. Siqueira JF Jr. Endodontic infections: concepts, paradigms, and perspectives. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2002;94:281-293.
212. Siqueira JF Jr, Alves FR, Rôças IN. Pyrosequencing analysis of the apical root canal microbiota. *J Endod.* 2011;37:1499-503.
213. Siqueira JF Jr, Rôças IN. Bacterial pathogenesis and mediators in apical periodontitis. *Braz Dent J.* 2007;18:267-80.
214. Siqueira JF Jr, Rôças IN. Diversity of endodontic microbiota revisited. *J Dent Res.* 2009;88:969-81.
215. Siqueira JF Jr, Rocas IN, Ricucci D. Biofilms in endodontic infection. *Endod Topics.* 2012;22:33-49.
216. Slots J. Herpesviruses in periodontal diseases. *Periodontol 2000.* 2005;38:33-62.
217. Slots J, Contreras A. Herpesviruses: a unifying causative factor in periodontitis? *Oral Microbiol Immunol.* 2000;15:277-80.
218. Slots J, Nowzari H, Sabeti M. Cytomegalovirus infection in symptomatic periapical pathosis. *Int Endod J.* 2004;37:519-24.
219. Slots J, Sabeti M, Simon JH. Herpesviruses in periapical pathosis: an etiopathogenic relationship? *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2003;96:327-31.

220. Smith MG. Propagation in tissue cultures of a cytopathogenic virus from human salivary gland virus (SVG) disease. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1956;92:424–30.
221. Söderberg-Nauclér C. Does cytomegalovirus play a causative role in the development of various inflammatory diseases and cancer? *J Intern Med.* 2006;259:219-46.
222. Söderberg-Nauclér C. Human cytomegalovirus persists in its host and attacks and avoids elimination by the immune system. *Crit Rev Immunol.* 2006;26:231-64.
223. Somma F, Castagnola R, Bollino D, Marigo L. Oral inflammatory process and general health. Part 2: How does the periapical inflammatory process compromise general health? *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2011;15:35-51.
224. Spatafore CM, Griffin JA Jr, Keyes GG, Wearden S, Skidmore AE. Periapical biopsy report: an analysis of over a 10-year period. *J Endod.* 1990;16:239-41.
225. Stashenko P, Teles R, D'Souza R. Periapical inflammatory responses and their modulation. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1998;9:498-521.
226. Sunde PT, Olsen I, Enersen M, et al. Human cytomegalovirus and Epstein-Barr Virus in apical and marginal periodontitis: a role in pathology? *J Med Virol.* 2008;80:1007-11.
227. Taherimahmoudi M, Ahmadi H, Baradaran N, et al. Cytomegalovirus infection and disease following renal transplantation: preliminary report of incidence and potential risk factors. *Transplant Proc.* 2009;41:2841-4.
228. Takahashi K. Microbiological, pathological, inflammatory, immunological and molecular biological aspects of periradicular disease. *Int Endod J.* 1998;31:311-25.
229. Tepavčević Z. *Oralna patologija.* Beograd: Samostalno autorsko izdanje; 2009.
230. Thomson AV, Lotze MT. *The cytokine handbook.* San Diego: Elsevier Science Ltd; 2003.
231. Thompson MP, Kurzrock R. Epstein-Barr virus and cancer. *Clin Cancer Res.* 2004;10:803-21.

232. Torabinejad M, Kettering JD. Identification and relative concentration of B and T lymphocytes in human chronic periapical lesions. *J Endod.* 1985;11:122-5.
233. Tortorella D, Gewurz BE, Furman MH, Schust DJ, Ploegh HL. Viral subversion of the immune system. *Annu Rev Immunol.* 2000;18:861-926.
234. Tortorella D, Gewurz B, Schust D, Furman M, Ploegh H. Down-regulation of MHC class I antigen presentation by HCMV; lessons for tumor immunology. *Immunol Invest.* 2000;29:97-100.
235. Varga M, Görög D, Kári D, et al. Cytomegalovirus seroprevalence among solid organ donors in Hungary: correlations with age, gender, and blood group. *Transplant Proc.* 2011;43:1233-5.
236. Verdugo F, Castillo A, Simonian K, et al. Periodontopathogen and Epstein-Barr Virus-Associated Periapical Periodontitis May Be the Source of Retrograde Infectious Peri-Implantitis. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2015;17:199-207.
237. Vogel JU, Otte J, Koch F, Gumbel H, Doerr HW, Cinatl J Jr. Role of human cytomegalovirus genotype polymorphisms in AIDS patients with cytomegalovirus retinitis. *Med Microbiol Immunol.* 2013;202:37-47.
238. Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P. Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ.* 2003;10:45-65.
239. Walker KF, Lappin DF, Takahashi K, Hope J, Macdonald DG, Kinane DF. Cytokine expression in periapical granulation tissue as assessed by immunohistochemistry. *Eur J Oral Sci.* 2000;108:195-201.
240. Wang A, Ren L, Abenes G, Hai R. Genome sequence divergences and functional variations in human cytomegalovirus strains. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2009;55:23-33.
241. Wauquier F, Leotoing L, Coxam V, Guicheux J, Wittrant Y. Oxidative stress in bone remodelling and disease. *Trends Mol Med.* 2009;15:468-77.
242. Wei S, Kitaura H, Zhou P, Ross FP, Teitelbaum SL. IL-1 mediates TNF-induced osteoclastogenesis. *J Clin Invest.* 2005;115:282-90.

243. Weine FS. Endodontic therapy. St.Louis: Mosby; 1996.
244. Weller TH. Serial propagation in vitro of agents producing inclusion bodies derived from varicella and herpes zoster. Proc Soc Exp Biol Med. 1953;83:340–6.
245. Wittgow WC Jr, Sabiston CB Jr. Microorganisms from pulpal chambers of intact teeth with necrotic pulps. J Endod. 1975;1:168-71.
246. Wolters U, Wolf T, Stützer H, Schröder T. ASA classification and perioperative variables as predictors of postoperative outcome. Br J Anaesth. 1996;77:217-22.
247. World Health Organization. Application of the International Classification of Disease to Dentistry and stomatology. Geneva: WHO; 1995.
248. Wu YM, Yan J, Ojcius DM, Chen LL, Gu ZY, Pan JP. Correlation between infections with different genotypes of human cytomegalovirus and Epstein-Barr virus in subgingival samples and periodontal status of patients. J Clin Microbiol. 2007;45:3665-70.
249. Yazdi KA, Sabeti M, Jabalameli F, et al. Relationship between human cytomegalovirus transcription and symptomatic apical periodontitis in Iran. Oral Microbiol Immunol. 2008;23:510-4.
250. Yildirim S, Yapar M, Kubar A, et al. Human cytomegalovirus, Epstein-Barr virus and bone resorption-inducing cytokines in periapical lesions of deciduous teeth. Oral Microbiol Immunol. 2006;21:107-11.
251. Yu SM, Stashenko P. Identification of inflammatory cells in developing rat periapical lesions. J Endod. 1987;13:535-40.
252. Zhang X, Peng B. Immunolocalization of receptor activator of NF kappa B ligand in rat periapical lesions. J Endod. 2005;31:574-7.
253. Zhang J, Huang X, Lu B, Zhang C, Cai Z. Can apical periodontitis affect serum levels of CRP, IL-2, and IL-6 as well as induce pathological changes in remote organs? Clin Oral Investig. 2016;20:1617-24.
254. Zimmer U, Adldinger HK, Lenoir GM, et al. Geographical prevalence of two types of Epstein-Barr virus. Virology. 1986;154:56-66.

255. Živković S, Miljušković D. Endodontska terapija hroničnih apeksnih parodontita.
Beograd: DANUBIUS-DENTAL; 2003.

IX PRILOZI

PRILOG 1. Radni karton ekperimentalne grupe istraživanja

Datum uzimanja uzorka -
Broj lezije za analizu -

ID broj pacijenta -
Broj protokola -

RADNI KARTON

I. OPŠTI PODACI PACIJENTA:

IME I PREZIME	
GODINA ROĐENJA	
POL	1 – M 2 – Ž
ADRESA PREBIVALIŠTA	
KONTAKT TELEFON	

II. UZROK JAVLJANJA LEKARU:

a.) bol b.) otok c.) poremećaj opšteg zdravstvenog stanja d.) slučajno otkriveno-bez simptoma

III. ISTORIJA BOLESTI:

Kada ste prvi put uočili promene, kada su se pojavile prve tegobe koje su uzrok javljanja lekaru?

Da li su iste promene u ustima i pre uzorkovale tegobe?

a.) DA b.) NE

Koliko puta pre?

a.) jedan put pre b.) dva puta pre c.) više puta pre

Koji vid terapije je korišćen u sanaciji tegoba?

a.) antibiotska terapija b.) incizija c.) drenaža kanala korena zuba
d.) endodontsko lečenje zuba e.) vađenje zuba f.) ostalo _____

IV. OPŠTE ZDRAVSTVENO STANJE:

Da li bolujete od neke dugotrajne bolesti koja zahteva redovnu upotrebu lekova?

a.) DA b.) NE

Navesti bolesti/lekove ukoliko je odgovor potvrđan:

Da li ste alergični na:

a.) lekove) b.) hranu c.)polen d.)ostalo _____

Da li ste ležali u bolnici?

a.) DA b.) NE

U slučaju potvrdnog odgovora navedite razloge:

V. KLINIČKI PREGLED:

- Lokalizacija promena/tegoba :

- **BOL**
Prisutan u toku kliničkog pregleda a.) DA b.) NE

Prisutan u prethodnih 48 sati a.) DA b.) NE

Karakteristike bola - izazvan stimulusom a.) DA b.) NE
- a.) oštar b.) probadajući c.) tup

Trajanje bola a.) kratkotrajan b.) dugotrajan c.) samo dok traje stimulus

Palpatorno zahvaćena regija a.) bolno osetljiva b.) bolno ne osetljiva
Perkusija - vertikalna a.) bolno osetljiva b.) bolno ne osetljiva
- horizontalna a.) bolno osetljiva b.) bolno ne osetljiva
- **OTOK**
Prisustvo a.) DA b.) NE

Karakteristike a.) tvrd b.) fluktuirajući

Koža iznad zahvaćenog predela – topla a.) DA b.) NE
- crvena a.) DA b.) NE

Prisustvo fistule na koži/sluzokoži a.) DA b.) NE

Deformacija alveolarnog grebena a.) DA b.) NE
a.) proliferativna b.) ulcerativna
- Aspiracija cističnog sadržaja
Izgled a.) bistar b.) замуćen c.) purulentan d.) bez sadržaja

VI. RADIOLOŠKA ANALIZA

a.) retroalveolarni snimak b.) ortopantomogram
Karakteristike lezije: a.) rasvetljenje b.) senka
Ograničenost: a.) neoštro b.) oštro ograničena sa zonom periferne kondenzacije
Lokalizacija:

Veličina lezije:

a.) meziodistalni promer ____mm b.) kraniokaudalni promer ____mm _____

Radna dijagnoza: _____

Patohistološki nalaz: _____

Indikacija: a.) hirurško lečenje b.) inciziona biopsija

PRILOG 2. Radni karton kontrolne grupe istraživanja

Datum uzimanja uzorka -
Broj lezije za analizu -

ID broj pacijenta -
Broj protokola -

RADNI KARTON

I. OPŠTI PODACI PACIJENTA:

IME I PREZIME	
GODINA ROĐENJA	
POL	1 – M 2 – Ž
ADRESA PREBIVALIŠTA	
KONTAKT TELEFON	

II. UZROK JAVLJANJA LEKARU:

a.) bol b.) otok c.) poremećaj opšteg zdravstvenog stanja d.) slučajno otkriveno-bez simptoma

III. ISTORIJA BOLESTI:

Kada ste prvi put uočili promene, kada su se pojavile prve tegobe koje su uzrok javljanja lekaru?

Da li su iste promene u ustima i pre uzorkovale tegobe?

a.) DA b.) NE

Koliko puta pre?

a.) jedan put pre b.) dva puta pre c.) više puta pre

Koji vid terapije je korišćen u sanaciji tegoba?

a.) antibiotska terapija b.) incizija c.) vađenje zuba d.) ostalo _____

IV. OPŠTE ZDRAVSTVENO STANJE:

Da li bolujete od neke dugotrajne bolesti koja zahteva redovnu upotrebu lekova?

a.) DA b.) NE

Navesti bolesti/lekove ukoliko je odgovor potvrđan:

Da li ste alergični na:

a.) lekove) b.) hranu c.) polen d.) ostalo _____

Da li ste ležali u bolnici?

a.) DA b.) NE

U slučaju potvrdnog odgovora navedite razloge:

V. RADIOLOŠKA ANALIZA

a.) retroalveolarni snimak b.) ortopantomogram

Karakteristike lezije: a.) rasvetljenje b.) senka

Ograničenost: a.) neoštro b.) oštro ograničena sa zonom periferne kondenzacije

Lokalizacija:

Veličina lezije:

a.) meziodistalni promer ____mm b.) kraniokaudalni promer ____mm _____

Radna dijagnoza: _____

Patohistološki nalaz: _____

Indikacija: a.) hirurško lečenje b.) inciziona biopsija

X BIOGRAFIJA AUTORA

Dr Aleksandar Jakovljević je rođen 24.07.1986. godine u Doboju, Bosna i Hercegovina. Stomatološki fakultet Univerziteta u Sarajevu upisao je školske 2005/06. godine, a diplomirao prvi u generaciji u decembru 2010. godine sa prosečnom ocenom 9,60. Tokom osnovnih studija bio je stipendista Fonda za mlade talente Ministarstva prosvete i nauke Bosne i Hercegovine, kao i primalac stipendije za nadarene studente Univerziteta u Sarajevu. U oktobru 2011. godine nostrifikovao je diplomu osnovnih studija na Stomatološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu. Doktorske studije na Stomatološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, modul „Klinička istraživanja zasnovana na bazičnim naukama“ upisao je školske 2011/12. godine i uspešno položio sve planom i programom predviđene predmete sa prosečnom ocenom 10. Pripravnički staž je obavio na klinikama Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu, a u martu 2013. godine položio stručni ispit za doktora stomatologije. Od juna 2012. godine zaposlen je kao istraživač pripravnik, a od aprila 2016. godine kao istraživač saradnik na projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, rukovodioca Prof. dr Jelene Milašin, br. 175075 pod nazivom „Genetička kontrola i molekularni mehanizmi u malignim, inflamatornim i razvojnim patologijama orofacijalne regije“. U toku osnovnih studija školske 2008/09. i 2009/10. godine bio je angažovan kao demonstrator u izvođenju praktične nastave na predmetu Stomatološka radiologija na Stomatološkom fakultetu Univerziteta u Sarajevu. U toku školske 2014/15., 2015/16. i 2016/17. godine angažovan je kao saradnik u izvođenju praktične nastave na predmetu Patološka fiziologija na osnovnim integrisanim studijama Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

Naučno-istraživačkim radom počinje da se bavi kao student treće godine osnovnih studija pri čemu je bio autor i koautor na sedamnaest naučno-istraživačkih radova prezentovanih na domaćim i međunarodnim kongresima. Njegovi naučno-istraživački radovi na kongresima su nagrađivani pet puta, a tri puta je bio dobitnik prestižne Rektorove nagrade Univerziteta u Sarajevu za naučno-istraživački rad.

Tokom doktorskih studija prezentovao je još deset naučno-istraživačkih radova na domaćim i međunarodnim kongresima. Učestvovao je kao predavač u okviru programa kontinuirane medicinske edukacije Sekcije za oralnu hirurgiju i implantologiju, Srpskog lekarskog društva, kao i Klinike za bolesti zuba, Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu. 2015. godine dobija prestižni grant za mlade

istraživače Evropskog udruženja endodontista za sprovođenje projekta pod nazivom: „Biomarkeri oksidativnog stresa i regulatori koštane resorpcije u apeksnom parodontitisu - korelacija sa Epštajn-Bar virusnom infekcijom“. U 2016. godini nagrađen je za najbolju oralnu prezentaciju naučno-istraživačkog rada na 21. Kongresu Balkanskog udruženja stomatologa kao i na 4. Internacionalnom kongresu Austrijskog udruženja endodontista. Do sada, dr Jakovljević je autor jednog poglavlja u međunarodnoj monografiji, kao i 10 naučnih radova *in extenso*, od kojih su 8 publikovani u časopisima indeksiranim u Current Contents-u:

1. Jakovljevic A, Andric M, Knezevic A, Milicic B, Beljic-Ivanovic K, Perunovic N, Nikolic N, Milasin J. Herpesviral-bacterial co-infection in mandibular third molar pericoronitis. Clin Oral Investig. 2016 Sep 12. [Epub ahead of print].
2. Jakovljevic A, Andric M, Miletic M, Beljic-Ivanovic K, Knezevic A, Mojsilovic S, Milasin J. Epstein-Barr virus infection induces bone resorption in apical periodontitis via increased production of reactive oxygen species. Med Hypotheses. 2016 Sep;94:40-2.
3. Marjanovic U, Jurisic M, Brkovic B, Jakovljevic A, Milicic B, Marjanovic M, Ivanovic J. Comparative clinical evaluation of two different techniques of local anaesthesia in the posterior mandible using 4% articaine with 1:100000 adrenaline. Vojnosanit Pregl. (2016); Online First July, 2016
4. Zelic K, Galic I, Nedeljkovic N, Jakovljevic A, Milosevic O, Djuric M, Cameriere R. Accuracy of Cameriere's third molar maturity index in assessing legal adulthood on Serbian population. Forensic Sci Int. 2016 Feb;259:127-32.
5. Jakovljevic A, Andric M, Knezevic A, Soldatovic I, Nikolic N, Karalic D, Milasin J. Human Cytomegalovirus and Epstein-Barr Virus Genotypes in Apical Periodontitis Lesions. J Endod. 2015 Nov;41(11):1847-51.
6. Jakovljevic A, Knezevic A, Karalic D, Soldatovic I, Popovic B, Milasin J, Andric M. Pro-inflammatory cytokine levels in human apical periodontitis: Correlation with clinical and histological findings. Aust Endod J. 2015 Aug;41(2):72-7.

7. Jakovljevic A, Lazic E, Soldatovic I, Nedeljkovic N, Andric M. Radiographic assessment of lower third molar eruption in different anteroposterior skeletal patterns and age-related groups. *Angle Orthod.* 2015 Jul;85(4):577-84.
8. Jakovljevic A, Andric M. Human cytomegalovirus and Epstein-Barr virus in etiopathogenesis of apical periodontitis: a systematic review. *J Endod.* 2014 Jan;40(1):6-15.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а _____ Александар Јаковљевић _____

број индекса _____ 4010/2011 _____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом:

„Детекција и генотипизација Хуманог цитомегаловируса и Епштајн-Бар вируса у хроничним периапикалним лезијама“

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

Потпис докторанда

У Београду, _____

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Александар Јаковљевић

Број индекса 4010/2011

Студијски програм Докторске академске студије, модул: „Базична и клиничка истраживања у стоматологији“

Наслов рада „Детекција и генотипизација Хуманог цитомегаловируса и Епштајн-Бар вируса у хроничним периапикалним лезијама“

Ментор Доц. др сци. Мирослав М. Андрић, Проф. др сци. Александра М. Кнежевић

Потписани/а Александар Јаковљевић

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

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

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

Потпис докторанда

У Београду, _____

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

„Детекција и генотипизација Хуманог цитомегаловируса и Епштајн-Бар вируса у хроничним периапикалним лезијама“

која је моје ауторско дело.

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

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

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

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

Потпис докторанда

У Београду, _____

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

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

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

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

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

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