

Antioksidativna uloga pljuvačke u očuvanju zdravlja usta

Tatjana Todorović*, Ivan Dožić*, Bojan Mandić†, Marjan Marjanović‡

Stomatološki fakultet, *Institutski predmeti – Biohemija, †Klinika za maksilofacijalnu hirurgiju, Beograd; Vojnomedicinska akademija, ‡Klinika za stomatologiju, Beograd

K l j u č n e r e č i : pljuvačka; usta, bolesti; usta, zdravlje; stres, oksidativni; antioksidansi; slobodni radikali; superoksid dizmutaza; peroksidaze; lipidi, peroksidacija; periodontalne bolesti; usta, neoplazme.

Key words : saliva; mouth diseases; oral health; oxidative stress; antioxidants; free radicals; superoxide dismutase; peroxidases; lipid peroxidation; periodontal diseases; mouth neoplasms.

Uvod

U savremenoj medicini slobodnim radikalima i oksidativnom stresu poklanja se sve veća pažnja zbog njihove uloge u patogenezi mnogih oboljenja. Slobodni radikali su definisani kao atomi, joni ili molekuli sa jednim ili više nesparenih elektrona u poslednjoj orbitali zbog čega su izrazito reaktivni. U biološkim sistemima slobodni radikali su uglavnom derivati kiseonika: superoksid anjon radikal (O_2^-), vodonik peroksid (H_2O_2), hidroksilni radikal (OH^\cdot), perhidroksi radikal (OOH^\cdot), alkoksi radikal (RO^\cdot), peroksi radikal (ROO^\cdot). Konstantno se stvaraju u malim količinama u ćelijama tokom odigravanja fizioloških procesa kao „nusprodukti“ metabolizma (oksidativna fosforilacija u mitohondrijama, tzv. tkivno disanje, oksidacijska hidrosilacija u mikrozomima, autooksidacija različitih molekula, fagocitoza u leukocitima, oksido-redukcijski procesi u prisustvu metala promenljive valence). Tokom evolutivnog razvoja organizma uspostavljen je specifičan odbrambeni sistem od eventualnog štetnog delovanja slobodnih radikala, koji je označen kao antioksidativni sistem. Antioksidansom se smatra svaka supstancija koja, prisutna u manjoj koncentraciji u odnosu na supstancije koje se oksidišu, može da spreči ili značajno umanji njihovu oksidaciju. Prema prirodi i načinu delovanja antioksidansi se mogu podeliti na: enzimske (superoksid-dizmutaza, katalaza, glutation reduktaza, glutation-S-transferaza i dr.) i neenzimske (glutation, vitamini A, C i E,

albumini, ceruloplazmin, transferin, bilirubin, mokraćna kiselina i dr.) (1, 2).

Sve dok postoji ravnoteža između produkcije slobodnih radikala i antioksidativne zaštite ćelije slobodni radikali ne ispoljavaju štetan efekat. Prekomerno stvaranje slobodnih radikala (iznad fiziološkog nivoa) i/ili smanjenje koncentracije antioksidanasa dovode do oksidativnog oštećenja tkiva, koje se naziva i oksidativni stres. S obzirom na to da su visoko reaktivna jedinjenja, slobodni radikali mogu veoma brzo izazvati oksidativnu modifikaciju ćelijskih i ekstraćelijskih biomolekula kao što su: proteini, ugljeni hidrati, DNK, lipidi. Oksidacija tiolnih grupa (SH) mnogih strukturnih i funkcijskih proteina (enzima) dovodi do promene njihove aktivnosti. Kao najizraženiji negativni efekat delovanja slobodnih radikala navodi se oksidacija višestruko nezasićenih masnih kiselina sadržanih u ćelijskim membranama, poznata kao lipidna peroksidacija, tokom koje se oštećuje plazma membrane. Krajnji proizvod lipidne peroksidacije je kratkolančani malondialdehid (MDA), koji služi kao biohemijski marker stepena oksidativnog oštećenja ćelijskih membrana. Ovaj produkt lipidne peroksidacije može da reaguje sa slobodnim SH i NH_2 grupama aminokiselina, peptida, proteina, nukleotida i fosfolipida, dovodeći do kovalentne modifikacije ovih makromolekula, što dovodi do promene njihovih funkcijskih osobina (2).

Kao što je napred pomenuto danas se oksidativnom stresu pridaje značajna uloga u patogenezi mnogih sistem-

skih oboljenja (šećerna bolest, hronične bolesti CNS-a koje dovode do demijelinizacije, ateroskleroza, maligna oboljenja, alergijske bolesti, inflamacijske bolesti i dr.). Slobodni radikali i oksidativni stres odgovorni su i za proces starenja organizma (1–3).

Uloga oksidativnog stresa u patogenezi oralnih oboljenja usta

Uloga slobodnih radikala u nastanku oboljenja usta još uvek nije u potpunosti rasvetljena iako se u poslednje vreme sve veći značaj daje oksidativnom stresu u njihovoj patogenezi, posebno kada su u pitanju parodontopatija i oralni karcinom. Periodontalne bolesti se mogu okarakterisati kao oboljenja periodoncijuma koja nastaju kao posledica disbalansa između bakterijske kolonizacije usta i imunološke odbrane domaćina. U ustima identifikovano je više od 300 različitih bakterija, a većina je u komensalnom odnosu sa domaćinom. Tri vrste oralnih bakterija su posebno odgovorne za nastanak periodontalnih bolesti: *Porphyromonas gingivalis*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides forsythus*. Poznato je da su polimorfonukleusni leukociti (PMN) glavne odbrambene ćelije tkiva usne duplje koje je štite od štetnog delovanja bakterija. Interakcijom ovih leukocita i bakterija pokreću se različiti odbrambeni biohemijski i fiziološki procesi domaćina koji dovode do uništavanja patogena, ali i mogućeg oštećenja lokalnog tkiva. Polimorfonukleusni leukociti, indukovani patogenima, karakterišu se povećanom potrošnjom kiseonika i u njima se dešava prava „respiratorna eksplozija“ (*respiratory burst*) čija je posledica povećana produkcija slobodnih radikala kojim ove odbrambene ćelije „ubijaju“ bakterije. Međutim, tokom ove odbrambene reakcije može doći i do oksidativne modifikacije različitih biomolekula i oštećenja lokalnog tkiva, kao neke vrste „kolateralne štete“ (4–8).

I u patogenezi oralnog karcinoma danas se sve veći značaj poklanja slobodnim radikalima i oksidativnom stresu. Usta predstavljaju „ulazna vrata“ organizma za različite kancerogene materije iz zagađene životne sredine, što je posebno intenzivirano štetnim navikama, kao što je pušenje cigareta koje se dovodi u veoma blisku vezu sa nastankom karcinoma. Duvanski dim sadrži slobodne radikale, kao i supstancije koje uzrokuju pojačanu produkciju slobodnih radikala. Pored toga, pušenje cigareta uzrokuje i smanjenje antioksidativnog kapaciteta pljuvačke, što vodi ka još izraženijem narušavanju ravnoteže između slobodnih radikala i antioksidativne zaštite. U ovim uslovima su u preimućstvu slobodni radikali koji, zbog svoje izrazite reaktivnosti, mogu izvršiti oksidativnu modifikaciju DNK, što direktno vodi ka malignoj alteraciji ćelija (3, 9).

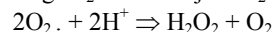
Antioksidansi pljuvačke

U zaštiti oralnih tkiva značajnu ulogu ima pljuvačka, kao sekret koji je u neprekidnom i neposrednom kontaktu sa svim oralnim strukturama. Prevashodni značaj pljuvačke je

održavanje oralne homeostaze, odnosno, očuvanje stalnog biohemijskog sastava oralnih tkiva, što ovaj sekret realizuje svojim brojnim organskim i neorganskim sastojcima. Najznačajnije uloge pljuvačke u pomenutom kontekstu jesu: samočišćenje usta od zaostalih čestica hrane, održavanje fizioloških vrednosti pH, održavanje integriteta čvrstih i mekih tkiva, specifična i nespecifična antimikrobna zaštita, antioksidativna zaštita. Pljuvačka je značajna i kao mogući biološki materijal za nove dijagnostičke testove koji bi mogli doprineti postavljanju dijagnoze i razjašnjavaњу patogeneze mnogih sistemskih oboljenja i oboljenja lokalizovanih u ustima (10–13).

U zaštiti oralnih tkiva od štetnog delovanja slobodnih radikala značajnu ulogu imaju antioksidansi. U pljuvački su prisutni neenzimski i enzimski antioksidansi. Enzimi pljuvačke koji ispoljavaju antioksidativnu sposobnost su: superoksid dizmutaza, oralna peroksidaza, katalaza i glutation peroksidaza. U neenzimске antioksidanse pljuvačke ubrajaju se: mokraćna kiselina, albumin, vitamin C i glutation (7, 10, 14).

Superoksid dizmutaza (SOD) katalizuje reakciju dizmutacije superoksid anjon radikala (O_2^-) u vodonik peroksid (H_2O_2) i kiseonik (O_2). U toku ove reakcije jedan O_2^- se oksiduje u O_2 , a drugi O_2^- se redukuje u H_2O_2 ;



Kod eukariota, uključujući i čoveka, prisutne su tri izoforme SOD: Cu, Zn-zavisna-SOD (citozolski enzim), Mn-zavisna-SOD (matriks mitohondrija) i ekstracelularna SOD. Prokariotske ćelije sadrže Fe i Mn-zavisnu SOD.

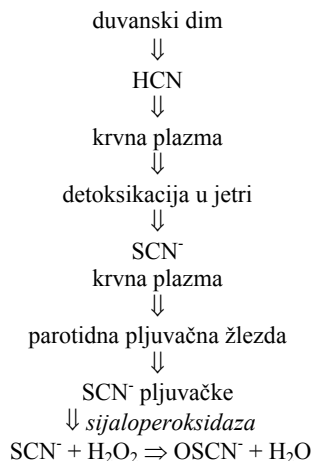
U istraživanjima je ustanovljena povećana aktivnost ovog enzima pljuvačke kod bolesnika sa rekurentnim aftoznim stomatitisom u odnosu na kontrolnu grupu. Autori ovo objašnjavaju pojačanom produkcijom slobodnih radikala od strane odbrambenih ćelija (leukocita), pa povećana aktivnost ovog antioksidativnog enzima predstavlja mehanizam adaptacije domaćina na ove nepovoljne uslove (2, 10, 14).

Oralna peroksidaza (OP) je enzim pljuvačke koji se sastoji iz dva peroksidazna enzima: salivarne peroksidaze (80%) i mijeloperoksidaze (20%). Ona je naznačajniji enzimski antioksidans pljuvačke.

Salivarnu peroksidazu luče glavne pljuvačne žlezde, uglavnom parotidna žlezda. To je enzim koji u svom aktivnom centru sadrži selen. Uloga salivarne peroksidaze je redukcija vodonik-peroksida (H_2O_2), produkta metabolizma oralnih bakterija, u prisustvu jona tiocijanata (SCN^-). Tiocijanati, sastojci pljuvačke (0,3–1,5 mM), predstavljaju donore elektrona, slično redukovanom glutationu u ostalim biološkim sistemima. Nastaju iz hidrogen-cijanida (HCN) duvanskog dima tokom detoksikacije u jetri, a zatim se putem krvi transportuju do pljuvačnih žlezda, gde ultrafiltracijom dospevaju u pljuvačku (slika 1).

Dejstvo salivarne peroksidaze katalizuje se reakcija H_2O_2 i jona tiocijanata. Proizvodi ove reakcije su hipotiocijanatna kiselina (HOSCN) i hipotiocijanati (OSCN⁻) koji ispoljavaju antibakterijsko dejstvo. Antibakterijska aktivnost ovih proizvoda zasnovana je na reakciji sa sulfhidrilnim

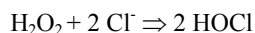
grupama bakterijskih enzima glikolize, kao što su: heksokinaza, aldolaza i piruvat kinaza. Pored uloge u nespecifičnoj antibakterijskoj zaštiti oralne sredine, ovaj enzim doprinosi i efikasnom uklanjanju H_2O_2 iz oralne sredine (9, 15).



Sl. 1 – Dejstvo salivarne peroksidaze (sijaloperoksidaze)

U pojedinim istraživanjima je analizovana aktivnost salivarne peroksidaze kod pušača sa aspekta nastanka oralnog karcinoma, s obzirom na to da pušenje cigareta predstavlja prvi na listi faktora rizika za nastanak ove maligne bolesti. Ustanovljeno je da se aktivnost salivarne peroksidaze značajno smanjuje kod pušača. Kao posledica javlja se nepotpuna eliminacija H_2O_2 iz oralne sredine, čijom se reakcijom sa ostalim radikalima i molekulima stvaraju mnogo reaktivniji slobodni radikali koji vrše oksidativno oštećenje biomolekula, kao što je DNK, a što može dovesti do maligne transformacije i nastanka oralnog karcinoma (9, 16, 17).

Mijeloperoksidaza (MPO) je HEM-zavisan enzim koga sadrže leukociti (neutrofili i monociti). U prisustvu H_2O_2 formira se sa mijeloperoksidazom kompleks enzim-supstrat, koji ima sposobnost da oksidiše jodide i hloride, stvarajući toksične proizvode. S obzirom na to da je jon hlora veoma rasprostranjen u biološkim sistemima, njegovom oksidacijom ovim kompleksom dobija se hipohlorna kiselina (HOCl):

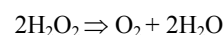


Ova kiselina ima izražena oksidativna svojstva i pri tome se dobijaju proizvodi (aktivne forme kiseonika) koji imaju, ne samo baktericidna svojstva nego učestvuju i u razgradnji neinfektivnih materija (toksini, inflamatorni regulatori).

Ispitivanja mijeloperoksidaze pljuvačke ukazuju na njenu povećanu aktivnost kod obolelih od različitih inflamacijskih procesa u ustima, što je posledica povećanja broja leukocita i povećane produkcije slobodnih radikala od strane ovih odbrambenih ćelija kojima „ubijaju“ patogene bakterije (15, 17).

Katalaza je enzim, po strukturi tetramer, a svaka subjedinica sadrži HEM koji ulazi u sastav aktivnog mesta. U

ćelijama je najviše prisutan u peroksizomima, gde u fiziološkim uslovima sprečava veće stvaranje H_2O_2 . Ovaj enzim katalizuje razgradnju H_2O_2 do molekuskog kiseonika i vode:



Aktivnost ovog enzima se povećava pri povećanoj produkciji H_2O_2 , jer aktivno učestvuje u detoksikaciji tkiva od H_2O_2 (2, 10).

Interesantni su rezultati istraživanja aktivnosti katalaze u pljuvački bolesnika sa rekurentnim aftoznim stomatitisom. Kao i u slučaju superoksid dizmutaze, rezultati su ukazali na povećanu aktivnost katalaze u pljuvački obolelih, u odnosu na kontrolnu grupu zdravih ispitanika. Povećana aktivnost katalaze predstavlja adaptibilni mehanizam domaćina kao reakcija na povećanu produkciju H_2O_2 od strane leukocita (18).

Pljuvačka u svom sastavu sadrži i neenzimske antioksidanse od kojih je najznačajnija mokraćna kiselina, zatim albumini, vitamin C (askorbat) i glutation, koji su prisutni u manjoj koncentraciji (7, 10, 14).

Mokraćna kiselina (*acidum uricum*) je krajnji proizvod metabolizma purinskih nukleotida. Nemogućnost dalje razgradnje mokraćne kiseline kod čoveka (zbog nedostatka enzima urikaze), kao i reapsorpcija na nivou tubula bubrega, obezbeđuju dovoljno visoku koncentraciju mokraćne kiseline u krvnoj plazmi. Zbog toga ovaj metabolit ima značajnu ulogu u ukupnom antioksidativnom kapacitetu krvne plazme. Međutim, njeno prisustvo u pljuvački nije u potpunosti razjašnjeno. Pretpostavlja se da se urati (soli mokraćne kiseline) pasivnom difuzijom transportuju iz cirkulacije u pljuvačku, gde joj je koncentracija niža nego u krvnoj plazmi. Postoji i mogućnost njenog prisustva u gingivalnoj tečnosti kao posledica oksidativnog oštećenja proteina lokalnog tkiva. Bez obzira na njeno poreklo, smatra se glavnim antioksidansom pljuvačke, jer ona učestvuje u oko 70% ukupnog salivarnog antioksidativnog kapaciteta (7, 14).

Mokraćna kiselina redukuje i neutrališe slobodne radikale i pri tome se sama oksidiše do alantoina. Prema tome, odnos koncentracije mokraćne kiseline i alantoina može predstavljati parametar procene stvaranja i delovanja slobodnih radikala u *in vivo* uslovima. Značajna je i uloga mokraćne kiseline u formiranju kompleksa sa jonima metala promenljive valence (urati- Fe^{+3}), jer smanjuje oksidacioni potencijal Fe^{+3} bez oksidativnih promena ove kiseline (2, 10).

Nekoliko studija na temu analizovanja koncentracije mokraćne kiseline u pljuvački bolesnika sa dijagnostikovanim periodontalnom bolešću ukazuju na smanjenje koncentracije ovog antioksidansa u pljuvački obolelih u odnosu na kontrolnu grupu zdravih ispitanika (7, 8, 19). Naša istraživanja pokazuju da je u pljuvački bolesnika sa oralnim karcinomom, koji su pušači, znatno smanjena koncentracija mokraćne kiseline u odnosu na kontrolnu grupu (20). I jedni i drugi rezultati se mogu objasniti „potrošnjom“ ovog antioksidansa u neutralisanju slobodnih radikala, čija se koncentracija prekomerno povećava u ovim patološkim stanjima.

Albumini su plazma proteini koji se sintetišu u jetri. Uloga albumina je u održavanju onkotskog pritiska, regulaciji pH krvi, transportu različitih supstancija, ali i u antioksidativnoj zaštiti. Iz krvi ultrafiltracijom dospevaju u pljuvačku (1, 2).

U našim istraživanjima određivana je koncentracija albumina u pljuvački bolesnika sa oralnim karcinomom. Dobijeni rezultati su pokazali na značajno smanjenje koncentracije albumina u pljuvački obolelih u odnosu na kontrolnu grupu (20). Smanjenje koncentracije albumina u pljuvački obolelih se može objasniti na isti način, kao i u slučaju mokraćne kiseline.

Glutation je tripeptid koji se sastoji iz glutaminske kiseline, cisteina i glicina. U ćelijama je prisutan u dva oblika: kao redukovan (GSH) i oksidovan (GSSG). Za normalno funkcionisanje ćelije naročito je značajno da u njoj uvek ima u dovoljnoj količini redukovane forme ovog biomolekula koji je neophodan za delovanje antioksidativnog enzima glutation peroksidaze. Ovaj enzim vrši oksidaciju glutatona, pri čemu se vrši neutralisanje vodonik-peroksida i drugih peroksida (1, 2, 10).

Istraživanja su pokazala da pušenje cigareta ima za posledicu smanjenje koncentracije ovog antioksidansa pljuvačke. Zbog toga, pored ostalih štetnih efekata, pušenje cigareta ima za posledicu i značajno smanjenje antioksidativnog kapaciteta pljuvačke (koncentracije glutatona i aktivnosti ranije pomenutog enzima oralne peroksidaze), što može predstavljati još jedan predisponirajući faktor za nastanak oralnog karcinoma (21).

Dva glavna patofiziološka mehanizma oksidativnog oštećenja biomolekula slobodnim radikalima jesu: lipidna peroksidacija polinezasićenih masnih kiselina plazma membrana, što ima za posledicu oštećenje ovih vitalnih ćelijskih struktura i oksidativna modifikacija DNK, koja vodi ka malignoj alteraciji ćelija. Step en oksidativnog oštećenja plazma membrana i DNK može se meriti određivanjem koncentracije produkata nastalih u tim procesima (2).

Najznačajniji biomarker stepena oksidativnog oštećenja DNK jeste 8-hidroksidezoksiguanozin (8-OhdG). Analiza ovog markera u pljuvački je vršena ELISA testom kod bolesnika sa periodontalnim oboljenjima pre i posle odgo-

varajuće terapije. Utvrđeno je da je koncentracija 8-OhdG u pljuvački bolesnika sa periodontalnim oboljenjem veća u odnosu na kontrolnu grupu, ali da se značajno smanjuje nakon odgovarajuće terapije (22).

Krajnji produkt lipidne peroksidacije jeste malondialdehid. Analizovanjem koncentracije MDA, mi smo pokazali da u pljuvački bolesnika obolelih od periodontalnih bolesti dolazi do porasta njegovog sadržaja u odnosu na grupu zdravih ispitanika (11, 23).

Analizovanje ukupnog antioksidativnog kapaciteta pljuvačke i njegovog značaja za nastanak oralnih oboljenja bilo je predmet nekoliko studija. Najčešće je ispitivan ukupni salivarni antioksidativni kapacitet u pljuvački obolelih od periodontalnih bolesti. Nekoliko studija je ukazalo na značajno smanjenje ukupnog antioksidativnog kapaciteta pljuvačke kod obolelih u odnosu na grupu zdravih ispitanika (4, 5, 8, 19, 24). Druga istraživanja su ukazala na smanjenje salivarnog antioksidativnog kapaciteta kod bolesnika obolelih od oralnog lihen planusa, koje se smatra nekom vrstom premalignog oboljenja (25).

Na osnovu izloženih rezultata može se zaključiti da slobodni radikali i oksidativni stres mogu imati važnu ulogu u patogenezi, ne samo sistemskih već i oboljenja lokalizovanih u oralnoj sredini. Ovo se posebno odnosi na najrasprostranjenija oralna oboljenja – periodontalne bolesti i oralni karcinom. U odbrani oralnih tkiva od štetnog delovanja slobodnih radikala najveći značaj ima pljuvačka sa svojim antioksidansima. Sve dok postoji ravnoteža između produkcije slobodnih radikala i aktivnosti salivarnog antioksidativnog sistema odbrane ne dolazi do oksidativnog oštećenja oralnih tkiva. Međutim, u slučaju disbalansa između produkcije slobodnih radikala i/ili sposobnosti salivarnih antioksidanasa da ih neutrališu, dolazi do oksidativnog stresa koji može biti biohemijaska osnova za nastanak oralnih oboljenja.

Izneseni rezultati imaju i praktični značaj, jer se u prevenciji oralnih oboljenja, pored već poznatih mera, mogu primeniti i egzogeni antioksidansi, kao što su pojedini vitamini (A, C i E), a u cilju poboljšanja antioksidativnog kapaciteta pljuvačke. Međutim, njihovu pravu vrednost u prevenciji i terapiji oralnih oboljenja treba tek potvrditi kroz dobro organizovane kliničke studije.

L I T E R A T U R A

1. *Dorđević V.* Biochemical oxidation. In: *Koraćević D, Bjelaković G, Dorđević V, Nikolić J, Pavlović D, Kocić G*, editors. *Biochemistry*. Beograd: Savremena administracija; 2000. p. 678–705. (Serbian)
2. *Dorđević V, Pavlović D, Kocić G.* *Biochemistry of free radicals*. 1st ed. Niš: Sirius Print; 2000. (Serbian)
3. *Hensley K, Robinson KA, Gabbita SP, Salsman S, Floyd RA.* Reactive oxygen species, cell signaling, and cell injury. *Free Radic Biol Med* 2000; 28(10): 1456–62.
4. *Brock GR, Butterworth CJ, Matthews JB, Chapple IL.* Local and systemic total antioxidant capacity in periodontitis and health. *J Clin Periodontol* 2004; 31(7): 515–21.
5. *Moore S, Calder KA, Miller NJ, Rice-Evans CA.* Antioxidant activity of saliva and periodontal disease. *Free Radic Res* 1994; 21(6): 417–25.
6. *Ozmeric N.* Advances in periodontal disease markers. *Clin Chim Acta* 2004; 343(1–2): 1–16.
7. *Nagler RM, Klein I, Zarzhevsky N, Drigues N, Reznick AZ.* Characterization of the differentiated antioxidant profile of human saliva. *Free Radic Biol Med* 2002; 32(3): 268–77.

8. *Sculley DV, Langley-Evans SC.* Salivary antioxidants and periodontal disease status. *Proc Nutr Soc* 2002; 61(1): 137–43.
9. *Klein I, Nagler RM, Toffler R, van Der Vliet A, Reznick AZ.* Effect of cigarette smoke on oral peroxidase activity in human saliva: role of hydrogen cyanide. *Free Radic Biol Med* 2003; 35(11): 1448–52.
10. *Todorović T.* Oral biochemistry. 1st ed. Beograd: Stručna knjiga; 2004. (Serbian)
11. *Todorović T, Dožić I, Pavlica D, Marković D, Brajović G, Stefanović G, et al.* Using of saliva as a diagnostic fluid in dentistry. *Srpsi Arhiv*. In press 2005. (Serbian)
12. *Pavlica D, Todorović T.* Saliva – diagnostic fluid? *Stom Glas S* 2001; (48): 137–41. (Serbian)
13. *Todorović T, Ljušković B, Jović P, Pejović J.* Salivary enzymes – possible biochemical markres of periodontal disease. *Stom Glas S* 1999; (46): 7–14.
14. *Battino M, Ferreira MS, Gallardo I, Newman HN, Bullon P.* The antioxidant capacity of saliva. *J Clin Periodontol* 2002; 29(3): 189–94.
15. *Pruitt KM, Kamau DN, Miller K, Mansson-Rahemtulla B, Rahemtulla F.* Quantitative, standardized assays for determining the concentrations of bovine lactoperoxidase, human salivary peroxidase, and human myeloperoxidase. *Anal Biochem* 1990; 191(2): 278–86.
16. *Nishioka T, Maki K, Kimura M, Takahama U.* Determination of salivary peroxidase activity in human mixed whole saliva. *Arch Oral Biol* 2003; 48(5): 397–400.
17. *Reznick AZ, Klein I, Eiserich JP, Cross CE, Nagler RM.* Inhibition of oral peroxidase activity by cigarette smoke: in vivo and in vitro studies. *Free Radic Biol Med* 2003; 34(3): 377–84.
18. *Karincaoglu Y, Batcioglu K, Erdem T, Esrefoglu M, Genc M.* The levels of plasma and salivary antioxidants in the patient with recurrent aphthous stomatitis. *J Oral Pathol Med* 2005; 34(1): 7–12.
19. *Sculley DV, Langley-Evans SC.* Periodontal disease is associated with lower antioxidant capacity in whole saliva and evidence of increased protein oxidation. *Clin Sci (Lond)* 2003; 105(2): 167–72.
20. *Mandić B, Todorović T.* Antioxidant status in oral cancer patients. *Oral Oncology* 2002; (8): 38–42.
21. *Zappacosta B, Persichilli S, De Sole P, Mordente A, Giardina B.* Effect of smoking one cigarette on antioxidant metabolites in the saliva of healthy smokers. *Arch Oral Biol* 1999; 44(6): 485–8.
22. *Sugano N, Yokoyama K, Oshikawa M, Kumagai K, Takane M, Tanaka H, et al.* Detection of *Streptococcus anginosus* and 8-hydroxydeoxyguanosine in saliva. *J Oral Sci* 2003; 45(4): 181–4.
23. *Todorović T, Pavlica D, Stefanović G, Dožić I, Brajović G.* Saliva – as a diagnostic fluid. *Stom Glas S* 2004; 51(2 Suppl): 17–9.
24. *Diab-Ladki R, Pellat B, Chahine R.* Decrease in the total antioxidant activity of saliva in patients with periodontal diseases. *Clin Oral Investig* 2003; 7(2): 103–7.

Rad je primljen 05. III 2005. god.