

UNIVERZITET U BEOGRADU

Stomatološki fakultet

Nataša S. Nikoli Jakoba

**KARAKTERIZACIJA I TOKSI NA
AKTIVNOST *AGGREGATIBACTER*
ACTINOMYCETEMCOMITANS
IZOLATA**

Doktorska disertacija

Beograd, 2012.

UNIVERSITY OF BELGRADE

Faculty of Dental Medicine

Nataša S. Nikoli Jakoba

**CHARACTERISATION AND TOXIC
ACTIVITY OF *AGGREGATIBACTER*
ACTINOMYCETEMCOMITANS
ISOLATES**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2012

MENTOR:

Prof. dr **Saša Jankovi** ,
Univerzitet u Beogradu, Stomatološki fakultet,
Klinika za parodontologiju i oralnu medicinu

LANOVI KOMISIJE:

Prof. dr **Božidar Dimitrijevi** ,
Univerzitet u Beogradu, Stomatološki fakultet,
Klinika za parodontologiju i oralnu medicine

Prof. dr **Zoran Aleksi** ,
Univerzitet u Beogradu, Stomatološki fakultet,
Klinika za parodontologiju i oralnu medicine

Nau ni savetnik dr **Branka Vasiljevi** ,
Univerzitet u Beogradu, Institut za
molekularnu genetiku i geneti ko
inženjerstvo

Nau ni saradnik dr **Žanka Boji -Trbojevi** ,
Univerzitet u Beogradu, Institut za
primenu nuklearne energije

Datum odbrane: _____

Ova doktorska disertacija je realizovana u Laboratoriji za molekularnu genetiku i ekologiju mikroorganizama, Instituta za molekularnu genetiku i geneti ko inženjerstvo. Jedan deo teze je ura en u Laboratoriji za biologiju reprodukcije, Instituta za primenu nuklearne energije, dok je klini ki deo istraživanja obavljen na Klinici za parodontologiju i oralnu medicinu u Beogradu.

Ovom prilikom bih se zahvalila:

Mom mentoru prof. dr Saši Jankovi u i mojim profesorima prof. dr Božidaru Dimitrijevi u, prof. dr Vojislavu Lekovi u i prof. dr Zoranu Aleksi u, na ukazanom poverenju, strpljenju i velikoj slobodi tokom mog rada.

dr Branki Vasiljevi , koja me je uvela u podru je istraživanja molekularne genetike mikroorganizama i koja me je korisnim savetima upoznala sa na inom razmišljanja i planiranjem eksperimenata. Tako e, zahvaljujem joj se i na datoj šansi za rad u Institutu, kao i na brojnim sugestijama tokom pisanja teze koje su mi bile dragocene.

Dr Tanji Ili -Tomi na velikoj i nesebi noj pomo i prilikom izrade ovog rada. Svojim li nim angažovanjem, sugestijama i iskustvom je zna ajno doprinela realizaciji ove teze.

Dr Lidiji Šenerovi za korisne savete u eksperimentalnom radu, kao i na li nom angažovanju i velikoj pomo i.

Dr Žanki Boji Trbojevi na savetima, korisnim idejama kao i na kriti koj oceni rada. Bez njene pomo i i li nog angažovanja jedan zna ajan deo teze ne bi bio uspešno ura en i analiziran.

Tanji, Lidiji i Žani dugujem zahvalnost na podršci u savladavanju svih prepreka u eksperimentima.

Svim lanovima tima iz Lab 5, a naro ito Sandri V., Saši P. i Ivani M., na lepoj atmosferi, dobrom raspoloženju, konstruktivnim diskusijama i velikoj pomo i kada god mi je bila potrebna.

Mojim dragim drugaricama, Dr Mii Raki i dr Mileni Jovanovi , na velikoj i nesebi noj pomo i i iskrenoj podršci u trenucima kada mi je to bilo najpotrebnije.

Celokupnom kolektivu Klinike za parodontologiju i oralnu medicinu, za razumevanje i podršku koje su mi pružili prilikom izrade ovog rada.

Posebno se zahvaljujem mojim najdražim momcima i najve im ljubavima, suprugu Stevanu i sinu Kostu, na neizmernoj ljubavi, strpljenju, razumevanju, toleranciji i podršci!

APSTRAKT

Parodontalna oboljenja su široko rasprostranjena u celom svetu i u velikoj meri narušavaju oralno zdravlje, kako u razvijenim tako i u nerazvijenim zemljama. Parodontopatije su hroni na inflamatorna oboljenja potpornog aparata zuba koja usled razaranja dubljih parodontalnih tkiva mogu da rezultiraju gubitkom zuba. Etiologija parodontopatije je polimikrobna po svojoj prirodi. Opisano više od 700 različitih vrsta mikroorganizama koje naseljavaju usnu duplju, od kojih je oko 400 izolovano iz subgingivalne regije. Međutim, samo nekoliko bakterijskih vrsta je dovedeno u vezu sa parodontopatijama, među kojima je i *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Ovaj parodontopatogen se smatra veoma važnim u etiologiji parodontopatije, odnosno da doprinosi kako inicijaciji tako i progresiji destrukcije parodontalnih tkiva. Cilj ove studije je bio da se ispita prisustvo, karakteristike i toksi na aktivnost bakterije *A. actinomycetemcomitans* poreklom iz subgingivalnog dentalnog plaka, kod obolelih od parodontopatije kao i kod osoba sa klinički zdravim parodontacijom. Kod svih ispitanika uključenih u studiju, evidentiran je parodontalni status i nivo oralne higijene verifikacijom kliničkih parametara: dubinom sondiranja (DS u mm), nivoom pripojnog epitela (NPE u mm), krvarenjem na provokaciju (KNP) i plak indeksom (PI). Pulovani uzorci subgingivalnog dentalnog plaka su se koristili za kultivaciju i molekularne analize bakterije *A. actinomycetemcomitans*. Kultivacijom dobijene kolonije su selektovane u cilju identifikacije bakterije *A. actinomycetemcomitans*, sekvenciranjem 16S rRNK gena. Korišćene su specifične PCR reakcije u cilju genotipizacije promotorskog operona za leukotoksin, citoletalnog toksina istezanja i serotipizaciju kao i identifikaciju bakterije *A. actinomycetemcomitans* umnožavanjem dela gena za 16S

rRNK. Ispitivan je uticaj bakterije *A. actinomycetemcomitans* na inhibiciju rasta ekstravilusne trofoblastne elijske linije HTR-8/SVneo.

Statisti ki zna ajne razlike posmatranih klini kih parametara su bile prisutne me u grupama ispitanika. Srednje vrednosti dubine sondiranja i nivoa pripojnog epitela u A grupi su bile statisti ki zna ajno ve e u odnosu na H grupu, dok se srednje vrednosti KNP nisu statisti ki zna ajno razlikovale. Oboleli od parodontopatije (A i H grupa) su imali statisti ki zna ajno ve e srednje vrednosti svih posmatranih klini kih parametara u odnosu na grupu zdravih ispitanika. Identifikacija bakterije *A. actinomycetemcomitans* konvencionalnim PCR reakcijama za 16S rRNK pomo u jednog prajmera specifi nog za vrstu i jednog univerzalnog prajmera se pokazala neefikasnom, jer su PCR produkti na o ekivanim visinama dobijeni i u slu aju *A. segnis*, *A. aphrophilus*, *Campylobacter gracillis*, *Capnocytophaga* i *Bacillus turigiensis*. PCR reakcijama je dokazana dominantnost serotipa e me u *A.actinomycetemcomitans* klini kim izolatima, kao i da izolati ne pripadaju hiperleukotoksi nom fenotipu. Prisustvo nijednog *cdt* gena nije potvr eno PCR analizama. Infekcija bakterijom *A. actinomycetemcomitans* je dovela do inhibicije rasta ekstravilusne trofoblastne elijske linije HTR-8/SVneo. Me utim, neophodna su dalja istraživanja koja e pokazati koja vrsta elijske smrti nastupa kao rezultat infekcije-apoptoza ili autofagija.

Istraživanja su pokazala da *A. actinomycetemcomitans* sojevi imaju razli ite fenotipove, patogenetske mehanizme i funkcionalne uloge u zajednicama mikroorganizama subgingivalne regije što može da rezultira razli itim obrazcima veze sa oboljenjem.

Ključne re i: *A. actinomycetemcomitans*, parodontopatija, PCR, kultivacija, trofoblasti

Nau na oblast: Stomatologija

Uža nau na oblast: Parodontologija

UDK broj: 616.311.2-002:579.61(043.3)

ABSTRACT

Periodontal diseases are widely distributed in the world and represent a major oral health problem both in developed and in developing countries. These chronic inflammatory diseases are characterized by the destruction of tooth supporting tissues. It is commonly accepted that dental plaque bacteria are the primary etiologic agents of periodontal disease. More than 700 species have been detected in the oral cavity in different individuals. Approximately 400 of these species have been isolated from different subgingival microenvironments. However, only a few species have been associated with the disease. From these bacteria specifically associated with destructive disease, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* is considered as one of the bacterial species of etiological importance in periodontitis and has contributed to the initiation and/or progression of destructive forms of periodontitis. The aim of this study was to evaluate the occurrence characteristics and toxic activity of *A. actinomycetemcomitans* in the subgingival biofilm in subjects with periodontal health and disease. Periodontal status of all included subjects was evaluated during the initial screening visit. A full-mouth clinical examination was performed in each patient using a manual probe and the following parameters were recorded at six sites per tooth: probing depth (PD in mm), clinical attachment loss (CAL in mm), bleeding on probing (BOP) and plaque index (PI). Pooled samples of subgingival plaque were taken for culture-based identification of microorganisms and further molecular analysis. Colonies suspected to be *A. actinomycetemcomitans* were selected for molecular identification using 16S rRNA gene sequencing. Genotyping was performed by polymerase chain reactions specific to the *ltx* promoter region, serotype-specific and *cdt* region and by sequencing of 16S rRNA. Cytotoxicity was examined on extravillous trophoblast cell line HTR-8/SVneo.

The three groups demonstrated statistically significant differences regarding clinical parameters examined in the whole dentition. The subjects in AP group showed higher mean PD and CAL values in comparison with CP group indicating a more severe level of periodontal disease, while BOP values did not show significant difference. Diseased subjects had significantly higher full-mouth bleeding score compared with healthy controls. Identification of *A. actinomycetemcomitans* in conventional PCR for 16S rRNA with one species-specific and one universal primer was inconclusive because almost identical signal with *A. segnis*, *A. aphrophilus*, *Campylobacter gracilis*, *Capnocytophaga* and *Bacillus turigiensis* was obtained. PCR analysis showed that serotype e was overrepresented, the *ltx* promoter region was amplified and the *cdtABC* in *A. actinomycetemcomitans* isolates was absent. Infection caused by *A. actinomycetemcomitans* resulted with cell growth inhibition of extravillous trophoblast cell line HTR-8/SVneo, but further investigation are needed to determine what type of cell death had occurred-apoptosis or autophagy. It seems plausible that *A. actinomycetemcomitans* strains are distinct in their phenotypes, pathogenic mechanisms and functional roles in the subgingival microbial communities, which may result in different patterns of disease association.

Key words: *A. actinomycetemcomitans*, periodontitis, PCR, cultivation, trophoblast

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Parodontopatije.....	1
1.1.1. Savremena klasifikacija parodontopatija.....	2
1.1.2. Etiologija parodontopatija.....	5
1.1.2.1. Specifi na i nespecifi na teorija delovanja dentalnog plaka.....	6
1.1.2.2. Formiranje i mikrobiološki sastav dentalnog plaka.....	8
1.1.2.3. Akcesorni etiološki faktori parodontopatije.....	13
1.2. Generalne karakteristike bakterije <i>A. actinomycetemcomitans</i>	15
1.2.1. Serotipovi bakterije <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	17
1.2.2. Klonalni diverzitet bakterije <i>A. actinomycetemcomitans</i> i rasni tropizam.....	18
1.2.3. Putevi transmisije bakterije <i>A. actinomycetemcomitans</i>	19
1.2.4. Genom bakterije <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	21
1.2.5. Imunomodulatorni efekti bakterije <i>A. actinomycetemcomitans</i>	22
1.2.5.1. Citokini indukovani bakterijom <i>A. actinomycetemcomitans</i>	23
1.2.6. <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> i imunosupresija-inhibicija elijskog rasta.....	24
1.2.6.1. Leukotoksin.....	24
1.2.6.2. Citoletalni toksin istežanja.....	28
1.2.6.3. Ostali imunomodulatori/inhibitori elijskog ciklusa.....	29
1.2.7. Celularni mehanizmi odgovorni za koštanu destrukciju.....	30

1.2.8.	Imunski odgovor doma ina.....	33
1.3.	Parodontopatije i sistemska oboljenja.....	34
1.3.1.	Fokalna infekcija.....	34
1.3.2.	Bakterijemija.....	35
1.3.3.	Veza oralne infekcije i sistemskih oboljenja.....	37
1.3.4.	Parodontopatije i sistemska inflamacija.....	38
1.3.5.	Zajedni ki faktori rizika.....	39
1.4.	Prevremani poro aj i parodontopatija.....	40
2.	CILJEVI.....	46
3.	MATERIJAL.....	47
3.1.	Pacijenti.....	47
3.1.1.	Selekcija pacijenata.....	47
3.1.2.	Klini ki pregled.....	48
3.2.	Uzimanje uzoraka subgingivalnog dentalnog plaka za laboratorijske analize.....	50
3.2.1.	Selekcija mesta uzorkovanja.....	50
3.2.2.	Uzimanje uzoraka subgingivalnog dentalnog plaka.....	50
4.	METODE.....	52
4.1.	Kultivacija bakterija.....	52
4.2.	Izolovanje ukupne DNK bakterijskih sojeva.....	53
4.2.1.	Izolovanje ukupne bakterijske DNK visokom temperaturom.....	53
4.2.2.	Izolovanje ukupne bakterijske DNK fenolom.....	53
4.2.3.	Izolovanje ukupne bakterijske DNK pomo u komercijalnih kitova.....	54
4.3.	Genotipizacija.....	55

4.3.1.	Reakcije lanane polimerizacije (PCR).....	55
4.3.1.1.	Sinteza DNK u reakciji lanane polimerizacije.....	55
4.3.2.	Sekvenciranje.....	56
4.3.2.1.	Bioinformatička obrada sekvenci.....	57
4.3.3.	Reakcije umnožavanja dela 16S rRNA gena bakterije <i>A.a.</i>	58
4.3.4.	Serotip-specifična genotipizacija (Multiplex PCR).....	58
4.3.5.	Serotip-specifična genotipizacija- konvencionalni PCR.....	61
4.3.6.	Genotipizacija promotora operona za leukotoksin.....	61
4.3.7.	Genotipizacija <i>cdt</i> gena.....	62
4.3.8.	Analiza DNK na agaroznom gelu.....	63
4.4.	Ekstravilusna trofoblastna ćelijska linija HTR-8/SVneo.....	64
4.4.1.	Bakterijska kultura.....	64
4.4.2.	Tretman ćelija.....	65
4.4.3.	Detekcija i kvantitacija ćelija (MTT test).....	65
4.5.	Statistička obrada podataka.....	66
5.	REZULTATI.....	68
5.1.	Demografske karakteristike i parodontalni status ispitanika.....	68
5.1.1.	Klinički parametri.....	69
5.2.	Kultivacija bakterija subgingivalnog dentalnog plaka.....	74
5.2.1.	Kultivacija materijala uvaženog u 10% glicerolu.....	74
5.2.2.	Kultivacija materijala transportovanog u RTF-u... ..	74
5.2.3.	Kultivacija u tečnim hranljivim podlogama.....	76
5.3.	Prevalenca i distribucija kultivacijom identifikovanih <i>A. actinomycetemcomitans</i> izolata.....	77

5.4.	Izolacija bakterijske DNK.....	78
5.4.1.	Izolacija bakterijske DNK visokom temperaturom.....	78
5.4.2.	Izolacija bakterijske DNK fenolom.....	78
5.4.3.	Izolacija bakterijske DNK komercijalnim kitovima.....	79
5.5.	Sekvenciranje izolata dobijenih kultivacijom.....	80
5.6.	Reakcije umnožavanja dela 16S r RNK gena bakterije <i>A. a.</i>	83
5.7.	Genotipizacija promotora ltx operona.....	84
5.8.	Serotip-specifi na genotipizacija Multiplex PCR-om.....	86
5.9.	Serotip-specifi na genotipizacija konvencionalnim PCR-om.....	87
5.10.	Uticaj <i>A. actinomycetemcomitans</i> izolata na ekstravilusnu trofoblastnu elijsku liniju HTR-8/Svneo.....	88
5.10.1.	Efekat infekcije bakterijom <i>A. actinomycetemcomitans</i> na vijabilnost elija.....	89
5.10.2.	HTR-8/SVneo elije nakon infekcije bakterijom <i>A. a.</i>	92
6.	DISKUSIJA.....	93
7.	ZAKLJU CI ISTRAŽIVANJA.....	118
8.	LITERATURA.....	121

1. UVOD

1.1. Parodontopatije

Oboljenje parodontcijuma je zajednički termin za inflamatorna stanja potpornog aparata zuba koje nastaje kao odgovor organizma na prisustvo bakterija na površinama zuba u predelu dento-gingivalnog kompleksa (Pihlstrom i sar., 2005). Bakterije koje kolonizuju površine u usnoj duplji ulaze u sastav dentalnog biofilma ili dentalnog plaka.

Relativno blaga forma oboljenja parodontcijuma, poznata kao gingivitis, je praćena inflamatornim promenama u gingivi. Gingivitisi nastali kao posledica akumulacije dentalnog plaka imaju reverzibilan karakter, odnosno svakodnevno i pravilno uklanjanje dentalnog plaka u okviru održavanja oralne higijene može da dovede do potpunog ozdravljenja gingive (Löe i sar., 1965; Theilade i sar., 1966).

Parodontopatije su hronična inflamatorna oboljenja potpornog aparata zuba koja usled razaranja dubljih parodontalnih tkiva mogu da rezultiraju gubitkom zuba. Većina parodontopatija klinički se manifestuje inflamacijom i recesijom gingive, parodontalnim džepovima sa izraženim gnojenjem i stvaranjem subgingivalnih konkremenata na korenu zuba. Inflamatorni procesi u parodontcijumu dovode do destrukcije ovih tkiva što se klinički manifestuje labavljenjem i migracijom zuba, a u završnoj fazi i ispadanjem zuba. Ovi simptomi i znaci su redovno prisutni u skoro svim kliničkim formama parodontopatija, ali nisu podjednako izraženi. Povećanje obima destrukcije parodontalnih tkiva nastaju funkcionalne smetnje. Moguća pojava različitih komplikacija (koje su po pravilu praćene bolom) upozoravaju bolesnika na bolest i primoravaju ga da zatraži lekarsku pomoć.

Postoje različite kliničke forme parodontopatije. Epidemiološka istraživanja su pokazala da je najzastupljenija klinička forma parodontopatije hronična parodontopatija koju karakteriše spor i postepen gubitak parodontalnih tkiva (Armitage, 2004; Baelum, 1998; Brown & Löe, 1993). Za razliku od ove kliničke forme, agresivne parodontopatije koje mogu da se jave u lokalizovanoj ili generalizovanoj formi, karakteriše brz i obiman gubitak parodontalnih tkiva. Agresivne parodontopatije najčešće nastaju u ranom uzrastu, mada su istraživanja pokazala da destruktivni procesi u parodontijumu mogu da poprime agresivan karakter u bilo kojoj životnoj dobi (Armitage, 1994, 2004). Kod mladih osoba bolest se javlja oko puberteta i zahvata prve stalne molare i centralne incizive i može da rezultira iskompromitovanom funkcijom ovih zuba već u periodu adolescencije.

1.1.1. Savremena klasifikacija parodontopatija (Armitage, 1999)

- I. Hronična parodontopatija (ranije Parodontopatija odraslih ili sporonapredujuća parodontopatija) (Slika 1.2)
- II. Agresivne parodontopatije (ranije Juvenilna parodontopatija) (Slika 1.3)
 1. Lokalizovana
 2. Generalizovana
- III. Parodontopatija udružena sa sistemskim oboljenjima
- IV. Ulceronekrozna parodontopatija (Slika 1.4)



Slika 1. 1. Zdrav parodonticijum



Slika 1.2. Hroni na parodontopatija



Slika 1.3a. Agresivna parodontopatija. Pacijentkinja 30 godina starosti, puša
Slika 1.3b. Digitalni ortopantomogram iste pacijentkinje



Slika 1.4. Ulcero-nekrozna parodontopatija

1.1.2. Etiologija parodontopatija

Dentalni plak je glavni etiološki faktor u nastanku gingivita i parodontopatije. Dentalni plak je dinamičan i ekstremno kompleksan oralni biofilm. Predstavlja ekosistem gde zajednice različitih mikrobnih vrsta formiraju mikroniše koje se razlikuju u sastavu i metaboličkim aktivnostima. Dentalni plak se opisuje kao organska, bakterijska, bezbojna i opalescentna meka naslaga koja se akumulira na zubima, ali i na drugim mestima u usnoj duplji.

Najzastupljeniji sastavni deo dentalnog plaka su mikroorganizmi. Više od 700 različitih bakterijskih vrsta je detektovano u usnoj duplji kultivacijom ili primenom molekularnih metoda koje se baziraju na analizi bakterijske DNK (Aas i sar., 2005; Kroes i sar., 1999; Moore i sar., 1985; Paster i sar., 2001). Mnoge od ovih vrsta su prisutne u dentalnom plaku, ali je tačan broj i identitet onih vrsta koje su direktno uključene u etiologiju parodontopatija još uvek kontraverzan. Parodontopatogena svojstva su bila pripisana širokom (Marsh, 1994; Theilade, 1986) ili uskom (Slots & Listgarten, 1988; Socransky, 1977) spektru bakterija, uglavnom Gram-negativnim, asaharolitičkim i proteolitičkim vrstama koja se razmnožavaju i povećavaju svoj patogeni potencijal u ekološkim uslovima koji vladaju u akumuliranom dentalnom plaku. Prema nekim istraživačima, svega nekoliko vrsta (manje od 10) se može smatrati značajnim parodontalnim patogenom (Haffajee & Socransky, 1994; Slots & Listgarten, 1988; Socransky i sar., 1998; Socransky & Haffajee, 1992, 2005). Pretpostavka da parodontopatije mogu biti izazvane nekolicinom ili čak samo jednom od mnogih bakterijskih vrsta u dentalnom plaku, navodi neke istraživače da ove bakterije smatraju specifičnim parodontalnim patogenima. Preporuka je da se u cilju prevencije i terapije

oboljenja izvrši eradikacija ovih bakterija primenom antibiotika ukoliko je potrebno (Haffajee i sar., 1984; Christerson & Zambon, 1993; Pavić i sar., 1994; Saxsen & Asikainen, 1993; Slots & Rosling, 1983). Protivnici ovog stava se pozivaju na činjenicu da je svaka od bakterijskih vrsta koja se smatra parodontopatogenom bila detektovana i kod osoba sa klinički zdravim parodontacijumom, te bi se na njih trebalo gledati kao na komensalne organizme koji imaju potencijalnu ulogu oportunističkog patogena (Marsh, 1994; Theilade, 1986).

1.1.2.1. Specifična i nespecifična teorija delovanja dentalnog plaka

Do sredine prošlog veka bila je prihvaćena tzv. nespecifična teorija delovanja dentalnog plaka prema kojoj se smatralo da oboljenja parodonticijuma nastaju kao posledica kumulativnog dejstva svih mikroorganizama dentalnog plaka tokom određenog vremenskog perioda i usled smanjenog imunološkog odgovora domaćina na prisutne mikroorganizme (Theilade, 1986). Tu činjenicu su potvrdile mnogobrojne epidemiološke studije. Tako su neka epidemiološka istraživanja pokazala da se broj obolelih od parodontopatija povećava sa godinama starosti i da su u onih osoba u kojih ima više plaka na zubima više zastupljene parodontopatije. Međutim, neka druga zapažanja su opovrgla takva mišljenja. Ustanovljeno je da u nekim osobama i pored obilne akumulacije dentalnog plaka nisu konstatovana obimnija oštećenja parodonticijuma, kao i da u nekim osobama koje boluju od gingivita nije došlo do progresije inflamacije u dublja parodontalna tkiva. Istovremeno je konstatovano da se u nekim mlađim osobama u kojih su prisutne male količine dentalnog plaka na zubima, javljaju izrazito teške forme

parodontopatije. Tako je uočeno da se u iste osobe oštećenja parodontcijuma mogu javiti samo u predelu pojedinih zuba (Listgarten 1976; Westergaard i sar., 1978).

Iz ovog proizilazi da svaki plak ne ispoljava podjednako svoje patogeno dejstvo na parodontcijum. To ukazuje na specifičnost delovanja dentalnog plaka.

Po nespecifičnoj teoriji delovanja plaka, oboljenja parodontcijuma nastaju pod uticajem štetnih toksina iz dentalnog plaka. Mnoge bakterijske vrste iz subgingivalnog dentalnog plaka oslobađaju lipopolisaharid-LPS (Offenbacher & Salvi 1999), proteolitičke enzime, niz eteričnih masnih kiselina (butiratnu, propionatnu, izobutiratnu) (Grenier, 1992; Niederman i sar., 1996; Shah & Gharbia, 1995), kao i sulfide – vodonik sulfid i metil-merkaptan i dr. (Persson i sar., 1989; Persson i sar., 1990). Ukoliko se radi o malim količinama dentalnog plaka tada imunskim odgovorom domaćina one mogu biti savladane. Ukoliko se pak radi o velikim količinama dentalnog plaka tada ogromne količine štetnih agenasa ne mogu biti savladane imunskim reakcijama. Po ovoj teoriji bitan je kvantitet dentalnog plaka.

Povoljni terapijski rezultati koji se dobijaju nakon uspostavljanja dobre oralne higijene i uklanjanja drugih naslaga sa zuba u obolelih od parodontopatije govore u prilog ove teorije. Uopšte, većina terapijskih procedura koje se preduzimaju u obolelih od parodontopatije govori u prilog nespecifičnoj teoriji.

Specifična teorija plaka polazi od pretpostavke da nastanak, razvoj i težina patoloških procesa koji se razvijaju u parodontcijumu zavisi od prisustva različitih i specifičnih mikroorganizama dentalnog plaka i njihove sposobnosti da produkuju neke veoma agresivne agense (Loesche, 1979). Era bakteriološke specifičnosti dobila je zamah u momentu otkrića glavnog prouzrokovala juvenilne parodontopatije, odnosno izolovanjem bakterije *A. actinomycetemcomitans* (Genco i sar., 1986; Newman &

Socransky, 1977; Zambon i sar., 1988). Istovremeno je utvrđeno da je tok parodontopatije cikličan i da se periodi pogoršanja i aktiviranja inflamatornih procesa smenjuju sa periodima mirovanja (remisije). U fazama aktiviranja (egzacerbacije) inflamatornih procesa u parodontocijumu dolazi do znatnog povećanja broja Gram negativnih bakterija, dok u fazama remisije bolesti u dentalnom plaku dominiraju Gram pozitivne bakterije.

Obimna istraživanja su takođe pokazala da se parodontopatije ne razvijaju sinhrono i istovremeno u parodontocijumu svih zuba, niti na svim površinama jednog zuba.

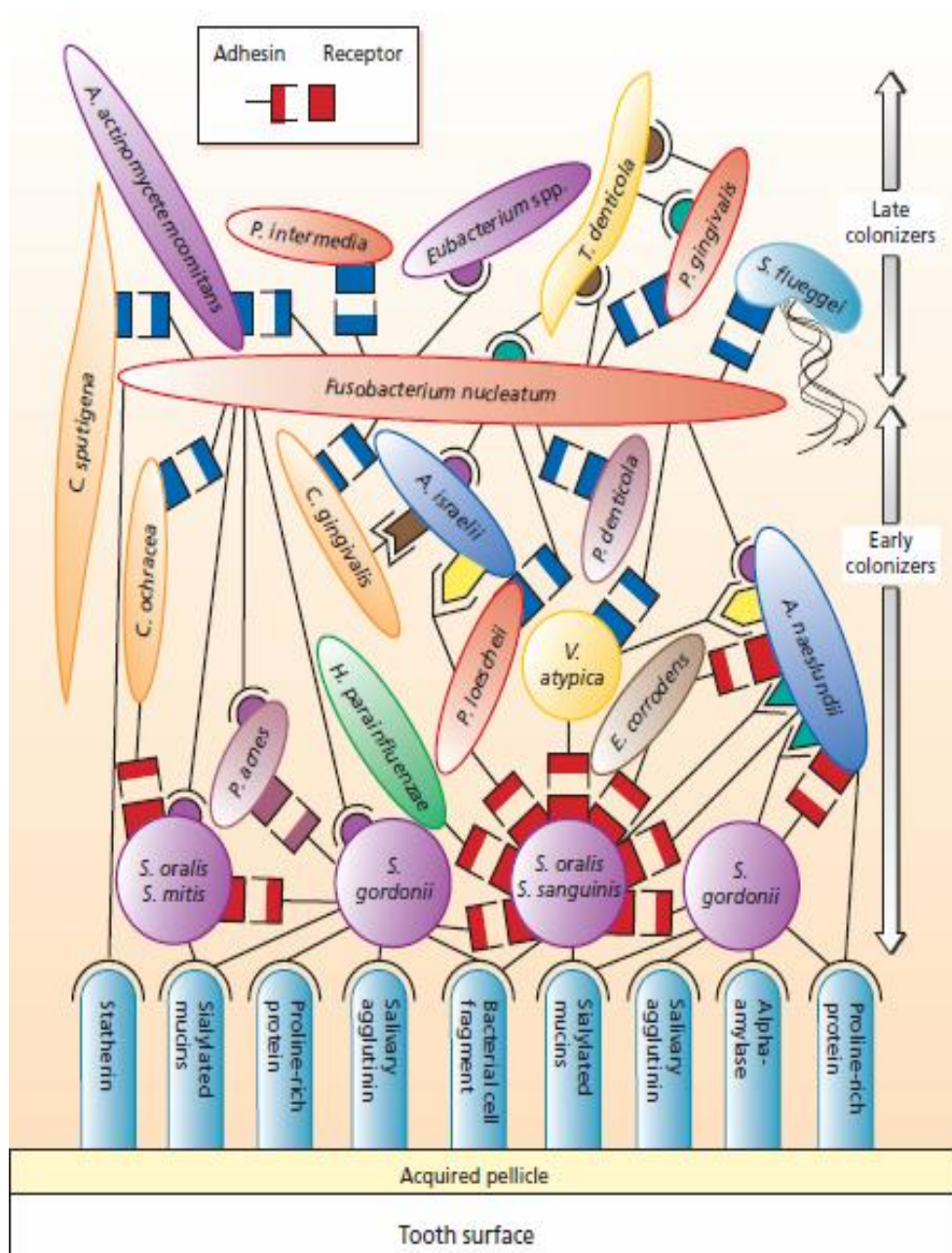
Dokazano je da na mestima gde je zdrav parodontocijum ili gde je inflamatorni proces u remisiji postoji razlika u mikrobiološkom sastavu plaka, kao i u ravnoteži koja je uspostavljena između tih mikroorganizama i gingive domaćina u odnosu na mesta gde se patološki proces razvija ili je došlo do njegove egzacerbacije.

Iz toga proizilazi da pored mikroorganizama dentalnog plaka postoje i drugi faktori koji mogu da utiču na promenu kvalitativnog i kvantitativnog sastava dentalnog plaka i koji utiču na smanjenje imunskog odgovora domaćina.

1.1.2.2. Formiranje i mikrobiološki sastav dentalnog plaka

Proces formiranja dentalnog plaka je predstavljen takođe utvrđenim i strogo definisanim redosledom kolonizacije mikroorganizama u kojem se takođe određene mikrobne vrste vezuju za površinu zuba u funkciji vremena (Slika 1.5), i ovaj proces je identičan za svakog pojedinca (Marsh, 2006). Međutim, sazrevanje dentalnog plaka je

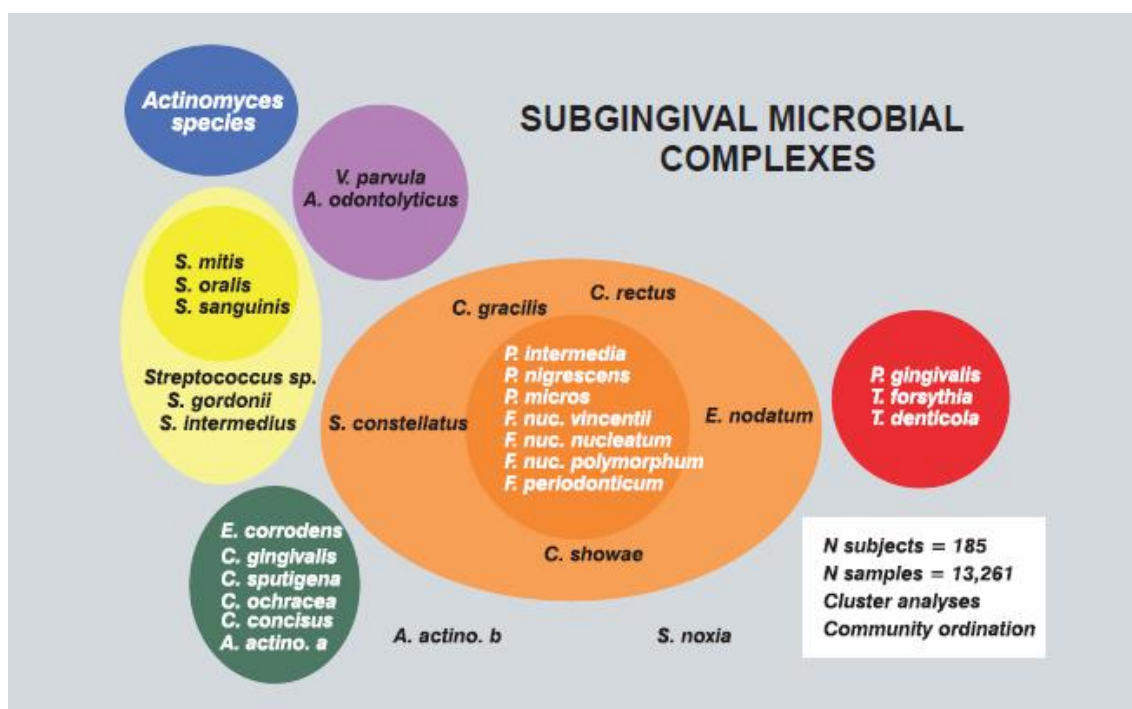
individualno specifično, tako da se i sastav dentalnog plaka razlikuje od osobe do osobe (Kolenbrander i sar., 2006). Prema lokalizaciji u odnosu na ivicu gingive, razlikujemo supragingivalni i subgingivalni dentalni plak koji se značajno razlikuju po svom mikrobnom sastavu.



Slika 1.5. Dinamika kolonizacije površine zuba različitim mikrobnim vrstama

Supragingivalni dentalni plak kolonizuju uglavnom mikroorganizmi usne duplje i pljuva ke. U njemu dominiraju Gram pozitivni mikroorganizmi.

Subgingivalni dentalni plak kolonizuju uglavnom Gram negativni mikroorganizmi. Subgingivalna regija (gingivalni sulkus, gingivalni i parodontalni džep) predstavlja zonu sa relativno stagnerajućim tokom fluida u koji se naseljavaju mikroorganizmi koji se ne mogu odmah adherirati za površinu zuba. Zbog toga se u ovoj regiji nalazi veliki broj neadheriranih anaerobnih i pokretnih mikroorganizama. U odnosu na osobine i faktore virulencije koje poseduju, Socransky i sar. (1998) su svrstali bakterije subgingivalnog dentalnog plaka u bakterijske komplekse (Slika 1.6). Veliki broj istraživanja je pokazao da bakterije crvenog i narandžastog kompleksa dominiraju u subgingivalnom dentalnom plaku obolelih od parodontopatija.



Slika 1.6. Asocijacije subgingivalnih mikrobnih vrsta svrstanih u bakterijske komplekse na osnovu njihovih osobina, dinamike kolonizacije i faktora virulencije koje poseduju (Socransky i sar., 1998).

Obzirom da je oksidoredukциони potencijal subgingivalne regije nizak (posebno parodontalnog džepa) u ovoj regiji opstaju i razmnožavaju se oni mikroorganizmi kojima odgovaraju ovakvi uslovi (niska koncentracija kiseonika). To su fakultativni i striktni anaerobni mikroorganizmi. Gingivalni eksudat sadrži veliki broj materija koje služe mikroorganizmima subgingivalnog plaka za ishranu. Zbog toga gingivalni eksudat, koji se oslobađa iz inflamirane gingive, može bitno da utiče na floru subgingivalnog plaka.

Dentalni plak se postepeno uvećava i sazreva razmnožavanjem mikroorganizama u njemu, kolonizacijom novih bakterija i nagomilavanjem njihovih produkata.

Etiologija parodontopatije je polimikrobna po svojoj prirodi. Opisano je više od 700 različitih bakterijskih vrsta koje naseljavaju usnu duplju, od kojih više od polovine nije moguće kultivisati (Paster i sar., 2006). Bilo kakva promena parodontalnog statusa u smislu poboljšanja ili pogoršanja u tesnoj je vezi sa promenom bakterijskog sastava subgingivalnog dentalnog plaka. Istraživanja su pokazala da disbioza u usnoj duplji (predominacija agresivnih parodontopatogena) može da vodi pojavi parodontopatije. Disbiozu karakteriše smena primarno dominantnih Gram-pozitivnih aeroba Gram-negativnim anaerobima (tzv. ekološka plak hipoteza; Marsh, 1991). Iz tog razloga je sasvim opravdano reći da se mikrobiološka testiranja mogu koristiti u cilju postavljanja dijagnoze kao i da bi se optimizovala terapija, naročito u slučajevima kada je indikovana antibiotska terapija (agresivne parodontopatije, parodontopatije rezistentne na terapiju). Primena antibiotika je opravdana kao pomoćna terapija u slučajevima kada pacijent nakon sprovedene kauzalne faze terapije ne pokazuje klinički manifestno poboljšanje parodontalnog statusa. Antibiotici se u cilju lečenja obolelog parodontacijuma mogu ordinirati lokalno ili sistemski.

Samo nekoliko slojeva elija pripojnog epitela deli subgingivalno lokalizovane bakterije od parenteralnog prostora doma ina, i omoguava njihovu intimnu komunikaciju. Da je oralna kolonizacija parodontopatogena kod naših predaka rezultirala brzim gubitkom zuba, ovi mikroorganizmi bi izgubili svoju ekološku nišu. Tako e, gubitak zuba koji imaju krucijalnu ulogu u žvakanju hrane bi ugrozilo preživljavanje doma ina. injenica da su parodontalne bakterije normalni stanovnici usne duplje kod osoba koje imaju zube govori u prilog tome da su i bakterije i doma in razvili toleranciju jedni prema drugima (Asikainen & Chen, 1999).

Nekoliko termina se koristi za klasifikaciju bakterija u odnosu na njihovu sposobnost da prouzrokuju oboljenje kao i za opisivanje njihove veze sa doma inom. Komensalni mikroorganizmi ili pripadnici normalne flore su one bakterije koje su skoro uvek prisutne u velikom broju, u ili na odre enom mestu i kompatibilne su sa doma inom. Ove bakterije imaju korist od doma ina, ali mu ne nanose štetu. Rosebury je predložio da se komensalizam zameni terminom "amfibioza", koji bi oznaavao itav spektar odnosa izme u simbioze i patogenosti (Rosebury, 1962). Amfibioza oznaava stabilno stanje, ali naglašava da se odnos izme u doma ina i bakterija može promeniti. Patogeni ili paraziti su egzogenog porekla i definišu se kao bakterije koje su sposobne da prouzrokuju oboljenje i nanesu štetu doma inu.

U medicinskoj literaturi konstantno prisustvo komensalnih mikroorganizama u ili na doma inu se naziva kolonizacijom, dok se uspešna perzistencija i razmnožavanje patogena na ili u doma inu naziva infekcijom. Infekcija ne mora uvek da vodi ka oboljenju (nosilac i latencija), a i kolonizacija bi mogla da rezultira pojavom bolesti (oportunističke infektivne bolesti ili endogene infekcije). Dakle, prisustvo odre enih patogenih parodontalnih mikroorganizama ne zna i i infekciju, odnosno

parodontopatogen je potreban ali ne i dovoljan za nastanak i progresiju parodontalnih oboljenja.

Iako je opšteprihvaten stav da parodontopatije nastaju kao rezultat polimikrobne infekcije, 1996. je postignut konsenzus da su *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* i *Bacteroides forsythus* (sada *Tannerella forsythia*) sigurni parodontopatogeni.

Inter-individualna varijacija polimikrobnih oboljenja predstavlja veliki izazov za kliničare u smislu njihovog lečenja. Da bi efikasno tretirali ova oboljenja neophodno je razumevanje i poznavanje normalne mikroflore koje bi uspostavljanje bilo glavni cilj antimikrobne terapije (Assisi sar., 2005). Izazov leži u određivanju šta je normalno za svakog pojedinca. Istraživanja su pokazala da različite bakterije mogu biti odgovorne za pojavu oboljenja kod različitih ljudi, što ukazuje na činjenicu da je progresija oboljenja individualno specifična.

1.1.2.3. Akcesorni etiološki faktori parodontopatije

Osim dentalnog plaka koji je glavni etiološki faktor u nastanku parodontopatije postoje i akcesorni etiološki faktori. Akcesorni etiološki faktori u nastanku parodontopatije mogu biti lokalni i opšti.

Lokalni akcesorni etiološki faktori olakšavaju i ubrzavaju formiranje, retenciju i akumulaciju dentalnog plaka a istovremeno otežavaju ili onemogućavaju njegovo uklanjanje u toku održavanja oralne higijene. Na taj način ovi faktori deluju indirektno. U ove faktore ubrajaju se: druge naslage na zubima, jatrogeni faktori, impakcija hrane,

loše navike, morfološka i anatomska odstupanja mekih i koštanog tkiva i ostali lokalni faktori.

Pored navedenih etioloških faktora jedan od značajnih lokalnih akcesornih etioloških faktora je i traumatska okluzija koja ubrzava razvoj i povećava obim patoloških promena u parodontijumu u toku parodontopatije.

Opšti akcesorni etiološki faktori utiču na smanjenje otpornosti parodontijuma prema delovanju mikroorganizama dentalnog plaka. Na taj način olakšavaju delovanje produkata dentalnog plaka i pojavu inflamacije u parodontijumu, utiču i istovremeno i na tok parodontopatije. U opšte akcesorne etiološke faktore ubrajaju se: nutritivni faktori, endokrine bolesti, krvne bolesti, imunološki poremećaji i drugi opšti faktori.

U etiopatogenezi parodontopatija od značaja je ispoljavanje fenomena sinergizma delovanja glavnog i akcesornih etioloških faktora. Tako na parodontijum mogu da deluju mikroorganizmi zajedno sa lokalnim i opštim akcesornim faktorima. To udruženo delovanje mikroorganizama i nekih lokalnih faktora (npr. jatrogeni faktori i morfološka odstupanja u razvoju alveolarne kosti) i opštih faktora (imunološki poremećaji, npr. AIDS) uslovljava brzi razvoj bolesti uz pojavu obimnih i teških destrukcija u parodontijumu sa lošom prognozom.

Upravo ovaj sinergizam delovanja brojnih različitih faktora kreira jedinstveni i za domaćina individualno specifičan tzv. biološki fenotip oboljenja, koji se odlikuje nizom kaskadnih celularnih i molekularnih patogenetskih mehanizama i koji je tokom vremena rezultirao određenim kliničkim fenotipom, odnosno kliničkom slikom bolesti (Casanova & Abel, 2004).

1.2. Generalne karakteristike bakterije *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

Aggregatibacter actinomycetemcomitans (*A. actinomycetemcomitans*) je Gram negativni, nepokretan, saharoliti an kokobacil, koji se opisuje kao fakultativno anaerobni, mikroaerofilni i kapnofilni mikroorganizam.

Po etkom '90-ih godina prošlog veka po ela je primena molekularnih metoda baziranih na analizi bakterijske DNK u cilju identifikacije bakterije *A. actinomycetemcomitans*. Metoda lan ane amplifikacije DNK (PCR metoda) se koristi u cilju umnožavanja gena za ribozomalne RNK (16S i 23S rRNK) ili drugih tipova gena (Albandar i sar., 1996; Flemmig i sar., 1995; Gonharoff i sar., 1993; Griffen i sar., 1992; Poulsen i sar., 2003; Tønjum & Haas, 1993). Tako e, ove metode se danas široko koriste i u cilju karakterizacije bakterije *A. actinomycetemcomitans*.

A. actinomycetemcomitans najbolje raste na temperaturi od 37°C u prisustvu 5% CO₂ (Ohta i sar., 1989), dok se optimalni pH kre e u rasponu 7,0 i 8,0 (Sreenivasan i sar., 1993). U te noj podlozi organizam formira izolovane, translucetne granule koje adheriraju na zidove ili dno epruvete, a medijum ostaje ist. Na krvnom agaru i selektivnoj TSBV podlozi (Slots i sar., 1982) stvara male, konveksne, translucetne, cirkularne kolonije, dijametra oko 1mm nakon 2-3 dana. Kolonije imaju diskretno nepravilne ivice i vrlo su vrsto pri vrš ene za površinu agara. Hrapave su površine i kada se posmatraju pod svetlosnim mikroskopom uo ava se središte u obliku zvezde ili izgled ukrštenih cigareta. Nakon presejavanja subkulture, zvezdolika struktura obi no iz ezne, a kolonije postanu neprovidne, glatke površine i ne urastaju u agar. Ova transformacija iz hrapavog u gladak fenotip dovodi se u vezu sa gubitkom fimbrija (Inouye i sar., 1990; Rosan i sar., 1988). Promena fenotipa je demonstrirana posle 7

dana u te noj kulturi (Haase i sar., 2006). Istraživanja su pokazala da hrapave kolonije koje poseduju fimbrije bolje adheriraju za površinu hidroksiapatita, kao i za hidroksiapatit obložen pluva kom nego glatke kolonije (Rosan i sar., 1988).

A. actinomycetemcomitans je član roda *Actinobacillus* koji pripada familiji *Pasteurellaceae*. Prvo ime ovoj vrsti bilo je *Bacterium actinomycetem comitans*, a dao je Klinger 1912. godine (Klinger, 1912). Nakon toga, ime se menjalo nekoliko puta; 1929. godine u *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (Topley & Wilson, 1929) i 1985. godine u *Haemophilus actinomycetemcomitans* (Potts i sar., 1985). Od 2006. godine *Actinobacillus actinomycetemcomitans* je svrstan u novi rod familije *Pasteurellaceae*, zajedno sa *Haemophilus aphrophylus*-om i *Haemophilus segnis*-om, i nazvan *Aggregatibacter*. Danas se ove tri vrste zovu: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Aggregatibacter aphrophilus* i *Aggregatibacter segnis* (Nørskov-Lauritsen & Kilian, 2006).

Prirodno stanište *A. actinomycetemcomitans* je usna duplja oveka i drugih sisara (Asikainen i sar., 1991; Asikainen & Chen, 1999; Beem i sar., 1991; Eke i sar., 1993). U usnoj duplji oveka *A. actinomycetemcomitans* je izolovan iz supra- i subgingivalnog dentalnog plaka, pljuva ke, a dokazano je njegovo prisustvo i na bukalnoj sluzokoži, gingivi, jeziku (dorzalnoj i lateralnim površinama), tvrdom nepcu i tonzilama (Asikainen i sar., 1991; Muller i sar., 2001).

To je prva bakterijska vrsta prepoznata kao mogu i parodontopatogen zbog ve e prevalence i prisustva u ve em broju u lezijama kod lokalizovane agresivne parodontopatije. *A. actinomycetemcomitans* je tako e prisutan i kod osoba obolelih od hroni ne parodontopatije, gde je njegova uloga manje jasna.

Ovaj mikroorganizam poseduje brojne faktore virulencije me u kojima su leukotoksin, citoletalni toksin istezanja, bakteriocini, adhezini i lipopolisaharid.

1.2.1. Serotipovi bakterije *A. actinomycetemcomitans*

Izolati *A. actinomycetemcomitans* su klasifikovani u šest serotipova (a-f) (Kaplan i sar., 2001). Serološku specifičnost određuje prisustvo O-polisaharida, molekula velike molekularne mase, koji pored lipida ulaze u sastav lipopolisaharida-LPS (SPAs-serotip specifični polisaharidni antigen) (Page i sar., 1991). O-polisaharidi serotipova b, c, e i f su produkti homologih klastera gena koji se sastoje izmeđ u 10 (serotip e) i 16 (serotip b) gena, sa visoko konzerviranim grupama gena na proksimalnim i distalnim krajevima i jedinstvenim centralnim klasterima gena sa niskim GC sadržajem (Kaplan i sar., 2001). Klasteri gena koji kodiraju sintezu serotipova a i d su strukturalno nepovezani sa preostala četiri (Nakano i sar., 2000; Suzuki i sar., 2000).

Klaster gena za serotip d je 13,9-kb fragment lokalizovan samo 2 kb nizvodno od b, c, e i f klastera gena. Serotip a je kodiran 12,9-kb fragmentom hromozomalne DNK. Serotip a specifični antigen se sastoji isključivo od 6-deoksiheksoze, 6-deoksi-D-talose (Shibuya i sar., 1991), koja je jedinstvena međ u bakterijama. Suzuki i sar. (2001) su koristili insercionu inaktivaciju gena odgovornih za sintezu serotipa a, identifikovali gene koji su odgovorni za sintezu 6-deoksi-D-talose.

1.2.2. Klonalni diverzitet bakterije *A. actinomycetemcomitans* i rasni tropizam

Bakterije mogu da izmene genom tako što inkorporiraju DNK okolnih, susednih elija (Ochman i sar., 2000). Geneti ka struktura bakterija se može klasifikovati kao klonalna, panmiktika ili epidemijna (Maynard i sar., 1993). Retke rekombinacije vode ka klonalnoj strukturi i u vrstoj su vezi sa neravnotežom (oboljenjem), dok este rekombinacije rezultiraju panmiktiknojom (vrlo izmešanoj) geneti koj strukturi i relativno maloj vezi me u alelima u okviru genoma. U epidemijskim populacionim strukturama rekombinacija se pojavljuje vrlo esto, a genomi su vrlo izmešani i u maloj su, ili nikakvoj vezi sa neravnotežom (Maynard i sar., 1993).

Populacione geneti ke studije su pokazale da *A. actinomycetemcomitans* ima klonalnu geneti ku strukturu i da se sastoji iz geneti ki razli itih subpopulacija koji koreliraju sa poznatim serotipovima (Haubeck i sar., 1995; Kaplan i sar., 2002; Poulsen i sar., 1994). Etni ki razli ite populacije imaju razli itu oralnu mikrofloru, ali se i sklonost ka nastanku parodontopatije razlikuje. Naime, smatra se da lokalizovana agresivna parodontopatija (LAP) ustvari predstavlja dva razli ita oboljenja. U severnoj Evropi, kod pripadnika bele rase, LAP se dovodi u vezu sa oligoklonalnom populacijom bakterija, od kojih nijedna nema specifi nu deleciju 530-bp na promotoru gena za leukotoksin. Najjednostavnija interpretacija ove pojave je da se u okviru severnoevropske populacije *A. actinomycetemcomitans* ponaša kao oportunisti ki patogen. Mnogo detaljnije populacione studije na pripadnicima crne rase afri kog porekla otkrile su vezu izme u LAP i odre enog izolata serotipa b koji poseduje deleciju 530-bp na promotoru gena za leukotoksin. Ova delecija rezultira u signifikantno ve oj produkciju leukotoksina (Brogan i sar., 1994). Ovi izolati pripadaju

tzv. JP2 klonu, a oboljenje izazvano ovim klonom se smatra endemskim u Maroku. Studije su pokazale da JP2 klon predilekciono kolonizuje mla u populaciju, a šablon kolonizacije nije do kraja razjašnjen (Haubeck i sar., 2001, 2002). Prime eno je da se kolonizacija JP2 klonom odigrava u ranom uzrastu, dok se ne-JP2 izolati kolonizuju kasnije (Guthmiller i sar., 2001; Haraszthy i sar., 2000A). Leukotoksi na aktivnost izolata je bila 4 puta ve a kod dece uzrasta 6-12 godina u odnosu na izolate na ene kod adolescenata (13-25 godina) (Tsai & Taichman, 1986). Promena toksinosti se može objasniti smenom genotipova, me utim ova pojava je još uvek neistražena i nejasna. Simultano prisustvo JP2 i ne-JP2 klonova je vrlo esta pojava kod adolescenata u Maroku, mada je u toku opservacionog perioda u trajanju od 2 godine došlo do gubitka jednog klona (Haubek i sar., 2009). Ova pojava bi se mogla objasniti kompetitivnim isklju ivanjem me usobno razli itih genotipova *A. actinomycetemcomitans*.

Studije su pokazale da je ve ina nosioca bakterije *A. actinomycetemcomitans* kolonizovana samo jednim genotipom ove bakterije. Samo oko 25% populacije nosi više od jednog klonalnih tipova (Di Rienzo i sar., 1990; Petit i sar., 1993A; van der Reijden i sar., 2008; van Winkelhoff & Boutaga, 2005).

1.2.3. Putevi transmisije bakterije A. actinomycetemcomitans

Veliki broj studija su pokazale da članove jedne porodice kolonizuje isti klonalni tip bakterije *A. actinomycetemcomitans* (Dogan i sar., 2008; van Winkelhoff & Boutaga, 2005). Intrafamilijarna, tzv. vertikalna transmisija JP2 klona je tako e dokazana (Bueno i sar., 1998; Haubek i sar., 1997A, 2007; Haubek i Westergaard, 2004). Još uvek je nepoznato do koje mere bliski kontakt, odnosno deljenje hrane i pi a me u

decom ili tinejdžerima može da doprinese transmisiji i diseminaciji bakterije *A. actinomycetemcomitans*. Zajednička upotreba četkice za zube nije se mogla dovesti u vezu sa prenosom bakterije *A. actinomycetemcomitans* među adolescentima u Maroku (Haubek i sar., 2005). Međutim, deljenje hrane i pića koje je bilo praćeno razmenom salive značajno je povećalo rizik, odnosno bilo je u vezi sa prisustvom *A. actinomycetemcomitans* i velikim vrednostima gubitka pripojnog epitela (Haubek i sar., 2005).

Kolonizacija usne duplje se odigrava uglavnom u ranom detinjstvu, dok se kolonizacija novih bakterijskih vrsta/klonalnih tipova kasnije tokom života ne odigrava lako. Na primer, samo nekoliko tinejdžera u Maroku je bilo inficirano *de novo* JP2 klonom tokom dvogodišnjeg perioda praćenja (Haubek i sar., 2009). Međutim, nije sigurno da li se ova kolonizacija dogodila u ranom detinjstvu i da li je prisustvo bakterije *A. actinomycetemcomitans* u toku opservacionog perioda bilo ispod detekcionog limita.

Mogućnost intraoralne transmisije bakterije *A. actinomycetemcomitans* kod odraslih pomoću parodontalne sonde iz kolonizovanog u prethodno nekolonizovan parodontalni prostor je bila istraživana. *A. actinomycetemcomitans* inokulisan u gingivalni sulkus nije permanentno kolonizovao ovo mesto, već je bio eliminisan u toku 3 nedelje (Christersson i sar., 1985). Dakle, šanse da se uspostavljena oralna mikroflora promeni kolonizacijom novih, "stranih" mikroorganizmima je minimalna.

Da bi uopšte mogli da razumemo šablone kolonizacije i puteve prenošenja, bilo bi korisno razmotriti moguća mesta u usnoj duplji koja bi *A. actinomycetemcomitans* mogao da naseli i da preživi. Istraživanja su pokazala da bi jezik mogao da bude potencijalni rezervoar kod vrlo male dece (Tanner i sar., 2002), kao i obrazna sluzokoža

i tonzile (Haubek i sar., 2006). Sposobnost invazije epitelnih elija bukalne sluzokože omogu ava ovom fakultativno anaerobnom mikroorganizmu da opstane u nepovoljim uslovima. Eksfolijacija epitelnih elija obezbe uje zašti en put transmisije bakterija i intraoralno i me u doma inima. Me utim, neophodna su dalja istraživanja u cilju utvr ivanja potencijalnih mehanizama kolonizacije i transmisije bakterija (Rudney i sar., 2001, 2005).

1.2.4. Genom bakterije *A. actinomycetemcomitans*

Roe i sar. su 2002. god. sekvencirali genom bakterije *A. actinomycetemcomitans* ATCC 700685 (HK1651, JP2 klon) na Univerzitetu u Oklahomi (Najar, 2002). Genom se sastoji iz 2 024 943 bp i aktuelna sekvenca u ovom stadijumu reprezentuje 99.8% genoma. Hromozom je predstavljen jednim cirkularnim molekulom i po veli ini je sli an hromozomu *H. influenzae* Rd [1,830,137 bp], za koga se smatra da je najbliskiji ro ak bakteriji *A. actinomycetemcomitans*.

Analizom genoma bakterije *A. actinomycetemcomitans* utvr eno je 1877 ORF-ova (engl. Open Reading Frame) od kojih 32% (600 ORF-ova) ima nepoznatu funkciju i nazivaju se neidentifikovani ORF-ovi (uORFs). Dvadeset procenata ovih uORFs su jedinstveni za *A. actinomycetemcomitans*, dok su preostalih 80% homologi ORFs drugih organizama. Od ukupnog broja ORFs, 38 (2%) ima homologiju sa poznatim faktorima virulencije drugih organizama, pa se oni, shodno tome, smatraju faktorima virulencije ovog organizma.

Sadržaj GC u genomu je nizak i iznosi prose no 48%. Regioni kao što je *tad* operon imaju razli it sadržaj GC (Kachlany i sar., 2000), što se obi no uzima kao dokaz

skorašnjeg preuzimanja konkretnog segmenta genoma od drugog organizma mehanizmom horizontalnog transfera.

Sekvenciranjem DNK ustanovljeno je da je 63% genoma *A. actinomycetemcomitans* homologo sa *H. influenzae* (Ward i sar., 2001), pa bi se reklasifikacija *A. actinomycetemcomitans* u rod *Haemophilus* smatrala vrlo opravdanom.

1.2.5. Imunomodulatorni efekti bakterije *A. actinomycetemcomitans*

A. actinomycetemcomitans sekretuje veliki broj proteina (Kirby i sar., 1995) i proteomska studija je otkrila da se kompozicija ovih sekretovanih proteina modifikuje okruženjem kulture (Fletcher i sar., 2001). Studije su pokazale da *A. actinomycetemcomitans* može da aktivira i T i B elije kod osoba obolelih od LAP-e. Sekretovani produkti (Nishihara i sar., 1987), kao i komponente elijskog zida, uključujući i LPS (Woolverton i sar., 1994), imaju mitigeno dejstvo na B limfocite, što je potvrdio visok titar antitela na *A. actinomycetemcomitans* kod pacijenata obolelih od LAP-e (Lamster i sar., 1998). Ova antitela imaju sposobnost opsonizacije (Wilson & Bronson, 1997), promovišu fagocitozu i destrukciju neutrofila (Wilson i sar., 1995), blokiraju aktivnost leukotoksina (Tsai i sar., 1981), pokazuju antiproliferativnu aktivnost (White i sar., 1995) i doprinose koštanoj resorpciji (Meghji i sar., 1993).

1.2.5.1. Citokini indukovani bakterijom *A. actinomycetemcomitans*

Istraživanja koja su rađena u cilju razotkrivanja imunomodulatorne aktivnosti bakterije *A. actinomycetemcomitans* došla su do rezultata koji ukazuju na vrlo neobičan odgovor domaćina na prisustvo ove bakterije. Izlaganje humanih fibroblasta ovoj bakteriji indukovalo je sintezu IL-6 i IL-8, ali ne i IL-1 (Dongari-Bagtzoglou & Ebersole, 1996; Uchida i sar., 2001). Slično tome, i humane ćelije epitela gingive nisu otpuštale IL-1 kao odgovor na prisustvo intaktne bakterije (Uchida i sar., 2001). Studije su pokazale da intaktna *A. actinomycetemcomitans* stimuliše humane mononuklearne ćelije da proizvode hemokine MIP-1 (macrophage inflammatory protein) i RANTES (regulated on activation, normal T cell expressed and secretion) (Jiang & Graves, 1999).

Komparativna analiza kapaciteta LPS-a, lipid A-udruženih proteina i proteina koje sekreduje *A. actinomycetemcomitans* da stimulišu sintezu citokina od strane humanih monocita, pokazala je da je LPS najmanje potentan, dok su se sekretovani proteini pokazali kao vrlo moćni i efikasni (Reddi i sar., 1995; Wilson i sar., 1996). Analizom sekretovanih proteina identifikovan je velik broj induktora citokina, uključujući i protein ćeljskog zida- haperonin 60 (Woolverton i sar., 1994). Ovaj peptid težine 2kDa pokazao se kao vrlo potentan induktor koštane resorpcije (Kirby i sar., 1995); direktno stimuliše gingivalne fibroblaste da sintetišu IL-6, ali bez pokretanja transkripcije za proinflamatorne citokine IL-1 i TNF- α (Reddi i sar., 1996).

1.2.6. *A. actinomycetemcomitans* i imunosupresija

-inhibicija elijskog ciklusa-

Poznato je da bakterije mogu aktivno da suprimiraju uroeni i steeni imunitet (Henderson, 2000; Henderson & Oyston, 2003). Dokazano je da bakterijski toksini mogu da inhibiraju imuni odgovor (Wilson, 2002), a *A. actinomycetemcomitans* proizvodi dva takva imunomodulatorna toksina-leukotoksin i citoletalni toksin istezanja.

1.2.6.1. Leukotoksin

Leukotoksin (*LtxA*) je prvi otkriven i do sada najviše izuavan toksin kojeg proizvodi *A. actinomycetemcomitans* (Kolodrubetz i sar., 1989; Lally i sar., 1989; Narayan i sar., 2002). Smatra se glavnim faktorom virulencije ovog parodontopatogena.

Sposobnost ekstrakta izolovanog iz bakterije *A. actinomycetemcomitans* da prouzrokuje smrt leukocita prvi put je opisana pre 30 godina (Baehni i sar., 1979, 1981). Ubrzo nakon ove opservacije iz bakterije je izolovan toksin (Tsai i sar., 1979, 1984). DNK sekvenca gena za leukotoksin je objavljena u isto vreme od strane dve nezavisne grupe istraživača (Kolodrubetz i sar., 1989, Lally i sar., 1989). Ovaj protein, težine približno 113 kDa, prema amino-kiselinskoj sekvenci, deli približno 51% identiteta sa alfa-hemolizinom *E. coli* i oko 43% sa leukotoksinom *Mannheimia haemolyticae*.

Leukotoksin je član RTX familije toksina (repeats in toxin). Ova grupa toksina, formiraju i kanale na elijskoj membrani, dovodi do smrti elije osmotskom lizom (visoke doze) ili indukcijom apoptoze (niže doze, verovatno reprezentativnije u

fiziološkim uslovima) (Lally i sar. 1999; Korostoff i sar., 1998, 2000). RTX toksini se sastoje iz određene sekvence aminokiselina koja se ponavlja više od 40 puta (Czuprynski & Welch, 1995).

Leukotoksin se preko α -2-integrin receptora LFA-1 (Leukocyte Function-associated Antigen-1) (Lally i sar., 1997) vezuje za humane α -elije limfoidne i mieloidne loze i dovodi do njihove smrti (Lally i sar., 1999). LFA-1 je α -elijski receptor za LtxA koga ispoljavaju samo hematopoetske α -elije. LFA-1 je heterodimer sačinjen od dva proteina CD11 i CD18, koji se nalazi na površini svih humanih α -elija bele krvne loze. Iako su oba molekula neophodna da bi LtxA stupio u interakciju sa α -elijom, pokazalo se da CD18 daje specifičnost za ovaj toksin bakterije *A. actinomycetemcomitans* (Dileepan i sar., 2007).

Ltx operon formiraju četiri gena: *ltxA* je strukturalni gen, a preostala tri (*ltxB*, *ltxC* i *ltxD*) su neophodni za aktivaciju i transport toksina. Svi izolati *A. actinomycetemcomitans* poseduju *ltx* operon, ali postoje razlike u regionu promotora koje rezultiraju različitom ekspresijom leukotoksina me u izolatima. Faktori sredine takođe regulišu produkciju leukotoksina. Visok nivo produkcije toksina se odigrava tokom aktivne faze rasta, i opada u toku stacionarne faze ili u aerobnim uslovima (Spitznagel i sar., 1995). Visoka koncentracija fruktoze inhibira produkciju toksina (Mizoguchi i sar., 1997). Mogućnost da nivo šećera u usnoj duplji može da kontroliše ekspresiju leukotoksina je još uvek neistražena.

Veruje se da je leukotoksin kojeg proizvodi *A. actinomycetemcomitans* jedinstven u grupi RTX toksina, jer je utvrđeno da pored toga što biva sekretovan, leukotoksin stupa u vezu sa komponentama α -elijske membrane (Berthold i sar., 1992). Ova diskrepanca je nedavno razjašnjena nalazom koji objašnjava ključnu razliku između

neadherentnih (glatkih) i adherentnih (hrapavih) izolata ovog organizma. Neadherentni izolati, kao što su JP2 i Y4 oslobađaju leukotoksin, dok adherentne forme zadržavaju toksin na svojoj površini. Mutacije na *tad* operonu koje rezultiraju inhibicijom adhezije i dovode se u vezu sa oslobađanjem leukotoksina, ukazuju na to da toksin mora biti vezan za fimbrije (Kachlany i sar., 2000). Drugi, nedavno otkriven mehanizam oslobađanja leukotoksina je kroz membranske vezikule, koje ova bakterija oslobađa sa svoje spoljašnje membrane (Kato i sar., 2002).

Uprkos činjenici da su u laboratorijskim uslovima napravljeni mutanti *A. actinomycetemcomitans* koji nemaju sposobnost produkcije leukotoksina (Kolodrubetz i sar., 1996), ovi organizmi još uvek nisu testirani *in vivo*.

U zavisnosti od koncentracije toksina, LtxA ispoljava različite efekte na humane leukocite. Egzaktna koncentracija toksina lokalno u parodontalnim tkivima se ne zna, tako da su termini "niska" i "visoka" samo relativni. Studije *in vitro* su pokazale da niska koncentracija LtxA promoviše degranulaciju neutrofila, oslobađa kolagenolitičku proteinazu - matriksnu metaloproteinazu 8 (MMP 8) (Claesson i sar., 2002) i inhibira fagocitozu (Johansson i sar., 2000A, Johanson i sar., 2000B). Ovi efekti mogu biti rezultat povećanja koncentracije Ca^{2+} intracelularno, koje se dešava pod uticajem LtxA (Taichman i sar., 1991). Visoke koncentracije toksina u *in vitro* uslovima mogu da dovedu do lize ćelije (Karkelian i sar., 1998). LtxA izaziva degranulaciju lizozoma što ima za posledicu oštećenje tkiva domaćina i pokretanje inflamatornog odgovora.

Ako je leukotoksin ključni faktor virulencije, može se očekivati da domaćin pokrene odbrambene mehanizme. Dokazano je da sintetski proizveden histatin 5, peptid bogat histidinom sa antimikrobnom aktivnošću i pripada grupi salivarnih katjona,

inhibira sposobnost bakterije *A. actinomycetemcomitans* da leukotoksinom ubija neutrofile (Murukami i sar., 2002).

Leukotoksin je vrlo potentan induktor apoptoze leukocita (Korostoff i sar., 1998; Shenker i sar., 1994). Postoje eksperimentalni dokazi koji podržavaju hipotezu da LtxA direktno narušava funkciju mitohondrija i da na taj način izaziva apoptozu elije (Korostoff i sar., 2000).

Rezultati nekih istraživanja su pokazali da leukotoksin ispoljava i (Kimizuka i sar., 1996) hemolitičku aktivnost na krvnim agarima različitog porekla. Izolati JP2 klonova formiraju α -hemolitičke kolonije (Haubek i sar., 1997A), što ukazuje da bi hemolitička aktivnost mogla oslikavati visok kapacitet pojedinih izolata bakterije *A. actinomycetemcomitans* da proizvode leukotoksin. Ovaj stav je poduprt rezultatima studije koja je potvrdila odsustvo hemolitičke aktivnosti mutanta *A. actinomycetemcomitans*, defektnim u produkciji leukotoksina (Balashova i sar., 2006A). Međutim, specifični receptori na eritrocitima za leukotoksin još uvek su nepoznati.

Smatra se da u etiologiji i patogenezi parodontopatije pored leukotoksina važnu ulogu igraju i drugi faktori virulencije ovog mikroorganizma. Brojne studije su se bavile izučavanjem veze između i međusobnog uticaja dva vrlo potentna egzotoksina: leukotoksina i citoletalnog toksina istezanja, ali je veliki broj mehanizama koji oslikavaju njihovu vezu još uvek nerazjašnjen (Di Rienzo & Mc Kay, 1994; Mayer i sar., 1999).

1.2.6.2. Citoletalni toksin istežanja (*cytolethal distending toxin*- CDT)

Citoletalni toksin istežanja (*cytolethal distending toxin* - CDT) je višekomponentni bakterijski holotoksin koji pogađa i u eukariotskih elija izazivaju i njihovo istežanje i prekid elijskog ciklusa (G2 fazu) (Lara-Tajero & Galan, 2002; Pickett & Whitehouse, 1999) što rezultira apoptozom elije. Mehanizam kojim toksin ulazi u eukariotsku eliju i vezuje se za jedro još uvek nije poznat. *A. actinomycescomitans* je jedina bakterija u usnoj duplji za koju se zna da produkuje CDT, ali intenzitet toksi ne aktivnosti varira me u izolatima ove bakterijske vrste.

cdtABC operon kodira produkciju CDT (Mayer i sar., 1999; Sugai i sar., 1998). Homologi geni su pronađeni i kod drugih patogenih bakterija: *E. coli*, *C. jejuni*, *Shigella dysenteriae*, *Helicobacter* spp. i *H. ducrey* (Mayer i sar., 1999; Pickett & Whitehouse, 1999). Većina izolata poseduje sva tri gena (*cdtA*, *cdtB* i *cdtC*), pri čemu *cdtA* gen pokazuje visok stepen polimorfizma za koji je dokazano da utiče na intenzitet toksičnosti. Polimorfizam jednog nukleotida na poziciji 281 (mutacija CAT-CGT) na *cdtB* genu je dokazan kod visoko toksičnih izolata *A. actinomycescomitans*.

CdtB koji ima sposobnost DNaze, jednom kada uđe u ciljnu eliju, dovodi do nespecifičnog sečenja DNA. Ovakvo oštećenje DNK rezultira prekidom elijskog ciklusa (De Rycke & Oswald, 2001). Uloga ostala dva proteina koji su produkti *cdt* operona je još uvek nepoznata. Mnogi istraživači se drže hipoteze da su sva tri Cdt proteina neophodna za aktivnost toksina (Lara-Tajero & Galan, 2002). Međutim, dokazi u slučaju CDT kojeg produkuje *A. actinomycescomitans* su kontradiktorni. Dokazana je aktivnost toksina indukovana samo prisustvom dva proteina-CdtB i CdtC (Akifusa i sar., 2001), ili čak samo jednim-CdtB (Shenker i sar., 1994, 1999, 2000).

Dalja istraživanja su pokazala da se toksičnost CdtB povećava 10 000 puta u prisustvu druga dva proteina, CdtA i CdtB (Shenker i sar., 2004, 2005). Ove razlike verovatno mogu objasniti prirodni cilj (T limfocita) koje su korišćene za ispitivanje citotoksičnog efekta CDT. Ovim studijama je pokazano da CdtB kojeg proizvodi *A. actinomycetemcomitans* ima sposobnost prekida ćelijskog ciklusa u G2 fazi, što rezultira apoptozom humanih T limfocita, i ukazuje na to da je ključna uloga ovog toksina disregulacija ćelularnog imuniteta.

Ne postoje pokušaji inaktivacije *cdt* operona, tako da njegova precizna uloga u virulenciji ove bakterije još uvek nije definisana. Trebalo bi uzeti u obzir da knockout *H. ducreyi*, koji ima najveći stepen homologije u *cdt* operonu (više od 90% sekvence), se nije pokazao manje virulentnim na modelu humanih volontera (Young i sar., 2001).

1.2.6.3. Ostali imunomodulatori/inhibitori ćelijskog ciklusa

Postoji širok niz nedovoljno okarakterisanih imunomodulatora/inhibitora ćelijskog ciklusa koje proizvodi *A. actinomycetemcomitans*. U ovu grupu ubrajamo i protein, od 14 kDa, koji je prepoznat i za koga se tvrdi da inhibira sintezu limfokina (IL-2, IL-4) (Kuritai & Ochiai, 1996). Protein Omp34, koji ulazi u sastav spoljašnje membrane bakterije *A. actinomycetemcomitans* (White i sar., 1998), funkcioniše kao Fc vezujućih proteina (Mintz & Fives-Taylor, 1994) i na taj način ispoljava svoje imunosupresivno dejstvo. Takođe je objavljeno da ovaj organizam proizvodi molekul male molekulske mase koji inhibira hemotaksu neutrofila.

Pored CDTa za koga je dokazano da blokira G2 fazu elijskog ciklusa, opisani su i *gapstatin*, peptid od 8 kDa, koji ispoljava ovaj efekat na elije B loze (White i sar., 1998; White i sar., 1995), i dva proteina od 60 kDa (Helgeland & Norby, 1993) i 80 kDa (Oguchi i sar., 1998) koji prekidaju elijski ciklus u istoj fazi.

1.2.7. Celularni mehanizmi odgovorni za koštanu destrukciju

Gubitak kosti je osobina koja definiše patologiju uzrokovanu bakterijom *A. actinomycetemcomitans*. Koštano tkivo karakteriše konstantna i dinamična remodelacija koja je, zapravo, posledica aktivnosti dve elijske populacije: osteoblasta i osteoklasta.

Osteoblasti su elije kuboidnog oblika mezenhimalnog porekla. Sekretorno najaktivnije elije koštanog tkiva, koje u najvećem procentu leže na površini kosti. Ove elije su primarno odgovorne za produkciju organskog matriksa kosti, koji se sastoji predominantno od kolagena tipa I i raznih drugih nekolagenih proteina kosti i plazma proteina.

Nakon maturacije, osteoblasti mogu da podlegnu apoptozi, ostanu zarobljeni u matriksu kao osteociti ili da ostanu na površini kosti.

Osteoklasti su velike, višejedarne elije, koje učestvuju u resorpciji kosti. Igraju centralnu ulogu u odgovoru aveolarne kosti na različite biološke regulatorne faktore i funkcionalne zahteve. Osteoklasti, kao elije, potiču od hematopoeznog tkiva i formiraju se fuzijom mononuklearnih elija koje pripadaju asihronim populacijama. Obilan broj lizozoma bogatih proteolitičkim fermentima kao i prisustvo resorptivnih vakuola u citoplazmi ukazuju na značaj ovih elija u resorptivnoj aktivnosti kosti.

Osteoklasti pokazuju ameboidne pokrete, a zahvaljuju i površini bogatoj mikrovilima sa dubokim, uskim me uprostorima, u vidu unduliraju e membrane, okrenute prema površini kosti, imaju na toj strani aktivnu proteoliti ku i resorptivnu sposobnost. Nagrizaju kost u vidu nepravilnih šupljina, tzv. Howship-ovih lakuna.

Ove dve vrste elija su u vrlo bliskoj interakciji. Osteoblasti poseduju receptore za razli ite ligande, uklju uju i i faktore rasta, citokine, eikozanoide i endokrine hormone, koji promovišu oba aspekta remodelacije koštanog tkiva (resorpciju i sintezu). Poznato je da mnogi faktori koji mogu da stimulišu ili inhibiraju resorpciju kosti stupaju u interakciju sa tri lana TNF familije: RANK (receptor aktivator nuklearnog faktora B), RANKL (ligand receptora aktivatora nuklearnog faktora B) i OPG (osteoprotežerin). RANKL je prona en na stromalnim elijama, osteoblastima, i aktiviranim T limfocitima. Vezuju i se za RANK na preosteoklastima, stimuliše njihovu maturaciju u osteoklaste. OPG može da inhibira osteoklastogenezu vezuju i se za RANKL, koji kao takav nema sposobnost vezivanja za RANK (Horwitz i sar., 2001).

Aktivirani T limfociti ekspimiraju RANKL i mogu da prouzrokuju destrukciju kosti *in vivo* (Kong i sar., 1999). Antigen-specifi ni klonovi T elija na *A. actinomycetemcomitans* promovišu resorpciju kosti *in vivo* (Kawai i sar., 2000), i ova aktivnost može biti blokirana osteoprotežerinom. Ovo ukazuje da se RANK/RANKL sistem aktivira od strane antigen-specifi nih T elija prepoznaju i *A. actinomycetemcomitans* kod pacijenata sa LAP (Teng, 2002; Teng i sar., 2000).

Još uvek neidentifikovani protein, produkt sekrecije bakterije *A. actinomycetemcomitans*, inhibira proliferaciju osteoblasta i sintezu koštanog kolagena (Meghji i sar., 1992; Meghji i sar., 1993; White i sar., 1995).

Mnoge komponente bakterije *A. actinomycetemcomitans* mogu direktno ili indirektno da imaju uticaja na koštano tkivo. Dokazano je da LPS (Iino & Hopps, 1984; Ishihara i sar., 1989), lipid A-udruženi protein (Reddi i sar., 1995), kapsularni polisaharidi (Nishihara i sar., 1995; Ueda i sar., 1995), sekretovani proteini (Wilson i sar., 1985) i haperonin 60 (Kirby i sar., 1995) mogu direktno da stimulišu resorpciju kosti ili da indukuju diferencijaciju osteoklasta *in vitro* (Wilson, 2002). Uloga LPSa je još uvek nejasna. LPS bakterije *A. actinomycetemcomitans* može da indukuje ekspresiju IL-1, kao i antagonist receptora IL-1ra na makrofagima, što u prvom slučaju onemogućava resorpciju kosti (Nishihara i sar., 1989), a u drugom pored inhibicije koštane resorpcije i formiranje osteoklasta (Nishihara i sar., 1994). Saopšteno je da LPS u koncentracijama izraženim u mikrogramima pokazuje aktivnost u resorpciji kosti (Ishihara i sar., 1989), dok je LPS *E. coli* aktivan i u vrlo niskim, nanogramskim koncentracijama (Reddi i sar., 1995). LPS bakterije *A. actinomycetemcomitans* ubrizgan u gingivu miša prouzrokuje resorpciju kosti (Nishida i sar., 2001).

Prava uloga leukotoksina i CDTa u resorpciji kosti je još uvek nepoznata. Obzirom da leukotoksin pogađa i elije mieloidne loze što rezultira apoptozom ovih elija, moglo bi se očekivati da napada i osteoklaste i njihove prekursore i da na taj način inhibira resorpciju koštanog tkiva. Preliminarne studije su pokazale da CDT stimuliše resorpciju kosti *in vitro*. Ovaj efekat toksina se ispoljava u slučaju prisustva sva tri CDT proteina (S. Meghji & B. Henderson, neobjavljeni rezultati).

Hipoteze o etiologiji i patogenezi parodontopatija su fokusirane na mikroorganizme dentalnog plaka i njihove produkte, imunski odgovor domaćina i faktore rizika domaćina (Meng i sar., 2007; Nishihara & Koseki, 2004; Socransky & Haffajee, 1994). Apsolutno je prihvaćen stav da je prisustvo dentalnog plaka od

fundamentalnog značaja za nastanak parodontalnih oboljenja, ali ta an mehanizam kojim bakterije indukuju i promovišu oštećenja potporog aparata zuba još uvek se ne zna.

1.2.8. Imunski odgovor doma ina

Parodontalna tkiva zbog svojih anatomskih karakteristika imaju jedinstvene uslove u smislu odbrane od štetnih toksa. Epitel gingive se pripaja na vrsto zubno tkivo – gle ili cement, koje je vrlo podložno kolonizaciji oralnim mikroorganizmima. U normalnim uslovima, parodontacijum uz pomoć udruženih mehanizama uro enog i ste enog imuniteta je u mogućnosti da kontroliše izazov od strane bakterija. Reakcije odbrane uro enog imuniteta su prave oslobađanje niza aktivnih molekula koji u kombinaciji sa aktiviranim fagocitima, uglavnom neutrofilima, predstavljaju esencijalne elemente u inflamatornom odgovoru gingive (Kinane i sar., 2007; Marsh, 1989; Marsh & Martin, 1992). Reakcije ste enog imuniteta su prave oslobađanje antitela i ćelijskim odgovorom, koji može biti indukovani i kasnije pojačani prisutnim oralnim mikroorganizmima. Inflamatorni odgovor može da bude umerenog karaktera ili da bude prenaplašen i da dovede do prenaplašene destrukcije tkiva (Berezow i sar., 2008; Lewis, 2008).

Fagociti imaju ključnu ulogu u parodontacijumu, kako u stanju zdravlja tako i u toku oboljenja potpornog aparata zuba. Osobe sa deficijentnom funkcijom fagocita ve u najranijem uzrastu oboljevaju od parodontopatije (Carlsson i sar., 2006; Cox & Weathers, 2008; van Dyke & Champagne, 1995). Jasno je da destrukcija parodontalnih

tkiva koja se odigrava u toku parodontopatije nije posledica direktnog uticaja bakterija koje su izbegle fagocitozu i druge elemente odbrane, nego posledica inflamatornog odgovora tkiva na prisustvo bakterija. Dakle, bakterije su neophodne za inicijaciju ovih procesa (van Dyke 2007A, 2007B, 2009). Aktivirani fagociti (neutrofili i makrofagi) su veoma važni u procesu destrukcije parodontijuma, u smislu da su odgovorni direktno ili indirektno za povećanu produkciju tkivno-degradirajućih enzima, uključujući i matriksne-metaloproteinaze (Birkedal-Hensen, 1993; Cleasson i sar., 2002). Tokom parodontopatije, destruirana parodontalna tkiva bivaju donekle nadomešena dobro vaskularizovanim granulacionim tkivom koje obiluje inflamatornim ćelijama što u biološkom smislu povećava otpornost pri invaziji bakterija.

1.3. Veza parodontopatije i sistemskih oboljenja

1.3.1. Fokalna infekcija

Teorija fokalne infekcije, koja je uvedena tokom 19. i početkom 20. veka, se zasnivala na stavu da su "fokusi" sepse odgovorni za inicijaciju i progresiju različitih inflamatornih oboljenja, kao što su artritis, peptički ulkus i apendicitis (Scannapieco, 1998). U prvo vreme posle njenog uvođenja, ova teorija je bila bezrezervno prihvaćena, što je rezultiralo nekritičnim vađenjem zuba bez ikakvih znakova zapaljenja. Pošto ovakva vrsta terapije nije dovela do smanjenja tegoba niti izlječenja bolesti i pošto je bilo onih bolesnika koji su болоvali od istih bolesti bez evidentnog fokusa, teorija fokalne infekcije je diskreditovana i u velikoj meri ignorisana mnogo godina kasnije.

Značajan progres u klasifikaciji i identifikaciji oralnih mikroorganizama i saznanje da se određeni mikroorganizmi normalno nalaze samo u usnoj duplji, otvorilo je ponovo pitanje značaja oralne fokalne infekcije. Postalo je jasno da usna duplja može da predstavlja mesto porekla patogenih organizama odakle oni diseminuju do udaljenih tkiva ili organa u telu, naročito kod imunokompromitovanih osoba (pacijenti oboleli od malignih bolesti, dijabetesa, reumatoidnog artritisa ili su na kortikosteroidnoj ili nekoj drugoj vrsti imunosupresivne terapije). Brojne epidemiološke studije su kao predmet istraživanja pratile oralnu infekciju, naročito onu koja je u parodontalnom ili periapikalnom prostoru, kao faktor rizika za nastanak sistemskih oboljenja (Li i sar., 2000).

1.3.2. Bakterijemija

Jedan miligram dentalnog plaka sadrži više od 10^{11} bakterija. Bliski anatomske odnosi ovih mikroorganizama sa cirkulacijom mogu da olakšaju nastanak bakterijemije i sistemsku diseminaciju bakterijskih produkata, kompleksi i imunokompleksa.

Incidenca bakterijemije nakon stomatoloških intervencija je dobro dokumentovana. Pojava bakterijemije nakon ekstrakcije zuba je opservirana u 100% slučajeva, u 70% nakon obrade parodontalnog džepa, u 55% nakon ekstrakcije impaktiranog umnjaka, u 20% nakon endodontskog tretmana i u 55% nakon bilateralne tonzilektomije. U ovim slučajevima anaerobi su izolovani češće nego fakultativno anaerobni mikroorganizmi. Konzervativne procedure kao što je preparacija kaviteta npr., kao i etkanje zuba povećavaju prevalencu bakterijemije sa 17% na 40% (Baltch i sar., 1988; Carrol & Sebor, 1980; Debelian i sar., 1995; Donley & Donley, 1988;

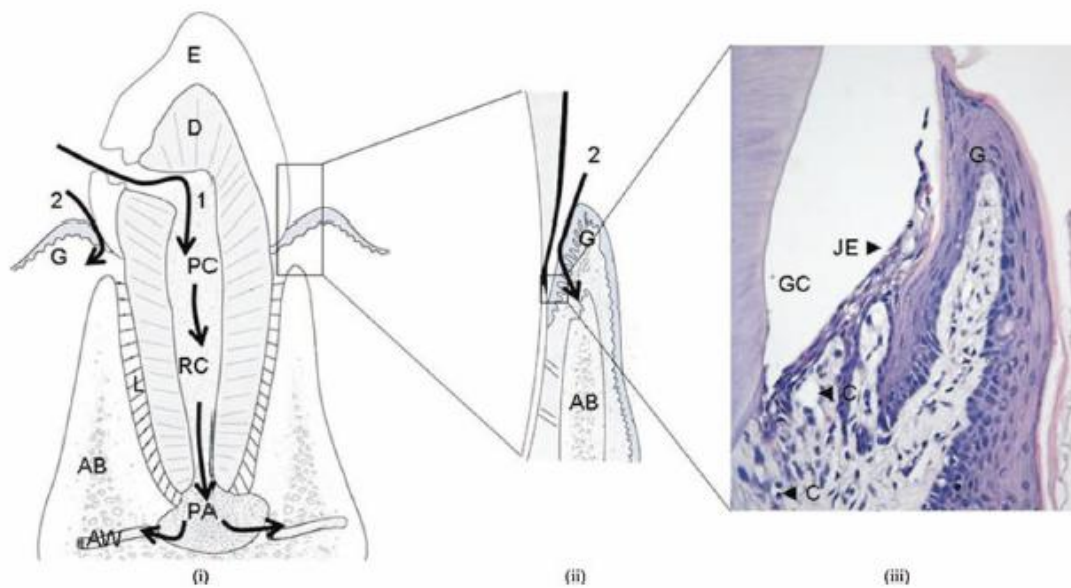
Drinnan & Gogan, 1990; Heimdahl i sar., 1990; Little, 1991; Lofthus i sar., 1991; Navazesh & Mulligan, 1985; Okabe i sar., 1995).

Diseminacija oralnih mikroorganizama u sistemsku cirkulaciju je uobičajena i očekivana pojava, i za manje od 1 minuta nakon oralne krvave stomatološke intervencije mikroorganizmi iz inficiranih mesta stižu do srca, pluća i periferne kapilarne mreže (Kilian, 1982).

Na površini ljudskog tela se nalazi više od 10^{13} mikroorganizama, ali su potkožna tkiva i cirkulacija uglavnom sterilni. U usnoj duplji postoji nekoliko prirodnih barijera koje se suprotstavljaju penetraciji bakterija iz dentalnog plaka u okolna tkiva (Loesche, 1994; Loesche & Lopatin, 1998; Weinberg i sar., 1998):

1. fizička barijera u vidu polioslojevitog epitela
2. defenzini – peptidi koje sintetizira domaćin i ispoljavaju antimikrobni efekat, a nalaze se u epitelu mukoze
3. imunološka barijera koju predstavljaju čimbenici humoralnog imuniteta
4. retikuloendotelijalni sistem (fagocitna barijera).

U normalnim okolnostima ovaj sistem barijera zajedničkim snagama doprinosi inhibiciji i eliminaciji penetriranih bakterija. Ravnoteža može biti narušena fizičkom traumom, hipoksijom ili padom imuniteta (neutropenija, AIDS, imunosupresivna terapija) što može rezultirati propagacijom mikroorganizama i nastankom akutne ili hronične infekcije (Loesche, 1994). Mogući putevi ulaska bakterija u sistemsku cirkulaciju prikazani su na slici 1.7.



Slika 1.7. Mogu i putevi ulaska bakterija u sistemsku cirkulaciju: 1) kroz kanal korena zuba (RC) ili iz periapikalne lezije (PA) u krvne sudove alveolarne kosti (AW); 2) iz periodoncijuma, gde bakterije iz gingivalnog sulkusa (GC) kroz pripojni epitel (JE) dospevaju u vezivno tkivo gingive, a odatle u kapilarnu mrežu (C). E, glez; D, dentin; L, parodontalni ligament; AB, alveolarna kost. (Slika preuzeta od Lu Qian [Oral Bio-Sciences, Faculty of Dentistry])

1.3.3. Veza oralne infekcije i sistemskih oboljenja

Smatra se da oralna infekcija pomoću tri različita mehanizma može da doprinese nastanku sistemskih oboljenja (Thoden van Velzen i sar., 1984):

1. Metastatska infekcija. Oralna infekcija i stomatološke procedure mogu uzrokovati pojavu tranzitorne bakterijemije. Mikroorganizmi koji prodru u krv i cirkulišu organizmom obično bivaju eliminisani retikuloendotelijalnim sistemom u toku jednog minuta, što po pravilu ne

biva prvenstveno pojavom kliničkih simptoma (Kilian, 1982; Thoden van Velzen i sar., 1984). Međutim, ukoliko diseminovani mikroorganizmi naiđu na povoljne uslove, oni mogu posle izvesnog vremena početi da se multipliciraju.

2. Metastatska povreda. Pojedine Gram-pozitivne i Gram-negativne bakterije imaju sposobnost produkcije difuzibilnih proteina ili egzotoksina koji predstavljaju vrlo potentan faktor virulencije. Endotoksin, po sastavu lipopolisaharid (LPS), ulazi u sastav spoljašnje membrane i oslobađa se nakon smrti bakterijske ćelije. Odgovor domaćina na prisustvo LPS-a karakteriše se velikim brojem patoloških manifestacija (Hammond, 1992; McGhee, 1982).
3. Metastatska inflamacija. Solubilni antigeni mogu da prodru u cirkulaciju, stupe u reakciju sa cirkulišućim antitelima i formiraju makromolekularne komplekse. Ovi imunokompleksi mogu da dovedu do pojave različitih akutnih i hroničnih inflamatornih reakcija na mestu depozicije (Thoden van Velzen i sar., 1984; Van Dyke i sar., 1986).

1.3.4. Parodontopatije i sistemska inflamacija

Mnoga istraživanja su se bavila vezom parodontopatije i sistemskih oboljenja i došlo se do zaključka da parodontopatije dele faktore rizika sa mnogim sistemskim oboljenjima, zatim da se subgingivalni biofilm ponaša kao rezervoar Gram-negativnih bakterija i da inflamirani parodontcijum predstavlja depo medijatora inflamacije (Page,

1998). Pokazano je da se u osoba sa punom klini kom slikom parodontopatije redovno odvija tranzitorna bakterijemija, kao i značajan sistemski odgovor antitelima. Ovo je sasvim razumljivo kada se zna da je epitel parodontalnog džepa ulcerisan i da ima površinu od 5 - 7.5 cm².

1.3.5. Zajednički faktori rizika

Postoje faktori koji povećavaju rizik za nastanak parodontopatije, ali isto tako povećavaju rizik i za nastanak sistemskih oboljenja, npr. kardiovaskularnih. To su u prvom redu pušenje i stres, a zatim i starenje, muški pol, rasa i etnička pripadnost.

Subgingivalni biofilm

Subgingivalni prostor je stalno naseljen Gram-negativnim bakterijama, koje se tu nalaze u različitim broju i imaju različiti virulentni potencijal. Nakon obrade parodontalnih džepova se ne postiže eradikacija ovih bakterija, pri čemu one čak pokazuju tendenciju ponovnog naseljavanja, tj. rekolonizacije. Prisustvo ovih bakterija obezbeđuje kontinuirani rezervoar LPS-a koji stimuliše pokretanje imunskog odgovora i lokalno u tkivu i na mestima gde dopre cirkulacijom. Sistemski izazov Gram-negativnim bakterijama ili LPS-om indukuje vaskularni odgovor, uključujući i formiranje inflamatornog celijskog infiltrata u zidovima krvnih sudova, zatim proliferaciju vaskularne glatke muskulature, masnu degeneraciju krvnih sudova i intravaskularnu koagulaciju (Marcus & Hajjar, 1993; Mattila, 1989). LPS povećava ekspresiju adhezivnih molekula endotelijalnih ćelija i sekreciju IL-1, TNF- i

tromboksana. Ovo rezultira agregacijom i adhezijom trombocita i pojavom depozita holesterola i njegovih metabolita.

Parodontcijum kao rezervoar citokina

Proinflamatorni citokini IL-1 , TNF- , IFN- i prostaglandin E₂ (PGE₂) dostižu visoke koncentracije u tkivu u toku parodontopatije (Page, 1998), ali mogu putem cirkulacije dovesti do sistemskih efekata. IL-1 favorizuje koagulaciju i trombozu i ometa fibrinolizu (Clinton i sar., 1991).

1.4. Prevremeni poro aj i parodontopatija

Trudno a može da uti e na zdravlje gingive. Promene hormonalnog statusa u trudno i promovišu inflamaciju, što rezultira pojavom gingivitisa – Gingivitis gravidarum (Löe & Silness, 1963) koji ne mora biti u pozitivnoj korelaciji sa prisutnom koli inom dentalnog plaka (Kornman & Loesche, 1980). Oralni kontraceptivi, tako e, mogu da uzrokuju promene u gingivi u pravcu inflamacije, ak i u slu aju dobre kontrole plaka. Istraživanja su pokazala da kontraceptivne pilule dovode do alteracije malih krvnih sudova, menjaju permeabilnost gingive i pove avaju sintezu estrogena (Kalkwarf i sar 1978).

Neka istraživanja su pokazala da oralne infekcije pove avaju rizik ili u zna ajnoj meri doprinose ro enju dece male telesne težine ili dovode do pojave spontanog prevremenog poro aja. Uprkos zna ajnom napretku prenatalne nege i neonatalne medicine u poslednjih 50 godina u razvijenim zemljama, ali i u zemljama u razvoju,

incidenca prevremenog porođaja se nije smanjila – i ona iznosi čak 11% (Goldenberg & Rose, 1998). Spontani prevremeni porođaj je onaj koji se dogodi pre navršene 37. nedelje gestacije i rezultira rođenjem odojčeta telesne mase manje od 2500g. Najveći broj prevremenih porođaja se odvijaju spontano, a uzrok su dve relativno česte obstetričke komplikacije: prevremeno pucanje plodovih ovojnica i/ili prevremenih kontrakcija. Prevremeno rođena deca umiru u neonatalnom periodu 40 puta češće od dece normalne telesne mase na rođenju (McCormick, 1985; Shapiro i sar., 1980). Ovakvo rođena deca, koja prežive neonatalni period, se suoavaju sa povećanim rizikom za nastanak slepila, smetnji u neurološkom razvoju (Byrne i sar., 1993; Fityhardinge, 1976), respiratornih i ORL infekcija (Hack i sar., 1983; McCall & Acheson, 1968), kao i sa poremećajem pažnje (Breslay i sar., 1996) i smanjenim kognitivnim sposobnostima u predškolskom uzrastu (Sommerfelt i sar., 1996). Takođe, ova deca se suoavaju sa većim brojem kongenitalnih anomalija (Christianson i sar., 1981; Van den Berg & Yerushalmy, 1966).

Dosadašnje epidemiološke studije ukazuju na sledeće faktore rizika za prevremenu porođaj (Goldenberg i sar., 2000, Offenbacher i sar., 1996):

- starost trudnice (> 34 i < 17)
- alkohol i pušenje
- crna rasa
- nizak socioekonomski status
- neadekvatna prenatalne nega
- genitourinarne infekcije
- diabetes mellitus
- hipertenzija

- multiple trudno e

Me utim, u oko 25% spontanog prevremenog poro aja se ne identifikuje nijedan od poznatih faktora rizika.

Dokazi o ve oj u estalosti infekcije amnionske te nosti, horioamnionskoj infekciji, kao i histološki nalaz horioamnionitisa upu uju na povezanost izme u spontanog prevremenog poro aja i ra anja dece male telesne težine i infekcije u toku trudno e (Offenbacher i sar., 1998). Interesantno je da histološki nalaz horioamnionitisa esto egzistira ak i u odsustvu infekcija vagine (vaginoze) ili cervikalne regije. Ovo ukazuje na mogu nost da bi udaljena infekcija ili sepsa mogla da ima za cilj membrane placente (Hillier i sar., 1988, 1995).

Vaginoza, Gram negativna anaerobna infekcija vagine, sa oslobadjanjem endotoksina, je zna ajan faktor rizika za spontani prevremeni poro aj (Hillier i sar., 1988, 1995). U toku vaginioze dolazi do aktivacije celularnog imuniteta što vodi ka stvaranju citokina i prostangladina, bitnih inilaca u spontanom prevremenom poroaju (Hiller i sar., 1988). Povišeni nivoi citokina (IL-1, IL-6, TNF) su na eni u amnionskoj te nosti žena koje su se prevremeno porodile i koje su imale infekciju amnionske te nosti (Romero i sar., 1993). Poznato je da navedeni citokini indukuju sintezu prostaglandina i sledstveni poro aj. Pouzdane biohemijske analaze koje bi pravovremeno ukazale na pove an rizik za nastanak prevremenog poro aja za sada ne postoje.

Primarni etiološki faktor parodontopatije su Gram negativne anaerobne bakterije sadržane u subgingivalnom biofilmu. Tokom trudno e, naro ito u drugom trimestru, pove ava se broj anaerobnih bakterijskih vrsta u dentalnom plaku (Kornman & Loesche, 1980). Navedene bakterije mogu da stvaraju razli ite bioaktivne molekule koji

na različite načine utiču na domaćina. Verovatno najvažnija od ovih komponenti je endotoksin koji stimuliše makrofage i druge ćelije da sintetišu i sekretuju veliki broj bioaktivnih molekula, uključujući i citokine (IL-1, TNF- α , IL-6), PGE₂, i matriksne metaloproteinaze - kolagenaze, gelatinaze, elastaze (Darveau i sar., 1997; Offenbacher i sar., 1998B). Teorijski, ove bioaktivne molekule bi, ukoliko bi se našle u sistemskej cirkulaciji i prošle placentalnu barijeru, mogle da povećaju fiziološki nivo PGE₂ i TNF- α u amnionskej tečnosti i indukuju prevremeni porođaj. Dakle, isti medijatori inflamacije koji su značajni u patogenezi parodontopatije imaju važnu ulogu i u započinjanju prevremenog porođaja.

Udruženost između infekcije parodontijuma i spontanog prevremenog porođaja u humanoj populaciji se zasniva na relativno novim podacima i tek bi trebalo da bude potvrđena u prospektivnim studijama.

Takođe, ne bi trebalo zanemariti mogućnost uticaja parodontopatogena na ćelije placente i eventualni uticaj na nastanak komplikacija rane trudnoće. Humana placenta je visoko specijalizovani organ, preko koga se tokom trudnoće ostvaruje kontakt između majke i ploda. Prilikom implantacije započinje razvoj placente, a sam proces se naziva placentacija. Osnovnu funkcionalnu jedinicu posteljice predstavljaju horionske resice, njihovim obrazovanjem se povećava kontaktna površina horiona sa krvlju majke, i uspostavlja se kontakt između embrionalnog i majčinog krvotoka. Površina horionskih resica je pokrivena trofoblastnim dvoslojem koji čine sinciciotrofoblast i citotrofoblast. Sinciciotrofoblast i citotrofoblast predstavljaju ćelije posteljice odgovorne za njenu specifičnu strukturu i funkciju, a označene su zajedničkim imenom – trofoblast. Iako predstavlja svega 13% ukupne mase posteljice, trofoblast je metabolički najaktivniji deo placente. Ćelije trofoblasta osim direktnog kontakta između krvotoka majke i

krvnog sistema ploda, obezbe uju i pogodnu hormonsku sredinu za održavanje trudno e. Sincicio- i citotrofoblast se me usobno razlikuju. Tako je sinciotrofoblast u najve oj meri odgovoran za hormonsku, protektivnu i nutritivnu funkciju placentne. Citotrofoblastne elije predstavljaju germinativne elemente iz kojih se diferencira sinciotrofoblast i elije ostalih subpopulacija trofoblasta. Diferencijacija trofoblasta, se nakon usa ivanja blastociste u endometrijum materice, odvija u dva pravca: vilusni i ekstravilusni. Ekstravilusni trofoblast obuhvata sve trofoblastne populacije koje se nalaze van definisanih struktura placentnih resica (Kaufman i Castellucci, 1997). Ekstravilusnu elijsku populaciju ine elijska ostrva, citotrofoblastna ljuska i elijski stubovi, endovaskularni i intersticijalni trofoblast. Intersticijalne trofoblastne elije zapo inju invaziju uterusne mukoze, sve do endometrijalno-miometrijalne granice. Osim promene morfologije invazivnog trofoblasta od ovalnih i uniformnih elija do izolovanih izduženih elija koje vrše invaziju u decidualno tkivo (Kam i sar., 1999). Intersticijalni trofoblast, do po etka drugog trimestra trudno e, prodire do prve tre ine miometrijuma, gde se dalje diferencira u mnogojedarne, džinovske elije placentnog ležišta (placental bed giant cell). Pored invazije decidualizovanog endometrijuma i miometrijuma (intersticijalni trofoblast), tokom prve polovine trudno e, ekstravilusne trofoblastne elije vrše invaziju i spiralnih arterija majke sve do oblasti superficijalnog miometrijuma. Ta populacija trofoblastnih elija je ozna ena kao endovaskularni trofoblast. Fiziološke promene zahvataju decidualne i miometrijalne delove spiralnih arterija, pri emu dolazi do destrukcije normalnih mišinih struktura zidova ovih krvnih sudova i njihove zamene trofoblastnim elijama. Trofoblast u lumenu krvnih sudova postepeno zamenjuje endotelne elije i dolazi do integracije endovaskularnih

trofoblastnih elija u zid krvnog suda (Kam i sar., 1999). Proces fiziološke transformacije spiralnih arterija je ključan za normalan rast fetusa i njegovo razviće.

Dakle, u trudnica obolelih od parodontopatije i lošom oralnom higijenom, može se očekivati da usled tranzitorne bakterijemije, parodontopatogeni cirkulacijom dospeju do trofoblasta, kako do invazivnih tako i do endovaskularnih, i ispolje citotoksični efekat. Faktori agresije ovih mikroorganizama i tačan mehanizam njihovog delovanja na različite elijske linije trofoblasta su još uvek nedovoljno istraženi.

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Različite studije su pokazale geografske, etničke i rasne varijacije u prisustvu bakterije *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* u okviru subgingivalne mikroflore. Ne postoji podatak o zastupljenosti ovog mikroorganizama u subgingivalnom dentalnom plaku kod obolelih od parodontopatije i osoba sa klinički zdravim parodontcijumom u Srbiji, kao ni o njegovim genotipskim karakteristikama. Ciljevi ovog istraživanja bili su:

1. Ispitati uestalost pojave bakterije *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* u uzorcima subgingivalnog dentalnog plaka.
2. Ispitati serotipove bakterije *A. actinomycetemcomitans*.
3. Ispitati korelaciju serotipova bakterije *A. actinomycetemcomitans* i parodontalnog statusa ispitanika.
4. Ispitati prevalencu i prirodu genotipova dva kompleksna toksina bakterije *A. actinomycetemcomitans*: leukotoksina i citoletalnog toksina istezanja.
5. Ispitati citotoksični efekat izolata *A. actinomycetemcomitans* na ekstravilusnu trofoblastnu ćelijsku liniju HTR-8/SVneo.

3. MATERIJAL

3.1. Pacijenti

U ovo istraživanje su bili regrutovani pacijenti koji su se javili radi lečenja parodontopatije na Kliniku za parodontologiju i oralnu medicinu Stomatološkog fakulteta u Beogradu.

U studiju je bilo uključeno 90 ispitanika oba pola podeljenih u tri grupe (30 pacijenata obolelih od hronične parodontopatije, 30 obolelih od agresivne parodontopatije i 30 ispitanika sa klinički zdravim parodontcijumom) koji su prihvatili informaciju o istraživanju i potpisali pristanak za učestvovanje u istom.

3.1.1. Selekcija pacijenata

Da bi bili uključeni u istraživanje, pacijenti oboleli od parodontopatije su morali da zadovolje sledeće kriterijume:

1. da imaju 18 i više godina starosti
2. da budu sistemski zdravi
3. da budu bez trudnoće i laktacije
4. da imaju prisustvo parodontalnih džepova dubine 5 i više milimetara
5. da imaju više od 20 zuba (ne računaju se treće molare), bez fiksnih protetskih radova
6. da tri meseca unazad od momenta uzorkovanja nisu uzimali antibiotsku terapiju
7. da dve nedelje unazad od trenutka uzimanja uzoraka nisu uzimali nesteroidne antiinflamatorne lekove

8. da tri meseca unazad od momenta uzorkovanja nisu imali nikakav parodontološki tretman

Osobe sa klini ki zdravim parodoncijumom su morale da ispunjavaju slede e uslove:

1. da imaju 18 i više godina starosti
2. da dubina sondiranja bude manja od 3 mm, a nivo pripojnog epitela 0 mm
3. da imaju potpuno odsustvo inflamacije gingive
4. izostajanje krvarenja na provokaciju nakon sondiranja
5. da imaju više od 20 zuba (ne računaju i tre e molare)
6. da budu sistemski zdravi
7. da budu bez trudno e i laktacije
8. da tri meseca unazad od momenta uzorkovanja nisu uzimali antibiotsku terapiju
9. da dve nedelje unazad od trenutka uzimanja uzoraka nisu uzimali nesteroidne antiinflamatorne lekove

3.1.2. Klini ki pregled

Nivo oralne higijene i klini ko stanje parodontalnih tkiva je bilo verifikovano klini kim parametrima:

- ♦ Plak Indeksom-PI (Silness-Löe)
- ♦ Krvarenjem na provokaciju (KNP)
- ♦ dubinom sondiranja (DS)
- ♦ nivoom pripojnog epitela (NPE)

Nakon uzimanja uzoraka, na reprezentativnim zubima su se pomoću ugradisane parodontalne sonde (UNC 15, Hu Friedy, Chicago, IL, USA) merili dubina parodontalnog prostora, nivo pripojnog epitela i nivo ivice gingive u predelu 6 ta aka oko zuba (mezijalno, sredina i distalno vestibularne i oralne površine zuba). Tako je pronađena pojava krvarenja iz gingive 15 s nakon sondiranja. Svi anamnestički podaci i klinička merenja parodontalnog statusa su beleženi u evidencioni i parodontalni karton ispitanika (Prilog 1.).

Dubina sondiranja predstavlja mereno rastojanje od ivice gingive do mesta gde se vrh parodontalne sonde zaustavlja u parodontalnom prostoru u predelu njegovog dna.

Nivo pripojnog epitela je mereno rastojanje od cementnogle granice do koronarnog kraja pripojnog epitela.

Na osnovu anamneze, kliničkog pregleda i analize radiograma, parodontalni status ispitanika je bio definisan prema kriterijumima američke Akademije za parodontologiju (Armitage, 1999).

U studiju su bili uključeni pacijenti koji su imali 4 i više mesta u zubiku sa dubinom sondiranja 5 i više mm i nivoom pripojnog epitela 2 i više mm (Offenbacher i sar. 2001). Pacijenti sa inicijalnom destrukcijom parodontalnih tkiva nisu bili uključeni u studiju.

Plak indeks (PI)

Pri određivanju Plak Indeksa uzimalo se u obzir prisustvo ili odsustvo dentalnog plaka u predelu ivice gingive. Pregledom je bilo obuhvaćeno svih 6 površina (mezijalno, sredina i distalno vestibularne i oralne površine zuba) na reprezentativnim

zubima. U cilju identifikacije dentalnog plaka nije se koristilo bojenje, ve instrumentacija parodontalnom sondom.

Pre po etka odre ivanja PI pacijent je vodom dobro isprao usta u cilju uklanjanja svih mekih naslaga osim dentalnog plaka. Potom su se zubi osušili vazduhom i tek tada se pristupilo pregledu.

3.2. Uzimanje uzoraka za laboratorijske analize

3.2.1. Selekcija mesta uzorkovanja

Na osnovu anamneze, klini kog pregleda i analize digitalnog ortopantomograma definisana su mesta uzorkovanja. Uzorci subgingivalnog dentalnog plaka su uzimani sa 4 reprezentativna mesta papirnim poenima (#30, Mailfer, Balligues, Švajcarska). Reprezentativna mesta su bila mesta sa najve om dubinom sondiranja u svakom kvadrantu kod obolelih od parodontopatije, odnosno bukomezijalne površine prvih stalnih molara kod ispitanika sa klini ki zdravim parodoncijumom.

3.2.2. Uzimanje uzoraka subgingivalnog dentalnog plaka

Mesta uzorkovanja su izolovana vaterolnama da bi se izbegla kontaminacija uzoraka pljuva kom. Nakon uklanjanja supragingivalnog dentalnog plaka kiretom, po 3 papirna poena su plasirana do dna prethodno selektovanog parodontalnog prostora (gingivalni sulkus, odnosno parodontalni džep). Nakon 10 sekundi, po jedan papirni poen iz svakog kvadranta je odlagan u zasebnu plasti nu epruveticu (Eppendorf). Dakle, formirana su

3 pulovana uzorka subgingivalnog dentalnog plaka, koji su se odlagali u zasebne vialne.

Prvi pulovan uzorak plaka je odlagan u epruvetu u kojoj se nalazilo 1ml fiziološkog rastvora, a drugi u epruvetu koja je sadržala 1 ml 10% glicerola. Uzorci su zamrzavani na -20°C i tako čuvani do momenta analiziranja. Treći pulovan uzorak je odlagan u epruvetu u kojoj se nalazilo 1 ml RTF-Reduced Transport Fluid (Syed & Loesche 1972) i u narednih 24h je bio dalje procesuiran u laboratoriji.

4. METODE

4.1. Kultivacija bakterija

Materijal iz drugog i trećeg pulovanog uzorka je zasejavan na hranljive podloge u cilju kultivacije bakterija, njihove karakterizacije i daljih mikrobioloških analiza.

Materijal koji je uvažen u 10% glicerolu je nakon odmrzavanja razmazivan direktno korištenim papirnim poenima na Tryptic Soy–Serum–Bacitracin–Vancomycin Agar (TSBV) (Slots, 1982). Ova podloga je visoko selektivno specifična podloga za kultivaciju bakterije *A. actinomycetemcomitans*.

Materijal transportovan u RTF-u je u narednih 24h od momenta uzorkovanja zasejavan u različitim razblaženjima na 2 vrste podloga, TSBV i Kolumbiju agar (bioMérieux, France). Nakon vorteksovanja u trajanju od 30 s, po 100 µl uzorka i razblaženja 10^{-1} je zasejano na TSBV podlogu. Po 100 µl razblaženja 10^{-2} i 10^{-3} je zasejano na Kolumbija agar. Šolje su inkubirane na temperaturi od 37°C, 3-5 dana, u mikroaerofilnim uslovima (5% CO₂).

4.2. Izolovanje ukupne DNK iz bakterijskih sojeva

U cilju izolacije ukupne bakterijske DNK primenjeno je nekoliko razli itih metoda.

4.2.1. Izolacija ukupne bakterijske DNK visokom temperaturom

Izolacija ukupne bakterijske DNK visokom temperaturom kao metod izolacije bakterijske DNK je bio primenjen na više razli itih uzoraka.

1. Iz pulovanog uzorka subgingivalnog dentalnog plaka papirni poeni su nakon odmrzavanja premešteni u epruvetu koja je sadržala 250 µl sterilne destilovane vode.
2. Kolonije koje su porasle na TSBV agaru su resuspendovane u 1 ml sterilne destilovane vode.
3. Kolonije koje su rasle u te nom TSBV medijumu su nakon centrifugiranja i odlivanja supernatanta, resuspendovane u 1ml sterilne destilovane vode.

Uzorci su kuvani na temperaturi od 100°C 5 min. Supernatant je koriš en kao matrica u konvencijalnim ili multipleks PCR reakcijama.

4.2.2. Izolacija ukupne bakterijske DNK fenolom

Ova metoda se pre svega koristi za izolovanje ukupne DNK iz bakterija roda *Streptomyces* (Hopwood i sar., 1985), ali se pokazala i kao veoma efikasna i za izolaciju DNK iz drugih bakterija.

Oko 50 mg bakterijskog taloga rastvoreno je u 0,5 ml rastvora za lizu (0,3 M saharoza, 0,025 M TRIS, 0,025 M EDTA u destilovanoj vodi) koji je sadržao 2 mg/ml lizozima i 50 µg/ml RNaze, i inkubirano od 30 minuta do sat vremena na 37°C uz povremeno mu kanje. Potom je dodavano 250 µl 2% SDS i suspenzija je intenzivno mu kana na vorteksu oko jedan minut. Dodavanjem 250 µl neutralnog fenola i intenzivnim mu kanjem, a potom i centrifugiranjem u trajanju od 5 minuta na 13 000 obrt/min, odstranjuju se proteini i komponente bakterijske membrane, koje ostaju u interfazi. Supernatant se podvrgava koraku dodavanja fenola sve do potpunog gubitka interfaze. DNK se potom precipitira dodavanjem jedne desetine volumena natrijum acetata (3M CH₃COONa; pH 4,8), jednog volumena izopropanola i inkubacijom od 5 minuta na sobnoj temperaturi. Uzorak se centrifugira 5 minuta na 13 000 obrt/min, ukloni se supernatant i talog se rastvori u 500 µl TE pufera (10mM Tris, pH 7,5; 1mM EDTA, pH 7,5) kome je dodato 25 µl 100 mM spermin HCl. Posle inkubacije od 5 minuta uzorak se centrifugira 5 minuta na 13 000 obrt/min, odlije se supernatant, talog se rastvori u 300 µl 0,3 M natrijum acetata i 10 mM MgCl₂, doda se 1 ml hladnog apsolutnog etanola (-20°C) i inkubira se sat vremena na sobnoj temperaturi. Uzorak se potom centrifugira 5 minuta na 13 000 obrt/min, odlije se supernatant, talog se osuši i potom rastvara preko noći i na 4°C u 100 µl destilovane vode.

4.2.3. Izolacija pomoću komercijalnih kitova

U cilju izolacije bakterijske DNK, iz dva dana starih kolonija kliničkih izolata dobijenih kultivacijom na TSBV i Kolumbija agaru, izvršena je izolacija hromozomalne DNK prema uputstvu proizvođača. Korišteni su sledeći komercijalni kitovi:

- Genomic Purification Kit (Fermentas)
- QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen)
- ISOLATE Genomic DNA Kit (Bioline)
- KAPA Express Extract (KapaBiosystems)
- BugBuster[®] Protein Extraction Reagent (Merck Millipore)

4.3 Genotipizacija

4.3.1. Reakcije lan ane polimerizacije (PCR)

Reakcija lan ane polimerizacije (eng. Polymerase Chain Reaction, PCR) zasniva se na tri procesa koji se sukcesivno ponavljaju: *in vitro* denaturacija dvolan ane DNK matrice, hibridizacija (aniling od *eng.* annealing) prajmera sa matricom na osnovu komplementarnosti baza i ekstenzija prajmera DNK polimerazom

4.3.1.1. Sinteza DNK u reakciji lan ane polimerizacije

U reakcijama polimerizacije svaki od prajmera (Tabela 2.2) bio je u koncentraciji od 50 pmol. PCR reakciona smeša sadržala je još i dNTP smešu u koncentraciji od 2 mM, 2.5 mM MgCl₂, 1xPfu polimerazni pufer bez MgCl₂ i 1,25U Pfu polimeraze po reakciji. Finalna zapremina reakcije je iznosila 50μl, koja je podešavana dodavanjem destilovane vode.

Za amplifikaciju korišćen je GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystem, USA) i sledeći programi, prikazani u tabeli 2.1.

Tabela 2.1. PCR program korišćen za amplifikaciju dela 16S rDNK gena

	temperatura	vreme	proces	br. ciklusa
Amplifikacija 16S rDNK	95°C	5 minuta	Denaturacija DNK	1
	95°C	40 sekundi	Umnožavanje ^a	35
	50°C	40 sekundi		
	72°C	2 minuta		
	72°C	10 minuta	Finalna elongacija	1

Tabela 2.2. Prajmeri korišćeni u reakcijama polimerizacije dela 16S rDNK gena

Upotreba	Naziv	Sekvenca prajmera	Referenca
16S rDNK	27 F	5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'	Marchesi <i>et al.</i> , 1998
	1492 R	5'-ACGGGCGGTGTGTGTRC-3'	Marchesi <i>et al.</i> , 1998

4.3.2. Sekvenciranje

Umnoženi PCR fragmenti 16S rDNK sekvencirani su na aparatu Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA; IMGGI), uz upotrebu

komercijalnog kita za sekvenciranje BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems, USA), po slede ojoj proceduri:

Reakciona smeša za sekvenciranje, ukupne zapremine od 8 μ l sadržala je: 3 μ l Ready Reaction Mix-a, 3,2 pmol M13/pUC18 prajmera (Yanish-Perron *et al.*, 1985) i 150-300 ng DNK matrice. Prvi korak sekvenciranja ura en je na PCR aparatu (GeneAmp PCR System 2700, Applied Biosystems, USA) koriš enjem slede eg programa: jedan ciklus inicijalne denaturacije u trajanju od 1 minuta na 96°C, 25 ciklusa denaturacije na 96°C u trajanju od 10 sekundi, anilinga prajmera na 55°C od 5 sekundi i elongacija produkata u trajanju od 4 minuta na 60°C.

Produkti su pre iš avani, odnosno nevezani obeleženi nukleotidi su uklanjani dodavanjem 40 μ l rastvora A (1,2 ml 3M CH₃COONa, pH 5,2; 25 ml etanola; 5,8 ml destilovane vode) i centrifugiranjem u trajanju od 10 minuta na 13 000 obrt/min. Nakon odlivanja supernatanta talog je ispiran sa 200 μ l 70% etanola, centrifugiran 10 minuta na 13 000 obrt/min. Po odlivanju supernatanta korak ispiranja ponovljen je još jednom. Talog je osušen i rastvoren u 25 μ l HiDi formamida.

Analiza sekvenci ra ena je na aparatu Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer programom SeqAnalyzer.

4.3.2.1. Bioinformati ka obrada sekvenci

Sekvence su sklopljene u SeqMan programu (DNASTAR, USA), a njihovi homolozi identifikovani su upotrebom BLAST algoritma (Altschul *et al.*, 1997; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Za 16S rDNK sekvence iz metagenomskih biblioteka i 16S rDNK sekvence bakterija identifikovani su i preuzeti homolozi sa RDP (Ribosomal Database Project II Release 9.4, <http://rdp.cme.msu.edu>; Cole *et al.*, 2009). 16S rDNK sekvence bakterija poravnate su sa homologim sekvencama u CLUSTALW programu (Thompson *et al.*, 1994) implementiranim u program BioEdit 7.1.3 (Hall, 1999).

4.3.3. Reakcije umnožavanja dela 16S rRNK gena bakterije *A. actinomyces*

U cilju identifikacije bakterije *A. actinomyces* u reakcijama lananog umnožavanja korišteni su jedan univerzalni 1492R (5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3') i jedan za vrstu specifičan prajmer (CACTTAAAGGTCCGCCTACGTGC) koji amplifikuju deo 16S rRNK gena. Uslove reakcije je prethodno opisala Pucar *et al.*, 2007.

4.3.4. Serotip-specifična genotipizacija (Multiplex PCR)

U cilju određivanja serotipa bakterije *A. actinomyces* su primenjene konvencionalne i multipleks PCR reakcije koje su ranije opisane (Suzuki *et al.*, 2001; Kaplan *et al.*, 2001). U reakcijama polimerizacije svaki od prajmera bio je u koncentraciji od 100 pmol. PCR reakciona smeša sadržala je još i dNTP smešu u koncentraciji od 2 mM, 1xPfu polimerazni pufer sa MgCl₂ i 1,25U Pfu polimeraze po reakciji. Finalna zapremina reakcije je iznosila 50 µl, koja je podešavana dodavanjem

destilovane vode. U multipleks PCR reakcijama je koriš ena DNK matrica dobijena razli itim metodama.

Za amplifikaciju je koriš en GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystem, USA) i program prikazan u tabeli 2.4.

Tabela 2.4. Uslovi amplifikacije u reakcijama lan ane polimerizacije za determinaciju serotipova – Multiplex PCR

	temperatura	vreme	proces	Br. ciklusa
Amplifikacija serotipova <i>A. a.</i> multiplex PCR-om	94°C	5 minuta	Denaturacija DNK	1
	95°C	30 sekundi	Umnožavanje	35
	54°C	30 sekundi		
	72°C	60 sekundi		
	72°C	5 minuta	Finalna elongacija	1

Tabela 2.3. Sekvence prajmera koriš ene za genotipizaciju serotipova, promotora operona *ltx* gena i *cdt* gena

Ime	Sekvenca 5' 3'	Veli ina produkta (bp)	Protein ili referenca	soj/gen
<i>Serotipovi</i>				
SA-F	GCAATGATGTATTGTCTTCTTTTGGGA	428	Navodna	SUNYaB
SA-R	CTTCAGTTGAATGGGGATTGACTAAAAC		manoziltransferaza	75
SB-F	CGGAAATGGAATGCTTGC	298	dTDP-4-keto-6-	Y4
SB-R	CTGAGGAAGCCTAGCAAT		deoxy-D-glucose reductase	
SC-F	AATGACTGCTGTCGGAGT	559	Navodna	NCTC
SC-R	CGCTGAAGGTAATGTCAG		acetiltransferaza	9710
SD-F	TTACCAGGTGTCTAGTCGGA	690	Navodna	IDH
SD-R	GGCTCCTGACAACATTGGAT		manoziltransferaza	781
SE-F	CGTAAGCAGAAGAATAGTAAACGT	211	Nepoznat	IDH
SE-R	AATAACGATGGCACATCAGACTTT		1705	
SF-F	ARA AYTYYTCWTCGGGAATG	232	Kaplan i sar., 2001	/
SF-R	CCTTTATCAATCCAGACAGC			
<i>Leukotoksin</i>				
LTX-F	TTTCTCCATATTAATCTCCTTGT	504 ili		<i>ltx</i> pro-
LTX-R	CAGATCAAAACCTGATAACAGTATT	1034	Haubek i sar., 1996.	moter
<i>Citoletalni toksin istežanja</i>				
<i>cdtA-7</i>	GATGGATCTAAGGAGAGATATAATG	326		<i>cdt A</i>
<i>cdtA-13</i> <i>cdtA-12</i>	AATTAACCGCTGTTGCTTCTAATACAG AAGGAGTTTATATGCAATGGGTAAAG		462	Ahmed i sar., 2001
<i>cdtA-8</i> <i>cdtA-1</i>	TAGCGATCACGAACAAAATAACAG TAGTTTTGTTCGTGATCGCTAAGGAG	272		
<i>cdtA-4</i>	GCTACCCTGATTTCTTCGCACCG			

4.3.5. Serotip specifi na genotipizacija - Konvencionalni PCR

Primenjuju i uslove amplifikacije koje je propisao autor (Suzuki i sar., 2001) nisu dobijeni željeni rezultati multiplex PCR-om, pa su postavljeni restriktivniji uslovi umnožavanja za konvencionalni PCR. Reakciona smeša je ostala potpuno ista, ali je temperatura anilinga podignuta sa 57°C na 60°C (Tabela 2.5.).

Tabela 2.5. Uslovi amplifikacije reakcijama lan ane polimerizacije za determinaciju serotipova – Konvencionalni PCR

	temperatura	vreme	proces	Br. ciklusa
Amplifikacija serotipova <i>A. a.</i> konvencionalnim PCR-om	94°C	5 minuta	Denaturacija DNK	1
	95°C	1 minut	Umnožavanje	35
	60°C	1 minut		
	72°C	1 minut		
	72°C	5 minuta	Finalna elongacija	1

4.3.6. Genotipizacija promotora operona za leukotoksin

U cilju karakterizacije gena za leukotoksin *A. actinomycetemcomitans* izolata, primenjene su PCR reakcije koje su ranije opisane (Haubek i sar., 1996). U reakcijama polimerizacije svaki od prajmera bio je u koncentraciji od 10 pmol (sekvence koriš enih prajmera su prikazane u Tabeli 2.3.). PCR reakciona smeša sadržala je još i dNTP

smešu u koncentraciji od 2 mM, 1xPfu polimerazni pufer sa MgCl₂ i 1,25U Pfu polimeraze po reakciji. Finalna zapremina reakcije je iznosila 25 µl, koja je podešavana dodavanjem destilovane vode. U PCR reakcijama je koriš ena DNK matrica dobijena komercijalnim kitovima za ekstrakciju bakterijske DNK.

Za amplifikaciju je koriš en GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystem, USA) i program prikazan u tabeli 2.6.

Tabela 2.6. Uslovi amplifikacije u reakcijama lan ane polimerizacije za promotor operona *ltx*

	temperatura	vreme	proces	br. ciklusa
Amplifikacija <i>ltx</i> operon promotora	94°C	5 minuta	Denaturacija DNK	1
	94°C	60 sekundi	Umnožavanje	35
	55°C	60 sekundi		
	72°C	60 sekundi		
	72°C	10 minuta	Finalna elongacija	1

4.3.7. Genotipizacija *cdt gena*

U cilju karakterizacije gena za citoletalni toksin istezanja *A. actinomycetemcomitans* izolata, primenjene su PCR reakcije koje su ranije opisane (Ahmed i sar., 2001). U reakcijama polimerizacije svaki od prajmera je bio u koncentraciji od 100 pmol (sekvence koriš enih prajmera prikazane u Tabeli 2.3.). PCR reakciona smeša sadržala je još i dNTP smešu u koncentraciji od 2 mM, 1xPfu

polimerazni pufer sa MgCl₂ i 1,25U Pfu polimeraze po reakciji. Finalna zapremina reakcije je iznosila 25 µl, koja je podešavana dodavanjem destilovane vode. U PCR reakcijama je koriš ena DNK matrica dobijena komercijalnim kitovima za ekstrakciju bakterijske DNK.

Za amplifikaciju je koriš en GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystem, USA) i program prikazan u tabeli 2.7.

Tabela 2.7. Uslovi amplifikacije reakcijama lan ane polimerizacije za genotipizaciju *cdt* gena

	temperatura	vreme	proces	br. ciklusa
Amplifikacija <i>cdt</i> gena	94°C	5 minuta	Denaturacija DNK	1
	95°C	30 sekundi	Umnožavanje	35
	54°C	30 sekundi		
	72°C	60 sekundi		
	72°C	5 minuta	Finalna elongacija	1

4.3.8. Analiza DNK na agaroznom gelu

Analiza dobijenih PCR produkata je vršena elektroforezom na 0.8% ili 2% gelu. U gel je pre polimerizacije dodavan etidijum bromid (5µg/ml). Elektroforeza je tekla u 1 X TAE puferu (40mM Tris, 20 mM Na-acetat, 1 mM Na₂ EDTA), pri voltaži od 4-7 V/cm. DNK je vizualizovana osvetljavanjem gela UV svetlom talasne dužine 266 nm. Trajni zapis rezultata dobijao se fotografisanjem gela CCD kamerom integrisanom u sistem za automatsku digitalnu akviziciju slike, BioDocAnalyze sistemom. Veliki fragmenti DNK određuju se pomoću adekvatnih komercijalnih markera (Fermentas).

4.4. Ekstravilusna trofoblastna elijska linija HTR-8/SVneo

Citotoksi ni efekat klini kog *A. actinomycetemcomitans* izolata ispitan je na ekstravilusnoj trofoblastnoj elijskoj liniji HTR-8/SVneo.

eljska linija HTR-8/Svneo dobijena je ljubaznoš u dr Charls H. Graham-a (Queen's University, Kingston, ON, Canada). Ova elijska linija dobijena je transfekcijom populacije ekstravilusnih elija humane placente prvog trimestra trudno e SV40 T antigenom (Graham i sar., 1993; Irving i sar., 1995).

HTR-8/SVneo elijska linija je hiperproliferativna i hiperinvazivna linija i eksprimira sve markere prisutne i kod normalnih ekstravilusnih elija (King i sar., 1995). elije su gajene u RPMI 1640 medijumu koji sadrži 5% fetalni tele i serum (FCS, PAA Laboratories, Linz, Austria), gentamicin (Sigma) i Amfotericin B, što predstavlja kompletan medijum. elije su gajene u plasti nim flaskovima (Falcon, Becton Dickinson, USA), pri temperaturi od 37°C, u atmosferi 95% O₂ i 5% CO₂. U svakom otvoru je bilo oko 2 X 10⁴ HTR-8/SVneo elija koje su upotrebljene u MTT testu.

4.4.1. Bakterijska kultura

Klini ki izolat bakterije *A. actinomycetemcomitans*, serotipa e i kompletnim promoterom operona *ltx* gena je koriš en u ovom testu. Izolovana kolonija sa TSBV podloge je zasejana u BHI (Brain Heart Infusion) medijum (Brain Heart Infusion Broth, BioMérieux, Francuska). Nakon 7 dana inkubacije pri temperaturi od 37°C, u atmosferi

95% O₂ i 5% CO₂, koncentracija bakterija u suspenziji je kvantifikovana merenjem optičke gustine (OD 550 nm) u spektrofotometru.

Kao pozitivna kontrola u ovom eksperimentu korišćen je referentni soj *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277. Pojedinačne kolonije izrasle na Chedler-ovom agaru (krvni agar obogaćen heminom i vitaminom K) su zasejane u tečni Chedler-ov medijum i nakon 3 dana inkubacije pri temperaturi od 37°C, u atmosferi 95% O₂ i 5% CO₂, koncentracija bakterija u suspenziji je kvantifikovana merenjem optičke gustine (OD 660 nm) u spektrofotometru.

Bakterije su vorteksovane 4 minuta pri 4000 rpm i nakon odlivanja supernatanta resuspendovane u RPMI, nakon čega su pravljena razblaženja za infekciju.

4.4.2. *Tretman elija*

HTR-8/SVneo elije su resuspendovane u kompletnom RPMI 1640 medijumu i rasejane u ploču sa 96 mesta, u koncentraciji 2×10^4 elija/otvoru i gajene na temperaturi od 37 °C, u atmosferi 95% O₂ i 5% CO₂. Nakon 24 sata, elije su isprane PBS-om (engl. Phosphate Buffered Saline), a zatim je u svaki otvor dodato po 100 µl RPMI koji sadrži određeni broj *A. actinomycetemcomitansa* (MOI=500 i 5000; MOI-engl. Multiplicity Of Infection), odnosno *Porphyromonas gingivalis* (MOI=100 i 1000). Nakon centrifugiranja (10 min, 1000g), elije su inkubirane na 37°C jedan sat, a zatim isprane dva puta PBS-om koji sadrži gentamicin i nakon toga kompletnim medijumom. U otvore je dodato po 100 µl medijuma i ostavljeno da se inkubira na 37°C narednih 6h, odnosno 24h. Nakon 6h inkubacije, uklonjen je medijum, elije su isprane jedanput

PBS-om i dodato je po 100 μ l 3-[4,5-dimetiltiazol-2-yl]-2,5 difenil tetrazolium bromida u koncentraciji 1 mg/ml. Ova procedura je ponovljena i posle 24h.

4.4.3. Detekcija i kvantitacija elija (MTT test)

Broj živih elija je odre ivan MTT testom (Hanisch i sar., 1993). Nakon tretmana, dodato je 100 μ l MTT (1 mg/ml) u RPMI medijumu bez fenol crvenog, i inkubirano dva sata na 37°C. Rastvor MTT-a je uklonjen, a u svaki otvor je dodato 100 μ l 1-propanola (Lachema, eška Republika). Nakon rastvaranja istaložene boje, merena je opti ka gustina na 540 nm u ita u Microplate reader (LKB).

4.5. Statisti ka obrada podataka

Statisti ka analiza podataka izvedena je primenom komercijalnog softvera (SAS Enterprise Guide 4.1, SAS Institute Inc., 2008) gde je koriš en nivo poverenja od 95%.

U analizi vrednosti klini kih parametara (KNP, PI, DS and NPE), koriš eni su indikatori deskriptivne statistike. Svi podaci su izraženi srednjim vrednostima i standardnom devijacijom.

Sve vrednosti varijabli su testirane Kolmogorov-Smirnov testom u cilju odre ivanja normalnosti distribucije, a u zavisnosti od tipa distribucije su koriš eni odgovaraju i testovi (parametrijski ili neparemetrijski). Merene vrednosti su izražene

kao srednja vrednost \pm standardna devijacija i interval poverenja vrednosti. Vrednosti su poređene između grupa Wilcoxon rank-sum testom, pri čemu je za mikrobiološke varijable korišćena "exact" opcija u cilju povećanja preciznosti merenja na malom uzorku. Korelacije među merenim parametrima evaluirane su pomoću Spearman-ovog koeficijenta korelacije.

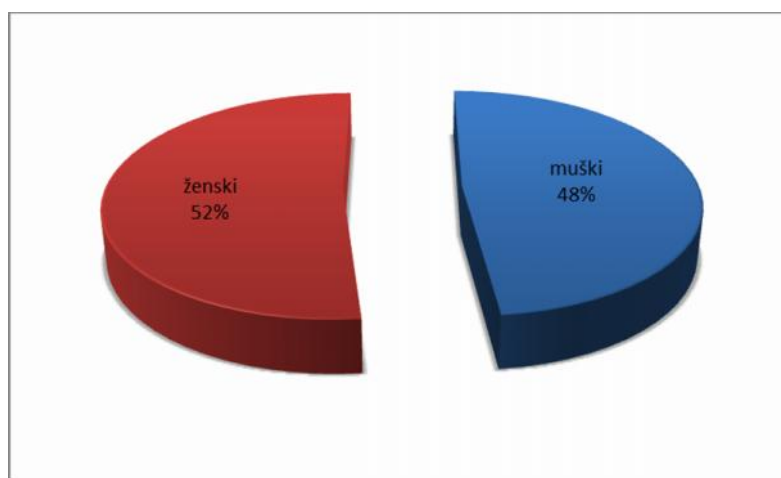
Rezultati MTT testa su statistički obrađeni u programu Statistical Software Program Version 5.0 (Primer of Biostatistic, McGraw-Hill Companies Inc., New York, NY; USA) primenom ANOVA testa.

5. REZULTATI

5.1. Demografske karakteristike i parodontalni status ispitanika

U ovo istraživanje je bilo uključeno 90 ispitanika (44 muškaraca (48%) i 46 žena (52%)) (Grafik 5.1.), koji su na osnovu parodontalnog statusa bili razvrstani u 3 grupe od po 30 ispitanika:

1. grupa A (agresivna parodontopatija)
2. grupa H (hronična parodontopatija)
3. grupa Z (zdrav parodoncijum)



Grafik 3.1. Distribucija ispitanika uključених u studiju prema polu

Demografske karakteristike ispitanika uključених u studiju su predstavljene u Tabeli 3.1.

Tabela 3.1. Demografske karakteristike ispitanika uklju enih u studiju

	POL		STAROST*	Puša i	Nepuša i
	Muški	Ženski			
A grupa	16/30	14/30	26.5±5	8/30	22/30
	53.3%	46.7%		26.7%	73.3%
H grupa	13/30	17/30	51.5±13.5	12//30	18/30
	43.3%	56.7%		40%	60%
Z grupa	15/30	15/30	23±2.5	5/30	25/30
	50%	50%		16.7%	83.3%

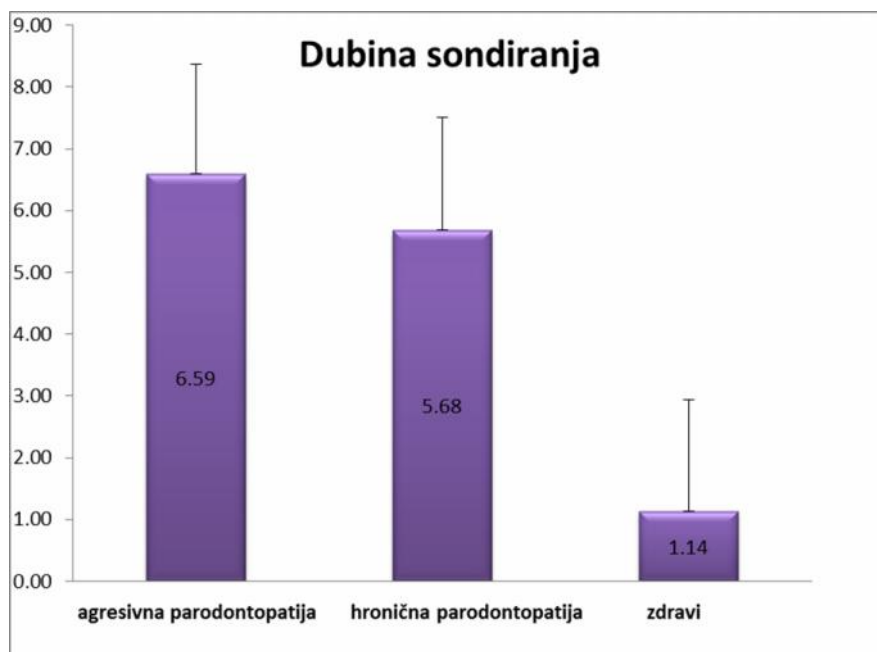
*Starost ispitanika izražena kao srednja vrednost ± standardna devijacija.

5.1.1. Klinički parametri

Glavno obeležje i patognomoni an znak parodontopatije je gubitak alveolarne kosti uz posledično formiranje parodontalnog džepa. Različiti klinički parametri kao što su dubina sondiranja (DS), nivo pripojnog epitela (NPE) i krvarenje na provokaciju (KNP) se koriste u cilju postavljanja dijagnoze ovog oboljenja, kao i za detekciju inflamatornih lezija.

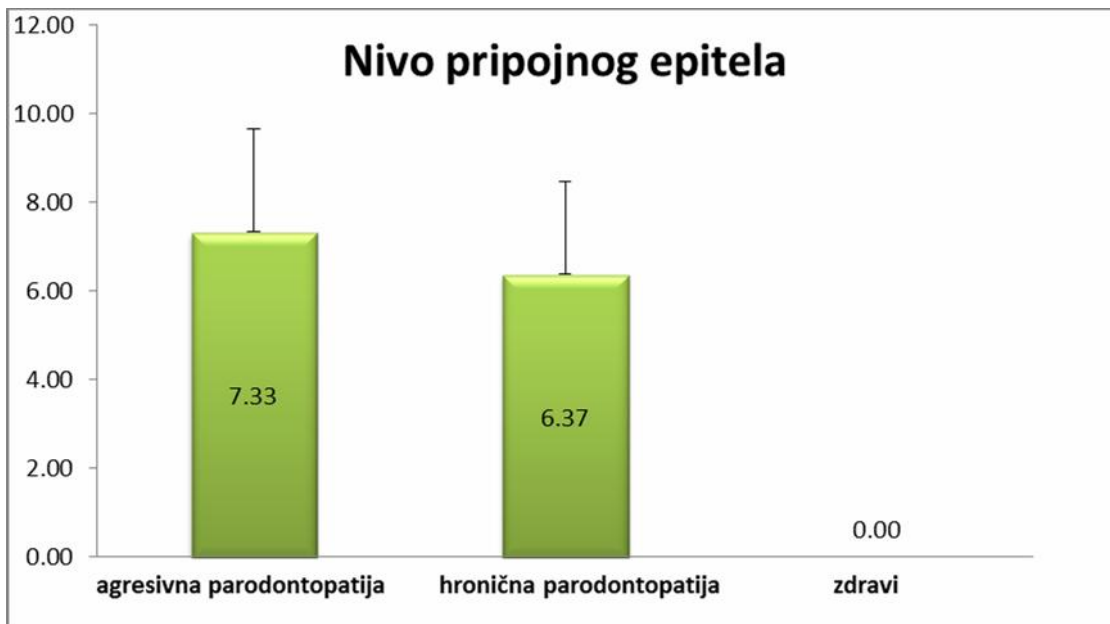
Srednje vrednosti dubine sondiranja (DS) iznosile su 6.59 ± 1.47 mm u A grupi, 5.68 ± 1.30 mm u H grupi i 1.14 ± 0.84 mm u Z grupi. Upoređivanjem dobijenih prosečnih vrednosti DS među grupama potvrđene su statistički značajno veće vrednosti ovog parametra kod obolelih od parodontopatije u odnosu na grupu zdravih ispitanika

($p=0.000$). Srednje vrednosti dubine sondiranja u A grupi su bile statisti ki zna ajno ve e nego u H grupi ($p=0.000$) (Grafik 3.2).



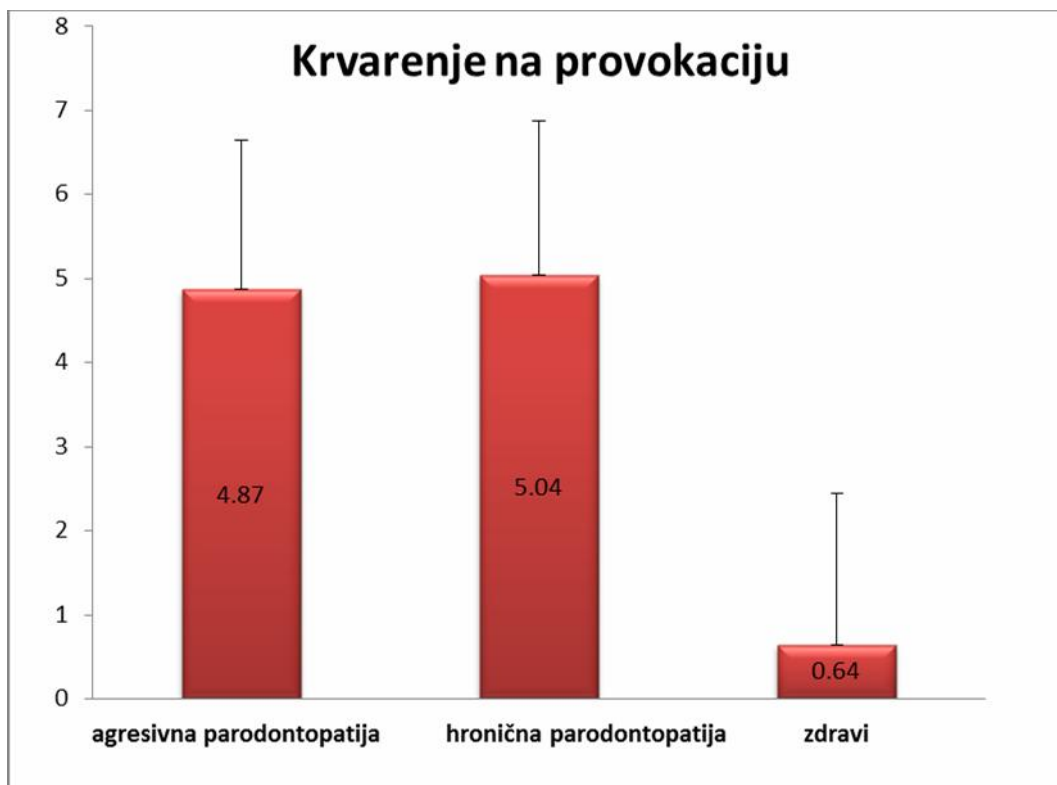
Grafik 3.2. Srednje vrednosti dubine sondiranja (DS) kod obolelih od agresivne i hroni ne parodontopatije, kao i kod osoba sa klini ki zdravim parodontcijumom.

Srednje vrednosti nivoa pripojnog epitela (NPE) iznosile su 7.33 ± 2.32 mm u A grupi, 6.37 ± 2.11 mm u H grupi i 0.00 ± 0.00 mm u Z grupi (Grafik 3.3.). Kompariraju i dobijene srednje vrednosti NPE me u grupama utvr ene su statisti ki zna ajno ve e vrednosti ovog parametra kod obolelih od parodontopatije u odnosu na grupu zdravih ispitanika, pri emu su srednje vrednosti NPE u A grupi su bile statisti ki zna ajno ve e nego u H grupi ($p=0.027$).



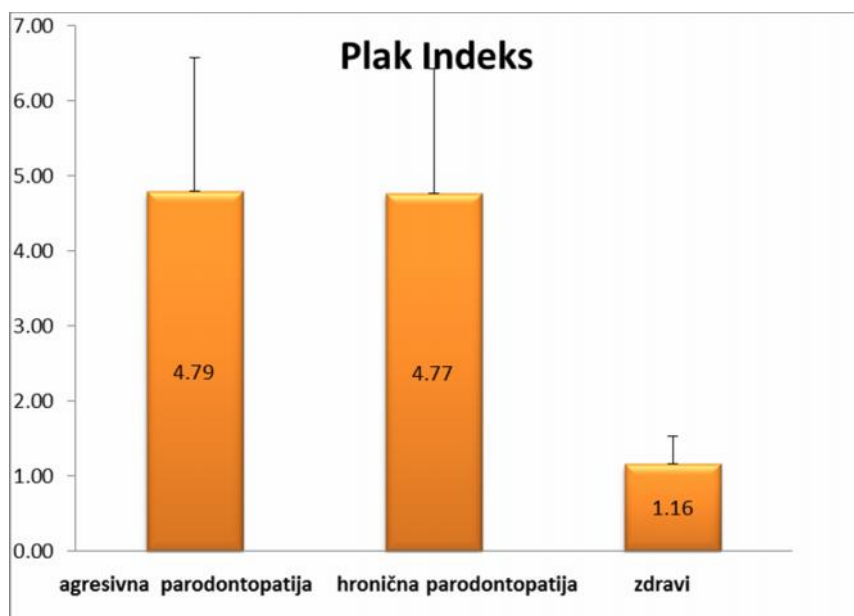
Grafik 3.3. Srednje vrednosti nivoa pripojnog epitela (NPE) kod obolelih od agresivne i hronične parodontopatije, kao i kod osoba sa klinički zdravim parodontcijumom

Srednje vrednosti krvarenja na provokaciju (KNP) bile su 4.87 ± 1.77 u A grupi, u 5.04 ± 1.83 u H grupi i 0.64 ± 1.80 u Z grupi (Grafik 3.4.). Uporeivanjem dobijenih prosečnih vrednosti KNP među grupama potvrđene su statistički značajne veće vrednosti ovog parametra kod obolelih od parodontopatije u odnosu na grupu zdravih ispitanika ($p=0.000$). Nije utvrđena statistički značajna razlika srednjih vrednosti krvarenja na provokaciju među obolelima od različitih kliničkih formi parodontopatije ($p=0.154$).



Grafik 3.4. Srednje vrednosti krvarenja na provokaciju (KNP) kod obolelih od agresivne i hronične parodontopatije, kao i kod osoba sa klinički zdravim parodontocijumom

U cilju procene nivoa oralne higijene korišćen je Plak Indeks (PI). Prosečne vrednosti plak indeksa iznosile su 4.79 ± 1.79 u A grupi, 4.77 ± 1.66 u H grupi i 1.16 ± 0.37 u Z grupi (Grafik 3.5.). Poređenjem dobijenih prosečnih vrednosti PI me u grupama potvrđene su statistički značajne veće vrednosti ovog parametra kod obolelih od parodontopatije u odnosu na grupu zdravih ispitanika ($p=0.000$). Nije utvrđena statistički značajna razlika srednjih vrednosti Plak Indeksa me u obolelima od različitih kliničkih formi parodontopatije ($p=0.316$).



Grafik 3.5. Srednje vrednosti Plak Indeksa (PI) kod obolelih od agresivne i hronične parodontopatije, kao i kod osoba sa klinički zdravim parodontocijumom

Rezultati ispitivanja kliničkih parametara su sumirani u Tabeli 3.2. gde su prikazane srednje vrednosti DS, NPE, KNP i PI po grupama ispitanika.

Tabela 3.2. Klinički parametri ispitanika uključeni u studiju

	Agresivna parodontopatija	Hronična parodontopatija	Zdravi	P -vrednost
KNP	4.87±1.77	5.04 ± 1.83	0.64±1.80	0.154 AP/HP 0.000* AP>Z 0.000* HP>Z
DS	6.59 ± 1.47	5.68 ± 1.30	1.14±0.84	0.000* AP>HP 0.000* AP>Z 0.000* HP>Z
NPE	7.33± 2.32	6.37 ± 2.11	0.00±0.00	0.027* AP>HP 0.000* AP>Z 0.002* HP>Z
PI	4.79±1.79	4.77 ± 1.66	1.16±0.37	0.316 AP/HP 0.000* AP>Z 0.000* HP>Z

Sve vrednosti su izražene kao srednja vrednost ± standardna devijacija, KNP-krvarenje na provokaciju, DS-dubina sondiranja, NPE-nivo pripojnog epitela, PI-Plak Indeks, *p-vrednost <0.05 Wilcoxon rank sum test.

5.2. Kultivacija bakterija subgingivalnog dentalnog plaka

U cilju kultivacije bakterije *A. actinomycetemcomitans*, formirana su dva različita pulovana uzorka subgingivalnog dentalnog plaka. Na hranljiva podloge zasejavan je materijal koji je uvan u 10% glicerolu i materijal koji je transportovan u RTF-u.

5.2.1. Kultivacija materijala uvanog u 10% glicerolu

Materijal koji se uvaao u 10% glicerolu je nakon odmrzavanja razmazivan direktno korišćenim papirnim poenima na Tryptic Soy–Serum–Bacitracin–Vancomycin Agar (TSBV) (Slots, 1982). Šolje su inkubirane na temperaturi od 37°C, 3-5 dana, u mikroaerofilnim uslovima (5% CO₂). Zasejano je ukupno 23 uzorka, a nakon opservacionog perioda od 5 dana na 19 (82.61%) šolja su se pojavile bakterijske kolonije.

Na osnovu makroskopskih karakteristika, selektovane su male, okrugle, translucetne kolonije koje su dalje procesuirane u cilju izolacije bakterijske DNK radi daljih molekularnih analiza. Rezultati sekvenciranja su pokazali da nijedna od selektovanih bakterijskih kolonija nije pripadala vrsti *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

5.2.2. Kultivacija materijala transportovanog u RTF-u

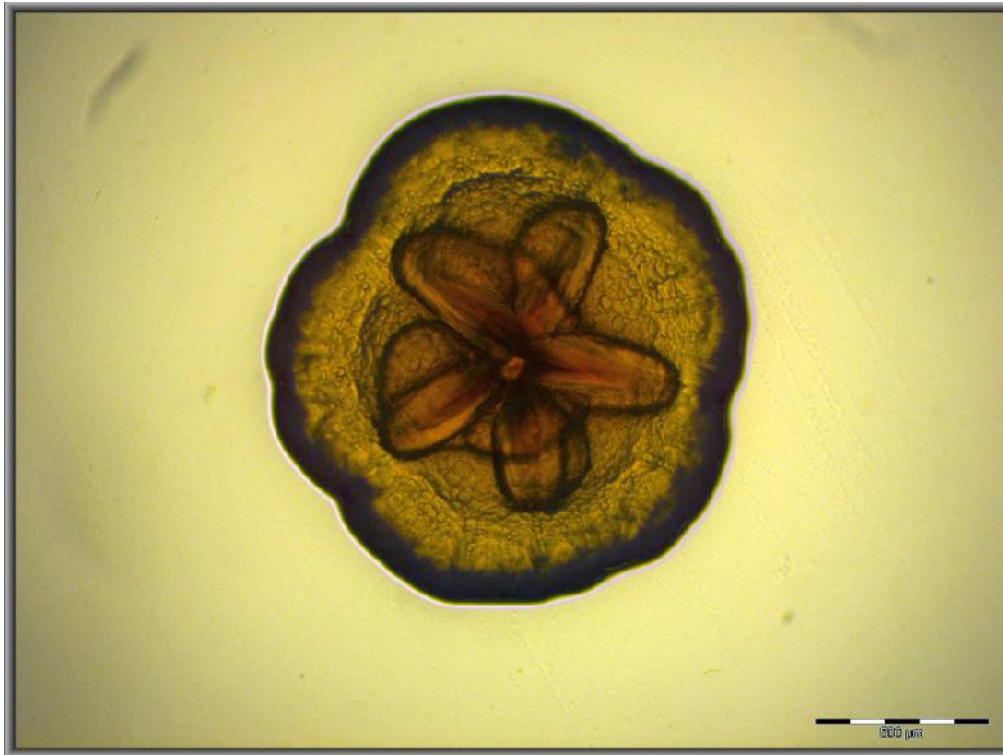
Materijal transportovan u RTF-u je u narednih 24h od momenta uzorkovanja zasejavan u različitim razblaženjima na 2 vrste podloga: TSBV i Kolumbiju agar

(bioMérieux, Francuska). Nakon vorteksovanja u trajanju od 30 s, 100 μ l uzorka u razblaženju 10^{-1} je zasejano na TSBV podlogu, dok je 100 μ l razblaženja 10^{-2} i 10^{-3} zasejano na Kolumbija agar. Šolje su inkubirane na temperaturi od 37°C , 3-5 dana, u mikroaerofilnim uslovima (5% CO_2) i nakon toga posmatrane pod svetlosnim mikroskopom (10x uveli anje).

Od 45 uzorka transportovanih u RTF-u, 24 je zasejano na TSBV podlogu. Posmatraju i pod mikroskopom, selektovano je 7 kandidata sa karakterističnom unutrašnjom zvezdastom strukturom kolonije. Preostalih 21 uzoraka je zasejano na Kolumbija agar, a 12 potencijalnih kandidata na osnovu mikroskopskog izgleda kolonije selektovano u cilju daljih analiza.



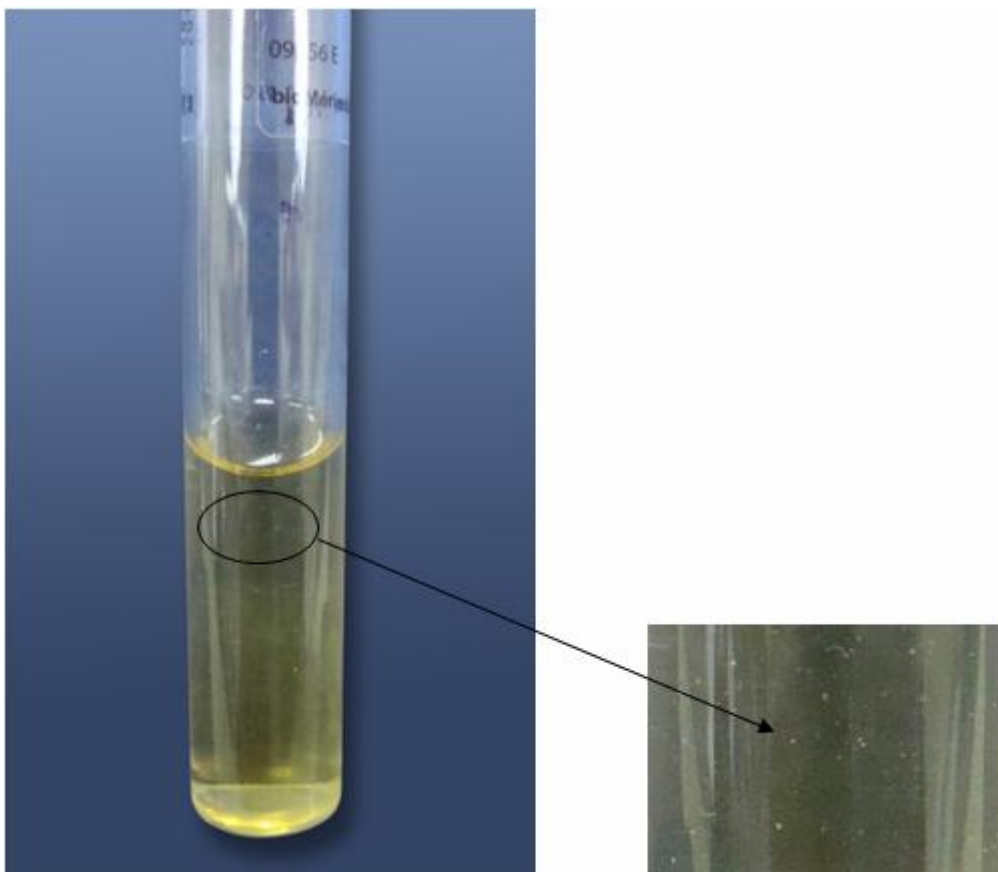
Slika 3.1. ista kultura bakterije *A. actinomycetemcomitans* na TSBV podlozi



Slika 3.2. Kolonija bakterije *A. actinomycetemcomitans* na TSBV podlozi, 4x uveli anje. Uo ava se centralno postavljena zvezdasta struktura, ivice kolonije blago talasaste i tamno prebojene.

5.2.3. Kultivacija u te nim hranljivim podlogama

U cilju dobijanja te nih kultura koriš ene su dve vrste te nih podloga, TSBV i BHI (Brain Heart Infusion Broth, bioMérieux, Francuska). Tokom kultivacije u te noj hranljivoj podlozi, kolonije *A. actinomycetemcomitans* su se lepale za zidove plasti ne ili staklene epruvete i nisu zamu ivale difuzno podlogu (Slika 3.3.). Nakon vorteksovanja, odvajale se od podloge i padale na dno epruvete u vidu taloga, pri emu je te ni medijum ostajao nezamu en. Izolati su pokazivali ova adhezivna svojstva i posle 6 meseci kontinuiranog presejavanja.



Slika 3.3. Te na kultura bakterije *A. actinomycetemcomitans*

5.3. Prevalenca i distribucija kultivacijom identifikovanih *A. actinomycetemcomitans* izolata

Kultivacijom na TSBV podlozi je me u 24 pacijenta (10 iz A grupe, 10 iz H grupe i 4 iz Z grupe) identifikovan *A. actinomycetemcomitans* kod 5 pacijenata (3 muškarca i 2 žene), odnosno kod 21.83% ispitanika. Me u *A. actinomycetemcomitans* pozitivnim pacijentima, 4 (90%) je pripadalo grupi agresivnih parodontopatija, prose ne starosti 31 ± 4 godina, dok je 1 pacijent (10%) bolovao od hroni ne parodontopatije (65 godina starosti). 90% *A. actinomycetemcomitans* pozitivnih su bili puša i.

Srednja vrednost dubine sondiranja na *A. actinomycetemcomitans* pozitivnim mestima bila je 7.26 ± 1.84 mm i sva mesta su krvarila na provokaciju. Prosečna vrednost Plak Indeksa iznosila je 4.76 ± 1.81 .

5.4. Izolacija bakterijske DNK

U ovom radu bakterijska DNK je izolovana na tri različita načina: primenom visoke temperature, fenolom i upotrebom komercijalnih kitova.

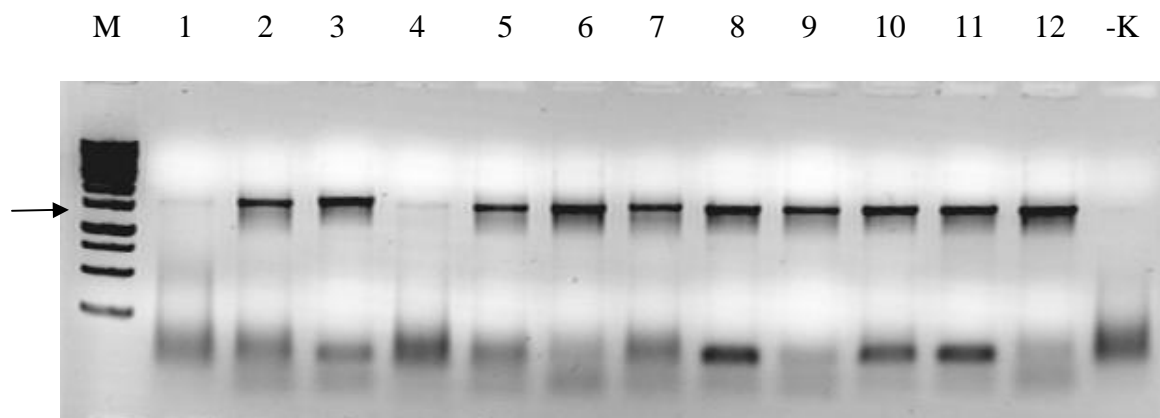
5.4.1. Izolacija ukupne bakterijske DNK visokom temperaturom

Kolonije koje su porasle na TSBV i Kolumbija agaru, kao i one koje su rasle u tečnom TSBV medijumu su nakon resuspendovanja u 1 ml sterilne destilovane vode kuvane na temperaturi od 100°C u trajanju od 5 min. Rezultati PCR analize za 16S rRNK su pokazali potpuno odsustvo PCR proizvoda, što govori u prilog tome da se ova metoda izolacije bakterijske DNK ne može koristiti kod *A. actinomycetemcomitans* izolata.

5.4.2. Rezultati izolacije ukupne bakterijske DNK iz bakterijskih sojeva fenolom

Iako se ova metoda pre svega koristi za izolovanje ukupne DNK iz bakterija roda *Streptomyces* (Hopwood *et al.*, 1985), pokazala se kao veoma efikasna i za izolaciju DNK iz drugih bakterija. Od 12 ispitivanih uzoraka, samo kod dva (kolone 1 i 4) detektovane su trake slabog intenziteta (Slika 3.4), za koje se kasnije potvrdilo da

pripadaju vrsti *A.a.* Dobijeni rezultati su pokazali da primenom ove metode nije moguće uspešno izolovati DNK iz *A. actinomycetemconitans* izolata (Slika 3.4.).

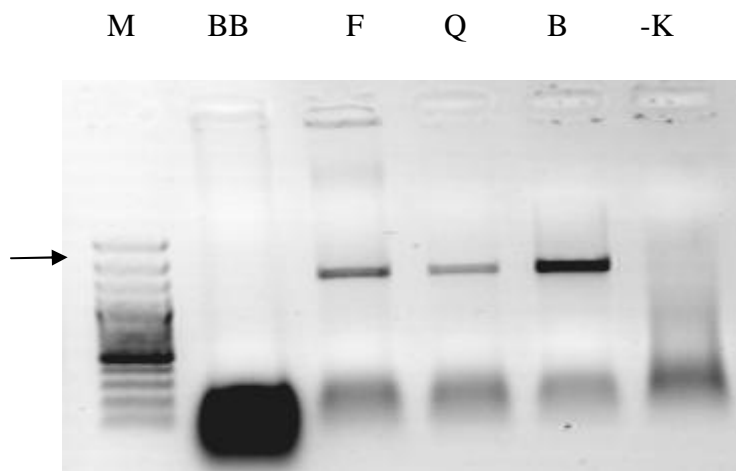


Slika 3.4. PCR produkti umnožavanja 16S rDNK gena univerzalnim prajmerima nakon izolacije ukupne bakterijske DNK fenolom.

M-Standard molekularnih veličina (O'GeneRuler™ 100 bp DNK marker); 1-12 potencijalni *Aa* kandidati; K- Kontrolna PCR reakcija bez DNK.

5.4.3. Izolacija komercijalnim kitovima

Upotrebom četiri različita komercijalna krita, izolovana je DNK iz *Aa* izolata. Izolacija DNK iz *A. actinomycetemconitans* izolata bila je efikasna primenom Genomic Purification krita (Fermentas), QIAamp DNA Mini Krita (Qiagen) i ISOLATE Genomic DNA Krita (Bioline), dok primenom BugBuster® Protein Extraction Reagent (Merck Millipore) (Slika 3.5.), kao ni KAPA Kitom izolacija DNK nije bila uspešna (rezultati nisu prikazani).



Slika 3.5. PCR produkti umnožavanja 16S rDNK gena univerzalnim prajmerima nakon izolacije ukupne bakterijske DNK komercijalnim kitovima.

M-Standard molekulskih veličina (O'GeneRuler™ 100 bp DNK marker), F-Genomic Purification kita (Fermentas), Q-QIAamp DNA Mini Kita (Qiagen), B-ISOLATE Genomic DNA Kita (Bioline), K- Kontrolna PCR reakcija bez DNK.

5.5. Sekvenciranje izolata dobijenih kultivacijom

Izolati selektovani sa TSBV i Kolumbija agara iz drugog i trećeg pulovanog uzorka, kao i PCR produkti dobijeni PCR reakcijom za umnožavanje dela gena 16S rRNA su sekvencirani, sekvence sastavljene u SeqMan programu, a njihovi homologe identifikovani upotrebom BLAST algoritma (Altschul i sar., 1997; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Analiza sekvenci izolata selektovanih sa TSBV podloge iz drugog pulovanog uzorka je pokazala da najveći broj izolata pripada rodu *Campylobacter*, zatim *Capnocytophaga* i vrsti bakterije *Eikenella corrodens* dok izolacija bakterije *A. actinomycetemcomitans* nije potvrđena sekvenciranjem (Tabela 3.3.).

Analiza sekvenci 4 izolata selektovanih sa TSBV podloge iz trećeg pulovanog uzorka je pokazala da svi izolati pripadaju vrsti *A. actinomycetemcomitans*.

Analiza sekvenci 12 izolata selektovanih sa Kolumbija podloge iz trećeg pulovanog uzorka je pokazala da najveći broj izolata pripada rodu *Streptococcus*, dok kultivacija *A. actinomycetemcomitans*-a na ovoj podlozi nije potvrđena sekvenciranjem.

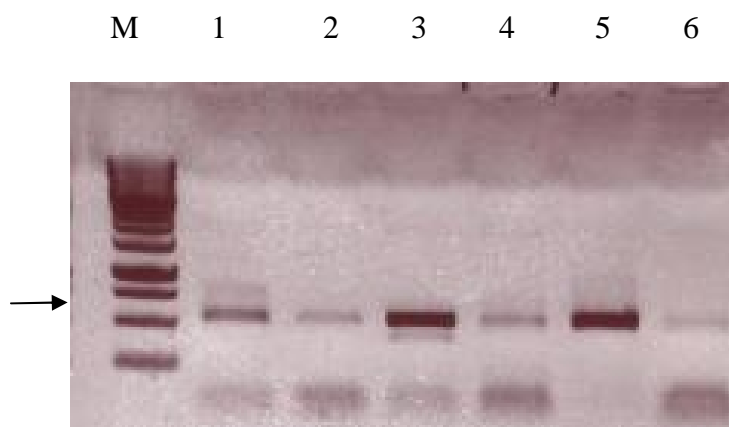
Tabela 3.3. *In silico* analiza sekvenci 16S rRNA gena izolata dobijenih kultivacijom

izolat	Izvorni takson	Pristupni broj sekvence	Poklapanje sekvenci (%)
SN-3	<i>Campylobacter curvus</i> LMG 11127	AF550651	99.87
	<i>Campylobacter curvus</i> ATCC 35224	NR_043603	99.73
SN-6	<i>Campylobacter concisus</i> CHR3152	HM536952	99.71
SN-21	<i>Campylobacter gracilis</i> LMG 7616	AF550656	99.72
	<i>Campylobacter gracilis</i> ATCC 33236	NR_043605	99.72
SN-22	<i>Campylobacter gracilis</i> CCUG 27721	AF550658	98.83
	<i>Campylobacter gracilis</i> CCUG 13143	AF550657	98.83
	<i>Campylobacter gracilis</i> LMG 7616	AF550656	98.83
	<i>Campylobacter gracilis</i> ATCC 33236	NR_043605	98.83
SN-28	<i>Campylobacter gracilis</i> CCUG 27721	AF550658	99.73
	<i>Campylobacter gracilis</i> CCUG 13143	AF550657	99.73
	<i>Campylobacter gracilis</i> LMG 7616	AF550656	99.73
	<i>Campylobacter gracilis</i> ATCC 33236	NR_043605	99.73
SN-29	<i>Campylobacter gracilis</i> LMG 7616	AF550656	98.96
	<i>Campylobacter gracilis</i> ATCC 33236	NR_043605	98.96
SN-34	<i>Capnocytophaga</i> sp. WWP_SS2_G57	GU412132	97.93
	<i>Capnocytophaga ochracea</i> DSM 7271	CP001632	97.77
SN-41	<i>Campylobacter gracilis</i> LMG 7616	AF550656	99.57
	<i>Campylobacter gracilis</i> ATCC 33236	NR_043605	99.57
SN-42	<i>Eikenella corrodens</i> JCM12952	AB525415	99.74

5.6. Reakcije umnožavanja dela 16S rRNK gena bakterije *A. actinomycetemcomitans*

U cilju identifikacije bakterije *A. actinomycetemcomitans* u reakcijama lananog umnožavanja korišteni su jedan univerzalni 27f (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') i jedan za vrstu specifičan prajmer (CACTTAAAGGTCCGCCTACGTGC) koji amplifikuju deo 16S rRNK gena bakterije *A. actinomycetemcomitans*. Suspenzija ukupnog plaka je korišćena kao matrica za PCR amplifikaciju, a bakterijska DNK iz uzorka je izolovana kuvanjem.

Analiza dobijenih PCR produkata je vršena elektroforezom na 2% agaroznom gelu. Očekivana dužina čistog PCR produkta je bila 570 bp. Postojanje dela 16S rRNK gena *A. actinomycetemcomitans* je potvrđeno prisustvom PCR produkta očekivane dužine.



Slika 3.6. Agarozna gel elektroforeza umnoženih delova gena za 16S rRNK bakterije *A. actinomycetemcomitans*

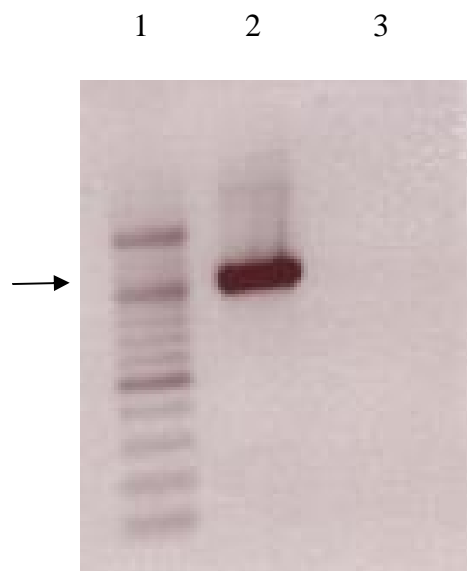
M-Standard molekularnih veličina (O'GeneRuler™ 100 bp DNK marker); 1-*Capnocytophaga ochracea*; 2-*Bacillus turigiensis*; 3-*Aggregatibacter segnis*; 4-*Capnocytophaga*; 5-*Aggregatibacter aphrophylus*; 6-Kontrolna PCR reakcija bez DNK.

Od 45 uzoraka analiziranih na ovaj način, 23 su dali trake na 570 bp. Međutim, sekvenciranjem PCR produkata dobijenih u ovim reakcijama pokazano je da je korištenjem ovih prajmera koji bi trebalo da budu specifični za *A. actinomycetemcomitans* došlo do umnožavanja dela 16S rRNA gena drugih bakterijskih vrsta (Slika 3.6.).

5.7. Genotipizacija promotora *ltx* operona

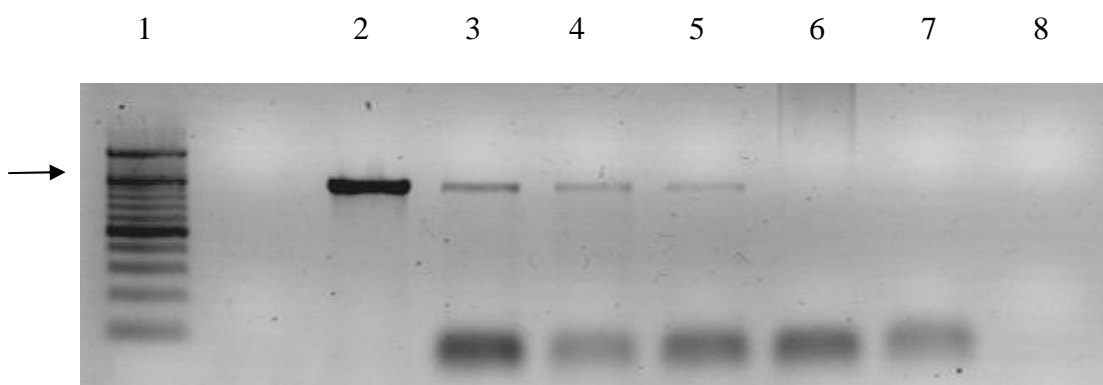
U cilju karakterizacije gena za leukotoksin *A. actinomycetemcomitans* izolata, primenjene su PCR reakcije koje su ranije opisane (Haubek i sar., 1996).

Analiza dobijenih PCR produkata je vršena elektroforezom na 2% agaroznom gelu. Očekivana dužina wt PCR produkta je 1034 ili 504 bp. Postojanje *ltx* gena je pokazano prisustvom PCR produkta očekivane visine na 1034 bp (Slika 3.7.), što odgovara nehiperleukotoksičnom fenotipu izolata *A. actinomycetemcomitans*.



Slika 3.7. Agarozna gel elektroforeza umnoženih delova *ltx* gena bakterije *A. Actinomycetemcomitans*. 1-Standard molekularnih veličina (O'GeneRuler™ 100 bp DNK marker); 2- Produkt PCR reakcije (promotor *ltx* operona); 3-Kontrolna PCR reakcija bez DNK.

Svi *A. actinomycetemcomitans* izolati poseduju *ltx* gen, tako da se ova reakcija može uspešno primenjivati u cilju diferencijacije različitih vrsta u okviru roda *Aggregatibacter* (Slika 3.8.).



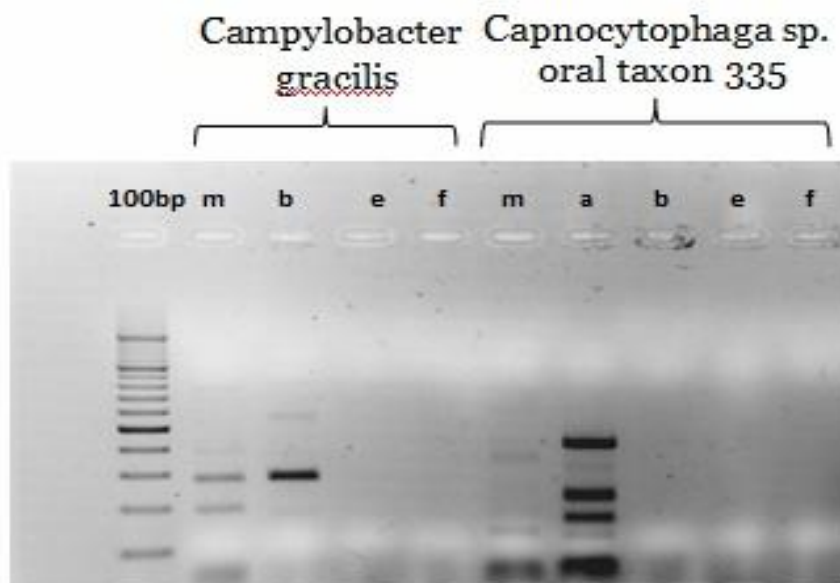
Slika 3.8. Agarozna gel elektroforeza umnoženih delova *ltx* gena *A. Actinomycetemcomitans* izolata

1-Standard molekularnih veličina (O'GeneRuler™ 100 bp DNK marker); 2-5 Produkt PCR reakcije (promotor operona *ltx*) *A. actinomycetemcomitans* izolata; 6-*A. segnis*; 7-*A. aphrophilus*; 8-Kontrolna PCR reakcija bez DNK.

5.8. Serotip-specifi na genotipizacija Multiplex PCR-om

DNK izolovana primenom visoke temperature iz kolonija selektovanih sa TSBV podloga, koje su bile rezultat zasejavanja materijala uvanog u 10% glicerolu, je poslužila kao matrica za PCR amplifikaciju serotip-specifi nih gena. Ove PCR reakcije su ra ene na samom po etku istraživanja prema ranije opisanoj metodologiji (Suzuki i sar., 2001). U to vreme, rezultat uspešnosti izolacije bakterijske DNK kuvanjem nije bio poznat.

Analiza dobijenih PCR produkata je vršena elektroforezom na 2% agaroznom gelu. Uzorci razdvojeni na agaroznom gelu prikazani su na Slici 3.9.



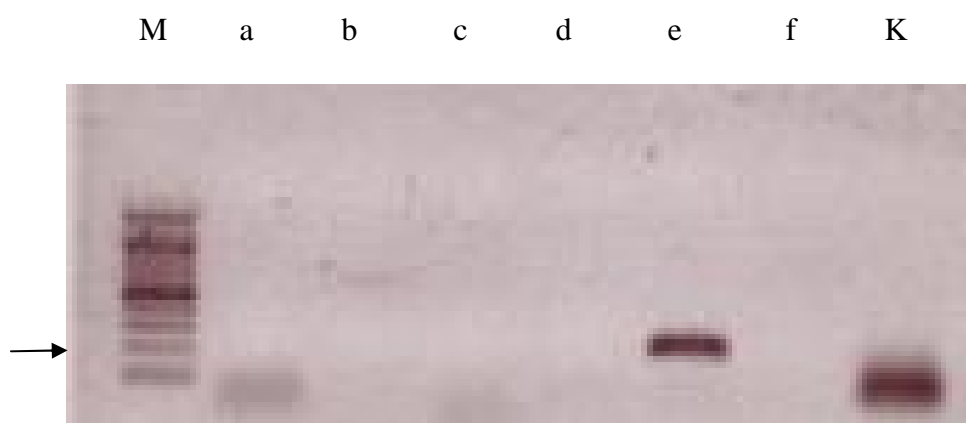
Slika 3.9. Elektroforetska analiza serotip-specifi nih PCR produkata izolata selektovanih sa TSBV podloge (potencijalni Aa kandidati, za koje je kasnije sekvenciranjem potvr eno da pripadaju vrsti *Campylobacter gracilis* i rodu *Capnocytophaga*).

m-multiplex PCR; a, b, e, f-konvencionalni PCR za svaki serotip; 100 bp – 100 bp Ladder (Fermentas).

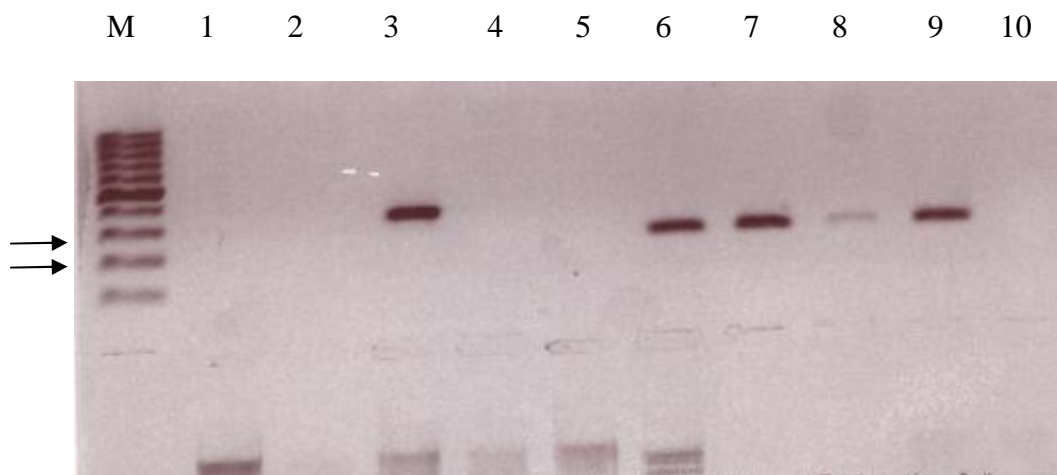
5.9. Serotip-specifi na genotipizacija konvencionalnim PCR-om

Pošto multipleks PCR reakcije nisu dale jasan i konkretan rezultat, isti parovi prajmera su korišteni i u konvencionalnim PCR reakcijama. DNK izolovana komercijalnim kitom poslužila je kao matrica za PCR amplifikaciju serotip specifičnih gena, sekvenciranjem i potvrđivanjem *A. actinomycetemcomitans* izolata. Primenjeni su restriktivniji uslovi u odnosu na ranije opisane multiplex PCR reakcije (Suzuki i sar., 2001), odnosno povećana je temperatura anilina.

Analiza dobijenih PCR produkata je vršena elektroforezom na 2% gelu. Uzorci razdvojeni na agaroznom gelu prikazani su na Slici 3.10. Prisustvo produkta PCR reakcije na očekivanoj dužini od 211 bp govori u prilog tome da klinički izolati bakterije *A. actinomycetemcomitans* pripadaju serotipu e, dok PCR produkt dužine 298 bp govori u prilog prisustva serotipa b (Slika 3.11.). Prisustvo dva serotipa kod iste osobe detektovano je kod samo jednog pacijenta obolelog od hronične parodontopatije (prisutne trake na očekivanim dužinama u kolonama 3 i 8) (Slika 3.11.).



Slika 3.10. Elektroforetska analiza serotip-specifičnih PCR produkata kliničkih *A. actinomycetemcomitans* izolata. a, b, c, d, e, f-konvencionalni PCR za svaki serotip; M-100 bp – 100 bp Ladder (Fermentas); K-kontrolna PCR reakcija bez DNK.



Slika 3.11. Elektroforetska analiza serotip-specifi nih PCR produkata klini kih *A. actinomycetemcomitans* izolata.

M-100 bp – 100 bp Ladder (Fermentas); 1-4 konvencionalni PCR za serotip b; 6-9 konvencionalni PCR za serotip b; 5,10-kontrolna PCR reakcija bez DNK.

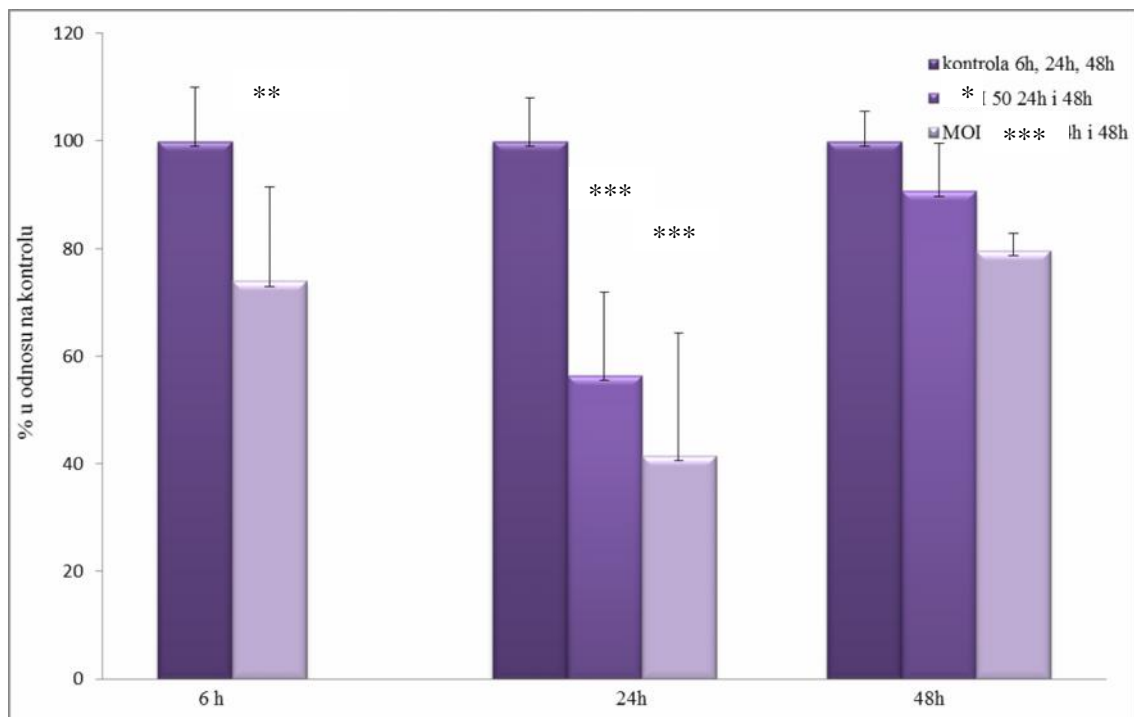
5.10. Uticaj *A. actinomycetemcomitans* izolata na ekstravilusnu trofoblastnu elijsku liniju HTR-8/SVneo

Jedna od pretpostavki koju smo želeli da ispitamo ovim radom je da li *A. actinomycetemcomitans* ima uticaja na HTR-8/SVneo elijsku liniju (Slika 3.12.). Upotrebljene su dve vrste bakterija *A. actinomycetemcomitans*, kao i *P. gingivalis* koji je poslužio kao pozitivna kontrola našeg eksperimenta, i praden je njihov uticaj na vijabilnost elija MTT testom.

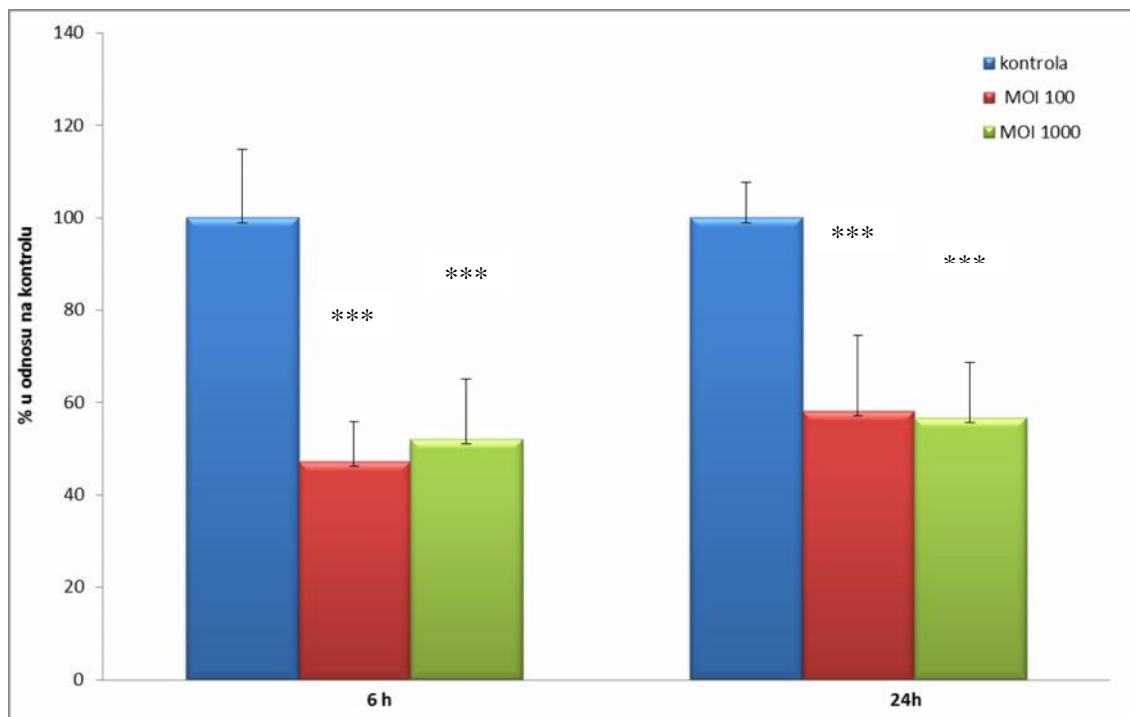
5.10.1. Efekat infekcije *A.actinomycetemcomitans* na vijabilnost elija

U ovim eksperimentima proučen je efekat delovanja bakterija *A. actinomycetemcomitans* i *P. gingivalis* na HTR-8/SVneo elije u tri vremenska intervala, šest sati, 24 sata i 48 sati od infekcije. Iako je u radovima drugih laboratorija pokazano da infekcija bakterijom *P. gingivalis* inhibira proliferaciju pojedinih elijskih linija trofoblasta (Katz i sar., 2009), bilo je neophodno utvrditi da li će i u našim eksperimentalnim uslovima infekcija ovom bakterijom uticati na broj vijabilnih elija. Nakon tretmana pri MOI=100, broj živih elija se smanjio 47,2% u odnosu na kontrolu šest sati posle infekcije, dok je 24 sata od infekcije broj vijabilnih elija smanjen (~58%) u odnosu na kontrolu. Sličan rezultat je dobijen i pri MOI=1000 (Grafik 3.7).

Blago smanjenje broja živih elija, 24,6% u odnosu na kontrolu koje se uočava šest sati nakon infekcije bakterijom *A. actinomycetemcomitans* pri MOI=500, prelazi u statistički značajno smanjenje od 79.7% nakon 24 sata (Grafik 3.6). Takođe, infekcija manjim brojem bakterija (MOI=50) dovela je do statistički značajnog smanjenja broja vijabilnih elija (~42%) posle 24h, ali se to smanjenje nije statistički značajno razlikovalo u odnosu na tretman većim brojem bakterija (MOI=500). Međutim, 48 sati nakon infekcije dolazi do statistički značajnog povećanja apsorbance, bez obzira na broj bakterija koje su korišćene u tretmanu, pri čemu je to povećanje apsorbance bilo statistički značajno veće nakon tretmana manjim brojem bakterija (MOI=50) (Grafik 3.6).



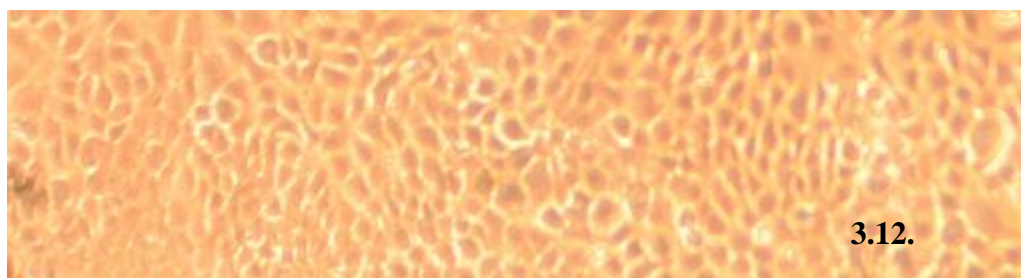
Grafik 3.6. Vijabilnost HTR-8/SVneo elija – uticaj infekcije bakterijom *A. actinomycetemcomitans*. Dobijene vrednosti predstavljaju srednju vrednost \pm standardna devijacija (SD) i izražene su kao procenat u odnosu na kontrolu; $n = 12$. * označava da je razlika između kontrole i tretmana, ili pojedinačnog i zajedničkog tretmana statistički značajna za $p < 0,05$, ** za $p < 0,01$ i *** za $p < 0,001$.



Grafik 3.7. Vijabilnost HTR-8/SVneo elija – uticaj infekcije bakterijom *P. gingivalis*. Dobijene vrednosti predstavljaju srednju vrednost \pm standardna devijacija (SD) i izražene su kao procenat u odnosu na kontrolu; n = 12. * označava da je razlika između kontrole i tretmana, ili pojedina i zajedničkog tretmana statistički značajna za $p < 0,05$, ** za $p < 0,01$ i *** za $p < 0,001$.

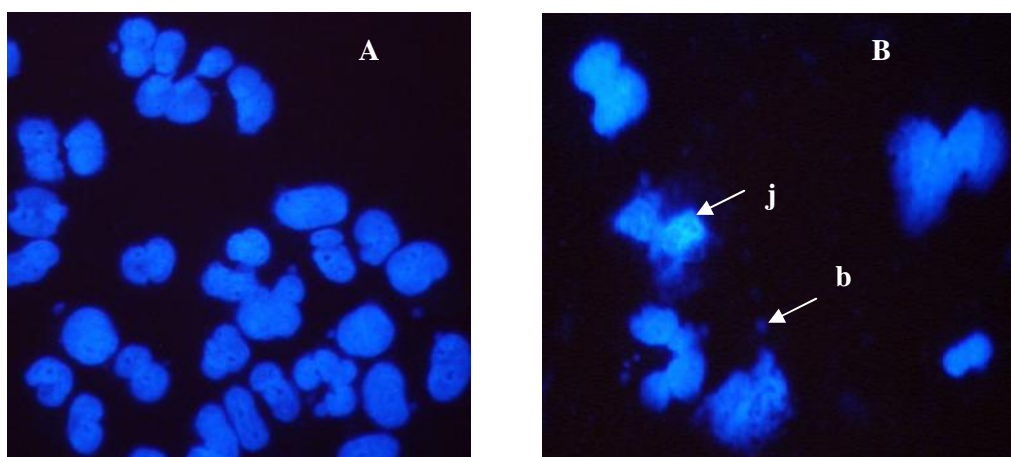
5.10.2. HTR-8/SVneo elije nakon infekcije bakterijom *A. actinomycetemcomitans*

Ekstravilusna elijska linija HTR-8/SVneo u odgovaraju em medijumu obrazuje konfluentan elijski sloj koji je prikazan na Slici 3.12.



Slika 3.12. Žive HTR-8/SVneo elije

U ovim eksperimentima su nakon infekcije uočene promene u izgledu jedara HTR-8/SVneo elija, u poređenju sa kontrolnom grupom elija (Slika 3.13., A, B). Bojenje jedara je prisutno kod obe grupe elija, ali jedra inficiranih elija, odnosno na neinficirane elije, se razlikuju po izgledu.



Slika 3.13. Jedra HTR-8/SVneo elije vizualizovana bojenjem DAPI reagensom u kulturi bez infekcije bakterijom *A.a* (A) i nakon bakterijske infekcije (B). Jedra HTR-8/SVneo elija su označena strelicom (B, j), dok su jedra bakterija označena vrhom strelice (B, b).

6. DISKUSIJA

Parodontopatije, inflamatorna oboljenja potpornog aparata zuba, su jedno od najčešćih oboljenja humane populacije. Sve veći broj studija koje ukazuju na činjenicu da infekcija u parodontijumu nema lokalizovani efekat već i da povećava rizik za nastanak nekih sistemskih oboljenja i stanja, stavlja parodontopatije u epicentar interesovanja naučne i stručne javnosti.

Uloga bakterija iz subgingivalnog dentalnog plaka u etiologiji parodontopatije je ekstenzivno dokumentovana (Curtis i sar., 2005, Socransky & Haffajee 1994, van Winkelhoff & Boutaga, 2005). *A. actinomycetemcomitans* se već dugo vremena unazad dovodi u vezu sa oboljenjima parodontijuma i podaci iz literature nesumnjivo dokazuju njegovu ulogu u etiologiji lokalizovane agresivne parodontopatije (Cao i sar., 2004; Cortelli i sar., 2003; Haubek & Westergaard, 2006; Wiebe & Putnins, 2000; Yang i sar., 2004). Veza sa drugim kliničkim formama parodontalnih oboljenja ili sa zdravim parodontijumom još uvek je nejasna (Socransky and Haffajee, 2008). Studije su pokazale da se *A. actinomycetemcomitans* može naći i manje od 20% u subgingivalnom dentalnom plaku osoba sa klinički zdravim parodontijumom (Rylev & Kilian, 2008). Istraživanja su pokazala da nisu svi *A. actinomycetemcomitans* izolati podjednako patogeni, a uloge drugih kultivabilnih i nekultivabilnih bakterija i njihova interakcija sa bakterijom *A. actinomycetemcomitans* bi tek trebalo objasniti. Za sada je poznato da *Porphyromonas gingivalis* i *Prevotella intermedia* proizvode proteaze koje mogu da smanje toksičnost bakterije *A. actinomycetemcomitans*, što vodi ka zaključku da bi kod

nekih pacijenata *A. actinomycetemcomitans* mogao da ima dopunsku ulogu u razvoju parodontopatije (Chen & Slots, 1999).

Prvi od ciljeva ovog istraživanja bila je izolacija bakterije *A. actinomycetemcomitans* iz subgingivalnog dentalnog plaka obolelih od agresivne i hronične parodontopatije kao i kod osoba sa klinički zdravim parodontijumom radi dalje karakterizacije i ispitivanja toksičnog potencijala ove bakterije.

Pored kliničkog pregleda, a u cilju procene aktivnosti destruktivnih procesa u parodontijumu koje su posledica prisustva različitih parodontopatogena, odznajaju se i različite metode koje se koriste za detekciju ovih mikroorganizama. Podaci iz literature govore da je *A. actinomycetemcomitans* moguće detektovati kultivacijom, DNA-DNA hibridizacijom, indirektnom imunoflorescencijom, FISH metodom, konvencionalnim i multipleks PCR-om, "nested" PCR-om, "real time" PCR-om, "loop-mediated isothermal amplification", kloniranjem i sekvenciranjem 16S rRNK biblioteka.

Tradicionalna kultivacija bakterija ima nekoliko bitnih prednosti: omogućava istovremenu detekciju više različitih bakterijskih vrsta i dozvoljava testiranje osetljivosti bakterija na različite antibiotike. Najvažnija osobina kultivacije je što omogućava detekciju neekvivalentnih bakterija. Ova karakteristika čini kultivaciju referentnom metodom za identifikaciju parodontopatogena.

Kultivacija kao metoda ima i brojna ograničenja. Neophodno je obovijabilnost bakterija i zbog toga su uslovi uzorkovanja i transportovanja do laboratorije vrlo strogo definisani. Osoblje koje manipulira uzorcima mora biti dobro obučeno i iskusno. Veliki nedostatak kultivacije je što se rezultati ne dobijaju odmah, nego je potrebno vreme da bakterije narastu i kolonije formiraju svoje karakteristične morfološke osobine koje omogućavaju identifikaciju bakterija. Naroditi problem

predstavlja činjenica da se kultivacijom ne mogu detektovati bakterije koje su u malom broju prisutne u uzorku, odnosno ispod detekcionog limita koji u proseku iznosi 10^3 do 10^4 bakterijskih jedinica (Lamster i sar., 1993; Armitage, 1996).

Na samom početku ovog istraživanja se u cilju izolacije bakterije *A. actinomycetemcomitans* koristila selektivna TSBV podloga. Primarni cilj kultivacije je bila izolacija bakterije *A. actinomycetemcomitans* koji bi poslužio kao pozitivna kontrola u planiranim PCR reakcijama. Subgingivalni dentalni plak prvih 45 ispitanika uključeni u studiju je bio evaluiran prema ovom metodološkom konceptu. Uzeta su po dva pulovana uzorka subgingivalnog dentalnog plaka. Prvi pulovan uzorak koji je odlagan u 1 ml fiziološkog rastvora je korišten za PCR reakcije, za identifikaciju bakterije *A. actinomycetemcomitans* pomoću jednog primera specifičnog za vrstu i jednog univerzalnog primera. Od 23 ispitanika koji su uzorci u PCR reakciji davali produkt na očekivanoj dužini od 570 bp, drugi pulovan uzorak subgingivalnog dentalnog plaka koji je čuvan u 10%-om glicerolu na -20°C se zasejavao direktno sa papirnih poena na TSBV podlogu. Ova podloga zbog toga što u sebi sadrži vankomicin i bacitracin suprimira većinu oralnih bakterijskih vrsta i značajno više nego neselektivni krvni agar dozvoljava rast bakterije *A. actinomycetemcomitans*. Očekivalo bi bilo isto i činjenicu da bez pregledanja kolonija izraslih na šolji uz pomoć svetlosnog mikroskopa, kolonije *A. actinomycetemcomitans* ne mogu biti prepoznate. Iako su u cilju naknadnih analiza selektovane male, okrugle, konveksne, translucetne i svetlucave kolonije, od 0.5 do 1.0 mm u dijametri koje su se pojavile nakon 3 dana inkubacije, sekvenciranje je pokazano da većina ovih kolonija pripada rodu *Campylobacter*, kao i *Capnocytophaga* i *Eikenella* (Tabela 3.2.). Samo je teorijski moguće da u uzorcima od 23 ispitanika koji su analizirani na ovaj način, nijedan nema *A. actinomycetemcomitans* u subgingivalnom

dentalnom plaku. Već je verovatno da su kolonije drugih bakterijskih vrsta prerasle kolonije bakterije *A. actinomycetemcomitans* jer su bile u značajno većem broju.

U drugom delu istraživanja od 45 uzorka transportovanih u RTF-u, 24 je zasejano na TSBV podlogu. Posmatrajući pod mikroskopom, selektovano je sedam kandidata sa karakterističnom unutrašnjom zvezdastom strukturom kolonije od kojih su četiri potvrđeni sekvenciranjem da pripadaju vrsti *A. actinomycetemcomitans*. Preostalih 21 uzoraka su zasejani na Kolumbija agar podlozi, a 12 potencijalnih kandidata na osnovu mikroskopskog izgleda kolonije selektovano u cilju daljih analiza. Iako su imale zvezdastu unutrašnju strukturu, nijedna od selektovanih kolonija sa Kolumbija podloge nije pripadala vrsti *A. actinomycetemcomitans*. Rezultati istraživanja govore u prilog prednosti korišćenja selektivne TSBV podloge u cilju kultivacije bakterije *A. actinomycetemcomitans*, jer svetla boja agara omogućava laku vizualizaciju karakteristične zvezdolike unutrašnje strukture pod mikroskopom.

Dobijeni rezultati su pokazali da 90% izolata pripada obolelima od agresivne parodontopatije, što je u saglasnosti sa podacima iz literature. Srednja vrednost dubine sondiranja na *A. actinomycetemcomitans* pozitivnim mestima bila je $7,26 \pm 1,84$ mm. Rezultati koji porede vezu prisustva bakterije *A. actinomycetemcomitans* u odnosu na vrednosti kliničkih parametara parodontalnih oboljenja su u literaturi vrlo različiti, što se objašnjava različitim metodološkim konceptima primenjenim u studijama. Međutim, u najvećem broju studija je potvrđeno da što je veća dubina parodontalnog džepa, veća je i verovatnoća izolacije bakterije *A. actinomycetemcomitans* (Socransky & Haffajee, 1992). U ovom istraživanju kultivacijom nije izolovan *A. actinomycetemcomitans* kod osoba sa klinički zdravim parodontacijom. Najveći broj uzoraka klinički zdravih ispitanika je zasejavan na Kolumbija podlogu i iako su selektovane kolonije sa

zvezdolikom unutrašnjom strukturom, rezultati sekvenciranja su pokazali da nijedan izolat ne pripada vrsti *A. actinomycetemcomitans*. Rezultati brojnih istraživanja su pokazali da se *A. actinomycetemcomitans* kod osoba sa klinički zdravim parodontijumom nalazi vrlo retko i to u veoma malom procentu, što govori u prilog tome da je u stanju dobrog parodontalnog zdravlja rast ove bakterijske vrste pod kontrolom i izbalansiran prisustvom drugih mikroorganizama u biofilmu. Grupu parodontalno zdravih ispitanika u ovoj studiji činili su studenti IV i V godine Stomatološkog fakulteta u Beogradu, koji su obučeni u održavanju oralne higijene. Mala količina prisutnog dentalnog plaka je verovatno rezultirala prisustvom bakterije *A. actinomycetemcomitans* ali ispod detekcionog limita za kultivaciju. Iz tog razloga bi trebalo u cilju određivanja prisustva bakterije *A. actinomycetemcomitans* kod osoba sa klinički zdravim parodontijumom primeniti neku od osetljivijih molekularnih metoda.

Metoda lančane amplifikacije DNK (PCR metoda) omogućava bržu detekciju i veća preciznost u odnosu na kultivaciju i predstavlja najosetljiviju i najbržu metodu za utvrđivanje prevalencije parodontalnih bakterija (Ashimoto, 1996; Riggio et al., 1996; Eick et al., 2002). Ovom metodom se mogu amplifikovati izuzetno male količine bakterijskih nukleinskih kiselina što omogućava detekciju svega 10-ak bakterija u uzorku plaka (Tran & Rudney, 1999).

Molekularno-biološke metode pomažu u sekvenciranju gena za 16S rRNK se u današnje vreme najviše koriste u cilju identifikacije i klasifikacije bakterija. Sekvenca ribozomalne RNK se široko koristi za kategorizaciju u biološkoj filogenetskoj taksonomiji, pa i u taksonomiji mikroorganizama (Fox i sar., 1980). Pošto 16S rRNK sadrži nekoliko vrlo dobro konzerviranih regiona među biološkim vrstama, to omogućava poređenje sekvenci 16S rRNK u studijama molekularne evolucije. Takva

sekvenca 16S rRNK tako e omogu ava identifikaciju mikroorganizama jer 16S rRNK sadrži i druge varijabilne sekvence koje se razlikuju me u vrstama ili familijama (Rossello-Mora & Amann, 2001). Iz tih razloga se 16S rRNK koristi za filogenetske analize, uklju uju i i identifikaciju vrste bakterija. Iako bi odabrana sekvenca 16S rRNK trebalo da omogu i amplifikaciju samo konkretne, ciljane vrste mikroorganizama, naša istraživanja govore u prilog zna ajne nespecifi nosti koriš enih prajmera u ovoj vrsti analiziranja uzoraka. Naši rezultati su pokazali da koriš enjem prajmera specifi nog za vrstu dizajniranog prema sekvenci dela gena za 16S rRNK bakterije *A. actinomycetemcomitans*, su dobijeni PCR produkti na o ekivanoj dužini od 570 bp za koje se kasnije sekvenciranjem potvrdilo da pripadaju vrstama *Aggregatibacter aphrophilus*, *Aggregatibacter segnis*, *Campylobacter*, *Bacillus turigiensis*. Kao DNK matrica u PCR reakcijama je koriš ena suspenzija ukupnog plaka, prethodno kuvana na 100°C u cilju izolacije bakterijske DNK. Kasnije smo, proveravaju i razli ite metode izolacije DNK bakterije *A. actinomycetemcomitans*, došli do zaklju ka da se geneti ki materijal ove bakterijske vrste ne može izolovati kuvanjem iako se u brojnim istraživanjima upravo ova metoda koristi. Dakle, u cilju identifikacije bakterije *A. actinomycetemcomitans* trebalo bi koristiti sekvencu nekog drugog gena, npr. sekvencu promotorskog regiona operona gena za leukotoksin. Rezultati našeg istraživanja su pokazali da je ova reakcija daleko specifi nija, jer je dala amplikone samo kod *A. actinomycetemcomitans* izolata.

U ovoj studiji smo koristili prajmere specifi ne za klastere gena koji su odgovorni za biosintezu serotip-specifi nog polisaharidnog antigena. Prajmeri su dizajnirani tako da omogu avaju identifikaciju serotipova bakterije *A. actinomycetemcomitans* pomo u multipleks PCR-a. Prema Suzukiju i sar., (Suzuki i

sar., 2001) ovaj metod može biti koristan u genotipizaciji serotipova, brzo i direktno iz kliničkog uzorka koji sadrži različite mikroorganizme. Naši rezultati su bili nespecifični kada smo koristili suspenziju ukupnog subgingivalnog dentalnog plaka kao DNK matricu u PCR reakciji. Pošto u to vreme još uvek nismo imali rezultate sekvenciranja 16S rRNK potencijalnih *A. actinomycetemcomitans* kandidata selektovanih sa TSBV podloge, pristupili smo daljim molekularnim ispitivanjima i dobili veoma iznenađujuće i neekvivalentne rezultate. U PCR reakcijama smo koristili dve vrste DNK matrice: 1) kolonije dobijene zasejavanjem uzorka subgingivalnog dentalnog plaka i 2) suspenziju ukupnog plaka. Obe vrste uzoraka su, kao što je u metodologiji napomenuto, uzete sa istih-reprezentativnih zuba. Pozitivne signale specifične za serotip smo dobili analizirajući i obe vrste uzoraka. Međutim, *in silico* analize su pokazale da većina selektovanih kolonija pripada rodu *Campylobacter*, kao i *Capnocytophaga* i *Eikenella* (Tabela 3.2.) uprkos činjenici da su dobijeni pozitivni signali specifični za serotipove bakterije *A. actinomycetemcomitans*. Postavljajući i restriktivnije uslove PCR reakcije (temperatura anilina podignuta na 60°C) i koristeći DNK izolovanu komercijalnim kitovima za ekstrakciju DNK, došli smo do zaključka da *A. actinomycetemcomitans* izolati u našoj populaciji pripadaju serotipu b i e. Samo kod jednog pacijenta obolelog od hronične parodontopatije smo detektovali prisustvo dva serotipa, serotip b i serotip e. Rezultati su dobijeni konvencionalnim, a ne multipleks PCR-om. Naši rezultati su vrlo interesantni jer se serotip e sreće jako retko u Evropi, u oko 3 % (Poulsen i sar., 1994), odnosno 10 % slučajeva (Dogan i sar., 1999B), dok je kod Japanaca izolovan u 23% slučajeva (Yamamoto i sar., 1997). Ni u jednoj od ovih studija serotip e nije pronađen kod obolelih od lokalizovane agresivne parodontopatije. Ove diskrepance u distribuciji serotipova se mogu objasniti različitim brojem subjekata u uzorku, parodontalnim

statusom, genetskim karakteristikama kao i faktorima okruženja samih ispitanika. Postoji nekoliko mogućih objašnjenja zbog čega je detekcija serotipova d i e tako retka među kliničkim *A. actinomycetemcomitans* izolatima. Pre svega, uslovi koji vladaju u usnoj duplji mogu da favorizuju kolonizaciju serotipova a, b i c što rezultira većom prevalencijom ovih serotipova u humanoj populaciji, a osobe koje su već kolonizovane bakterijom *A. actinomycetemcomitans* imaju jako male šanse da budu inficirane sa novim *A. actinomycetemcomitans* klonovima tokom dužeg niza godina. Dalje, serotipovi d i e bi mogli biti osetljiviji na antibiotike od ostalih serotipova što bi doprinelo njihovoj retkoj detekciji. Takođe, otežana transmisija ovih izolata sa osobe na osobu, kao i naglašen i naročito efikasan imunski odgovor protiv ovih izolata bi mogli doprineti njihovoj eradikaciji. Međutim, ova objašnjenja su opovrgnuta za serotip e jer rezultati istraživanja nisu potvrdili vanrednu osetljivost na antibiotike (Pajukanta i sar., 1993), a dokazana je i intrafamilijarna transmisija oba serotipa (Asikainen i sar., 1996, Saarela i sar., 1993). Takođe, ne postoje podaci u literaturi koji govore u prilog efektivnijem odgovoru domaćina, odnosno većim koncentracijama antitela specifičnih na serotip d i e u odnosu na ostale serotipove (Gmür & Baehni, 1997). Jedno od objašnjenja za retku detekciju serotipova d i e je da bi oni mogli da budu povremeni mutanti dominantnih serotipova, ali i ova mogućnost je opovrgnuta rezultatima studije koji su pokazali da svaki od 5 serotipova obuhvata genetski izolovane subpopulacije, tako da se serotipovi d i e ne mogu smatrati varijantama ostalih, zastupljenijih serotipova (Poulsen i sar., 1994). Još jedna studija novijeg datuma je na osnovu filogenetskih analiza i rezultata real-time PCR-a, analize sekvence 16S rRNK gena, DNA-DNA hibridizacije, AFLP analize i fenotipske karakterizacije pomoću API® 50CH kitta, pokazala da serotip e izolati formiraju relativno evolutivno stabilni,

verovatno klonski ali globalno distribuirani *A. actinomycetemcomitans* soj (van der Reijden i sar., 2010). Jedan od razloga za retku izolaciju serotipova d i e bi mogao da bude i tehni ke prirode, odnosno da se vijabilnost ovih izolata ne može održati tokom transporta do laboratorije. Testiranjem ove hipoteze došlo se do zaključka da nema razlike u CFU vrednostima između različitih serotipova. Korišćen je VMGA III transportni medijum, a CFU vrednosti se nisu razlikovale na šoljama koje su odmah po prispeću uzorka u laboratoriju zasejane i šoljama koje su zasejane nakon 2 dana od uzorkovanja, pri čemu su uzorci stajali na sobnoj temperaturi (Dogan i sar., 1999). U drugim studijama gde su korišćeni drugi transportni medijumi pokazana je retkost ovih serotipova (Zamboni i sar., 1983). Iako smo u ovom istraživanju koristili RTF transportni medijum i zasejivali uzorke najkasnije 48h od momenta uzorkovanja, uspeh smo da održimo bakterije *A. actinomycetemcomitans* vijabilnim i ostvarimo uspešnu kultivaciju serotipa e. Međutim, neophodna su dalja istraživanja na većem uzorku da bi se ispitalo prisustvo drugih serotipova u srpskoj populaciji, a u cilju identifikacije kako samog *A. actinomycetemcomitans*, tako i serotipova neophodno je primeniti osetljivije molekularne metode, npr. fluorescentnu *in situ* hibridizaciju - FISH ili imunološke analize (određivanje titra serotip-specifičnih IgG antitela-ELISA testom).

Istraživanja sprovedena u severnoj Evropi, severnoj Africi i na afričko-američkoj populaciji su pokazala da je kod pojedinaca uglavnom prisutan jedan serotip/genotip *A. actinomycetemcomitans* i da ovakav vid kolonizacije ima tendenciju da ostane stabilan u dužem vremenskom periodu, čak 1-6 godina (Asikainen & Chen, 1999; Saarela i sar., 1992, 1993, 1999; Yamamoto i sar., 1997; Yang i sar., 2005).

Pokazano je da se serotipovi a, b, c i f se pojavljuju mnogo češće u usnoj duplji nego serotipovi d i e. Serotip b se mnogo češće sreće kod obolelih od agresivne

parodontopatije (Asikainen i sar., 1991b; Lakio sar., 2002; Haubek i sar., 1995, 1996, 1997A, 2001, Tinoco i sar., 1997B; Zang i sar., 2004, 2005; Zambon, 1983B), kao i u slučaju neoralnih infekcija (Paju i sar., 2000; Zambon i sar., 1983B, 1988). Serotip c se vrlo često javlja kod osoba sa klinički zdravim parodontcijumom (Asikainen i sar. 1991A; Dogan i sar., 1999; Haubek i sar., 1995; Lakio sar., 2002). Neke osobe nose više različitih genotipova bakterije *A. actinomycetemcomitans*, a tako je pokazano da jedna osoba može biti kolonizovana sa dva različita serotipa istovremeno (Alaluusua i sar., 1991; Asikainen i sar., 1991A; Chung i sar., 1989; Hölttä i sar., 1994).

Istraživanja su pokazala da postoje razlike u distribuciji serotipova među narodima različite geografske i rasne pripadnosti (Asikainen i sar., 1991A; Chung i sar., 1989; Hölttä i sar., 1994; Yamamoto i sar., 1997; Yang i sar., 2005). Međutim, zbog razlika u dizajnu studija i različitih dijagnostičkih kriterijuma, direktno poređenje rezultata istraživanja je značajno otežano. Iako je u većini istraživanja prevalenca serotipa b bila značajno veća kod obolelih od agresivne parodontopatije, rezultati istraživanja u Koreji su pokazali da se ovaj serotip javlja podjednako često kao i serotipovi a i c (Chung i sar., 1989). Studija sprovedena u Tajvanu koja je obuhvatala mladu populaciju je pokazala da su serotipovi a, b i c vrlo frekventni članovi oralne mikroflore, ali da se serotip b javlja značajno više kod obolelih od parodontopatije nego kod osoba sa zdravim parodontcijumom (Yang i sar., 2005). Nasuprot njima, serotipovi d, e i f su relativno retki (Dogan i sar., 1999A; Teixeira i sar., 2006). U nekoliko studija broj izolata sa ovim serotipom je bio toliko mali da se nije mogao doneti zaključak o vezi ovih izolata sa vrstom parodontopatije ili geografskim poreklom nosioca (Haubek i sar., 1995, 2001). Podaci iz literature su pokazali da se serotipovi a, b i c mogu izolovati kod pripadnika bele rase u Severnoj Evropi (Asikainen i sar., 1991A, Haubek i sar.,

1995), Gr koj (Sakellari i sar., 2011) i Severnoj Americi (Zambon i sar., 1983), dok se u Azijskoj populaciji (Kinezi, Vijetnamci, Tajlan ani i Koreanci) naj eš e sre e serotip c (Chung i sar., 1989; Dahlen i sar., 2002; Holta i sar., 1994; Mombelli i sar., 1998).

Iako se PCR metodi daje prednost jer je brza, osetljiva i omogu ava detekciju malog broja bakterija koje su ina e ispod detekcionog limita u slu aju kultivacije, prezentovani rezultati su pokazali da ovaj metod nije konkluzivan *per se* i potvr uju neizostavnost sekvenciranja. Kombinaciju molekularnih tehnika i kultivacije kao tradicionalnog "zlatnog standarda" bi trebalo koristiti u cilju identifikacije parodontopatogena, kao i u cilju postavljanja dijagnoze i pra enja postignutih terapijskih rezultata u le enju parodontopatije.

Upravo nepostojanje "zlatnog standarda" u cilju detekcije prisustva bakterije *A. actinomycetemcomitans* rezultirale su brojnim metodološkim konceptima koji su doprineli zna ajnoj razli itosti rezultata. Procedure uzorkovanja dentalnog plaka i metode koje su se koristile u analizi tih uzoraka u laboratorijama su se vrlo zna ajno razlikovale me u epidemiološkim studijama. Brojni faktori su doprinosili ovoj razli itosti: sama procedura uzimanja uzoraka plaka, razlog uzorkovanja, uzrast ispitanika i mesto uzorkovanja. Plak je uziman pomo u etkica za zube, a kalica, briseva, papirnih poena, kireta, itd. U odnosu na uzimanje reprezentativnog uzorka dentalnog plaka iz parodontalnih džepova, nije postignut konsenzus u odnosu na to koja je tehnika superiornija od ostalih (Beikler i sar., 2006; Dahlén, 1993; Loomer, 2004; Renvert i sar., 1992; Tanner & Goodson, 1986; Teles i sar., 2008).

U komparativnoj studiji gde su pore ene dve tehnike uzimanja subgingivalnog dentalnog plaka, uzorkovanje papirnim poenima se pokazalo superiornijim u odnosu na uzimanje uzorka kiretama. Ovom tehnikom se kasnije u toku kultivacije dobilo daleko

više kolonija, a i kultivisalo se mnogo više parodontopatogena nego kada su uzorci bili uzeti kiretama (Renvert i sar., 1992). Upravo iz ovih razloga smo se odlučili da koristimo papirne poene u ovoj studiji.

Poznato je da različite bakterijske vrste nisu homogeno distribuirane u biofilmu. Ovo značajno može da utiče na rezultate uzorkovanja papirnim poenima koji imaju veliku sposobnost apsorpcije. U *in vitro* uslovima, najuspešnije se uzorkuju one bakterijske vrste koje se nalaze u površinskim slojevima plaka (Baker i sar., 1991). Iz ovih razloga, uzimanje uzorka papirnim poenima bi bilo reprezentativnije kada je od interesa neodržan dentalni plak koji se nalazi slobodan u parodontalnom džepu, nego vrsto vezani slojevi biofilma. Rezultati istraživanja su pokazali da se *A. actinomycetemcomitans* vezuje za površinske slojeve vezanog dentalnog plaka, kako onog koji se nalazi na tvrdom zidu parodontalnog džepa, tako i onog koji je vezan za epitel parodontalnog džepa (Noiri i sar., 2001; Socransky & Haffajee, 2005). Ovo je verovatno jedan od razloga zbog kojih je otežana detekcija bakterije *A. actinomycetemcomitans* naročito kod osoba sa zdravim parodontijumom, jer manipulacija papirnim poenom ne bi trebalo da bude agresivna, nego da subgingivalna aplikacija bude bez primene sile i pritiska.

U formiranju metodološkog koncepta uzorkovanja, parametri koje bi trebalo razmotriti su tip i veličina papirnih poena, dužina boravka papirnih poena u parodontalnom prostoru i osetljivost metoda koje se koriste u laboratorijskim analizama (Poulsen i sar., 2003). U studiji gde je ispitivana efikasnost različitih papirnih poena u uzimanju uzorka, najbolje su se pokazali papirni poeni ISO 45. U odnosu na vreme boravka papirnog poena u parodontalnom prostoru, vreme od 60 s se pokazalo optimalnim, mada i kraća vremena (5-30 s) nisu značajno redukovala efikasnost

uzorkovanja (Hartroth i sar., 1999). Tanke papirne poene bi trebalo izbegavati, jer se u izvesnoj meri teže plasiraju u parodontalni džep. Tako e, brže omekšaju, pa postoji mogućnost da ni ne stignu do dna džepa što povećava rizik za dobijanje lažno negativnih rezultata (Baker i sar., 1991; Hartroth i sar., 1999).

Jedno od pitanja koje je dosta često predmet debatovanja je kako selektovati mesta uzorkovanja i koji je to optimalni broj mesta sa kojih se uzima uzorak u cilju dobijanja reprezentativnog uzorka mikrobiota u subgingivalnom dentalnom plaku. Kada je reč o bakteriji *A. actinomycetemcomitans* najmanji broj lažno negativnih rezultata je bio kada su uzimani uzorci iz četiri najdublja parodontalna džepa i konačni zaključak te studije je bio da se povećanjem broja mesta uzorkovanja značajno smanjuje mogućnost dobijanja lažno negativnih rezultata (Haffajee & Socransky, 1992).

Preporuka da se uzorak uzima iz najdubljih džepova može da bude relevantna kao vodič u nekim istraživanjima. Međutim, kada su u pitanju inicijalno zdravi, mladi subjekti ili deca, preporuka je da se uzorci uzimaju sa mesta gde prvo kreće destrukcija u parodontijumu kod agresivne parodontopatije – stalni prvi sekuti i prvi molari (Haubek i sar., 2002; Hørmann & Frandsen, 1979; Saxén & Murtomaa, 1985; Timmerman i sar., 2000). Istraživanja su pokazala da je prevalenca bakterije *A. actinomycetemcomitans* bila najniža kada je uzorak uziman samo u predelu prvih inciziva, ali se nije značajno razlikovala ni u slučaju uzorkovanja oko prvih molara (Haubek i sar., 2001, 2008). Rezultati ovih istraživanja su pokazali da bi trebalo kod adolescenata uzimati uzorke sa osam mesta u zubiku, jer je na taj način detektovan mnogo veći broj nosioca bakterije *A. actinomycetemcomitans*. U okviru ovog istraživanja kod zdravih ispitanika smo uzimali uzorke subgingivalnog dentalnog plaka u predelu mezijalnih površina prvih stalnih molara. Iako je u prvom delu istraživanja od

15 zdravih ispitanika kod 10 potvrđeno prisustvo bakterije *A. actinomycetemcomitans* PCR-om, kultivacijom nije izolovan nijedan. Ovo se može objasniti možda malim brojem mesta u zubiku sa kojih je uziman uzorak subgingivalnog dentalnog plaka, ili je broj bakterija *A. actinomycetemcomitans* u uzorku bio ispod detekcionog limita za kultivaciju.

A. actinomycetemcomitans kao jedan od glavnih oralnih patogena izaziva inflamaciju istovremeno doprinose i destrukciji ekstracelularnog matriksa parodontalnog ligamenta i alveolarne kosti. Ovaj mikroorganizam sa velikim virulentnim potencijalom spakovanim u 2 Mb genom, putem svojih različitih celularnih i ekstracelularnih komponenata, stupa u interakciju sa domaćinom. Mnogi faktori virulencije ovog organizma još uvek nisu identifikovani. Sekvenciranje genoma bakterije *A. actinomycetemcomitans* zajedno sa razvojem sistema za efikasnu inaktivaciju gena će doprineti bržoj identifikaciji tih faktora.

Prvi otkriven i do sada najviše izuzetan faktor virulencije bakterije *A. actinomycetemcomitans* je leukotoksin. Primarna uloga leukotoksina je izbegavanje pokretanja imunog odgovora koje se dešava u prisustvu bakterije *A. actinomycetemcomitans*. Naime, kao posledica prisustva i invazije bakterije *A. actinomycetemcomitans*, polimorfonukleari migriraju na mesto oštećenja što rezultira aktivacijom niza kaskadnih imunoloških reakcija koje imaju za cilj eliminaciju patogena. Leukotoksin je glavni akter kontra-odbrane bakterije *A. actinomycetemcomitans*. Cilj svakog patogena nije da eliminiše domaćina, nego da živi u simbiozi sa njim, a *A. actinomycetemcomitans* je izvanredan primer jednog, na taj način, uspešnog patogena. Ciljaju i samo određene ćelije bele krvne loze, bakterije se osiguravaju da su efekti delovanja njihovih toksina limitirani samo na ćelije koje su

imunološki najrelevantnije (Kachlany, 2010A). Istraživanja su pokazala da su Th1 limfociti najosetljiviji na delovanje leukotoksina, jer je proto nom citometrijom dokazano da poseduju najveći broj CD11 i CD18 molekula na svojoj površini (Kachlany i sar., 2009). Pored Th1 limfocita, istraživanja su pokazala da formiraju i pore na elijskoj membrani, leukotoksin dovodi do smrti polimorfonuklearnih leukocita-neutrofila (Teichman & Wilton, 1981) i monocita (Zambon i sar., 1983A).

Postoje jasne razlike u ekspresiji leukotoksina me u *A. actinomycetemcomitans* izolatima. Opisani su izolati sa minimalnom (npr. ATCC 33384), umerenom (npr. y4) i jakom (JP2) ekspresijom leukotoksina. Konkretni razlozi zbog ega postoje razlike u ekspresiji leukotoksina još uvek nisu definisani. Izolati koji se odlikuju hiperleukotoksi nim fenotipom (JP2) poseduju deleciju 530 bp na operonu *ltx* gena. Prisustvo ovih izolata je zna ajno eš e kod osoba sa lokalizovanom agresivnom parodontopatijom. Brojne studije su pokazale rasni tropizam JP2 klona, odnosno njegovu ve u zastupljenost u afri koj populaciji, naro ito u Maroku. Nezavisno od JP2 klona, u Japanu je izolovan još jedan hiperleukotoksi ni *A. actinomycetemcomitans* izolat (He i sar., 1999; Schaeffer i sar., 2008), iji je promotorski region dužine 1926 bp. Grupa istraživa a sa Sardinije je analizirala mikrobiološki sastav subgingivalnog dentalnog plaka i pljuva ke pacijenata sa razli itim parodontalnim statusom. Studija je pokazala da od 81 ispitanika uklju enih u istraživanje svega njih 10 je bilo kolonizovano bakterijom *A. actinomycetemcomitans*, od kojih su samo 2 pacijenta imali pozitivan nalaz i u pljuva ki. Interesantan je nalaz da je ak 6 izolata pripadalo JP2 klonu, za koga sa zna da poseduje rasni topizam i da je karakteristi an za afri ku populaciju (Orrù i sar., 2006). Grupa istraživa a je pokazala pozitivnu korelaciju hiperleukotoksi nih izolata sa agresivnom parodontopatijom za razliku od obolelih od

hroni ne parodontopatije i osoba sa klinički zdravim parodontcijumom (Cortelli i sar., 2003). S druge strane, među *A. actinomycetemcomitans* izolatima u grupi populaciji koji su pripadali serotipu b nije potvrđen hiperleukotoksični JP2 klon (Sakellari i sar., 2011).

Nepoznato je prisustvo drugih izolata sa sličnim virulentnim potencijalom kod obolelih od parodontopatije različitih etničkih grupa, tako da su komparativne genetičke analize bakterije *A. actinomycetemcomitans* neophodne u daljnjim istraživanjima. Iako se prisustvo JP2 klonova vezuje za LAP, pokazano je i da su minimalno leukotoksični izolati, npr. 652 izolat, identifikovani kod obolelih od ove vrste parodontopatije u severnoevropskoj populaciji (Kaplan i sar., 2002; Fine i sar., 2007). Na osnovu ovih rezultata autori su zaključili ili da još uvek nije moguće odrediti da li JP2 klon ima veći virulentni potencijal od minimalno leukotoksičnih izolata. Fine i sar. su pokazali da je izolat sa 652 promotorom minimalno leukotoksičan u laboratorijskim uslovima, ali u fiziološkom okruženju produkuje isti nivo toksina kao i JP2 izolati (Fine i sar., 2007).

Rezultati naših istraživanja su pokazali da *A. actinomycetemcomitans* izolati u našoj populaciji ne pripadaju hiperleukotoksičnom fenotipu. Reakcija lananog umnožavanja *ltx* operona se pokazala vrlo pouzdanom u cilju identifikacije bakterije *A. actinomycetemcomitans* i diferencijacije različitih vrsta u okviru roda *Aggregatibacter*.

Iako je leukotoksin izuzetno isključivo zbog toga što predstavlja pretnju imunom sistemu domaćina, postavilo se pitanje da li se ovaj toksin zbog svojih jedinstvenih prirodnih karakteristika može eksploatisati u terapijske svrhe. U savremenoj medicini je već poznata primena nekoliko bakterijskih toksina u svakodnevnoj kliničkoj praksi, kao npr. *Clostridium botulinum* neurotoksin (BOTOX) u tretmanu neuromuskularnih oboljenja (Jankovic, 2004) i *Corynebacterium diphtheriae* toksin (ONTAK) koji se

koristi u le enju T- elijskog limfoma (Duvic i sar., 2002; Olsen i sar., 2001). Istraživanja su pokazala da je ekspresija LFA-1 pove ana kod mnogih leukemija i limfoma (Bechter i sar., 1999; Horst i sar., 1991), što vodi ka zalju ku da bi maligne elije bile osetljivije na citotoksi ne efekte posredovane LFA-1. Kachlany i sar. (2009) su pokazali da su zdrave elije bele loze u perifernoj cirkulaciji neosetljive na delovanje leukotoksina, za razliku od malignih koje su izuzetno osetljive. Leukotoksin se pokazao veoma efikasnim u tretmanu leukemije kod SCID miševa, a testiran na Makaka majmunima u vrlo malim dozama (22µg/kg) je doveo do smanjenja broja belih krvnih zrnaca dok su vrednosti hemoglobina, eritrocita, trombocita i drugih markera toksinosti ostale nepromenjene. Dakle, dok konvencionalni hemoterapeutici pokazuju malu specifi nost i veliku sistemsku toksinost, leukotoksin bi mogao da predstavlja novi bioterapijski koncept koji bi mogao da se koristi ciljano u le enju poreme aja bele krvne loze.

Iako je od otkri a ovog toksina prošlo skoro 30 godina, detalji njegove biologije su još uvek nedovoljno poznati. Važna pitanja koja još uvek ekaju odgovore su: mehanizam kojim LtxA napada eliju doma ina, fiziološki doprinos LtxA bolesti i kako LtxA prepoznaje i napada eritrocite. Veoma je važna injenica da zbog svoje prirodne toksinosti i specifi nosti vezivanja za pojedine vrste leukocita, leukotoksin bi se mogao razmatrati kao efikasno i bezbedno terapijsko sredstvo u tretmanu pojedinih malignih oboljenja bele krvne loze (Kahlany, 2010B).

Drugi, tako e veoma potentan faktor virulencije bakterije *A. actinomycetemcomitans* je citoletalni toksin istezanja koji svojom aktivnoš u prekida elijski ciklus mnogih eukariotskih elija u G2 fazi što dovodi do apoptoze elije. Koriste i parove prajmera koji su homologni sa genima *cdtA*, *cdtB* i *cdtC* prema

uslovima preuzetim iz literature (Ahmed i sar., 2001), nismo dobili očekivane rezultate. Promene uslova PCR reakcije u smislu PCR reakcione smeše, finalne zapremine, polimeraze i temperaturnih uslova reakcije (restriktivniji temperaturni uslovi-aniling 60°C, *touch-down* PCR) nisu dale pozitivan rezultat. Ovakav nalaz je verovatno posledica malog stepena homologije sekvence korišćenih prajmera sa sekvencom *cdtABC* operona naših izolata, a ne odsustva gena za CDT.

U literaturi su opisani brojni slučajevi gde nisu dokazani nijedan od *cdt* gena, ili su dokazani samo jedan ili dva gena. Fabris i sar. (2003) su ispitali toksični efekat izolata bakterije *A. actinomycetemcomitans* različitog geografskog porekla (Brazil, Kenija, Japan i Švedska) izolovanih kod pacijenata sa različitim parodontalnim statusom, na jajne ćelije kineskog hrčka. Od 40 izolata, 39 je ispoljilo toksični efekat, odnosno uzrokovalo morfološke promene jajnih ćelija. Kod 30% izolata je nedostajao bar jedan *cdt* gen, što nije iznenađujuće jer se zna da se lokus *cdt* gena nalazi na nestabilnom regionu hromozoma (Mayer i sar., 1999). Međutim, polovina ovih izolata je dala amprikone u PCR reakciji umnožavanja operona *cdtABC*, što ukazuje na prisustvo gena ali i na odsustvo homologije sa korišćenim prajmerima za svaki pojedinačni gen. Neki od ovih izolata su pokazali izuzetno nisku toksičnu aktivnost čak i u većim koncentracijama izolata. Jedini izolat koji nije posedovao *cdtB* gen nije pokazao toksičnu aktivnost, što je i očekivano obzirom da se zna da je *CdtB* glavna komponenta ovog holotoksina. Interesantno je i da je jedini izolat koji je posedovao samo *cdtB* gen ispoljavao veoma mali toksični efekat na jajne ćelije, kao i to da je 50% izolata pokazao minimalnu toksičnost (manje od 20% jajnih ćelija je imalo morfološke promene) čak i pri najvećim količinama toksina korišćenih u tom eksperimentu (20 µg). Rezultati ove studije nisu mogli potvrditi jasnu vezu između aktivnosti CDT i parodontalnog statusa

(Fabris i sar., 2002). Odsustvo *cdtABC* gena je opisano i me u *A. actinomycetemcomitans* izolatima u Japanu (Yamano i sar., 2003) i Kini (Leung i sar., 2005; Tan i sar., 2002).

Jako je mali broj istraživanja koji se bavio ispitivanjem citotoksi nog efekata bakterije *A. actinomycetemcomitans* na različite elijske kulture. U cilju ispitivanja citotoksi nog efekta na U937 elijsku liniju makrofaga koriš eni su cele bakterijske *A. actinomycetemcomitans* elije, supernatant kulture i pre iš en leukotoksin. Rezultati istraživanja su pokazali da supernatant ima toksi niji efekat od bakterija, da ne usporava i ometa rast elija nego da ostvaruje brz letalni efekat na PMA-indukovane (diferentovane) U937 elije. Leukotoksin ispoljava najve u toksi nu aktivnost i za razliku od supernatanta i bakterija dovodi do smrti i PMA-indukovanih i neindukovanih U937 elija. Osetljivost PMA-indukovanih U937 elija na dejstvo bakterija i supernatanta bakterijske kulture je posledica pove ane ekspresije LFA-1 antigena. Pokazano je da ove elije poseduju na elijskoj membrani više CD11 i CD18 receptora za koje se vezuju solubilni faktori supernatanta *A. actinomycetemcomitans* bakterijske kulture (Fukunaga & Tsuruda, 2001). Sugai i sar. su pokazali da CDT prisutan i u supernatantu kulture i u elijama *A. actinomycetemcomitans* Y4 izolata indukuje prekid rasta HeLa elija (Sugai i sar., 1998). U drugim istraživanjima je dokazana inhibicija rasta humanih fibroblasta nakon delovanja *A. actinomycetemcomitans*a (Shenker i sar., 1982), zatim prekid elijskog ciklusa indukovani CDT-om kod humanih keratinocita (Sugai i sar., 1998), kao i imunosupresivno dejstvo na T i B limfocite (Shenker i sar., 1990). Leung i sar. su pokazali da je na monolejeru epitelnih elija periodontalnog ligamenta došlo do promena u konfluentnosti i pripoju elija za predmetno stakalce, kao i da je izlaganje dejstvu bakterije *A. actinomycetemcomitans* dovelo do pove anja

veliki i neelija. Izolat koji je posedovao *cdtABC* gen i JP2 *ltx* promotor je indukovao najekstenzivnija oštećenja na elijskoj kulturi, dok je izolat sa 652 promotorom za leukotoksin i nedostatkom *cdtABC* gena ispoljio najslabiji citotoksični efekat (Leung i sar., 2005). Ovi nalazi potvrđuju uverenje da su egzotoksini koje produkuje *A. actinomycetemcomitans* izuzetno virulentni faktori agresije i doprinose toksičnosti ovog mikroorganizma.

Analize bakterijske DNK ukazale su na izuzetno veliku sličnost neoralnih izolata i onih koji su izolovani iz usne duplje, što vodi ka zaključku da se mikroorganizmi iz usta sistemskom cirkulacijom diseminuju do udaljenih organa (Muhle i sar., 1979; Paju i sar., 2000; Paturel i sar., 2004). Istraživanja su pokazala da je *A. actinomycetemcomitans* povremeno odgovoran i za nastanak infektivnog endokarditisa (oko 0.6% slučajeva), perikarditisa, pneumonije, infektivnog artritisa, osteomijelitisa, sinovitisa, kožnih infekcija, infekcija urinarnog trakta, apscesa, bakterijemije i septikemije (van Winkelhoff & Slots, 1999). Prisustvo DNK ove bakterije je dokazano u 18% uzoraka aterosklerotskih plakova (Fiehn i sar., 2005; Haraszthy i sar., 2000B; Marques da Silva i sar., 2005; Pucar i sar., 2007; Zaremba i sar., 2007), što govori u prilog teoriji da su parodontalna oboljenja faktor rizika za nastanak kardiovaskularnih oboljenja. Međutim, prisustvo vijabilnih oralnih bakterija još uvek nije dokazano (Fiehn i sar., 2005; Kozarov i sar., 2005).

Istraživanja su pokazala da u slučaju dobrog oralnog zdravlja i održavanja optimalne oralne higijene, samo mali broj fakultativnih anaeroba dospeva u cirkulaciju. Međutim, u situaciji loše oralne higijene, broj kolonizovanih bakterija na zubima, a naročito supragingivalno, može da se poveća 2 – 10 puta (Loesche, 1997), što vodi ka povećanju prevalencije i opsežnosti bakterijemije.

Veza parodontopatije i sistemskih oboljenja se može objasniti i zajedni kim faktorima rizika za njihov nastanak. Logično je da mnogi faktori rizika koji pospešuju inflamaciju i tako predisponiraju određene osobe za parodontopatiju, tako i stvaraju pogodno tlo za razvoj drugih multifaktorijskih bolesti koje u sebi sadrže inflamatornu komponentu: kardiovaskularne i cerebrovaskularne bolesti, prevremeni porođaj, neke bolesti respiratornog sistema (hronična opstruktivna plućna bolest i akutna bakterijska pneumonija), kao i da mogu da utiču na glikoregulaciju. Tako i, subgingivalni dentalni plak kod obolelih od parodontopatije obiluje Gram negativnim mikroorganizmima, a prisustvo ovih bakterija obezbeđuje kontinuirani rezervoar LPS-a koji stimuliše pokretanje imunog odgovora, i lokalno u tkivu i na mestima gde dopire cirkulacijom. Proinflamatorni citokini IL-1, TNF- α , IFN- γ i prostaglandin E₂ (PGE₂) dostižu visoke koncentracije lokalno u tkivu u toku parodontopatije (Page, 1998), i ukoliko dospeju u sistemsku cirkulaciju mogu dovesti do sistemskih efekata.

Neka istraživanja su pokazala da oralne infekcije povećavaju rizik ili u značajnoj meri doprinose rođenju dece male telesne težine ili dovode do pojave spontanog prevremenog porođaja. Histološki nalaz horioamnionitisa je često prisutan čak i u odsustvu infekcije vagine (vaginoze) ili cerviksa, što upućuje na razmišljanje da bi udaljena infekcija ili sepsa mogla da ima za cilj mebrane placentne (Hillier i sar., 1988, 1995). Poznato je da proinflamatorni citokini IL-1, TNF- α , IFN- γ indukuju sintezu prostaglandina što vodi ka porođaju. Istraživanja su pokazala da se u amnionskoj tečnosti žena koje su se prevremeno porodile sa prisutnom infekcijom amnionske tečnosti nalazile veće koncentracije prostaglandina nego kod onih koje su bile bez infekcije amnionske tečnosti (Offenbacher i sar., 1996).

Primarni etiološki faktor parodontopatije su Gram-negativne anaerobne bakterije sadržane u subgingivalnom biofilmu. Tokom trudnoće, naročito u drugom trimestru, povećava se broj anaerobnih bakterijskih vrsta u dentalnom plaku (Kornman & Loesche, 1980). Navedene bakterije mogu da stvaraju različite bioaktivne molekule koji na različite načine utiču na domaćina. Verovatno najvažnija od ovih komponenti je endotoksin koji stimuliše makrofage i druge ćelije da sintetišu i sekretuju veliki broj bioaktivnih molekula, uključujući i citokine (IL-1, TNF- α , IL-6), PGE₂, i matriksne metaloproteinaze - kolagenaze, gelatinaze, elastaze (Darveau i sar., 1997; Offenbacher i sar., 1998B). Teorijski, ove bioaktivne molekule bi, ukoliko bi se našle u sistemske cirkulaciji i prošle placentalnu barijeru, mogle da povećaju fiziološki nivo PGE₂ i TNF- α u amnionskoj tečnosti i indukuju prevremeni porođaj. Dakle, isti medijatori inflamacije koji su značajni u patogenezi parodontopatije imaju važnu ulogu i u započinjanju porođaja.

Kada se razmatraju putevi kojima bi parodontopatija mogla da ima uticaj na porođaj, treba imati u vidu da su parodontopatogeni neophodni, ali ne i dovoljni za nastanak i razvoj parodontopatije i da bi osnovna determinanta prijemivosti i težine bolesti mogao da bude inflamatorni odgovor domaćina (Offenbacher, 1996A). Udruženost između parodontopatije i spontanog prevremenog porođaja bi mogla da bude odraz izmenjenog imunoinflamatornog puta koji čini pacijentkinju prijemivom za oba patološka stanja. Prema tome, parodontopatija bi mogla da bude pokazatelj prijemivosti za spontani prevremeni porođaj, kao i specifični faktor rizika za isti.

Dosadašnja ispitivanja, iako na relativnom malom uzorku, su pokazala postojanje udruženosti parodontopatije i spontanog prevremenog porođaja. Rezultati kliničkih studija su pokazali da su majke koje su se spontano prevremeno porodile uglavnom

imale teže oblike parodontopatije nego majke koje su donele na svet odoj ad normalne telesne težine u regularnom terminu (Offenbacher i sar., 1996; Offenbacher i sar., 1998A). Ovakav nalaz može da sugeriše na to da su parodontalni status majke, biohemijske karakterisrike gingivalne te nosti i mikrobiološki sastav dentalnog plaka u vezi sa spontanim prevremenim poro ajem i ra anjem dece male telesne težine. Tako e, ovi rezultati govore u prilog postojanja potrebe za uvo enjem stomatologije u tokove opšte medicine, odnosno za uspostavljanje tzv. „medicinskih indikacija“ za parodontološko le enje u cilju o uvanja opšteg zdravlja pacijenta.

Obzirom da je pokazano je da se u osoba sa punom klini kom slikom parodontopatije redovno odvija tranzitorna bakterijemija, postoji mogu nost i hematogene translokacija parodontalnih patogena u fetopolacentalnu jedinicu, odnosno njihovog efekta na elije placente. Prekursorske elije humane placente, trofoblasti, prve se pojavljuju ve etvrtog dana nakon fertilizacije kao spoljašnji sloj elija blastociste i kasnije se diferentuju u druge tipove elija humane placente. Trofoblasti imaju krucijalan zna aj u odvijanju uspešne i zdrave trudno e, jer posreduju u kriti nim doga ajima kao što su implantacija, produkcija hormona trudno e, imunskoj zaštiti ploda, pove anju protoka krvi majke kroz placentu i poro aju. U toku ovog istraživanja ispitivan je citotoksi ni efekat *A. actinomycetemcomitans* izolata na ekstravilusnu trofoblastnu elijsku liniju HTR-8/SVneo elije. HTR-8/SVneo elijska linija dobijena iz humanog invazivnog ekstravilusnog trofoblasta je vrlo dobro okarakterisana (Graham i sar., 1993) i koristi se prilikom ispitivanja regulatornih mehanizama migracije i invazije ekstravilusnog trofoblasta (Gleeson i sar., 2001; Chakraborty i sar., 2003; Huber i sar., 2006). U literaturi je opisan citotoksi ni efekat bakterije *Porphyromonas gingivalis* na pojedine elijske linije trofoblasta, odnosno potvr eno je prisustvo ove

bakterije u sinciciotrofoblastima, horionskim trofoblastima, decidualnim elijama i amnionskim epitelnim elijama (Katz i sar., 2009). Iz tog razloga je u ovom istraživanju bakterija *P. gingivalis* koriš ena kao pozitivna kontrola. Rezultati ovog istraživanja su pokazali da su HTR-8/SVneo elije osetljive ne tretman *P. gingivalis*, ali da vremenska ni dozna zavisnost nemaju uticaja na broj živih elija nakon tretmana bakterijom *P. gingivalis*, jer se broj živih elija smanjio 47,2% u odnosu na kontrolu šest sati posle infekcije, dok je 24 sata od infekcije broj vijabilnih elija iznosio približno 58% u odnosu na kontrolu (Grafik 3.6).

U po etku ovog istraživanja, u fazi optimizacije uslova eksperimenta, trofoblastne elije su inficirane ve im brojem bakterija *A. actinomycetemcomitans* (MOI=500 i MOI=5000), a efekat infekcije se pratio nakon šest sati i 24 sata. Pove anje broja živih HTR-8/SVneo elija, 316,8% u odnosu na kontrolu, koje se uo avalo nakon šest sati od infekcije pri MOI=5000, prelazilo je u zna ajno smanjenje 24 sata posle infekcije. Nemerljiva apsorbance je govorila u prilog potpune lize HTR-8/SVneo elija (rezultati nisu prikazani), pa je zbog toga u daljim eksperimentima koriš en manji broj bakterija (MOI=50 i 500) i period inkubacije od 48h.

Blago smanjenje broja živih elija, 24,6% u odnosu na kontrolu je uo eno šest sati nakon infekcije bakterijom *A. actinomycetemcomitans* pri MOI=500, prelazi u statisti ki zna ajno smanjenje od 79.7% nakon 24 sata (Grafik 3.5). Dakle, broj živih ekstravilusnih trofoblastnih elija se zna ajno više smanjio kao posledica delovanja bakterije *A. actinomycetemcomitans* posle 24h u odnosu na efekat bakterije *Porphyromonas gingivalis*.

Me utim, 48 sati nakon infekcije bakterijom *A. actinomycetemcomitans* došlo je do statisti ki zna ajnog pove anja apsorbance, u pore enju sa periodom od 24 sata, bez

obzira na broj bakterija koji je korišćen u tretmanu (Grafik 3.5). Ovi rezultati otvaraju dalje moguće ispitivanja, u smislu utvrđivanja da li je povećanje apsorbance nastalo kao posledica povećane proliferacije ili zbog povećanja njihove metaboličke aktivnosti nakon infekcije.

Prema našim saznanjima ovo je prvo istraživanje gde je pokazan efekat bakterije *A. actinomycetemcomitans* na HTR-8/SVneo ćelijsku liniju trofoblasta, čime su utim neophodna su dalja istraživanja koja će pokazati koja vrsta ćelijske smrti nastupa kao rezultat infekcije-apoptoza ili autofagija.

Ova istraživanja sprovedena u uslovima *in vitro* predstavljaju osnov za dalje ispitivanje uticaja parodontopatogena na trofoblaste. Ne bi trebalo zanemariti mogućnost uticaja bakterija subgingivalnog dentalnog plaka na nastanak eklampsije/preeklampsije, za koje se sada zna da nisu oboljenja nego sindromi koji nastaju kao posledica udruženog delovanja više faktora, i jedan od najčešćih nalaza u preeklampsiji je smanjenje ili potpuno odsustvo invazije trofoblasta u spiralne arterije majke. U literaturi postoje brojni radovi novijeg datuma koji nedvosmisleno govore o pozitivnoj korelaciji parodontopatije i preeklampsije (Hirano i sar., 2012; Kunnen i sar., 2007; Vergens, 2008). Takođe, otvara se široko polje ispitivanja uloge parodontopatogena u nastanku komplikacija prvog trimestra trudnoće (npr. rani prekid trudnoće), pa bi buduća istraživanja trebala usmeriti u pravcu rasvetljivanja veze parodontopatija i različitih patologija trudnoće.

7. ZAKLJU CI ISTRAŽIVANJA

- Kultivacijom determinisana prevalencija bakterije *A. actinomycetemcomitans* u našoj populaciji iznosi oko 20%, pri emu je 90% izolata detektovano kod osoba obolelih od agresivne parodontopatije.
- Kultivacija uzoraka subgingivalnog dentalnog plaka na Kolumbija podlozi u cilju identifikacije bakterije *A. actinomycetemcomitans* se pokazala kao veoma zametna i nesigurna.
- Kultivacija uzoraka subgingivalnog dentalnog plaka na selektivnoj TSBV podlozi u cilju identifikacije *A. actinomycetemcomitans* se pokazala vrlo efikasnom, ali je za selekciju potencijalnih kandidata neophodno posmatrati kolonije pod svetlosnim mikroskopom.
- Najjednostavnija i najjeftinija metoda izolacija DNK bakterije *A. actinomycetemcomitans* tretmanom visokom temperaturom se pokazala neefikasnom, kao i izolacija DNK fenolom.
- Izolacija ukupne DNK *A. actinomycetemcomitans* je uspešna samo primenom pojedinih komercijalnih ekstrakcionih kitova.

- Na in kultivacije, odnosno da li se kultivacija obavlja na vrstoj ili u te noj podlozi, ne uti e na efikasnost izolacije DNK bakterije *A. actinomycetemcomitans*.
- Izolati su pokazali adhezivna svojstva tokom kultivacije u te nim medijumima i nakon šest meseci kontinuiranog presejavanja.
- Identifikacija bakterije *A. actinomycetemcomitans* PCR-om pomo u sekvence dela gena za 16S rRNK se nije pokazala uspešnom. Prajmeri specifi ni za vrstu su umnožili DNK i drugih bakterijskih vrsta prisutnih u uzorku subgingivalnog dentalnog plaka. Na osnovu ovih rezultata postavlja se pitanje neophodnosti pozitivne kontrole obzirom da o ekivani PCR produkt govori u prilog lažno pozitivnog rezultata.
- Multipleks PCR reakcije u cilju serotipizacije *A. actinomycetemcomitans* izolata primenjene prema literaturi nisu dale o ekivani rezultat.
- Konvencionalni PCR u cilju serotipizacije sa istim parovima prajmera kao i za multipleks PCR, ali pod restriktivnijim temperaturnim uslovima, je pokazao prisustvo serotipova b i e me u *A. actinomycetemcomitans* izolatima u našoj populaciji. Samo kod jednog ispitanika, obolelog od hroni ne parodontopatije, je detektovano prisustvo 2 serotipa, b i e. Kod ostalih ispitanika koji su bili kolonizovani bakterijom *A. actinomycetemcomitans* utvr eno je prisustvo serotipa e.

- *A. actinomycetemcomitans* izolati u našoj populaciji se ne odlikuju hiperleukotoksi nim fenotipom.

- PCR reakcija umnožavanja promotorskog regiona *ltx* operona se pokazala vrlo specifi nom u pogledu identifikacije bakterije *A. actinomycetemcomitans*.

- Odsustvo sva tri gena *cdt* operona kod svih klini kih *A. actinomycetemcomitans* izolata ukazuje na mali stepen homologije sekvence koriš enih prajmera sa sekvencom *cdtABC* operona naših izolata. Ovakav nalaz ne bi trebalo tuma iti odsustvom gena za CDT.

- *A. actinomycetemcomitans* izolati iz subgingivalnog dentalnog plaka su pokazali efekat inhibicije rasta na elijsku liniju trofoblasta.

8. LITERATURA

- Aas JA, Paster BJ, Stokes LN, Olsen I, Dewhirst FE. (2005) Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J Clin Microbiol.* **43**:5721–32.
- Ahmed HJ, Svensson LA, Cope LD et al. (2001) Prevalence of *cdtABC* genes encoding cytolethal distending toxin among *Haemophilus ducreyi* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* strains. *J Med Microbiol.* **50**:860–864.
- Akifusa S, Poole S, Lewthwaite J, Henderson B, Nair SP. (2001) Recombinant *Actinobacillus actinomycetemcomitans* cytolethal distending toxin proteins are required to interact to inhibit human cell cycle progression and to stimulate human leukocyte cytokine synthesis. *Infect Immun.* **69**:5925–30.
- Alaluusua S, Asikainen S, Lai CH. (1991) Intrafamilial transmission of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Periodontol.* **62**:207–10.
- Albandar JM, Lyngstadaas SP, Forbord B. (1996) PCR primers for the amplification of the 16S rRNA gene of oral bacteria and for the specific identification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Eur J Oral Sci.* **104**:144–7.
- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**: 3389–3402.
- Armitage GC. (1999) Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol.* **4**:1-6.
- Armitage GC. (2004) Periodontal diagnoses and classification of periodontal diseases. *Periodontol 2000.* **34**:9–21.

- Ashimoto A, Chen C, Bakker I, and Slots J. (1996) Polymerase chain reaction detection of 8 putative periodontal pathogens in subgingival plaque of gingivitis and advanced periodontitis lesions. *Oral Microbiol Immunol.* **11**: 266-273.
- Asikainen S, Alaluusua S, Saxén L. (1991B) Recovery of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* from teeth, tongue, and saliva. *J Clin Periodontol.* **62**:203–6.
- Asikainen S, Chen C. (1999) Oral ecology and person to person transmission of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*. *Periodontol 2000.* **20**:65–81.
- Asikainen S, Chen C, Slots J. (1996) Likelihood of transmitting *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in families with periodontitis. *Oral Microbiol Immunol.* **11**:387-394.
- Asikainen S, Lai CH, Alaluusua S, Slots J. (1991A) Distribution of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotypes in periodontal health and disease. *Oral Microbiol Immunol.* **6**:115–8.
- Ass JA, Paster BJ, Stokes LN, Olsen I, Dewhirst FE. (2005) Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J Clin Microbiol.* **43**: 5721-5732.
- Baehni P, Tsai CC, McArthur WP, Hammond BF, Taichman NS. (1979) Interaction of inflammatory cells and oral microorganisms. VIII. Detection of leukotoxic activity of a plaque-derived Gram-negative microorganism. *Infect Immun.* **24**:233-243.
- Baehni PC, Tsai CC, McArthur WP, Hammond BF, Shenker BJ, Taichman NS (1981) Leukotoxic activity in different strains of the bacterium *Actinobacillus*

actinomycetemcomitans isolated from juvenile periodontitis in man. *Arch Oral Biol.* **26**:671-676.

Baelum V. (1998) The epidemiology of destructive periodontal disease. Causes, paradigms, problems, methods, and empirical evidence. *Thesis*. Aarhus Royal Dental College, University of Aarhus.

Baker PJ, Butler R, Wikesjö UME. (1991) Bacterial sampling by absorbant paper points. An in vitro study. *J Periodontol.* **62**:142–6.

Balashova NV, Diaz R, Balashov SV, Crosby JA, Kachlany SC. (2006B) Regulation of *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans* leukotoxin secretion by iron. *J Bacteriol.* **188**: 8658–61.

Balashova NV, Crosby JA, Al Ghofaily L, Kachlany SC. (2006A) Leukotoxin confers beta-hemolytic activity to *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect Immun.* **74**:2015–21.

Baltch A., Pressman HL, Schaffer C, Smith RP, Hammer MC, Breslau MN, Brown GG, DelDotto JE, Kumar S, Ezhuthachan S, Andreski P, Hufnagle KG. (1996) Psychiatric sequelae of low birth weight at 6 years of age. *J Abnorm Child Psychol.* **24**:385–400.

Bechter OE, Eisterer W, Dirnhofer S, Pall G, Kuhr T, Stauder R, *et al.* (1999) Expression of LFA-1 identifies different prognostic subgroups in patients with advanced follicle center lymphoma (FCL). *Leuk Res.* **23**:483-488.

Beem JE, Hurley CG, Magnusson I, McArthur WP, Clark WB. (1991) Subgingival microbiota in squirrel monkeys with naturally occurring periodontal diseases. *Infect Immun.* **59**:4034–41.

- Beikler T, Schnitzer S, Abdeen G, Ehmke B, Eisenacher M, Flemmig TF. (2006) Sampling strategy for intraoral detection of periodontal pathogens before and following periodontal therapy. *J Periodontol.* **77**:1323–32.
- Berezow AB, Jin L, Darveau RP. (2008) The molecular basis of host defence mechanisms in oral disease. In: Rogers AH, editor. *Molecular Oral Microbiology.* Caister Academic Press. 237–55.
- Berthold P, Forti D, Kieba IR, Rosenbloom J, Taichman NS, Lally ET. (1992) Electron immunocytochemical localization of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin. *Oral Microbio Immunol.* **7**:24–27.
- Birkedal-Hansen H. (1993) Role of cytokines and inflammatory mediators in tissue destruction. *J Periodontal Res.* **28**:500–10.
- Brogan JM, Lally ET, Poulsen K, Kilian M, Demuth DR. (1994) Regulation of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin expression: analysis of the promoter regions of leukotoxic and minimally leukotoxic strains. *Infect Immun.* **62**:501–8.
- Brown LJ, Loe H. (1993) Prevalence, extent, severity and progression of periodontal disease. *Periodontol 2000.* **2**:57–71.
- Bueno LC, Mayer MPA, DiRienzo JM. (1998) Relationship between conversion of localized juvenile periodontitis- susceptible children from health to disease and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin promoter structure. *J Periodontol.* **69**:998–1007.
- Byrne J, Ellsworth C, Bowering E, Vincer M. (1993) Language development in low birth weight infants: the first two years of life. *J Dev Behav Pediatr.* **14**:21–27.

- Cao SL, Progulsk-Fox A, Hillman JD, Handfield M. (2004) In vivo induced antigenic determinants of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *FEMS Microbiol Lett.* **237**:97-103.
- Carlsson G, Wahlin YB, Johansson A, Olsson A, Eriksson T, Claesson R, et al. (2006) Periodontal disease in patients from the original Kostmann family with severe congenital neutropenia. *J Periodontol.* **77**:744–51.
- Carroll GC, Sebor RJ. (1980) Dental flossing and its relationship to transient bacteremia. *J Periodontol.* **51**:691–692.
- Casanova JL, Abel L. (2004) The human model: A genetic dissection of immunity to infection in natural conditions. *Nat Rev Immunol.* **4**:55-66.
- Chakraborty C, Barbin YP, Chakrabarti S, Chidiac P, Dixon SJ, Lala PK. (2003) Endothelin-1 promotes migration and induces elevation of [Ca²⁺] and phosphorylation of MAP kinase of a human extravillous trophoblast cell line. *Mol Cell Endocrinol.* **201**: 63-73.
- Chen C, Slots J. (1999) Microbiological tests for *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*. *Periodontol 2000.* **20**:53-64.
- Christersson LA, Slots J, Zambon JJ, Genco RJ. (1985) Transmission and colonization of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in localized juvenile periodontitis patients. *J Periodontol.* **56**:127–31.
- Christersson LA, Zambon JJ. (1993) Suppression of subgingival *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in localized juvenile periodontitis by systemic tetracycline. *J Clin Periodontol.* **20**:395–401.

- Christianson RE, van den Berg BJ, Milkovich L, Oechsli FW. (1981) Incidence of congenital anomalies among white and black live births with long-term follow-up. *Am J Public Health.* **71**:1333–1341.
- Chung HJ, Chung CP, Son SH, Nisengaard RJ. (1989) *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotypes and leukotoxicity in Korean localized juvenile periodontitis. *J Periodontol.* **60**:506–11.
- Claesson R, Johansson A, Belibasakis G, Hänström L, Kalfas S. (2002) Release and activation of matrix metalloproteinase 8 from human neutrophils triggered by the leukotoxin of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Periodontal Res.* **37**:353–9.
- Clinton SK, Fleet JC, Loppnow H, Salomon RN, Clark BD, Cannon JG, Shaw AR, Dinarello CA, P Libby. (1991) Interleukin-1 gene expression in rabbit vascular tissue in vivo. *Am J Pathol.* **138**:1005–1014.
- Cole J, Wang Q, Cardenas E, Fish J, Chai B, Farris RJ, Kulam-Syed-Mohideen AS, McGarrell DM, Marsh T, Garrity GM, Tiedje JM. (2009) *The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis.* *Nucleic Acids Res.* **37**:141-145.
- Cortelli SC, Jorge AO, Cortelli JR, Jordan SF, Haraszthy V. (2003) *Detection of highly and minimally leukotoxic Actinobacillus actinomycetemcomitans strains in patients with parodontal disease.* *Pesqui Odontol Bras.* **17**:183-188.
- Cox DP, Weathers DR. (2008) Leukocyte adhesion deficiency type 1: an important consideration in the clinical differential diagnosis of prepubertal periodontitis. A case report and review of the literature. *Oral Surg, Oral Med, Oral Pathol, Oral Radiol, Endod.* **105**:86–90.

- Czuprynski CJ, Welch RA. (1995) Biological effects of RTX toxins: the possible role of lipopolysaccharide. *Trends Microbiol.* **3**:480–3.
- Dahlén G. (1993) Role of suspected periodontopathogens in microbiological monitoring of periodontitis. *Adv Dent Res.* **7**:163–74.
- Dahlen G, Widar F, Teanpaisan R, Papapanou PN, Baelum V, Fejerskov O. (2002) *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in a rural adult population in southern Thailand. *Oral Microbiology Immunology.* **17**:137–142.
- Darveau RP, Tanner A, Page RC. (1997) The microbial challenge in periodontitis. *Periodontol 2000.* **14**:12–32.
- Debelian GJ, Olsen I, Tronstad L. (1995) Bacteremia in conjunction with endodontic therapy. *Endod Dent Traumatol.* **11**:142–149.
- De Rycke J, Oswald E. (2001) Cytolethal distending toxin (CDT): a bacterial weapon to control host cell proliferation. *FEMS Microbiol Lett.* **203**:141–48.
- Dileepan T, Kachlany SC, Balashova NV, Patel J, Maheswaran SK. (2007) Human CD18 is the functional receptor for *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* leukotoxin. *Infect Immun.* **75**:4851–4856.
- DiRienzo JM, Cornell S, Kazoroski L, Slots J. (1990) Probespecific DNA fingerprinting applied to the epidemiology of localized juvenile periodontitis. *Oral Microbiol Immunol.* **5**:49–56.
- DiRienzo JM, McKay TL. (1994) Identification and characterization of genetic cluster groups of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* isolated from the human oral cavity. *J Clin Microbiol.* **32**:75– 81.

- Dogan B, Saarela MH, Jousimies-Somer H, Alaluusua S, Asikainen S. (1999B) *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotypes e - biotypes, genetic diversity and distribution in relation to periodontal status. *Oral Microbiol Immunol.* **14**:98–103.
- Dogan B, Saarela M, Asikainen S. (1999A) Genotyping of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotype d isolates based on polymerase chain reaction. *Oral Microbiol Immunol.* **14**:387–90.
- Dogan B, Kipalev AS, Ökte E, Sultan N, Asikainen SE. (2008) Consistent intrafamilial transmission of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* despite clonal diversity. *J Periodontol.* **79**:307–15.
- Dongari-Bagtzoglou AI, Ebersole JL. (1996) Gingival fibroblast cytokine profiles in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*- associated periodontitis. *J Periodontol.* **67**:871–78.
- Donley TG, Donley KB. (1988) Systemic bacteremia following toothbrushing: a protocol for management of patients susceptible to infective endocarditis. *Gen Dent.* **36**:482–484.
- Drinnan AJ, Gogan C. (1990) Bacteremia and dental treatment. *J Am Dent Assoc.* **120**:378.
- Eick S, Pfister W. (2002) Comparison of microbial cultivation and a commercial PCR based method for detection of periodontopathogenic species in subgingival plaque samples. *J Clin Periodontol.* **29**:638-644.
- Eke PI, Braswell L, Arnold R, Fritz M. (1993) Sub-gingival microflora in *Macaca mulatta* species of rhesus monkey. *J Periodontal Res.* **28**:72–80.

- Fabris AS, DiRienzo JM, Wikstrom M, Mayer MPA. (2002) Detection of cytolethal distending toxin activity and cdt genes in *Actinobacillus actinomycetemcomitans* isolates from geographically diverse populations. *Oral Microbiol Immunol.* **17**:231–238.
- Fiehn NE, Larsen T, Christiansen N, Holmstrup P, Schroeder TV. (2005) Identification of periodontal pathogens in atherosclerotic vessels. *J Periodontol.* **76**:731–6.
- Fine DH, Markowitz K, Furgang D, Fairlie K, Ferrandiz J, Nasri C. (2007) *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and its relationship to initiation of localized aggressive periodontitis: longitudinal cohort study of initially healthy adolescents. *J Clin Microbiol.* **45**:3859-3869.
- Fitzhardinge PM. (1976) Follow-up studies of the low birth weight infant. *Clin Perinatol.* **3**:503–516.
- Flemmig TF, Rüdiger S, Hofmann U, Schmidt H, Plaschke B, Strätz A. (1995) Identification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in subgingival plaque by PCR. *J Clin Microbiol.* **33**:3102–5.
- Fletcher JM, Nair SP, Ward JM, Henderson B, Wilson M. (2001) Analysis of the effect of changing environmental conditions on the expression patterns of exported surface-associated proteins of the oral pathogen *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Microb Pathog.* **30**:359–68.
- Fox GE, Stackebrandt E, Hespell RB. (1980) The phylogeny of prokaryotes. *Science.* **209**:457–463.
- Fukunaga M, Tsuruda K. (2001) *Actinobacillus actinomycetemcomitans* induces lethal effects on the macrophage-like human cell line U937. *Oral Microbiol Immunol.* **16**:284–289.

- Genco R.J, Van Dyke TE, Levine MJ, Nelson RD, Wilson ME. (1986) Kreshover lecture. Molecular factors influencing neutrophil defects in periodontal disease. *J Dent Res.* **65**:1379–1391.
- Gleeson LM, Chakraborty C, McKinnon T, Lala PK. (2001) Insulin-like growth factor-1 stimulates human trophoblast migration by signaling through alpha5 beta1 integrin via mitogen activated protein kinase pathway. *J Clin Endocrinol Metab.* **86**: 2484-93.
- Gmür R, Baehni PC. (1997) Serum immunoglobulin G responses to various *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotypes in a young ethnographically heterogeneous periodontitis patient groups. *Oral Microbiol Immunol.* **12**: 1-10.
- Gmür R, McNabb H, Van Steenberg TJM, et al. (1993) Seroclassification of hitherto nontypeable *Actinobacillus actinomycetemcomitans* strains: evidence for a new serotype e. *Oral Microbiol Immunol.* **8**:116-120.
- Gmür R, Guggenheim B. (1994) Interdental supragingival plaque – a natural habitat of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides forsythus*, *Campylobacter rectus*, and *Prevotella nigrescens*. *J Dent Res.* **73**:1421-1428.
- Goncharoff P, Figurski DH, Stevens RH, Fine DH. (1993) Identification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*: polymerase chain reaction amplification of lktA-specific sequences. *Oral Microbiol Immunol.* **8**:105–10.
- Graham CH, Hawley TS, Hawley RG, MacDougall JR, Kerbel RS, Khoo N, Lala PK. (1993) Establishment and characterization of first trimester human trophoblast cells with extended lifespan. *Exp Cell Res.* **206**: 204-11.

- Grenier, D. (1992) Nutritional interactions between two suspected periodontopathogens, *Treponema denticola* and *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun.* **60**:5298–5301.
- Griffen AL, Leys EJ, Fuerst PA. (1992) Strain identification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* using the polymerase chain reaction. *Oral Microbiol Immunol.* **7**:240–3.
- Guthmiller JM, Kolodrubetz D, Kraig E. (1993) A panel of probes detects DNA polymorphisms in human and non-human primate isolates of a periodontal pathogen, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Microb Pathog.* **14**:103–15.
- Guthmiller JM, Lally ET, Korostoff J. (2001) Beyond the specific plaque hypothesis: Are highly leukotoxic strains of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* a paradigm for periodontal pathogenesis. *Crit Rev Oral Biol Med.* **12**:116–24.
- Haase EM, Bonstein T, Palmer J, Scannapieco FA. (2006) Environmental influences on *Actinobacillus actinomycetemcomitans* biofilm formation. *Arch Oral Biol.* **51**:299–314.
- Hack M, Caron B, Rivers A, Fanaroff AA. (1983) The very low birth weight infant: the broader spectrum of morbidity during infancy and early childhood. *J Dev Behav Pediatr.* **4**:243–249.
- Haffajee AD, Socransky SS, Ebersole JL, Smith DJ. (1984) Clinical, microbiological and immunological features associated with the treatment of active periodontitis lesions. *J Clin Periodontol.* **11**: 600–18.
- Haffajee AD, Socransky SS. (1992) Effect of sampling strategy on the false-negative rate for detection of selected subgingival species. *Oral Microbiol Immunol.* **7**:57–9.

- Haffajee AD, Socransky SS. (1994) Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontol 2000*. **5**:78–111.
- Hall TA. (1999) BioEdit. a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Series*. **41**:95-98.
- Hammond BF. (1992) Major bacterial diseases, p. 165–190. In J. Slots and M. A. Taubman (ed.), *Contemporary oral microbiology and immunology*. Mosby, St. Louis, Mo.
- Hanish FG, Dressen F, Uhlenbruck G. (1993) Quantitative micro-adhesion assay on polystyrene matrices. In: *Lectins and Glycobiology* (Gabijs HJ, Gabiys S, editors). Springer Laboratory p. 411-7.
- Haraszthy VI, Hariharan G, Tinoco EMB, Cortelli JR, Lally ET, Davis E, et al. (2000A) Evidence for the role of highly leukotoxic *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in the pathogenesis of localized juvenile and other forms of early-onset periodontitis. *J Periodontol*. **71**:912–22.
- Haraszthy VI, Zambon JJ, Trevisan M, Zeid M, Genco RJ.(2000B) Identification of periodontal pathogens in atheromatous plaques. *J Periodontol*. **71**: 1554–60.
- Hartroth B, Seyfahrt I, Conrads G.(1999) Sampling of periodontal pathogens by paper points: evaluation of basic parameters. *Oral Microbiol Immunol*. **14**:326–30.
- Haubek D, Ennibi O-K, Abdellaoui L, Benzarti N, Poulsen S. (2002) Attachment loss in Moroccan early onset periodontitis patients and infection with the JP2-type of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Clin Periodontol*. **29**:657–60.
- Haubek D, Ennibi O-K, Poulsen K, Poulsen S, Benzarti N, Kilian M. (2001) Early-onset periodontitis in Morocco is associated with the highly leukotoxic clone of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Dent Res*. **80**:1580–83.

- Haubek D, Poulsen K, Asikainen S, Kilian M. (1995) Evidence for absence in Northern Europe of especially virulent clonal types of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Clin Microbiol.* **33**:395–401.
- Haubek D, Poulsen K, Westergaard J, Dahle'n G, Killan M. (1996) Highly toxic clone of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in geographically widespread cases of juvenile periodontitis in adolescents of African origin. *J Clin Microbiol.* **34**:1576–1578.
- Haubek D, Tinoco EM, Westergaard J, Lopez NJ, Chung CP, Poulsen K, et al. (1997A) Racial tropism of a highly toxic clone of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* associated with juvenile periodontitis. *J Clin Microbiol.* **35**:3037–42.
- Haubek D, Ennibi O-K, Poulsen K, Poulsen S, Benzarti N, Kilian M. (2001) Early-onset periodontitis in Morocco is associated with the highly leukotoxic clone of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Dent Res.* **80**:1580–3.
- Haubek D, Ennibi O-K, Abdellaoui L, Benzarti N, Poulsen S. (2002) Attachment loss in Moroccan early onset periodontitis patients and infection with the JP2-type of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Clin Periodontol.* **29**:657–60.
- Haubek D, Westergaard J.(2004) Detection of a highly toxic clone of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (JP2) in a Moroccan immigrant family with multiple cases of localized aggressive periodontitis. *Int J Paediatr Dent.* **14**:41-48.
- Haubek D, Ismaili Z, Poulsen S, Ennibi O-K, Benzarti N, Baelum V. (2005) Association between sharing of toothbrushes, eating and drinking habits and the presence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in Moroccan adolescents. *Oral Microbiol Immunol.* **20**:195–8.

- Haubek D, Havemose-Poulsen A, Westergaard J. (2006) Aggressive periodontitis in a 16-year-old Ghanaian adolescent, the original source of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* strain HK1651 – a 10-year follow up. *Int J Paediatr Dent.* **16**:370–5.
- Haubek D, Ennibi O-K, Vaeth M, Poulsen S, Poulsen K. (2009) Stability of the JP2 clone of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *J Dent Res.* **88**:856–60.
- Haubek D, Poulsen K, Kilian M. (2007) Microevolution and patterns of dissemination of the JP2 clone of *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans*. *Infect Immun.* **75**:3080–8.
- Haubek D, Ennibi O-K, Poulsen K, Vaeth M, Poulsen S, Kilian M. (2008) Risk of aggressive periodontitis in adolescent carriers of the JP2 clone of *Aggregatibacter (actinobacillus) actinomycetemcomitans* in Morocco: a prospective longitudinal cohort study. *Lancet.* **317**:237–42.
- He T, Nishihara T, Demuth DR, Ishikawa I. (1999) A novel insertion sequence increases the expression of leukotoxicity in *Actinobacillus actinomycetemcomitans* clinical isolates. *J Periodontol.* **70**:1261–8.
- Heimdahl A, Hall G, Hedberg M, Sandberg H, Soder PO, Tuner K, Nord CE. (1990) Detection and quantitation by lysis-filtration of bacteremia after different oral surgical procedures. *J Clin Microbiol.* **28**:2205–2209.
- Helgeland K, Norby O. (1993) Cell cyclespecific growth inhibitory effect on human gingival fibroblasts of a toxin isolated from the culture medium of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Periodontal Res.* **28**:161–65.

- Henderson B. (2000) Therapeutic control of cytokines: lessons from microorganisms. In Novel Cytokine Inhibitors, ed. GA Higgs, B Henderson, pp. 243–61. Basel: Birkhauser Verlag.
- Henderson B, Oyston PC. (2003) Bacterial Evasion of Host Immune Responses. Cambridge: Cambridge Univ Press.
- Hillier SL, Martius J, Krohn M, Kiviat N, Holmes KK, Eschenbach DA. (1988) A case-control study of chorioamnionic infection and histologic chorioamnionitis in prematurity. *N Engl J Med.* **319**:972–978.
- Hillier SL, Nugent RP, Eschenbach DA, Krohn MA, Gibbs RS, Martin DH, Cotch MF, Edelman R, Pastorek JG 2nd, Rao AV. (1995) Association between bacterial vaginosis and preterm delivery of a low-birth-weight infant. The Vaginal Infections and Prematurity Study Group. *N Engl J Med.* **333**:1737–1742.
- Hirano E, Sugita N, Kikuchi A, Shimada Y, Sasahara J, Iwanaga R, Tanaka K, Yoshie H. (2012) The association of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* with preeclampsia in a subset of Japanese pregnant women. *J Clin Periodontol.* **39**: 229–238.
- H Ittä P, Alaluusua S, Saarela M, Asikainen S. (1994) Isolation frequency and serotype distribution of mutans streptococci and *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, and clinical periodontal status in Finnish and Vietnamese children. *Scand J Dent Res.* **102**:113–9.
- Hopwood DA, Bibb MJ, Chater KF, Kieser T, Bruton CJ, Kieser HM, Lydiate DJ, Smith CP, Ward JM, Schrepf H. (1985) Genetic manipulation of *Streptomyces*. A laboratory manual. John Innes Foundation, Norwich, UK.

- Horst E, Radaszkiewicz T, Hoofman-den Otter A, Pieters R, van Dongen JJ, Meijer CJ, et al. (1991) Expression of the leucocyte integrin LFA-1 (CD11a/CD18) and its ligand ICAM-1 (CD54) in lymphoid malignancies is related to lineage derivation and stage of differentiation but not to tumor grade. *Leukemia*. **5**:848-853.
- Horwitz MC, Xi Y, Wilson K, Kacena MA. (2001) Control of osteoclastogenesis and bone resorption by members of the TNF family of receptors and ligands. *Cytol. Growth Fact Rev*. **12**:9–18.
- H rmand J, Frandsen A. (1979) Juvenile periodontitis. Localization of bone loss in relation to age, sex, and teeth. *J Clin Periodontol*. **6**:407–16.
- Hritz M, Fisher E, Demuth DR. (1996) Differential regulation of the leukotoxin operon in highly leukotoxic and minimally leukotoxic strains of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect Immun*. **64**: 2724–9.
- Huber AV, Saleh L, Bauer S, Husslein P, Knöfler. (2006) TNFalpha-mediated induction of PAI-1 restricts invasion of HTR-8/SVneo trophoblast cells. *Placenta*. **27**: 127-36.
- Iino Y, Hopps RM. (1984) The bone resorbing activities in tissue culture of lipopolysaccharides from the bacteria *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides gingivalis* and *Capnocytophaga ochracea* isolated from human mouths. *Arch Oral Biol*. **29**:59–63.
- Inoue T, Tanimoto I, Ohta H, Kato K, Murayama Y, Fukui K. (1998) Molecular characterization of low-molecular- weight component protein, Flp, in *Actinobacillus actinomycetemcomitans* fimbriae. *Microbiol Immunol*. **42**:253–8.

- Inouye T, Ohta H, Koikeguchi S, Fukui K, Kato K. (1990) Colonial variation and fimbriation of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *FEMS Microbio Lett.* **57**:13–17.
- Irving JA, Lysiak JJ, Graham CH, Hearn S, Han VK, Lala PK. (1995) Characteristics of trophoblast cells migrating from first trimester chorionic villus explants and propagated in culture. *Placenta.* **16**:413-33.
- Ishihara Y, Nishihara T, Maki E, Noguchi T, Koga T. (1989) Role of interleukin-1 and prostaglandin in in vitro bone resorption induced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* lipopolysaccharide. *J Periodontal Res.* **26**:155–60.
- Jankovic J. (2004) Dystonia: medical therapy and botulinum toxin. *Adv Neurol.* **94**:275-86.
- Jiang Y, Graves DT. (1999) Periodontal pathogens stimulate CC-chemokine production by mononuclear and bonederived cells. *J Periodontol.* **70**:1472–78.
- Johansson A, Claesson R, Hanstrom L, Sandstrom G, Kalfas S. (2000A) Polymorphonuclear leukocyte degranulation induced by leukotoxin from *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Periodontal Res.* **35**:85–92.
- Johansson A, Sandstrom G, Claesson R, Hanstrom L, Kalfas S. (2000B) Anaerobic neutrophil-dependent killing of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in relation to bacterial leukotoxicity. *Eur J Oral Sci.* **108**:136–46.
- Kachlany SC. (2010A) *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* leukotoxin: from threat to therapy. *J Dent Res.* **89**:561-570.
- Kachlany SC, Fine DH, Figurski DH. (2000) Secretion of RTX leukotoxin by *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect Immun.* **68**:6094–100.

- Kachlany SC, Planet PJ, Bhattacharjee MK, Kollia E, DeSalle R, et al. (2000) Nonspecific adherence by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* requires genes widespread in bacteria and archaea. *J Bacteriol.* **182**:6169–76.
- Kachlany SC, Schwartz AB, Balashova NV, Hioe CE, Tuen M, Le A, et al. (2010B) Anti-leukemia activity of a bacterial toxin with natural specificity for LFA-1 on white blood cells. *Leukemia Res.* **34**:777-89.
- Kalkwarf, K. L. (1978) Effect of oral contraceptive therapy on gingival inflammation in humans. *J Periodontol.* **49**:560–563.
- Kam EPY, Gardner L, Loke YW, King A. (1999) The role of trophoblast in the physiological change in decidual spiral arteries. *Human Reproduction.* **14**: 2131–2138.
- Kaplan JB, Perry MB, Maclean LL, Furgang D, Wilson ME, Fine DH. (2001) Structural and genetic analyses of O-polysaccharide from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotype f. *Infect Immun.* **69**: 5375–5384.
- Kaplan JB, Schreiner HC, Furgang D, Fine DH. (2002) Population structure and genetic diversity of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* strains isolated from localized juvenile periodontitis patients. *J Clin Microbiol.* **40**:1181–87.
- Karkelian D, Lear JD, Lally ET, Tanaka JC. (1998) Characterization of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin pore formation in HL60 cells. *Biochim Biophys Acta.* **1406**:175–87.
- Kato S, Kowashi Y, Demuth DT. (2002) Outer membrane-like vesicles secreted by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* are enriched in leukotoxin. *Microb Pathog.* **32**:1–13.

- Katz J, Chegini N, Shiverick KT, Lamont RJ. (2009) Localization of *P. gingivalis* in preterm delivery placenta. *J Dent Res.* **88**:575-578.
- Kaufmann P, Castellucci M. (1997) Extravillous trophoblast in the human placenta. *Trophoblast Res.* **10**:21-65.
- Kawai T, Eisen-Lev R, Seki M, Eastcott JW, Wilson ME, Taubman MA. (2000) Requirement of B7 costimulation for Th1-mediated inflammatory bone resorption in experimental periodontal disease. *J Immunol.* **164**:2102-9.
- Kilian M. (1982) Systemic disease: manifestations of oral bacteria, p. 832- 838. In J. R. McGhee, S. M. Michalek, and G. H. Cassell (ed.), *Dental microbiology. Harpers & Row*, Philadelphia, Pa.
- Kinane DF, Shiba H, Hart TC. (2005) The genetic basis of periodontitis. *Periodontol 2000.* **39**:91-117.
- Kinane DF, Demuth DR, Gorr SU, Hajishengallis GN, Martin MH. (2007) Human variability in innate immunity. *Periodontol 2000.* **45**:14-34.
- King A, Thomas L, Bishof P. (2000) Cell culture models of trophoblast II: trophoblast cell lines-a workshop report. *Placenta. 21: Troph Res. Supplement A.* **14**: S113-19.
- Kirby AC, Meghji S, Nair SP, White P, Reddi K, et al. (1995) The potent bone resorbing mediator of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* is homologous to the molecular chaperone GroEL. *J Clin Invest.* **96**:1185-94.
- Klinger R. (1912) Untersuchungen über menschliche Aktinomykose. *Zentralbl Bakteriol.* **62**:191-200.

- Kolenbrander PE, Palmer RJ Jr, Rickard AH, Jakubovich NS, Chalmers NI, Diaz PI. (2006) Bacterial interactions and successions during plaque development. *Periodontol 2000*. **42**:47-79.
- Kolodrubetz D, Dailey T, Ebersole J, Kraig E. (1989) Cloning and expression of the leukotoxin gene from *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect Immun*. **57**:1465–9.
- Kolodrubetz D, Spitznagel J, Wang B, Phillips LH, Jacobs C, Kraig E. (1996) cis elements and trans factors are both important in strain-specific regulation of the leukotoxin gene in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect Immun*. **64**:3451–60.
- Kolodrubetz D, Phillips L, Jacobs C, Burgum A, Kraig E. (2003) Anaerobic regulation of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin transcription is ArcA/FnrA-independent and requires a novel promoter element. *Res Microbiol*. **154**:645–53.
- Kong Y-Y, Feige U, Sarosi I, Bolan B, Tafuri A, et al. (1999) Activated T cells regulate bone loss and joint destruction in adjuvant arthritis through osteoprotegerin ligand. *Nature*. **402**:304–8.
- Korostoff J, Wang J-F, Kieba I, Miller M, Shenker BJ, Lally ET. (1998) *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin induces apoptosis in HL-60 cells. *Infect Immun*. **66**:4474–83.
- Korostoff J, Yamaguchi N, Miller M, Kieba I, Lally ET. (2000) Perturbation of mitochondrial structure and function plays a central role in *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin-induced apoptosis. *Microb Pathog*. **29**: 267–78.

- Kornman, K. S., and W. J. Loesche. (1980) The subgingival microbial flora during pregnancy. *Periodontal Res.* **15**:111–122.
- Kozarov EV, Dorn BR, Shelburne CE, Dunn WA, Progulske-Fox A. (2005) Human atherosclerotic plaque contains viable invasive *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **25**:e17–e18.
- Kroes I, Lepp PW, Relman DA. (1999) Bacterial diversity within the human subgingival crevice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **96**:14547–52.
- Kunnen A, Blaauw J, van Doormaal JJ, van Pampus MG, van der Schans CP, Aarnoudse JG, van Winkelhoff AJ, Abbas F. (2007) Women with a recent history of early-onset pre-eclampsia have a worse periodontal condition. *J Clin Periodontol.* **34**: 202–207.
- Kuritai Ochiai T, Ochiai K. (1996) Immunosuppressive factor from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* down regulates cytokine production. *Infect Immun.* **64**:50–54.
- Lakio L, Kuula H, Dogan B, Asikainen S. (2002) *Actinobacillus actinomycetemcomitans* proportion of subgingival bacterial flora in relation to its clonal type. *Eur J Oral Sci.* **110**:212–17.
- Lally ET, Hill RB, Kieba IR, Korostoff J. (1999) The interaction between RTX toxins and target cells. *Trends Microbiol.* **7**:356–61.
- Lally ET, Kieba IR, Demuth DR, Rosenbloom J, Golub EE, Taichman NS, *et al.* (1989) Identification and expression of the *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin gene. *Biochem Biophys Res Commun.* **159**:256-262.

- Lally ET, Kieba IR, Sato A, Green CL, Rosenbloom J, et al. (1997) RTX toxins recognize α_2 integrin on the surface of human target cells. *J Biol Chem.* **272**:30463–69.
- Lamster IB, Kaluszner-Shapira I, Herrera-Abreu M, Sinha R, Grbic JT. (1998) Serum IgG antibody response to *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*: implications for periodontal diagnosis. *J Clin Periodontol.* **25**:510–16.
- Lara-Tejero M, Galan JE. (2002) Cytolethal distending toxin: limited damage as a strategy to modulate cellular functions. *Trends Microbiol.* **10**:147–52.
- Lamster IB, Celenti RS, Jans HH, Fine JB, Grbic JT. (1993) Current status of tests for periodontal disease. *Adv Dent Res.* **7**:182-190.
- Leung WK, Ngai VKS, Yau JYY, Cheung BPK, Tsang PWK, Corbet EF. (2005) Characterization of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* isolated from young Chinese aggressive periodontitis patients. *J Periodont Res.* **40**:258–268.
- Lewis JP. The molecular basis of host-pathogen interaction in the oral cavity. (2008) In Rogers AH editor. *Molecular Oral Microbiology.* Caister Academic Press. 195–235.
- Li X, Koltveit KM, Tronstad L, Olsen I. (2000) Systemic diseases caused by oral infection. *Clinical Microbiology Reviews.* **13**:547-558.
- Little JW. (1991) Prosthetic implants: risk of infection from transient dental bacteremia. *Compendium.* **12**:160–164.
- Loomer PM. (2004) Microbiological diagnostic testing in the treatment of periodontal diseases. *Periodontol 2000.* **34**:49–56.

- Löe H, Anerud A, Boysen H, Morrison E. (1986) Natural history of periodontal disease in man. Rapid, moderate and no loss of attachment in Sri Lankan laborers 14 to 46 years of age. *J Clin Periodontol.* **13**:431–40.
- Löe H, Silness J. (1963) Periodontal disease in pregnancy: prevalence and severity. *Acta Odontol Scand.* **21**:532–551.
- Löe H, Theilade E, Börglum Jensen S. (1965) Experimental gingivitis in man. *J Periodontol.* **36**:177–87.
- Loesche WJ. (1994) Ecology of the oral flora, p. 307–319. In R. J. Nisengard and M. G. Newman (ed.), *Oral microbiology and immunology*, 2nd ed. W. B. Saunders, Philadelphia, Pa.
- Loesche WJ. (1994) Periodontal disease as a risk factor for heart disease. *Compendium.* **15**:976, 978–982, 985–986 passim.
- Loesche WJ. (1997) Association of the oral flora with important medical diseases. *Curr Opin Periodontol.* **4**:21–28.
- Loesche WJ, Lopatin DE. (1998) Interactions between periodontal disease, medical diseases and immunity in the older individual. *Periodontol 2000.* **16**:80–105.
- Lofthus JE, Waki MY, Jolkovsky DL, Otomo-Corgel J, Newman MG, Flemmig T, Nachnani S. (1991) Bacteremia following subgingival irrigation and scaling and root planing. *J Periodontol.* **62**:602–607.
- Marchesi JR, Sato T, Weightman AJ, Martin TA, Fry JC, Hiom SJ, Wade WG. (1998) Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol.* **64**:795-799.

- Marcus AJ, Hajjar DP. (1993) Vascular transcellular signaling. *J. Lipid Res.* **34**:2017–2031.
- Marques da Silva R, Caugant DA, Lingaas PS, Geiran O, Tronstad L, Olsen I. (2005) Detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* but not bacteria of the red complex in aortic aneurysms by multiplex polymerase chain reaction. *J Periodontol.* **76**:590–4.
- Marsh PD. (1989) Host defenses and microbial homeostasis: Role of microbial interactions. *J Dent Res.* **68**:S1567–S75.
- Marsh PD. (1991) The significance of maintaining the stability of the natural microflora of the mouth. *Br Dent J.* **171**:174-177.
- Marsh PD. (2006) Dental laque as a biofilm and a microbial community-implications for health and disease. *BMC Oral Health.* **6** (Suppl 1): 14.
- Marsh PD. (1944) Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. *Adv Dent Res.* **8**:263–71.
- Marsh P, Martin M. (1992) Oral Microbiology, 3rd edn. London SE1 8HN: Chapman and Hall, 2-6 Boundary Row.
- Mattila KJ. (1989) Viral and bacterial infections in patients with acute myocardial infarction. *J Intern Med.* **225**:293–296.
- Mayer MP, Bueno LC, Hansen EJ, DiRienzo JM. (1999) Identification of a cytolethal distending toxin gene locus and features of a virulence-associated region in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect Immun.* **67**:1227–37.
- Maynard Smith J, Smith NH, O'Rourke M, Spratt BG. (1993) How clonal are bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA.* **90**:4384–88.

- McCall MG, Acheson ED. (1968) Respiratory disease in infancy. *J Chronic Dis.* **21**:349–359.
- McCormick MC. (1985) The contribution of low birth weight to infant mortality and childhood morbidity. *N Engl J Med.* **312**:82–90.
- McGhee JR. (1982) Microbial pathogenic mechanisms, p. 374–387. *In* J. R.
- McGhee S, Michalek M, Cassell GH. (ed.), Dental microbiology. Harper & Row, Philadelphia, Pa.
- Meghji S, Henderson B, Nair S, Wilson M. (1992) Inhibition of bone DNA and collagen synthesis by surface-associated material from bacteria implicated in the pathology of periodontal disease. *J Periodontol.* **63**:736–42.
- Meghji S, Henderson B, Wilson M. (1993) High titre antisera from patients with periodontal disease inhibit bacterial capsule-induced bone resorption. *J Periodontal Res.* **28**:115–21.
- Meng H, Xu L, Li Q, Han J, Zhao Y. (2007) Determinants of host susceptibility in aggressive periodontitis. *Periodontol 2000.* **43**:133–59.
- Mintz KP, Fives-Taylor PM. (1994) Identification of an immunoglobulin Fc receptor of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect Immun.* **62**:4500–5.
- Mizoguchi K, Ohta H, Miyagi A, Kurihara H, Takashiba S, Kato K, et al. (1997) The regulatory effect of fermentable sugar levels on the production of leukotoxin by *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *FEMS Microbiol Lett.* **146**:161–6.
- Mombelli A, Gmur R, Lang NP, Corbert E, Frey J. (1999) *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in Chinese adults. Serotype distribution and analysis of the leukotoxin gene promoter locus. *J of Clin Periodontol.* **26**:505–510.

- Moore WEC, Holdeman LV, Cato EP, Smibert RM, Burmeister JA, Palcains KG, et al. (1985) Comparative bacteriology of juvenile periodontitis. *Infect Immun* **48**:507–19.
- Muhle I, Rau MD, Ruskin J. (1979) Vertebral osteomyelitis due to *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *JAMA*. **241**:1824–5.
- Muller HP, Heinecke A, Fuhrmann A, Eger T, Zoller L. (2001) Intraoral distribution of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in young adults with minimal periodontal disease. *J Periodontal Res.* **36**:114–23.
- Murukami Y, Xu T, Helmerhorst EJ, Ori G, Troxler RF, et al. (2002) Inhibitory effects of synthetic histatin 5 on leukotoxin from *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Oral Microbiol Immunol.* **17**:143–49.
- Najar FZ. (2002) Sequence and analysis of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. PhD thesis. *Univ Oklahoma*. 272 pp.
- Nakano Y, Yoshida Y, Suzuki N, Yamashita Y, Koga T. (2000) A gene cluster for the synthesis of serotype d-specific polysaccharide antigen in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Biochim Biophys Acta.* **1493**:259–63.
- Narayan SM, Nagaraja TG, Chengappa MM, Stewart GC. (2002) Leukotoxins of Gram-negative bacteria. *Vet Microbiol.* **84**:337–56.
- Nishida E, Hara Y, Kaneko T, Ikeda Y, Ukai T, Kato I. (2001) Bone resorption and local interleukin-1 and interleukin-1 synthesis induced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide. *J Periodontal Res.* **36**:1–8.

- Nishihara T, Koga T, Hamada S. (1987) Extracellular proteinaceous substances from *Haemophilus actinomycetemcomitans* induce mitogenic responses in murine lymphocytes. *Oral Microbiol Immunol.* **2**:48–52.
- Nishihara T, Ishihara Y, Noguchi T, Koga T. (1989) Membrane IL-1 induces bone resorption in organ culture. *J Immunol.* **143**:1881–86.
- Nishihara T, Ohsaki Y, Ueda N, Saito N, Mundy GR. (1994) Mouse interleukin-1 receptor antagonist induced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* lipopolysaccharide blocks the effect of interleukin-1 on bone resorption and osteoclast-like cell formation. *Infect Immun.* **62**:390–97.
- Nishihara T, Ueda N, Amano K, Ishihara Y, Hayakawa H, et al. (1995) *Actinobacillus actinomycetemcomitans* Y4 capsular-polysaccharide-like polysaccharide promotes osteoclast-like cell formation by interleukin-1 production in mouse marrow cultures. *Infect Immun.* **63**:1893–98.
- Navazesh M, Mulligan R. (1995) Systemic dissemination as a result of oral infection in individuals 50 years of age and older. *Spec Care Dentist.* **15**:11–19.
- Newman MG, Socransky SS. (1977) Predominant cultivable microbiota in periodontosis. *J Periodontal Res.* **12**:120–128.
- Niederman R, Buyle-Bodin Y, Lu BY, Naleway C, Robinson P, Kent R. (1996) The relationship of gingival crevicular fluid short chain carboxylic acid concentration to gingival inflammation. *J Clin Periodontol.* **23**:743–749.
- Nishihara T, Koseki T. (2004) Microbial etiology of periodontitis. *Periodontol 2000.* **36**:14–26.
- Noiri Y, Li L, Ebisu S. (2001) The localization of periodontal disease-associated bacteria in human periodontal pockets. *J Dent Res.* **80**:1930–4.

- N rskov-Lauritsen N, Kilian M. (2006) Reclassification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Haemophilus aphrophilus*, *Haemophilus paraphrophilus* and *Haemophilus segnis* as *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* gen. nov., comb. nov., *Aggregatibacter aphrophilus* comb. nov. and *Aggregatibacter segnis* comb. nov., and emended description of *Aggregatibacter aphrophilus* to include V factor-dependent and V factor-independent isolates. *Int J Syst Evol Microbiol.* **56**:2135–46.
- Ochman H, Lawrence JG, Groisman EA. (2000) Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature.* **405**:299–304.
- Offenbacher S. (1996) Periodontal diseases pathogenesis. *Ann Periodontol.* **1**:821–878.
- Offenbacher S, Beck JD, Lief S, Slade G. (1998B) Role of periodontitis in systemic health: spontaneous preterm birth. *J Dent Educ.* **62**:852–858.
- Offenbacher S, Jared HL, O'Reilly PG, Wells SR, Salvi GE, Lawrence HP, Socransky SS, Beck JD. (1998A) Potential pathogenic mechanisms of periodontitis associated pregnancy complications. *Ann Periodontol.* **3**:233–250.
- Offenbacher S, Katz V, Fertik G, Collins J, Boyd D, Maynor G, McKaig R, Beck J. (1996) Periodontal infection as a possible risk factor for preterm low birth weight. *J Periodontol.* **67**:1103–1113.
- Offenbacher S, Lief S, Boggess KA, Murtha AP, Madianos PN, Champagne CM, McKaig RG, Jared HL, Mauriello SM, Auten RL Jr., Herbert WN, Beck JD. (2001) Maternal periodontitis and prematurity. Part I: obstetric outcome of prematurity and growth restriction. *Ann of Periodontol.* **6**:164–174.
- Offenbacher, S., and G. E. Salvi. (1999) Induction of prostaglandin release from macrophages by bacterial endotoxin. *Clin Infect Dis.* **28**:505–513.

- Oguchi M, Ishisaki A, Okahashi N, Koide M, Koseki T, et al. (1998) *Actinobacillus actinomycetemcomitans* toxin induces both cell cycle arrest in the G2/M phase and apoptosis. *Infect Immun.* **66**:5980–87.
- Ohta H, Fukui K, Kato K. (1989) Effect of bicarbonate on the growth of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in anaerobic fructose-limited chemostat culture. *J Gen Microbiol.* **135**:3485–95.
- Okabe K, Nakagawa K, Yamamoto E. (1995) Factors affecting the occurrence of bacteremia associated with tooth extraction. *Int J Oral Maxillofac Surg.* **24**:239–242.
- Olsen E, Duvic M, Frankel A, Kim Y, Martin A, Vonderheid E, et al. (2001) Pivotal phase III trial of two dose levels of denileukin diftitox for the treatment of cutaneous T-cell lymphoma. *J Clin Oncol.* **19**:376–388.
- Orrù G, Marini MF, Ciusa ML, Isola D, Cotti M, Baldoni M, Piras V, Pisano E, Montaldo C. (2006) Usefulness of real time PCR for the differentiation and quantification of 652 and JP2. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* genotypes in dental plaque and saliva. *BMC Infect Dis.* **13**:6:98.
- Otto BR, Verweij-van AMJJ, MacLaren DM. (1992) Transferrins and heme-compounds as iron sources for pathogenic bacteria. *Crit Rev Microbiol.* **18**:217–33.
- Page RC, Sims TJ, Engel LD, Moncla BJ, Bainbridge B, et al. (1991) The immunodominant outer membrane antigen of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* is located in the serotype-specific high-molecular-mass carbohydrate moiety of lipopolysaccharide. *Infect Immun.* **59**:3451–62.
- Paju S, Carlson P, Jousimies-Somer H, Asikainen S. (2000) Heterogeneity of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* strains in various human infections and

relationships between serotype, genotype, and antimicrobial susceptibility. *J Clin Microbiol.* **38**:79–84.

Pajukanta R, Asikainen S, Saarela M, Alaluusua S, Jousimies-Somer J. (1993) *In vitro* antimicrobial susceptibility of different serotypes of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Scand J dent Res.* **101**:209-303.

Paster BJ, Olsen I, Aas JA, Dewhirst FE. (2006) The breadth of bacterial diversity in the human periodontal pocket and other oral sites. *Periodontol 2000.* **42**:80–7.

Patrel L, Casalta JP, Habib G, Nezri D, Raoult D. (2004) *Actinobacillus actinomycetemcomitans* endocarditis. *Clin Microbiol Infect.* **10**:98–118.

Pavicic MJAMP, Van Winkelhoff AJ, Douque NH, Steures RWR, De Graaff J. (1994) Microbiological and clinical effects of metronidazole and amoxicillin in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*-associated periodontitis. A 2-year evaluation. *J Clin Periodontol.* **21**:107–12.

Persson S, Claesson R, Carlsson J. (1989) The capacity of subgingival microbiotas to produce volatile sulfur compounds in human serum. *Oral Microbiol Immunol.* **4**:169–172.

Persson S, Edlund MB, Claesson R, Carlsson J. (1990) The formation of hydrogen sulfide and methyl mercaptan by oral bacteria. *Oral Microbiol Immunol.* **5**:195–201.

Petit MDA, van Steenberg TJM, De Graaff J, van der Velden U. (1993A) Transmission of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in families of adult periodontitis patients. *J Periodontal Res.* **28**:85–100.

Pickett CL, Whitehouse CA. (1999) The cytolethal distending toxin family. *Trends Microbiol.* **7**:292–97.

- Pihlstrom BL, Michalowicz BS, Johnson NW. (2005) Periodontal diseases. *Lancet*. **366**:1809–20.
- Potts TV, Zambon JJ, Genco RJ. (1985) Reassignment of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* to the genus *Haemophilus* as *Haemophilus actinomycetemcomitans* comb nov. *Int J Syst Bacteriol*. **35**:337–41.
- Poulsen K, Theilade E, Lally ET, Demuth DR, Kilian M. (1994) Population structure of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*: a framework for studies of disease-associated properties. *Microbiol*. **140**:2049-06.
- Poulsen K, Ennibi O-K, Haubek D. (2003) Improved PCR for detection of the highly leukotoxic JP2 clone of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in subgingival plaque samples. *J Clin Microbiol*. **41**:4829–32.
- Pucar A, Milasin J, Lekovic V, Vukadinovic M, Ristic M, Putnik S, Kenny EB. (2007) Correlation between atherosclerosis and periodontal putative pathogenic bacterial infections in coronary and internal mammary arteries. *J Periodontol*. **78(4)**:677-82.
- Reddi K, Nair SP, White P, Hodges S, Tabona P, et al. (1996) Surface-associated material from the bacterium *Actinobacillus actinomycetemcomitans* contains a peptide which, in contrast to LPS, directly stimulates fibroblast interleukin-6 synthesis. *Eur J Biochem*. **236**:871–76.
- Reddi K, Wilson M, Poole S, Meghji S, Henderson B. (1995) Relative cytokinestimulating activities of surface components of the oral periodontopathic bacterium *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Cytokine*. **7**:534–41.

- Renvert S, Wikstrom M, Helmersson M, Dahlen G, Claffey N. (1992) Comparative study of subgingival microbiological sampling techniques. *J Periodontol* **63**:797–801.
- Riggio MP, Macfarlane TW, Mackenzie D, Lennon A, Smith AJ, Kinane D. (1996) Comparison of polymerase chain reaction and culture methods for detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in subgingival plaque samples. *J Periodontol Res.* **31**:496-501.
- Romero R, Baumann P, Gomez R, Salafia C, Rittenhouse L, Barberio D, Behnke E, Cotton DB, Mitchell MD. (1993) The relationship between spontaneous rupture of membranes, labor, and microbial invasion of the amniotic cavity and amniotic fluid concentrations of prostaglandins and thromboxane B2 in term pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.* **168**:1654–1664.
- Rosan B, Slots J, Lamont RJ, Listgarten MA, Nelson GM. (1988) *Actinobacillus actinomycetemcomitans* fimbriae. *Oral Microbiol Immunol.* **3**:58–63.
- Rosebury T. (1962) Microorganisms indigenous to man. New York: McGraw-Hill. 1-8.
- Rossello-Mora R, Amann R. (2001) The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiol Rev.* **25**:39–67.
- Rudney JD, Chen R, Sedgewick GJ. (2005) *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, and *Tannerella forsythensis* are components of a polymicrobial intracellular flora within human buccal cells. *J Dent Res.* **84**:59–63.
- Rudney JD, Chen R, Sedgewick GJ. (2001) Intracellular *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in buccal epithelial cells collected from human subjects. *Infect Immun.* **69**:2700–7.

- Saarela M, Asikainen S, Alaluusua S, Pyhälä L, Lai CH, Jousimies-Somer H. (1992) Frequency and stability of mono- or poly-infection by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotypes a, b, c, d or e. *Oral Microbiol Immunol.* **7**:277–9.
- Saarela M, Asikainen S, Chen C, Alaluusua S, Slots J. (1995) Comparison of arbitrarily primed polymerase chain reaction and ribotyping for subtyping *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Anaerobe.* **1**:97–102.
- Saarela M, Asikainen S, Jousimies-Somer H, Asikainen T, Von Troil-Linde'n B, Alaluusua S. (1993A) Hybridization patterns of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotypes a-e detected with an rRNA gene probe. *Oral Microbiol Immunol.* **8**:111–5.
- Saarela M, Dogan B, Alaluusua S, Asikainen S. (1999) Persistence of oral colonization by the same *Actinobacillus actinomycetemcomitans* strain(s). *J Periodontol.* **70**:504–9.
- Saarela M, von Troil-Linden B, Torkko H, Stucki AM, Alaluusua S, Jousimies-Somer H, et al. (1993B) Transmission of oral bacterial species between spouses. *Oral Microbiol Immunol.* **8**:349–54.
- Saarela M, Saxen L, Slots J. (1997) Clonal specificity of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in destructive periodontal disease. *Clin Infect Dis* **25**:S227– S229.
- Sakellari D, Katsikari A, Slini T, Ioannidis I, Konstantinidis A, Arsenakis M. (2011) Prevalence and distribution of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* serotypes and the JP2 clone in a Greek population. *J Clin Periodontol.* **38**:108–114.

- Saxén L, Asikainen S. (1993) Metronidazole in the treatment of localized juvenile periodontitis. *J Clin Periodontol.* **20**:166–71.
- Saxén L, Murtomaa H. (1985) Age-related expression of juvenile periodontitis. *J Clin Periodontol.* **12**:21–6.
- Scannapieco FA. (1998) Position paper: periodontal disease as a potential risk factor for systemic diseases. *J Periodontol.* **69**:841–850.
- Schaeffer LM, Schmidt ML, Demuth DR. (2008) Induction of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* leukotoxin expression by IS1301 and orfA. *Microbiology* **154**:528–38.
- Shah HN, SE Gharbia. (1995) The biochemical milieu of the host in the selection of anaerobic species in the oral cavity. *Clin Infect Dis.* **20**: S291–S300.
- Shapiro S, McCormick MC, Starfield BH, Krischer JP, Bross D. (1980) Relevance of correlates of infant deaths for significant morbidity at 1 year of age. *Am J Obstet Gynecol.* **136**:363–373.
- Shayegani, Michelsen P. (1988) Bacteremia in patients undergoing prophylaxis as recommended by the American Heart Association, 1977. *Arch Intern Med.* **148**:1084–1088.
- Shenker BJ, Besack D, McKay T, Pankoski L, Zekavat A, Demuth DR. (2004) *Actinobacillus actinomycetemcomitans* cytolethal distending toxin (Cdt): evidence that the holotoxin is composed of three subunits: CdtA, CdtB, and CdtC. *J Immunol.* **172**: 410–417.
- Shenker BJ, Besack D, McKay T, Pankoski L, Zekavat A, Demuth DR. (2005) Induction of cell cycle arrest in lymphocytes by *Actinobacillus*

actinomycetemcomitans cytolethal distending toxin requires three subunits for maximum activity. *J Immunol.* **174**:2228–2234.

Shenker BJ, Hoffmaster RH, McKay TL, Demuth DR. (2000) Expression of the cytolethal distending toxin (Cdt) operon in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*: evidence that the CdtB protein is responsible for G2 arrest of the cell cycle in human T cells. *J Immunol.* **165**:2612–18.

Shenker BJ, Hoffmaster RH, Zekavat A, Yamaguchi N, Lally ET, Demuth DR. (2001) Induction of apoptosis in human T cells by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* cytolethal distending toxin is a consequence of G2 arrest of the cell cycle. *J Immunol.* **167**:435–41.

Shenker BJ, Kushner ME, Tsai C-C. (1982) Inhibition of fibroblast proliferation by *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect Immun.* **38**:986–992.

Shenker BJ, McKay T, Datar S, Miller M, Chowhan R, Demuth D. (1999) *Actinobacillus actinomycetemcomitans* immunosuppressive protein is a member of the family of cytolethal distending toxins capable of causing a G2 arrest in human T cells. *J Immunol.* **162**:4773–80.

Shenker BJ, Vitale LA, Kieba I, Harrison G, Berthold P, et al. (1994) Flow cytometric analysis of the cytotoxic effects of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin on human natural killer cells. *J Leukoc Biol.* **55**:153–60.

Shenker BJ, Vitale LA, Welham DA. (1990) Immune suppression induced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans*: effects on immunoglobulin production by human B cells. *Infect Immun.* **58**:3856–3862.

Silness J, Løe H. (1964) Periodontal disease in pregnancy. II. Correlation between oral hygiene and periodontal condition. *Acta Odontol Scand.* **22**:121–135.

- Slots J.(1982) Selective medium for isolation of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*.
J Clin. Microbiol. **15**:606–609.
- Slots J, Listgarten MA. (1988) *Bacteroides gingivalis*, and *Bacteroides intermedius* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal diseases. *J Clin Periodontol.* **15**:85–93.
- Slots J, Rosling BG. (1983) Suppression of the periodontopathic microflora in localized juvenile periodontitis by systemic tetracycline. *J Clin Periodontol.* **10**:465–86.
- Socransky SS. (1977) Microbiology of periodontal disease - present status and future considerations. *J Periodontol.* **48**:497–504.
- Socransky SS, Haffajee AD. (1992) The bacterial etiology of destructive periodontal disease: current concepts. *J Periodontol.* **63**:S322–S31.
- Socransky SS, Haffajee AD. (1994) Evidence of bacterial etiology: a historical perspective. *Periodontol 2000.* **5**:7–25.
- Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL. (1998) Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol.* **25**:134–44.
- Socransky SS, Haffajee AD. (2005) Periodontal microbial ecology. *Periodontol 2000.* **38**:135–87.
- Sommerfelt K, Troland K, Ellertsen B, Markestad T. (1996) Behavioral problems in low-birth weight preschoolers. *Dev Med Child Neurol.* **38**:927–940.
- Spitznagel J, Kraig E, Kolodrubetz D. (1991) Regulation of leukotoxin and nonleukotoxic strains of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect Immun.* **59**:1394–401.
- Spitznagel J, Kraig E, Kolodrubetz D. (1995) The regulation of leukotoxin production in *Actinobacillus actinomycetemcomitans* strain JP2. *Adv Dent Res.* **9**:48-54.

- Sreenivasan PK, Meyer DH, Fives-Taylor PM. (1993) Factors influencing the growth and viability of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Oral Microbiol Immunol.* **8**:361–9.
- Sugai M, Kawamoto T, Peres SY, Ueno Y, Komatsuzawa H, et al. (1998) The cell cycle-specific growth-inhibitory factor produced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* is a cytolethal distending toxin. *Infect Immun.* **66**:5008–19.
- Suzuki N, Nakano Y, Yoshida Y, Ikeda D, Koga T. (2001) Identification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotypes by multiplex PCR. *J Clin Microbiol.* **39**:2002–2005.
- Syed SA, Loesche WJ. (1972) Survival of human dental plaque flora in various transport media. *Applied Microbiology.* **24**:638–644.
- Taichman NS, Iwase M, Lally ET, Shattil SJ, Cunningham ME, Korchak HM. (1991) Early changes in cytosolic calcium and membrane potential induced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin in susceptible and resistant cells. *J Immunol.* **147**:3587–94.
- Taichman NS, Wilton JM. (1981) Leukotoxicity of an extract from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* for human gingival polymorphonuclear leukocytes. *Inflammation.* **5**:1–12.
- Tan KS, Song KP, Ong G. (2002) Cytolethal distending toxin of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* Occurrence and association with periodontal disease. *J Periodontal Res.* **37**:268–272.
- Tanner ACR, Goodson JM. (1986) Sampling of microorganisms associated with periodontal disease. *Oral Microbiol Immunol.* **1**:15–20.

- Tanner ACR, Milgrom PM, Kent R, Mokeem SA, Page RC, Riedy CA, et al. (2002) The microbiota of young children from tooth and tongue samples. *J Dent Res.* **81**:53–7.
- Teixeira RE, Mendes EN, de Carvalho MAR, Nicoli JR, Farias LdM, Magalhaes PP. (2006) *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotype-specific genotypes and periodontal status in Brazilian subjects. *Can J Microbiol.* **52**:182–8.
- Teles FR, Haffajee AD, Socransky SS. (2008) The reproducibility of curet sampling of subgingival biofilms. *J Periodontol.* **79**:705–13.
- Teng YT. (2002) Mixed periodontal Th1- Th2 cytokine profile in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*-specific osteoprotegerin ligand (or RANK-L)-mediated alveolar bone destruction in vivo. *Infect Immun.* **70**:5269–73.
- Teng Y-TA, Nguyen H, Gao X, Kong YY, Gorczynski RM, et al. (2000) Functional human T-cell immunity and osteoprotegerin ligand control alveolar bone destruction in periodontal infection. *J Clin Invest.* **106**:R59–R67.
- Theilade E. (1986) The non-specific theory in microbial etiology of inflammatory periodontal diseases. *J Clin Periodontol.* **13**:905–11.
- Theilade E, Wright WH, Jensen SB, Løe H. (1966) Experimental gingivitis in man II. A longitudinal clinical and bacteriological investigation. *J Periodontal Res.* **1**:1–13.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. (1994) CLUSTALW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**:4673–4680.

- Thoden van Velzen SK, Abraham-Inpijn L, Moorer WR. (1984) Plaque and systemic disease: a reappraisal of the focal infection concept. *J Clin Periodontol.* **11**:209–220.
- Timmerman MF, Van der Weijden GA, Abbas F, Arief EM, Armand S, Winkel EG, et al. (2000) Untreated periodontal disease in Indonesian adolescents. Longitudinal clinical data and prospective clinical and microbiological risk assessment. *J Clin Periodontol.* **27**:932–42.
- Tinoco EMB, Stevens R, Haubek D, Lai CH, Balachandran S, Preus H. (1997B) Relationship of serotype, leukotoxin gene type and lysogeny in *Actinobacillus actinomycetemcomitans* to periodontal disease status. *Eur J Oral Sci.* **105**:310–7.
- Topley WWC, Wilson GS. (1929) The principles of bacteriology and immunity. London: *Edward Arnold.* 1–587.
- Tran SD, Rudney JD. (1999) Improved multiplex PCR using conserved and species-specific 16S rRNA gene primers for simultaneous detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteriodes forsythus*, and *Porphyromonas gingivalis*. *J Clin. Microbiol.* **37**:3504-3508.
- T njum T, Haas R. (1993) Identification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* by leukotoxin gene-specific hybridization and polymerase chain reaction assays. *J Clin Microbiol.* **31**:1856–9.
- Tsai CC, McArthur WP, Baehni PC, Evian C, Genco RJ, Taichman NS. (1981) Serum neutralizing activity against *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin in juvenile periodontitis. *J Clin Periodontol.* **8**:338–48.

- Tsai CC, McArthur WP, Baehni PC, Hammond BF, Taichman NS (1979) Extraction and partial characterization of a leukotoxin from a plaque-derived Gram-negative microorganism. *Infect Immun.* **25**:427-439.
- Tsai CC, Shenker BJ, DiRienzo JM, Malamud D, Taichman NS (1984) Extraction and isolation of a leukotoxin from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* with polymyxin B. *Infect Immun.* **43**:700-705.
- Tsai CC, Taichman S. (1986) Dynamics of infection by leukotoxic strains of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in juvenile periodontitis. *J Clin Periodontol* **11**:330-1.
- Uchida Y, Shiba H, Komatsuzawa H, Takemoto T, Sakata M, et al. (2001) Expression of IL-1 and IL-8 by human gingival epithelial cells in response to *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Cytokine* **14**:152-61.
- Ueda N, Nishihara T, Ishihara Y, Amano K, Kuroyanagi T, Noguchi T. (1995) Role of prostaglandin in the formation of osteoclasts induced by capsular-like polysaccharide antigen of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* strain Y4. *Oral Microbiol Immunol.* **10**:69-75.
- Van den Reijden WA, Brunner J, Bosch-Tijhof CJ, van Trappen S, Rijnsburger MC, de Graaff MP, van Winkelhoff AJ, Cleenwerck I, de Vos P. (2010) Phylogenetic variation of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* serotype e reveals an aberrant distinct evolutionary stable lineage. *Infect Genet Evol.* **10**:1124-31.
- Van den Berg BJ, Yerushalmy J. (1966) The relationship of the rate of intrauterine growth of infants of low birth weight to mortality, morbidity, and congenital anomalies. *J Pediatr.* **69**:531-545.

- Van der Reijden WA, Bosch-Tijhof CJ, van der Velden U, van Winkelhoff AJ. (2008) Java project on periodontal diseases: serotype distribution of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and serotype dynamics over an 8-year period. *J Clin Periodontol.* **35**:487–92.
- Van Dyke TE. (2009) The etiology and pathogenesis of periodontitis revisited. *J Appl Oral Science.* **17**:S1678-77572009000100001.
- Van Dyke TE. (2007A) Cellular and molecular susceptibility determinants for periodontitis. *Periodontol 2000.* **45**:10–3.
- Van Dyke TE. (2007B) Control of inflammation and periodontitis. *Periodontol 2000.* **45**:158–66.
- Van Dyke TE, Champagne CME. (1995) Neutrophils and oral disease. *Dtsch Zahnärztl.* **50**:278– 86.
- Van Dyke TE, Dowell Jr. VR, Offenbacher S, Snyder W, Hersh T. (1986) Potential role of microorganisms isolated from periodontal lesions in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Infect Immun.* **53**:671– 677.
- Van Winkelhoff AJ, Rodenburg JP, Goené RJ, Abbas F, Winkel EG, de Graaff J. (1989) Metronidazole plus amoxicillin in treatment of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* associated periodontitis. *J Clin Periodontol.* **16**:128–31.
- Van Winkelhoff AJ, Boutaga K. (2005) Transmission of periodontal bacteria and models of infection. *J Clin Periodontol.* **32**:16–27.
- Van Winkelhoff AJ, Slots J. (1999) *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in nonoral infections. *Periodontol 2000.* **20**: 122–35.

- Van Winkelhoff AJ, Tjihof CJ, de Graaff J. (1992) Microbiological and clinical results of metronidazole plus amoxicillin therapy in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*- associated periodontitis. *J Periodontol.* **63**:52–7.
- Vergnes JN. (2008) Studies suggest an association between maternal periodontal disease and preeclampsia. *Evidence-Based Dentistry.* **9**: 46–47.
- Ward JM, Fletcher J, Nair SP, Wilson M, Williams RJ, Poole S, Henderson B. (2001) Identification, using alkaline phosphatase fusions, of the exported proteins of the oral opportunistic pathogen, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect Immun.* **69**:2748–52.
- Weinberg A, Krisanaprakornkit S, Dale BA. (1998) Epithelial antimicrobial peptides: review and significance for oral applications. *Crit Rev Oral Biol Med.* **9**:399–414.
- Wiebe CB, Putnins EE. (2000) The periodontal disease classification system of the American Academy of Periodontology –an update. *J Can Dent Assoc.* **66**:594-597.
- White PA, Nair SP, Kim M-J, Wilson M, Henderson B. (1998) Molecular characterisation of an outer membrane protein of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* belonging to the OmpA family. *Infect Immun.* **66**:369–72.
- White PA, Patel M, Nair S, Ashmore J, Galgut P, et al. (1998) Control of the human cell cycle by a bacterial protein, gapstatin. *Eur J Cell Biol.* **77**:228–38.
- White PA, Wilson M, Nair SP, Kirby AC, Reddi K, Henderson B. (1995) Characterization of an antiproliferative surface-associated protein from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* which can be neutralised by sera from a proportion of patients with localised juvenile periodontitis. *Infect Immun.* **63**:2612– 18.

- Wilson M, ed. (2002) Bacterial Adhesion to Host Tissues: Mechanisms and Consequences. Cambridge: Cambridge Univ Press.
- Wilson M, Henderson B. (1995) Virulence factors of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *FEMS Rev Microbiol.* **17**:365–79.
- Wilson M, Kamin S, Harvey W. (1985) Bone resorbing activity of purified capsular material from *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Periodontal Res.* **20**:484–91.
- Wilson M, Reddi K, Henderson B. (1996) Cytokine-inducing components of periodontopathic bacteria. *J Periodontal Res.* **31**:393–407.
- Wilson ME, Bronson PM. (1997) Opsonization of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* by immunoglobulin G antibodies to the O-polysaccharide of lipopolysaccharide. *Infect Immun.* **65**:4690–95.
- Wilson ME, Bronson PM, Hamilton RG. (1995) Immunoglobulin G2 antibodies promote neutrophil killing of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect Immun.* **63**:1070–75.
- Woolverton CJ, Bryson CL, Redshaw PA, Paquet A. (1994) Immunomodulating activities of sodium-dodecyl-sulphate extracted antigens from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotype b. *Microb Ecol Health Dis.* **7**:275–82.
- Yamamoto M, Nishihara T, Koseki T, He T, Yamato K, Zhang Y-J, et al. (1997) Prevalence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotypes in Japanese patients with periodontitis. *J Periodontal Res.* **32**:676–81.
- Yamano R, Ohara M, Nishikubo S. et al. (2003) Prevalence of cytolethal distending toxin production in periodontopathogenic bacteria. *J Clin Microbiol.* **41**:1391–1398.

- Yang HW, Asikainen S, Dogan B, Suda R, Lai CH. (2004) Relationship of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotype b to aggressive periodontitis: frequency in pure cultured isolates. *J Periodontol.* **75**:592-599.
- Yang HW, Huang YF, Chan Y, Chou MY. (2005) Relationship of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotypes to periodontal condition: prevalence and proportions in subgingival plaque. *Eur J Oral Sci.* **113**:28–33.
- Young RS, Fortney KR, Gelfanova V, Phillips CL, Katz BP, et al. (2001) Expression of cytolethal distending toxin and hemolysin is not required for pustule formation by *Haemophilus ducreyi* in human volunteers. *Infect Immun.* **69**:1938–42.
- Zambon JJ, DeLuca C, Slots J, Genco RJ. (1983A) Studies of leukotoxin from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* using the promyelocytic HL-60 cell line. *Infect Immun.* **40**:205–212.
- Zambon JJ, Slots J, Genco RJ. (1983) Serology of oral *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and serotype distribution in human periodontal disease. *Infect Immun.* **41**:19-27.
- Zambon JJ, Umemoto T, De Nardin E, Nakazawa F, Christersson LA, Genco RJ. (1988) *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in the pathogenesis of human periodontal disease. *Adv Dent Res.* **2**:269–274.

Prilog 1.

EVIDENCIONI KARTON

Br. _____

Ime i prezime pacijenta:	
Broj telefona:	
Godište:	
Datum uzorkovanja:	

Kriterijumi za isklju enje

- upotreba antibiotika u predhodna 3 meseca
- upotreba antiinflamatorika nisu u predhodne 2 nedelje
- trudno a i laktacija
- prethodna terapija parodontopatije

I Li na anamneza :

<input type="checkbox"/> KVS	
<input type="checkbox"/> Metaboli ki poreme aji	<i>Diabetes mellitus</i>
<input type="checkbox"/> Reumatska i autoimuna oboljenja	
<input type="checkbox"/> Alergije	
<input type="checkbox"/> Hormonski poreme aji	
<input type="checkbox"/> Hematološki poreme aji	<i>Anemija</i>
<input type="checkbox"/> Parodontopatija	

II Porodi na anamneza :

III Loše navike :

<input type="checkbox"/> KVS	<input type="checkbox"/> Pušenje
<input type="checkbox"/> Degenerativna oboljenja CNS	<input type="checkbox"/> Alkohol
<input type="checkbox"/> Reumatska i autoimuna oboljenja	<input type="checkbox"/> Disanje na usta
<input type="checkbox"/> Dijabetes melitus 1 2	<input type="checkbox"/> Bruksizam
<input type="checkbox"/> Parodontopatije A H	<input type="checkbox"/> Lekovi

BIOGRAFIJA

Nataša /Sava/ Nikolić rođena je 17.08.1975. godine u Novom Sadu. Osnovnu školu i Gimnaziju završila u Inđiji. Stomatološki fakultet u Beogradu upisala je školske 1994/95. godine i diplomirala 16.03.2001. godine sa prosečnom ocenom 8,60. Na osnovnim studijama je bila nagrađena kao najbolji student III godine studija. Po završetku fakulteta obavila je obavezan lekarski staž u Domu zdravlja „Voždovac” i na Klinikama Stomatološkog fakulteta, a stručni ispit za doktore stomatologije je položila 30.04.2002. godine. Magistarske studije upisala je školske 2001/02. godine, a magistarsku tezu pod nazivom „Evaluacija primene preparata na bazi -trikalcijum fosfata u prezervaciji alveolarnog grebena nakon ekstrakcije zuba” odbranila je 16.10.2007. godine i stekla akademski naziv magistra stomatoloških nauka za naučnu oblast Parodontologija i oralna medicina. Specijalističke studije iz oblasti *Parodontologija i oralna medicina* upisala je 2003. godine, a specijalistički ispit položila 31.01.2007. godine, sa odličnim uspehom i stekla zvanje specijaliste parodontologije i oralne medicine. Od 2003. godine je zaposlena na Klinici za parodontologiju i oralnu medicinu u zvanju asistenta pripravnika. U zvanje asistenta izabrana je 2011. godine. Od 2011. god. angažovana na projektu Ministarstva prosvete i nauke Republike Srbije pod nazivom *Interakcija etiopatogenetskih mehanizama parodontopatije i periimplantitisa sa sistemskim bolestima današnjice* (broj projekta 41008).

Kao rezultat svojih istraživanja objavila je i saopštila 31 stručnih i naučnih radova, u časopisima i na skupovima međunarodnog i nacionalnog značaja i učestvovala na kongresima u zemlji i inostranstvu. Održala je pet predavanja po pozivu i bila mentor sedam naučnih radova studenata Stomatološkog fakulteta.

Član je Udruženja parodontologa Srbije, Srpskog lekarskog društva (SLD) – Sekcije za parodontologiju i Evropske federacije za parodontologiju (EFP). Govori engleski jezik i poznaje rad na računaru.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Наташа С. Николић Јакоба

број уписа _____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Карактеризација и токсична активност *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* изолата

- 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 докторанта

У Београду, 15.06.2012.



Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Наташа С. Николић Јакоба

Број уписа _____

Студијски програм _____

Наслов рада **Карактеризација и токсична активност *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* изолата**

Ментор Проф. др Саша Јанковић

Потписани Наташа С. Николић Јакоба

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 докторанта

у Београду, 15.06.2012.



Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

Карактеризација и токсична активност *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* изолата

која је моје ауторско дело.

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

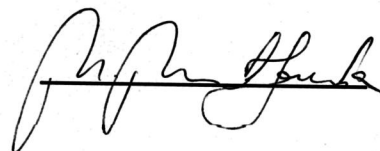
Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

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 докторанта

У Београду, 15.06.2012.



1. Ауторство - Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. Ауторство – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.